

棉铃疫病菌孢子囊产生及游动孢子悬液稀释的方法

单卫星 李君彦

(西北农业大学植保系, 陕西杨陵 712100)

摘要 本文报道棉铃疫病菌即苾麻疫霉菌(*Phytophthora boehmeriae*)孢子囊的离体生产及游动孢子悬液的稀释方法。将疫病菌菌饼置于马铃薯葡萄糖培养液(PDL)或菜豆葡萄糖培养液(BDL)中, 24℃条件下暗培养48-72小时, 然后将菌丝块在20-22℃条件下用矿质盐溶液(MSS)更换漂洗(4次)培养10-12小时并辅以光照(日光灯); 最后除去MSS, 继续光照培养12小时即可得到大量孢子囊。黑暗条件可抑制孢子囊的形成而促进卵孢子的产生。培养液采用BDL优于PDL, 除了产孢量更高外, 突出的特点表现在菌丝块的颜色变化与产孢同步, 菌丝块由淡橙色转变为紫色, 指示孢子大量产生。Tris-琥珀酸盐缓冲液(Tris-Succinate Buffer, TSB, pH6.8, 5.0mmol/L)是效果很好的定量稀释液, 可维持游动孢子较高的运动活性。

关键词 棉铃疫病菌(*Phytophthora boehmeriae*); 孢子囊离体生产; 游动孢子运动活性

棉铃疫病早在50年代已有记载, 它是我国黄河和长江流域棉区的主要病害^[1]。目前棉铃疫病仍然是棉花棉铃病中最重要的病害之一, 并有上升为我国棉花主要病害的趋势^[2,3]。经研究鉴定我国棉铃疫病的主要致病菌是苾麻疫霉菌(*Phytophthora boehmeriae*)^[4]。

用人工简易法大量生产棉铃疫病菌的无性繁殖体——孢子囊, 是深入开展棉花品种抗病性鉴定和抗源材料筛选; 疫病菌致病机制和病害流行规律等研究工作的基础。棉铃疫病菌孢子囊离体生产的简易方法至今尚未见报道。在以往的研究中棉铃疫病菌的接种方法一般采用菌丝块贴接法^[1,4], 与自然条件下的侵染有较大出入(待发表)。疫病菌游动孢子浓度的调整亦是植物疫霉病研究中尚未很好解决的基本问题之一, 游动孢子浓度的适宜调整方法是定量评价寄主植物抗疫病菌特性的前提。游动孢子悬液的稀释方法直接影响接种效率, 稀释过程往往造成游动孢子的迅速失活。土壤浸提液目前被认为是最有效的稀释液^[5], 但对稀释液的定性定量问题同样未见这方面研究报告。本文针对这两方面问题进行了探索研究, 并在实用中

取得了较好效果, 现将方法报告如下。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种来源: 分离自西北农业大学农作一站的棉田中自然染病棉铃。

2. 培养基: 采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)固体培养基, 在此培养基内不加琼脂即为马铃薯葡萄糖培养液(PDL)。菜豆葡萄糖培养液(BDL)制备方法: 取100g菜豆种籽放入500ml蒸馏水中煮沸30分钟, 双层纱布过滤, 在滤液中加10g葡萄糖, 补足蒸馏水至500ml, 灭菌备用。

漂洗用矿质盐溶液(MSS)根据文献[6]稍作改良: Ca(NO₃)₂ 0.01mol/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.004mol/L, KNO₃ 0.05mol/L, Fe-EDTA 1ml, 蒸馏水 1000ml。其中Fe-EDTA的配方为: EDTA-Na₂ 14.86g, FeSO₄ · 7H₂O 24.9g, 蒸馏水 1000ml。Fe-EDTA单独灭菌, 临用前按比例加入。

用于游动孢子悬液稀释的土壤浸提液制备方法: 取菜地耕层土250g, 溶于500ml蒸馏水

中,低温下(4-6C)过夜,经定性滤纸(中速102型)过滤,取滤液备用。

(二) 方法

1. 孢子囊离体生产程序:取疫病菌菌种多点接种于 PDA 平板上,22-24 C 暗培养 2-3 天菌丝布满 PDA 平板,打孔制成菌饼(直径 0.65cm)。每平皿(直径 9cm)置 30-40 块菌饼,注入 20mlPDL 或 BDL,22-24 C 暗培养 1-4 天,以扩增疫病菌菌丝体,然后吸去培养液,再用 MSS 漂洗处理 3 次,每皿每次 25ml,每次漂洗处理 0.5-1.0 小时,最后再加一次 MSS,从第一次用 MSS 处理开始计时,经 10-12 小时后吸去 MSS,继续培养 12 小时即可产生大量繁殖体(卵孢子或游动孢子)。光照处理即从第一次 MSS 处理菌丝块开始辅以光照设置,在距培养皿 15cm 高处,用 8W 日光灯予以光照。

2. 游动孢子悬液稀释试验:将产生大量孢子囊的菌丝块放入适量灭菌蒸馏水中,冰箱中低温(6-8C)处理 20 分钟,再于 22-24 C 温箱中暗培养 30 分钟即可得到同步释放出运动活跃的高浓度的游动孢子的悬液,经定性滤纸过滤即得纯的游动孢子悬液。

以蒸馏水、土壤浸提液、Tris-琥珀酸缓冲液 TSB(pH6.8, 5.0mmol/L,加或不加 CaCl₂ 2.5mmol/L)、磷酸钠盐缓冲液 PBS(pH6.8, 5.0mmol/L,加或不加 CaCl₂ 2.5mmol/L)等为稀释液,测定稀释过程对游动孢子运动活性的影响。取 1ml 游动孢子悬液缓缓注入盛有 9ml 稀释液的平皿中,依次稀释至 10⁻³。此项试验在 19-21 C 条件下进行,直接显微镜检,根据游动孢子在视野中的运动活性划分为五级:不运动(-),1-25%的孢子游动(+),26-50%的孢子游动(++),51-75%的孢子游动(+++),76-100%的孢子游动(++++)。

结 果

(一) MSS 和光照对棉铃疫病菌产孢活性的影响(表 1)

从表 1 结果看出,在用 MSS 处理菌丝块的

过程中,光照可调控棉铃疫病菌孢子囊和卵孢子的产生,黑暗条件完全抑制孢子囊的形成,菌丝块中形成大量卵孢子。光照条件下菌丝块经 MSS 处理 9 小时后开始产生孢子囊,吸去 MSS 后继续培养 12 小时即可获得同步产生的大量孢子囊。光照条件下菌丝块中除了产生大量孢子囊外,其中还有少量卵孢子,这是菌丝块在用 MSS 处理前就已分化形成的,光照抑制了卵孢子的形成。用灭菌蒸馏水处理菌丝块不能诱发该病菌产孢。表明除了降低养分水平外,通过 MSS 处理,矿质离子对该病菌的产孢活性亦有很大影响。用这种方法产生的孢子囊在 20 C 条件下经 20 天后仍可有效地释放游动孢子。

(二) 菌丝菌龄对棉铃疫病菌孢子囊形成的影响

菌丝菌龄影响该病菌的孢子囊产生效率,新鲜菌丝是诱导产生孢子囊的先决条件。菌丝菌龄超过 3 天时,孢子囊产量急剧下降;液体培养 24 小时的菌丝块产生的孢子囊总量不多,与菌丝量较少有关。以液体培养 36-72 小时的菌丝块用于孢子囊的产生较为适宜;液体培养 48-60 小时,单位菌丝块孢子囊产量最大(图 1,以菌龄为 60 小时的菌丝块的孢子囊产量为 100,示液体培养时间对单位菌丝块孢子囊产量的影响)。

表 1 MSS 和光照对棉铃疫病菌产孢活性的影响(菌丝菌龄:48h)

处理 ^a	培养时间 ^b (h)	产孢量 ^c	
		孢子囊	卵孢子
黑暗 蒸馏水	12	-	-
	24	+	--
MSS	12	-	++++
	24	+	++++
光照 蒸馏水	12	---	-
	24	+	-
MSS	12	++++	++
	24	++++	+++

a. 菌丝块在黑暗或持续光照条件下用灭菌蒸馏水或 MSS 漂洗处理 4 次,共 12 小时;

b. 从吸去蒸馏水或 MSS 后开始计时;

c. “-”不产孢至“++++”产孢量极大

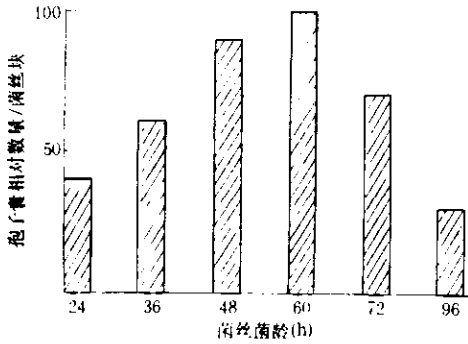


图1 菌丝菌龄对棉铃疫病菌孢子囊形成的影响

(三) 棉铃疫病菌离体产孢的一般特点

采用 PDL 和 BDL 均适宜于棉铃疫病菌菌丝的扩增,在适宜的诱导条件下这些新鲜菌丝可迅速分化产生大量孢子囊或卵孢子。但 BDL 较 PDL 效果更好,除了产孢量更高外,其突出的优点是菌丝块的产孢状况可由其颜色变化显现出来,即由淡橙色转变为紫色,这种颜色变化与产孢量同步,不受光照影响。

采用这种离体产孢方法获得的孢子囊大小悬殊较大,特别是利用 BDL 产生的孢子囊普遍大于病组织上产生的。离体产生的孢子囊不易脱落,每个孢子囊可分化产生 80—100 个游动孢子。而在病组织上产生的孢子囊大小均一,易脱落,孢子囊柄很短,表现出气传孢子囊的特征,每个孢子囊可释放 35—45 个游动孢子。用人工接菌产生于病棉铃上的孢子囊释放的游动孢子和本文离体产生的游动孢子对棉叶和棉铃的侵染效率没有差异。离体产生的卵孢子大小均一。

(四) 稀释对棉铃疫病菌游动孢子运动活性的影响

采用 TSB(pH6.8, 5.0mmol/L) 稀释游动孢子悬液,对游动孢子的运动活性影响较小,在较低的稀释倍数下可达到土壤浸提液的稀释效果(图 2)。

讨 论

用人工离体法简易生产棉铃疫病菌孢子囊

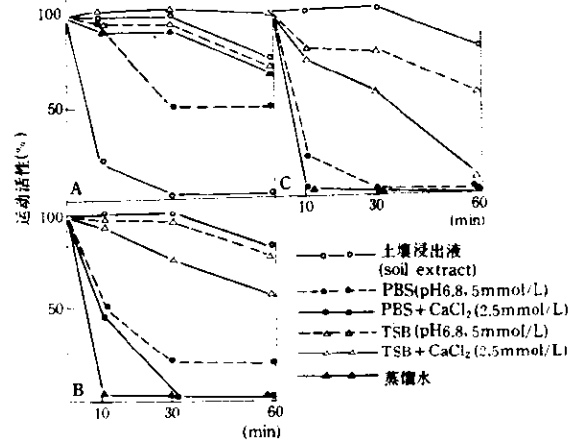


图2 稀释对棉铃疫病菌游动孢子运动活性的影响

(游动孢子悬液的初始浓度为 1×10^6 孢子/ml,

A、B、C 为分别稀释 10、100 及 1000 倍)

和卵孢子等接种体,是开展该病菌致病机制、疫病流行规律以及棉花抗病品种鉴定等研究工作的基础。自从 Chen 和 Zentmyer^[6]首次报道樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*)孢子囊的离体产生方法以来,在其它一些疫霉菌种中也取得较好结果。但关于棉铃疫病菌孢子囊、游动孢子和卵孢子的离体简易生产尚未见报道。本文报道的方法可制备浓度高达 2×10^6 孢子/ml 的游动孢子悬液。以 BDL 扩增菌丝不仅产孢量更高,而且产孢状况可由菌丝块的颜色变化即由淡橙色转变为紫色显示出来。

疫霉菌对植物的危害程度与接种体施用量成正相关。高接种量往往使抗病品种表现感病,在适宜的接种体浓度下才能检测出具有田间抗病性的马铃薯品种^[7]或松(树)种^[8]。研究中采用的菌丝块接种方法难以对接体定量,而且疫霉菌的游动孢子是侵染寄主最有效的接种体形态,故棉铃疫病菌菌丝块接种无伤棉苗叶片发病率很低^[4]。本试验结果表明,菌丝块接种棉苗叶片除了发病率较低外,发病时间较游动孢子迟 1—2 天。此外,菌丝块接种发病情况不稳定,推测存在由菌丝形成孢子囊的过程。接种高浓度游动孢子,该病菌侵染棉叶的潜育期短仅 24 小时(详情另文报道)。

适宜浓度的游动孢子悬液是精确鉴定抗源材料或评价病害防治措施的基础。然而浓度调整过程往往造成游动孢子迅速失去运动活性,甚至裂解失活,从而大大降低接种效率和研究结果的可靠性。前人研究认为土壤浸提液的稀释性能良好^[5],本项工作中这一性状亦得到证实,但是土壤浸提液难以定性定量,土壤来源不同可能影响游动孢子的运动活性。试验表明,TSB(pH6.8, 5.0mmol/L)对游动孢子的运动性影响较小,特别是在较低的稀释倍数下其稀释效果可与土壤浸提液媲美,因此更具有实用意义。

参 考 文 献

1. 于文清: 科学研究年报(中国农科院棉花所), 16: 1-9, 1964.
2. 姚耀文: 中国棉花, 13(1): 42-44, 1986.
3. 张绪振等: 植物保护, 15(5): 53-54, 1989.
4. 籍秀琴, 李宝栋: 中国农业科学, 1: 14-18, 1982.
5. Harris D C: *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 86(3): 482-486, 1986.
6. Chen D W & C A Zentmyer: *Mycologia*, 62: 397-402, 1970.
7. Hodgson WA: *American Potato Journal*, 39: 8-13, 1962.
8. Fraedrich S W, Tainter F H & A E Miller: *Phytopathol.*, 79: 1109-1113, 1989.

(1993-2-22 收稿)

STUDIES OF METHOD OF THE SPORANGIA PRODUCTION AND DILUTION OF THE ZOOSPORE SUSPENSIONS FROM *PHYTOPHTHORA BOEHMERIAE*

Shan Weixing Li Junyan

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

A simple method for in vitro production of sporangia by *Phytophthora boehmeriae* causing cotton boll blight in China was developed, and a method for dilution of zoospore suspensions was presented as well. Large amounts of sporangia were obtained when mycelial mats, produced from Potato extract-Dextrose Liquid (PDL) or Bean extract-Dextrose Liquid (BDL) at 24 °C for 48-72 hr, were rinsed with Mineral Salt Solution (MSS) four times at 20-22 °C for 10-12 h with continuous fluorescent light (cool white), and incubated for additional 12 h after drained off MSS. Darkness favored oospore whereas suppressed sporangial production by *P. boehmeriae*. BDB is superior to PDB in the production of oospores and sporangia by *P. boehmeriae* as evidenced by the amount of sporangia or oospores and in particular the fact that the color change of mycelial mats from light orange to purple was synchronous with the sporulation of *P. boehmeriae*. Tris-succinate buffer (pH6.8, 5.0mmol/L, TSB) was the quantitatively excellent diluent for preserving motility of zoospores of *P. boehmeriae* in the dilution process.

Key words *Phytophthora boehmeriae*; In vitro production of sporangia; Zoospore motility