

# 辣椒对疫霉抗性的快速鉴定

赫 卫, 张 慧, 王 莹

(黑龙江省农业科学院园艺分院, 哈尔滨 150069)

**摘要** 研究发现叶、茎、茎基部和果实接种 4 种方法均能用于鉴定辣椒对辣椒疫霉的抗性。叶与茎接种法操作简单, 接种部位发病快, 可同时检测大量品种, 但要求空气湿度大; 茎基部接种法模拟田间病害的发生过程, 最能反映品种的真实抗性, 但需要菌量大, 工作量也大; 果实接种法不仅操作简单、接种部位发病快、菌需求量小, 而且可同时筛选大量品种, 可以通过量化达到有效区分抗病和感病品种的目的, 更具有完整保存原有植株的优势。

**关键词** 辣椒疫病; 抗病性; 鉴定

**中图分类号:** S 436. 418 **文献标识码:** A **DOI:** 10. 16688/j. zwbh. 2017261

## Rapid identification of resistance to *Phytophthora capsici* in pepper

HE Wei, ZHANG Hui, WANG Ying

(Institute of Horticulture, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

**Abstract** By comparing different methods of leaf, stem, stem base and fruit inoculation, it was found that all the four methods could be used to identify the resistance of pepper to *Phytophthora capsici*. Leaf and stem inoculation methods are simple in operation and quick in infection, and could be used to detect a large number of varieties at the same time, but the high air humidity is required. The inoculation in stem base basically simulates the occurrence of field disease, which can reflect the real resistance of cultivars, but large amount of fungus and workload are required. Fruit inoculation method is not only simple in operation, quick in infection, small in inoculum size demand, but also can screen a large number of varieties at same time. The fruit method can be used for the effective distinction between resistant and susceptible varieties by quantifying, and has the advantage of preserving the original plant.

**Key words** *Phytophthora capsici*; resistance; identification

由辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* 引起的辣椒疫病已成为影响辣椒生产的主要病害之一, 其主要特征是发病周期短, 流行速度快, 发病面积大。病原菌通过孢子囊萌发产生的游动孢子侵入植物的根、茎、叶、花和果实<sup>[1]</sup>。游动孢子除主要通过雨水或灌溉水在土壤中传播并引起大面积死苗外, 还可以通过气流传播。目前, 抗病品种的选育和推广是控制辣椒疫病的主要手段。而抗性鉴定常采用的接种方法为离体叶片接种<sup>[2-3]</sup>和游动孢子液灌根接种<sup>[3]</sup>。虽然这两种接种方法均可以区分不同辣椒品种对辣椒疫霉的反应, 但是这两种方法却都有着自身无法克服的缺点, 比如: 离体叶片接种法

是依据病斑面积占叶面积的比例作为病情分级标准的, 由于品种间叶片面积相差较大, 因此在接种量一样的情况下, 根据病斑面积进行比较就无法反映出品种的抗性, 同时离体叶片法不适宜进行量化, 因而不好分级, 只能进行初步的鉴定; 游动孢子液灌根接种法基本上是模拟田间病害的发生过程, 能反映品种的真实抗性, 但是需要培养孢子, 尤其是当鉴定的品种数量较多的时候, 需要大量的孢子, 工作量大, 操作较复杂。为了获得简单有效的方法鉴定辣椒对疫霉的抗性, 本试验用 4 种不同的方法, 为选择合适的辣椒抗疫病品种的筛选方法提供依据。

收稿日期: 2017-07-25

修订日期: 2017-09-04

基金项目: 黑龙江省青年科学基金(QC2013C023); 黑龙江省农业科学院引进博士人员科研启动金项目(201507-48); 国家重点研发计划(2017YFD0101903); 国家特色蔬菜产业技术体系(CARS-24-G-04)

联系方式 E-mail: hw80he@163. com

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取 8 份辣椒品种或品系为试材。播种前用 52~55℃ 的温水浸种 30 min, 1% 硫酸铜溶液浸泡 5 min 进行种子消毒处理, 然后用清水冲洗干净, 再浸种催芽后播种至穴盘内。叶、茎和茎基部接种法在辣椒的 4~6 叶期接种。

### 1.2 辣椒疫霉的培养

将在室内低温保存的辣椒疫霉菌种接种在燕麦固体培养基上进行培养, 在 25~28℃ 下恒温暗培养 3 d 至白色菌丝充分生长繁殖布满整个培养基表面, 继续培养 4 d, 然后在 25~28℃ 恒温下光/暗交替培养 7 d 至产生孢子囊。用无菌水冲洗后 4℃ 放置 30 min 即可用于叶和茎接种法, 孢子浓度为 1 000 孢子/mL。

### 1.3 接种方法

#### 1.3.1 叶接种法

选取 4~6 叶期健康的活体植株顶端展开叶, 用灭菌刷子在叶片正面上制造浅细伤口, 将制备好的菌液用刷子刷在叶片上。每个品种接 10 株, 重复 3 次, 共 30 株。在温室自制玻璃箱内接种及培养, 自然光照, 温度 25~30℃, 相对空气湿度 90%~95%, 以灭菌水为对照, 接种后每隔 24 h 调查记录 1 次发病情况。

#### 1.3.2 茎接种法

选取 4~6 叶期健康的活体植株子叶上部茎, 用灭菌接种针划破表皮制造 3 个伤口, 将制备好的菌液用灭菌刷子刷在伤口上, 用塑料薄膜包扎保湿 24 h 后除去薄膜。培养条件同 1.3.1。

#### 1.3.3 茎基部接种法

选取 4~6 叶期健康无病的活体植株茎基部, 将菌块埋在距植株 1 cm 土壤 0.5 cm 深处, 适时浇水以保持土壤湿度达到饱和。培养条件同 1.3.1。

#### 1.3.4 果实接种法

选取健康完整青果期的辣椒果实用灭菌水冲洗后, 再用乙醇冲洗灭菌, 在铁盘内垫上双层湿滤纸, 将辣椒果实放在上面, 用灭菌刀片在果实上切去直径 7 mm 表皮, 从准备好的菌盘上切割边长 5 mm 的菌饼, 将菌饼有菌丝的一面紧贴在伤口上, 在 30℃ 光照 16 h 后, 25℃ 黑暗培养 8 h, 采用保鲜膜覆盖在铁盘上面保湿, 促使病害的发生。以不含菌的

培养基为对照。

### 1.4 调查标准

叶、茎、茎基部接种 3 种方法不适宜进行分级, 只能进行定性观察。果实接种法调查标准分 5 级 (图 1): 0 级, 无病斑; 1 级, 果面上出现水浸状病斑, 病斑直径  $\leq 2$  cm; 2 级, 果面上出现水浸状病斑,  $2 \text{ cm} < \text{病斑直径} < 4 \text{ cm}$ ; 3 级, 果面上的水浸状病斑已严重变软, 果表皮与果肉分离, 病斑直径  $\geq 4 \text{ cm}$ ; 4 级, 果面上的水浸状病斑已完全或几乎覆盖果实表面。

病情指数 =  $\Sigma(\text{各级病果数} \times \text{相对级值}) / (\text{调查总果数} \times \text{最高级值}) \times 100$ ;

抗病性划分标准: 抗病 (R), 病情指数  $\leq 15$ ; 中抗 (MR),  $15 < \text{病情指数} \leq 30$ ; 中感 (MS),  $30 < \text{病情指数} \leq 50$ ; 感病 (S), 病情指数  $> 50$ 。



图 1 辣椒果实接种法调查标准

Fig. 1 Investigation criteria for inoculation of pepper fruit

## 2 结果与分析

### 2.1 叶接种后的发病情况

接种后 5 d 即可发病。抗病植株伤口处变褐, 病斑比伤口略大, 并不再向外扩展 (图 2b)。感病植株先在伤口处形成褐色病斑, 逐渐发展, 叶片病斑变黑, 整个叶片皱缩萎蔫, 病斑沿叶柄向茎扩展, 直至根部, 造成整个植株萎蔫, 最后死亡 (图 2c~d)。对照在伤口处变白, 没有任何病变 (图 2a)。

### 2.2 茎接种后的发病情况

接种后 5 d 即可发病。抗病植株仅伤口处变褐缢缩, 病斑并不向外扩展 (图 2f), 茎部的局部病变缢缩有可能使伤口上部的组织整体掉落, 留下断茎。感病植株在切口处形成黑褐色病斑, 病斑沿茎秆向上和向下扩展, 直至根部, 造成植株萎蔫, 最后死亡 (图 2g~h)。对照在伤口处变白, 没有任何病变 (图 2e)。在接种后 20 d, 抗病植株在留下的断茎上生出

新的叶片,植株继续生长,说明这些抗病植株对辣椒疫病有一定的耐受性。

2.3 茎基部接种后的发病情况

接种后 10 d 发病,抗病植株茎基部变褐,病斑

并不扩展(图 2j)。感病植株在茎基部形成黑褐色病斑,茎基部变黑缢缩,病斑沿茎秆扩展,造成植株萎焉,最后死亡(图 2k~l)。对照在茎基部没有任何变化(图 2i)。



a~d: 叶接种法; e~h: 茎接种法; i~l: 茎基部接种法  
a-d: Leaf inoculation method; e-h: Stem inoculation method; i-l: Stem base inoculation method

图 2 3 种方法在接种后辣椒植株的发病情况

Fig. 2 Symptoms on pepper plant after inoculation by the three methods

2.4 果实接种后的发病情况

接种后 3 d,有少数几份品种开始发病,第 5 天时全部品种都表现出发病症状,但也有一些品种的部分辣椒果实未发病。发病初期,疫霉从切口处开始扩散,先在果内长出少量菌丝,随后果外出现水浸状病斑,当果内长出大量菌丝,果外水浸状病斑迅速扩展,果实剖面呈褐色,果果肉质松软,直至果皮和果肉分离,彻底腐烂,菌丝在伤口处或果柄处外露(图 3)。对照在切口处干枯,无发病症状。

果实接种法可以很好地区分抗病和感病品种。抗病品种在切口处无病斑,或切口周围变褐,病斑向外略有扩展即被遏制,病斑扩展缓慢,而感病品种则在切口处形成水浸状褐色病斑,病斑向外扩展,造成果肉和果皮分离,直至整个果腐烂。



图 3 接种后辣椒果实内部

Fig. 3 Inside of pepper fruit after inoculation

应用果实接种法可以区分辣椒品种对疫病抗性。不同品种抗病性呈现明显不同(图 4)。选取其中 8 个品种进行鉴定,根据病情指数与抗病性的关系,可以判断‘ICPN21-03’、‘陇椒 5 号’为中抗品种,‘红椒王’,‘B16142’、‘龙椒 951’、‘野生椒’、‘B16166’、‘ICPN21-08’为感病品种(图 4 和表 1)。这说明,果实接种法可用于辣椒品种对疫病的抗性划分。

果实接种法选取辣椒果作为鉴定对象具有一致性。辣椒果实作为试验材料,病斑虽有分级,但绝大部分位于一个抗病调查标准,总体表现比较均一。说明辣椒果实作为抗病鉴定材料表现稳定(图 4)。

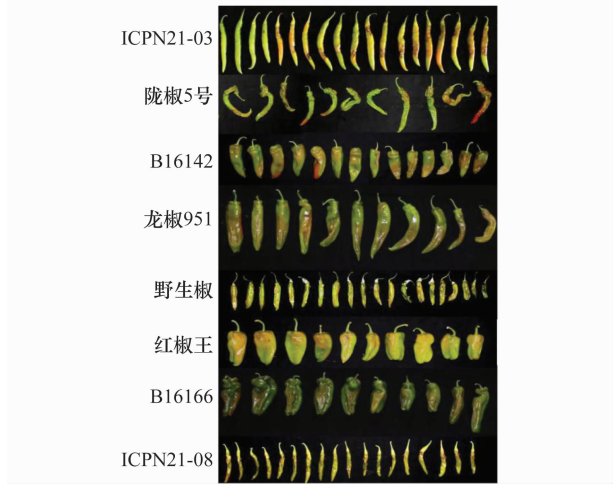


图 4 果实接种法鉴定不同辣椒品种抗疫病结果

Fig. 4 Identification of resistance of pepper varieties to *Phytophthora capsici* by fruit inoculation method

表 1 辣椒果实接种法抗疫病鉴定结果

Table 1 Resistance of pepper varieties to *Phytophthora capsici* by fruit inoculation method

| 品种<br>Variety | 来源<br>Source  | 病情指数<br>Disease index | 抗性评价<br>Resistance evaluation |
|---------------|---------------|-----------------------|-------------------------------|
| ICPN21-03     | 亚蔬—世界蔬菜中心     | 19.7                  | MR                            |
| 陇椒 5 号        | 甘肃省农业科学院蔬菜研究所 | 22.7                  | MR                            |
| B16142        | 黑龙江省农业科学院园艺分院 | 55.3                  | S                             |
| 龙椒 951        | 黑龙江省农业科学院园艺分院 | 77.3                  | S                             |
| 野生椒           | 海南            | 100.0                 | S                             |
| 红椒王           | 美国            | 45.0                  | MS                            |
| B16166        | 黑龙江省农业科学院园艺分院 | 72.5                  | S                             |
| ICPN21-08     | 亚蔬—世界蔬菜中心     | 100.0                 | S                             |

3 结论与讨论

3.1 3 种活体接种方法的比较

本试验摸索了 3 种活体鉴定方法,发现这 3 种接种方法均可使辣椒在几天内发病,并可区分辣椒

品种对疫病的反应,3 种方法各有优缺点,可以根据需要选择适宜的接种方法。

以辣椒叶片为接种材料,接种叶片在几天内发病,并很快蔓延至整株,可快速鉴定对疫病的抗性。叶接种法操作简单,能够同时检测大量品种,但与叶部喷雾接种法<sup>[4-5]</sup>一样,需长时间保湿来增加侵染效率。要求空气湿度达到 90%左右,空气湿度不一致会导致发病情况不一致,空气湿度保持均匀一致时,同批供试材料的抗性结果基本一致。即空气湿度的强度和均一性是制约叶片侵染法的主要因素。由于不同品种辣椒的叶片面积相差较大,叶接种法在接种量方面存在差异,根据病斑面积不能进行病情分级。

茎接种法同样操作简单,接种后发病快,可以同时检查大量品种。茎接种法可通过接种后病斑长度变化来反映病斑的扩展速度,适宜对抗性量化。根据病斑扩展的速度即可区别品种间的抗性差异。因茎接种部位的上部茎叶有受侵染后整体脱落形成断茎的现象,部分接种后植株的病斑长度不能测量,无法判断受害等级。且茎接种法对空气湿度要求高,空气湿度同样制约侵染效率和发病程度。空气湿度保持均匀一致时,同批供试材料的抗性结果基本一致。茎接种法与叶接种法<sup>[4,6]</sup>同样因缺少病原菌与根际微生物间的相互作用而与田间侵染不符。

茎基部接种法更接近田间病害的发生过程,最能反映品种的真实抗性,不过,该法需要培养孢子囊,当鉴定品种数量多时,需要菌量大,工作量大。接菌量少时,发病耗时长,侵染效率低。研究者尝试采用在土壤中包埋菌块来替代浇灌菌液的方法,解决灌根法<sup>[7-8]</sup>中对菌量的需求,但没有达到预期目的。

3.2 辣椒果实接种法的优劣

果实接种法的优势在于接种后发病时间短,伤口的存在为侵染提供了便利,缩短了发病时间。接种后 3 d,接种部位发病,5 d 感病品种大部分腐烂变软。果实接种法采用菌饼接种,这种方式对病菌的需求量小,一个培养皿内的菌丝可以接种 40 个果左右,解决了大量培养菌耗时耗力的问题。果实接种法可以应用于各种辣椒品种,基本不受果形限制。

果实接种法可以根据病斑扩展的速度区别品种间的抗性差异,对抗性进行量化,能有效区分抗感疫病品种。

- [J]. Annuals of the Phytopathological Society of Japan, 1997, 63: 432–436.
- [25] OHIRA K, NAMBA S, ROZANOV M, et al. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capillovirus: comparative sequence analysis of capillovirus genomes[J]. Journal of General Virology, 1995, 76(9): 2305–2309.
- [26] TATINENI S, AFUNIAN M R, GOWDA S, et al. Characterization of the 5'- and 3'-terminal subgenomic RNAs produced by a capillovirus: evidence for a CP subgenomic RNA [J]. Virology, 2009, 385(2): 521–528.
- [27] MARAIS A, SVANELLA-DUMAS L, BARONE M, et al. Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of cherry capillovirus A [J]. Plant Pathology, 2012, 61(1): 195–204.
- [28] NOORANI M S, AWASTHI P, SINGH R M, et al. Complete nucleotide sequence of *Cherry virus A* (CVA) infecting sweet cherry in India [J]. Archives of Virology, 2010, 155(12): 2079–2082.
- [29] JELKMANN W. Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry [J]. Journal of General Virology, 1995, 76(8): 2015–2024.
- [30] WANG Jiawei, ZHAI Ying, LIU Weizhen, et al. Structure and genome organization of *Cherry virus A* (*Capillovirus*, *Betaflexiviridae*) from China using small RNA sequencing[J]. Genome Announcements, 2016, 4(3): e00364–16.
- [31] MARAIS A, SVANELLA-DUMAS L, BARONE M, et al. Development of a polyvalent RT-PCR detection assay covering the genetic diversity of *Cherry capillovirus A* [J]. Plant Pathology, 2012, 61(1): 195–204.
- [32] CHEN H, CHEN S, LI Y, et al. Phylogenetic analysis and recombination events in full genome sequences of *Apple stem grooving virus* [J]. Acta Virologica, 2013, 58(4): 309–316.
- [33] 陈立伟, 宗晓娟, 王文文, 等. 樱桃病毒 A 外壳蛋白基因克隆及其原核表达[J]. 中国农学通报, 2012, 28(13): 195–199.
- [34] HARI V, ABDEL-GHAFFAR M H, LEVY L, et al. *Asian prunus latent virus*: an unusual potyvirus detected in germplasm from East Asia [J]. Acta Horticulturae, 1995, 386: 78–85.
- [35] DESVIGNES J C, BOYE R, CORNAGGIA D, et al. Virus diseases of fruit trees[M]. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Legumes (CTIFL), Paris, France, 1999.
- [36] 张毅. 日本垂枝梅花资源[J]. 世界农业, 2011(10): 90–94.
- [37] 褚孟姬. 中国果树志梅卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 1–47.
- [38] 李庆卫. 川滇藏黔野梅种质资源调查和梅花抗寒品种区域试验的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 148 页)

果实接种法基于同一辣椒品种的果实对疫病抗性的一致性,可每个品种选取 3 个果实作为试材进行初步筛选,经初步筛选后的材料再采取辣椒果实鉴定方法或其他鉴定方法进一步大量接种鉴定。采用果实接种法进行初步筛选,快速简便,操作简单,可同时筛选大量品种,有利于抗疫病品种的快速筛选。

果实接种法以离体果实为研究对象,能够在短时间内检测多个品种,对辣椒植株无任何损伤,不影响植株的生长,辣椒原有植株可用于其他试验或取种。即使是感病品种,也能在进行抗疫病鉴定的同时保存品种资源,在对种质资源稀少的品种进行抗疫病鉴定方面有优势。另外,果实接种法鉴定在辣椒青果期的任何阶段都可以进行,试验周期短,试验时间充足。

果实接种法的缺点在于以离体的果实作为鉴定材料,不存在系统抗性反应。另外,滤纸的湿度要保持一致,避免湿度过大导致果实过度腐烂,影响病级判定。对于果实太小的品种,如圆球形的果实,也存在病级判定的问题。

## 参考文献

- [1] REIFSCHNEIDER F J B, BOITEUX L S, DELLAVECCHIA P T, et al. Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper [J]. Euphytica, 1992, 62(1): 45–49.
- [2] 李智军, 龙卫平, 郑锦荣, 等. 辣椒疫病抗性离体叶鉴定法研究[J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(2): 47–51.
- [3] 马辉刚, 何烈干, 陈学军, 等. 两种方法鉴定辣椒疫病抗性研究[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(3): 536–542.
- [4] KIM Y J, HWANG B K, PARK K W. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici* [J]. Plant Disease, 1989, 73(9): 745–747.
- [5] MOZZETTI C, FERRARIS L, TAMIERRI G, et al. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1995, 46(2): 95–107.
- [6] KIM F S, HWANG B K. Virulence to Korea pepper cultivars of *Phytophthora capsici* from different geographic areas [J]. Plant Disease, 1992, 76(5): 486–489.
- [7] 林柏青, 张松林. 辣椒品种抗疫病鉴定方法的初步研究[J]. 中国蔬菜, 1994(4): 21–24.
- [8] 毛爱军, 胡洽, 耿三省. 辣椒疫病菌接种鉴定技术研究[J]. 北京农业科学, 1998, 16(2): 21–24.

(责任编辑: 杨明丽)