

芝麻枯萎病病原菌分离和纯化方法研究

苏银玲¹, 苗红梅², 魏利斌², 张海洋^{2*}

(1. 南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095;

2. 河南省农业科学院 芝麻研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 为快速、高效地分离芝麻枯萎病病原菌, 对该病原菌的分离及纯化方法进行了改进研究。结果表明, 与新鲜病株病原菌分离方法相比, 利用干燥后的病株更容易分离到芝麻枯萎病病原菌, 无杂菌污染病原菌株系的分离率为 92.7%, 比常规分离方法(73.5%)高出 19.2 个百分点; 孢子悬浮液方法可以替代显微镜检方法用于芝麻枯萎病病原菌的单孢分离工作, 该方法简便易行, 菌株纯合度高。研究认为, 采用干燥病株分离病原菌、采用孢子悬浮液方法进行单孢分离是获得高质量芝麻枯萎病病原菌的重要优化技术途径, 尤其适合于大量芝麻枯萎病株的病原菌分离及纯化工作。

关键词: 芝麻; 枯萎病; 病原菌; 镰刀菌; 分离; 纯化

中图分类号: Q93-331 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)01-0092-03

Study on Separation and Purification Techniques of *Fusarium Oxysporum* in Sesame (*Sesamum indicum* L.)

SU Yin-ling¹, MIAO Hong-mei², WEI Li-bin², ZHANG Hai-yang^{2*}

(1. National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To quickly and efficiently obtain pathogens of sesame wilt from the infected sesame plants, optimal methods of pathogen separation and purification were researched in this experiment. Results showed that *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesame* (FOS) could be obtained more easily from the infected sesame plantlets with the dry sample isolation method, compared to the conventional direct isolation technique from fresh infected samples. The separation rate(92.7%) was 19.2 percentage points higher than that of the conventional separation method(73.5%). Furthermore, the spore suspension selection method could be used in monospore purification of FOS, as an alternative to the ordinary microscope selection method, for its simplicity and high purification efficiency. It indicated that the above new isolation and purification methods were optimal for FOS, especially adaptive for the massive infected sesame samples.

Key words: sesame; *Fusarium* wilt; pathogen; *Fusarium oxysporum*; separation; purification

芝麻(*Sesamum indicum* L., $2n=26$)属胡麻科胡麻属, 是世界上最古老的优质油料作物, 也是我国重要的优势农产品^[1-2]。在我国芝麻生产中, 枯萎病常年发病率 15% 左右, 严重时可达 30%, 对芝麻产量和品质影响较大^[3]。芝麻枯萎病(sesame wilt)是一种维管束病害, 由尖孢镰刀菌引起(*Fusarium ox-*

ysporum)^[4]。目前, 芝麻枯萎病病原菌分离多采用活体根部、茎秆切段直接进行分离^[5-6], 利用此法分离易造成杂菌污染, 且大量快速分离难度大、效率低。对枯萎病病原菌的纯化常采用在菌落边缘挑取菌块再次接种或在显微镜下进行单孢分离的方式, 前者常常纯化不彻底, 后者挑取单孢效率低。为此,

收稿日期: 2011-08-03

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-15); 国家科技支撑计划项目(2009BADA8B04)

作者简介: 苏银玲(1986-), 女, 河南灵宝人, 在读硕士研究生, 研究方向: 芝麻抗病遗传育种。E-mail: suyinling419@163.com * 通讯作者: 张海洋(1963-), 男, 河南项城人, 研究员, 博士, 主要从事芝麻遗传育种研究。E-mail: zhy@hnagri.org.cn

对从干燥的芝麻枯萎病株材料中分离和纯化病原菌进行了研究,旨在为快速、高效提取与纯化芝麻枯萎病病原菌提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

依托国家芝麻产业技术体系对我国河南、安徽、湖北、江西、河北、山西、吉林、辽宁等芝麻主产区不同生育时期的芝麻枯萎病病株进行了采集,2007—2009 年共收集芝麻枯萎病病株 177 株,2010 年 6—7 月收集芝麻枯萎病病株 49 株。

1.2 培养基制备

用于菌株分离、纯化的培养基以传统 PDA 培养基(去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 12 g、水 1 000 mL)为基准。将培养基 pH 值调至 6.8 或以自然状态于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。根据分离量多少,准备好灭菌的培养基,并于倾倒时加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素,每皿倒入 10~20 mL 培养基制成平板。

1.3 芝麻枯萎病病原菌的分离

对收集的芝麻枯萎病病株,设置活体病株茎秆切段直接分离和干燥病株茎秆分离 2 组试验。活体病株茎秆分离,采取新鲜病株的病健交界处组织用 75%乙醇消毒 30 s,无菌水冲洗 3~4 次,再用 1.25%的次氯酸钠溶液浸泡 10~15 min,无菌水冲洗 3~4 次,用无菌切割刀切取 0.3 cm \times 1.0 cm 的木

质部薄片于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 PDA 培养基平板上,在 26 °C 恒温箱中培养获得菌株。干燥病株茎秆分离是将采集的活体病株置阴凉处充分干燥后,在超净工作台上将病株接近根部茎秆切成 2~3 cm 的茎秆小段(图 1A),用 70%乙醇表面消毒 1 min,无菌水冲洗 3~4 次,将茎秆小段从中部纵切成两半,使髓部维管束组织显露出来,之后用镊子轻轻夹取中央维管束组织放于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 PDA 平板上(图 1B),置 26 °C 恒温箱中保湿培养 72 h 后,即可培养出枯萎病病原菌菌落(图 1C)。挑取菌落上少量菌丝进行镜检,以确定病原菌种类(图 1D)。

1.4 芝麻枯萎病病原菌的纯化

将上述分离到的无杂菌污染的菌株进行纯化,采用普通纯化方法和孢子悬浮液纯化 2 种方法。前一种方法直接从分离到的菌落边缘挑取菌丝进行接种,后一种方法步骤为:初步鉴定病菌为枯萎病病原菌后,在 PDA 平板接种处切取一块 0.4 cm \times 0.8 cm 的菌饼,放置于 1.5 mL 离心管中,加 800 μL 无菌水,剧烈振荡 1 min,制备成孢子悬浮液;吸取孢子悬浮液 15 μL ,用血球计数器计数,并配制成含量为 100~1 000 个/mL 的孢子悬浮液;吸取 150 μL 孢子悬浮液均匀涂布于 PDA 平板上,26 °C 下培养 60 h 后,长出多个单孢菌落(图 1E),挑选部分单孢菌落于 PDA 试管斜面或新的 PDA 平板上(图 1F),用于保存、研究,即完成芝麻枯萎病病原菌的单孢分离纯化。

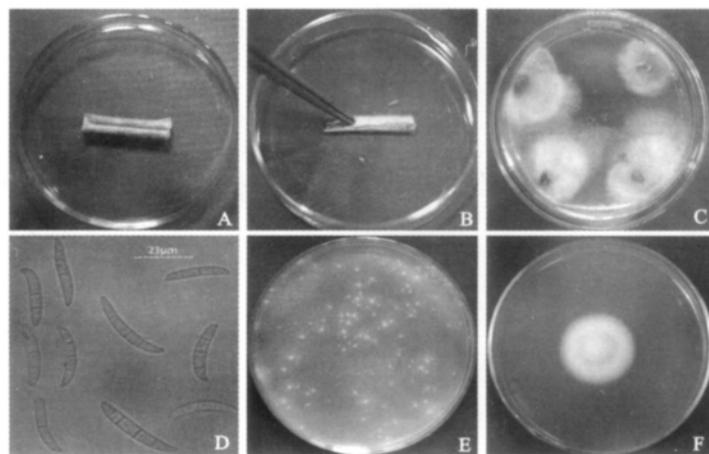


图 1 改进的芝麻枯萎病病原菌分离及纯化过程
A. 从芝麻枯萎病病株茎秆病健交界处截小段;B. 将茎秆小段从中部纵切成两半,用镊子夹取中央维管束组织置于 PDA 培养基上进行培养;C. 培养 72 h 后,在 PDA 培养基上形成真菌菌落;D. 对真菌菌落进行镜检,确定为芝麻枯萎病病原菌;E. 配制适宜浓度的孢子悬浮液,涂布于 PDA 平板后形成多个单孢菌落;F. 分离出的单孢菌落。

图 1 改进的芝麻枯萎病病原菌分离及纯化过程

2 结果与分析

2.1 芝麻枯萎病病原菌的分离结果

对 2010 年 6—7 月采集的 49 株新鲜芝麻枯萎

病病株,采用活体病株分离方法进行枯萎病病原菌的分离,结果成功分离得到 36 株无杂菌污染的枯萎病病原菌,分离率为 73.5%。对 2007—2009 年在全国芝麻主产区收集的 177 株病株,采用干燥病株

分离方法进行枯萎病病原菌的分离,结果成功分离得到 164 株无杂菌污染的枯萎病病原菌,分离率达到 92.7%。从芝麻枯萎病病原菌分离试验结果可以看出,采用干燥病株分离方法的成功率明显高于活体病株分离方法的成功率,且干燥病株分离方法所分离部位为维管束组织,隔离了病株外围其他非枯萎病病原菌,减少了杂菌污染。此外,干燥的芝麻病株维管束组织易于分离枯萎病病菌,分离效率高,为大量、快速分离芝麻枯萎病病株提供了条件。

2.2 芝麻枯萎病病原菌的纯化结果

采用直接从菌落边缘挑取菌块再次接种的方法进行芝麻枯萎病病原菌的纯化,对纯化后的菌落进行形态学观察时发现,有些菌落存在纯化不彻底的现象,主要表现在菌落颜色、菌落形状、生长速度和大孢子类型等性状上的不一致性。采用孢子悬浮液涂布的方法进行纯化,对纯化后得到的单孢菌落观察发现,其在菌落颜色、菌落形状、生长速度和大孢子类型等性状上都表现得较为一致,保证了菌株的纯合性(表 1)。同时,采用孢子悬浮液进行单孢分离简单易行,提高了纯化菌落的效率,从而也保证了快速高效地分离芝麻枯萎病病原菌。

表 1 2 种芝麻枯萎病病原菌纯化方法的效果比较

纯化方法	菌落颜色	菌落形状	生长速度	大孢子类型
菌块再次接种	不一致	多为嵌合型	不一致	多样
孢子悬浮液	一致	一致	均匀一致	一致

3 结论与讨论

目前芝麻枯萎病病原菌分离多采用活体根部、茎秆切段直接进行分离^[5-6],这样木质部、韧皮部等有非维管束的杂菌存在,加上根部非芝麻致病性镰刀菌普遍存在,容易造成非致病镰刀菌等杂菌污染,给枯萎病病原菌的分离造成很大困难。同时分离到的病原物要进行重接种致病性试验,才能确证其是否为芝麻枯萎病病原菌,但根据基因对基因学说,致病性测定与寄主芝麻品种有关,加上分离菌株的多次接种培养和环境条件的改变,致病性结果也与采集时病株病症产生偏差,给致病性测定工作带来很大困难。此外,不同时间、地区采集的芝麻枯萎病病株由于地点比较分散、时间跨度长,活体分离时难以做到大量快速分离。本研究采用的从干燥芝麻枯萎病病株中分离病原菌的方法具有很多优点,首先,茎秆干燥时维管束组织与木质部容易分离,病株外围木质部等作为天然屏障隔离其他非枯萎病病原菌,减少茎秆表面、韧皮部和木质部非致病性镰刀菌等杂菌污染;其次,从具有明显症状的芝麻茎秆维管束

组织中获得病原菌,来源明确,保证了该菌为高侵染性病原菌;其三,直接通过挑取干燥维管束组织进行分离,操作简便易行,分离效率高。

国内外对枯萎病病原菌的纯化方式多是在菌落边缘挑取菌块再次接种纯化^[6-7],这样不容易得到完全纯化的枯萎病病原菌菌株;而通过显微镜进行单孢分离^[8],虽然可以保证纯化的质量,但操作困难、繁琐、效率低。本研究在对芝麻枯萎病病原菌进行纯化过程中,采用小 PDA 菌块制备一定浓度的分生孢子悬浮液并涂平板培养,可简单快速地挑取、分离单孢菌落,避免了纯化不彻底和通过显微观察挑取单孢效率低的弊端。另外,在分生孢子悬浮液的平板培养基上添加了链霉素,其添加量对分离的单孢菌落生长有很大影响,本试验在分离纯化培养基中添加的链霉素量主要参照戴水莲等^[9]的研究结果,未做链霉素质量浓度梯度试验,因此,对于分离芝麻枯萎病病原菌时链霉素使用的最佳质量浓度还有待于进一步研究。

综上所述,采用干燥芝麻枯萎病病株进行病原菌分离和采用孢子悬浮液对菌株进行单孢分离纯化技术,能够准确、高效地分离和纯化出芝麻枯萎病病原菌。同时,本研究也为其他能够引起维管束病害的病原菌分离及其纯化提供借鉴。

参考文献:

- [1] Bedigian D, Harian J. Evidence for cultivation on sesame in the ancient world[J]. *Econom Bot*, 1986, 40: 137-154.
- [2] 黎冬华, 王林海, 张艳欣, 等. 芝麻高纯度线粒体 DNA 提取技术研究[J]. *华北农学报*, 2011, 26(3): 90-94.
- [3] 刘红艳, 赵应忠. 我国芝麻生产、育种现状及展望[J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(12): 2475-2476.
- [4] 陆家云. 病原植物真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 360-440.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-135.
- [6] 苏世鸣, 任丽轩, 杨兴明, 等. 西瓜专化型尖孢镰刀菌的分离鉴定及水稻根系分泌物对其生长的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(1): 57-62.
- [7] 王海平, 李心文, 李景欣, 等. 胡麻枯萎病病原尖孢镰刀菌生态生物型的划分研究[J]. *华北农学报*, 2004, 19(2): 115-118.
- [8] 张治家. 太原市温室黄瓜枯萎病病菌分离、鉴定及室内药剂生物测定研究[J]. *山西农业科学*, 2009, 37(1): 66-68.
- [9] 戴水莲, 林警, 高丽. PDA 培养基中加入青霉素、链霉素的抗菌作用试验简报[J]. *中国食用菌*, 2007, 26(4): 53-54.