

禹 阳,贾赵东,马佩勇,等. 甘薯黑斑病抗性鉴定中黑斑病菌培养方法研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):120-121.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.031

甘薯黑斑病抗性鉴定中黑斑病菌培养方法研究

禹 阳,贾赵东,马佩勇,郭小丁,谢一芝,边小峰

(江苏省农业科学院粮食作物研究所,江苏南京 210014)

摘要:黑斑病是甘薯生产上的重要病害,选育抗黑斑病的甘薯品种是防治黑斑病的重要途径之一。黑斑病抗性鉴定是甘薯抗病育种的基础,然而目前采用的甘薯黑斑病抗性鉴定方法仍存在不足,尤其是病原菌的纯化和准备。利用甘薯液体培养基对黑斑病菌进行扩大培养,成功接种苏薯8号和华东51-93并致病。采用该培养方法连续2年对苏渝303等8个品种进行黑斑病抗性鉴定,鉴定结果较为稳定一致,能有效反映甘薯品种对黑斑病的抗性水平。该培养方法科学高效,操作简单,不易污染,从而可为甘薯抗黑斑病品种选育提供高效精准的抗性鉴定方法。

关键词:甘薯;黑斑病;病原菌培养;抗性鉴定

中图分类号: S435.313+.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0120-02

由甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted)侵染引起的甘薯黑斑病(sweetpotato black rot)是甘薯生产上一种重要病害,在我国各甘薯产区均有发生。该病能造成甘薯储藏时烂窖,育苗时烂床和死苗,对甘薯生产影响极大。其中病薯毒害较大,如用病薯喂养牲畜,会发生气喘病而死亡;用病薯酿酒,则发酵迟缓并降低乙醇的产量与质量,严重制约甘薯产业的发展^[1]。甘薯黑斑病可通过种薯、薯苗及土壤等多种途径传播^[2],很难彻底根除,因此选育抗黑斑病甘薯品种是防治黑斑病的重要途径之一。

黑斑病抗性鉴定是甘薯抗病育种的基础,目前生产上采用的鉴定方法主要有田间人工接种鉴定、田间自然诱发鉴定、室内薯块人工接种鉴定、室内薯苗人工接种鉴定等。由于田间鉴定费时费力、受外界环境影响较大,组织幼嫩的薯苗接种会致发病较重、不易区分品种抗性等级,一般多采用室内薯块人工接种鉴定法^[3-4]。然而此法在使用过程中仍有不足,尤其是病原菌的扩繁效率和纯度。本研究通过利用甘薯液体培养基培养黑斑病菌,极大程度改善了传统薯片法的缺陷,可为甘薯黑斑病的高效精准鉴定提供新的参考。

1 材料与与方法

1.1 供试材料

用于黑斑病菌活力鉴定的苏薯8号和华东51-93,以及用于黑斑病抗性鉴定的苏渝303等8个甘薯品种均由江苏省农业科学院粮食作物研究所甘薯研究室提供和保存。

1.2 病原菌分离和纯化

从田间采集黑斑病发病薯块,通过组织分离法分离黑斑病菌。分离时洗去薯块表面泥土,并用75%乙醇进行表面消

毒,在超净工作台上将病斑表皮去除,取病斑部并切成小块。将病斑部接种在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板上培养,经分离纯化和柯赫氏法则验证确定。

1.3 黑斑病菌的培养和孢子悬浮液制备

取2g薯块(薯块颜色白色为宜),加水煮沸并搅拌,使薯块彻底匀浆在溶液中,纱布过滤,将滤液高压灭菌制备甘薯液体培养基。将分离纯化的黑斑病菌接入甘薯液体培养基中,28℃摇床150~200 r/min培养20~24 h。灭菌纱布过滤去除菌丝后,6 000 r/min离心5 min,之后用无菌水悬浮获得孢子悬浮液,并将其 $D_{600\text{ nm}}$ 调至1.0。

1.4 病原菌接种与薯块处理

采用针刺接种法接种,用医用注射针头蘸取配好的菌液,穿刺测试的薯块进行接种,每个薯块接种15个点(注意:每针刺1次,针头需蘸取菌液),深度0.5 cm。接种后的薯块装入消毒的塑料箱中,加盖消毒纱布,置于25~28℃的恒温室中,每天上午、下午各用温水浇湿覆盖纱布1次进行保湿。

1.5 发病情况调查

每个测试品种重复接种4~10次,接种15 d后测量薯块的病斑表面直径,计算平均病斑直径并确定其抗病等级。

具体评价标准为:直径<1.0 cm,高抗;1.0 cm≤直径<1.3 cm,抗病;1.3 cm≤直径<1.6 cm,中抗;1.6 cm≤直径<1.9 cm,感病;直径≥1.9 cm,高感。

2 结果与分析

2.1 利用甘薯液体培养基扩大培养黑斑病菌的活力鉴定

将分离得到的黑斑病菌接入甘薯液体培养基中过夜培养,纱布过滤离心后制成孢子悬浮液。经显微镜镜检发现,孢子悬浮液中杂质较少,且孢子形态正常(图1-A)。为鉴定孢子是否有活力,采用室内薯块人工接种法对苏薯8号和华东51-93进行黑斑病菌接种预试验。试验发现,接种2 d后在苏薯8号和华东51-93的薯块表面即出现黑斑病病斑,且随着接种天数的延长病斑越明显,接种10 d后的病菌在甘薯薯块纵切面有不同程度的致病(图1-B)。该结果证明,通过甘薯液体培养基扩大培养的黑斑病菌能够明显减少杂菌污

收稿日期:2017-05-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:31601382);现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-11-C-03)

作者简介:禹 阳(1988—),女,江苏扬州人,博士,从事甘薯生物技术与遗传育种研究。E-mail:fairyyu88@126.com。

通信作者:边小峰,博士,副研究员,从事甘薯生物技术与遗传育种研究。E-mail:bianxiaofeng2@163.com。

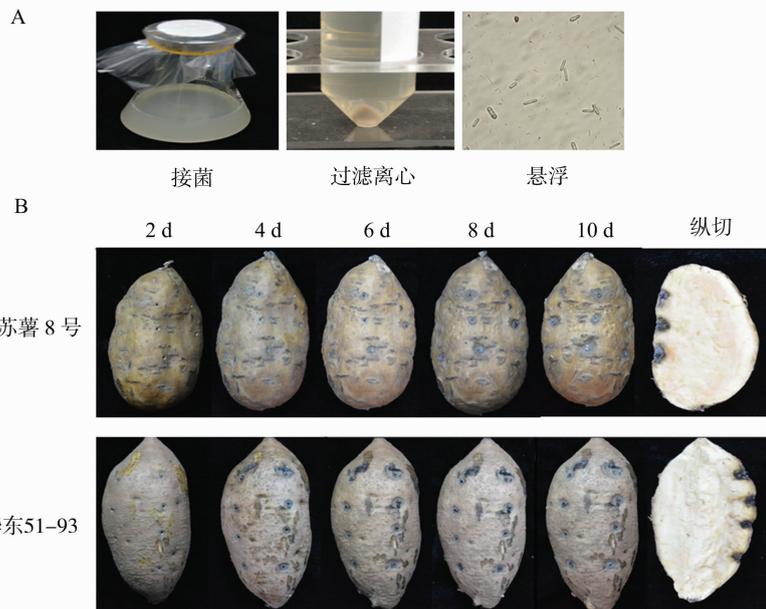


图1 利用甘薯液体培养基培养黑斑病菌及其活力鉴定

染,孢子活力大,可以成功使甘薯发病,能够用于生产上的甘薯黑斑病抗性鉴定。

2.2 利用液体培养基培养黑斑病菌进行品种抗性鉴定

利用甘薯液体培养基培养黑斑病菌的方法,于2016、2017年采用室内薯块人工接种法对苏渝303等8个品种进行黑斑病抗性鉴定。其中鉴定出抗病品种2个,分别为宁W50-20和南京1063;中抗品种4个,分别是苏渝303、宁紫1号、徐薯36和宁104-1;感病品种2个,分别为徐紫8号和宁W50-13。通过分析2年的数据发现,利用甘薯液体培养基培养黑斑病菌进行甘薯黑斑病抗性鉴定的结果较为稳定一致,说明该培养方法能够科学可靠地反映供试材料的抗病性。

表1 甘薯品种黑斑病抗性鉴定

品种	平均病斑直径(cm)		抗性等级
	2016年	2017年	
苏渝303	1.28	1.27	中抗
徐紫8号	1.40	1.66	感病
宁紫1号	1.28	1.43	中抗
徐薯36	1.41	1.41	中抗
宁104-1	1.56	1.36	中抗
宁W50-20	1.12	1.38	抗病
宁W50-13	1.85	1.62	感病
南京1063	1.04	0.92	抗病

3 讨论与结论

甘薯黑斑病的传播途径较多,在生产上属于顽固性病害,难以彻底根除,因此选育抗病品种是防治黑斑病的重要途径之一。黑斑病抗性鉴定作为甘薯抗病性研究的重要环节,其科学性将直接影响甘薯抗黑斑病品种的选育。

目前,生产上普遍采用传统的薯片法培养黑斑病菌进行甘薯黑斑病抗性的室内薯块人工接种鉴定^[5],即将切好的薯片放入加水稀释的捣烂薯块黑斑病斑部,内浸后晾干表面水分,在无菌培养皿内培养5~6d至薯片表面长满浅灰色的

分生孢子,之后制成孢子悬浮液以接种。在这个过程中,不仅薯片易腐烂,也容易混入杂菌,且耗时较长,因此无法科学精准地对甘薯品种黑斑病的抗性作出评价。液体培养基扩大培养真菌孢子进行植物抗病性鉴定的方法已在多种农作物中被广泛应用,该方法具有周期短、污染少、灵敏性高等特点,为植物抗病品种选育提供了切实可靠有效的指导^[6-7]。借鉴这些农作物的真菌病害鉴定方法,本研究对传统的甘薯黑斑病抗性鉴定方法进行了改进。与传统的薯片法相比,利用甘薯液体培养基对分离纯化的甘薯黑斑病菌进行扩大培养只需20~24h,不仅能够极大缩短黑斑病菌的增殖时间,而且操作过程简单、条件可控、不易污染。此外,由此制备的孢子悬浮液中杂菌少,孢子活力强。

采用甘薯液体培养基培养黑斑病菌的方法,连续2年对苏渝303等8个甘薯品种进行黑斑病抗性鉴定的结果较为稳定一致,进一步说明该培养方法的鉴定结果科学准确,能够有效反映甘薯品种对黑斑病的抗性水平,可以为甘薯抗黑斑病品种选育提供高效的抗性鉴定方法。

参考文献:

- [1] 陈利锋,徐敬友. 农业植物病理学[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2007:201-205.
- [2] 江苏省农业科学院,山东省农业科学院. 中国甘薯栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984:201-203,265-270.
- [3] 冯启涣,陆漱韵,王莉莉,等. 甘薯黑斑病人工接种方法研究[J]. 中国农业大学学报,1998,3(1):50-56.
- [4] 贾赵东,郭小丁,尹晴红,等. 甘薯黑斑病的研究现状与展望[J]. 江苏农业科学,2011,39(1):144-147.
- [5] 谢一芝,尹晴红,戴起伟,等. 甘薯品种抗黑斑病鉴定及其遗传趋势[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(4):311-313.
- [6] 沈万宽,姜子德,杨湛端,等. 甘蔗抗黑穗病的鉴定新方法及其品种抗性评价[J]. 华中农业大学学报,2014,33(2):51-56.
- [7] 周森平,姚金保,张鹏,等. 小麦幼苗纹枯病抗性评价新方法[J]. 江苏农业学报,2017,33(1):61-66.