

马铃薯黑胫病菌分离纯化体系的建立

董学志^{1,2}, 胡林双², 魏琪², 邱彩玲^{1,2}, 闵凡祥², 杨松³, 李永刚¹

(1. 东北农业大学农学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省华山监狱, 黑龙江五大连池 164153)

摘要: 为了指导马铃薯黑胫病相关试验, 利用 CVP 培养基, 对疑似感染了黑胫病的马铃薯植株进行病原菌的分离、鉴定和纯化, 并对菌株的 3 种保存方法进行比较和探讨, 同时采用病原菌回接的方法对菌株致病性进行鉴定, 最终成功建立了马铃薯黑胫病菌分离纯化体系。

关键词: 马铃薯黑胫病; 分离; 纯化; 菌株保存; 致病性鉴定

中图分类号: S435.32

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)07-0045-04

马铃薯黑胫病(Potato Black Leg)是由 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) 诱发的一种细菌性病害, 又称黑腿病, 是以茎基部腐烂变黑的症状而命名的。*E. carotovora* subsp. *atroseptica* 是一种革兰氏染色呈阴性的致病菌。马铃薯黑胫病在我国主要马铃薯栽培区都有发生, 植株发病率轻时达 2%~5%, 严重时可达 40%~50%。近几年来, 黑龙江、内蒙古等栽培区病情逐年加重, 降水量大的年份可造成严重减产。马铃薯黑胫病不但造成烂种死苗, 而且还会造成贮藏期的烂窖, 使马铃薯的品质、产量和商品薯率大幅度降低, 因此世界各国都把它列为重要的检疫对象。最新研究表明, 马铃薯植株中存在着肉眼无法看到的潜隐性侵染, 这种潜隐性侵染经过逐代积累逐渐表现出病症, 这是马铃薯黑胫病无法根除的根本原因^[1-4]。

黑胫病菌在 CVP 选择性培养基上生长, 能够形成乳白色的菌落, 同时使培养基中的果胶酸盐发生分解反应, 导致培养基呈现弱酸化, 2~3 d 后在菌落周围形成很深的、杯状的凹陷特征。以此特点对马铃薯中的黑胫病菌进行分离和纯化^[5]。

现对疑似感染了马铃薯黑胫病的植株进行病原菌的分离与纯化, 对黑胫病菌菌株保存方法进

行研究和比较, 并且对保存的菌株进行致病性鉴定。从而建立马铃薯黑胫病菌分离纯化体系, 为以后更深入地研究打下坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与试验材料 试验所用疑似感染黑胫病的马铃薯植株于 2011 年、2012 年采自黑龙江省绥化市、克山县、内蒙古、广东、广西及甘肃等省的田间样品。

阳性对照菌种均由国际马铃薯中心(CIP)提供。该研究所用的马铃薯品种荷兰 15 微型薯由农业部脱毒马铃薯种薯质量监督检验测试中心(哈尔滨)提供。

1.1.2 常用培养基及试剂 培养基有 CVP 选择性培养基、kel 培养基和马铃薯培养基。试验中所用的培养基均经过 120℃ 高温灭菌 20 min。试剂有革兰氏染色液和脱脂奶粉(分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯黑胫病菌的分离与纯化 (1) 马铃薯黑胫病菌的分离。将疑似感染了黑胫病的马铃薯茎部放入 2% 的次氯酸钠水溶液中, 处理 3 min, 再用灭菌水冲洗 2 次, 用灭菌的面巾纸将材料吸干。用灭菌的手术刀从茎部腐烂发黑的部分以上 3 cm 处开始将茎切成 2~3 mm 的组织切片, 在组织切片上能够看到变黑的维管束, 用灭菌的手术刀将维管束切下, 放入灭菌的研钵中加 1 000 μL 灭菌水研磨成组织液。用涂布棒蘸取组织液在 CVP 选择性培养基上涂板, 置于培养箱中, 23℃ 培养 2~3 d。利用马铃薯黑胫病菌在 CVP 培养基上的特异性形态, 挑取单菌落进行革兰氏染色, 染色后在 10×100 倍显微镜下镜检。

(2) 马铃薯黑胫病菌的纯化。鉴于马铃薯黑

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 黑龙江省青年科学基金资助项目(QC2011C082); 国家马铃薯产业技术体系资助项目(CARS-10-P/4); “十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD06B02)

第一作者简介: 董学志(1983-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 在读硕士, 研究实习员, 从事马铃薯病害研究。E-mail: dongxuezhizhi_96@126.com。

通讯作者: 李永刚(1975-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 副教授, 从事植物分子抗病机制研究。E-mail: neaulyg@yahoo.cn。

胫病菌总是与其它细菌联合侵染马铃薯,所以要利用革兰氏染色的方法对病原菌进行纯度鉴定。如果在镜检过程中发现存在杂菌,则用接种环蘸取马铃薯黑胫病单菌落于 1 000 μ L 灭菌水中,涡旋仪轻微涡旋,直至混匀,用涂布棒蘸取菌液,重新在 CVP 平板培养基上涂板,23℃ 培养 2~3 d,革兰氏染色,10 \times 100 倍显微镜下进行观察,显微镜下除了淡粉色的短杆菌外,如果还存在其它杂菌,则挑取培养基凹陷中的单菌落重新涂板并培养,直到纯化无杂菌为止。

1.2.2 马铃薯黑胫病菌菌株保存 (1)kel 培养基保存法。在 CVP 选择性培养基上对马铃薯黑胫病菌进行纯化后,挑取病原菌单菌落在装有 kel 斜面培养基的试管中划线培养,置于培养箱中,23℃ 培养 2~3 d 后,2℃ 保存菌株。

(2)灭菌水保存法。在 CVP 选择性培养基上对马铃薯黑胫病菌进行纯化后,挑取病原菌单菌落装入盛有 2 mL 灭菌水的 Eppendorf 管中。涡旋仪轻微涡旋,直至混和均匀,置于冰箱中 2℃ 保存。

(3)真空冷冻干燥保存法。将马铃薯黑胫病菌在马铃薯培养基上涂板培养,置于培养箱中,23℃ 培养 2~3 d,这时菌株处在指数生长期,在超净工作台中,向马铃薯培养基中加入 15%~20% 的脱脂牛奶 500 μ L,涡旋仪轻微涡旋,直至马铃薯黑胫病菌与脱脂牛奶充分混匀,将混合液注入安瓿管中,置于-18℃ 冰箱中冷冻,第 2 天将充分冷冻的安瓿管置于真空冷冻干燥机中,在低温下抽真空 2 d。真空冷冻干燥后,将安瓿管高温封口,-18℃ 保存。

1.2.3 病原菌的致病性鉴定 在温室内利用病原菌回接的方法来测定马铃薯黑胫病菌的致病性。取马铃薯品种荷兰 15 微型薯,在室内见光存放 15 d,进行催芽。然后将草炭土和珍珠岩混合,进行马铃薯微型薯种植。马铃薯植株生长温度为 20℃,在温室内种植了 20 d 后,将马铃薯黑胫病菌在马铃薯培养基上涂板培养 2 d,这时是黑胫病菌活性最好的时期。利用灭菌牙签蘸取病原菌,刺入马铃薯植株的叶腋处。21 d 后,通过观察被接种植株上黑胫病的表现症状来进行评估。

2 结果与分析

2.1 马铃薯黑胫病菌的分离与纯化

利用 CVP 选择性培养基,对来自不同地区的 10 株疑似感染黑胫病的马铃薯植株进行病原菌的分离和纯化(见图 1)。获得了 10 株黑胫病菌株,采集地点与采集年份等情况详见表 1。

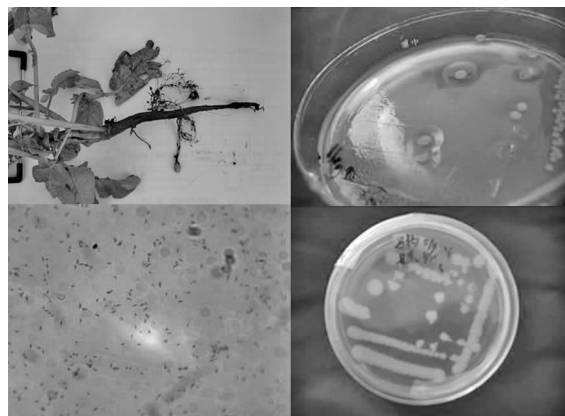


图 1 马铃薯黑胫病菌的分离与纯化

Fig. 1 Isolation and purification of potato black leg pathogen

表 1 供试菌株的检测地区及获取时间

Table 1 Detection area and acquisition year of the strains

编号 No.	菌株名称 Name of strains	检测地区 Detection area	获得时间 Acquisition year
1	KFS1	甘肃	2011
2	BL1	绥化	2011
3	BL2	绥化	2011
4	BL3	绥化	2011
5	BL4	绥化	2011
6	KFS2	哈尔滨	2012
7	KFS3	哈尔滨	2012
8	BL5	内蒙古	2012
9	BL6	广东	2012
10	BL7	广西	2012

通过对疑似感病马铃薯植株的处理,能够在 CVP 选择性培养基上观察到使培养基表面产生凹陷的菌落,即马铃薯黑胫病菌,达到了分离黑胫病菌的目的。

2.2 3 种不同保存黑胫病菌的方法比较

在 kel 斜面培养基上 2℃ 保存的马铃薯黑胫病菌种,30 d 内将保存的菌种在 CVP 选择性培养基上涂板,经培养后有病原菌生长,证明其仍有活性。

利用灭菌水 2℃ 保存的马铃薯黑胫病菌种,1 a 内将保存的菌种在 CVP 选择性培养基上涂板,经培养后有病原菌生长,证明其仍有活性。

利用真空冷冻干燥法保存的马铃薯黑胫病菌种,经过 2 a 的试验,利用蛋白胨液体培养基对保存的菌种进行复壮后,在 CVP 选择性培养基上涂板,经培养后有病原菌生长,证明其至今仍有活性(见表 2)。

表 2 对菌种(KFS1、BL1、BL7)不同保存方法的比较

Table 2 Comparison of different preservation methods for strains(KFS1、BL1、BL7)

保存方法 Preservation method	菌株生活力 Viability of strains								
	30 d 后 After 30 days			1 a 后 After 1 years			2 a 后 After 2 years		
	KFS1	BL1	BL7	KFS1	BL1	BL7	KFS1	BL1	BL7
Kel 斜面培养基 Kel agar slant culture medium	+	+	+	—	—	—	—	—	—
灭菌水 2℃ 保存 Preservation in sterile water at 2℃	+	+	+	+	+	+	—	—	—
真空冻干保存 Vacuum freeze dehydration preservation	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: + 表示在 CVP 培养基上能够检测到黑胫病菌; — 表示在 CVP 培养基上不能检测到黑胫病菌。

Note: + can detect potato black leg pathogen in CVP medium; — can't detect potato black leg pathogen in CVP medium.

2.3 马铃薯黑胫病菌的致病性鉴定

在马铃薯品种荷兰 15 植株上, 将 KFS1、KFS2、BL5 这 3 个有代表性的菌种进行病原菌回接试验。控制温室内的温湿度等外界条件, 诱发马铃薯黑胫病的发生(见图 2, 图 3, 图 4)。

由图 2 可知, 没有回接黑胫病菌前, 马铃薯植株生长正常。用 KFS1 菌株接种后的马铃薯植株, 2012 年 11 月 22 日时, 植株接种的部位出现茎部变黑的症状。2012 年 11 月 25 日, 植株的茎部变黑区域显著扩大, 说明马铃薯黑胫病菌已经通过维管束向周围组织侵染。同时茎部裂开并有带有臭味的菌脓流出, 植株在接种的地方出现弯折的症状, 说明马铃薯黑胫病菌分泌的果胶酶使细胞壁的中胶层分解, 因此造成细胞解离、组织松散、植株腐烂。

由图 3 可知, 没有回接黑胫病菌前, 马铃薯植株生长正常。用 BL5 菌株接种后的马铃薯植株, 2012 年 11 月 20 日时, 植株接种的部位出现茎部变黑的症状, 同时植株在接种的地方出现弯折的现象。2012 年 11 月 22 日时, 植株出现萎蔫的症状, 并且有臭味的菌脓流出。2012 年 11 月 25 日时, 被接种的植株萎蔫更加严重, 已经接近死亡。

由图 4 可知, 没有回接黑胫病菌前, 马铃薯植株生长正常。用 KFS2 菌株接种后的马铃薯植株, 2012 年 11 月 20 日时, 植株接种的部位出现茎部变黑的症状。2012 年 11 月 22 日时, 部分植株接种的地方彻底变黑, 同时植株的侧枝及叶片开始腐烂解体, 并掉落下来。2012 年 11 月 25 日时, 植株完全腐烂枯死。

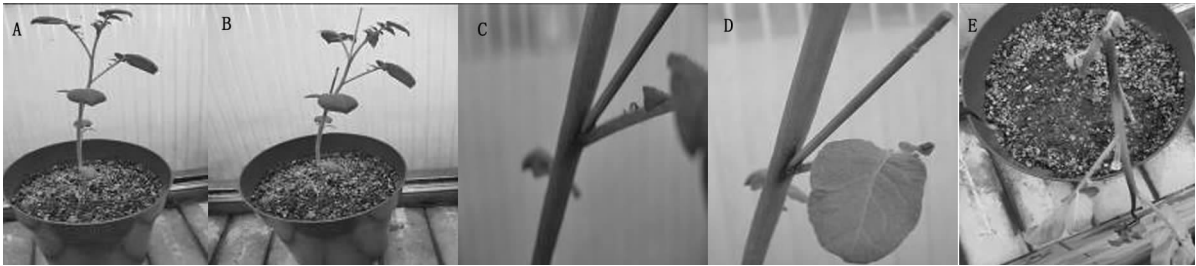


图 2 KFS1 菌株接种马铃薯荷兰 15 植株的鉴定结果

Fig. 2 Identification result of the KFS1 strains by inoculating

A. 接种前; B. 10 月 30 日; C. 11 月 20 日 13 点; D. 11 月 22 日 13 点; E. 11 月 25 日 13 点。下同。

A. Before inoculation; B. October 30; C. 1 p. m. November 20; D. 1 p. m. November 22; E. 1 p. m. November 25

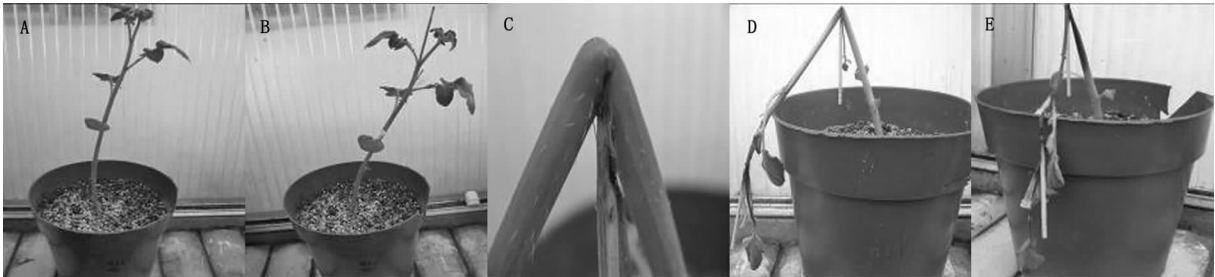


图 3 BL5 菌株接种马铃薯荷兰 15 植株的鉴定结果

Fig. 3 Identification result of the BL5 strains by inoculating

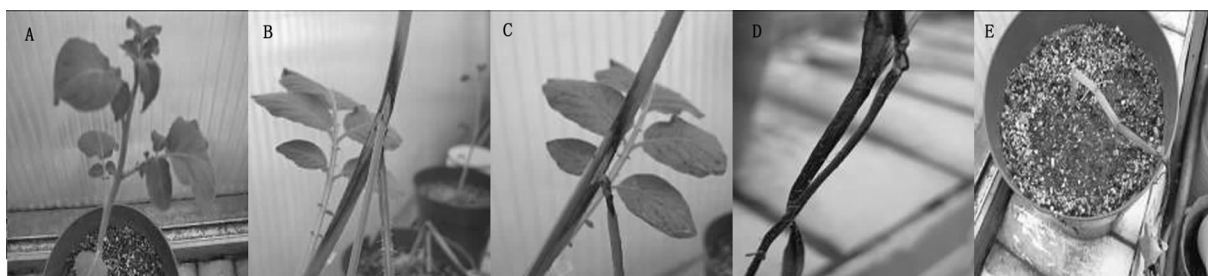


图4 KFS2菌株接种马铃薯荷兰15植株的鉴定结果

Fig. 4 Identification result of the KFS2 strains by inoculating

3 结论与讨论

通过对疑似感染了黑胫病的马铃薯植株进行病原菌的分离与鉴定,证明该试验采用的方法可以成功地从发病植株中分离到黑胫病菌,分离成功率达100%,且方法简便易行、省时省力,具备基本实验条件的实验室均可独立完成。

通过对3种保存黑胫病菌的方法进行比较,可以得出:斜面培养基法适合短期保存,如在短时间内经常使用此菌,可以用这种保存方法;灭菌水法适合中长期保存马铃薯黑胫病菌株;而冻干法则可以长期保存黑胫病菌,如遇短期或中期保存的菌株意外死亡或失活时可作备用。

该试验对不同地区的3个马铃薯黑胫病菌株进行致病性鉴定试验,经过接种的马铃薯植株均感染了马铃薯黑胫病,说明这3个黑胫病菌株均有很强的致病力,且在该试验所设置的温湿度条

件下,此种接种方法行之有效。

综上所述,该试验所建立的马铃薯黑胫病菌分离和纯化体系可以成功地对黑胫病菌进行分离、纯化、保存以及菌株致病性的鉴定,对相关试验的实施具有指导性意义。

参考文献:

- [1] 牛志敏. 马铃薯黑胫病的发生与防治[J]. 中国马铃薯, 2002, 16(2): 116-117.
- [2] 孙秀梅. 黑龙江省马铃薯黑胫病的发生与防治[J]. 中国农村小康科技, 2005(12): 44.
- [3] 于恒纯, 滕丽雅, 闫明宇. 黑龙江省马铃薯细菌病害调查初报[J]. 中国马铃薯, 2003, 7(2): 122-123.
- [4] Elphinstone T G. Contamination of progeny tubers of potato plants by seed and leaf borne *Erwinia carotovora* [J]. Potato Research, 1986, 29(1): 77-93.
- [5] Schaad N W, Jones J B, Chun W. 植物病原细菌鉴定实验指导[M]. 3版. 赵廷昌, 译. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2011: 43-44.

Establishment of Isolation and Purification System of Potato Black Leg Pathogen

DONG Xue-zhi^{1,2}, HU Lin-shuang², WEI Qi², QIU Cai-ling^{1,2}, MIN Fan-xiang², YANG Song³, LI Yong-gang¹

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Virus-free Seedling Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 3. Huashan Prison in Heilongjiang Province, Wudalianchi, Heilongjiang 164153)

Abstract: In order to guide relevant test of potato black leg, CVP medium was used to isolate, identify and purify the pathogen of the potato plant that was suspected infected with black leg. Three preservation methods of strain were compared and discussed, Inoculation test were used to identify the virulence of pathogenic. At last, the separation and purification system of potato black leg pathogen was established successfully.

Key words: potato black leg; isolation; purification; strains preservation; identification of pathogenic