

甘薯根腐病原菌粗毒素对甘薯生长的影响

柴一秋^{1,2*}, 陈利锋², 王金生²

(¹ 浙江省亚热带作物研究所, 温州 325005; ² 南京农业大学植物病理学系 农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 本文鉴定了茄病镰孢甘薯专化型 [*Fusarium solani* (Mart) Sacc. f. sp. *batatas* McClure, 简称 FSB] 引起甘薯 胜利百号根腐病以及诱导胜利百号显蕾开花, 并研究了菌株 V100-93-06 粗毒素对胜利百号组培苗生长的影响。结果表明, 菌株 V100-93-06 对不同甘薯栽培品种呈现不同的致病性, 其粗毒素能够诱导甘薯出现和病原菌寄生相似的部分症状。粗毒素原液处理胜利百号薯苗 2、3、5 和 9 d, 病情指数分别为 0.9、2.8、2.5 和 3.0, 而 10 倍稀释浓度的粗毒素处理 2、3、5 和 9 d, 病情指数分别为 0、1.5、2.8 和 2.5。1~1 000 倍稀释浓度的粗毒素处理胜利百号组培苗 3 h, 就能够诱导出现黄叶, 浓度越高诱导出现黄叶数越多; 对基芽和根的影响则表现为抑制基芽和根的生长, 浓度越高基芽和根的数量越少; 对根伸长生长的影响表现为 1 倍稀释浓度粗毒素抑制根的伸长生长, 10~1 000 倍稀释浓度都能够促进根的伸长生长。

关键词: 茄病镰孢甘薯专化型; 甘薯; 开花; 粗毒素; 组织培养

Effect of crude toxin of *Fusarium solani* f. sp. *batatas* on the growth of sweet potato

CHAI Yi-qiu^{1,2}, CHEN Li-feng², WANG Jin-sheng² (¹ Institute of Subtropical Crops of Zhejiang Province; Wenzhou 325005, China; ² Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects, Ministry of Agriculture; Department of Plant Pathology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Fusarium solani* (Mart) Sacc. f. sp. *batatas* McClure (abbreviation as FSB) was identified to cause root rot and induce flowering of sweet potato Shenglibaihao. The effect of crude toxin of strain V100-93-06 of FSB on the growth of sweet potato tissue culture seedlings was studied. The results showed that the virulence of V100-93-06 to different varieties varied, and its crude toxin resulted in similar symptoms as the fungal infection. The disease index of symptom of Shenglibaihao seedlings was 0.9, 2.8, 2.5 and 3.0 at 2th, 3th, 5th, and 9th d after treated with the crude toxin, and the disease index of symptom was 0, 1.5, 2.8 and 2.5 treated with 10 dilutions. When the seedlings of tissue culture of Shenglibaihao treated with 1–1 000 dilutions of crude toxin, yellow leaves were induced only in 3 h, and the high concentration of crude toxin was used, the more yellow leaves was got; the crude toxin inhibited the growth of the hypoblasts and roots, the number of the hypoblasts and roots was decreased as the crude toxin concentrations increased; 1 dilution inhibited the growth of the length of the roots, but the growth of the length of the roots was advanced when treated with 10–1 000 dilutions.

Key words: *Fusarium solani* f. sp. *batatas*; sweet potato; flowering; crude toxin; tissue culture

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2007)06-0604-06

甘薯根腐病 [*Fusarium solani* (Mart) Sacc. f. sp. *batatas* McClure] 为典型的土传、毁灭性病害, 蔓延迅速, 防治困难, 发病田块轻者减产 10% ~

20%、重者减产 40%~50%, 甚至绝产^[1,2]。实践证明, 选用抗病品种是最为经济有效的防治措施, 抗根腐病是甘薯抗病育种的重要指标之一^[3]。目前

收稿日期: 2007-06-18; 修回日期: 2007-09-30

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(J99004)

通讯作者: 柴一秋, 副研究员, 主要从事真菌应用研究; Tel: 0577-88520251, Fax: 0577-88520338, E-mail: chai-yiqiu@yeah.net。

国内外甘薯抗甘薯根腐病的鉴定方法主要有室内盆栽鉴定、大田成株期人工辅助接种鉴定和大田病圃或非病圃自然侵染鉴定法,存在效率低、成本高、时间长或受季节和环境因素影响等缺点^[4]。鉴于国内外有许多其它病原菌粗毒素应用于寄主作物抗病筛选的研究报道^[5-8],为了快速、高效和准确地从大量育出的品种中检测筛选抗甘薯根腐病品种,本文通过甘薯根腐病原菌粗毒素对甘薯组培苗生长的影响的研究,为建立甘薯根腐病抗性快速检测提供试验依据。现将我们的研究报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本采集

1999~2000年,从江苏徐州甘薯研究中心港上镇病圃采集胜利百号现蕾开花的病株根部,用湿润的病圃土壤包埋带回实验室,共采集129份病组织进行分离。

1.2 培养基

分离培养基为固体PSA,诱导产孢培养基为Balai's^[9],产生色素培养基为米饭培养基^[10]。甘薯组培苗培养基为MS^[9]。毒素培养基为液体F2培养基(NH_4NO_3 10.0 g、 KH_2PO_4 5.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g、蒸馏水1 000 mL,高压湿热灭菌后,用过滤法加入L-木糖30 g)^[10]。

1.3 供试品种

甘薯徐18是甘薯根腐病高度抗病品种。胜利百号是高度感病品种,在南京地区不会自然开花。194039-1、96-31-5、Su 6和P616-23是中等抗病品种。

1.4 甘薯单芽组培苗体系

取胜利百号和徐18无土栽培健壮顶芽或侧芽,常规消毒后放在不加任何激素的MS培养基上置光照培养箱(25℃,85% RH,2 000 Lx,12 h光照,12 h黑暗)繁殖成单芽组培苗体系,可用于毒素测试。选择生长状况一致的壮苗移栽基质为灭菌蛭石的塑料花盆(直径12 cm)中,置另外光照培养箱(条件同上),1/2 MS培养液浇灌维持正常生长。挑选具4~5节、5张叶片、8条根和株高15 cm的植株用于接种。

1.5 病原菌分离鉴定

病株根部组织分离和单孢分离^[9]:2%洗衣粉溶液浸泡3~5 min、清水冲洗10~20 min根部病键交界处组织,放入次氯酸钠溶液(次氯酸钠10 g+水140 mL混合,过滤后使用)中消毒3~5 min,再用无菌水冲洗3~4次,置PSA平板25℃条件下培养2~3 d,切取边缘带有菌丝的培养基小块继续培养7~15 d后,选取粘孢团单孢分离,观察菌落特征及显微特征,-20℃保存单孢菌株。

从针刺接种法(3.0×10^8 孢子/mL)回接发病的开花病株根部分离病原菌并鉴定^[10-12]。选取根部出现典型发病症状的开花植株,从根尖或中部出现黑褐色病斑或者大部分根变黑腐烂部位,分离病原菌,并培养、鉴定。

1.6 对不同品种的致病性测定

采用病原菌在不同品种薯块组织中的扩展范围来测定致病性^[13],将胜利百号、苏6、96-31-5、194039-1、P616-23和徐18等6个甘薯栽培品种的薯块切成1.5 cm厚的薯片(约125 g/块),其上用0.5 cm直径的打孔器打0.5 cm深的洞(洞间距1.5 cm×1.5 cm),挖除洞内组织,每洞加V100-93-06菌株分生孢子悬浮液(3.0×10^5 孢子/mL)60 μL,以清水为对照,放入直径15 cm的培养皿,用灭菌蛭石保湿,置25℃培养7 d,取洞底水平4个方向组织分离培养确定病原菌扩展最远端来判断发病情况。每重复5块,每处理8个重复。

1.7 病原菌粗毒素制备

将F2液体培养滤液30 mL煮沸15 min后,用0.1 N NaOH调至pH 9.2,再经直径0.45 μm微孔滤膜抽滤,弃滤渣,滤液用0.1 N HCl调至pH 2.5,培养滤液用3倍体积的乙酸乙酯萃取3次,弃水相,合并酯相。旋转蒸发仪50℃蒸干,溶于30 mL水,经透析袋(截留分子量1 000 D)磁力振荡透析24 h,收集保留液,并浓缩至30 mL,为粗毒素原液^[14]。

1.8 粗毒素对甘薯叶片、基芽和根生长的影响

将上述粗毒素原液15 mL稀释1、10、100、1 000和10 000倍。取健壮,高6 cm,7张展开叶的同一单芽组培苗体系茎尖,转入装有10 mL各稀释浓度的粗毒素中分别处理0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8和2.1 h后转接不加任何激素的MS培养基置25℃,

12 h 黑暗, 12 h 光照培养 10 d (重复数为 12, 上述 F2 液体培养基为空白对照)。

1.9 病情分级标准

病情指数分级参照如下标准^[10]: 0 级, 无可见症状。1 级, 植株叶片上有褪绿斑或黄化斑, 少数须根 (0 ~ 20%) 腐烂。2 级, 整株黄化。少数叶片上甚至可出现坏死斑, 约 20% ~ 50% 的须根腐烂。3 级, 整株叶片枯死并脱落, 大部分或全部须根 (50% 以上腐烂)。

2 结果与分析

2.1 病原菌鉴定

从根腐开花植株的根系黑斑分离出 93 株真菌, 经过菌落颜色、色素、菌落直径和粘孢团特征的观察, 选择生长旺盛的菌株 V100-93-06。

该菌在 PSA 培养基上 28℃ 培养 4 d, 菌落圆形, 菌落直径 5.5 ~ 6.8 cm, 灰白色或白色, 易产生角变, 稀绒毛状至密绒毛状或絮状, 产生土黄色粘孢团, 背面肉色。在米饭培养基上菌落背面为咖啡色。在 Balai's 培养基上菌落白色, 气生菌丝稀少。

产生小型分生孢子的瓶梗单生, 细长, (20.0 ~ 25.0) μm $\times$ (2.0 ~ 3.0) μm , 侧生于菌丝上, 较少分枝。小型分生孢子卵圆形至椭圆形, (8.0 ~ 10.0) μm $\times$ (2.5 ~ 4.0) μm , 在瓶梗顶端聚成头状。大型分生孢子纺锤形或圆柱形, 顶细胞圆形或似喙状, 足细胞不明显, 3 ~ 5 个隔膜, 少数 1 ~ 2 个隔膜。1 ~ 2 个隔的大小为 (10.0 ~ 35.0) μm $\times$ (2.5 ~ 5.0) μm , 3 ~ 4 隔的 (30.1 ~ 42.2) μm $\times$ (3.4 ~ 5.6) μm , 5 隔的 (31.4 ~ 48.4) μm $\times$ (3.8 ~ 6.5) μm 。厚垣孢子球形至近球形, 单生或链生, 顶生或间生, 直径 5.4 ~ 9.7 μm 。产生大型分生孢子的瓶梗 (9.0 ~ 15.0) μm $\times$ (3.5 ~ 4.5) μm , 聚生成分生孢子座, 粘孢团黄色或蓝绿色。依据这些特征, 该菌株被鉴定为茄病镰孢甘薯专化型 [*Fusarium solani* (Mart) Sacc. f. sp. *batatas* McClure, 简称 FSB]。

2001 年 8 月, 以及 2002 年 8 月采用菌株 V100-93-06 针刺接种甘薯品种胜利百号和徐 18 无土栽培苗, 胜利百号出现上述典型的根腐开花症状, 徐 18 以及对照没有症状。从胜利百号病株根系黑斑分离的病原菌特征经鉴定与菌株 V100-93-06 一致。

2.2 菌株 V100-93-06 对不同甘薯栽培品种的致病性

菌株 V100-93-06 对不同的甘薯栽培品种具有不同的致病性, 胜利百号最易感染, 徐 18 抗性最好, 其他品种抗性处于两者之间 (表 1)。

Table 1 Susceptibility of six sweet potato cultivars to the strain V100-93-06

Cultivars	Mycelium extension within sweet potato* (cm)
Shenglibaihao	4.40 (4.25 - 4.53) a**
194039-1	2.95 (2.86 - 3.09) a
96-31-5	2.52 (2.50 - 2.53) b
Su 6	1.88 (1.82 - 0.21) c
P616-23	0.81 (0.73 - 0.86) d
Xu 18	0.50 (0.42 - 0.54) e

* : The values are averages of eight replicates (minimum value to maximum value).

** : Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$ (same as follows).

2.3 菌株 V100-93-06 粗毒素诱导甘薯叶片出现类似于病原菌寄生的症状

从病情指数分析, 粗毒素能够显著诱导胜利百号出现类似于病原菌寄生的症状, 但对徐 18 没有显著影响。粗毒素对薯苗的影响与浓度成正比, 浓度越高出现的症状越严重 (表 2)。粗毒素抑制胜利百号组培苗侧芽和基芽分化, 使叶片变黄、脱落 (图 1-A)。

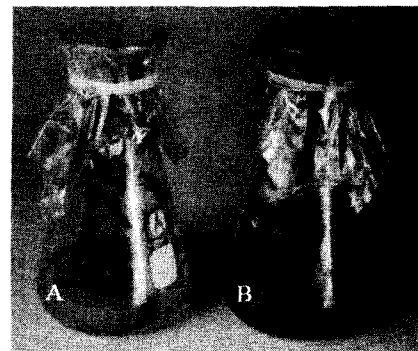


Fig. 1 Effect of crude toxin of the strain V100-93-06 on the leaves and hypoblasts of Shenglibaihao tissue culture seedlings

A: One month culture with crude toxin; B: Control.

Table 2 The effect of crude toxin of V100-93-06 on sweet potato seedlings

Treatment time(d)	Cultivars	Disease index [*]				
		1	10	100	1 000	10 000
2	Shenglibaihao	0.9(0-1)c**	0	0	0	0
	Xu18	0	0	0	0	0
3	Shenglibaihao	2.8(2-3)a	1.5(1-2)b	0	0	0
	Xu18	0.8(0-1)c	0	0	0	0
5	Shenglibaihao	2.5(2-3)a	2.8(2-3)a	0	0	0
	Xu18	0.6(0-1)c	0	0	0	0
9	Shenglibaihao	3.0a	2.5(2-3)a	2.1(2-3)a	1	0
	Xu18	1.0c	0.9(0-1)c	0.8(0-1)c	0	0

* : The values are averages of eight replicates (minimum value to maximum value).

** : Different letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

2.4 菌株 V100-93-06 粗毒素对甘薯单芽组培苗叶片、基芽和根生长的影响

处理组叶片由下而上变黄,随着稀释倍数的增加,出现黄叶数减少;与对照相比,各稀释浓度的粗毒素都会减少胜利百号组培苗基芽数量;同一浓度不同处理时间没有差异(图2)。对照组表现正常,

粗毒素对徐 18 没有影响。原液处理组根尖发黑,随着稀释倍数增加,根数量增加,对照组根数最多;根长分析表明,与对照比,原液处理抑制根的伸长生长,而 100 和 1 000 稀释倍数处理,促进根的伸长生长,同一处理浓度,不同处理时间之间没有差异(图2)。上述培养滤液对徐 18 没有影响。

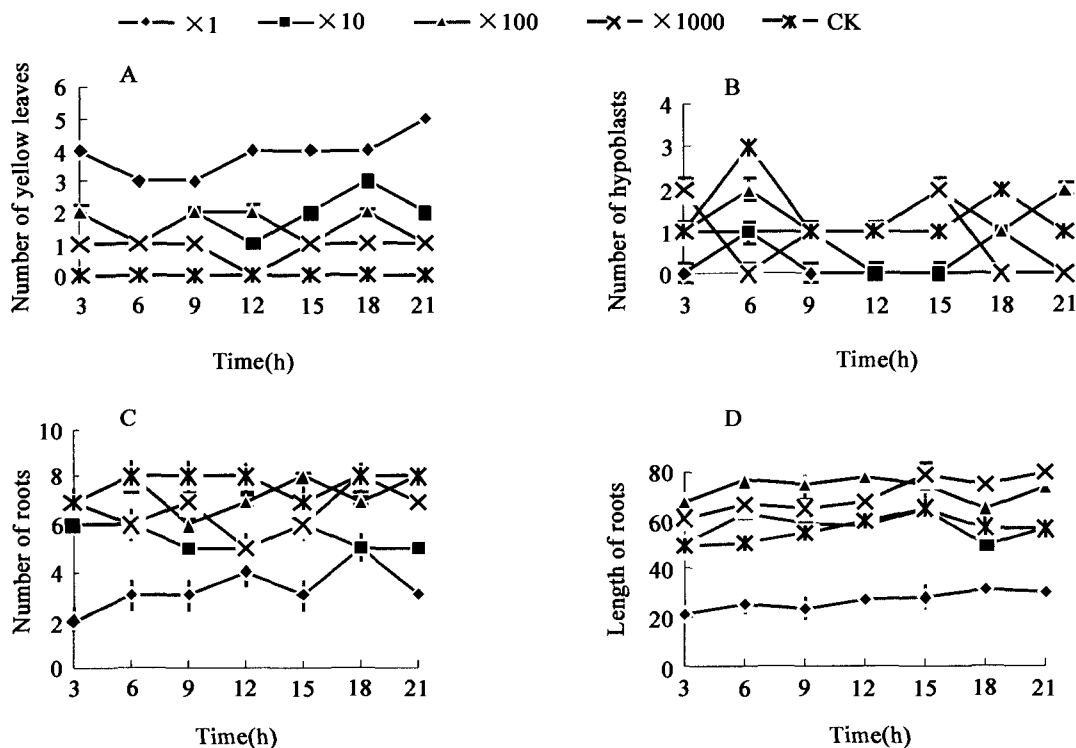


Fig. 2 Effect of crude toxin of FSB on the growth of sweet potato tissue culture seedlings

A: Number of leaves; B: Number of hypoblasts; C: Number of roots; D: Length of roots(mm).

3 讨论

Miao 等^[15]从三七根腐病株根部分离到 7 株病原菌,结合田间人工接种以及组织分离频率,认为 *Cylindrocarpon destructans* 和 *C. didymum* 才是田间三七根腐病的重要病原真菌。我们从甘薯根腐病斑分离的 93 株真菌中,除了 FSB 外,主要还有爪哇镰孢 (*Fusarium javanicum*),茄镰孢蓝色变种 (*F. solani* var. *coeruleum*) 和尖孢镰孢 (*F. oxysporum*),但只有 FSB 接种症状明显,并能诱导开花。本文首次明确了 FSB 诱导甘薯 胜利百号 现蕾开花。

选择甘薯单芽组培苗体系,以及恒定环境条件下蛭石栽培有利于保持实验背景稳定一致。采用土壤接种法、蘸根接种法、根部切伤接种法和针刺接种法 4 种方法接种甘薯苗根部,后两种接种方法效果好(文中数据省略),可能由于创伤有利于 FSB 侵染根系,在田间农事操作的伤害有利于该病发生^[1, 2]。

室内盆栽鉴定、大田成株期人工辅助接种鉴定和大田病圃或非病圃自然侵染鉴定法等常规甘薯根腐病抗性筛选工作量大,用地多,需要 30 d,甚至几个月的时间^[4]。采用 FSB 粗毒素处理甘薯组培苗产生的症状与分生孢子接种薯苗产生的症状类似,以粗毒素处理感病品种 胜利百号 无土栽培苗,4~5 d 后出现主要症状,而抗病品种徐 18 则表现正常或轻微症状。这为快速、有效地鉴定甘薯植株根腐病抗性提供试验依据。

Fusarium solani 的代谢产物研究一直很活跃。豌豆根腐病菌 (*F. solani* f. sp. *pisi*) 培养液滤液中可以检测到茄病镰孢烯醇 (Neo-solanial)、二醋酸蔗草镰刀菌烯醇 (Diacetoxyscirpenol) 等毒素^[16]。FSB 能够诱发甘薯块根通过甲瓦龙酸途径 (mevalonic acid pathway) 形成呋喃萜类化合物(如甘薯酮、甘薯醇)起植保素的作用^[13]。病原菌等逆境因素通过诱导植物的 5-磷酸脱氧木酮糖合成酶基因 (*dxs*)、5-5-磷酸脱氧木酮糖还原酶基因 (*dxr*)、2-甲基赤鲜糖醇 4-胞苷二磷酸激酶基因 (*cmk*) 等基因,合成脱落酸 (ABA) 等多种萜类化合物,这些基因已被克隆^[17]。我们研究表明,FSB 寄生甘薯使甘薯内源 ABA 含量显著上升,GA_{1/3} 则显著低于对照,并且 FSB 能够合成 ABA,这可能是甘薯根腐病

株出现开花现象的原因^[14]。本文为甘薯根腐病株开花机理研究提供生理学方面的实验依据,也是从植物病理学的角度提供开花机理研究的特殊材料。

致谢:衷心感谢徐州甘薯研究中心马岱夫、谢逸萍研究员,以及江苏省农业科学院谢一芝、吴纪中研究员在提供试验材料及用地方面的帮助。

参考文献

- [1] Chen L F, Xu J Y. Agriculture plant pathology (in Chinese) [M]. Beijing: China Agricultural Press (北京: 中国农业出版社), 2001. 110-125.
- [2] Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Shandong Academy of Agricultural Sciences. China sweet potato cultivation (in Chinese) [M]. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1984. 1-378.
- [3] Xie Y Z, Zhang L Y, Dai Q W, et al. Behaviors of sweet potato resistance to root rot in the different environmental conditions and its inheritance (in Chinese) [J]. Acta Phytophylacica Sinica (植物保护学报), 2002, 29(2): 133-137.
- [4] Xie Y P. Studies on the inoculation methods for testing the resistance of sweet potato varieties to root rot in laboratory (in Chinese) [J]. Plant Protection (植物保护), 1999, 25(6): 7-9.
- [5] Mercado Vergnes D, Renard M E, Duveiller E, et al. Effect of growth stage on host sensitivity to helminthosporol toxin and susceptibility to *Cochliobolus sativus* causing spot blotch on wheat [J]. Physiol. Molec. Plant Pathol., 2006, 68: 14-21.
- [6] Jayasankar S, Litz R E. Characterization of embryogenic mango cultures selected for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* culture filtrate and phytotoxin [J]. Theor. Appl. Genet., 1998, 96: 823-831.
- [7] Zhang X H, Chen Y F, Ren H L, et al. Effect of *Fusarium graminearum* crude toxin on wheat young embryos culture and scab-resistance of plants in R₁ and R₂ generations (in Chinese) [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin (中国农学通报), 2005, 21(7): 331-333, 340.
- [8] Li B J, Xie S Y, Chen H Z, et al. Resistance of sweet potato varieties to isolates of *Ralstonia solanacearum* and their corresponding crude toxins (in Chinese) [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences (福建农业学报), 2001, 16(1): 12-15.
- [9] Fang Z D. The study method of plant pathology (third print) (in Chinese) [M]. Beijing: China Agricultural Press (北京: 中国农业出版社), 1998. 200-235.
- [10] Chen L F. Study on the pathogen of sweet potato root

- rot disease (in Chinese) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京:南京农业大学), 1988.
- [11] Booth C. The genus *Fusarium* [M]. England: The Commonwealth Mycological Institute Press, 1971.
- [12] Chen H K, Wang Z C. *Fusarium* in Zhejiang (in Chinese) [M]. Hangzhou: Zhejiang Science Technology Press (杭州:浙江科学技术出版社), 1992.
- [13] Wei Y D. *Fusarium solani batatas* induces the phytoalexin of sweet potato (in Chinese) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University (武汉:华中农业大学), 1986.
- [14] Chai Y Q, Chen L F, Wang J S. The effect of infection by *Fusarium solani* f. sp. *batatas* on endogenous hormone levels in sweet potato seedling (in Chinese) [J]. J. Plant Physiol. Mol. Biol. (植物生理与分子生物学学报), 2007, 33 (8): 318 - 324.
- [15] Miao Z Q, Li S D, Liu X Z, et al. The causal microorganisms of *Panax notoginseng* root rot disease (in Chinese) [J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2006, 39(7): 1371 - 1378.
- [16] Sun S D. Studies on the toxins of *Fusarium solani* I. isolation assay and bioassay (in Chinese) [J]. Journal of Gansu Agricultural University (甘肃农业大学学报), 1994, 29(2): 140 - 144.
- [17] Michael H W, Joachim H, Dieter S. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots [J]. The Plant Journal, 2002, 31(3): 243 - 254.

责任编辑:张国珍