

十字花科蔬菜根肿病菌休眠孢子的分离与检测^{*}

Extracting and Detecting *Plasmodiophora brassicae* Resting Spores

杨佩文,李家瑞,杨勤忠,王 群
(云南省农业科学院植物保护研究所,云南 昆明 650205)

摘要: 在常规分离方法的基础上,对分离自根肿组织和土壤中休眠孢子粗提液用 50% 蔗糖溶液进行悬浮,能成功地提取到根肿病菌的休眠孢子,可用于病原菌的繁殖、长期保存、DNA 的提取及其它植物病理学研究,并能在 600 倍显微镜下清晰检测得到。

关键词: 十字花科蔬菜;根肿病菌;分离;检测

中图分类号: S 436.341.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2002)03-0301-02

十字花科蔬菜根肿病由 *Plasmodiophora brassicae* 侵染而引起,在世界各国均有分布^[1],植株受到侵染,根部肿大,腐烂,甚至使植株枯萎死亡,给蔬菜生产带来巨大损失。近年来危害寄主范围也从栽培蔬菜到野生杂草,甚至到一些装饰花卉植物,严重威胁着农业生产的发展^[2]。此病在云南省早有发生危害,但未引起重视,近年来逐渐蔓延,在云南省昆明、曲靖等地的部分县区发生危害十分严重,致使大白菜种植面积急剧萎缩,如不抓紧进行研究和防治,将影响云南省蔬菜产业的发展。目前国内对其侵染机制研究不多,在防治上尚难以提出切实有效的防治措施,因此,加快十字花科蔬菜根肿病侵染循环、致病机制及致病性分化等方面的研究,对于减轻和控制十字花科蔬菜根肿病的蔓延及危害,确保蔬菜的安全生产和产业化发展有着重要的意义。

根肿病菌形成孢子囊寄生于寄主根部薄壁组织内,在土壤中以休眠孢子存在,病残体和未腐熟的厩肥,加上机械操作、人畜、运输、流水和风等多种途径传播都可成为田间发病的初侵染源^[1]。到目前为止,体外培养根肿病菌的尝试尚未获得成

功^[3],病原菌孢子寄生于寄主组织或土壤中,加上体积较小,分离和检测较难,给根肿病的检测和病害的早期诊断带来了很大的困难。MacFarlane 最早进行根肿病菌休眠孢子的分离^[4],其它的分离方法都是在其方法的基础上进行改进而得。Kenji Takahashi 用荧光染色技术对土壤中提取的休眠孢子进行检测与定量^[5];Arie 用荧光抗体技术对分离自土壤或植物根肿组织的休眠孢子进行了检测^[6];Lange, Wakeham 和 White 成功地对分离自土壤及根肿组织中的根肿病菌进行了血清学及扫描电镜检测^[7,8];但以上这几种方法比较费时,需要一定的实验技能和专用设备,因而应用上受到一定限制。本试验在 MacFarlane(1958)和 Kenji Takahashi(1987)方法的基础上,进行改进,试图摸索出一种快速、简便的分离和检测技术,为病原菌的致病性分化等方面的研究作一些前期重要的工作。现将初步试验结果作如下总结。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集发病严重的十字花科蔬菜根肿病标样和

* 收稿日期: 2001-08-29

基金项目: 云南省“十五”科技攻关项目(2000A3-02)

作者简介: 杨佩文(1973-),男,云南丽江人,主要从事稻瘟病抗病育种、抗稻瘟病新基因的克隆、十字花科蔬菜根肿病菌灾变规律等研究工作。

重病田土样

1.2 试验方法

(1) 根肿组织中休眠孢子的分离:将 10 g 根肿组织切碎,加 50 mL 灭菌水,在研钵中研细或用榨果汁机研碎,然后用 4 层纱布过滤,滤液移入一干净的 50 mL 离心管,3 100 r/min 离心 15 min,弃上清液,沉淀重溶于 50 mL 灭菌水,3 100 r/min 离心 10 min,此步操作可重复 2~3 次。弃上清液,在沉淀中加 5 mL 50% 蔗糖溶液,混均后,3 100 r/min 离心 10 min,用移液枪把上清液小心移入一干净的离心管,加 30 mL 灭菌水,3 100 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀重溶于 30 mL 灭菌水,3 100 r/min 离心 10 min,此步操作可重复 2 次,最后沉淀溶于 5 mL 灭菌水备用。

(2) 土壤中休眠孢子的分离:取 10 g 含休眠孢子的土样溶于 20 mL 2% calgo (100% sodium hexametaphosphate) 或 0.05% Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) 溶液中,置于摇床上摇 2~3 h (on a wrist-action flaskshaker)。混合液依次通过 32 目,60 目,120 目,200 目和 400 目的筛网,滤去有机物质和砂粒。滤液 3 100 r/min 离心 15 min,弃上清液,沉淀重溶于 50 mL 灭菌水,3 100 r/min 离心 10 min,此步操作可重复 2~3 次。弃上清液,在沉淀中加 5 mL 50% 蔗糖溶液,混均后,3 100 r/min 离心 10 min,用移液枪把上清液小心移入一干净的离心管,加 30 mL 灭菌水,3 100 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀重溶于 30 mL 灭菌水,3 100 r/min 离心 10 min,此步操作可重复 2 次,最后沉淀溶于 5 mL 灭菌水备用。

(3) 取一滴休眠孢子提取液于载玻片上,盖上盖玻片,于 600 倍显微镜下镜检。

2 结果与分析

(1) 根肿组织经过研磨、过滤、离心等步骤,休眠孢子沉淀于离心管底部,而细菌、植物根组织以及其它微生物则留在上层溶液而被除去。但沉淀中还含有淀粉、土壤颗粒等杂质,若除不去,则会影响到繁殖、长期保存、DNA 的提取等用途。而通过

50% 蔗糖溶液悬浮后,休眠孢子漂在溶液的上层,淀粉、土壤颗粒等杂质则留在离心管底部而达到去杂的目的。经过以上几个步骤,就可以除去细菌、植物根组织、淀粉、土壤颗粒以及其它微生物等杂质,分离到较纯的休眠孢子提取液。

(2) 根肿病菌在土壤中以休眠孢子的形式存在,是主要的初侵染来源。本试验在 Kenji Takahashi(1987)方法的基础上进行改进,含有休眠孢子的土样经过清洗、过滤、离心等步骤后,休眠孢子和土壤颗粒沉淀在离心管底部,通过 50% 蔗糖溶液悬浮后,休眠孢子漂在溶液的上层,土壤颗粒则留在离心管底部,从而分离到较纯的休眠孢子提取液。

(3) 休眠孢子提取液在 600 倍显微镜下镜检,能清晰地观察到休眠孢子,并可以进行定量,从而可以开展其它植物病理学方面的研究。

3 讨论

用以上经过改进的方法,能成功地提取到纯度较高的休眠孢子悬浮液,可用于病原菌的繁殖、长期保存、DNA 的提取及其它植物病理学研究,并能在 600 倍显微镜下清晰检测得到。此方法简便快捷,不需要特殊的实验技术和专用设备,在普通的实验室就能进行,为开展其它植物病理学方面的研究(病原菌的繁殖、长期保存、DNA 的提取、病原菌致病性分化及品种抗病性等)提供了方便。

十字花科蔬菜根肿病菌为土壤习居菌,在土壤中存活期较长,在我国早有发生,但由于危害不大,未引起重视,在病原菌的致病性分化及变异、分子检测技术、抗病育种等方面尚属空白,因此应加强对根肿病侵染循环、致害机理、病原菌的致病性分化的研究,研制高效低残留的生物源农药,引进和筛选抗病品种,进行抗抗病育种,控制根肿病的危害和蔓延。

(下接第 306 页)

降低。在美国和欧洲其它国家也发现,牛群在苇状羊茅草地上放牧时,经常发现一种“羊茅中毒症”或“夏季综合症”^[14]。此外还有羊茅脚病,麦角中毒病和低镁病。但在昆明的整个试验中,未发现苇状羊茅对家畜产生不良影响,这是否与昆明气候温和、雨量充沛、没有北美草原那样的高温气候有关,可能消除了这些疾病发生的环境因素,这一问题还有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 陈文品,刘大钧. 苇状羊茅的染色体组分析[J]. 草业科学, 1989,6(4):24-31.
- [2] 李俊尤. 多花黑麦草、苇状羊茅及其属间杂种细胞遗传学研究进展[J]. 草原与牧草,1994,(2):1-4.
- [3] 复亦芥. 黑麦草属和羊茅属的远缘杂交育种[J]. 草原与牧草,1986,(5):8-10.
- [4] 米福贵. 羊茅与黑麦草属牧草种间杂交[J]. 中国草地, 1994,(5):66-71.
- [5] 胡高昂. 苇状羊茅的育种[J]. 草原与牧草, 1990,(2):6-12.
- [6] 松敏宽,杉信竖一. 意大利黑麦草与苇状羊茅的杂交亲和性[J]. 育种杂志, 1991,(4):31-33.
- [7] 胡兴宗,李敏,蔡杂宗. 冷季型草坪草羊茅属新品种的初步研究[J]. 中国草地, 1990,(3):67-71.
- [8] 齐桂玉. 黑麦草与苇状羊茅杂交育种的研究进展[J]. 牧草与饲料, 1992,(3):33-35.
- [9] 周芝析,杨明海. 苇状羊茅引种试验报告[J]. 草业科学, 1989, 6(1):33-35.
- [10] 江玉林. 浅谈苇状羊茅的放牧利用[J]. 草业科学, 1987, 4(5):54-56.
- [11] B P OBCHMEP, 聂朝相译. 施肥对苇状羊茅及其杂种产量和青贮品质的影响[J]. 草原与牧草, 1985,(2):38-39.
- [12] 张树源. 海北高寒矮嵩草草甸植物叶积与生物产量之间的关系[J]. 草原与牧草, 1986,(5):43-47.
- [13] 丁文广. 苇状羊茅的毒性因素[J]. 草原与牧草, 1944,(4):17-20.
- [14] 刘若. 苇内生真菌当中的夏季综合症[J]. 草原与牧草, 1985,(6):1-4.

=====

(上接第 302 页)

[参 考 文 献]

- [1] 北京农业大学主编. 农业植物病理学[M]. 北京:农业出版社,1982.
- [2] DYLEWSKI, D P. Phylum Plasmodiophoromycota[M]. In: Handbook of protocista. Eds., L. Margulis. 1990.
- [3] MUGNIER J, MOSSE B. Vesicular-Arbuscular mycorrhizal infection intraspecific root-inducing T-DNA roots grown axenically[J]. Phytopathology. 1987, 77(7): 1 045 - 1 050.
- [4] MACFARLANE I. A solution culture technique for obtaining root-hair or primary infection by *Plasmodiophora brassicae*[J]. J. Gen. Myco. Soc. 1958, 80:720-732.
- [5] KENJI TAKAHASHI, TAKEO YAMAGUCHI. A method for assessing the pathogenic activity of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* by fluorescence microscopy[J]. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 1988,54:466-475.
- [6] ARIE T, NAMBA S, YAMASHITA Y. Doi: Detection of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* Woron. from soil and root by fluorescent antibody technique[J]. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn, 1988,54, 242-245.
- [7] LANGE M, HEIDE L, HOBOLTH, et al.. Serological detection of *Plasmodiophora brassicae* by dot immunobinding and visualization of the serological reaction by scanning electron microscopy[J]. Phytopathology, 1989, 1 066-1 071.
- [8] WAKEHAM, A J, White J G. Serological detection in soil *Plasmodiophora brassicae* resting spores[J]. Physiol. Mol. Plant Pathol, 1996, 48, 289~303.