

大蒜叶枯病菌毒素产生条件的研究

张志强,程智慧,沈永杰

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了筛选大蒜叶枯病菌培养的最佳产毒条件,从田间发病的大蒜叶片上分离、鉴定得到大蒜叶枯病菌菌株,利用大葱种子发芽法研究培养条件(培养基、培养温度、光照、振荡、培养基 pH 值、培养时间)对大蒜叶枯病菌菌株产毒能力的影响。结果表明,大蒜叶枯病菌的最佳产毒培养条件为:Czapek-Dox 液体培养基、培养温度 24 ℃、培养基 pH 值 6.0~7.0、连续黑暗振荡培养,在以上条件下培养 20 d 时大蒜叶枯病菌产生粗毒素的毒性最强。

[关键词] 大蒜叶枯病菌;培养条件;粗毒素

[中图分类号] S436.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0186-05

Conditions of toxin production of *Stemphylium vesicarium* (Wallr) Simmons in garlic

ZHANG Zhi-qiang, CHENG Zhi-hui, SHEN Yong-jie

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to screen the optimum conditions of toxin production by the *Stemphylium vesicarium* (Wallr) Simmons, *Stemphylium vesicarium* (Wallr) Simmons was isolated from field infected garlic leaves and identified in lab. The conditions of crude toxin production by the *Stemphylium vesicarium* (Wallr) Simmons, including medium, culture temperature, lightening, vibration, culture duration and pH value were systematically studied by Welsh onion seed germination test of the toxin toxicity. The results showed that the optimum conditions for the pathogen culture to produce crude toxin were Czapek-Dox liquid medium, medium pH 6.0—7.0, culture temperature 24 ℃, with successive darkness and vibration during culture. Under the above conditions, the production of crude toxin reached the highest level on the 20th day of culture.

Key words: *Stemphylium vesicarium* (Wallr) Simmons; culture condition; crude toxin

大蒜叶枯病(Garlic tip blight)病原菌的无性世代为匍柄霉 *Stemphylium vesicarium* (Wallr) Simmons(属半知菌亚门),有性世代为枯叶格孢腔菌 *Pleospora* sp.(属子囊菌亚门),该病在陕西各地均有不同程度发生,对大蒜生产造成严重损失^[1-3]。选育抗病性品种是控制大蒜叶枯病的重要途径,但大蒜无法进行有性杂交育种,探索无性系变异筛选育

种十分重要。石凤梅^[4]报道,利用毒素代替病原菌试验,可以简便快速筛选出具有初步抗病性的材料。病菌毒素不但可用于筛选抗病材料,而且在适当的选择剂量下,还可作为一种外源激发子来诱导植物产生抗性或促进植物生长。因此,应用病菌毒素进行细胞无性系筛选可能是大蒜品种改良和育种的一个新途径,但目前有关大蒜叶枯病菌毒素的培养条

* [收稿日期] 2006-11-03

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2004BA516A09);中德农业部科技合作项目(06-37)

[作者简介] 张志强(1982—),男,山西高平人,在读硕士,主要从事蔬菜生物技术研究。E-mail: zzzz402@yahoo.com.cn

[通讯作者] 程智慧(1958—),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事园艺植物逆境生理生态研究。

E-mail: chengzh@nwsuaf.edu.cn

件及其致病性研究尚未见系统报道。本研究从田间发病的大蒜叶片上分离、鉴定得到大蒜叶枯病菌菌株,利用大葱种子发芽法研究培养条件(培养基、培养温度、光照、振荡、培养基 pH 值和培养时间)对大蒜叶枯病菌菌株产毒能力的影响,以期为大蒜叶枯病菌毒素培养,以及应用该毒素进一步开展大蒜抗叶枯病无性系离体筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 大蒜叶枯病菌,由田间病株上分离获得。

1.1.2 供试培养基 用于病菌培养、鉴定的培养基为 PDA 培养基,其组成为:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值 7.0。

用于病菌毒素产生的培养基及其组成如下。

PS 培养基(简称 PS):马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值 7.0。

改良 Fries 培养基(简称 I-Fries):蔗糖 30 g,酒石酸铵 5 g, NH_4NO_3 1 g, MgSO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g,结晶 CaCl_2 0.1 g,酵母膏 0.5 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值 7.0。

Czapek-Dox 培养基(简称 Czapek-Dox): NaNO_3 3.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, MgSO_4 0.50 g, KCl 0.50 g, FeSO_4 0.01 g,蔗糖 30 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值 7.0。

改良理查德培养基(简称 I-Richard): KNO_3 10 g, KH_2PO_4 5 g, MgSO_4 2.5 g, FeSO_4 0.02 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值 7.0。

1.1.3 供试植物 生物测试植物为大蒜,品种为山东章丘大蒜,种子由西北农林科技大学园艺学院提供。

1.2 大蒜叶枯病菌菌种的分离和纯化

选高温、高湿的天气,在田间苍山大蒜叶片上采集发病严重、典型的大蒜叶枯病病叶,放入体积分数 70%酒精中浸泡 30 s,然后用 0.1 g/L 升汞消毒 1~2 min,并用无菌水冲洗 3 次后接于 PDA 培养基平板上,待有灰暗色菌丝长出后挑取菌丝进行纯化,得到所需菌株。将分离得到的菌株在 35 ℃、相对湿度 100%下离体和活体分别回接于苍山大蒜上,观察其发病情况。

1.3 大蒜叶枯病菌产毒培养条件的筛选

1.3.1 培养基和产毒培养时间 分别在 4 个 250 mL 三角瓶中定量倒入 100 mL pH 7.0 的 PS、I-

Fries、Czapek-Dox 和 I-Richard 4 种培养基,用接种针挑取大蒜叶枯病菌菌饼 4 块,接种于各培养基中,置 25 ℃黑暗条件下 100~120 r/min 振荡培养,分别于培养 4,6,8,10,12,14,16,18,20 和 22 d 取样,每次取 3 瓶,共 30 瓶,每处理重复 3 次,制备大蒜叶枯病菌培养液。

1.3.2 温度和产毒培养时间 在 250 mL 三角瓶中定量倒入 100 mL pH 7.0 的 Czapek-Dox 培养液,用接种针挑取大蒜叶枯病菌菌饼 4 块,接种于三角瓶中,分别置于 18,20,22,24,26,28 和 30 ℃恒温箱中静止培养,每天早、晚人工各振荡 1 次,分别于培养 4,6,8,10,12,14,16,18,20 和 22 d 取样,每次取 3 瓶,共 30 瓶,每处理重复 3 次,制备大蒜叶枯病菌培养液。

1.3.3 光照及振荡培养方式和产毒培养时间 在 250 mL 三角瓶中定量倒入 100 mL pH 7.0 的 Czapek-Dox 培养液,用接种针挑取大蒜叶枯病菌菌饼 4 块,接种于三角瓶中,置 24 ℃,连续黑暗(牛皮纸遮光)静置(简称 24D-S)、连续光照静置(简称 24L-S)、连续黑暗振荡(简称 24D-V)、连续光照振荡(简称 24L-V)、每天 12 h 光照 12 h 黑暗振荡(简称 12L/12D-V)、每天 12 h 光照 12 h 黑暗静置(简称 12L/12D-S)条件下培养,分别于培养 4,6,8,10,12,14,16,18,20 和 22 d 取样,每次取 3 瓶,共 30 瓶,每处理重复 3 次,制备大蒜叶枯病菌培养液。

1.3.4 pH 值 在 250 mL 三角瓶中定量倒入 100 mL pH 4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0 和 10.0 的 Czapek-Dox 培养液,用接种针挑取大蒜叶枯病菌菌饼 4 块,在 24 ℃恒温黑暗振荡培养,20 d 后制备大蒜叶枯病菌培养液。

1.4 大蒜叶枯病菌粗毒素的制备及其毒性的生物检测

1.4.1 病菌粗毒素的制备 将不同培养条件下获得的大蒜叶枯病菌培养液,用 8 层灭菌滤纸滤去菌丝体,滤液经 4 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用 0.45 μm 滤器过滤得大蒜叶枯病菌粗毒素。

1.4.2 病菌粗毒素毒性的生物测定 采用种子发芽法,以大蒜种子发芽率判定毒素毒性(产量)。将经表面消毒的大葱种子播种在直径 90 mm 的消毒培养皿滤纸发芽床上,每皿 50 粒种子,加入供试大蒜叶枯病菌粗毒素 6 mL,20 ℃条件下恒温保湿培养 5 d,重复 4 次,统计种子发芽情况,计算发芽率,用 Duncan's 新复极差法进行数据差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 大蒜叶枯病菌菌种的分离与纯化

从田间苍山大蒜叶枯病病叶上分离得到了大蒜叶枯病菌菌株,其分生孢子形态见图 1。经室内回接鉴定,分离菌株可以引起苍山大蒜发生典型的叶枯病症状。

2.2 不同培养基对大蒜叶枯病菌产生粗毒素毒性的影响

从表 1 可以看出,在一定培养时间内,从 Czapek-Dox 培养基中得到的大蒜叶枯病菌粗毒素对大葱种子发芽的抑制作用最强,培养 20 d 时,大葱种子发芽率仅为 10.5%,而从 PS、I-Fries 和 I-Richard 培养基中得到的大蒜叶枯病菌粗毒素,对大葱种子发芽的抑制作用稍弱,培养 20 d 时的发芽率分别为 27.0%,18.5%和 15.5%。可见,Czapek-Dox 培养

图 1 大蒜叶枯病菌的分生孢子
Fig. 1 Conidia of *Stemphylium vesicarium*
(Wallr) Simmons

表 1 不同培养基中大蒜叶枯病菌菌株产生的粗毒素对大葱种子发芽率的影响
Table 1 Effect of crude toxin produced by *Stemphylium* in different culture media on Welsh onion seed germination percentage

培养时间/d Culture duration	培养基 Culture media				%
	PS	Czapek-Dox	I-Richard	I-Fries	
4	88.5 aA	80.0 bA	84.0 abA	87.0 abA	
6	82.5 aA	69.0 bA	76.5 abA	82.0 aA	
8	76.5 aA	62.0 bA	65.5 bA	72.0 abA	
10	68.0 aA	53.5 bA	57.5 abA	62.5 abA	
12	56.0 aA	45.0 aA	49.0 aA	52.0 aA	
14	48.0 aA	36.0 bA	42.5 abA	43.5 abA	
16	36.5 aA	22.0 cB	25.0 bcAB	31.5 abAB	
18	26.5 aA	15.0 bB	16.5 bAB	21.0 abAB	
20	27.0 aA	10.5 cB	15.5 bcB	18.5 bAB	
22	38.5 aA	19.5 bB	31.5 aA	35.5 aA	

注:同一行数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。
Note:Different small letters within the same row indicate significant difference ($P<0.05$);different capital letters indicate greatly significant difference($P<0.01$). The following tables are the same.

方差分析结果表明,在培养 20 d 时,Czapek-Dox 培养基上产生的大蒜叶枯病菌粗毒素对大葱种子发芽率的影响与在 I-Fries 培养基上达显著差异($P<0.05$),与在 PS 培养基上达极显著差异($P<0.01$),与在 I-Richard 培养基上差异不显著。

2.3 培养温度对大蒜叶枯病菌菌株产生粗毒素毒性的影响

由表 2 可以看出,培养温度对大蒜叶枯病菌粗毒素的毒性影响较大。在 24 ℃下培养,病菌产生粗毒素的能力最强,表现为大葱种子发芽率普遍低于其他各处理;在培养 20 d 时,大葱种子发芽率降至最小值(10.0%),即病菌粗毒素的毒性最强,而在 18,20,22,26,28 和 30 ℃下培养,病菌产生粗毒素的

能力均较弱,在培养 20 d 时,大葱种子的发芽率分别为 28.5%,24.5%,14.0%,19.5%,26.0%和 39.5%。

方差分析结果表明,在培养 20 d 时,24 ℃下产生的大蒜叶枯病菌粗毒素对大葱种子发芽率的影响与在 26 ℃下达显著差异($P<0.05$);与在 18,20,28 和 30 ℃下均达极显著差异($P<0.01$),与在 22 ℃下差异不显著。

2.4 光照及振荡培养方式对大蒜叶枯病菌菌株产生粗毒素毒性的影响

由表 3 可以看出,在 3 种不同光照条件下,振荡(V)培养产生的大蒜叶枯病菌粗毒素对大葱种子发芽的抑制作用均强于同种光照条件下静置(S)。可见,振荡(V)有利于病菌的生长和产毒。在不同培

养时期,24 h 黑暗(D)条件下产生的大蒜叶枯病菌粗毒素对大葱种子发芽的抑制作用均强,而连续光照(24 L)和光暗各 12 h(12 L/12 D)病菌产生的粗毒素对大葱种子发芽的抑制作用均较弱。可见,光照抑制大蒜叶枯病菌生长和产毒,黑暗则促进菌株生长和产毒。

表 2 不同温度下大蒜叶枯病菌菌株产生的粗毒素对大葱种子发芽率的影响

Table 2 Effect of crude toxin produced by <i>Stemphylium</i> under different temperatures on Welsh onion seed germination percentage								%
培养时间/d Culture duration	培养温度/℃ Temperature							
	18	20	22	24	26	28	30	
4	93.5 aA	85.5 bcA	81.5 bcA	81.0 cA	81.5 bcA	89.0 abcA	92.0 abA	
6	87.5 aA	80.0 bcAB	74.5 bcAB	71.0 cB	80.5 abcAB	85.0 abAB	81.0 abcAB	
8	80.0 aA	74.0 bAB	69.5 bAB	65.0 bB	72.5 abAB	77.0 aAB	74.0 abAB	
10	71.5 aA	67.0 aAB	59.5 bAB	54.0 bB	65.0 abAB	69.5 aAB	62.5 abAB	
12	61.5 abAB	59.5 bcAB	49.5 cdAB	47.0 dB	51.5 bcdAB	62.5 aA	50.5 cdAB	
14	52.0 aA	44.0 bA	37.0 bA	37.0 bA	41.0 abA	47.5 abA	45.0 abA	
16	42.0 abAB	36.5 bcABC	30.0 cdBC	25.0 dC	33.5 bcdABC	39.0 abcAB	46.0 aA	
18	36.5 bAB	30.5 cBC	17.5 deD	16.0 eD	24.0 dCD	33.0 bBC	43.0 aA	
20	28.5 bB	24.5 cBC	14.0 deD	10.0 eD	19.5 cdCD	26.0 bBC	39.5 aA	
22	45.5 bAB	36.0 cBC	22.0 dD	19.5 dD	27.0 dCD	42.5 bcB	56.5 aA	

由表 3 还可以看出,无论在何种培养方式下,均在培养 20 d 时毒性最强,对大葱种子发芽的抑制作用最大,说明振荡培养 20 d 左右是产毒培养较适宜的培养方式和培养时间。

方差分析结果表明(表 3),在培养 20 d 时,24 h 黑暗振荡培养条件下产生的大蒜叶枯病菌粗毒素,对大葱种子发芽率的影响与在其他条件下均达极显著差异($P<0.01$)。

表 3 不同光照及振荡培养方式下大蒜叶枯病菌菌株产生的粗毒素对大葱种子发芽率的影响

Table 3 Effect of crude toxin produced by <i>Stemphylium</i> under different lightening and shaking condition on Welsh onion seed germination percentage								%
培养时间/d Culture duration	培养条件 Condition							
	12L/12D-S	24D-S	24L-S	24D-V	24L-V	12L/12D-V		
4	85.0 aA	86.0 aA	90.0 aA	81.0 aA	85.5 aA	82.0 aA		
6	76.0 bcdAB	84.0 abA	87.0 aA	71.0 dB	80.0 abcAB	72.5 cdB		
8	73.0 abAB	76.0 bAB	79.0 aA	63.5 cB	74.0 bAB	67.0 bcAB		
10	63.0 abABC	67.0 aAB	70.0 aA	53.5 cC	65.0 abABC	58.0 bcBC		
12	54.0 abA	57.0 aA	60.0 aA	47.0 bA	55.0 abA	50.5 abA		
14	46.0 bcAB	49.0 abAB	54.0 aA	36.5 dC	47.0 bcAB	41.0 cdBC		
16	38.5 bcAB	44.0 abA	47.0 aA	25.5 dC	42.0 abAB	32.5 cdBC		
18	31.0 aAB	34.0 aA	37.0 aA	14.5 bC	32.0 aAB	21.5 bBC		
20	25.0 aAB	28.0 aA	31.0 aA	10.5 cC	26.0 aAB	19.0 bB		
22	33.0 aAB	34.5 aAB	37.5 aA	20.0 cC	31.5 abAB	26.5 bBC		

2.5 产毒培养时间对大蒜叶枯病菌菌株产生粗毒素毒性的影响

表 1 表明,除 PS 培养基在培养 18 d 时大蒜叶枯病菌产生的粗毒素毒性最强,大葱种子的发芽率为 26.5%外,其他 3 种培养基都在培养 20 d 时产生的粗毒素毒性最强,其发芽率分别为 10.5%,15.5%和 18.5%。由表 2 可以看出,在最佳培养基 Czapek-Dox 中,大蒜叶枯病菌均随培养时间延长,产生粗毒素的能力增强,在培养 20 d 时达到最大,继续培养,毒性又减弱。由表 3 可以看出,在不同培养方式下,培养 20 d 时大蒜叶枯病菌产生的粗毒素毒性最强,对大葱种子发芽的抑制作用最大。因此

认为,20 d 为大蒜叶枯病菌产毒培养的最佳时间。

2.6 pH 值对大蒜叶枯病菌菌株产生粗毒素毒性的影响

由图 2 可以看出,病菌培养液 pH 值对大蒜叶枯病菌粗毒素毒性影响很大。经过 24 h 黑暗振荡培养 20 d 后,pH 值为 6.0 和 7.0 的菌株产生的粗毒素对大葱种子发芽的抑制作用最大,发芽率分别为 13.0%和 10.5%;pH 值呈碱性或酸性均不利于病菌产毒,培养液 pH 值为 4.0,5.0,8.0,9.0 和 10.0 时,大葱种子的发芽率分别为 26.0%,23.0%,25.0%,29.0%和 31.5%。

方差分析结果表明,在培养基 pH 为 6.0 和 7.0

条件下,大蒜叶枯病菌产生的粗毒素对大葱种子发芽的抑制作用均极显著($P<0.01$)大于其他各处理, pH 为 5.0 的种子发芽率显著($P<0.05$)低于 pH 10.0,而其他各处理间无显著差异($P>0.01$)。因此,病菌产毒培养的适宜 pH 为 6.0~7.0。

图 2 不同 pH 培养液中大蒜叶枯病菌菌株产生的粗毒素
对大葱种子发芽率的影响
Fig. 2 Effect of crude toxin produced by *Stemphylium vesicarium* (Wallr) Simmons under different pH value
on Welsh onion seed germination percentage

3 讨 论

病原菌在人工培养基中的产毒量直接受培养基成分和外界环境条件的影响。培养基成分直接影响病菌的产毒量,如 PSC 培养液适宜大豆根腐病菌产毒^[5];水稻纹枯病菌以改良 Richard 培养基产生毒素最多^[6];Miller^[7]研究表明,禾谷镰刀菌可以在 Myroth 和 Moss 液体培养基中产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)毒素,而在马铃薯液体培养基中不产生 DON 毒素。环境条件也会影响病原菌的产毒量。研究表明,适宜马铃薯晚疫病病菌粗毒素培养的温度为 20~22 ℃,pH 为 6.0~7.0,黑暗条件下振荡培养,在此条件下产生的粗毒素毒性最强,可强烈抑制番茄种子发芽^[8-9];童蕴慧等^[10]研究发现,不同培养条件下产生的病菌粗毒素毒性有较大差异;吴嵩民等^[11]报道,不同培养条件下生长的棉花黄萎病菌毒

素产量相差很大,培养 8 d 的产毒量仅为培养 14 d 的 1/3。可见,适宜的培养条件对毒素高产有很大作用。

本研究从田间发病的苍山大蒜叶片病斑上分离出大蒜叶枯病菌,回接鉴定表明病菌具有正常的致病性,症状典型,并且可产生有致病力的粗毒素。用大葱种子发芽生物检测表明,大蒜叶枯病菌的最佳产毒培养基为 Czapek-Dox 液体培养基,培养温度为 24 ℃,培养基 pH 值为 6.0~7.0,在黑暗条件下连续振荡培养 20 d 时产生粗毒素的毒性最强。

[参考文献]

[1] 商鸿生,王树权,左金钟,等.蒜薹白斑腐烂病的病原学研究[J].西北农业学报,1997,6(4):62-65.

[2] Boiteux L S, Lima M F. A garlic leaf blight caused by *Stemphylium vesicarium* in brazil[J]. Plant Pathology, 1994, 43: 412-414.

[3] 贾菊生,赵建民.新疆大蒜叶疫病研究 I. 症状及病原菌研究鉴定[J]. 植物病理学报,1994,24(3):251-255.

[4] 石凤梅. 植物病原真菌毒素的研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2006(2):70-73.

[5] 台莲梅. 大豆根腐病菌(*Fusarium oxysporum*)毒素及其对大豆根部致病作用的研究[J]. 中国油料作物学报,2004,26(4):71-73.

[6] 徐敬友,张华东,张 红,等.立枯丝核菌毒素的产生及与致病力的关系[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2004,25(2):61-64.

[7] Miller J D. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*[J]. Can J Microbiol, 1983, 29: 1171-1178.

[8] 邢宇俊,程智慧. 培养条件对马铃薯晚疫病病菌粗毒素产生的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(3):89-92.

[9] 程智慧,邢宇俊. 利用马铃薯晚疫病病菌粗毒素离体筛选马铃薯抗晚疫病菌无性系[J]. 西北植物学报,2005,25(12):2402-2407.

[10] 童蕴慧,徐敬友,袁素玲. 番茄早疫病病菌培养滤液的毒性及不同品种对滤液的敏感性[J]. 江苏农业学报,1997,13(4):250-251.

[11] 吴嵩民,夏正俊,傅正擎,等. 培养条件对棉花黄萎病菌毒素产生的影响[J]. 江苏农业学报,1999,15(2):96-99.