

大蒜紫斑病菌产毒培养条件的筛选

沈永杰, 程智慧, 张志强

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了研究大蒜紫斑病菌培养的最佳产毒条件,从具有典型病斑的发病大蒜叶片上分离得到大蒜紫斑病菌,对该病菌的产毒培养条件进行了研究。结果表明,最佳产毒条件为:培养基为改良 Fries 培养基,培养温度为 26℃,培养基 pH 值为 7,培养时间为 6 h,培养方式为连续 24 h 黑暗+振荡培养。同时试验选择山东章丘大葱种子,以种子发芽抑制法对粗毒素进行生物检测,表明培养得到的粗毒素具有一定的毒性。

[关键词] 大蒜紫斑病菌;培养条件;粗毒素;生物检测

[中图分类号] S436.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0157-04

Screen of the culture condition for production of phytotoxin by garlic violet leaf spot

SHEN Yong-jie, CHEN G Zhi-hui, ZHANG Zhi-qiang

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

Abstract: In order to research the optimum conditions of toxin production by garlic violet leaf spot, the germ was isolated from pathogenic and typical spots of garlic leaves. The condition of phytotoxin-productivity capability was studied. Results showed that the optimal condition for producing phytotoxin was improved as: Fried liquid medium, 26℃, pH 7, cultured period 7d, continual 24 h dark and shaking. Shallot seed germination was selected to test the toxicity of crude toxin, which showed that the cultured crude toxin had definite toxicity.

Key words: garlic violet leaf spot; culture condition; crude toxin; biologic test

大蒜紫斑病是真菌性病害,其病原为葱链格孢(*Alternaria porri* (ELLiott) Cif.),异名为 *Macrisporium porri* ELLis,属半知菌亚门链格孢属^[1],是葱蒜类蔬菜的主要病害之一,在陕西省及其他各省均有不同程度的发生,并造成一定的经济损失。病菌在感染大蒜的过程中会产生毒素,致使受感染的大蒜叶片出现紫黑色霉状物,且病斑多具同心轮纹。一般而言,病原真菌在寄主体外产生毒素的量与培养条件关系密切^[2]。

目前,化学药物防治大蒜紫斑病虽然有一定的作用,但是由于部分残毒滞留在大蒜产品中,而且污染环境,影响人类身体健康,故存在严重弊端。因此,采用抗病育种方法显得尤为重要。国内外的许多抗病育种方法,是采用体细胞无性系变异进行育种。在育种过程中,首先要筛选出病菌的产毒条件。然而对于大蒜和葱类作物紫斑病菌产毒条件的系统研究,迄今在国内外尚未见报道。本试验在分离大蒜紫斑病菌的基础上,研究大蒜紫斑病菌的产毒培

[收稿日期] 2006-08-09

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

[作者简介] 沈永杰(1980-),男,山西长治人,在读硕士,主要从事蔬菜栽培生理生态研究。

E-mail: shenyongjie1980@yahoo.com.cn

[通讯作者] 程智慧(1958-),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事无公害蔬菜栽培生理生态技术和园艺植物细胞工程技术研究。E-mail: chengzh@nwsuaf.edu.cn

养条件,建立病菌粗毒素毒性生物检测技术,以期为大蒜抗紫斑病离体细胞筛选育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种:大蒜紫斑病菌菌种从具有典型紫斑病发病植株上的病斑分离纯化而来,由本实验室保存。

生物测定材料:山东章丘大葱种子,由陕西杨凌农城种业提供。

1.2 常规条件下大葱种子发芽曲线的测定

将经表面消毒的大葱种子,播种于直径 90 mm 放有滤纸的消毒培养皿中,每皿 50 粒,重复 3 次,加入 7.5 mL 无菌水,于 20 ℃、黑暗条件下恒温保湿培养,每天统计发芽数,计算发芽率。以发芽种子胚根长超过种子直径计为发芽^[3]。

1.3 大蒜紫斑病菌产毒培养条件的筛选

1.3.1 产毒培养基和产毒培养时间的筛选 试验设计以下 4 种培养基:

(1) 改良 Fries 培养基 (Improved-Fries Medium):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 1 L,调 pH 值至 7.0。

(2) PSK 培养基 (PSK Medium):马铃薯 200 g,蔗糖 30 g, K_2HPO_4 1 g,加蒸馏水至 1 L。

(3) 查彼克培养基 (Czapek-Dox Medium):蔗糖 30 g, NaNO_3 2 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO_4 0.01 g,蒸馏水 1 L,调 pH 值至 7.0。

(4) 改良理查德培养基 (Improved-Richard Medium): KNO_3 10 g, KH_2PO_4 5 g, MgSO_4 2.5 g, FeSO_4 0.02 g,蒸馏水 1 L,调 pH 值至 7.0。

分别在 4 个 500 mL 三角瓶中倒入 300 mL 上述 4 种培养基,然后取一定大小的大蒜紫斑病菌菌丝块,接种于各液体培养基中,每瓶接种 2 块,在黑暗、26 ℃、110 r/min 条件下振荡培养。培养时间共设 10 个处理,即分别于培养 2,4,6,8,10,12,14,16,18 和 20 d 取样,每次取 3 瓶,制备大蒜紫斑病无菌滤液及粗毒素^[4]。

1.3.2 产毒培养温度的筛选 取 1.3.1 中筛选出 pH 为 7.0 的 300 mL 培养基倒入 500 mL 三角瓶中,取一定大小的大蒜紫斑病菌菌丝块,接种于此培养基,每瓶接种 2 块,在黑暗、110 r/min 条件下培养。培养温度设 18,20,22,24,26,28 和 30 ℃ 共 7 个处理,按 1.3.1 中筛选出的时间培养后取样,每处

理取 3 瓶,制备大蒜紫斑病无菌滤液及粗毒素。

1.3.3 光照及振荡培养条件的筛选 取 1.3.1 中筛选出 pH 为 7.0 的 300 mL 培养基倒入 500 mL 三角瓶中,取一定大小的大蒜紫斑病菌菌丝块,接种于此培养基中,每瓶接种 2 块,在 1.3.2 中筛选时的适宜温度条件下培养。共设 5 种光照和振荡培养方式:(1) 12 h 光照/12 h 黑暗 + 振荡(简称 12L/12D + V);(2) 12 h 光照/12 h 黑暗 + 静置(简称 12L/12D + S);(3) 24 h 光照 + 静置(简称 24L + S);(4) 24 h 黑暗 + 振荡(简称 24D + V);(5) 24 h 黑暗 + 静置(简称 24D + S)。按 1.3.1 中筛选出的时间培养后取样,每处理取 3 瓶,制备大蒜紫斑病无菌滤液及粗毒素。

1.3.4 适宜培养基 pH 值的筛选 取 1.3.1 中筛选 300 mL 培养基倒入 500 mL 三角瓶中,取一定大小的大蒜紫斑病菌菌丝块,接种于此培养基,每瓶接种 2 块,培养基 pH 值分别设 3,4,5,6,7,8,9,10,11 和 12 共 10 个处理,在 1.3.2 中筛选时的适宜温度、1.3.3 中筛选时的最佳光照及振荡条件下,按 1.3.1 中筛选出的时间培养后取样,每处理取 3 瓶,制备大蒜紫斑病无菌滤液及粗毒素。

1.4 无菌滤液与粗毒素的制备及其生物检测方法

1.4.1 无菌滤液的制备 将大蒜紫斑病菌在 1.3 中筛选出的病菌产毒最佳条件下培养后,用 8 层纱布过滤,将滤液用滤纸抽滤,得到无菌滤液。

1.4.2 粗毒素的制备 将无菌滤液于 4 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.45 μm 的滤膜过滤,得到病菌粗毒素。

1.4.3 生物检测方法 采用种子发芽抑制法检测病菌粗毒素的毒性^[5]。具体方法为:将经表面消毒的大葱种子播种在直径 90 mm 放有滤纸的消毒培养皿中,每皿 50 粒,3 次重复,每皿加入供试病菌粗毒素 7.5 mL,20 ℃、黑暗条件下恒温保湿培养一定时间(以常规条件下大葱种子发芽曲线测定筛选的适宜发芽时间为标准),统计种子发芽情况,计算发芽率。发芽标准同 1.2。以无菌水作为对照 (CK)。

1.5 数据处理

试验数据采用方差分析和 Duncan 新复极差法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 大葱种子在常规条件下的发芽曲线测定

从图 1 可以看出,章丘大葱种子在无菌水处理下,发芽率逐渐增高,从第 1 天的 0.4% 上升到第 5

天的 90.9%。但是,从第 5 天开始,发芽率不再提高,一直维持在 90.9%。故在进行粗毒素的种子发芽抑制试验中,发芽时间确定为 5 d。

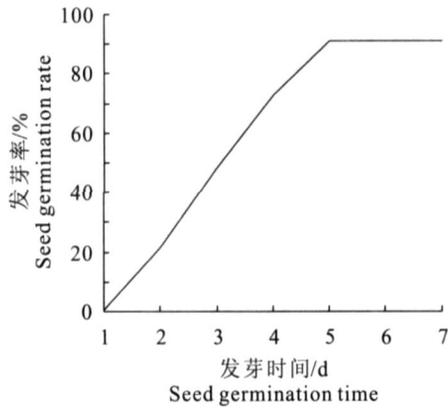


图 1 大葱种子在常规条件下的发芽曲线

Fig. 1 Welsh onion seed germination under the conventional condition

2.2 产毒培养基和产毒培养时间对大蒜紫斑病菌粗毒素量的影响

试验观察表明,大蒜紫斑病菌在 4 种培养基中

均能生长,但是外部形态不同。在改良 Fries 培养基上大蒜紫斑病菌呈刺球状,而在其他 3 个培养基上则均呈圆球形。

从表 1 可以看出,大蒜紫斑病菌在改良 Fries 培养基中培养 6 d 产毒量最多,致使大葱种子发芽率最低,仅为 6.0%,而在 PSK 培养基、查彼克培养基、改良理查德培养基中培养 6 d 的产毒量均较少,大葱种子发芽率分别为 50.0%,50.0%和 43.3%。此外,PSK 培养基、查彼克培养基、改良理查德培养基产毒高峰时间也比改良 Fries 出现得迟,分别在培养 8,8 和 16 d,此时大葱种子的发芽率分别为 31.3%,22.7%和 30.0%。在相同培养时间下,改良 Fries 培养基上产生的毒素,使大葱种子的发芽率基本显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 低于其他的培养基。从产毒趋势上也可以看出,在培养时间相同时,4 种培养基中以改良 Fries 培养基产毒量最多。可见,改良 Fries 培养基是最适合大蒜紫斑病菌产毒的培养基,产毒量最多的培养时间是 6 d,此时毒力最强。

表 1 大蒜紫斑病菌在不同培养基上经不同时间培养产生的粗毒素对大葱种子发芽率的影响

Table 1 Effect of crude toxin by pathogen in different culture media and shaking time on the number of Welsh onion seed germination

培养时间/d Culture time	发芽率/% Germination rate			
	PSK 培养基 PSK medium	查彼克培养基 Czapek-Dox medium	改良 Fries 培养基 Improved Fries medium	改良理查德培养基 Improved Richard medium
2	72.0 ±2.0 aA	65.3 ±3.1 bA	46.0 ±2.0 dC	54.7 ±1.2 cB
4	65.3 ±3.1 aA	60.7 ±1.2 aA	34.0 ±5.3 cC	46.0 ±2.0 bB
6	50.0 ±3.5 aA	50.0 ±2.0 aA	6.0 ±2.0 bB	43.3 ±5.8 aA
8	31.3 ±1.2 bB	22.7 ±1.2 cC	11.3 ±1.2 dD	35.3 ±1.2 aA
10	38.7 ±3.1 aA	26.0 ±2.0 cB	14.7 ±3.1 dC	32.7 ±1.2 bAB
12	40.0 ±4.0 aA	30.0 ±2.0 cC	20.0 ±2.0 cC	32.0 ±2.0 bB
14	46.0 ±5.3 aA	36.7 ±3.1 bB	24.7 ±1.2 dBC	30.7 ±1.2 cC
16	47.3 ±4.2 aA	39.3 ±2.3 bAB	28.7 ±6.2 cC	30.0 ±4.0 cBC
18	50.0 ±2.0 aA	43.3 ±1.2 bB	31.3 ±1.2 dD	37.3 ±1.2 cC
20	56.7 ±1.2 aA	47.3 ±1.2 bB	34.0 ±2.0 dD	42.0 ±2.0 cC

注:同行数据后标不同小写字母者表示差异显著性 ($P < 0.05$),标不同大写字母者表示差异极显著 ($P < 0.01$),标相同字母者表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Note:Different capital letters represent very significant difference ($P < 0.01$);different small letters represent significant difference ($P < 0.05$). The same letter means no significant difference ($P > 0.05$).

2.3 培养温度对大蒜紫斑病菌粗毒素量的影响

从表 2 可以看出,不同培养温度下大蒜紫斑病菌产毒量差异很大。在 26℃ 培养条件下大蒜紫斑病菌产毒量最多,培养 6 d 时,生物检测大葱种子的发芽率最低,仅为 8.0%;而在 24℃ 和 28℃ 培养条件下大蒜紫斑病菌产毒量比 26℃ 培养条件下稍低,大葱种子的发芽率分别为 8.5%和 9.5%;在 18, 20,22 和 30℃ 培养条件下大蒜紫斑病菌产毒量均

极显著 ($P < 0.01$) 低于 26℃,培养 6 d 时,大葱种子的发芽率分别为 13.0%,12.0%,11.1%和 14.5%。在大蒜紫斑病菌产毒量最多的温度(26℃)下,大葱种子发芽率与在 24℃ 和 28℃ 差异不显著 ($P < 0.05$)。在各培养温度下大蒜紫斑病菌产生的毒素使大葱种子的发芽率均比在常规条件下(90.9%)低。由此可见,适宜大蒜紫斑病菌产毒的培养温度为 24~28℃,其中在 26℃ 下产毒量最多,毒力最强。

表 2 不同培养温度下大蒜紫斑病菌产生的粗毒素对大葱种子发芽率的影响

Table 2 Effect of crude toxin by pathogen at different temperatures on the number of Welsh onion seed germination

温度/ Temperatures	发芽率/ Germination rate	差异性测验 Significant test	
		= 0.05	= 0.01
18	13.0 ± 1.2	ab	AB
20	12.0 ± 1.6	abc	ABC
22	11.1 ± 1.2	bcd	ABCD
24	8.5 ± 1.9	de	DE
26	8.0 ± 1.6	e	E
28	9.5 ± 1.9	cde	BCD
30	14.5 ± 2.5	a	A

2.4 光照和振荡培养条件对大蒜紫斑病菌粗毒素量的影响

由图 2 可见,在 24D + V 条件下,大蒜紫斑病菌产毒量最大,培养 6 d 时大葱种子发芽率最低,为 9.0%;24L + S 条件下,大蒜紫斑病菌的产毒量最少,培养 6 d 时大葱种子发芽率为 14.0%;在 12L/12D + V、12L/12D + S 和 24D + S 条件下,大葱种子的发芽率为分别为 11.2%、13.5%、12.0%。说明振荡较静置有利于产毒,黑暗较光照有利于产

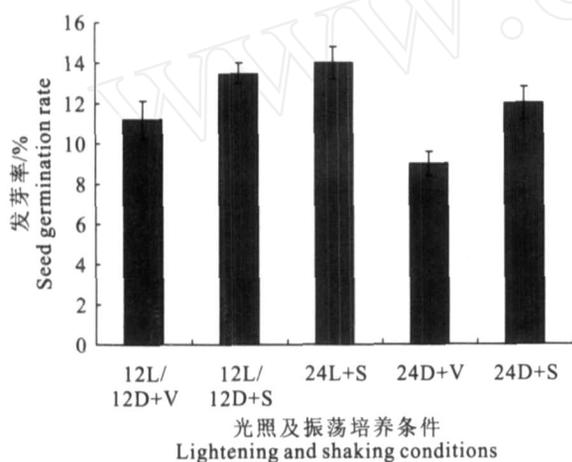


图 2 不同光照及振荡条件下大蒜紫斑病菌产生的粗毒素对大葱种子发芽率的影响

Fig. 2 Effect of crude toxin by pathogen in different light and shaking conditions on Welsh onion seed germination

3 结论与讨论

在致病毒素的研究中,首先要筛选出病菌的产毒条件。例如,中国在小麦抗赤霉病育种方面处于世界领先地位,通过调节培养条件,曾选育出著名的抗赤霉病品种苏麦 3 号,此后又相继选育出 7840、扬麦 9 号和扬麦 158 等中抗赤霉病、丰产品种^[68]。关于大蒜和葱类作物紫斑病菌产毒条件的系统研究

毒。在连续黑暗和振荡条件下,大蒜紫斑病菌产生的粗毒素使大葱种子发芽率极显著低于其他条件下 ($P < 0.01$)。由此可见,24 h 黑暗 + 振荡条件适合大蒜紫斑病菌产毒。

2.5 培养基 pH 值对大蒜紫斑病菌粗毒素量的影响

由图 3 可见,在 pH 为 7 的培养基中,大蒜紫斑病菌产毒量最大,培养 6 d 时生物检测大葱种子发芽率最低,为 9.0%;在 pH 分别为 6 和 8 的培养基中,生物检测大葱种子发芽率分别为 10.0% 和 10.5%;大蒜紫斑病菌产毒量最少的培养基 pH 为 5,此时生物检测大葱发芽率为 33.5%;在 pH 分别为 3,10,11 和 12 的培养基中,生物检测大葱种子发芽率均很低。方差分析结果表明,在培养基 pH 为 7 的条件下,大蒜紫斑病菌产生的粗毒素使大葱种子发芽率极显著 ($P < 0.01$) 低于 pH 分别为 4,5 和 9 的培养基,而与 pH 分别为 3,6,8,10,11 和 12 培养基差异不显著。由此可知,pH 为 7 的培养基最适合大蒜紫斑病菌产毒。

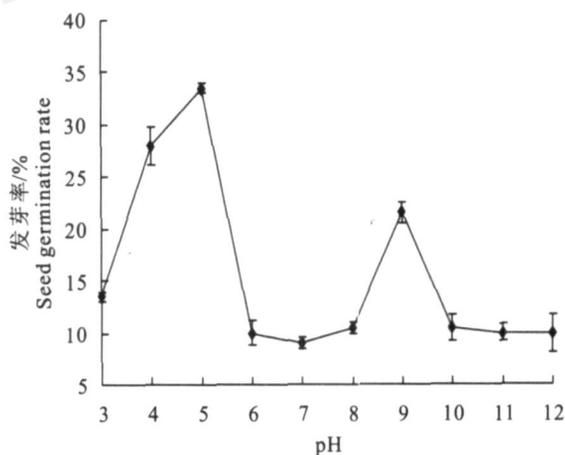


图 3 不同 pH 培养基上大蒜紫斑病菌产生的粗毒素对大葱种子发芽率的影响

Fig. 3 Effect of crude toxin by pathogen in different pH values on Welsh onion seed germination
迄今在国内外尚未见报道。

病原真菌的产毒能力与培养条件密切相关。本研究结果表明,在 PSK 培养基、改良 Fries 培养基、查彼克培养基、改良理查德培养基中,大蒜紫斑病菌的培养以改良 Fries 培养基产毒量最高,故作为最适培养基,虽然这与张金林等^[9]研究所用的培养基

(下转第 166 页)

[参考文献]

- [1] 汪俏梅,郭得平.植物激素与蔬菜的生长发育[M].北京:中国农业出版社,2002:99-101.
- [2] 房增国,赵秀芬,高祖明.多效唑提高植物抗逆性的研究进展[J].中国农业科技导报,2005,7(4):9-12.
- [3] 牛力文,赵剑波.新型植物延缓剂——PP₃₃₃对植物抗逆性的影响[J].河北林业科技,2003(1):49-50.
- [4] 牛力文,赵剑波.PP₃₃₃诱导植物抗寒性的研究[J].北京农业科学,2002(1):15-17.
- [5] 廖联安.新型植物生长延缓剂和杀菌剂——氯丁唑[J].植物生理学通讯,1985(2):56.
- [6] 蔡后建,周风帆,金琦,等.多效唑对几种生物的毒性及对植物超微结构效应的研究[J].南京大学学报,1994,30(2):274-279.
- [7] 王孟龙.PP₃₃₃浸种对伊丽莎白甜瓜种子萌发及幼苗生长的影响[J].辽宁农业职业技术学院学报,2002,4(3):61-64.
- [8] 张建文,覃雅芳,陈国民,等.不同浓度多效唑处理对网纹甜瓜苗质的影响[J].上海蔬菜,2006(2):76-77.
- [9] 何志生,司宗柱,曹永忠,等.PP₃₃₃对辣椒生长及产量的影响研究[J].安徽农业技术师范学院学报,1994,8(1):17-21.
- [10] 王志杰,郑均宝,张月娴.PP₃₃₃对香椿种子发芽和幼苗生长的影响[J].河北林学院学报,1995,10(3):221-225.
- [11] 杨广东,张战备,赵鸿钧,等.多效唑对温室青椒生长发育的影响[J].山西农业科学,1999,27(3):55-57.
- [12] 程智慧,刘宏伟.不同浓度 PP₃₃₃对番茄幼苗生长及生理的影响[J].西北农业大学学报,1992,20(3):122-126.
- [13] 王进涛,王发谋,蒋燕.4种矮化剂对樱桃番茄矮化作用研究[J].洛阳农业高等专科学校学报,2001,21(1):14-16.
- [14] Berova M,Zlatev Z. Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants[J]. Plant Growth Regulation,2000,30(2):117-123.
- [15] 熊自立,宋文坚,杨杰,等.烯效唑包衣处理对黄瓜种子活力和幼苗素质的影响[J].浙江农业学报,2005,17(4):223-227.
- [16] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000:92-93,201-202.
- [17] 张玉萍,徐珍美,叶宗国.多效唑在杂交水稻制种上的应用效果[J].江西农业学报,2005,17(4):29-31.
- [18] 艾辛,夏志兰,刘明月,等.植物生长调节剂对马铃薯试管苗生长和保存的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2005,31(5):514-517.
- [19] 洪森荣,李明军.PP₃₃₃对怀山药试管苗生长及生理特性的影响[J].河南农业科学,2006(3):80-83.
- [20] 罗赛男,谢志兵,彭尽晖.水杨酸和多效唑对玉簪叶片生理生化的影响[J].孝感学院学报,2005,25(3):20-23.
- [21] 刘兆良,沈岳清,盛敏智,等.多效唑对部分作物植株组织结构的影响[J].上海农业学报,1995,11(3):43-47.

(上接第 160 页)

相同,但是他们并没有指出产毒达到高峰时的最佳培养条件。在本试验中,对培养基和培养时间而言,大蒜紫斑病菌在改良 Fries 培养基产毒量最多时所需的时间最短,为 6 d;而在 PSK 培养基、查彼克培养基产毒量最多时所需培养时间均为 8 d,改良理查德培养基则需 16 d,且大蒜紫斑病菌在以上 3 种培养基的粗毒素毒性均无改良 Fries 培养基中产生的粗毒素毒性强。在本试验设置的温度范围内,24~28℃条件下,大葱种子发芽率均较低,其中以 26℃最低,但三者之间发芽率无显著性差异,因此认为大蒜紫斑病菌产毒培养的适宜温度为 24~28℃,以 26℃时产毒量最多。

本研究中,振荡较静置有利于产毒,黑暗较光照有利于产毒,在所设置的 5 个处理中,以 24 h 黑暗+振荡条件下大蒜紫斑病菌产毒量最高,并与其他 4 个处理差异极显著。pH 为 7 的培养基与 pH 分别为 3,10,11,12 的培养基,产生的毒素量差异不显著,其原因可能是:(1)偏酸偏碱不利于大蒜紫斑病菌产毒;(2)溶液本身偏酸偏碱也不利于大葱种子发芽。培养基 pH 为 9 时,大葱种子发芽率升高,这是由于粗毒素是大蒜紫斑病菌的次生代谢产物,此时 pH 不适合粗毒素的产生,产毒量减少,导

致大葱种子发芽率升高。所以,适合大蒜紫斑病菌产毒的培养基 pH 值为 6~8,最佳产毒 pH 为 7。

本研究明确了大蒜紫斑病的产毒条件,同时对粗毒素的纯化及以后进行大蒜抗紫斑病变异无性系的筛选提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] 董金皋.农业植物病理学:北方本[M].北京:中国农业出版社,2001:441.
- [2] 康绍兰,刘国胜,董金皋.几种植物病原真菌毒素的初步研究[J].河北农业大学学报,1995,18(4):105-111.
- [3] 左豫虎,康振生.小麦雪霉叶枯病菌毒素的初步研究[D].陕西杨凌:西北农业大学,1995.
- [4] 万佐玺,强胜,吴永尧.链格孢菌毒素的分离及活性测定[J].北华大学学报:自然科学版,2001,2(5):428-430.
- [5] 邢宇俊,程智慧.培养条件对马铃薯晚疫病病菌毒素产生的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(3):89-92.
- [6] 陆维忠,程顺和,王裕中.小麦抗赤霉病研究[M].北京:科学出版社,2001.
- [7] Liu D. Breeding wheat for scab resistance—a worldwide hard nut to crack[M]//中国农学会.21世纪小麦遗传育种展望.北京:中国农业出版社,2001:4-12.
- [8] 刘思衡,巫升鑫,李始明,等.小麦对抗赤霉病性超亲选育研究[J].中国农业科学,1998,31(1):40-45.
- [9] 张金林,董金皋,樊慕贞,等.葱紫斑病菌毒素的纯化及除草活性[J].植物保护学报,2000,27(3):285-286.