

石楠拟盘多毛孢毒素产生条件初探

蒋继志* 李向彬 桂春爽 王 岩

(河北大学生命科学学院 河北 保定 071002)

摘 要: 石楠拟盘多毛孢是引起草莓根腐病的优势病原菌之一, 本实验在明确该病菌毒素是主要致病物质的基础上, 利用叶圆片法对该菌的产毒条件进行了初步探讨, 结果表明, 除光照影响不明显外, pH 值、温度、振荡及培养时间等对此菌产生毒素均有显著影响, 其最适产毒条件为: 培养基初始 pH 值为自然 pH 值(约为 6.2)、温度为 25°C、黑暗、静置培养 5 d~7 d。此外, 实验还发现该菌产生的粗毒素对玉米、黑麦和绿豆种子萌发、根或芽的延伸生长都有明显的抑制作用。

关键词: 石楠拟盘多毛孢, 毒素, 培养条件

Preliminary Research on Conditions of Toxins Produced by *Pestalotiopsis photiniae*

JIANG Ji-Zhi* LI Xiang-Bin GUI Chun-Shuang WANG Yan

(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

Abstract: *Pestalotiopsis photiniae* is one of the predominant pathogens of strawberry root rot disease. Based on preliminary research, it was proved that crude toxins were main pathogenic substances of the pathogen. For further investigation and utilization of toxins produced by this fungus, conditions of producing toxins were analyzed with the leaf disk method in this experiment. The result showed that pH values, cultural time, vibration, and tested temperatures obviously affected the production of toxins, except for light treatment. The most suitable culture conditions for the toxin production were pH 6.2, 25°C, darkness and stillness, for 5 d~7 d. Besides, it was discovered that crude toxins could significantly inhibit seed germination and elongation growth of roots or shoots for maize, rye and mung bean.

Keywords: *Pestalotiopsis photiniae*, Toxin, Culture condition

草莓根腐病(Strawberry Root Rot)是由多种病原菌单独或复合侵染引起的重要病害之一, 世界主要草莓生产园区均有发生^[1], 严重时可能造成草莓生产的毁灭性损失。华北地区作为全国主要的草莓生产区, 每年都因此病遭受重大经济损失。但迄今为止, 关于草莓根腐病的研究主要局限于致病菌的种类分

离鉴定、致病性测定、宏观防治措施等方面的探讨, 本实验室的前期研究结果表明, 河北满城地区草莓根腐病的优势致病菌为石楠拟盘多毛孢^[2]、该病菌产生的主要致病物质为毒素^[3]。在此基础上, 本试验对该病菌产生毒素的条件以及粗毒素对几种植物种子萌发及幼根、幼芽延伸生长的影响进行了初步探

索,为进一步深入研究毒素的理化特征、致病组分和致病机理,以及利用毒素进行草莓品种的抗病性筛选等提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试菌株为石楠拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis photiniae* (Thuem) Y.X.Chen),为本实验室保存菌株。供试草莓品种为达赛莱克特,购自满城草莓生产基地。玉米、黑麦和绿豆种子购自保定农资科技市场。

1.2 不同培养条件对病菌产生毒素的影响

按培养时间、初始 pH 值、培养温度、光照、振荡与静置等不同条件培养病菌,分别制备粗毒素,并通过致病性检测逐一确定各项最佳培养条件。其中,培养时间分别为培养 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d;培养基初始 pH 值分别用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 调节至 3、5、7 和 9,共 4 种处理;培养温度分别设:20℃、25℃ 和 30℃ 3 种处理;光照分别设连续光照、12 h 光照/12 h 黑暗和连续黑暗 3 种处理;振荡条件分别设连续振荡(50 r/min)、间歇振荡(50 r/min, 30 min/d)和静置 3 种处理;以上各项试验条件每种处理均重复 4 次,试验重复 3 次。按照文献[3]所描述的方法制备粗毒素,4℃ 保存备用。

1.3 粗毒素毒性(virulence)的生物检测

参照万佐玺^[4]和董金皋^[5]的方法采用叶圆片法进行生物检测。用 5 mL 粗毒素溶液(浓度为 0.355 mg/mL)处理草莓离体叶片,按文献[4]所述的标准统计处理后的病情指数来评价毒素的毒性大小。生测时将毒素滤液统一调至 pH 7。

1.4 粗毒素对几种植物种子萌发及根、芽延伸生长的影响

参考赵晓军^[6]的方法用经上述试验确定的各项最佳产毒条件下获得的粗毒素溶液(浓度为 0.355 mg/mL) 20 mL 分别浸泡玉米、黑麦和绿豆种子 1 h,用无菌水冲洗数次并浸泡 3 h~7 h,对照用无菌水浸泡 4 h~8 h,25℃~26℃ 培养 3 d,统计种子的萌发率;此外,选用正常条件下萌发、主根(芽)长约 2 mm 的玉米、绿豆和黑麦种子,以 20 mL 粗毒素溶液(浓度同上)浸泡处理 30 min(对照用无菌水处理),25℃~26℃ 保湿培养 2 d,测定主根(芽)长度,按文献[6]的方法计算抑制率。计算公式:

$$\text{萌发抑制百分率(\%)} = \frac{\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100$$

$$\text{生长抑制百分率(\%)} = \frac{\text{对照胚根(芽)长} - \text{处理胚根(芽)长}}{\text{对照胚根(芽)长}} \times 100$$

2 结果和分析

2.1 培养时间对产毒的影响

石楠拟盘多毛孢在 25℃ 下分别静置培养 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d 后产生的毒素,均可引起草莓离体组织发生病变,供试 6 种处理所得毒素的毒力均与对照达到极显著差异(表 1),其中以培养第 7 天所得毒素的毒力最强(病情指数为 77.08),培养第 5 天的毒素毒力次之(病情指数为 63.34),培养时间少于 5 d 或多于 7 d 所得毒素的毒力均显著下降,这表明石楠拟盘多毛孢产生致病毒素的最适培养时间为 5 d~7 d,本试验选用 5 d(图 1)。

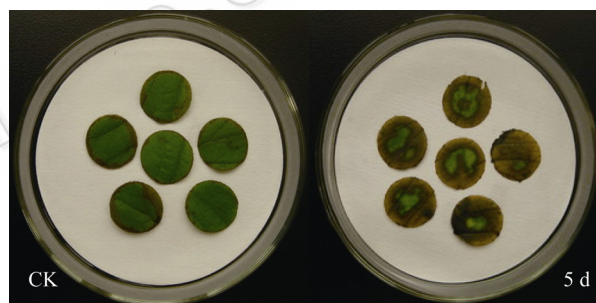


图 1 石楠拟盘多毛孢培养 5 d 所产生的毒素对叶片的毒性

Fig. 1 Virulence of crude toxin produced by *P. photiniae* cultured for 5 d on leaves

2.2 培养基初始 pH 值对产毒的影响

不同初始 pH 值对石楠拟盘多毛孢产毒的影响见表 1。将培养基初始 pH 值调整为 3、5、7、9 后分别培养石楠拟盘多毛孢 5 d,所得毒素均可明显引起草莓离体组织发生病变,其中在自然 pH 值 6.2 和初始 pH 值为 7 时所产生的毒素毒力最强(病情指数分别为 70.83 和 72.50),其它 pH 值条件下毒素的毒力明显下降,但均与对照达到极显著差异。表明石楠拟盘多毛孢产生致病毒素最适培养基初始 pH 值为 7 或自然 pH 值,本试验选用自然 pH 值(约为 6.2)。

2.3 培养温度对产毒的影响

由表 1 所示,将培养基的自然 pH 值定为初始

pH 值, 分别于 20°C、25°C 和 30°C 下培养石楠拟盘多毛孢 5 d, 所产生毒素的毒力均与对照达到极显著差异, 其中以 25°C 培养 5 d 所产生毒素的毒力最强(病情指数为 83.33), 与 30°C 条件下所得毒素的毒力之间差异极显著, 但与 20°C 条件下的毒力之间差异不显著。表明该病菌产生致病毒素的最适温度为 20°C~25°C, 本试验选用 25°C。

2.4 光照对产毒的影响

以自然 pH 值为培养基的初始 pH 值、温度 25°C, 在连续光照、12 h 光照/12 h 黑暗和连续黑暗 3 种处理下培养 5 d, 发现石楠拟盘多毛孢所产生毒素的毒

力之间无显著差异, 病情指数分别为 60.12、71.11 和 79.99(表 1), 但均与对照达到极显著差异。表明光照条件对该病菌产生致病毒素没有显著影响, 本试验选用黑暗培养。

2.5 振荡培养对产毒的影响

振荡培养对石楠拟盘多毛孢产生毒素的影响见表 1。选择自然 pH 值为培养基的初始 pH 值、温度 25°C、黑暗, 在连续振荡、间歇振荡(50 r/min, 30 min/d)和静置 3 种处理下培养 5 d, 发现病菌所产生毒素的毒力均与对照达到极显著差异, 其中以静置培养条件下所产生毒素的毒力最强(病情指数为

表 1 不同培养条件对石楠拟盘多毛孢毒素毒性的比较*
Table 1 Comparison among toxins virulence of *P. photinia* obtained at different cultural conditions*

处理 Treatment		病情指数 Disease index (%)				差异显著性 Different significance		
		1	2	3	4	平均	$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
时间(d) Time	1	23.33	0	0	10.00	8.33	c	C
	3	23.33	26.67	26.67	30.00	26.67	bc	BC
	5	60.00	60.00	66.67	66.67	63.34	a	A
	7	83.33	78.33	73.33	73.33	77.08	a	A
	9	40.00	60.00	23.33	23.33	36.37	b	B
	11	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	bc	BC
	CK	0	0	0	0	0	d	D
pH	3	20.00	20.00	30.00	50.00	30.00	b	B
	5	40.00	60.00	43.33	33.33	44.17	b	AB
	7	66.67	70.00	86.67	66.67	72.50	a	A
	9	36.67	23.33	23.33	13.33	24.17	b	B
	自然 pH	83.33	63.33	73.33	63.33	70.83	a	A
	CK	0	0	0	0	0	c	C
温度(°C) Temperature	20	66.67	66.67	73.33	73.33	70.00	a	A
	25	83.33	83.33	83.33	83.33	83.33	a	A
	30	30.00	36.67	33.33	56.67	39.17	b	B
	CK	0	0	0	0	0	c	C
	CK	0	0	0	0	0	c	C
光照 Light	连续光照	63.70	70.00	46.67	60.12	a	A
	12L/12D	70.00	73.33	70.00	71.11	a	A
	连续黑暗	93.30	66.67	80.00	79.99	a	A
	CK	0	0	0	0	0	b	B
振荡条件 Vibration	连续振荡	43.33	40.00	43.33	42.22	b	B
	振荡 30min/d	50.00	46.67	36.00	44.22	b	B
	静置	70.00	63.33	66.67	66.67	a	A
	CK	0	0	0	0	0	c	C
	CK	0	0	0	0	0	c	C

注: *: 对相同培养条件不同处理所得的病情指数进行了统计分析。

Note: *: The disease indexes were analyzed statistically for different treatment at the same cultural conditions.

66.67%), 且静置条件下所产生毒素的毒力与连续振荡或间歇振荡下的毒力相比均达到极显著差异, 但连续振荡和间歇振荡之间无显著差异。可见该病菌致病毒素的产生以静置培养为宜。

2.6 毒素对几种植物种子萌发及幼根延伸生长的影响

经粗毒素处理后, 玉米(图 2)、黑麦和绿豆种子的萌发率降低, 幼芽生长缓慢, 而对照种子萌发正常、长势良好, 粗毒素对玉米、黑麦和绿豆种子萌发的抑制率分别为 77.78%、96.30%和 46.67%, 同时, 使幼根的延伸生长受到抑制, 明显比对照短小, 其抑制率均达到 60%以上, 其中对玉米(图 4)幼根延伸生长的抑制作用最明显, 抑制率达到 86.40%, 对黑麦根生长的抑制作用最弱。上述结果表明石楠拟盘多毛孢粗毒素对这 3 种植物种子的萌发及幼根延伸生长均具有显著的抑制作用。

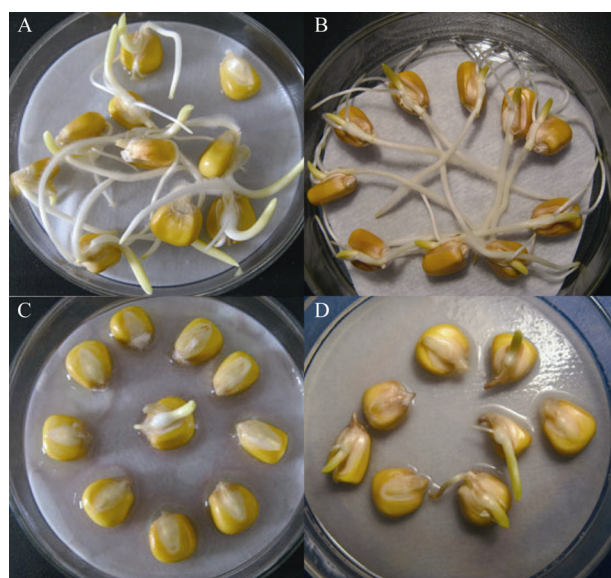


图 2 毒素对玉米种子萌发及幼根延伸生长的影响

Fig. 2 Effects of crude toxins on seed germination and shoot elongation growth of maize

注: A: 正常萌发的玉米种子; B: 幼根正常延伸生长的玉米种子; C: 毒素抑制萌发的玉米种子; D: 毒素抑制幼根延伸生长的玉米种子。

Note: A: Normal germination of maize seeds; B: Normal elongation growth of maize shoots; C: Germination of maize seeds inhibited by toxins; D: Elongation growth of maize shoots inhibited by toxins.

3 讨论与结论

一般而言, 病原真菌在寄主体外产生毒素的量与培养条件的关系十分密切, 因而对于不同的真菌,

需要对其产生毒素的培养条件进行探索。研究发现, 大多数真菌需要培养较长时间才可以达到最大的产毒量, 大部分都在 10 d~20 d^[7], 有些真菌则需要更长时间^[8], 而本实验中石楠拟盘多毛孢最大的产毒量是在 5 d~7 d, 这说明不同真菌之间产生毒素所需要的时间有很大区别; 另外, 大部分真菌的最佳产毒温度均为 25°C 左右^[7], 本实验所得结果与上述结论基本一致; 有关 pH 值对病菌产毒的影响, 有报道表明中性或者接近中性环境比较适合大多数真菌产毒的需要^[9], 而有些嗜碱和嗜酸性菌可能是例外^[10], 本试验中石楠拟盘多毛孢的产毒最佳 pH 值接近中性; 至于光照对真菌产毒的影响, 似乎没有明显规律, 有些真菌在光照下产生毒素量大(如大豆根腐病菌 *Fusarium oxysporum*)^[11], 有的则在黑暗下产生毒素量大(如白菜黑斑病菌 *Alternaria brassicae*)^[12], 可能因真菌种类及生长习性而异, 本试验中石楠拟盘多毛孢在黑暗下产生毒素最多; 振荡培养对真菌产生毒素的影响也无明显规律, 本试验中石楠拟盘多毛孢在静置培养下产生毒素最多。

病原真菌产生的毒素除引起植物根、茎和叶发生病变外, 对植物种子胚根、胚芽的生长也具有明显的抑制作用^[13], 本研究的结果表明石楠拟盘多毛孢毒素除了可以引起草莓叶片、根段发生病变以外^[3], 对玉米、绿豆和黑麦等植物种子萌发、根或芽的延伸生长均有明显的抑制作用, 虽然目前尚无关于该病菌在自然条件下引起这几种植物发生病害的报道, 但说明该菌有引起这些植物发生病害的潜在能力, 这一现象提示我们需要警惕这种病原真菌可能发生变异而使其寄主范围扩大^[14], 危害更多植物。因此, 对石楠拟盘多毛孢产生的毒素, 需要进一步开展多方面的研究工作, 主要包括分离、纯化、化学结构、致病机理和应用等方面, 尤其是尽快分离纯化该毒素组分、鉴定其结构, 将对深入揭示毒素的致病机制、以及利用毒素进行抗根腐病草莓材料或品种的筛选提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 赵秀娟, 王树桐, 张凤巧, 等. 草莓根腐病研究进展. 中国农学通报, 2006, 22(8): 419~422.
- [2] 徐淑华, 蒋继志, 郝志敏. 河北满城地区草莓根腐病病原真菌的分离鉴定. 彭友良, 中国植物病理学会 2004

- 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版, 2004, pp.68-71.
- [3] 李向彬, 蒋继志, 郭会婧. 草莓根腐病菌致病物质的初步研究. 河北农业大学学报, 2008, 31(2): 42-44.
- [4] 万佐玺. 链格孢菌毒素对紫茎泽兰致病性及生物测定方法的研究. 湖南民族学院学报, 2001, 19(1): 20-23.
- [5] 董金皋. 真菌毒素生物测定方法研究概况. 河北农业大学学报, 1992, 15(4): 99-102.
- [6] 赵晓军, 王美琴, 刘慧平, 等. 番茄叶霉病菌不同菌株粗毒素对种子萌发的影响. 山西农业科学, 2005, 33(1): 50-52.
- [7] 鲁绍琴, 杨 斌, 付 惠, 等. 泽兰尾孢菌的产毒培养与毒素提取. 西南林学院学报, 2006, 26(2): 40-43.
- [8] 杨军玉, 臧少先, 刘淑香. 玉米黄斑病菌产毒条件及毒素稳定性研究. 玉米科学, 2000, 8(4): 82-84.
- [9] 刘朝辉. 玉米弯孢菌产毒条件、产毒能力及毒素作用机理的研究. 四川农业大学硕士学位论文, 2004.
- [10] 叶 茂, 罗 宽, 何 昆, 等. 毛竹枯梢病原菌产毒条件及其对植物的影响. 湖南农业大学学报, 2001, 27(6): 449-452.
- [11] 台莲梅, 许艳丽. 大豆根腐病菌生长及产生毒素的条件筛选. 中国油料作物学报, 2004, 4(26): 71-73.
- [12] 樊慕贞, 董金皋, 杨俊国, 等. 白菜黑斑病菌菌丝生长和毒素产生条件的研究. 河北农业大学学报, 1995, 18(4): 21-27.
- [13] 车建美, 刘 波, 林营志, 等. 黄瓜枯萎病原菌的粗毒素滤液对黄瓜种子萌发的影响. 厦门大学学报, 2004, 43(S1): 91-93.
- [14] 韦继光, 徐 同. 植物内生拟盘多毛孢的生物多样性. 生物多样性, 2003, 11(2): 162-168.

征订启事

欢迎订阅 2009 年《植物保护》杂志

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫新动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。

联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部 邮编: 100193

电话: 010-62819059, 62815914 传真: 010-62815914

E-mail: zwbh1963@263.net 网址: www.plantprotection.ac.cn

联系人: 王 音 高洪荣