

鸭跖草叶点霉粗毒素的提取方法和产毒条件的研究^{*}

谷祖敏 纪明山^{**} 韩秀华 魏松红 王英姿

(沈阳农业大学 植物保护学院 辽宁省生物农药工程技术研究中心 沈阳 110161)

摘要 :以石油醚、乙酸乙酯、四氯化碳三种极性不同的溶剂对鸭跖草叶点霉病原菌的菌丝和培养液进行萃取,获取粗毒素。结果表明,叶点霉菌产生的毒素既有胞外毒素,又有胞内毒素,且用极性中等的乙酸乙酯萃取效果最好。大豆培养基和 PSK 分别是适合菌株生长和毒素分泌的固体培养基和液体培养基。确定有利于叶点霉产毒的温度为 32℃、培养时间为 14d、培养方式为 150r/min 振荡培养。

关键词 鸭跖草叶点霉 毒素 提取 产毒条件

中图分类号 S497 文献标识码 A 文章编号 0253-2654(2007)05-0946-04

Study on the Extracting Method and Producing Conditions of *Phyllosticta commelimecola* Toxin^{*}

GU Zu-Min JI Ming-Shan^{**} HAN Xiu-Hua WEI Song-Hong WANG Ying-Zi

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Biopesticide Engineering Research Center of Liaoning Province, Shenyang 110161)

Abstract The crude toxin was extracted from hypha and culture solution of *Phyllosticta commelimecola* through three different polarity solvent: benzinum, punicificatum ethyl acetate and chloroform. The result indicated that the toxin secreted by *Phyllosticta commelimecola* not only was in hypha but also in culture solution and the extracting effect of ethyl acetate was the best. The soybean median and PSK media can be respectively used as solid and liquid culture media to produce toxin and grow mycelium. The optimal cultural conditions for producing toxin were temperature 32℃, cultured period 14d, cultured ways shaking of 150r/min.

Key words :*Phyllosticta commelimecola* Young, Toxin, Extraction, Toxin-producing condition

鸭跖草(*Commelina communis* L.)是鸭跖草科鸭跖草属单子叶植物,主要危害大豆、小麦、玉米、花生等旱田作物,已成为东北地区农田中恶性杂草之一^[1]。使用寄生在鸭跖草上的病原真菌控制农田鸭跖草的发生,这是利用自然界生物力量去压抑鸭跖草种群的一个重要途径^[2]。从鸭跖草自然发生的叶斑病病斑上分离出的叶点霉菌能产生毒素,接种到鸭跖草叶片上,可以产生与孢子或菌丝侵染后相似的病斑,这说明叶点霉对鸭跖草的致病作用与其产生的毒素有关^[3]。国内外研究表明病原真菌在寄主体外产生毒素的量与培养条件关系密切^[4,5]。在本文中,作者用生测法对叶点霉菌的产毒培养条件和粗毒素的提取进行了研究,为进一步

研究开发叶点霉菌及其毒素作为防治鸭跖草及其它杂草的生物除草剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与植物

供试菌株:鸭跖草叶点霉(*Phyllosticta commelimecola* Young)从沈阳地区鸭跖草病叶上分离获得。

供试植物:鸭跖草为温室培育的实生苗,培养至三叶期。

1.2 产毒培养方法

转接叶点霉菌于 PDA 培养基上培养 7d,在菌落边缘打取直径为 6.5mm 的菌苔,接种到 300mL

^{*} 辽宁省“十五”科技攻关项目(No. 2006215004),辽宁省工程技术研究中心专项(No. 200535)

^{**} 通讯作者 Tel 024-88492673, E-mail jimingshan@163.com

收稿日期:2007-01-19,修回日期:2007-04-23

pH7 的 PSK 液体培养基中(500mL 三角瓶),每瓶接种 3 块菌苔,25℃ 150r/min 培养 7d~21d,培养液先用 4 层纱布过滤,滤液真空抽滤,得无菌滤液待用。

1.3 鸭跖草叶点霉粗毒素的提取方法

1.3.1 萃取溶剂的筛选 选择极性不同的有机溶剂石油醚、乙酸乙酯、四氯化碳,分别等体积对培养滤液进行萃取 3 次,合并有机相,50℃减压旋转蒸干后用水定容至 10mL 得粗毒素溶液。以无菌水、培养基和 3 种有机溶剂作对照,用针刺接种法测定粗毒素的生物活性,通过解剖镜观察病斑大小,并与无菌滤液作活性比较。每个处理重复 3 次。

1.3.2 毒素产生方式的确定 为确定叶点霉菌产生的毒素主要是胞外毒素还是胞内毒素,对培养滤液和洗净的菌丝分别进行处理,提取粗毒素^[6]。培养滤液粗毒素的提取方法如 1.3.1 所述。对菌丝中毒素的提取方法有两种,一是将菌丝用蒸馏水洗净,60℃烘干,乙酸乙酯浸泡 4h,4 层纱布过滤除去菌丝,滤液 50℃减压蒸馏,获得粗毒素。第二种方法将菌丝用蒸馏水洗净,加入无菌水后用组织均浆机搅碎,过滤,滤液用乙酸乙酯等体积萃取 3 次,合并有机相,50℃蒸馏获得粗毒素。针刺接种法测定粗毒素的生物活性,以无菌水作对照。

1.4 鸭跖草叶点霉产毒条件的确定

1.4.1 固体培养基的筛选 参考万佐玺等方法^[7],分别以水稻、小麦、玉米、大豆、高粱作培养基,接种叶点霉菌株,25℃ 培养,每天摇动 1~2 次,避免结块,3w 后取出培养物,用乙酸乙酯浸泡 2h,过滤出菌丝及剩余培养基,收集乙酸乙酯相,50℃减压蒸馏回收乙酸乙酯,获得粗毒素。针刺接种法进行生物活性测定,比较不同培养基产毒的差异。

1.4.2 液体培养基的筛选 以 PSK、SCSC、Czapek、Richard、鸭跖草汁 5 种液体培养基,接种叶点霉菌株,25℃ 150r/min 培养 10d,毒素的提取和活性测定方法参考 1.3.1。

1.4.3 温度对产毒活性的影响 以 PSK 为培养基,分别在 25℃、28℃、32℃ 转速 150r/min 下培养叶点霉 10d,提取粗毒素,针刺法测定毒素活性。

1.4.4 培养时间对产毒活性的影响 以 PSK 为培养基,接种叶点霉菌,分别置于温度 28℃ 转速 150r/min 条件下培养 7d、14d、21d,提取粗毒素,针刺法测定毒素活性。

1.4.5 培养方式对产毒的影响 以 PSK 为培养基,

接种叶点霉菌,置于 28℃ 下转速分别为 100r/min、150r/min、200r/min 的摇床上振荡培养和 28℃ 恒温箱中静止培养,10d 后取出,提取粗毒素,针刺法测定毒素活性。

2 结果与分析

2.1 萃取溶剂对叶点霉粗毒素提取的影响

如图 1 所示,极性不同的 3 种有机溶剂石油醚、乙酸乙酯、四氯化碳对粗毒素的萃取效果差异很大,萃取效果最好的是乙酸乙酯,病斑直径是 1.00mm,和无菌滤液相比,毒素的回收率达到 81.97%,石油醚的萃取效果最差,回收率只有 31.15%,四氯化碳的回收率为 42.62%。可见用中等极性的有机溶剂乙酸乙酯对叶点霉毒素可以进行有效的萃取。

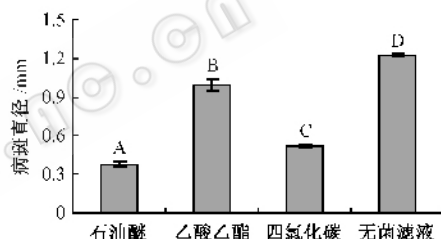


图 1 不同有机溶剂萃取的粗毒素的致病性

真菌毒素有分泌到细胞外,也有存在于细胞内的。从图 2 可见从培养滤液和菌丝中提取的毒素接种后产生的病斑大小差异比较小,说明叶点霉菌株在液体培养条件下,毒素的产生形式是既有分泌到细胞外的也有存在于细胞内的。

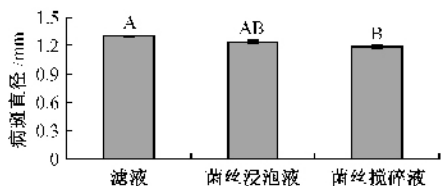


图 2 从培养滤液和菌丝中提取的粗毒素的致病性

2.2 培养基种类对叶点霉粗毒素产生的影响

鸭跖草叶点霉菌在供试的 5 种固体培养基上生长量差异很大,在大豆和玉米上长势较好,豆粒和玉米表面都长满了菌丝,而在水稻和小麦上生长的菌丝较少,菌丝主要集中在稻粒和麦粒的两端。从图 3 看出叶点霉菌在这几种固体培养基上都能产生毒素,以大豆为培养基产生的毒素致病力最强,病斑直径达 2.14mm,其次是玉米,病斑直径 1.62mm,

致病力最弱的是小麦培养基中产生的毒素,病斑直径只有 0.92mm,说明大豆的营养成分比较适合鸭跖草叶点霉菌丝的生长和毒素的分泌。

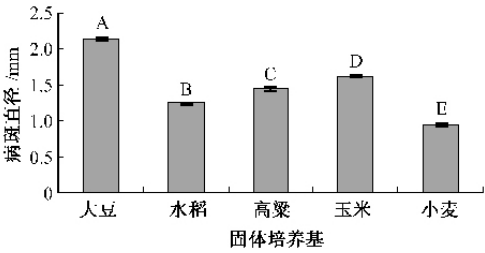


图3 固体培养基对叶点霉产毒的影响

采用 5 种液体培养基培养叶点霉菌,菌株的生长量有很大差别,在 PSK 和 SCSC 培养基中培养的叶点霉菌生长较旺盛,21d 后菌丝干重最多,在鸭跖草汁中的生长量次之,生长量最少的是在 Czapek 和 Richard 培养基。叶点霉菌在不同培养基中的培养性状有一定的差别,在 SCSC 培养基菌丝体簇团,表面毛绒绒,毛球较大,直径 7mm~8mm,颜色墨绿色;在鸭跖草汁中也呈球状,但表面是稀疏的小刺,且刺球直径仅有 2mm~3mm,颜色为乳白色。PSK、Czapek、Richard 培养中菌丝体分别呈棉絮状和片段状,颜色分别为灰黄色和白色。叶点霉菌在不同液体培养基中的致病性差异和生长量差异类似,在 PSK、SCSC 和鸭跖草汁中培养,毒素致病力较强,病斑直径分别为 1.22mm、1.18mm 和 1.15mm,而在 Czapek 和 Richard 培养基中提取的毒素致病力较弱,病斑直径分别为 1.06mm 和 0.97mm(见表 1)。综合菌丝的生长量和毒素的致病性,认为 PSK 培养基是适合鸭跖草叶点霉菌的生长和分泌毒素的液体培养基。

表 1 叶点霉菌在不同液体培养基中的致病性和生长量

培养基 种类	病斑直 径(mm)	菌丝干重 (g)	培养性状
PSK	1.22a	3. 9375a	菌丝体棉絮状,灰黄色
SCSC	1.18ab	3. 8063b	菌丝体簇团,绒球状, 直径 7~8mm,墨绿色
鸭跖草汁	1.15bc	3.4032c	菌丝体簇团,刺球状, 直径 2~3mm,乳白色
Czapek	1.06c	2.6703de	菌丝体片段状,白色
Richard	0.97d	2.5095e	菌丝体片段状,白色

注 按 Duncan's 新复极差检测($P=0.05$)同列相同字母表示处理间无显著差异。

2.3 温度对鸭跖草叶点霉粗毒素活性的影响

从图 4 看出,用 PSK 培养基在不同温度下培养叶点霉菌,获得的毒素活性有一定的差别。32℃时叶点霉毒素致病力最强,病斑直径最大可达 1.35mm,24℃时病斑直径最小,说明在一定温度范围内高温有利于病菌产生高致病力的毒素。

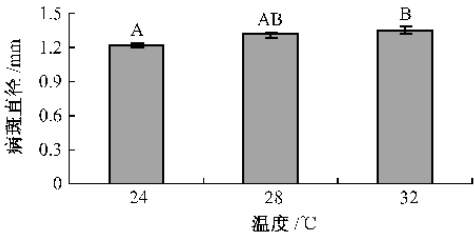


图4 温度对叶点霉产毒的影响

2.4 培养时间对叶点霉粗毒素活性的影响

在 PSK 培养基接种叶点霉菌,分别培养 7d、14d 和 21d 后都能分泌粗毒素,针刺接种鸭跖草叶片,第 2d 就可以产生病斑,且病斑大小随着时间延长而扩大(见图 5)。叶点霉培养时间的长短对毒素活性的影响很大,培养 14d 后提取得到的粗毒素活性高于 7d 和 21d,接种 6d 后病斑直径可达 1.32mm,远远大于另外两种处理,可见培养时间是毒素活性高低的一个重要影响因素。

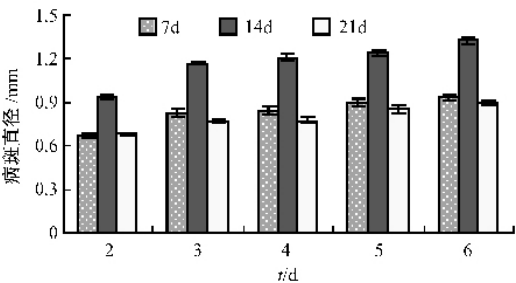


图5 培养时间对叶点霉产毒的影响

2.5 培养方式对粗毒素活性的影响

图 6 结果显示,在振荡和静止两种培养条件下,毒素致病力显著不同,振荡条件下在发病第 6 天观察病斑直径可达 1.3mm,静止条件下培养病斑直径却非常小,只有 0.92mm,表明振荡培养有利于叶点霉菌分泌毒素。振荡培养的转速对叶点霉毒素的产生也具有一定的影响,转速 150r/min 条件下菌株产生毒素的致病力总是高于 100r/min 和 200r/min 条件下毒素的致病力,病斑直径总是最大。100r/min 和 200r/min 时病斑直径较小,且两者差异不大。

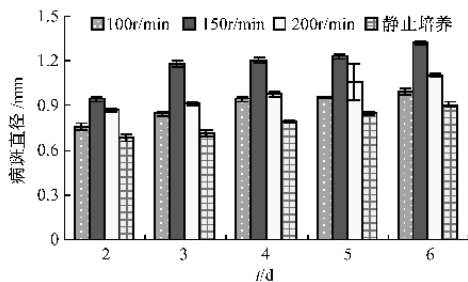


图6 培养方式对叶点霉产毒的影响

3 结论与讨论

真菌毒素有胞外毒素和胞内毒素之分,提取真菌毒素首先要确定毒素的产生形式。本研究表明,叶点霉菌产生的对鸭跖草有致病作用的毒素既有分泌到细胞外的也有存在于细胞内的,而在实际生产中还要从生产成本,提取的难易程度等方面加以考虑。虽然菌丝内也含有叶点霉毒素,但要先将菌丝搅碎、烘干,浸泡,然后才可以提取毒素,操作烦琐,费工费时。应用胞外毒素更适宜叶点霉菌开发生物源除草剂。

真菌毒素的提取溶剂对毒素活性影响较大,为使毒素的活性充分释放出来,必需选择合适的溶剂对无菌滤液进行萃取。研究结果表明,极性中等的乙酸乙酯是较理想的溶剂。

培养基的营养成分、温度、培养时间、培养方式

等对植物病原真菌产生毒素都有影响。固体培养基中大豆的营养成分比较适合叶点霉菌分泌毒素。液体培养基 PSK, SCSC 培养病菌产生的毒素致病力最强。叶点霉是高温病菌,培养温度为 32℃ 分泌的毒素活性最强,这也和田间 7~8 月份鸭跖草叶斑病发病最严重的情况相吻合。培养 14d 产生毒素的活性高于 7d 和 21d,说明培养时间过短毒素尚未分泌完全,培养时间过长毒素在培养基中被分解失效,所以要得到高致病力的毒素应注意掌握适当的培养时间。培养方式影响菌株的生长最终影响毒素的分泌。静止培养得到的菌体成大球状,球体内部为空洞而只在球表面布满菌丝,菌丝的数量减少,使得菌株分泌的毒素也相应减少。

参考文献

- [1] 由立新, 赵长山. 黑龙江农业科学, 2005, 3: 11~13.
- [2] 张艳华, 杜娟, 白容霖, 等. 吉林农业大学学报, 2000, 22(3): 27~29.
- [3] Crous P W, Palm M E. Mycol Res, 1999, 103(10): 1299~1304.
- [4] 康绍兰, 刘国胜, 董金皋. 河北农业大学学报, 1995, 18(4): 105~111.
- [5] 万佐玺, 强胜, 徐尚成, 等. 中国生物防治, 2001, 17(1): 10~15.
- [6] 万佐玺. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2002, 20(4): 26~28.
- [7] 万佐玺, 周光来, 强胜. 湖北民族学院学报(自然科学), 2001, 19(2): 7~10.