

# 白菜炭疽病病原菌粗毒素培养条件的优化

张林青, 顾捷芬

(淮阴工学院, 江苏 淮安 223003)

**摘要:**以白菜种子发芽抑制率为指标,采用生物检测法筛选白菜炭疽病病原菌产毒培养最佳条件。结果表明:白菜炭疽病病原菌的最佳产毒培养基为 Fries 培养液,培养温度为 28℃,培养基 pH 值为 6,在黑暗条件下连续振荡培养 10 d 产生的粗毒素最强。

**关键词:**白菜炭疽病菌;粗毒素;致病性;发芽抑制率

**中图分类号:**S 436.341.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)12-0115-04

白菜炭疽病分布全国各大白菜产区,是主要叶部病害之一。除危害大白菜外还可危害小白菜、萝卜、芜菁、芥菜等。炭疽病主要危害叶片、叶柄和中脉,也可危害花梗、种荚等。由于近几年来秋季气温变暖,白菜炭疽病的发生亦越来越严重,重病的病情指数达 47~80,但目前我国对白菜炭疽病的研究主要是在发生规律、化学药剂防治等方面<sup>[1-4]</sup>。

植物病原真菌毒素是由植物病原真菌产生的一类对寄主植物有毒的代谢产物,即真菌与寄主植物互作中的重要致病因子。真菌毒素能使寄主产生特定病症反应,在植物病害的发生、发展过程中具有明显的致病作用,因此越来越受到植物病理学家的重视。按照致病病原菌的种类,可分为植物病原细菌毒素和植物病原真菌毒素<sup>[5]</sup>。为了明确毒素在病程中的作用和应用粗毒素进行筛选,首先必须培养出大量的病菌粗毒素。迄今为止,关于白菜炭疽病菌产毒培养国内外尚鲜见报道。该研究在分离白菜炭疽病病菌的基础上,系统研究了病菌产粗毒素的培养条件,以期为今后进行白菜抗炭疽病离体细胞筛选育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株:白菜炭疽病原菌由取自淮安市农业科学院田间采样分离纯化后获得。

供试种子:黑芭菜种子在市场购买。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 病原菌的分离纯化与鉴定 病原菌的分离:首先

制备 PDA 培养基,将土豆洗净去皮切成小块称取 200 g,加水 1 000 mL 放在电磁炉上煮沸后过 25 min 再用 6 层纱布过滤,滤液加水补足到 1 000 mL 再加入 20 g 葡萄糖及 20 g 琼脂,小火加热让其充分溶解即可,并且这个过程中要用玻璃杯不断地搅拌<sup>[6]</sup>。取新鲜病叶的单个病斑,剪取病害与健康叶片交界处的病斑小块(3 mm×3 mm),叶脉,叶柄,叶片处病害分别切取备用。再用 75% 的酒精浸泡 1 min 消毒,无菌水冲洗 3 遍备用,然后用无菌操作法将这些病斑块接种到 PDA 培养基中,每皿放 3 块,做好标记。将培养皿倒置放入 20℃ 的恒温箱内培养。前 2 d 主要观察是否被细菌污染,后 5 d 观察待分离菌生长结果<sup>[7]</sup>。病原菌的纯化:接种 5 d 后菌落长出,观察分离的病叶组织处真菌菌落的特征,然后在无菌操作台上进行纯化。用直径为 5 mm 的打孔器取带有菌落的小块移入新的培养基上,在 20℃ 左右的恒温箱内进行纯化培养,3 d 后观察菌落生长情况。病原菌的鉴定:将分离纯化的病原真菌接种到健康的无病小白菜上,观察白菜是否产生与原来炭疽病相同的病害,如相同则可进行下一步试验,若不是则需要继续分离纯化。用接种铲铲取 3~5 块直径为 1 cm 病原菌菌落,放入无菌水中混匀,倒入喷瓶中喷洒在无病健康小白菜上,然后将喷洒过病原菌的小白菜放入植物培养箱中,温度设置为 28℃,湿度为 90%,7 d 后观察发病情况。用来接种的小白菜是从病原株同一田间采来的无病健康的植株体<sup>[8-9]</sup>。病原菌的扩繁:20℃ 恒温箱下培养,每 5 d 重新扩繁 1 次,以备用。

1.2.2 粗毒素培养条件的筛选 培养基的筛选:I. Fries 培养基:蔗糖 30 g,酒石酸铵 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g,硫酸镁 0.5 g,氯化钠 0.1 g,结晶氯化钙 0.1 g,酵母膏 1 g,蒸馏水 1 000 mL。II. 理查德培养基(Richardm

**第一作者简介:**张林青(1978-),女,博士,副教授,现主要从事园艺植物生理等研究工作。E-mail:linqingzhang@sina.com.

**收稿日期:**2015-02-12

edium): 硝酸钾 10 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g, 硫酸镁 2.5 g, 氯化铁 0.02 g, 蔗糖 50 g, 蒸馏水 1 000 mL。Ⅲ. PS 培养基: 马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 加水至 1 000 mL。Ⅳ. PD 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 加水至 1 000 mL。Ⅴ. 查彼克培养基(Czapek Dox medium): 蔗糖 30 g, 硝酸铵 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸铁 0.01 g, 蒸馏水 1 000 mL<sup>[9]</sup>。分别在 5 个 500 mL 三角瓶中倒入 300 mL 上述培养基, 然后取菌丝饼 6 块直径为 5 mm, 接种于各液体培养基中, 重复 3 次。在黑暗、振荡, 28℃ 条件下培养, 分别于培养 6 d 后取样制备白菜炭疽病菌粗毒素<sup>[10]</sup>。培养温度的筛选: 设 22、24、26、28、30℃ 5 个培养温度处理。将 300 mL 经筛选出的适宜培养基倒入 500 mL 三角瓶中, 取 6 块直径为 5 mm 的菌丝饼接种于其中, 分别置于不同温度的培养箱中, 重复 3 次, 培养 6 d 后取样制备白菜炭疽病菌粗毒素<sup>[11]</sup>。培养基 pH 值的筛选: 设 pH 为 3、4、5、6、7 五个培养基处理。将 300 mL 经筛选出的适宜培养基倒入 500 mL 三角瓶中, 取菌丝饼 6 块接种于其中, 重复 3 次, 培养 6 d 后取样制备白菜炭疽病菌粗毒素。光照条件的筛选: 将 300 mL 经筛选出的培养基倒入 500 mL 三角瓶中, 取 6 块直径为 5 mm 的菌丝饼接种于其中。设 24 h 光照、12 h 光照/12 h 黑暗、24 h 黑暗 3 个光照培养条件, 重复 3 次, 培养后取样制备白菜炭疽病菌粗毒素<sup>[12]</sup>。培养方式的筛选: 将 300 mL 经筛选出的培养基倒入 500 mL 三角瓶中, 取 6 块直径为 5 mm 的菌丝饼, 接种于其中。设振荡、静置 2 个培养条件, 重复 3 次, 培养 6 d 后取样制备白菜炭疽病菌粗毒素<sup>[12]</sup>。培养时间的筛选: 将 300 mL 经筛选出的培养基倒入 500 mL 三角瓶中, 取 6 块直径为 5 mm 的菌丝饼接种于其中。设 24 h 黑暗+振荡条件, 重复 3 次, 分别培养 4、6、8、10、12 d 后取样制备白菜炭疽病菌粗毒素<sup>[12]</sup>。粗毒素的制备: 将不同条件下培养最后得到的培养液用 8 层纱布过滤, 然后用 3 层滤纸过滤 2 遍, 再将滤液装入 5 mL 的离心管中, 贴上标签, 在离心机上离心, 用 2 000 r/min 离心 30 min, 离心后用试管取上清液分别装入贴有标签的试管中备用。

1.2.3 粗毒素生物活性的测定 将黑芭菜种子播种于覆盖基质的穴盘中, 放在 20℃ 植物培养箱中进行育苗, 2 周后对幼苗喷洒粗毒素, 放入植物培养箱中以 28℃, 90% 的湿度培养, 1 周后观察症状。参照陆仕华<sup>[13]</sup>抑制种子发芽测定法。将供试的白菜种子用清水洗净, 用温汤浸种法进行表面消毒。用无菌水冲洗 3 遍后, 每皿内 30 粒种子, 且铺一张无菌滤纸, 取 10 mL 粗毒素置于培养皿中, 于 20℃ 下催芽, 以无菌水培养处理为对照。48 h 后测定并计算种子发芽抑制率。每处理 3 次重复。种

子发芽抑制率(%)=(对照种子发芽个数-处理种子发芽个数)/对照种子发芽个数×100%。

### 1.3 数据分析

每个处理重复 3 次, 所得数据用 STAT 和 Excel 软件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 病菌粗毒素对白菜幼苗生长的影响

试验观察发现, 将白菜幼苗用粗毒素喷洒放入植物培养箱中以 28℃, 90% 的湿度培养, 1 周后, 部分外缘叶片上出现凹陷褐色小病斑, 后扩展到心叶及叶柄, 随着时间越长, 植株生长越衰弱, 整株出现大片病斑, 变黄矮化或枯死, 外观与最初的试验病株相似。说明病菌粗毒素是致病因子。发病前后对比见图 1、2。



图1 健康白菜



图2 粗毒素处理后的白菜

### 2.2 培养基对病菌产生毒素的影响

用白菜种子进行生物检测, 白菜种子发芽抑制率越高, 说明产毒培养中病菌产生的粗毒素越多。由表 1 可以看出, 不同培养基上产毒有极显著的差异。在 Fries 培养基上培养病菌产毒量最多, 白菜种子发芽抑制率最

高达 58.89%,而在 PD 培养基、PS 培养基、查彼克培养基、理查德培养基上培养所产生的粗毒素较少,发芽抑制率分别为 13.33%、16.67%、42.22%、38.89%。从产毒趋势上也可以看出,在相同培养时间下,Fries 培养基上产生的毒素使白菜种子发芽抑制率极显著高于其它培养基。可见 Fries 培养基是最适合白菜炭疽病菌产毒的培养基。

表 1 不同培养基对白菜炭疽病菌产毒的影响

培养基	发芽抑制率/%	5%差异	1%差异
Fries 培养基	58.89	a	A
查彼克培养基	42.22	b	A
理查德培养基	38.89	b	A
PS 培养基	16.67	c	B
PD 培养基	13.33	c	B

注:表中同一列数据后小写字母不同表示 5%水平的差异显著性,大写字母不同表示 1%水平的差异显著性,相同字母表示差异不显著。下同。

### 2.3 培养温度对病菌产生粗毒素的影响

病菌在不同温度下培养产毒差异很大。由表 2 中的发芽抑制率可以看出,在培养温度低于 28℃时,粗毒素产量随着温度的升高而增加;温度高于 28℃时,粗毒素产量随着温度的升高而降低。在 28℃培养条件下产毒量最多,白菜种子发芽抑制率显著达 67.78%,24℃和 30℃培养条件下毒量也较多,抑制率分别为 55.55%和 56.67%,不同温度下培养产生的毒素白菜种子发芽有不同程度的抑制,但抑制率显著的为 28℃下产毒培养。由此可见,适宜产毒的培养温度范围是 24~30℃,其中在 28℃下产毒量最多,毒性最强。

表 2 不同培养温度对白菜炭疽病菌产毒的影响

培养温度/℃	发芽抑制率/%	5%差异	1%差异
22	51.11	b	A
24	55.55	ab	A
26	62.22	ab	A
28	67.78	a	A
30	56.67	ab	A

### 2.4 pH 值对病菌产粗毒素的影响

由表 3 可知,病菌培养液 pH 对病菌产毒影响很大,培养基 pH 值为 6 与 3 时在 5%水平上差异显著。当培养基 pH 值低于 6 时,粗毒素产量随着培养基 pH 值升高而增加,培养基 pH 值高于 6 时,粗毒素产量随着培养基 pH 值升高而减少。最终结果表明,pH 值为 6 时

表 3 不同 pH 值下对白菜炭疽病菌产毒的影响

pH 值	发芽抑制率/%	5%差异	1%差异
6	66.67	a	A
7	58.89	ab	A
5	57.78	ab	A
4	55.56	ab	A
3	52.22	b	A

最适合产毒。

### 2.5 光照条件对病菌产粗毒素的影响

由表 4 可见,光照条件对病菌产毒影响并不是很大,24 h 光照、24 h 黑暗、12 h 光照+12 h 黑暗处理的抑制率分别为 63.33%、67.78%、64.44%,在 5%和 1%水平上差异不显著,但是最适合的条件为 24 h 黑暗下培养,产毒最多,毒性最强。

表 4 不同光照条件对白菜炭疽病菌产毒的影响

光照条件	发芽抑制率/%	5%差异	1%差异
24 h 黑暗	67.78	a	A
12 h 光照+12 h 黑暗	64.44	a	A
24 h 光照	63.33	a	A

### 2.6 培养方式对病菌产粗毒素的影响

由表 5 可知,培养方式对病菌产毒有一定影响,震荡培养与静置培养抑制率分别为 71.11%和 63.33%,从分析看差异不显著,从数据可看出震荡培养最适合产毒培养。

表 5 不同培养方式对白菜炭疽病菌产毒的影响

培养方式	发芽抑制率/%	5%差异	1%差异
震荡	71.11	a	A
静置	63.33	a	A

### 2.7 培养时间对病菌产粗毒素的影响

由表 6 可见,培养时间对病菌产毒影响很大,培养时间在 10 d 内,粗毒素产量随着天数的增加而增加,10 d 后,粗毒素的产量随着天数增加而减少,培养 10 d 时白菜发芽抑制率高达 70.00%,因此,该试验条件下白菜炭疽病菌产毒最适合的培养天数为 10 d。

表 6 不同时间下对白菜炭疽病菌产毒的影响

培养时间/d	发芽抑制率/%	5%差异	1%差异
4	57.78	b	A
6	61.11	ab	A
8	63.33	ab	A
10	70.00	a	A
12	62.22	ab	A

## 3 讨论

病原菌在人工培养基内产生毒素直接受培养基成分和外界环境条件的影响。国内外有许多这方面的研究报道。如在研究 *Pyrenophora tritici repentis* 产生的 PTR 毒素时,就采用了变温、变换光照及暗处理时间、更换培养基等多种手段来促使其产毒<sup>[14]</sup>。培养基直接影响病菌的产毒量。禾谷镰刀菌可以在 MYROTT 和 MOSS 液体培养基中产生 DON 毒素,而在马铃薯液体培养基中则不产生<sup>[15]</sup>。改良 Richard 培养液适宜水稻纹枯病菌和立枯丝核菌产毒<sup>[16]</sup>。环境因素方面,pH 7~8



时禾谷镰刀菌产生的毒素量最多<sup>[15]</sup>。棉花黄萎病菌毒素培养 8 d 的产毒量仅为培养 14 d 的 1/3<sup>[17]</sup>。链格孢菌产毒的最佳条件为温度 25℃, pH 值为 4~13, 培养时间为 5~7 d、黑暗及静置等培养条件<sup>[18]</sup>。Czapek-Dox 液体培养基、培养温度 24℃、培养基 pH 6.0~7.0、连续黑暗振荡培养培养 20 d 时大蒜叶枯病菌产生粗毒素的毒性最强<sup>[19]</sup>。而适宜晚疫病粗毒素培养条件为, 温度 20~22℃, pH 6~7, 黑暗条件振荡培养<sup>[20]</sup>。可见适宜的培养条件对毒素高产有很大作用。该研究从田间发病的典型病株分离出白菜炭疽病菌, 回接鉴定表明病菌具有正常的致病性, 因此白菜炭疽病菌可产生有致病力的粗毒素, 接着从不同条件下培养白菜炭疽病菌, 通过用不同条件下制配的粗毒素测定白菜种子的发芽抑制率, 最终得出最适合粗毒素培养的条件。

### 参考文献

- [1] 刘爱媛. 大白菜炭疽病菌生物学特性的研究[J]. 湖南省农学院学报, 1992 (S1): 171-176.
- [2] 刘富春, 刘爱媛, 何玉英. 大白菜炭疽病的发生条件与防治[J]. 植物保护, 1990, 16(4): 30.
- [3] 刘爱媛. 白菜炭疽病菌期抗病性鉴定方法的研究[J]. 中国蔬菜, 1997 (1): 4-7.
- [4] 刘爱媛. 大白菜炭疽病的预测及防治[J]. 湖南农业科学, 1992, 18 (4): 6-8.
- [5] 赵蕾, 梁存元, 张天宇. 利用致病毒素筛选植物抗病突变体的研究进展[J]. 生物技术, 2001, 11(3): 41-43.
- [6] 杨勇, 张凤英, 陈岑. PDA 培养基改良配方的研究[J]. 酿酒科技, 2012(4): 12-13.
- [7] 张涛, 康业斌, 任文丽. 牡丹红点病菌粗毒素的提取及致病性测定[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 160-161.
- [8] 李艳梅, 李小六, 陈超, 等. 大花蕙兰根腐病原菌的分离与鉴定[J]. 河南农业大学学报, 2007(4): 11.
- [9] 易茜茜, 张争, 丁万隆, 等. 荆芥茎枯病原菌的分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(5): 530-533.
- [10] 孙俊, 刘志恒, 杨红, 等. 辣椒褐斑病菌粗毒素的提取方法研究[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(3): 584-586.
- [11] 张妍, 冯景刚, 于雷, 等. 不同培养基配方对金针菇菌丝体生长的影响[J]. 防护林科技, 2008(5): 6-9.
- [12] 张林青, 程智慧. 大蒜白腐病原菌产毒素培养条件的优化[J]. 园艺学报, 2008, 35(6): 841-846.
- [13] 陆仕华. 水稻尾孢霉毒素[J]. 真菌学报, 1985(4): 240-254.
- [14] Zhang H F, Leonard J F, James G J, et al. Structural and physical properties of a Necrosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*[J]. Phytopathol, 1997, 87: 154-160.
- [15] Miller J D. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*[J]. Can J Microbiol, 1983, 29: 1171-1178.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 万佐玺, 强胜, 徐尚成, 等. 链格孢菌的产毒培养条件及其毒素的致病范围[J]. 中国生物防, 2001, 17(1): 10-15.
- [19] 张志强, 程智慧, 沈永杰. 大蒜叶枯病菌毒素产生条件的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(2): 186-190.
- [20] 邢宇俊, 程智慧. 培养条件对马铃薯晚疫病粗毒素产生的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(3): 89-92.

## Cabbage Anthracnose Pathogen Crude Toxin Optimized Culture Conditions

ZHANG Lin-qing, GU Jie-fen

(Huaiyin Institute of Technology, Huaian, Jiangsu 233003)

**Abstract:** The relation between crude toxin production and the optimum culture conditions was examined by testing the toxicity of crude toxin with Chinese cabbage germination inhibition. The results showed that the optimum conditions for toxin production were fries liquid medium at pH 6 and at 28℃, with successive dark periods and shaking during culturing. Production of crude toxin reached the highest level on the 10th day of culturing.

**Keywords:** cabbage anthrax bacteria; crude toxins; pathogenic; germination inhibition