

大豆灰斑病菌 (*Cercospora sojina* Hara) 毒素的初步研究^{*}

刘亚光¹ 王继才² 杨庆凯¹

(1 东北农业大学大豆所 哈尔滨 150030 2 齐齐哈尔市种子管理局 161005)

摘 要

本试验主要从液体培养基的种类、培养温度、培养方式、培养天数、接种量和培养基的 pH 值及碳源等几个方面入手研究了大豆灰斑病菌最佳的产毒条件。利用大豆胚根伸长抑制率和单复叶萎蔫指数来测定毒素的产量。实验结果得出该菌的最佳产毒条件是利用 Czapek 培养基,以蔗糖作为碳源,糖含量为 3%,将培养基的 pH 调到 6-7,接种三块直径为 6mm 的新鲜菌丝块,于 25-28℃ 下静止培养 25-27 天。

关键词 大豆灰斑病菌;毒素;产毒条件

大豆灰斑病作为一种世界性重要真菌病,受到国内外植物病理学家与遗传育种界的普遍关注并开展了大量的研究,尤其在大豆灰斑病菌的生物学特性、生理分化、侵染循环流行规律^[1-4]、抗性遗传^[5-6]、组织病理学和病理生理学以及形态结构的抗病性和生理生化抗病性机制^[3,7]等方面取得很多有意义的结果。而有关大豆灰斑病菌毒素的研究国内外报道极少^[13]。

十九世纪末期,当植物病理学的发展还处于萌芽阶段时,人们就开始注意到植物病原菌的另一个致病因子—毒素。但国外有关大豆灰斑病菌毒素培养的报道极少,且不详。我们研究所曾利用过固体培养基提取毒素^[12],但由于固体培养基的成分、pH 值、菌丝生长量等难以控制和测定,而且增加了毒素提纯的过程和难度,从而影响毒素的收得率。为了建立一个实用的液体培养产毒方法,以取得更多毒素样品供科研之用,本试验对大豆灰斑病菌在液体培养条件下产毒性进行了研究,旨在为进一步深入研究该毒素理化特性、致病组分、毒素在致病过程中所起的作用和利用毒素进行抗源筛选以及进一步揭示大豆灰斑病菌的致病机理等打下基础。

材料与amp;方法

1 供试材料

^{*} 收稿日期 1999-04-19 Received on April 19, 1999

大豆品种东农 91- 135和东农 1330

2 供试菌种

大豆灰斑病菌 1号、4号和 7号等生理小种

3 供试培养基种类和培养方法

Fries Richard Czapek 改进的 Czapek^[2]、PS(马铃薯蔗糖培养基)和 PD(马铃薯葡萄糖培养基)等六种液体培养基 用打孔器在 PDA 平板上打成 $\varphi=6\text{mm}$ 的菌丝块,在无菌条件下接种到盛有 100ml 培养基的 250ml 的三角瓶中,分别置于不同条件下培养 将培养液在无菌条件下用四层灭菌纱布过滤,再将滤液经 3000rpm 离心 20min,取上清液 110℃ 灭菌 10min,得无菌培养滤液供测试作。菌丝体在 60℃ 下烘干 24小时,称量干重

4 毒素的生物活性测定

4.1 大豆种子胚根伸长法: 用无菌培养滤液处理催芽 (经 1‰ 次氯酸钠浸泡 20min, 用无菌水冲净后加水于 25℃ 下浸泡 8hr, 然后于 25℃ 下催芽 16hr, 置芽长 2- 3mm 为佳) 后大豆种子, 置于 25℃ 的培养箱中培养 48hr 后测量种子根长度 (同时设清水对照)。

$$\text{根长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照根长} - \text{处理根长}}{\text{对照根长}} \times 100$$

4.2 大豆单复叶萎蔫法: 取生育期、叶位相同的三出复叶, 插入无菌培养滤液中, 定期观察其萎蔫级别并计算萎蔫指数 每个处理设三次重复, 每次重复三片复叶。同时设无菌水和空白培养基为对照

单复叶萎蔫程度分级标准:

0 正常

1 叶柄弯曲或叶片变软

2 叶缘轻微卷曲或叶片变软

3 叶缘卷曲或叶脉间轻微皱缩

4 整个叶片卷曲、皱缩

5 小于 1/2 叶面积干枯

6 等于或大于 1/2 叶面积干枯

$$\text{萎蔫指数}(\%) = \frac{\sum \text{萎蔫株数} \times \text{该级所代表数值}}{\text{总株数} \times \text{最高级别}} \times 100$$

结果与分析

1 培养基的筛选

将大豆灰斑病菌 1号生理小种的新鲜菌丝块分别接种于 Fries Czapek Richard 改进的 Czapek Ps 和 PD 等六种培养基中, 分别测得 17, 23 和 30 天的培养滤液对胚根生长的抑制结果见图 1, 结果表明: 无论培养时间的长短, 均为 Czapek 的培养滤液对胚根的抑制率最高而 PD 的最低。当培养时间为 23 天时 Czapek 的培养滤液对胚根的抑制率是 75.9, 而 PD 的抑制率只有 45%。因此本试验选择用 Czapek 培养基培养毒素

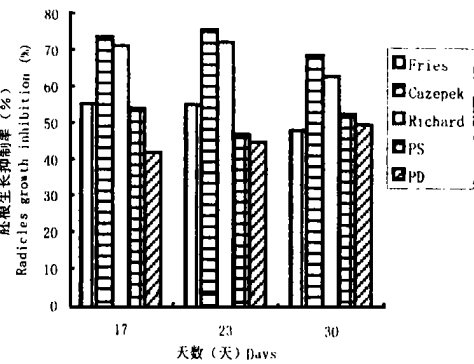


图 1 不同培养基滤液对大豆胚根影响

Fig. 1 Effect of culture filtrates from various media on soybean radicles growth

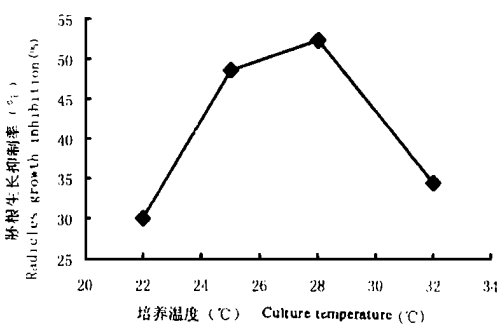


图 2 不同温度培养滤液对大豆胚根影响

Fig. 2 Effect of culture filtrates on soybean radicles growth under various temperature

2 产毒条件

2.1 培养温度

将 4 号生理小种菌丝块接入 pH5 的 Czepeck 培养基中,分别在 22℃、25℃、28℃和 32℃下静止培养 17 天,培养滤液对大豆胚根生长抑制率的影响如图 2 所示:当培养温度低于 25℃和高于 28℃时,菌丝生长量和毒素产量均明显低于其它两个温度,当温度在 25℃- 28℃之间时,菌丝干重及胚根抑制率均明显高于前者。从图中还可得出随着菌丝生长量的增加,毒素的产量也随之增多。

2.2 培养方式

将 1 号生理小种的 Czepeck 培养基,于 28℃下培养 17 天,其培养滤液对大豆胚根生长抑制率和菌丝生长量的影响如图 3 所示:在全天振荡条件下,菌丝生长量最高,为 138. 2mg/瓶,但其胚根抑制率最低为 56. 7%。而静止条件下菌丝生长量比全天振荡低,为 54. 2mg/瓶,但对胚根抑制却高,为 62. 1%。间隔振荡(早晚各振一次,每次 30 分钟)的两项指标均居中。因此可以说静止条件更适合毒素的培养

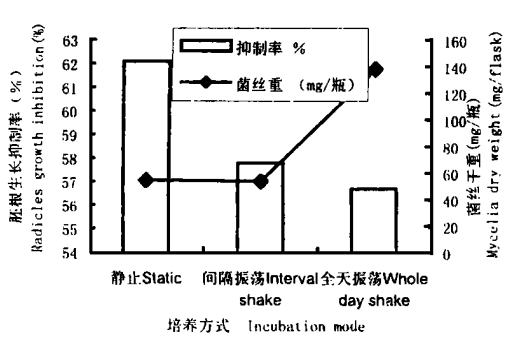


图 3 不同培养方式对滤液毒性及对大豆灰斑病菌株生长影响

Fig. 3 Effect of incubation mode on toxicity of culture filtrates and growth of *Cercospora soijina* Hara isolates

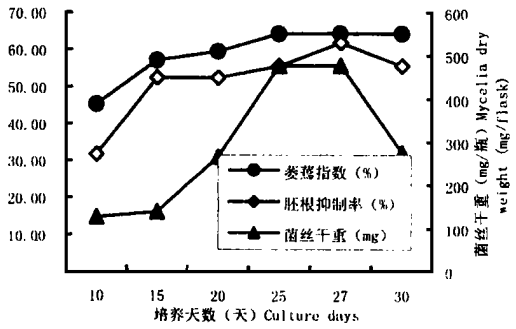


图 4 培养时间对培养滤液毒性及菌株生长的影响

Fig. 4 Effect of incubation time on toxicity of culture filtrates and growth of *Cercospora soijina* Hara isolates

2.3 培养时间

将接 1号生理小种的培养基于 28℃ 静止条件下培养 10 15 20 25 27和 30天 ,各培养滤液对大豆胚根抑制率 萎蔫指数和菌丝生长量的影响如图 4所示: 菌丝生长量随着培养时间的延长而增加 ,到 25- 27天时达到最大值 ,且胚根生长抑制率和萎蔫指数随时间的变化与菌丝生长量的变化趋势相一致 ,当培养至 25- 27天时两个生测指标均达到最高点 ,随后呈下降趋势 因此得出产毒的最佳时间为 25- 27天。

2.4 接种量

分别取一块、三块和五块 1号生理小种的菌丝块接入 Czapek 培养基中 ,于 28℃ 静止条件下培养 27天 ,培养滤液对大豆叶片的萎蔫指数和菌丝干重的试验结果如图 5所示: 随着接种量的增加菌丝生长量和萎蔫指数也随之增加 ,接种量为三块和五块时的毒素产量明显高于一块 ,但接种量增加到五块时 ,接种时被污染的可能性也随之增加。所以接种量以三块为宜。

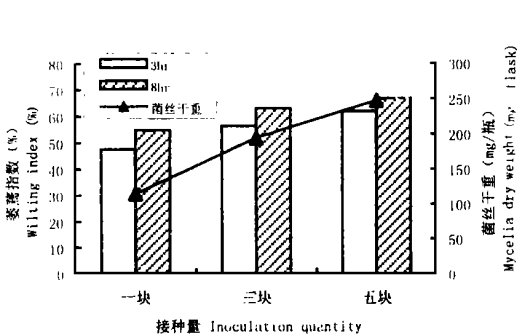


图 5 接种量对培养滤液的毒性及菌株生长的影响

Fig. 5 Effect of inoculation quantity on toxicity of culture filtrates and growth of *Cercospora soja* Hara isolates

2.5 pH值

将 Czapek 培养基的 pH分别调至 5 6 7和 8,接种 7号生理小种于 25- 28℃ 静止条件下培养 27天 ,从表 1和图 6的菌丝生长量和萎蔫指数的结果可以看出培养基的 pH对大豆灰斑病菌菌丝生长量和产毒量的影响均很大 pH为 6和 7的培养滤液 ,处理 8. 5hr 后其萎蔫指数达到 100% ,而 pH为 5和 8的培养滤液则分别在处理 10. 5hr和 13hr后其萎蔫指数才达到 100%。因此当培养基的 pH在 6- 7之间时 ,菌丝生长量及毒素产量均明显高于 pH5和 pH8的培养基 ,而且 pH值对其它不同生理小种产毒量的影响均与 7号相似 (图 7)。

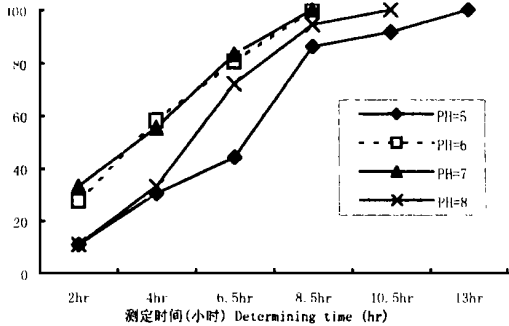


图 6 pH培养滤液毒性的影响

Fig. 6 Effect of pH on toxicity of culture filtrates

表 1 不同 pH培养基中菌丝的生长量

Table 1 The growth of isolate in various pH media

pH值	菌丝干重 mg/瓶	pH值	菌丝干重 mg/瓶	pH值	菌丝干重 mg/瓶	pH值	菌丝干重 mg/瓶
pH= 5	391. 0	pH= 6	733. 1	pH= 7	661. 1	pH= 8	253. 9

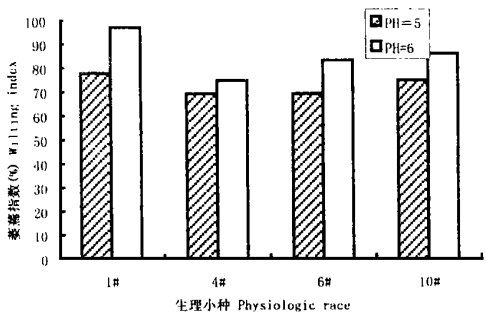


图 7 pH值对不同生理小种培养滤液毒性的影响

Fig. 7 Effect of pH on the tixicity of culture filtrates of different physiologic races

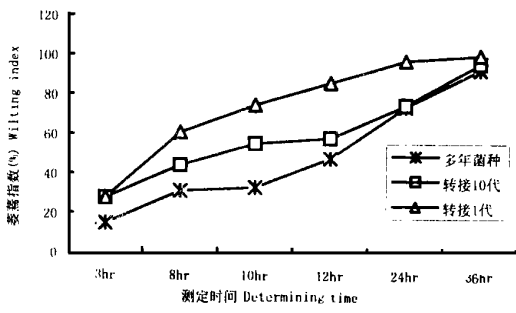


图 8 不同转接代数菌株对培养滤液毒性的影响

Fig. 8 Effect of culture generation of isolates on toxicity of culture filtrates

2.6 转接代数

大豆灰斑病菌在 PSA斜面上保存代数对毒素的产量有一定的影响 结果如图 8所示: 随着转接代数的增加,毒素的产量有所下降. 但转接 10代与保存多年的菌种产毒量相差不显著, 即使菌种在斜面上保存多年 (8年以上), 仍具有一定的产毒.

试验中还测定了蔗糖浓度对产毒的影响, 结果是 3% 的蔗糖浓度较为适宜, 当浓度小于 3% 时, 产毒量明显减少, 高于 6% 时对产毒时影响并不显著且形成高渗溶液, 不利于生物测定. 此外在试验中还发现, 光照对培养滤液的产毒的影响与黑暗条件下的相比较没有明显差别

结 论

- 1 经试验筛选出适合培养大豆灰斑病菌的液体培养基为 Czapek 培养基
- 2 Czapek 培养基产毒的最适 pH 范围在 6- 7 之间, 蔗糖浓度为 3% 为宜.
- 3 最佳产毒条件为: 接入 3 块 $\varphi = 6\text{mm}$ 的新鲜菌丝块, 置于 25- 28℃ 下静止培养 25 - 27 天.
- 4 菌种的转接代数对产毒量有一定的影响, 最好是使用新转接的菌种或转接代数少的菌种, 但即使大豆灰斑病菌在 PSA斜面上保存 8 年以上仍具有较高的产毒能力.

参 考 文 献

[1] 黄桂潮, 霍虹, 1984, 大豆灰斑病菌 (*Cerospora sojina* Hara) 生理小种鉴定初报, 大豆科学, 3(3): 231- 234
[2] 刘学敏, 1996, 博士论文, 大豆灰斑病菌遗传标记的建立, 沈阳农业大学
[3] 李海英, 1996, 博士论文, 大豆灰斑病菌抗性机制的初步研究, 东北农业大学
[4] 赵骞, 1994, 硕士论文, 大豆灰斑病菌生理小种分化与大豆品种抗性关系的研究, 东北农业大学
[5] 刘忠堂, 1983, 大豆灰斑病 (*Cerospora sojina* Hara) 抗病性的遗传分析, 大豆科学, 2(4): 315- 322

- [6] 杨庆凯等, 1988, 大豆灰斑病菌生理小种抗性鉴定研究, 中国农业科学, 5: 27– 29
- [7] 刘丽君等, 1996, 灰斑病 (*Cercospora sojina* Hara)对大豆保护酶体系的影响, 大豆科学, 15(1): 17– 23
- [8] 陈捷等, 1993, 玉米茎腐病菌毒素的初步研究 (I), 沈阳农业大学学报, 24(2): 110– 113
- [9] 吕金殿等, 1997, 棉花枯萎萎蔫病菌毒素的研究现状, 植物病原菌毒素研究进展
- [10] 董金皋等, 1997, 寄主选择性植物病原真菌的毒素化学, 微生物学通报, 24(4): 247– 250
- [11] 章元寿, 1997, 关于植物病原真菌毒素研究中几个问题的商榷, 植物病原菌毒素研究进展
- [12] 陈少江等, 1998, 大豆灰斑病菌毒素生物活性分析, 植物病理学报, 28(3): 233– 236
- [13] Ramak Velicheti and J. B. Sinclair (1992), Reaction of seedborne soybean fungal pathogens to Cercosporin. Seed Sci. & Technol 20: 149– 154

PRELIMINARY STUDIES ON THE TOXIN FROM *CERCOSPORA SOJINA* HARA

Liu Yaguang Wang Jicai Yang Qingkai

(Institute of Soybean, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract

The conditions of producing toxin from *Cercospora sojina* Hara were systematically studies on following aspects: kind of liquid culture medium, culture temperature, culture time, incubation mode, inoculation quantity and pH value of culture medium. The inhibition of soybean radicle growth and wilting index of single compound leaf of soybean were used to test the injury results of foxicity. The experimental results showed that the optimum conditions of producing toxin from *Cercospora sojina* Hara were Czapek's liquid medium, the pH value 6 to 7, three pieces ($\varphi = 6\text{mm}$) mycelia, 25– 28°C, static incubation, 25– 27 days under dark and 3% sucrose as C source respectively.

Key words *Cercospora sojina* Hara; Toxin; Conditions of producing toxin