

# 玉米弯孢菌毒素培养条件的研究

唐树戈, 庄敬华, 高增贵, 吴海云, 陈捷\* (1. 沈阳农业大学, 辽宁沈阳 110161; 2. 上海交通大学, 上海 201101)

**摘要** 研究了玉米弯孢菌产毒能力与培养条件、环境因子等因素的关系。结果表明: 不同菌株的产毒能力存在明显差异, 以 CL1、CL2、CL7、CL13 菌株培养液对叶片的破坏能力最强; 该病原菌在 Fries 培养基中有较强的产毒能力; 培养基中以蔗糖为碳源、以 KNO<sub>3</sub> 为氮源较适合毒素的产生; 在 25 ℃ 条件下培养 20~25 d 产毒能力较强; 光照对毒素的产生没有明显的影响; 其中培养方式对毒素的产生有较大的影响, 振荡培养有利于毒素的产生。

**关键词** 玉米弯孢菌; 毒素; 培养条件

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)01-0001-03

## Factors Affecting Toxin Production of *Curvularia lunata*

TANG Shu-guo et al. (Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** The factors affecting the toxin production of *Curvularia lunata* were researched in this paper. The results showed that the various strains were different in toxin production. CL1, CL2, CL7, CL13 strains were strong in the toxin production. Fries was the proper medium. The optimum condition of the toxin production was 25 ℃, pH8 light 12 hours one day and shaking culture.

**Key words** *Curvularia lunata*; Toxin; Fermentation condition

植物病原菌的致病因子主要有酶、毒素和激素三大类, 其中以毒素研究最多。毒素被认为是与病程密切相关的一类致病因子。玉米弯孢菌叶斑病是一种世界性的玉米病害, 常造成巨大的经济损失。毒素是玉米弯孢菌叶斑病的主要致病因子之一, 所以研究其致病机理对于防治该病害有着重要的意义。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 供试玉米弯孢菌叶斑病菌(*Curvularia lunata*) 从辽宁省瓦房店地区严重感病的玉米叶片上经单孢分离得到。供试玉米为自交系黄早四, 由沈阳农业大学植物免疫室提供。

**1.2 方法** 将经单孢分离的玉米弯孢菌东单60 接种于PD 固体培养基上, 培养5 d 后接于无菌水中, 配制成浓度为  $1 \times 10^7$  ml 孢子悬浮液。将此孢子悬浮液1 000 μl 接入液体培养基中, 25 ℃ 振荡培养20 d。将毒素培养液用4 层纱布滤去菌丝, 所得滤液为毒素原液, 最后进行生物测定。

生物测定可采用电解质外渗法和抑制种子根伸长法。

$$\text{细胞膜损伤度}(\%) = \left(1 - \frac{1 - T_1/T_2}{1 - C_1/C_2}\right) \times 100$$

式中, C<sub>1</sub> 为对照叶片杀死前外渗电导率; C<sub>2</sub> 为对照叶片杀死后外渗电导率; T<sub>1</sub> 为毒素处理杀死前外渗电导率; T<sub>2</sub> 为毒素处理杀死后外渗电导率。

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

## 2 结果与分析

### 2.1 生长条件对毒素产生的影响

**2.1.1 不同来源玉米弯孢菌毒素的毒力差异。** 表1 表明, 15 个供试菌株接种在自交系黄早四的叶片上, 毒素对叶片的破坏作用有明显差异。菌株 CL1、CL2、CL7、CL13 产生的毒素破坏力较强, 采用针刺法接种发酵液于叶片上, 3 d 后可见褪绿斑, 并且随着时间的延长褪绿斑逐渐变大; 菌株 CL5、CL15 产生的毒素破坏力较弱, 发酵液接种于叶片上3 d 后未出现褪绿斑, 接种5 d 后才在叶片上出现较明显的症状。

表1 玉米叶片对不同菌株毒力的反应

菌株	菌株接种时间 d				
	1	2	3	4	5
CL1	-	-	+++	+++++	+++++
CL2	-	-	+++	+++++	+++++
CL3	-	-	-	+++	+++++
CL4	-	-	-	+++	+++++
CL5	-	-	-	-	+++
CL6	-	-	-	+++	+++++
CL7	-	-	+++	+++++	+++++
CL8	-	-	-	+++	+++++
CL9	-	-	-	+++	+++++
CL10	-	-	-	+++	+++++
CL11	-	-	-	+++	+++++
CL12	-	-	-	+++	+++++
CL13	-	-	+++	+++++	+++++
CL14	-	-	-	+++	+++++
CL15	-	-	-	-	+++

注: + 表示轻度褪绿; ++ 表示中度褪绿; +++ 表示重度褪绿。

**2.1.2 培养基对毒素产生的影响。** 图1、2 表明, 在4 种培养基中玉米弯孢菌均能生长, 产毒情况有明显差异。在 Fries 培养基中毒素产量最大, 在 PD 培养基中该菌的产毒能力最差。培养初期在培养液中长出白色的菌丝球, 随着时间的延长, 菌丝球逐渐由白色变为黑色, 同时培养液的颜色也逐渐加深。在 PD 培养液中菌丝量较少, 菌丝球较小, 培养液的颜色较浅; 在 Fries 培养液中, 培养初期菌丝量较大, 最后培养液的颜色也较深。用不同培养液处理叶圆片时, 表现的症状也有所不同。用 Fries 培养液处理的叶片, 在叶圆片的边缘出现深褐色, 而其他培养液处理的叶片未出现上述现象。由此可见, Fries 培养基适宜玉米弯孢菌的生长, 有利于毒素的产生。

**2.1.3 碳源对毒素产生的影响。** 图3、4 表明, 在 Fries 培养基中加入蔗糖和葡萄糖有利于毒素的产生, 淀粉不利于毒素的产生。所以, 在提取毒素时以蔗糖作为碳源。

**2.1.4 氮源对毒素产生的影响。** 图5、6 表明, 当尿素作为氮源时, 培养液对根的抑制率比较低, 其他氮源对毒素的产生不存在差异。利用2 种生物测定方法得到的结论不一致, 可能是由试验材料不同而造成的。综合考虑各方面因素, 选择 KNO<sub>3</sub> 作为培养基的氮源。

基金项目 辽宁省教育厅资助项目(05L406)。  
作者简介 唐树戈(1971 - ), 女, 辽宁盖州人, 在读博士, 副教授, 从事植物病理学研究。\* 通讯作者。  
收稿日期 2006-09-22

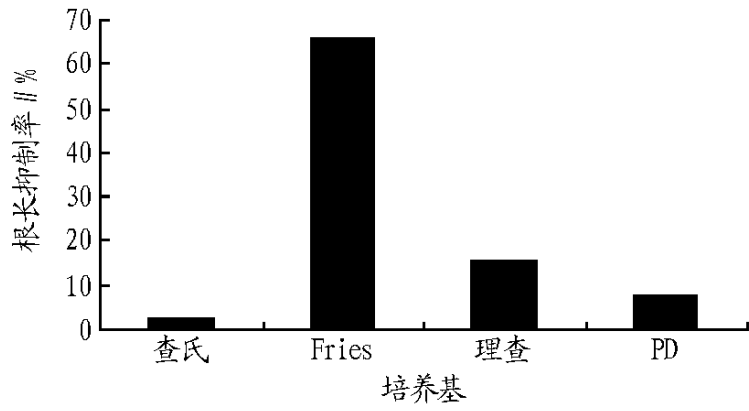


图1 培养基对根长抑制率的影响

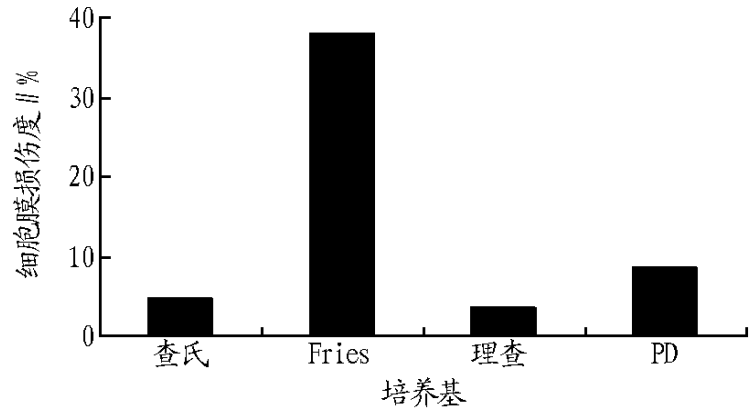


图2 培养基对细胞膜损伤度的影响

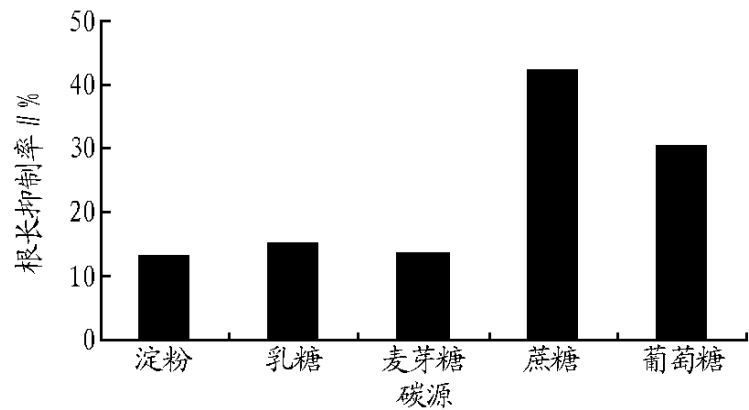


图3 碳源对根长抑制率的影响

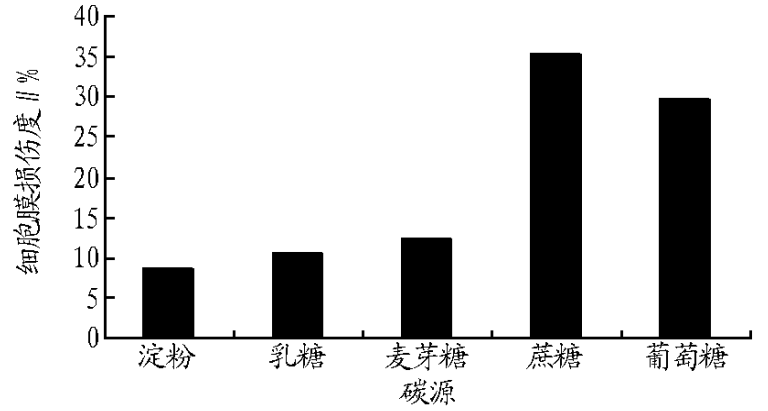


图4 碳源对细胞膜损伤度的影响

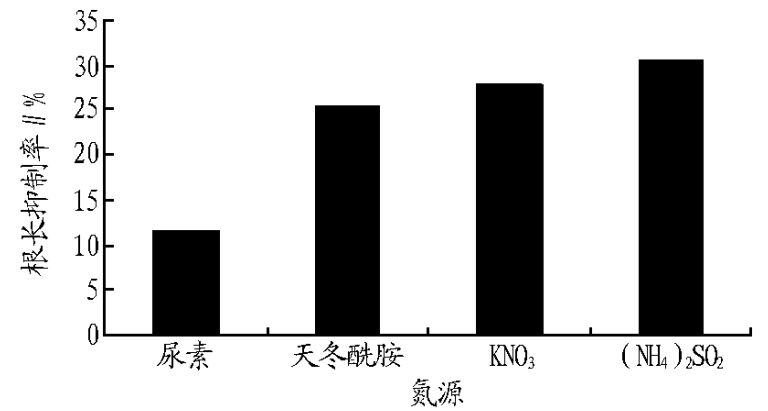


图5 氮源对根长抑制率的影响

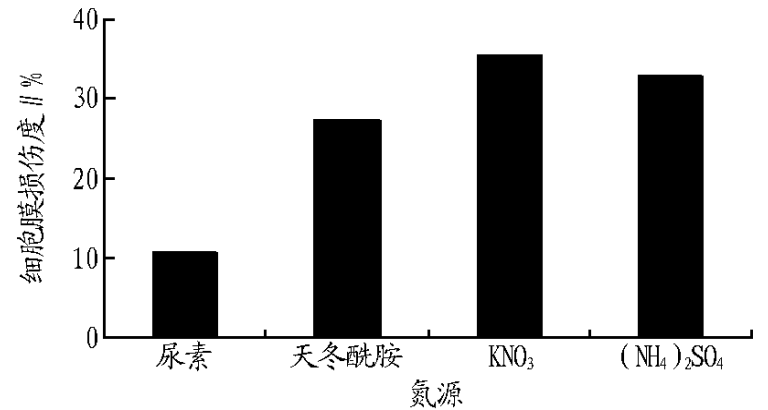


图6 氮源对细胞膜损伤度的影响

**2.1.5 培养液pH对毒素产生的影响。**图7、8表明,培养液酸度对毒素产生有一定的影响。在酸性较强时,因不利于菌丝生长而使得产毒能力明显下降;在中性偏碱的培养液中,毒素原液对叶片破坏作用最大,叶圆片的边缘明显褪

绿,其外渗电解质电导率值达1 500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。这都可能是由于在碱性溶液中毒素的溶解度较大,并且在该条件下毒素能较好地发挥其作用。因此,培养液的酸度应略偏碱性。

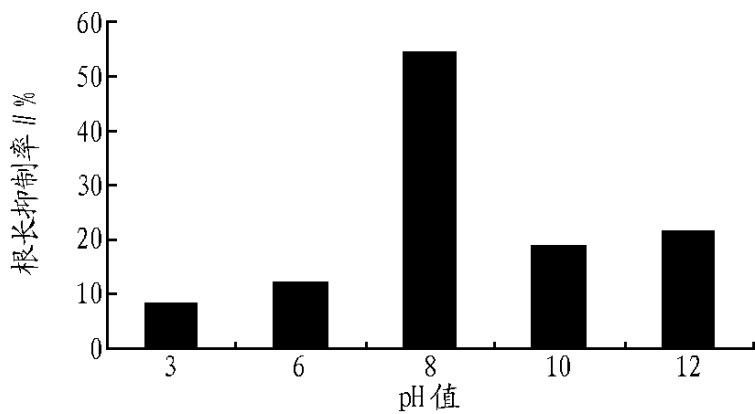


图7 酸度对根长抑制率的影响

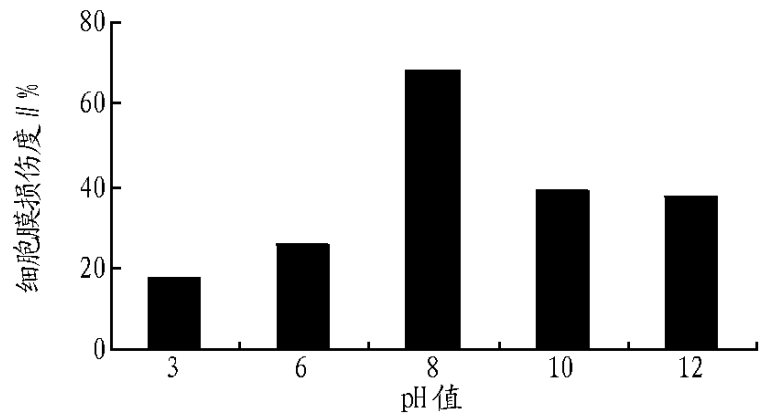


图8 酸度对细胞膜损伤度的影响

## 2.2 环境因素对毒素产生的影响

**2.2.1 培养温度对毒素产生的影响。**图9、10表明,在15~40温度范围内,玉米弯孢菌均可生长,但生长速度却有着明显差异,其产毒能力也存在差异。25时产毒能力最强,15时产毒最弱。病菌的产毒能力与菌丝生长呈正相关。在该菌生长较快时,其产生毒素的能力也较强。

**2.2.2 培养时间对毒素产生的影响。**图11、12表明,振荡培养20和25 d后,培养液对叶片的破坏作用最明显,对胚根的抑制作用最大。在短时间内毒素的产量很低,说明毒素是该菌的次生代谢物;培养时间过长,毒素产量未有明显变化。这可能是由于培养液中的养分基本消耗完,弯孢菌

的生活代谢能力下降。

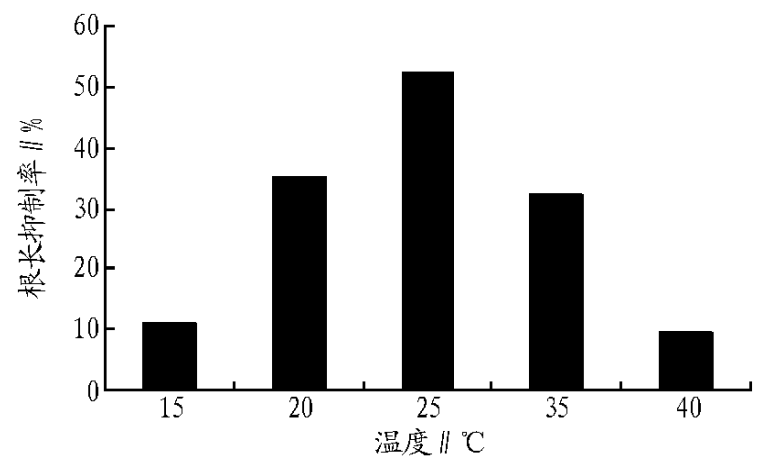


图9 温度对根长抑制率的影响

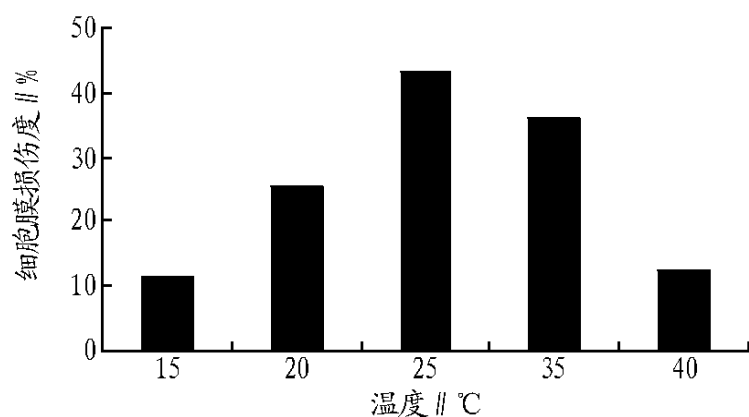


图10 温度对细胞膜损伤度的影响

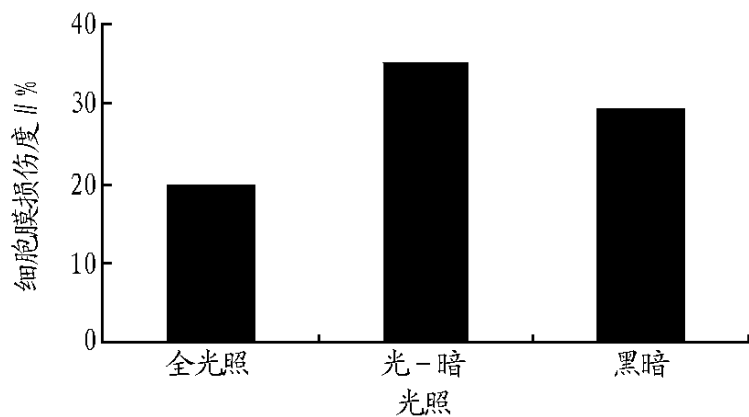


图14 光照对细胞膜损伤度的影响

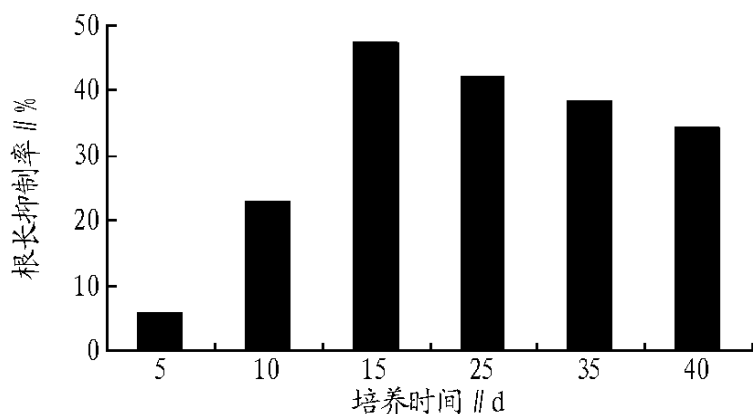


图11 培养时间对根长抑制率的影响

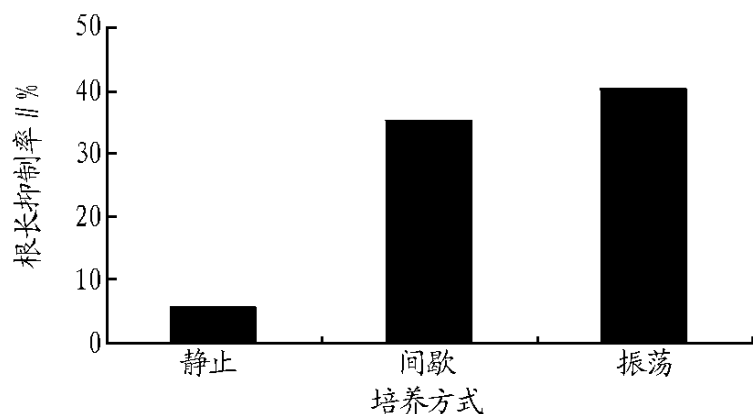


图15 培养方式对根长抑制率的影响

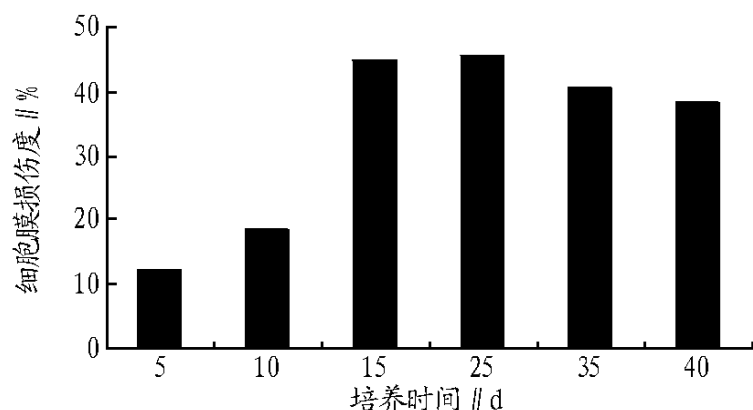


图12 培养时间对细胞膜损伤度的影响

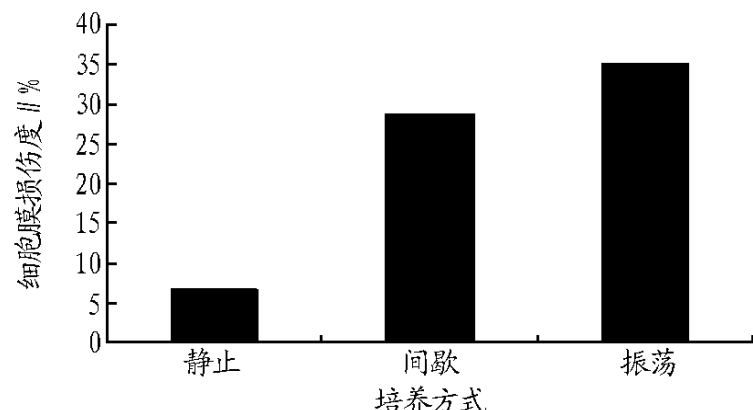


图16 培养方式对细胞膜损伤度的影响

图13 光照对根长抑制率的影响

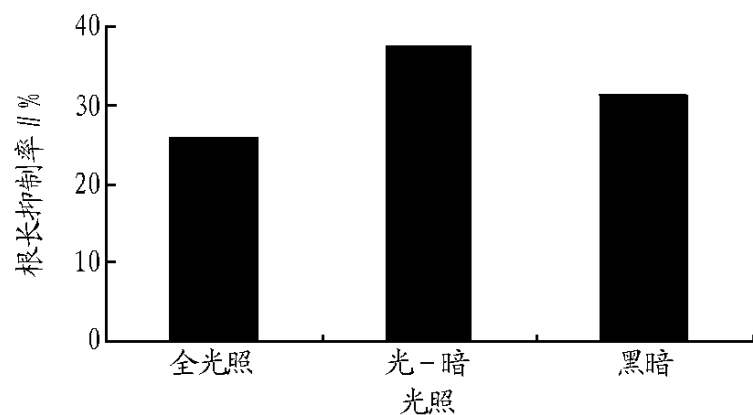


图13 光照对根长抑制率的影响

**2.2.3 不同光照对毒素产生的影响。**图13、14表明,光照对毒素的产生有较大的影响。在光—暗交替条件下产生毒素的能力最强,在全光照条件下培养液对根长的抑制率最低,在全黑暗条件下毒素的产生低于光—暗交替条件。这说明适当时间的黑暗有利于毒素的产生。由于光—暗交替有利于分生孢子的形成,所以该情况可能与分生孢子的形成有关。

**2.2.4 培养方式对毒素产生的影响。**图15、16表明,静止、间歇振荡、连续振荡培养方式对毒素产生有较大影响。静止培养的发酵液对根的抑制作用最小,叶片电解质外渗液电导率也最小;连续振荡培养的发酵液产生毒素的致病作用最强。这种差异可能是由于在连续振荡的过程中发酵液

中供氧量充足;而静止培养供氧量相对比较少,接种的孢子因集中在三角瓶的底部而不利于菌丝的生长。

### 3 讨论

研究表明,较高温度(25 )有利于玉米弯孢菌毒素的产生,高温和低温都不利于毒素的产生;偏碱的环境有利于毒素的产生;光照振荡培养有利于毒素的产生;该菌产毒条件与菌丝生长对碳源、氮源要求较为一致,一般为单糖和寡糖。另外,研究发现,真菌产生毒素还受到微量元素(Zn、Mo、Mn等)、化学农药、植物提取物等因素的影响。

#### 参考文献

- [1] 樊慕贞. 白菜黑斑病菌(*Aternaria brassicae*)菌丝生长和毒素产生条件的研究[J]. 河北农业大学学报,1995,18(4):21-26.
- [2] 李永波. *Heurctus Otreatus* 液体发酵生物学特性与产毒条件的探索[J]. 黔南民族师范学院学报,2003,6:25-28.
- [3] 祁高富. 植物病原菌毒素研究进展[J]. 南京林业大学学报,2000,24(2):66-70.
- [4] 陈绍江. 大豆紫斑病菌毒素的研究[J]. 植物病理学报,1996,26(1):45-48.
- [5] 叶建仁. 松针褐斑病菌的产毒培养和毒素粗提方法[J]. 南京林业大学学报,2001,25(5):6-10.
- [6] 董金皋. 玉米大斑菌 *H. nithos poriumturcicum* 致病毒素产生的条件及其特性[J]. 河北农业大学学报,1992,16(2):13-17.
- [7] 董金皋. 真菌毒素生物测定方法的研究[J]. 河北农业大学学报,1993,16(3):94-98.