

人参黑斑病菌毒素的提取及产毒条件研究*

赵保彦¹, 戴玄^{2**}, 王殿东², 潘丽梅^{1**}

1. 北华大学林学院, 吉林 132013; 2. 长江师范学院生命科学与技术学院, 重庆 408100

摘要: 初步提取人参黑斑病菌粗毒素, 并将粗毒素接种于健康叶片, 确定了该毒素是人参黑斑病的致病物质。通过设置不同培养条件, 得到人参黑斑病液体菌种产毒的最佳培养条件为 pH 为 4.5, 12 h / 12 h (光/暗), 静置培养 11~13 d。

关键词: 人参; 黑斑病; 毒素

中图分类号: S432.42; Q949.763.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20110714.1017.003

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20110714.1017.003.html>

Extracting of Phytotoxin of Ginseng Black Spot Pathogen(*Alternaria panax*) and Studies on the Conditions of Generating the Phytotoxin

ZHAO Bao-Yan¹ · DAI Xuan² · WANG Dian-Dong² · PAN Li-Mei¹

1. Forestry College of Beihua University, Jilin 132013, China; 2. College of Life Science and Technology, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China

Abstract: Phytotoxin Production of Ginseng Black Spot Pathogen was initially extracted and defined as morbid substance through the method of inoculating healthy leaves. Microorganism was cultured under different time, different culture medium pH, different conditions of illumination and shake. The results showed that the optimal culture time for producing toxin is 11d~13d, the optimal culture medium pH for producing toxin is 4.5, the optimal culture conditions of illumination and shake for produce toxin are 12 h light/ 12 h dark and stillness.

Key words: ginseng; black spot; phytotoxin

人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey) 为五加科人参属植物, 以根、茎、叶、果实入药, 具有大补元气、强心救脱、益心复脉、生津安神功能, 同时具有抗癌、抗衰老、抗氧化功效。人参黑斑病是发病历史悠久、分布广泛的病害, 也是人参生产中最流行和最严重的病害之一^[1]。自该病于 1906 年被美国学者首先发现并记述以来, 各国学者对其病原菌形态、生活史、发病症状、病菌的寄主范围、生理特性、生物学性状、侵染、传播、发病规律、致病性及化学防治等方面做了许多工作, 但对于其病原致病毒素的研究尚不深入^[2-6]。病原菌致病毒素的基本特性, 病原菌培养滤液的致病作用, 制备方法, 影响毒素作用的因素, 稳定性以及评定毒素测定的生物测定方法等方面的研究尚未见报道。人参黑斑病常年发病率达 30%~50%, 严重的高达 90%, 是当前参业生产中影响人参产量和质量的主要原因之一^[7-10]。由于生产中每年使用化学

农药防治病害的次数高达 12~20 次, 造成了严重的农药残留问题, 降低了产品的质量, 同时也严重污染环境并危害人身健康。

本研究通过对提取的人参黑斑病菌毒素进行纯化, 明确病原菌致病毒素的产生条件, 为该真菌病害的无公害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株为 2007 年 9 月在北华大学实验基地田间发病人参叶上分离并纯化的黑斑病菌, 供试植物为北华大学实验基地栽培的人参。

1.2 粗毒素的制备

将供试菌株接种到 PDA 培养基平板上, 培养至形成菌落, 从菌落边缘用打孔器取约 0.5cm² 的菌饼 3 块, 置于 PSK 液体培养基 (马铃薯 200g/L, 葡萄糖 20g/L,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771733)

作者简介: 赵保彦, 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。

收稿日期: 2010-12-18 网络出版时间: 2011-07-14 10:17

** 通讯作者

蒸馏水 1000 ml) 内, 静止培养 11d, 培养后的菌液经 4 层纱布和 2 层滤纸过滤, 得到的滤液用多管架自动平衡离心机离心, 上清液即为粗毒素滤液。

1.3 毒素活性的生物测定

在超净工作台上用 75%酒精将人参叶片表面消毒 3min, 再用无菌水冲洗 3 次, 然后将其放入装有已灭菌滤纸(无菌水浸润)的培养皿中。接种方法采用针刺法, 接种 15 μ L粗毒素, 3 次重复, 以无菌水为对照)。人参离体叶片培养一定时间后, 置于显微镜下, 测定病斑直径大小。病斑直径大则表明毒素活性高。

1.4 不同培养条件对产毒的影响

1.4.1 时间 把液体种放置于培养箱内[25 $^{\circ}$ C, 12h/12h (光/暗)+振荡], 于培养 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19d 取样, 每次 2 瓶, 制备粗毒素滤液。

1.4.2 pH 设置 配制 pH 3.5~9.0(间隔 0.5)的 pH 梯度的 PSK 培养基, 每个培养基中接 3 块菌饼, 置于 25 $^{\circ}$ C 下培养 11d, 制备粗毒素滤液。

1.4.3 培养方式设置 共设 5 种处理: 12h/12h (光/暗)+振荡, 12h/12h (光/暗)+静止, 连续光照+静止, 连续黑暗+振荡, 连续黑暗+静止。培养 11d 后制备粗毒素滤液。

2 结果与分析

2.1 人参黑斑病粗毒素致病性分析

对接种液体种毒素滤液的人参叶片进行观察, 可见叶片表面小孔周围开始出现深褐色水渍状圆形病斑, 并逐渐向叶盘的外缘扩展, 褐色逐渐加深, 最后形成黑色病斑, 致使叶片萎蔫, 枯死。而对照无此现象。说明人参黑斑病病原菌在液体培养基中可产生导致人参叶片病变坏死的致病毒素。

2.2 培养时间对产毒能力的影响

培养时间对液体种的产毒能力影响较大(表 1), 接种后第 1 d 可能是菌种在适应培养基, 所以病斑直径小幅下降, 随着时间的推移, 病斑直径开始迅速增长, 到 13d 时出现最大值 0.67mm, 随后开始迅速下降, 到 15d 时病斑直径下降开始平缓, 病斑直径的大小间接表明培养时间对产毒能力的影响。人参黑斑病病原菌在 PSK 培养基中培养的前 10d, 产毒量随培养时间的延长而增加, 到 11d 达到高峰, 11~13d 时产毒量最大, 然后开始下降, 到第 15d 后, 下降变得缓慢。培养 13d 与培养 11d 的差异不显著, 而与其他培养时间差异显著 ($P < 0.05$), 故可以得出最佳的培养时间为 11~13d。

表 1 不同培养天数对病斑直径的影响

Table 1. Effects of different cultrue days on spot diameter

培养时间/d Cultrue time	菌落直径/cm Colony diameter	P	
		0.05	0.01
13	0.67	a	A
11	0.64	a	ABCD
15	0.52	bcdefg	ABCD
17	0.5	cdefg	ABCD
5	0.5	defg	ABCD
19	0.49	efg	ABCD
9	0.47	fg	BCDE
7	0.45	gh	CDE
1	0.34	hi	DE
3	0.3	i	E

2.3 培养基 pH 对产毒能力的影响

培养基 pH 影响病原真菌的次生代谢, 从而影响毒素的产量。pH4.5 时病斑直径最大, 为 0.65cm, pH3.5、6.0、8.0 时, 其病斑直径依次为 0.55、0.58、

0.55cm, 在其他 pH 下, 病斑的直径较小(表 2)。说明培养基 pH 影响病原真菌的次生代谢, 从而影响毒素的产量。培养基 pH 值 4.5 时培养的液体种产毒能力最强。

表 2 不同 pH 值对病斑直径的影响

Table 2. Effects of different pH on spot diameter

pH	菌落直径/cm Colony diameter	pH	菌落直径/cm Colony diameter
4.5	0.65	7.5	0.40
6.0	0.58	4.0	0.30
3.5	0.55	7.0	0.30
8.0	0.55	8.5	0.30
6.5	0.45	5.5	0.25
5.0	0.40	9.0	0.20

2.4 光照及振荡条件对产毒能力的影响

从病斑直径大小来看产毒情况(表3), 12h/12h(光/暗)+静置、连续黑暗+静置2种培养方式的产毒能力较强, 其他培养方式产毒能力较差, 说明液体种的产毒能力对光照无需求, 且连续光照不利于产

毒; 静置培养比振荡培养更利于产毒。在12h/12h(光/暗)+静置条件下, 病斑直径显著高于12h L/12h D+振荡、连续黑暗+振荡和连续光照+静置3种培养方式, 但与连续黑暗+静止的培养方式差异不显著。

表3 光照及振荡条件对病斑的影响

Table3 Effects of different condition of light and shaking on spot diameter

处理 Treatment	菌落直径/cm Colony diameter	P	
		0.05	0.01
12h/12h (光/暗)+静置 12h Light, 12h dark and stewing	0.71	a	A
连续黑暗+静置 Dark and stewing	0.64	ab	A
12h/12h (光/暗)+振荡 12h Light, 12h dark and shaking	0.55	bc	A
连续黑暗+振荡 Dark and shaking	0.55	bc	A
连续光照+静置 Light and stewing	0.55	c	A

3 结论

人参黑斑病菌病原菌在PSK液体培养基中培养, 可以产生导致健康人参叶片病变的致病毒素。通过设置不同培养条件, 包括培养时间、培养基pH和光照及振荡条件, 得到有利于人参黑斑病液体种产毒的最佳培养条件是培养11~13d, pH 4.5, 12h L/12h D, 静置。本试验作为人参黑斑病菌病原菌致病毒素的提取、纯化及分子结构分析等研究的前期工作, 为进一步研究通过抑制合成毒素的方法来降低黑斑病菌的致病力, 利用人参黑斑病菌毒素筛选抗病突变体、建立人参抗黑斑病无性系等研究提供了基础资料, 这些成果对人参病害的无公害防治具有实际意义。

参考文献:

- [1] 孙连波. 人参黑斑病及其防治的新药剂[J]. 吉林农业, 2003, 5(7):24.
- [2] Chen C F, Chiou W F, Zhang J T. Comparison of the pharma

cological affects of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*[J]. Acta Pharmacol, 2008, 29:1103-1108.

- [3] Choi Y E, Kim Y S, Yi M J, et al. Physiological and chemical characteristics of field-and mountain-cultivated ginseng roots[J]. Journal of Plant Biology, 2007, 50:198-205.
- [4] 周慧, 郜瑞敏, 孙炳剑, 等. 小麦黑胚病菌链格孢产毒培养条件及其毒素的致病力测定[J]. 河南科学, 2008, 26(3):294-297.
- [5] 陆宁海, 齐尚红, 吴利民, 等. 番茄褐斑病菌产毒培养条件及其毒素的致病范围[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(4): 36-38.
- [6] 李荣金, 强胜. 百日草链格孢菌粗毒素的生产、提取及稳定性的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(8): 67-71.
- [7] 王江柱, 董金皋. 寄主选择性植物病原真菌毒素致病机制研究现状[J]. 河北农业大学学报, 1995, 18(3): 101-106.
- [8] Philippe Berto, Pascal Commenil, Lionel Belingheri, et al. Occurrence of alipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves[J]. Fems Microbiolog Letters, 1999, 180(2):183-189.
- [9] 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]. 中国生物防治, 2001, 17(1): 10-15.
- [10] 赵伟全, 刘大群, 杨文香, 等. 马铃薯疮痂病菌毒素及其致病性的研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 317-321.