

草茎点霉粗毒素的产生条件及活性测定

纪明山,刘 聃,谷祖敏,吴德财,王毅婧,刘 畅
(沈阳农业大学植物保护学院,沈阳 110866)

摘要:为了寻求能够充分发挥草茎点霉粗毒素活性的最佳培养条件,笔者利用有机溶剂萃取草茎点霉发酵液,获得粗毒素,采用针刺法、种子萌发法确定草茎点霉毒素合适的提取条件及对鸭跖草的致病性。结果表明:草茎点霉胞外毒素活性较高,3种有机溶剂中乙酸乙酯萃取效果最好,产毒的最佳条件为:培养温度32℃、培养时间14天、培养方式为150 r/min震荡培养。粗毒素浓度在1000 μg/mL时种子萌发抑制率为26.09%,病斑面积达到6.85 mm²。萃取毒素采用有机溶剂的种类以及培养温度、培养时间、培养方式对草茎点霉粗毒素的活性影响很大。

关键词:草茎点霉;毒素;产毒活性

中图分类号:S482.7

文献标志码:A

论文编号:2010-3290

Activity and Producing Conditions of *Phoma herbarum* Toxin

Ji Mingshan, Liu Dan, Gu Zumin, Wu Decai, Wang Yijing, Liu Chang
(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

Abstract: In order to determine the optimum culture conditions of *Phoma herbarum* for the toxin production, the author acquired the crude toxin of the *Phoma herbarum* by the way of organic solvent extraction, and the extraction condition was optimized by the seed germination and seedling stage stabbing inoculation. The results showed that this crude toxin showed high inhibitory activity, and the best extract organic solvent was ethylacetate. Besides the best conditions of toxin production of this strain were as follows: the fermentation temperature was 32℃, culture time was 14 d, agitation was 150 r/min. The seed germination rate was 26.09% and the lesion area of the leaf reached 6.85 mm² when the concentration of toxin was 1000 μg/mL. Obvious difference of herbicidal activity is shown with different extract organic solvent and culture condition which exerted a great influence on the activity of the crude toxin of *Phoma herbarum*.

Key words: *Phoma herbarum*; toxin; toxin-producing activity

0 引言

近年来,由于除草剂品种更换不利,缺乏能够防治鸭跖草的特效、选择性强的除草剂,致使鸭跖草成为东北地区大豆田和玉米田化学防除的一大难题^[1-2]。因此,寻求生物防治方法来控制鸭跖草已成为必然。真菌毒素是由病原真菌产生的除酶类和生长调节剂以外的物质,许多病原真菌毒素即使浓度很低也能使植物致病^[3]。许多真菌都可以在植物叶片上生长而引起植物的病害,因此从植物病原真菌中提取、分离对植物具有毒性的毒素,有可能找到更好的活性物质,为除草剂

的分子设计提供线索^[4]。

茎点霉属包括2000多个种,其中许多病原菌可以引起多种经济作物的病害^[5],国外报道草茎点霉对蒲公英有生防潜力,对银胶菊也有毒性作用^[6-7],但是真菌毒素活性受环境条件因素影响较大,这就需要找到真菌最适合的培养条件以充分发挥毒素的活性。国内也有关于草茎点霉致病机理及与常用农药相容性等的相关研究^[8-9],而草茎点霉毒素的产生条件尚无报道。

笔者采用生物测定法对草茎点霉的产毒培养条件和粗毒素活性进行了研究,以期开发草茎点霉作为

基金项目:国家自然科学基金(31071746)。

第一作者简介:纪明山,男,1966年出生,河北任丘人,教授,博士,主要从事生物农药及农药毒理学研究。通信地址:110866 沈阳市东陵路120号 沈阳农业大学植物保护学院, Tel: 024-88492673, E-mail: jimingshan@163.com。

收稿日期:2010-11-15,修回日期:2010-12-29。

防除鸭跖草的生物除草剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于2010年3月在沈阳农业大学农药实验室进行。

1.2 试验材料

供试菌株草茎点霉(*Phoma herbarum*)为从沈阳地区鸭跖草病叶上分离获得的草茎点霉菌株;鸭跖草为温室培育的实生苗,培养时间为3个月。

1.3 产毒培养方法

转接草茎点霉菌株于PDA平板上培养7天,用打孔器打取直径为6.5 mm的菌块,接种到装有150 mL PSK液体培养基的三角瓶中,每瓶接种2块,共接20瓶,在30℃、150 r/min条件下培养10天,培养液用两层滤纸过滤后,真空抽滤,得到澄清液体。

1.4 粗毒素的提取方法

1.4.1 萃取溶剂的筛选 采用3种极性不同的有机溶剂石油醚、氯仿、乙酸乙酯,对培养滤液进行萃取。每种溶剂连续萃取3次,合并有机相,减压旋转蒸干得到粗毒素^[10]。将浓缩物溶于5 mL水中。用针刺法^[11]进行生物活性测定,每个处理设置3次重复。

1.4.2 毒素产生方式的确定 为确定草茎点霉菌产生的毒素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粗毒素的提取处理^[12]。培养滤液粗毒素的提取方法如上所述。菌丝中粗毒素的提取首先将菌丝用蒸馏水洗净,80℃条件下烘干,研磨成粉末后,用乙酸乙酯连续萃取3次,合并有机相,蒸馏获得粗毒素。

1.5 粗毒素产毒条件的确定

1.5.1 温度对产毒活性的影响 转接草茎点霉于PSK培养基中,分别在20℃、24℃、28℃、32℃和36℃,转速150 r/min条件下培养10天,用乙酸乙酯萃取无菌滤液,旋转蒸发有机相获得粗毒素^[13],针刺法测定粗毒素活性。

1.5.2 培养时间对产毒活性的影响 转接草茎点霉于PSK培养基中,然后置于温度30℃、转速150 r/min条件下分别培养7、14、21、28天,用乙酸乙酯萃取培养滤液,旋转蒸发有机相获得粗毒素,针刺法测定粗毒素活性。

1.5.3 培养方式对产毒的影响 以PSK为培养基,接种草茎点霉菌株,在30℃条件下,分别放在转速为100、150、200 r/min的摇床上、培养10天,提取粗毒素,针刺法测定毒素活性。

1.6 粗毒素除草活性测定

1.6.1 粗毒素对鸭跖草种子萌发的测定 采用种子萌发法^[14]。选取前一年采集的鸭跖草种子,用无菌水将种子冲洗干净待用。用乙酸乙酯将粗毒素溶解,配制成不同浓度的毒素溶液,分别将不同浓度的毒素溶液倒入装有无菌滤纸的培养皿内,待乙酸乙酯挥发后,将鸭跖草种子均匀摆入培养皿内,每皿100粒,然后置于25℃恒温培养箱中,每处理3次重复,以无菌水为对照,7天后统计种子萌发数。

1.6.2 粗毒素对鸭跖草叶片的毒性反应 选取培育好的鸭跖草,在叶片上刺伤口,将不同浓度毒素溶液分别滴在伤口上,25℃条件下光照保湿培养,每处理3次重复,2天以后测量病斑面积。

2 结果与分析

2.1 萃取溶剂对草茎点霉粗毒素提取的影响

如图1所示,石油醚、氯仿、乙酸乙酯3种极性不同的有机溶剂对粗毒素的萃取效果差异显著,其中乙酸乙酯的萃取效果最好。与培养滤液相比,回收率达到96.85%,石油醚萃取效果最差,回收率只有37.05%,氯仿的回收率为47.70%。可见,用中等极性的乙酸乙酯进行萃取是可靠的。

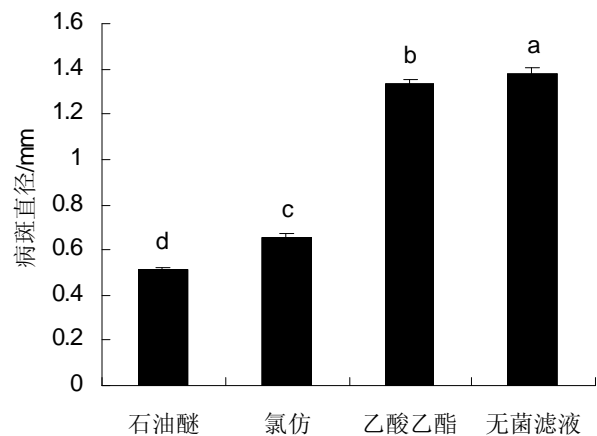


图1 不同有机溶剂萃取草茎点霉粗毒素的活性比较

2.2 毒素产生方式的确定

图2结果表明,草茎点霉在液体培养条件下,毒素既有细胞外分泌的也有细胞内的,但以细胞外分泌毒素为主。经细胞外毒素和无菌滤液处理的叶片病斑直径分别为1.34、1.38 mm,两者差异不显著,经细胞内毒素处理过的叶片病斑直径只有1.04 mm,与细胞外毒素活性差异显著。这说明草茎点霉的细胞外毒素活性要高于细胞内毒素活性。

2.3 粗毒素产毒条件的确定

2.3.1 温度对草茎点霉粗毒素活性的影响 从图3可以

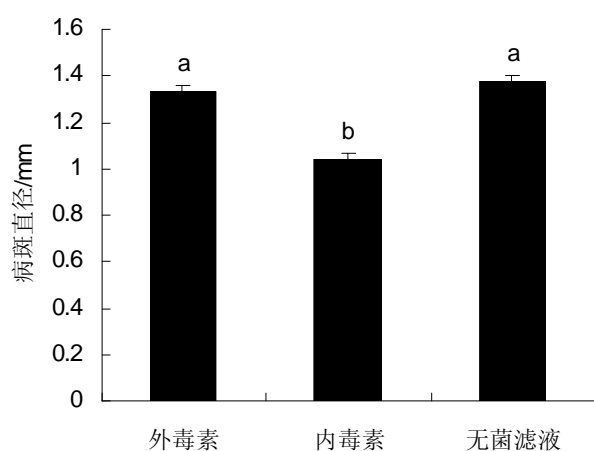


图2 草茎点霉粗毒素产生方式的活性比较

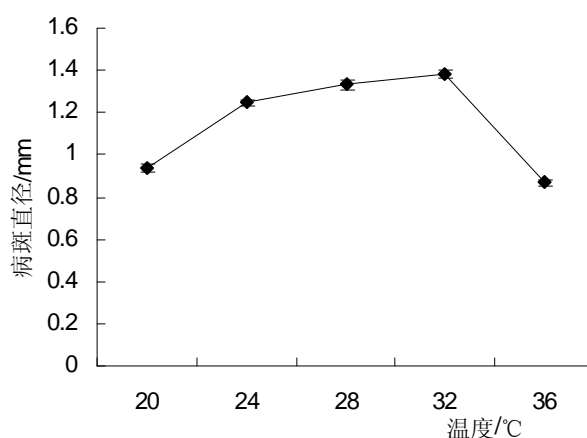


图3 温度对草茎点霉粗毒素产毒活性的影响

看出,在20℃~36℃温度范围内草茎点霉都可以分泌毒素,温度差别对草茎点霉活性影响很大。32℃条件下粗毒素活性最高,病斑直径达到1.38 mm。低于32℃时,粗毒素活性随温度的升高而升高,温度高于32℃以后毒素活性明显降低。这说明草茎点霉最适合温度是在32℃以下,高温不适于毒素活性释放。

2.3.2 培养时间对粗毒素活性的影响 从图4可以看出,草茎点霉在PSK培养基中培养7、14、21、28天后提出的粗毒素均有活性,但活性差异显著。培养14天获得的粗毒素活性最高,病斑直径达到1.28 mm;培养28天活性最低,病斑直径只有0.53 mm;超过21天,毒素活性明显下降。由此看出,粗毒素活性最高产生时间应该出现在7~21天之间。

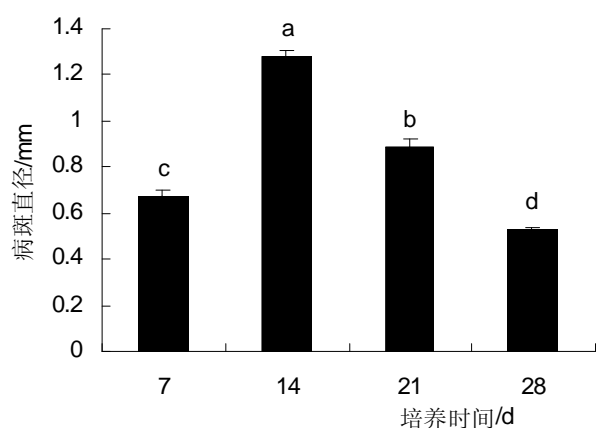


图4 培养时间对草茎点霉粗毒素活性的影响

2.3.3 培养方式对粗毒素活性的影响 图5结果显示,在振荡和静止2种培养条件下,草茎点霉都可以产生毒素。活性最高的是在150 r/min条件下,病斑直径达到1.35 mm,显著高于其他处理。在100 r/min和静止条件下粗毒素活性都很低,病斑直径分别为0.86、0.51 mm,

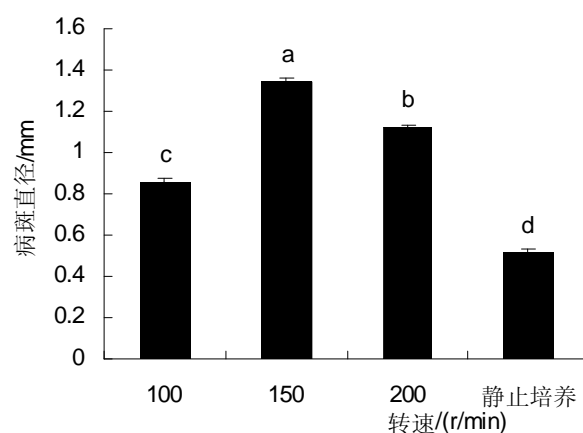


图5 培养方式对草茎点霉粗毒素活性的影响

两者差异显著。由此可见,草茎点霉菌株在振荡条件下有利于粗毒素活性释放,且转速在150 r/min时毒素活性最高。

2.4 粗毒素除草活性分析

2.4.1 粗毒素对鸭跖草种子萌发的影响 如表1所示,毒素对鸭跖草种子生长具有抑制作用,随着毒素浓度增加种子萌发率不断降低。毒素对种子萌发有抑制作用,但是作用效果不明显,当浓度在1000 μg/mL时,种子萌发抑制率达到最高为26.09%。

2.4.2 粗毒素对鸭跖草叶片的毒性反应 如表1所示,叶片在不同浓度毒素作用下均产生水渍状病斑,并且病斑面积随着毒素浓度增加而增大,当浓度在1000 μg/mL时,叶片病斑面积达到6.85 mm²。浓度最小时病斑面积也达到了0.21 mm²,说明毒素对叶片具有很强的致病作用。

3 结论

用毒素代替病原物,可简化或克服许多环境因子变化而影响试验结果。真菌毒素作为由病原菌产生的

表1 粗毒素对鸭跖草种子萌发及叶片的影响

浓度/($\mu\text{g/mL}$)	萌发率/%	抑制率/%	病斑面积/ mm^2
0	76.67	—	—
50	75.00	2.17 \pm 1.31d	4.03 \pm 0.08e
100	73.33	4.36 \pm 1.51d	4.58 \pm 0.08d
200	68.00	11.31 \pm 2.61c	5.56 \pm 0.12c
500	65.00	15.22 \pm 2.61b	6.60 \pm 0.14b
1000	56.67	26.09 \pm 3.29a	6.85 \pm 0.12a

注:小写字母表示在5%水平上的差异显著性;±后面的数字为标准偏差。

对寄主有毒害作用的次生代谢物在致病过程中起到重要作用而倍受关注^[15]。草茎点霉次级代谢物产物中多数为中等极性物质,细胞外毒素比细胞内毒素活性更高,因此细胞外毒素更适合于应用。毒素的活性虽然受培养温度、培养时间、培养方式的影响,但菌株产生的致病毒素具有很好的稳定性,有较高的利用价值。粗毒素对叶片的毒性与粗毒素浓度大小有很大关系,说明毒素中确实含有活性物质,并且随着纯度的增加,毒素的致病力应该更高。

4 讨论

本试验中乙酸乙酯是草茎点霉粗毒素提取的最适宜的有机溶剂,但在实际操作中,需要大量的乙酸乙酯,使毒素的提取需要较高的成本;草茎点霉粗毒素对种子萌发抑制作用不是很强,原因可能是粗毒素中具有活性成分的物质比较少,需要以生测为向导纯化粗毒素,得到活性更高的组分。粗毒素对叶片的毒性很明显,根据草茎点霉粗毒素的这一特点,可以考虑开发防除鸭跖草的茎叶处理生物除草剂。

参考文献

[1] 胡凡,付迎春,朴英,等.大豆田鸭跖草发生特点及药剂防除的研究

[J].中国农学通报,2003,19(3):9-12.

- [2] 张红梅,金红,张慧丽.非生物因素对鸭跖草种子萌发的影响[J].现代化农业,2004(7):11-12.
- [3] 刘亚光,李海英,杨庆凯.大豆灰斑病菌毒素的分离与提取[J].菌物系统,2003,22(4):620-627.
- [4] 谷祖敏,纪明山,张杨,等.草茎点霉粗毒素的除草活性和杀草谱研究[J].沈阳农业大学学报,2009,40(4):431-434.
- [5] Jose Fausto Rivero-Cruz, Genoveva Garcia-Aguirre, Carlos M. Cerda-Garcia-Rojas, et al. Conformational Behavior and Absolute Stereostructure of Two Phytotoxic Nonenolides from the Fungus *Phoma herbarum*[J].Tetrahedron,2000,56(2000):5337-5344.
- [6] Silke N, Greg J B. Influence of host and pathogen variables on the efficacy of *phoma herbarum*,a potential biological control agent of *Taraxacum officinale*[J].Canadian Journal of Botany,2002,80(4):425-429.
- [7] Vikrant P, Verma K K, Rajak R C, et al. Characterization of a Phytotoxin from *Phoma herbarum* for Management of *Parthenium hysterophorus* L.[J].Journal of Phytopathology Volume,2006,154:461-467.
- [8] 谷祖敏,纪明山,王英姿.草茎点霉毒素对鸭跖草致病相关生理反应的影响[J].沈阳农业大学学报,2008,39(3):309-312.
- [9] 谷祖敏,纪明山,杨春喜,等.草茎点霉毒SYAU-06菌株与农田常用农药的相容性研究[J].江西农业大学学报,2009,31(3):504-507.
- [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] 谷祖敏,纪明山,魏松红,等.11株草茎点霉培养特征、致病力及RAPD分析[J].吉林农业大学学报,2010,32(2):140-144.
- [12] 万佐玺.链格孢菌粗毒素的提取方法和稳定性的研究[J].湖北民族学院学报,2002,20(4):26-28.
- [13] 谷祖敏,纪明山,韩秀华,等.鸭跖草叶点霉粗毒素的提取方法和产毒条件的研究[J].微生物学通报,2007,34(5):946-949.
- [14] 慕立义.植物化学保护研究方法[M].北京:中国农业出版社,1994:79-81.
- [15] 张淑珍,徐鹏飞,吴小霞,等.大豆疫霉根腐病菌毒素的提取及生物活性测定[J].中国农学通报,2005,21(3):252-254.