

李永灿,余文贵,陈怀谷,等. 番茄灰霉病菌产毒条件优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):94-96.

# 番茄灰霉病菌产毒条件优化

李永灿<sup>1,2</sup>, 余文贵<sup>2</sup>, 陈怀谷<sup>3</sup>, 赵丽萍<sup>2</sup>, 赵统敏<sup>2</sup>, 李伟<sup>3</sup>, 杨玛丽<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014;

3. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014)

**摘要:** 灰霉病是番茄的重要病害,灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)产生的毒素是重要致病因子。为了解灰霉病菌的产毒条件,用番茄胚根生长抑制率法,研究了番茄灰霉病菌在不同培养基、培养时间、pH 值、培养温度、光照、培养方式等条件下获得粗毒素的活性。结果表明:番茄灰霉病菌的最佳产毒条件为 PD 液体培养基、pH 值 5~6、温度 20~25℃、黑暗条件下连续静置培养 20 d。该毒素具有很好的热稳定性,经高温高压处理 20 min 后活性基本不变。

**关键词:** 番茄;灰霉病菌;粗毒素;培养条件

**中图分类号:** S436.412.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0094-03

灰霉病是番茄设施栽培的主要病害之一,番茄叶、茎、花、果均可发该病,对产量影响很大,严重时减产 40%~50%,甚至绝产<sup>[1]</sup>。目前对番茄灰霉病主要采用化学防治,但在连续使用化学药剂的情况下,病原菌极易产生抗药性,病害一旦发生,几乎无法控制,对番茄生产不利,只有种植抗病品种才能最大限度地降低其危害,但是由于抗源材料的缺乏,番茄灰霉病育种始终处于停滞状态<sup>[2]</sup>。利用病原菌产生的毒素处理愈伤组织,诱导抗灰霉病突变体植株是解决抗源材料缺乏的有效措施。番茄灰霉病病原是半知菌亚门的灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*),灰霉病菌可产生有助于其致病的毒素。获得大量病菌毒素是明确其在致病过程中的作用和利用灰霉病菌毒素进行抗病育种研究的前提。毒素可以在感病组织中获得,也可在人工条件下培养获得<sup>[3]</sup>。前人通过对尖孢镰刀菌、大蒜白腐病菌、玉米黄斑病菌、链格孢菌、番茄叶霉病菌、稻瘟病菌的产毒条件的研究表明,人工培养条件下病原菌的产毒量与培养基条件、环境条件有关<sup>[4-9]</sup>。本研究利用毒素对番茄胚根生长的抑制作用对灰霉病菌产毒条件进行系统研究,旨在寻找灰霉病菌产毒的最佳条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

具有较强致病力的灰霉菌株 BC-9,由江苏省农业科学院植物保护研究所提供;番茄品种苏粉 9 号,由江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

### 1.2 病菌产粗毒素培养条件的建立

在液体培养前 3 d,将病原菌在 PDA 培养基上进行活化

培养,然后取长势一致的直径 5 mm 菌饼接种于液体培养基中。

先将不同条件下获得的灰霉病菌培养液用 4 层纱布过滤,除去菌丝体,滤液经 4 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,经 0.45 μm 滤膜过滤后得到粗毒素。

**1.2.1 培养基和培养时间的筛选** 选择 4 种液体培养基:PD 培养基、查彼克培养基、改良 Fies 培养基、理查德培养基。分别取上述 4 种培养基 300 mL,用 1 mol/L(氢氧化钠溶液或 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值为 7.0,倒入 500 mL 三角瓶中,然后取 12 块菌饼接种其中,在 24℃ 黑暗静置条件下培养,分别于培养 5、10、15、20、25、30 d 后取样制备粗毒素。每个处理重复 3 次。

**1.2.2 培养基 pH 值的筛选** 取上述筛选出的适宜培养基 300 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 盐酸分别将 pH 值调至 3、4、5、6、7、8、9,然后倒入 500 mL 三角瓶中,将 12 块菌饼接种其中,按上述筛选出的适宜培养时间取样。

**1.2.3 培养温度的筛选** 取 12 块菌饼接种于装有 300 mL 适宜培养基的 500 mL 三角瓶中,分别置于温度为 10、15、20、25、30、35℃ 的培养箱中培养,按筛选出的适宜培养时间取样。

**1.2.4 光照条件和培养方式的筛选** 取 12 块菌饼接种于装有 300 mL 适宜培养基的 500 mL 三角瓶中,分别置于 24 h 黑暗+静置、24 h 黑暗+振荡、12 h 黑暗+静置、12 h 黑暗+振荡、0 h 黑暗+静置、0 h 黑暗+振荡等 6 种条件下培养,振荡转速为 150 r/min,按筛选出的适宜培养时间取样。

### 1.3 粗毒素的热稳定性测定

粗毒素经高温(121℃)、高压(0.103 MPa)处理 20 min 后取样,以经 0.45 μm 滤膜过滤的粗毒素作对照,分别用无菌水稀释 5 倍和 10 倍后进行毒力测定。

### 1.4 粗毒素的生物测定方法

取大小、饱满度一致的番茄种子,催芽至露白。待胚根长到约 0.2 cm 时,挑选长势一致的种子,放在铺有粗毒素(用无菌水稀释 5 倍)浸湿的滤纸的培养皿中,再在种子上盖一层同样处理的滤纸,每皿 10 粒,3 d 后测量胚根长度,以清水作对照,计算胚根生长抑制率。以胚根长度和胚根生长抑制率

收稿日期:2012-10-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:30971830);江苏省科技支撑计划(编号:BE2011309);江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)1004]。

作者简介:李永灿(1986—),女,山东曹县人,硕士研究生,研究方向为蔬菜育种。E-mail:liyongcan1986@163.com。

通信作者:余文贵,男,江苏盐城人,研究员,主要从事番茄遗传育种研究。Tel:(025)84390003;E-mail:wenguiyu@jaas.ac.cn。

来衡量毒性。

胚根生长抑制率 = (对照胚根长度 - 处理胚根长度) / 对照胚根长度 × 100%。

1.5 数据统计与分析

用 DPS 软件和 Excel 软件分析试验数据,用 Duncan 新复极差法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 培养基和培养时间对粗毒素产量的影响

通过番茄胚根长度检测毒素毒力,胚根长度越短,胚根生长抑制率越高,说明病菌产生的毒素越多。由表 1 可以看出,

病菌在培养 20 d 前,毒素产量随培养时间的延长而增加;而培养 20 d 后毒素产量随培养时间的延长而减少。病菌在培养 20 d 时,番茄胚根长度最短,毒素产量最多。

由表 2 可知,在培养 20 d 的情况下,病菌在 PD 培养基上产生的毒素最多,胚根生长抑制率为 66.21%,PD 培养基处理的胚根长度与查彼克培养基差异不显著,而显著低于改良 Fries 培养基 ( $P < 0.05$ ),极显著低于理查德培养基 ( $P < 0.01$ )。病菌在查彼克培养基、改良 Fries 培养基、理查德培养基上产生的毒素较少,胚根生长抑制率分别为 61.61%、56.20%、58.35%。考虑到获得培养基的成本和难易程度,所以选用 PD 培养基。

表 1 不同培养基和培养时间下产生的粗毒素对番茄胚根生长的影响

培养时间 (d)	胚根长度 (cm)			
	PD 培养基	查彼克培养基	改良 Fries 培养基	理查德培养基
5	5.62 ± 0.36aA	5.39 ± 0.45aA	5.44 ± 0.33aA	5.34 ± 0.24aA
10	4.57 ± 0.36bB	4.61 ± 0.42bB	4.63 ± 0.32bB	4.25 ± 0.25bB
15	3.37 ± 0.33cC	3.21 ± 0.50cC	3.46 ± 0.37cC	3.11 ± 0.33cC
20	2.21 ± 0.23eE	2.51 ± 0.34eE	2.59 ± 0.31eE	2.72 ± 0.38dD
25	2.50 ± 0.36dD	2.83 ± 0.30dD	3.03 ± 0.31dD	2.31 ± 0.41eE
30	2.64 ± 0.42cdCD	3.05 ± 0.30cdCD	3.35 ± 0.27cC	2.61 ± 0.34dD

注:同列数字后不同大写、小写字母分别表示差异极显著、差异显著。下同。

表 2 不同培养基处理产生的粗毒素对番茄胚根生长的影响

培养基名称	胚根长度 (cm)	胚根生长抑制率 (%)
PD	2.21 ± 0.23cB	66.21
查彼克	2.51 ± 0.34bcAB	61.61
改良 Fries	2.59 ± 0.31abAB	56.20
理查德	2.72 ± 0.38aA	58.35

2.2 培养基 pH 值对病菌产生粗毒素的影响

不同 pH 值下产毒量差异显著(表 3)。当培养基 pH 值低于 5 时,毒素产量随 pH 值升高而增加;当培养基 pH 值高于 5 时,毒素产量随着 pH 值升高而降低。病菌在培养基 pH 值为 5 时毒素产量最多,该处理下的胚根长度与 pH 值为 6 的处理差异不显著 ( $P < 0.05$ ),而极显著低于其他处理 ( $P < 0.01$ )。说明灰霉病菌在培养基 pH 值为 5~6 的条件下有利于产毒。

表 3 不同 pH 值下病菌产生的粗毒素对番茄胚根生长的影响

pH 值	胚根长度 (cm)	胚根生长抑制率 (%)
3	3.38 ± 0.27bB	48.05
4	2.36 ± 0.25cC	64.44
5	1.47 ± 0.26eD	77.93
6	1.55 ± 0.35eD	75.48
7	2.16 ± 0.32dC	67.92
8	3.24 ± 0.19bB	50.19
9	3.80 ± 0.20aA	41.92

2.3 温度对病菌产生粗毒素的影响

不同温度下的病菌产毒量有很大差异。由表 4 可以看出,当培养温度低于 25 ℃ 时,毒素产量随培养温度的升高而

增加;温度高于 25 ℃ 时,毒素产量随培养温度的升高而降低。病菌在 25 ℃ 下产生的毒素对番茄胚根生长的抑制率最高,毒素产量最多,该处理下胚根长度与 20 ℃ 处理差异不显著,而极显著低于其他处理 ( $P < 0.01$ )。说明病菌在 20~25 ℃ 培养产生的毒素最多。

表 4 不同培养温度下病菌产生的粗毒素对番茄胚根生长的影响

温度 (℃)	胚根长度 (cm)	胚根生长抑制率 (%)
10	3.60 ± 0.39bB	45.90
15	2.32 ± 0.32dD	56.75
20	1.29 ± 0.25eE	72.03
25	1.51 ± 0.29eE	76.10
30	2.90 ± 0.27cC	55.86
35	3.89 ± 0.30aA	35.48

2.4 光照和培养方式对病菌产生粗毒素的影响

由表 5 可见,病菌在 24 h 黑暗 + 静置条件下产生的毒素对番茄胚根生长的抑制作用最强,病菌产生的毒素最多,该处理下胚根长度极显著低于其他处理 ( $P < 0.01$ );病菌在 0 h 黑暗 + 振荡条件下产生的毒素对番茄胚根生长的抑制作用最

表 5 不同光照及培养方式下病菌产生的粗毒素对番茄胚根生长的影响

培养方式	胚根长度 (cm)	胚根生长抑制率 (%)
24 h 黑暗 + 静置	1.39 ± 0.22dD	78.76
24 h 黑暗 + 振荡	1.96 ± 0.28cC	69.56
12 h 黑暗 + 静置	2.12 ± 0.31bBC	67.20
12 h 黑暗 + 振荡	2.22 ± 0.23bB	65.82
0 h 黑暗 + 静置	2.23 ± 0.25bB	64.75
0 h 黑暗 + 振荡	2.46 ± 0.25aA	62.15

弱,病菌产生的毒素最少,胚根长度极显著高于其他处理 ( $P<0.01$ )。说明黑暗较光照有利于产毒,静置较振荡有利于产毒。

2.5 粗毒素的热稳定性

由表 6 可知,粗毒素经高温高压处理后,番茄胚根长度均稍高于对照,但未表现出显著差异。说明高温高压处理对毒素活性的影响很小,因此在细胞离体筛选中可以和培养基一起高温高压灭菌使用。

表 6 高温高压处理的粗毒素对番茄胚根生长的影响

处理	稀释倍数 (倍)	胚根长度 (cm)	胚根生长抑制率 (%)
高温	5	1.74 ± 0.33aA	73.39
过滤	5	1.59 ± 0.44aA	75.89
高温	10	3.94 ± 0.44bB	39.59
过滤	10	3.70 ± 0.37bB	43.33

3 结论与讨论

病原菌在人工培养条件下的产毒量受培养基条件影响很大。王惠在研究灰葡萄孢菌株活性代谢产物时发现,在稀释倍数很大的情况下,菌株在改良 Fries 培养液中培养滤液活性最强,PD 培养滤液的活性最弱;但随着稀释倍数的减小,PD 培养滤液活性的提高幅度比其他培养滤液高,其活性与改良 Fries 滤液的活性差异不大,甚至有高于改良 Fries 滤液活性的可能<sup>[10]</sup>。魏伶俐将滤液稀释 25 倍后进行毒力测定,认为灰葡萄孢菌在改良 FriesⅢ号培养液产生的毒素活性最强<sup>[11]</sup>;本研究将滤液稀释 5 倍进行毒力测定,结果表明病菌在 PD 培养基最适于产毒。上述各研究结果不同可能与所用滤液的稀释倍数有关。PD 培养基中没有其他盐类,用于毒素的致病活性测定时,发病情况比较接近自然条件;将其用于抗性筛选时可以减少盐类对筛选效果的影响,因此本研究选用 PD 液体培养基制备毒素最佳。

振荡方式、培养时间、光照、通气量等外界培养条件对病菌产毒的影响有很大差异<sup>[12]</sup>。本研究表明,灰霉病菌在静置条件下产毒最多。静置条件下病菌可在培养液表面形成厚厚的菌丝盖,且菌盖表面覆有黑色的孢子;而在振荡条件下,菌丝结团成球,不利于孢子的产生,产毒量较少<sup>[13]</sup>。本研究发现灰霉菌培养 20 d 后毒素产量反而有所下降,这与孙文元等的研究结果<sup>[14]</sup>一致,原因可能是在一定时间内菌株生长迅速,形成大量孢子,随着培养时间的延长,菌株生长缺少营养,产毒量减少,还可能是因为积累其他代谢物质而抑制了毒素

的产生。光照条件对产毒量也有一定影响,黑暗或交替光照条件虽然能刺激灰霉菌产生分生孢子<sup>[15]</sup>,但光照易造成毒素分解,不利于毒素的产生和保存,试验发现黑暗条件有利于灰霉菌产毒。将粗毒素液经高温(121℃)、高压处理 20min,毒素活性基本不变,这与朱建兰的研究结果<sup>[16]</sup>相符合。

本研究对灰霉菌的产毒培养条件进行了优化,为离体筛选获得抗番茄灰霉病突变体提供了可能,同时为抗番茄灰霉病育种奠定了基础。

参考文献:

[1] 赵统敏,高军,余文贵. 棚室番茄灰霉病的发生规律与综合防治技术[J]. 江苏农业科学,1999(1):37-38.

[2] 赵统敏,余文贵,赵丽萍,等. 番茄抗灰霉病育种研究进展[J]. 江苏农业学报,2011,27(5):1141-1147.

[3] Rebordinos L, Cantoral J M, Prieto M V, et al. The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea* [J]. Phytochemistry, 1996, 42(2):383-387.

[4] 台莲梅,许艳丽. 大豆根腐病菌(*Fusarium oxysporum*)生长及产生毒素的条件筛选[J]. 中国油料作物学报,2004,26(4):71-73.

[5] 张林青,程智慧. 大蒜白腐病病原菌产毒素培养条件的优化[J]. 园艺学报,2008,35(6):841-846.

[6] 杨军玉,臧少先,刘淑香,等. 玉米黄斑病菌产毒条件及毒素稳定性研究[J]. 玉米科学,2000,8(4):82-84.

[7] 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.

[8] 李小波,康立功,路盼,等. 番茄叶霉病菌产毒条件研究[J]. 植物保护,2010,36(1):83-86.

[9] 臧威,孙剑秋,张国民,等. 稻瘟病菌粗毒素产生条件的研究[J]. 河南农业科学,2008,67(6):67-70.

[10] 王惠. 灰葡萄孢生物活性代谢产物的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2004.

[11] 魏伶俐. 灰葡萄孢毒素的产生条件及其对番茄植株的致病作用[D]. 扬州:扬州大学,2007.

[12] Berestetskiy A O. A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use[J]. Microbiology, 2008, 44(5):453-465.

[13] 王立安,齐志广,马春红,等. 培养条件对玉米小斑病菌毒素产量的影响[J]. 华北农学报,1999,14(增刊):92-95.

[14] 孙文元,翟玉柱,赵凤岩. 草莓灰霉病菌的培养及其毒素的生物测定[J]. 华北农学报,1999,14(增刊):112-116.

[15] 徐明,李海涛,张子君,等. 番茄灰霉病病原菌生物学特性的研究[J]. 贵州农业科学,2009,37(3):68-71.

[16] 朱建兰. 番茄灰霉病菌毒素对种子发芽和组织生长的毒害作用[J]. 甘肃农业大学学报,1997,32(2):181-185.