

小麦粒霉变病原菌的初步鉴定 及防控措施研究

高小明^{1,2}, 胡斌¹, 李皖光¹

(1. 安徽省粮油产品质量监督检测站, 安徽 合肥 230031;

2. 合肥幼儿师范高等专科学校, 安徽 合肥 230011)

摘要:近年来,安徽多地小麦籽粒基部霉变而产生黑色霉状物。为了探索该未知病原菌,采用组织分离的培养方法,用70%酒精处理、0.1%硝酸银溶液表面消毒和无菌水冲洗后接种至孟加拉红培养基上,置于25℃恒温培养箱中培养,对培养出的微生物每隔5d进行观察,分析了菌落形态、直径等菌落特征,以及显微镜观察微生物的分生孢子形状等特征,初步鉴定一种病原菌为细极链格孢菌 *Alternaria tenuissima*。通过中药精油熏蒸的方法基本明确樟脑油和山苍子油对该病原菌具有一定的抑制作用,这为仓储小麦免遭细极链格孢菌的侵袭提供了科学的指导依据。

关键词:小麦;病原菌;细极链格孢;中药精油;熏蒸

中图分类号:TS 207.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)02-0069-04

Preliminary identification of pathogen causing wheat to mildew and exploration of control method

GAO Xiao-ming^{1,2}, HU Bin¹, LI Wan-guang¹

(1. Anhui Grain and Oil Products Quality Supervision and Inspection Station, Hefei Anhui 230031

2. Hefei Preschool Education College, Hefei Anhui 230011)

Abstract: In recent years, in many places of Anhui, the base of wheat mildew and produce much black mould. Using tissue culture method to explore this unknown pathogen, the pathogen is inoculated to Bangladesh red culture medium after being treated with 70% alcohol, 0.1% silver nitrate and sterile water, and then placing in 25℃ constant temperature incubator, observing and analyzing colony morphology, diameter, etc. every five days. And observing the shape of conidium by microscope to identify the unknown pathogen was *Alternaria tenuissima*. It's definitude basically that camphor and litsea cubeba oil have inhibition to the pathogen by traditional Chinese medicine fumigation methods which provide scientific guidance for storage of wheat not suffering from the infection of *Alternaria tenuissima*.

Key words: wheat; pathogen; *Alternaria tenuissima*; Chinese medicine essential oil; fumigation

细极链格孢 *Alternaria tenuissima* (Fr.) Wiltshire 是链格孢属 *Alternaria* Nees 的重要成员。链格孢属真菌是农作物主要致病菌之一,能引起小麦、烟草、马铃薯等几十种植物发生病害,如褐斑病、茎枯病、黑斑病、赤星病等等,严重影响了农作物的产量,给农业生产带来了巨大损失^[1]。该属真菌易在低温潮湿的环境下生存,不仅危害植物的健康生长,而

且可产生多种毒素,当人和动物食用以后会导致急性或慢性的中毒^[2]。因此,对该种病原菌的防控势在必行。

从植物提取的精油中含有多种低分子的抗菌物质,传统研究领域中可用于消炎、抗菌,甚至在食品添加剂中也有广泛应用^[3-5]。中药精油是植物精油中一个特殊的群体,它是存在于中药不同组织如果实、叶片、花和根中的一类重要次生物质,由分子量较小的简单化合物组成,常温下多为油状液体,

收稿日期:2015-07-30

作者简介:高小明,1985年出生,女,博士,工程师

易挥发,具有强烈的香味和气味^[6]。众多研究表明精油具有明显的抗真菌、细菌及酵母的功能^[7-20]。

笔者在近年的小麦质量普查期间,发现大量小麦籽粒的基部出现了黑色霉状物,通过组织培养技术对该种霉菌进行了形态学鉴定,发现其中一种真菌为细极链格孢 *Alternaria tenuissima*。并选用樟脑油和山苍子油对组织培养的菌丝进行熏蒸,探索对该种病原菌的抑制效果,力求降低仓储损失,并为早期防止该生霉病粒的发生提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品与试剂

1.1.1 实验样品

选取质量调查中有代表性的6地市小麦样品,其生霉病粒均占样品总数的20%以上,具体样品信息见表1。

表1 样品信息

序号	样品编号	来源地	生霉病粒发生率(%)
1	AHXM13-011	马鞍山	22.3
2	AHXM13-015	巢湖	22.3
3	AHXM13-038	六安	94.3
4	AHXM13-292	滁州	36.8
5	AHXM13-334	蚌埠	27.9
6	AHXM13-338	亳州	24.7

1.1.2 实验试剂

孟加拉红培养基;山苍子油和樟脑油:江西鑫森天然植物油有限公司。

1.2 主要仪器与设备

超净工作台;恒温培养箱;40-400×生物显微镜;尼康相机

1.3 方法

1.3.1 病原菌鉴定

采用组织分离法对生霉病粒进行分离培养。选取带病籽粒,用解剖刀切取含霉状物的部分,用70%酒精处理、0.1%硝酸银溶液表面消毒和无菌水冲洗后接种至孟加拉红培养基上,置于培养箱中25℃恒温条件下培养。每隔5d观察菌落形态和直

径变化等。并挑取菌丝在显微镜下观察并拍照。

1.3.2 中药精油熏蒸抑菌实验

在无菌条件下,将表面消毒后的籽粒霉状物部分接种至孟加拉红培养基中间。在培养皿皿盖内壁上分别贴入含有一定质量中药精油的滤纸片,将培养皿倒置后用封口膜封口,放入25℃的培养箱熏蒸24h。同时设空白对照组。熏蒸结束后将滤纸取出,放入25℃培养箱中培养。

待对照组菌丝生长5d时,测量对照组和处理组菌丝直径,比较不同种类、不同浓度中药精油熏蒸的效果。具体的熏蒸方案见表2。

表2 中药精油熏蒸方案

样品编号	熏蒸精油	熏蒸浓度/(mg/mL)			
AHXM13-011	樟脑油	500	1 000	1 500	2 000
AHXM13-015	樟脑油	500	1 000	1 500	2 000
AHXM13-038	山苍子油	500	1 000	1 500	2 000
AHXM13-292	山苍子油	500	1 000	1 500	2 000
AHXM13-334	樟脑油+	250+	500+	750+	1 000+
	山苍子油	250	500	750	1 000
AHXM13-338	樟脑油+	500+	1 000+	1 500+	2 000+
	山苍子油	500	1 000	1 500	2 000

2 结果与分析

2.1 病原菌的鉴定结果

在培养过程中,菌落逐渐由白色变为墨绿色至近黑色;显微镜下观察发现分生孢子梗淡褐色,细长,偶分枝;分生孢子链生,倒棍棒形或长椭圆形,淡褐色至中等褐色,具横、纵隔膜。从生境以及菌落、分生孢子梗和分生孢子照片观察分析,并检索张天宇教授主编《中国真菌志》第十六卷(链格孢属)^[21]中的种,初步判定该种真菌为细极链格孢 *Alternaria tenuissima*(Fr.) Wiltshire(见图版)。

2.2 抑制病原菌的实验结果

樟脑油熏蒸的4个浓度梯度分别以Z₁、Z₂、Z₃、Z₄表示,山苍子油熏蒸的4个浓度梯度以S₁、S₂、S₃、S₄表示。未经熏蒸的空白组用Z₀或S₀表示。样品经25℃培养5、10、15d后的菌落直径结果分别列于表3、表4和表5。

表3 樟脑油熏蒸后的样品菌落直径

序号	样品编号	5d					10d					15d				
		Z ₀	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	Z ₀	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	Z ₀	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄
1	AHXM13-011	20	18	12	12	10	38	35	27	26	20	65	59	43	42	33
2	AHXM13-015	17	15	0	0	0	37	27	0	0	0	78	48	0	0	0

表4 山苍子油熏蒸后的样品菌落直径

序号	样品编号	5d					10d					15d				
		S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
3	AHXM13-038	16	8	0	0	0	35	26	0	0	0	69	49	0	0	0
4	AHXM13-292	14	5	0	0	0	34	25	0	0	0	60	44	0	0	0

表5 两种精油叠加熏蒸后的样品菌落直径

序号	样品编号	5d					10d					15d				
		Z ₀ +S ₀	Z ₁ +S ₁	Z ₂ +S ₂	Z ₃ +S ₃	Z ₄ +S ₄	Z ₀ +S ₀	Z ₁ +S ₁	Z ₂ +S ₂	Z ₃ +S ₃	Z ₄ +S ₄	Z ₀ +S ₀	Z ₁ +S ₁	Z ₂ +S ₂	Z ₃ +S ₃	Z ₄ +S ₄
5	AHXM13-334	15	4	0	0	0	34	22	0	0	0	69	42	0	0	0
6	AHXM13-338	15	0	0	0	0	34	2	0	0	0	70	9	0	0	0

2.3 讨论

将实验数据绘制成柱状图,以熏蒸浓度为横坐标,以菌落直径为纵坐标,比较熏蒸5、10和15d的菌落直径。樟脑油熏蒸样品 AHXM-011 和 015 的后的菌落直径见图2,山苍子油熏蒸样品 AHXM-038 和 292 的后的菌落直径见图3,樟脑油和山苍子油两种精油叠加熏蒸样品 AHXM-334 和 338 的后的菌落直径见图4。

由图2可知,通过樟脑油熏蒸样品 AHXM-011 和 015 与空白样品对比,前者的菌丝生长缓慢,并且随着精油浓度的增加,熏蒸效果更好。当浓度

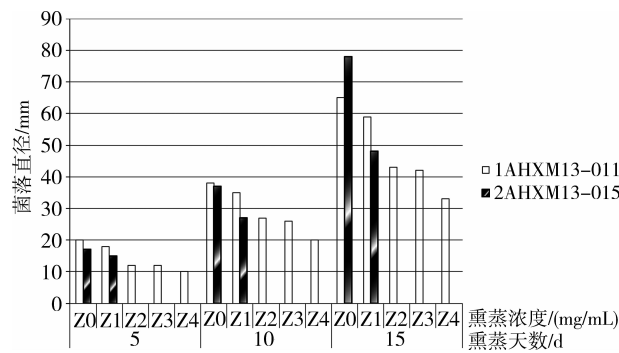


图2 樟脑油熏蒸后的样品菌落直径

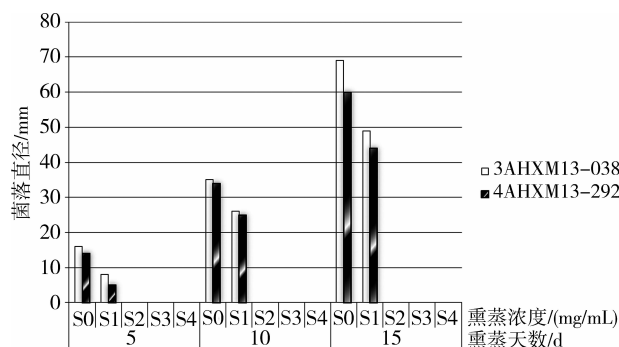


图3 山苍子油熏蒸后的样品菌落直径

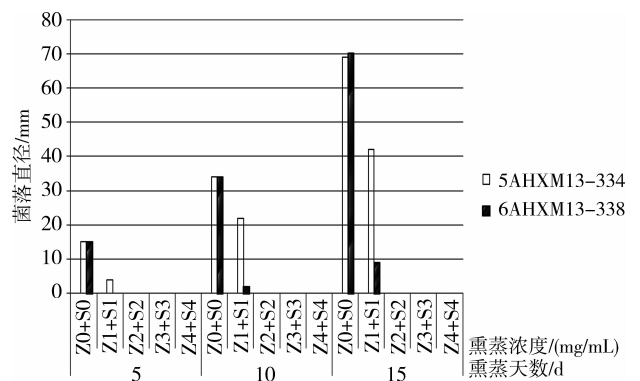


图4 两种精油叠加熏蒸后的样品菌落直径

大于等于1000 mg/L时,能有效抑制菌丝的继续生长。样品 AHXM13-011 的熏蒸效果不佳,可能是熏蒸时封口不严实,或是精油挥发较快没有及时对样品起到熏蒸效果。

由图3可知,通过山苍子油熏蒸样品 AHXM-038 和 292 与空白样品对比,前者的菌丝生长缓慢,并且随着精油浓度的增加,熏蒸效果更好。当浓度大于等于1000 mg/L时,能有效抑制菌丝的继续生长。

由图4可知,使用两种精油叠加熏蒸样品 AHXM-334 和 338 时,会产生更好的抑制效果。而随着天数的增加,精油也随之挥发,对菌丝的抑制效果逐渐减弱。但高浓度下,仍能起到较好的控制作用。

由此可见,通过樟脑油和山苍子油两种中药精油熏蒸能有效抑制细极链格孢菌的生长,应进一步探索更多种类、成本更低的熏蒸精油和最合适的熏蒸条件。

3 小结

链格孢属菌适应性强,相对较低或较高的温度

只能减缓而不会抑制其生长繁殖,昼夜变温更有利于孢子形成。它们喜潮湿、温暖、储藏通透差的环境,生长繁殖快,对营养要求低,产孢能力强,连续黑暗、空气充足条件下有利于产孢,在一些廉价农产品上均可大量产生孢子。

其含有多种毒素,可致人类皮肤癣、内脏疾病。粮库感染是作物生长期生病或带菌孢子为感染源,籽粒不干、仓库通透性差、储藏过久等都是诱因。

鉴于樟脑油和山苍子精油对此种病原菌繁殖的抑制效果,可以在仓库的粮堆下埋进中药精油,具体做法是将一定浓度的中药精油放置瓶中,用透气纱布扎住瓶口,然后连瓶埋入粮食中,让精油自然挥发,熏蒸粮食。或是直接将中药果实埋入粮食中,也可起到一定的抑菌效果。

中药精油熏蒸的方法也可能存在弊端。例如精油熏蒸产生的气味对粮食的影响,以及精油挥发较快,对粮食的熏蒸难以持久等等。同时,采用成本较高,难以被各地各级粮库广泛应用。

在本研究的基础上,寻求到更好的方法,来控制发生在小麦籽粒基部的细极链格孢继续生长,尤其是对于小麦在生长期间的环境、气候等加大监管力度、施以适当的干预措施,确保小麦健康生长;另外在小麦储藏期间要给予良好的仓储空间,力求小麦免受各类霉菌的侵袭,从而为小麦仓储工作的有序进行提供重要的参考依据。

参考文献:

[1] 崔迪,王继华,陈捷,等. 链格孢属真菌对农作物的危害[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报,2005,21(4):88-90

[2] 王洪凯,张天宇,张猛. 链格孢属真菌分类研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2001,32(3):406-410.

[3] 孙鹏,刘文文. 植物精油提取和应用的研究进展[J]. 甘肃科技,2007,23(5):139-140.

[4] Graziella Cherchi, Delia Deidda, Barbara De Gioannis, et al. Extraction of *Santolina insularis* essential oil by supercritical carbon dioxide; influence of some process parameters and biological activity[J].

Flavour and Fragrance Journal,2001,16(1):35-43.

[5] E. Reverchon, C. Marrone, M. Poletto, et al. Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil; Experiments and mathematical modeling[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1999,38(8):3069-3075.

[6] 徐汉虹. 杀虫植物与植物性杀虫剂[M]. 北京:中国农业出版社,2001:107-120.

[7] CHIALVA F. Essential oils constituents of *A chillea biebersteinii*[J]. JEOR,1993,5(1):87-88.

[8] CHARAI M. Chemoposition and antimicrobial activities of two aromatic plants[J]. JEOR,1996,8(6):657-664.

[9] 王红星,郭燕群,张梓,等. 芳香型植物精油抑菌效果的测定和比较[J]. 中国饲料,1996(6):32-34.

[10] 莫小路,严振,王玉生,等. 广藿香精油对植物病原真菌的抑菌活性研究[J]. 中药材,2004,27(11):805-807.

[11] 王宏年,江志利,冯俊涛,等. 7种植物精油对番茄灰霉病的抑制效果[J]. 植物保护,2007,33(5):111-115.

[12] 余伯良. 山苍子油对霉菌抗菌性及其与黄曲霉产毒关系的研究[J]. 微生物学通报,1998,25(3):144-146.

[13] 程赛,邵兴锋,郭安南,等. 茶树油熏蒸对草莓采后病害和品质的影响[J]. 农业工程学报,2011,27(4):383-388.

[14] 莫小路,王玉生,曾庆钱,等. 几种药用植物精油的抗真菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2005,17(6):696-699.

[15] 刘猛,李绍钰. 植物精油的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(6):252-254.

[16] 李凤清. 植物精油的抑菌评价及其应用[D]. 南京师范大学,2014.

[17] 赵欧. 山苍子雄花和雌花挥发油的提取及成分分析[J]. 广州化学. 2010,35(3):11-15.

[18] 王巨媛,翟胜. 植物精油应用进展及开发前景展望[J]. 江苏农业科学. 2010,(4):1-3

[19] 邵海,龚钢明. 植物精油在药理和农药方面的研究进展[J]. 中国野生植物资源. 2008,27(5):5-9.

[20] Fratemale D, Giamperi L, Ricci D. Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *Thymus mastichina* L. [J]. . 2003,15(4):278-281

[21] 张天宇. 中国真菌志. 第十六卷 链格孢属[M]. 北京:科学出版社,2003:38-42. ㊞