



华中农业大学
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

本科生毕业论文〔设计〕 *2006* 创新作品选编

上册

华中农业大学教务处
ACADEMIC AFFAIRS OFFICE OF
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

华中农业大学
2006 届本科生毕业论文(设计)
创新作品选编

华中农业大学教务处

二〇〇六年九月

前 言

毕业论文(设计)是学生综合运用所学知识和技能,学习科学研究或工程设计的基本方法,培养实践动手能力、科学精神及创新意识的重要教学环节。它不仅担负着向学生传授知识和技术,培养学生综合运用知识能力、文献综述能力、实验设计及数学分析能力、外文及现代技术应用能力和创新思维能力的任务,而且影响学生的世界观、工作作风和综合素质。如何适应当前教育教学改革新形势,坚持做好毕业论文(设计)工作,保证和提高毕业论文(设计)质量,一直都是检验高等院校教学质量的重要内容,同时也是高等院校广泛关注的重要课题。

近年来,我校以保证和提高毕业论文(设计)质量为核心,不断强化和完善毕业论文(设计)的规范化要求与管理,围绕选题、指导、中期检查、评阅答辩、评估评优等环节,制订了明确的规范和标准,编印了《华中农业大学本科生毕业论文(设计)工作手册》。同时,根据不同专业学科特点,建立了有效的毕业论文(设计)质量监控体系,有力地保证了我校学生毕业论文(设计)总体水平和质量。一方面表现在毕业论文(设计)形式规范,学生严格各项要求认真开展毕业论文(设计)工作,规范撰写毕业论文(设计)、文献综述、外文翻译,并采用学校统一印制封面进行包装,较好地规范了毕业论文(设计)形式。另一方面表现在论文(设计)质量高,绝大多数学生能综合运用所学知识开展研究和实践,独立查阅文献资料,设计研究方案、实践操作、应用外文及现代教育技术手段等方面能力强,论文(设计)结构、行文符合相关要求,论文(设计)总体质量高。

为鼓励大学生积极创新,提高毕业论文(设计)质量,根据《华中农业大学关于本科生毕业论文(设计)创新奖实施办法》文件精神,我校继续开展了 2006 届本科生毕业论文(设计)创新奖评审工作,经专家评审委员会严格评审,学校审批,最后确定 45 项荣获我校 2006 届本科生毕业论文(设计)创新奖。这些项目是广大指导教师、学生和管理工作者严格要求、辛勤耕耘、扎实工作的结果。为展示我校本科生毕业论文(设计)成果,促进交流,并为今后开展毕业论文(设计)提供示范和借鉴,我们组织编印了《华中农业大学 2006 届本科生毕业论文(设计)创新作品选编》。在选编过程中,我们本着科学严谨的态度,在充分尊重原作的基础上,结合专家评审意见进行了适当修改。由于时间和水平所限,不足之处在所难免,恳请读者批评指正。

《华中农业大学 2006 届本科生毕业论文(设计)创新作品选编》的编印得到了各院系的大力支持和协助,是集体智慧的结晶。王平祥、王春潮、成协设等同志承担了策划、统筹工作,吴敏菲、杨宇琼、张青林、王志山、代金贵等同学担任了编辑、校对工作,向佳玲、赵希庆、王蒙筠、张玉群、杨毅、刘芳、秦喜秀、吴虹、肖金华、修顺娣、周均、薛娟、张终、翟红、苏华英、肖湘平等同志为论文原稿收集做了大量工作,在此一并致谢。

华中农业大学教务处处长:

徐政进

二〇〇六年九月

目 录

(上 册)

大蒜紫斑病原鉴定及生物学特性研究	植物保护	霍 然(1)
玉米秸秆固体培养基发酵木霉技术初探	植物保护	程中山(10)
低氮条件下钙对水稻根系特征适应性的影响	植物科学与技术	涂姗姗(19)
甘蓝型油菜 C022 细胞核雄性不育的显微观察	植物科学与技术	成 道(26)
不同品种杂交水稻灌浆结实的动态分析	植物科学与技术	谢果珍(35)
不同基因型油菜对土壤镉的吸收及其初步机理的研究	农业资源与环境	温继华(45)
几种粘土矿物对恶臭假单胞菌吸附的影响因素	环境与工程	洪志能(59)
金红石含量线性可控的纳米 TiO_2 的合成和表征及其光降解亚甲基蓝的初步研究	环境与工程	邹 睿(71)
马铃薯种间体细胞杂种叶绿体遗传组分分析	园艺	伍小萌(87)
柑橘体细胞杂种花粉育性及其应用研究	园艺	李金利(102)
番茄抗病毒相关基因 eIF4E 的遗传转化研究	园艺	刘小芳(110)
用改良的石蜡切片方法观察悬铃木花芽分化过程的研究	园林	罗 娟(118)
百日草雄性不育株快繁技术研究	园林	黄 莉(128)
牛卵巢颗粒细胞体外培养及核型鉴定	动物科学	何 琴(138)
猪琥珀酸脱氢酶 D 亚基印记鉴定、基因频率及表达谱分析	动物科学	黄 菁(149)
二丙酸咪唑苯脲对猪附红细胞体病的疗效试验	动物科学	贺 兰(165)
胶体金免疫层析试纸法检测鸡蛋中磺胺嘧啶残留的研究	动物医学	李 巍(173)
鄱阳湖三种蚌遗传多样性的微卫星 DNA 分析	水产养殖	严如娟(182)
甲基盐霉素对鲤肠道、肝胰脏消化酶活性的影响	水产养殖	彭红兵(195)
CdSe 量子点与血红蛋白相互作用的光谱研究	应用化学	武红敏(206)
黑米淀粉提取及物化特性的研究	食品科学与工程	张 磊(223)
红曲霉 T-DNA 插入突变子淀粉酶的分离纯化与特性研究	食品科学与工程	杨 莎(238)
加热处理对白鲢鱼糜凝胶形成的影响	食品科学与工程	施星杰(248)
修旧、整合——武汉市菱角湖公园更新设计	城市规划	陈 平(261)
武汉市民主路西段户部巷—斗集营片区更新概念设计	城市规划(风景园林)	王 劲(277)

目 录

(下 册)

基于 ARM 嵌入式系统的 TCP/IP 协议栈的设计与实现	计算机科学与技术	丁 龙(295)
基于 Web 的 FIP 搜索引擎的设计与实现	计算机科学与技术	覃武权(313)
移动运营商短信中心运营支撑系统的设计与开发	信息与计算机科学	张荣华(330)
基于遥感图像的船舶提取方法研究	地理信息系统	吴 疆(353)
CIS 支持下土壤芭片数字图像微域景观特征分析	地理信息系统	闵凤阳(380)
淡水鱼阻抗特性的测试研究	机械设计制造及其自动化	肖 武(393)
一次直喂式剥麻机设计	机械设计制造及其自动化	叶 丹(421)
小型玉米免耕播种机的总体设计	农业机械化及其自动化	李继波(446)
板栗脱壳机的设计	机械化设计及其自动化	黄守仁(473)
武汉市白沙洲农产品大市场物质垃圾的处理方法研究	农林经济管理	李 喆(489)
基于虚拟水要素的农产品比较优势分析	国际经济与贸易	熊 航(502)
武汉市武钢第三中学教师激励机制研究	人力资源管理	黄爱华(514)
Black - Scholes 模型在上市公司可转换债券定价中的运用	会计学	韩元亮(530)
应城市农村居住点用地变化及其驱动力分析	土地资源管理	杨 俊(542)
征地补偿测算标准的研究——以新郑市为例	土地资源管理	苗 田(556)
“快一点”农药残留检测卡市场分析与策略	市场营销	赵占峰(579)
农民合作组织需求状况调查	社会工作	王祖贵(597)
从经济角度分析我国人才流动中商业秘密的保护	法学	朱 鹏(620)
三人行广告媒介运营策略分析研究	广告学	何思平(630)
浅析中美电影《一个也不能少》与《一球成名》中的集体主义与个人主义	英语	汪少波(643)

大蒜紫斑病病原鉴定及生物学特性研究

学 生: 霍 然
专 业: 植物保护
指导教师: 黄俊斌

摘 要:大蒜紫斑病是湖北省当阳市大蒜上的一种重要病害,为了控制和防治该病害的发生,对引起大蒜紫斑病的病原菌进行了分离鉴定和生物学特性研究。研究结果表明,引起大蒜紫斑病的病原物为茄菌柄霉(*Stemphylium solani*);病菌菌丝在 5~35℃ 范围内均能生长,在 20~30℃ 之间生长较好,最适生长温度为 25℃;菌丝在 pH 值为 6~8 时生长最好;该菌对半乳糖利用最好,对甘露醇、乳糖利用次之,对淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖利用最差;在测试氮源中,对硝酸钾、硝酸钙的利用效果最佳,其次是酵母膏、尿素,对蛋白胨、谷氨酸、氯化铵利用最差;菌丝的致死温度为 55℃,10 min。

关键词:大蒜;紫斑病;茄菌柄霉;生物学特性

Identification and biological characteristics of the pathogen causing purple leaf blotch of garlic

Student: Huo Ran
Major: Plant Protection
Instructor: Huang Junbin

Abstract: The pathogen causing purple leaf blotch of garlic was found to be a kind of important disease on the garlic in Dangyang city Hubei province. In order to control and prevent this pathogen identification and biological characteristics of the pathogen causing purple leaf blotch on garlic was carried out. The pathogen was identified as *Stemphylium solani* based on its morphology, and rDNA - ITS sequence. Biology characteristic research demonstrated that *Stemphylium solani* grew well at a temperature range of 20~30℃, the optimum temperature is 25℃. The most suitable pH is 6~8; Galactose were found to support the mycelia growth fastest, next to Mannitol and Lactose, whereas starch, glucose, sucrose and maltose support the least growth; Different nitrogen source influenced growth obviously. Calcium nitrate and Potassium nitrate were found to support growth best, next to yeast extract and carbanade, whereas peptone, glutamate and ammonium chloride supported the least growth. The lethal temperature for mycelia growth is at 55℃ for 10 min.

Key words: Garlic; purple leaf blotch; *Stemphylium solani*; biological characteristic

前 言

大蒜在我国种植历史悠久,且医用功效颇多。大蒜有很强的抑制细菌生长作用,能增强机体自身的免疫系统功能,降低胆固醇及甘油三酯,使血液的黏稠度下降,减少血液凝固的危险,有助于降低血压。大蒜还有预防感冒、关节炎、肝脏疾病的作用。由于大蒜功能多,现在越来越多的被人们所重视,国内外的大蒜产业竞相出现。

近几年来,湖北省政府、科技厅及有关部门高度重视湖北大蒜产业的发展,大蒜已在当阳、广水等地大面积规模化种植,成为当地农业增效、农民增收的支柱产业,仅当阳市 2004 年种植面积达 10 万亩,由于大面积集约化种植,加之大蒜品种单一,当地大蒜病害发生十分严重,2005 年在湖北省当阳市大蒜生产基地调查发现,发生在大蒜上的病害有白斑病、叶枯病、紫斑病和灰霉病,其中紫斑病发生严重。大蒜紫斑病主要危害叶片、蒜薹,贮藏期有时可侵染鳞茎,发病初期多从蒜尖或蒜薹中部产生灰色小斑点,中央微紫稍凹陷,渐扩大成椭圆形或纺锤形,呈黄褐色或暗紫色,湿度大时,病部产生黑色霉状物,呈同心轮纹,后期叶片

病斑连片造成叶片枯死,严重影响了大蒜的产量和品质(商鸿生和王树权,1997)。2005 年该病在两河镇 5.5 万亩大蒜生产区大面积流行,植株发病率在 95% 以上,平均产量损失超过 2/3,部分田块绝收,极大地打击了蒜农的种蒜积极性。

本文主要通过形态学和分子生物学对大蒜紫斑病进行病原鉴定,并对其生物学特性进行了研究,以期对大蒜紫斑病的防治奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌株分离培养及单孢纯化

1.1.1 菌株分离培养

病株于 2005 年 5 月采自湖北省当阳市两河镇。采用常规的组织分离法分离病原菌(方中达,1995),在 PSA 平板上培养,待纯化。

1.1.2 菌株单孢纯化

配制孢子悬浮液(低倍镜下每视野 20~30 个孢子),采用划线稀释法于水琼脂平板上进行单孢分离,2d 后,将单孢菌落移至 PSA 平板上培养。病原菌经纯化后保存在 PSA 斜面上,置于 4℃ 的冰箱中贮存备用(李祥等,1998)。

1.2 菌株致病性测定

将供试菌株移植于 PSA 平板上培养 7d 后,用内径为 6mm 的打孔器在菌落边缘打孔,接种菌丝块于健康的大蒜叶片。接种前用自来水冲洗叶片表面,70% 酒精表面消毒,无菌水冲洗 3 次。然后将接种的大蒜植株置于 25℃ 的温室内保湿培养,设未接种的叶片作对照。接种 2 天后移去菌丝块,观察病斑的扩展情况,计算发病率。

1.3 病原菌形态学鉴定

1.3.1 菌落培养性状观察

将病原菌接种到 PSA 培养基上,在 25℃ 连续光照条件下培养 5 天后观察菌落形态及颜色,并用交叉法测量菌落直径。

1.3.2 分生孢子的形态学观察

在采集病叶的病斑上,挑取少量霉层制成玻片在光学显微镜下观察病原菌的分生孢子和分生孢子梗的形态特征。在活化 7 天的菌落边缘挑取少量菌丝均匀涂于中心含有 10mm 方孔的滤纸上,置灭菌培养皿中保湿培养,5 天后进行产孢表型观察(张天宇,2003)。依据 Simons 等的分类方法进行病原菌种的鉴定。

1.4 rDNA-ITS 区的 PCR 扩增与测序

1.4.1 基因组 DNA 的提取

将单孢纯化后的病原菌接到铺有灭菌玻璃纸的 PSA 平板上,6d 后收集菌丝。采用微波法提取病原菌的基因组 DNA(徐平东和李梅,1994)。

1.4.2 引物

以通用引物 ITS1 和 ITS4 对 rDNA-ITS 区进行 PCR 扩增,其序列如下:

ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'; ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATIGATATGC - 3'。

1.4.3 PCR 反应条件

PCR 反应体系总体积 50 μ L,反应液为:10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L,25mmol/L MgCl₂ 5 μ L,2.5mmol/L dNTP 2 μ L,5U/ μ L Taq 酶 0.4 μ L,引物 ITS1 和 ITS4 各 1 μ L(25 μ mol/L)(以上试剂均由上海 sangon 公司提供),模板 DNA 10ng,补足 ddH₂O 使总体积达到 50 μ L,在 Ti-PCR 仪上扩增。

反应程序:94℃ 预变性 4min,进入循环:94℃ 变性 1min,54℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1min,共 36 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物委托北京华大中生科技发展有限公司进行纯化和 DNA 测序(陈庆河等,2004)。

1.4.4 序列分析

将分离菌株的 rDNA-ITS 区序列与互联网 GenBank 中核酸数据库中的相关序列的 ITS 区进行同源性比较 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。

1.5 病原菌生物学特性

1.5.1 不同温度对菌丝生长的影响

将直径为 6mm 的菌丝块置于 PSA 平板上,分别在 5,10,15,20,25,30,35℃下培养,每处理重复 4 皿,6d 后用十字交叉法测量菌落直径(张定法,1997)。

1.5.2 不同 pH 值对菌丝生长的影响

以 PSA 培养基为基础,用 0.1mol/l HCl 和 0.1 mol/l NaOH 调节 pH 值分别为 4,5,6,7,8,9,10。在不同 pH 值的 PSA 平板上接种直径为 6mm 的菌丝块,置于 25℃连续光照的培养室中培养。每处理重复 4 皿,6d 后用十字交叉法测量菌落直径。

1.5.3 不同碳源对菌丝生长的影响

以查彼克培养基(2.00gKNO₃, 1.00gKH₂PO₄, 0.5gKCl, 0.5gMgSO₄·7H₂O, 0.01gFeSO₄, 30.0g 蔗糖, 1000ml 蒸馏水, 17g 琼脂)为基础(方中达,1995),用含有相当碳的甘露醇、半乳糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、淀粉代替查彼克培养基中 30g 蔗糖,做成不同碳源的固体培养基,以不加碳源的查彼克培养基作为对照。分别将直径为 6mm 的菌丝块接种在培养基上,每处理重复 4 皿,置于 25℃连续光照的培养室中培养,在 6d 后用十字交叉法测量菌落直径。

1.5.4 不同氮源对菌丝生长的影响

以查彼克培养基为基础,用含有相当氮的氯化铵、酵母膏、硝酸钙、尿素、蛋白胨、谷氨酸(J. Chen and H. Ferris, 2002)代替查彼克培养基中的 2.00g 硝酸钾,做成不同氮源的固体培养基,以不加碳源的查彼克培养基作为对照。分别将直径为 6mm 的菌丝块接种在培养基上,每处理重复 4 皿,置于 25℃,连续光照的培养室中培养,在 6d 后用十字交叉法测量菌落直径。

1.5.5 菌丝致死温度测定

将在 PSA 平板上培养 7 d 的病原菌菌丝块装入无菌小试管中,加入 2ml 无菌水,分别放入温度为 45, 50, 55, 60, 65, 70℃的水浴锅内,加热 10min,取出后立刻在冷水中冷却至室温。然后将处理后的菌丝块接入倒好的 PSA 平板中央,置于 25℃条件下连续光照培养。每个处理设置 4 个重复。培养 6 天后观察菌丝生长情况。

1.5.6 数据处理与分析

用 Excel 2003 中的方差分析程序分析温度、pH 值、碳源和氮源对病菌菌丝生长的影响,并用新复极差法(盖钧益, 2000)比较不同处理的显著差异(P=0.05)和极显著差异(P=0.01)。通过 Excel 作图,所有图表中的正负偏差均表示 ± SE。

2 结果与分析

2.1 菌株致病性测定

将菌丝块接种到水培离体大蒜植株的叶片上,接种菌株对大蒜叶片的侵染率为 100%。在接种 2d 取下药块时便出现病斑,病斑灰褐色,纺锤型。去掉菌丝块 3d 后,病斑逐渐变黑,湿度大时出现黑色霉层,病斑边缘有黄色晕圈(图 2-1)。这与采集于当阳病害标本发病情况相似。从发病植株上可重新分离得到该病菌,重新分离得到的病原菌培养性状、分生孢子形态,均与接种病原菌相同,因此根据柯赫氏法则,确定该分离物为大蒜紫斑病的致病菌。

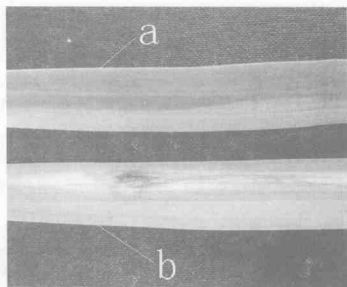


图 2-1 接种 5d 后大蒜叶片的发病症状(a 健康叶片;b 接种叶片)

Fig.2-1 The symptom of garlic leaf inoculated with isolate at after 5 day (a. health leaf; b. inoculated leaf)

2.2 病原菌鉴定

2.2.1 菌落培养性状

在 PSA 培养基上,菌落圆形,边缘规则,绒毛状,菌落中央初为灰白色,第 5d 后变为褐色。病菌分泌黄色色素,第二天培养基变为黄色,第五天培养基变为黄褐色。培养 5d 后,菌落平均直径为 44.1mm。

2.2.2 分生孢子(梗)形态及大小

在自然寄主上,分生孢子梗暗褐色,分隔, $105.5 \sim 170.0 \times 3.4 \sim 5.1 \mu\text{m}$,顶端膨大。分生孢子圆柱状或桶状,褐色,有的稍微弯曲。具有 3~5 个横隔膜,其中有 1~3 个明显缢缩,特别是中间隔膜颜色较深;有 2~7 个纵隔膜。分生孢子 $25.5 \sim 55.1 \times 17.0 \sim 34.4 \mu\text{m}$,长宽比约为 2:1(图 2-2)。

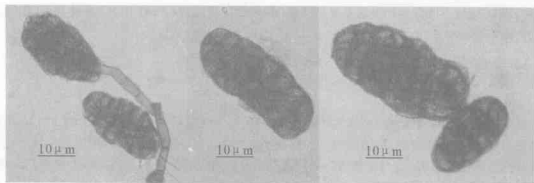


图 2-2 分生孢子及分生孢子梗形态特征

Fig.2-2 Morphological characteristics of conidium and conidiophore

2.2.3 产孢表型

分生孢子梗直立,单生,顶端囊状膨大,分生孢子以内壁芽生式从产孢梗的顶端囊状膨大体处产生(图 2-3)。

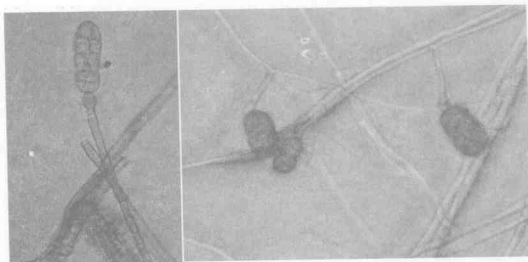


图 2-3 产孢表型

Fig. 2-3 Characteristics of sporulation

2.2.4 形态学鉴定结果

由典型特征:分生孢子梗 $105.5 \sim 170.0 \times 3.4 \sim 5.1 \mu\text{m}$,分生孢子 $25.5 \sim 55.1 \times 17.0 \sim 34.4 \mu\text{m}$,长宽比约为 2:1,其中有 1-3 个明显缢缩,特别是中间隔膜颜色较深,分生孢子以内壁芽生式从产孢梗的顶端囊状膨大体处产生(魏景超,1982)。根据 Simons 等的分类方法,将该病原菌鉴定为:茄柄柄霉 *Stemphylium solani*。

2.3 rDNA - ITS 区的 PCR 扩增与测序

通过对 ITS 区测序,获得了 552bp 的基因序列。在 BLAST 中进行序列同源性比较发现, *S. solani* 得分最高为 1019,说明其匹配的碱基数目最多,其同源性为 99%。由此可进一步证实该病菌为: *S. solani*。

表 2-1 ITS 区序列同源性比较

Table. 2-1 Homologous comparison of the sequences of ITS region

Genebank accession number	Strains	Score (Bits)	Identity	E value
gi 6625901 gb AF203450.1	<i>Stemphylium solani</i> strain SS31 18S ...	1019	99%	0
gi 6625900 gb AF203449.1	<i>Stemphylium solani</i> strain SS28 18S ...	1019	99%	0
gi 6625899 gb AF203448.1	<i>Stemphylium solani</i> strain SS21 18S ...	1019	99%	0
gi 3688538 emb Y17068.1	<i>Stemphylium botryosum</i> rRNA g...	989	98%	0
gi 7546966 gb AF229481.1	<i>Pleospora tarda</i> strain ATCC...	985	98%	0
gi 6009744 dbj AB026165.1	<i>Pleospora herbarum</i> gene for 18S rR...	977	98%	0
gi 6009743 dbj AB026164.1	<i>Pleospora herbarum</i> gene for 18S rR...	977	98%	0
gi 6009742 dbj AB026163.1	<i>Pleospora herbarum</i> gene for 18S rR...	977	98%	0
gi 7546969 gb AF229484.1	<i>Stemphylium vesicarium</i> .	975	98%	0

2.4 生物学特性测定

2.4.1 不同温度对菌丝生长的影响

由图 2-4 可知,菌丝在 5~35℃ 范围内均能生长,在 20~30℃ 之间生长较好,其中最适生长温度为 25℃。

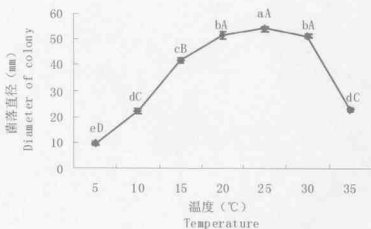


图 2-4 不同温度对 *S. solani* 菌丝生长的影响

Fig. 2-4 The effect of different temperatures on mycelial growth of *S. solani*

注:图中小写字母表示显著差异,大写字母表示极显著差异,以下各图同

2.4.2 不同 pH 值对菌丝生长的影响

结果表明(图 2-5),菌丝在 pH 值为 4~10 的培养基上均可生长,但在 pH 值为 6~8 时生长最好。说明该菌在酸、碱条件下均能正常生长。

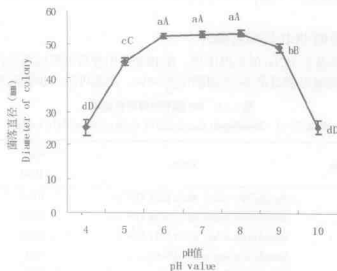


图 2-5 不同 pH 值对 *S. solani* 菌丝生长的影响

Fig. 2-5 The effect of different pH values on mycelial growth of *S. solani*

2.4.3 不同碳源对菌丝生长的影响

由图 2-6 分析得知,该菌对不同碳源利用广泛。对半乳糖利用最好;对甘露醇、乳糖利用次之;对淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖利用最差。另外菌丝在无碳源的查彼克培养基上生长较快,但菌落很稀薄。

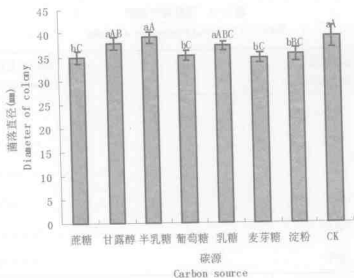


图 2-6 不同碳源对 *S. solani* 菌丝生长的影响

Fig.2-6 The effect of different carbon sources on mycelial growth of *S. solani*

2.4.4 不同氮源对菌丝生长的影响

在 7 种不同的供试氮源中(图 2-7), *S. solani* 对硝酸钾、硝酸钙的利用效果最佳;其次是酵母膏、尿素;对蛋白胨、谷氨酸、氯化铵利用最差。

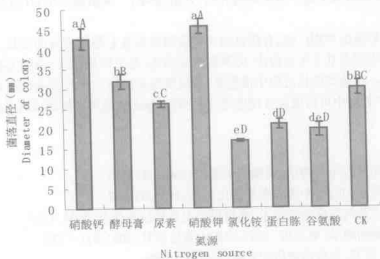


图 2-7 不同氮源对 *S. solani* 菌丝生长的影响

Fig.2-7 The effect of different nitrogen sources on mycelial growth of *S. solani*

2.4.5 菌丝致死温度

表 2-2 表明,在 50℃的水浴中处理 10min,菌丝块均能在 PSA 培养基上长出菌落,而在 55℃水浴处理 10min 后便完全致死,故菌丝的致死温度为 55℃,10min。

表 2-2 菌丝致死温度
Table. 2-2 Lethal temperature of mycelia

处理温度 (Temperature)	菌丝生长情况 (growth of colony)
45℃	++++
50℃	++++
55℃	-----
60℃	-----
65℃	-----
70℃	-----

注:“+”表示生长,“-”表示不生长,每个“+”或“-”代表一个重复。

3 结论与讨论

通过病菌的致病性测定、形态学和分子生物学鉴定,确定引起湖北省当阳市大蒜紫斑病的病原菌为 *S. solani*,而已报道引起紫斑病的病原有 *Stemphylium. vesicarium* 和 *Alternaria. porri* (A. M. Prados - Ligeró and M. J. Basallote - Ureba, 1998; H. Suheri and T. V. Price, 2000),因此 *S. solani* 系引起大蒜紫斑病的一种新病原。在以往的国内外文献报道中,*S. solani* 主要侵染棉花、番茄、马铃薯、豇豆、茼蒿等作物(达存堂, 2004),未见有侵染大蒜的研究论文,本文报道尚属首次。

病原菌生物学特性研究表明,菌丝在 5~35℃均能生长,适宜生长温度 20~30℃,其温度适应范围广。这与该病在春、冬季节都可发生这一事实是吻合的(方甜, 2005)。该菌菌丝在 pH 值为 4~10 均可生长,最适 pH 值范围为 6~8。

大蒜紫斑病菌对碳源的利用广泛,在供试的 7 种碳源培养基上都能较好的生长,但彼此间存在差异,尽管在无碳源的查彼克培养基上生长较快,但菌落生长稀薄,总生物量最低,说明无碳源是不利于菌丝生长的。氮源对 *S. solani* 在菌丝生长过程中很重要,不同氮源对菌丝生长的影响显著差异,硝酸钾最优,氯化铵最差,因此在生产管理中可以通过合理施肥,减少硝态氮肥的使用来控制该病害的发生。

参考文献

- [1] 方甜. 大蒜紫斑病的发生与防治. 安徽农学通报. 2005, 11(2): 57
- [2] 方中达. 植病研究法. 北京: 中国农业大学出版社. 1995, 85~87
- [3] 达存堂. 大蒜病害及其综合防治技术. 植物保护农业科技与信息. 2004, 4: 13
- [4] 许志刚. 普通植物病理学. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 337~338
- [5] 李祥, 李国庆, 姜道宏. 普通植物病理实验指导[M]. 1998
- [6] 李正萍, 李荣熹, 刘彩凤等. 小麦根腐病菌鉴定及其生物学特性测定. 华北农学报. 2002, 17(2): 44~48
- [7] 陈庆河, 翁启勇, 王源超等. 福建省大豆疫病病原菌鉴定及核糖体 DNA-ITS 序列分析[J]. 植物病理学报. 2004, 34(2): 112~116

- [8] 赵杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用. 陕西农业科学. 2004(4):35-37
- [9] 张定法, 徐瑞法, 张希福等. 玉米弯孢菌叶斑病菌生物学特性测定的研究[J]. 河南职业技术学院. 1998, 26(1):18-20
- [10] 张天宇. 中国真菌志. 科学出版社, 2003
- [11] 徐平东, 李梅. 聚合酶链式反应(PCR)在植物病害诊断检测上的应用. 福建省农科院学报. 1994, 9(1):51-56
- [12] 商鸿生, 王树权. 关于大蒜病害调查和病原鉴定. 西北农业大学. 1997
- [13] 盖钧镒. 试验统计方法. 北京: 中国农业出版社. 2000, 6:99-107
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982
- [15] A. M. Prados - Ligeró, M. J. Basallote - Ureba. Development of *Pleospora allii* on garlic debris infected by *Stemphylium vesicarium*. European Journal of Plant Pathology. 1998, 104: 861-870
- [16] H. Suheri, T. V. Price. The epidemiology of purple leaf blotch on leeks in Victoria, Australia. European Journal of Plant Pathology. 2000, 107: 503-510
- [17] H. Suheri, T. V. Price. *Stemphylium* leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in Australia. Australasian Plant Pathology. 2001, 29: 192-199
- [18] H. Suheri, T. V. Price. Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controlled environments. Plant pathology. 49: 375-382
- [19] J. Chen, H. Ferris. Growth and nitrogen mineralization of selected fungi and fungal - feeding nematodes on sand amended with organic matter. Plant and Soil. 2002, 18: 91-101
- [20] V. Rossil, E. Pattori, S. Giosue. Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium* the Pathology. 2005, 111: 361-370

玉米秸秆固体培养基发酵木霉技术初探

学 生:程中山
专 业:植物保护
指导教师:肖炎农

摘 要:为探索出玉米秸秆固体培养基发酵木霉的最佳条件配比,本试验测定了玉米秸秆固体培养基的含水量、接种量、堆料高度、添加成分(氯化钾、氯化钙和尿素)对木霉产孢量的影响。结果表明:在 pH 值自然和温度为 28℃ 时,玉米秸秆固体培养基的最佳条件配比是:含水量 66.7~71.4%,接种量 6%,堆料高度 4cm~6cm,添加氯化钾和氯化钙的量均为 0.3%。

关键词:玉米秸秆;木霉;固体发酵;分生孢子产量

Solid State Fermentation of *Trichoderma* sp. with Corn Straw

Student: Cheng Zhongshan
Major: Plant Protection
Instructor: Xian Yannong

Abstract: In order to optimized solid state fermentation of *Trichoderma* sp. with corn straw, the influences of water ratio, dosage of spores, height of smashed corn straw, and additional mineral substances were studied under 28℃ with natural pH. The results showed that the fungus could produce largest amount of spores under the following conditions: water ratio 66.7%~74.1%, dosage of spores 6%, height of smashed corn straw 4cm~6cm, potassium chloride 0.3%, and calcium chloride 0.3%.

Key words: Corn straw; *Trichoderma* sp.; solid state fermentation; spore production

绪 论

木霉(*Trichoderma* sp.)具有比一般病原真菌强的竞争和生存能力,能产生胶霉素和绿色菌素,对腐霉菌、链格孢菌、烟草疫霉、立枯丝核菌、胶孢炭疽菌均有不同程度的拮抗作用,而且有些木霉菌能够重寄生烟草黑胫病、立枯病和炭疽病的菌株,尤其在防治土传病害中起着重要作用^[1-3]。绿色木霉是一种资源丰富的拮抗微生物,在植病生防中具有重要的、不可忽视的作用。它的作用机制有以下几种:产生抗生素;重寄生作用,这是木霉菌作为拮抗菌最重要的机制;溶菌作用;竞争作用(主要为对生存空间和营养的竞争)^[4]。真菌细胞壁的主要成分是几丁质(卵菌为纤维素)和 β -(1-3)葡聚糖,还有少量的蛋白质和脂肪。木霉菌在侵入或穿透寄主菌丝细胞时,能产生几丁质酶、葡聚糖酶(包括 β -(1-3), β -(1-4), β -(1-6)葡聚糖酶)、蛋白酶以及脂酶等一系列水解酶类,来消解病原菌的细胞壁。在这些细胞壁降解酶中,几丁质酶和葡聚糖酶是目前生物防治研究的热点,被认为是影响生防真菌重寄生能力的重要因子。在抗生作用中,木霉可以产生拮抗性化学物质来毒害植物病原真菌,这些物质包括抗生素和一些酶类。Brukner 等^[2]用绿色木霉分离提纯了一组特殊的抗菌肽,分别为 trichobrachin 和 trichovirin。Sonia 等人^[23]研究发现绿色木霉能产生可挥发性的次级代谢产物,通过这种物质影响其它真菌的蛋白质合成和生长速度,从而起到抑菌作用。另外,绿色木霉对植物致病真菌都具有拮抗作用^[5],绿色木霉 LITE12-1 对黄瓜枯萎病菌有很强的拮抗作用,主要作用方式为位点竞争、营养竞争和抗生作用。LITE12-1 的主要抗生机制是,产生几丁质酶、 β -(1-3)-葡聚糖酶和蛋白酶消解病原菌细胞壁,从而杀灭病原菌^[6]。此外,经田间试验证实,绿色木霉对棉花枯萎病具有较高的防效作用^[7]。Ucker E.T.B 等人指出,在防止木材被担子菌类感染而产生腐蚀时,绿色木霉可有效地防止木材的腐烂。英国研究员 Brown H.L 也指出,绿色木霉可有效地防

止木材缓慢腐烂和担孢菌的腐蚀。加拿大科学家 Ahmad 等人还发现, 蘑菇菌素的存在对绿色木霉的氮代谢有重要作用, 在它的存在下, 木霉菌很容易被杀死。以前绿色木霉菌的应用大都集中于土壤传染病害研究上, 人们从实践中逐渐认识到, 叶面微生物的种群可直接或间接地影响叶面以至其它部位病害, 这促使人们从土传和根部病害生物防治的注意力扩展到叶面微生物^[8]。

绿色木霉在农业和环境保护领域具有重大应用前景, 自然界的有机固体废弃物中含有大量的纤维素类物质, 利用纤维素酶将纤维素水解成葡萄糖称为纤维素的生物转化工艺, 它对缓解世界粮食危机, 提高固体废弃物资源化水平都具有十分重要的意义^[24], 生物转化的关键工艺就是纤维素酶的生产。目前, 考虑到纤维素酶的生产成本。固态发酵法已逐渐成了人们研究的焦点。它相对于传统的深层液体发酵法, 有着空间要求小、原料价值低、操作简便和二次污染少等一系列优点^[24-25]。为了提高固态发酵的效率, 增加纤维素酶的量, 人们已经在优化其工艺上开展了很多工作^[9], 但是我国对于绿色木霉的研究多集中在纤维素酶活性和生物防治方面。我国有丰富的纤维素物质资源, 仅农作物秸秆一项就年产 6 亿多吨。但目前我国农作物秸秆的利用率不高, 相当数量被自然腐败或燃弃。利用生物降解方法综合利用农作物秸秆, 不但方法可行, 而且日益显示出推广这项工作的迫切性。纤维降解是利用农作物秸秆的重要步骤。由于酶解方法反应条件温和, 污染小, 属于绿色化学工业, 符合可持续发展战略。因此, 纤维素酶解的研究得到广泛的重视^[10]。绿色木霉在对有机污染的生物修复中具有一定的作用。Smith WH 等的试验证明, 绿色木霉能够降解有机氯。近几年还发现绿色木霉的菌丝对有毒金属, 如 Cu 和 Cd 具有向化性。国外的研究表明在底物浓度较低的固体培养基(0.1mmol/L Cd, Cu 和 Zn)上, 绿色木霉菌落的生长受到限制, 但当培养基中有足够多的可利用的碳源(葡萄糖)时, 这种毒金属物质的毒性作用明显减弱。这种有毒金属对绿色木霉菌丝和菌丝分枝的形式和长度都有影响。绿色木霉在有机污染生物修复中应用, 仍需要人们进一步去探讨。随着这方面的研究不断深入, 绿色木霉在防治金属污染中将会到实际应用。在产纤维素酶高产木霉菌株的改良研究中, 已有一些种内、种间甚至属间的生质体融合的报道。在分子水平上, 对绿色木霉进行改造已经成为可能。因此, 绿色木霉必将出现更为广阔的开发应用前景^[11]。

到目前为止, 人们已开发出防治烟草黑胫病、烟草猝倒病、立枯丝核病和根结线虫病等植物病害的木霉生防农药, 并且防治效果明显^[12, 26-29]。但目前国内木霉发酵大多采用麦麸和玉米粉等价格较高的培养基质, 使得木霉制剂价格过高, 难以在生产上大规模应用。本试验用玉米秸秆固体培养基发酵木霉, 测定了在 pH 值自然条件下, 玉米秸秆固体培养基的含水量、接种量、堆料高度和添加成分(氯化钾、氯化钙和尿素)对木霉分生孢子产量的影响。旨在研制出廉价有效的木霉玉米秸秆固体发酵方法, 为玉米秸秆工业化生产木霉提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

木霉菌种 T601 由华中农业大学植物科学技术学院线虫实验室分离保存。

1.2 菌种制备及玉米培养基制备

1.2.1 一级菌种

将木霉菌种 T601 试管种在无菌条件下接种于装有 PDA 培养基的培养皿中, 放入 28℃ 恒温箱中培养, 待木霉菌丝长满整个培养皿后, 放入 4℃ 的冰箱中冷藏。

1.2.2 二级菌种

将新鲜麦麸与水按 1:1 配制后, 以 500ml 罐头瓶罐装(装料高度为瓶高的 1/2), 放入高压锅中灭菌约 30 分钟, 冷却后在无菌条件下接种 T601 菌块, 再用塑料薄膜封好后再转入 27℃ 恒温箱中培养, 待菌丝长满整个罐头瓶并产生大量孢子后, 放入 4℃ 冰箱中冷藏。

1.2.3 玉米秸秆培养基制备

所用干燥玉米秸秆均用农用粉碎机粉碎, 使其直径约 0.5 厘米。再按不同实验情况与水、添加元素混匀, 待灭菌后备用。

1.3 试验设计

1.3.1 玉米秸秆固体培养基含水量试验

以温度、pH 值、接种量(按重量接二级菌种)、玉米秸秆固体培养基堆料高度为定量(28℃, 自然, 10%, 4cm), 玉米秸秆固体培养基含水量为变量, 依次设以下 6 个处理, 每个处理四个重复: 50% (含水配比 1:1), 60% (含水配比 1:1.5), 66.7% (含水配比 1:2), 74.1% (含水配比 1:2.5), 75% (含水配比 1:3) 和 77.8% (含水配比 1:4)。经灭菌、接种(无菌条件下进行)、用塑料薄膜封好后, 放入 28℃ 恒温箱中培养 19 天, 测定其产分生孢子产量。

1.3.2 接种量试验

以温度、pH 值、玉米秸秆固体培养基堆料高度、含水量为定量(28℃, 自然, 4cm, 74.1%), 玉米秸秆固体培养基接种量(按重量接二级菌种)为变量, 依次设以下 5 个处理, 每个处理四个重复: 1%、4%、6%、8% 和 10%。经灭菌、接种(无菌条件下进行)、用塑料薄膜封好后, 放入 28℃ 恒温箱中培养 19 天, 测定其分生孢子产量。

1.3.3 玉米秸秆固体培养基堆料高度试验

以温度、pH 值、接种量(按重量接二级菌种)、含水量为定量(28℃, 自然, 2g, 71.4%), 玉米秸秆固体培养基堆料高度为变量, 依次设以下 5 个处理: 2cm, 4cm, 6cm, 8cm 和 10cm。每个处理四个重复, 经灭菌、接种(无菌条件下进行)、用塑料薄膜封好后, 放入 28℃ 恒温箱中培养 19 天后, 测定其分生孢子产量。

1.3.4 玉米秸秆固体培养基添加成分(氯化钾、氯化钙和尿素)试验

以温度、pH 值、接种量(按重量接二级菌种)、玉米秸秆固体培养基堆料高度、含水量为定量(28℃, 自然, 10%, 4cm, 71.4%), 添加成分的量(氯化钾、氯化钙和尿素)为变量, 分别对氯化钾、氯化钙和尿素依次设 6 个处理: 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、空白对照。每个处理四个重复, 经灭菌、接种(无菌条件下进行)、用塑料薄膜封好后, 放入 28℃ 恒温箱中发酵培养 20 天后, 测定其分生孢子产量。

1.3.5 正交试验

利用 5 因素 4 水平的正交试验按下表 1-1 方案用玉米秸秆配制固体培养基, 经灭菌、接种(按重量接二级菌种)和用塑料薄膜封好后, 将其放入 28℃ 恒温箱中培养约 19 天, 再测定其孢子产量。

表 1-1 正交试验设计

Table 1-1 The design of orthogonal experiment

因素	含水配比	接种量(%)	料高(cm)	添加氯化钙量 (%)	添加氯化钾 (%)
1	1:1.5	4	4	0.1	0.1
2	1:1.5	6	6	0.2	0.2
3	1:1.5	8	8	0.3	0.3
4	1:1.5	10	10	0.3	0.4
5	1:2	4	6	0.3	0.4
6	1:2	6	4	0.3	0.3
7	1:2	8	10	0.1	0.2
8	1:2	10	8	0.2	0.1
9	1:2.5	4	8	0.3	0.2
10	1:2.5	6	10	0.3	0.1
11	1:2.5	8	4	0.2	0.4
12	1:2.5	10	6	0.1	0.3
13	1:3	4	10	0.2	0.3
14	1:3	6	8	0.1	0.4
15	1:3	8	6	0.3	0.1
16	1:3	10	4	0.3	0.2