

草莓灰霉病菌的培养及其毒素的生物测定

孙文元 翟玉柱 赵凤岩

(河北省沧州市农林科学院 061001)

摘要 草莓灰霉病菌(*Botrytis Ciennea* Persoon)在 21~25℃ 下 pH 3~4 的霉菌生长培养基中培养产生毒素,致使草莓愈伤组织细胞的活性丧失。产生毒素的高峰期在静置培养 20 d,培养滤液用氯仿萃取,所得粗提物稀释 90 倍后仍有毒性存在,30 倍稀释的毒素溶液处理愈伤组织,用荧光法观察,1.0 h 细胞致死率达 86%,2.5 h 细胞致死率高达 99.9%。

关键词 草莓灰霉病菌 毒素 荧光

中图分类号 S436.639 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7091(1999)增刊-0112-06

草莓灰霉病菌是在草莓生长后期寄生于草莓果实上的一种霉菌,致使果实霉烂,严重影响草莓的产量和质量。华北地区作为全国主要的草莓生产区,每年都因该病为害遭受很大的经济损失,对真菌毒素的研究已有不少报道,利用病原菌产生的毒素作为筛选剂来培养抗病植株,国内外也做了大量工作^[1~3]。利用细胞工程技术,以灰霉菌毒素为筛选剂来培养草莓抗病新品种是解决这一生产问题的有效方法。本研究首先对草莓灰霉菌的培养、毒素产生及生物测定进行了研究,作为草莓抗病育种研究的一部分。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种:灰霉病菌(*Botrytis Ciennea* Persoon)由草莓病果分离;草莓愈伤组织(*Calli of Fragaria ananassa*)。

1.2 培养基及试剂

PDA 培养基:成分为马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水 1000 mL。固体培养基用于病菌的分离培养和菌种保存,液体培养基用于菌体培养。

霉菌生长培养基(GM)^[4]:成分,葡萄糖 10 g,柠檬酸钠 3 g, KH_2PO_4 5 g, NH_4NO_3 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g,酵母膏粉 0.25 g,水 1000 mL。pH 分别为 2、3、4、5、6。装入 250 mL 三角瓶中 100 mL/瓶,0.1 MPa/cm² 灭菌 30 min;草莓愈伤组织诱导培养基:成分,MS^[5]附加 NAA、BA 各 0.5 mg,蔗糖 3000 mg/L,酪蛋白 300 mg/L, pH 5.8。

荧光素溶液:FDA 50 mg 先配成丙酮溶液,再用 pH 5.8 的磷酸缓冲液溶解,定容至 1000 mL,得 5×10^{-2} mg/mL 的 FDA,置冰箱保存备用。

氯仿:分析纯,用于毒素提取。

1.3 方法

1999-01-31 收稿。

作者简介:孙文元,男,1968 年生,助理研究员,理学学士,主要从事农业科研工作。

灰霉病菌的培养:将斜面保存的灰霉病菌活化后,每管加生理盐水 5 mL 制成孢子悬液,按 1% 的接种量接入液体培养基中,21℃ 摇床培养以选择合适的生长条件,或 25℃ 静置培养,滤液进行毒素测定和提取。

草莓愈伤组织的诱导:取草莓花蕾,用 75% 乙醇浸泡 30 s,再用升汞灭菌 10 min,无菌水冲洗 4~5 次,用解剖刀将花蕾切开,将萼片接种到愈伤组织诱导培养基上,25~28℃ 下培养,长出愈伤组织后,经多次继代,得到疏松的、分散性好的草莓愈伤组织。

毒素的提取:取 25℃ 静置培养 23 d 的发酵液,经三层纱布过滤后得滤液 600 mL,先于 50℃ 下减压浓缩到 60 mL,用等体积的氯仿萃取 5 次,收集氯仿溶液,50℃ 下进行减压浓缩成浓浆状物,得毒素粗提物 6 mL。

毒力测定:取静置培养 7、14、17、18、19、20、21、22、23 d 的发酵滤液和用 MS 培养基 30 倍、60 倍、90 倍稀释的毒素粗提物溶液及植物培养基,霉菌生长培养基,调 pH 值到 5.8,分别处理愈伤组织细胞,于不同时间内测定细胞致死情况。荧光法测定毒素含量,取草莓疏松愈伤组织分散于 5 mL 待测液中,处理不同时间后,取 1 滴静置洁净的载玻片上,加 1 滴 FDA,3 min 于荧光显微镜下观察,产生荧光的细胞有活性,无荧光的细胞已失去活性。

2 结果与讨论

2.1 灰霉病菌培养

用不同 pH 值 GM、PDA 培养基,在 21℃ 下 200 r/min,摇床培养,观察结果如表 1,图 1。由表 1、图 1 可以明显看出,培养基的种类及 pH 对灰霉病菌的生长影响很大,GM 培养基适合于灰霉病菌的生长,pH3~4 是其生长的最适 pH 值。

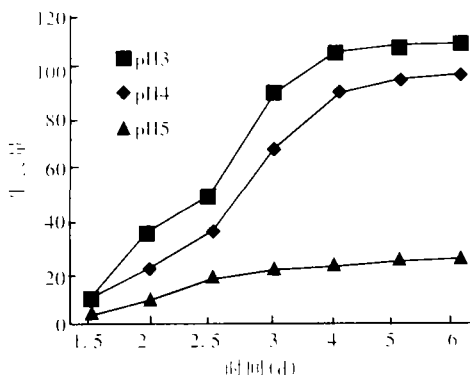


图1 灰霉病菌于不同 pH 值的 GM 培养基中的生长量

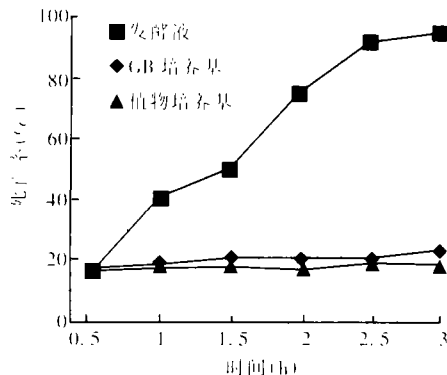


图2 不同溶液对愈伤组织细胞的影响

发酵液为静置培养 23 d 的滤液

2.2 灰霉病菌毒素产生及其毒力测定

2.2.1 不同溶液对愈伤组织细胞的影响 对不同溶液处理后的草莓愈伤组织细胞死亡统计如图 2。由图 2 可以看出 GM 培养基与植物培养基对愈伤组织细胞的活力基本无影响,因此发酵滤液中的细胞死亡完全是由发酵液中毒素所引起的,证明了发酵滤液中的毒素的存在。

2.2.2 产毒高峰的测定 对静置培养不同时期的发酵滤液进行毒力测定,结果如表 2。由表

表 2 不同培养时期发酵滤液对愈伤组织细胞活性的影响

测定 时间(h)	测定项目	培 养 时 间 (d)					
		18	19	20	21	22	23
1.0	总细胞数(个)	304	392	281	1322	458	402
	死亡细胞数(个)	97	75	47	729	164	120
	致死率(%)	12	9	24	18	17	18
1.5	总细胞数(个)	304	214	292	810	827	862
	死亡细胞数(个)	97	188	272	484	536	509
	致死率(%)	12	69	80	50	52	54
2.0	总细胞数(个)	144	362	721	1622	838	496
	死亡细胞数(个)	56	357	715	1418	828	490
	致死率(%)	20	98	99	81	97	98

* 表中数据均按原愈伤组织细胞死亡率为 20% 处理。

2 可以看出,25℃ 下静置培养灰霉病菌,自第 18 d 开始有毒素产生,对 1.5 h 不同时期发酵滤液进行致死率比较,20 d 的致死率最高,21 d 后虽有些下降但趋于稳定,也就是说其毒素产生高峰期在 20 d,此产毒情况与一些真菌的产毒情况相同,均在菌体生长后期,如镰刀菌毒素的产生在 30 d 左右^[6],大丽轮枝菌毒素产生时间在 14 d 后^[7];产毒高峰期过后毒力有所下降,与水稻尾孢霉毒素的产生状况基本一致^[8]。

2.2.3 毒素粗提物毒力的测定 对三个不同稀释度的毒素溶液对愈伤组织细胞的致死情况统计如表 3、图 3 及图 4。

表 3 毒素粗提物对细胞活性的影响

处理时间 (h)	测定项目	不同稀释倍数毒素粗提物		
		30 倍	60 倍	90 倍
0.5	总细胞数(个)	597	662	486
	死细胞数(个)	444	286	72
	死亡率(%)	73.0	33.0	9.0
1.0	总细胞数(个)	672	790	486
	死细胞数(个)	565	552	126
	死亡率(%)	86.0	65.0	30.0
1.5	总细胞数(个)	817	572	436
	死细胞数(个)	782	396	192
	死亡率(%)	97.0	69.0	40.0
2.0	总细胞数(个)	720	827	612
	死细胞数(个)	712	751	296
	死亡率(%)	99.0	76.0	50.0
2.5	总细胞数(个)	532	478	432
	死细胞数(个)	530	466	317
	死亡率(%)	99.9	95.0	74.0

由图4可以看出,A中细胞的荧光强,即细胞活性强,存活率高,而C中细胞荧光弱,或根本无荧光,即细胞活性低或完全失去活性,证明C中大部分细胞失去活性是由于发酵滤液中毒素所致。

由表3、图3可以看出,其中30倍、60倍、90倍不同稀释倍数的毒素粗提物溶液浓度相当于原发酵液浓度的3.3倍、1.65倍、1.1倍。其中30倍、60倍的毒素粗提物溶液毒力比原发酵液有明显提高。90倍稀释的致死率与原发酵液致死率比较,1.5h的致死率基本一致,均为18%左右,因此其毒力基本相等。故认为用氯仿萃取的方法可以将培养液中的毒素基本上萃取出来,其细胞毒素为胞外毒素。本实验关于毒素的提取方法,以及萃取剂的选择等工作还有待于进一步完善和深入。

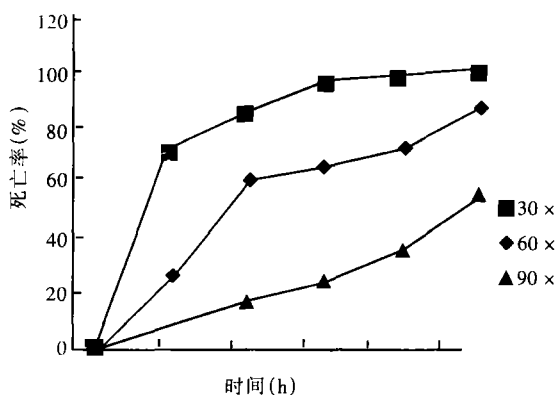


图3 毒素粗提物对草莓愈伤组织细胞的致死率

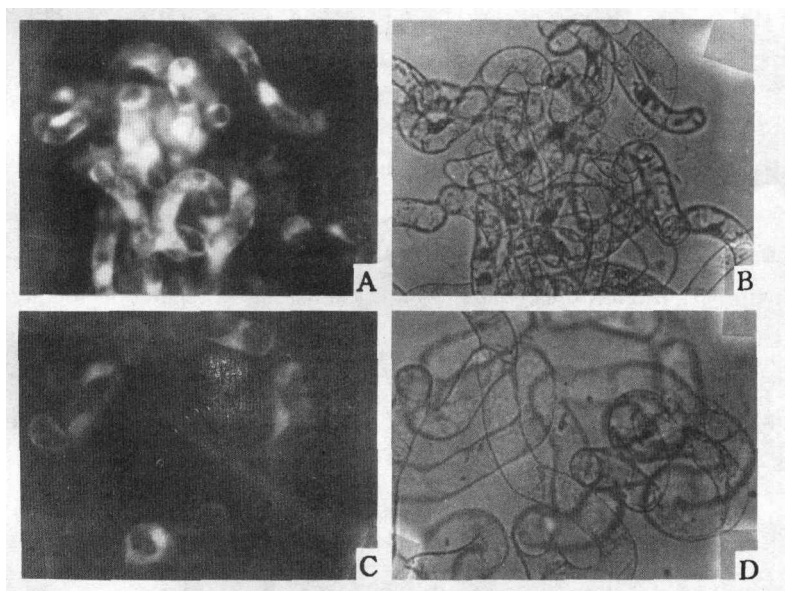


图4 不同稀释度毒素溶液对愈伤组织细胞的致死情况

- A. 植物培养基处理愈伤组织0.5h后细胞的荧光照片;
- B. 为A中细胞在可见光下的情况;
- C. 发酵滤液处理愈伤组织0.5h后细胞的荧光照片;
- D. 为C中细胞在可见光下的情况。

参 考 文 献

- 1 Green R J. A preliminary investigation of toxins produced *in vitro* by *V. albo-atrum*. *Phytopathology*, 1954, 44: 433~437
- 2 Gour N H, Dube HC. Effects of ouabain and phytotoxic membranes of cotton plants. *Physiol Plant Pathol*, 1985, 27: 109~118
- 3 韦石泉 等. 我国草莓病毒斑驳病毒研究鉴定. *植物病理学报*, 1994, 24(4): 293~298
- 4 Pederdy J F, Gibbon R K. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J Gen Microbiol*, 1971, 69: 325~330
- 5 崔山元, 林耀桂. 经济植物的组织培养与快速繁殖. 北京: 农业出版社, 1985, 13~14
- 6 匡开源 等. 镰刀菌毒素的研究. *真菌学报*, 1984, 4(3): 193~196
- 7 张元寿 等. 大丽轮枝菌毒素的分离、提纯及生物测定. *真菌学报*, 1989, 8(2): 140~147
- 8 陆仕华. 水稻尾孢霉毒素. *真菌学报*, 1985, 4(4): 240~254

Cultivation of Grey Mould Germ of Straw Berry and Biological Determination of Its Mycotoxin

Sun Wen yuan Zhai Yuzhu Zhao Fengyan

(Cangzhou Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Cangzhou 061001)

Abstract At temperature of 21 - 25℃, in substrate of pH 3 - 4, grey mould germ of straw berry produced mycotoxin, and the toxin can cause wound callus of straw berry to inactivate. Summit of mycotoxin was the 20 days. Cultivated liquid was leached, and then extracted with chloroform. The extractive which was diluted to 90 times still remained its toxicity. Wound callus was treated with mycotoxin solution which was diluted to 30 times, and then observed with fluorometry, mortality to cell was 86% in an hour and it was 99.9% in 2.5 hours.

Key words: Grey mould germ of straw berry; Toxin; Fluorometry