

# 四种棉花黄萎病毒素制备方法的比较

马春红<sup>1</sup>, 范尉尉<sup>2</sup>, 董文琦<sup>3</sup>, 刘子会<sup>1</sup>, 贾银锁<sup>1</sup>

(1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051; 2. 石家庄市疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050011;  
3. 河北省农林科学院, 河北 石家庄 050051)

**摘要:** 多年来大丽轮枝菌毒素的制备过程中常用几种不同的制备方法, 究竟不同方法制备的毒素在毒蛋白含量上与致病力上有多大区别, 长期以来一直没有定量分析的相关报道。本文就几种常见的方法加以比较, 在相同条件下本试验采用的方法四为最佳的试验方法。

**关键词:** 棉花; 黄萎病菌; 毒素; 制备方法; 比较

中图分类号: S562.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0257-03

## A Comparison of *Verticillium dahliae* Kleb Determined in Cotton by Four Extracting Methods

MA Chun hong<sup>1</sup>, FAN Wei wei<sup>2</sup>, DONG Wen qi<sup>3</sup>, LIU Zi hui<sup>1</sup>, JIA Yin suo<sup>1</sup>

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 2. Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050011, China; 3. Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

**Abstract:** *Verticillium dahliae* Kleb toxin extraction has been commonly used several extracting methods for many years. Actually, the different methods extracting toxin is a significant difference in the poisonous protein content and pathogenicity. It has not reported the correlative quantitative analysis for a long time about it. The comparison of the article with several four common extracting methods was test and selected the best one in the experiment.

**Key words:** Cotton; *Verticillium dahliae* Kleb; Toxin; Extracting method; Comparison

棉花黄萎病是一种由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb)侵染引起的危害性极大的维管束系统病害, 全球因黄萎病所造成的经济损失平均每年达10亿多美元。自20世纪70年代以来, 中国棉花黄萎病有发展和蔓延的趋势<sup>[1]</sup>, 目前已成为我国棉花生产上最严重的病害之一。越来越多的研究证明, 黄萎病菌分泌的毒素是导致棉花发生黄萎病的关键生化因子<sup>[2-8]</sup>, 棉花黄萎病菌的代谢物毒素在1972年已由Keen等鉴定, 它是一种蛋白质, 脂多糖复合物<sup>[9]</sup>。国内外有多种提取棉花黄萎病毒素的方法, 究竟哪种方法得到的毒素致病力强? 至今尚未详细进行过研究。本试验采取四种方法提取棉花黄萎病菌毒素, 比较不同的方法得到毒素的致病力, 并得出改进方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试棉花品种: 选用对黄萎病一般抗性的棉花品种996, 由河北省农林科学院棉花所提供。

供试菌株: 棉花黄萎病菌选用高阳县病土中分离的棉花黄萎菌, 由河北省农林科学院植物保护研究所提供。

### 1.2 新鲜菌块的获得

将试管中的菌株接种到灭菌后的PDA培养基上, 25℃培养箱内恒温培养7d左右。

### 1.3 四种制备毒素的方法

方法一: 将在PDA培养基上生长的菌种(直径0.8cm)转接于Czapek培养液内, 在25℃培养箱内恒温振荡培养7d, 然后将菌液倒入经高压灭菌的

收稿日期: 2007-03-20

基金项目: 河北省自然科学基金项目资助(C2006000744); 国际科技合作资助项目(2006DFB02480)

作者简介: 马春红(1968-), 女, 浙江金华人, 副研究员, 主要从事作物抗病生理及遗传育种研究

通讯作者: 贾银锁(1950-), 男, 河北新乐人, 博士, 研究员, 主要从事作物生理及遗传育种的研究工作。

棉籽培养基内,待长满菌丝后,将培养好的菌剂切成小块,加 200 mL 蒸馏水静置浸泡 24 h,使病菌毒素充分溶于水中,再用 4 层纱布滤去渣滓,滤液以 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液镜检,无菌丝及分生孢子,即为病菌毒素浸提液 1,置冰箱备用<sup>[10]</sup>。

方法二:将在 PDA 培养基上生长的菌种(直径 0.8 cm)转接于 Czapek 培养液内<sup>[11]</sup>,在 25℃ 黑暗条件下,110 r/min 的恒温振荡培养箱(培养箱型号 HZQ-F160)上振荡培养 21 d,将培养好的菌液,用 3 层脱脂纱布过滤,滤液在 8℃ 条件下经 15 000 r/min 离心 20 min 取上清液做显微观察无菌,然后粗滤液在 25℃ 室温条件下用 20%~90% 饱和硫酸铵进行分级沉淀。经硫酸铵沉淀的蛋白质,以 5 mmol/L 磷酸缓冲液(pH=7.0)溶解,得到毒素液 2<sup>[12]</sup>。

方法三:将事先准备好的菌株新鲜菌块(直径 0.8 cm)移入装有已灭菌的 100 mL Czapek 培养液的 250 mL 平底烧瓶中,25℃ 振荡培养 14 d,将菌液经过 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液经 0.45 μm 微皿孔滤膜真空过滤,所得到的滤液为无菌体的毒素滤液 3<sup>[13]</sup>。

方法四:本试验方法是参考了大量文献后综合的改进方法,即先制备在 PDA 培养基上培养的黄萎病菌种(直径 0.8 cm)。然后在培养皿中的 PDA 培养基上覆盖灭好菌的棉叶 2~3 片,在无茵条件下将此菌种接种到此叶片上。如此重复 4~5 次以上达到复壮效果,将复壮后的病菌接种于已灭菌的 100 mL Czapek 培养液的 250 mL 平底烧瓶(加入 2~3 滴氯霉素)中,25℃ 振荡培养 21 d,将菌液 100℃ 水浴煮沸 1 h,浓缩并杀死其中杂菌,经过 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜真空过滤,所得滤液即为粗毒素液 4。

#### 1.4 毒素滤液的浓度测定

取 5 mL 毒素滤液经 24 h pH 7.0 磷酸缓冲液透析,经透析后的滤液根据考马斯亮蓝染料结合法利用紫外分光光度计测光密度,然后用测得的光密

度,查阅事先制作好,并用牛血清蛋白制成的标准曲线上的蛋白浓度,作为该菌滤液中的毒素浓度<sup>[14]</sup>。

#### 1.5 毒素生物活性测定

1.5.1 根冠细胞死亡率的测定 将供试种子用 0.1% 的升汞溶液消毒 3~5 min,用无菌水冲洗 3 次,置于 25℃ 培养箱内催芽,待胚根长至 1~1.5 cm 时待用。取以上四种方法分别得到的毒素滤液 1,2,3,4 各 2 mL 置于 7 mL 的离心管中,切取 2~3 个 1~1.5 cm 长的根尖,轻轻放于装有毒素液的小离心管中,在 mini-mix 快速混合器上振荡 1 min,再放于 25℃ 恒温箱中处理 2 h。分别取一滴处理过的毒素液置于载玻片上,先加入一滴 pH 6.5 的 0.01% 中性红染色 5 min,之后加入一滴 0.2% 伊文思兰染色 5 min,然后在显微镜下观察,记录死细胞(蓝色)和活细胞(红色)的个数,区分死活细胞。细胞死亡率的计算公式如下:

$$\text{细胞死亡率} = \frac{\text{活细胞数目}}{\text{总细胞数目}} \times 100\%$$

1.5.2 毒素对棉花幼根抑制的测定 将供试种子用 0.1% 的升汞溶液消毒 3~5 min,用无菌水冲洗 3 次,置 25℃ 培养箱内催芽,待棉籽露白时,选择均匀一致的棉籽 8 粒播于铺有滤纸(分别用 1,2,3,4 四种毒素液(4 mL)浸湿滤纸)的培养皿中,设 3 个重复,于 30℃ 培养箱中萌发 36 h,测定根的长度。

1.5.3 毒素生物学活性测定 在 25℃ 恒温箱中,将四叶期棉苗的根部创伤,分别浸于 1,2,3,4 四种毒素液的 25 mL 刻度试管中,每试管浸 3 株,以蒸馏水为对照,重复 3 次。处理 48 h 后,记录棉苗萎蔫情况。棉苗萎蔫度的分级标准:0 级:无症状;0.5 级:仅子叶萎蔫;1 级:子叶萎蔫,真叶叶柄倒挂;2 级:子叶,真叶萎蔫;3 级:全株萎蔫或真叶脱落。

## 2 结果与分析

毒素对根冠细胞死亡率的影响以及对根抑制与棉苗萎蔫度的影响,见表 1。

表 1 四种不同毒素的蛋白含量及对根冠细胞、幼根与棉苗毒害的影响

Tab 1 The influence of the four different toxin protein to the root cap cells, radical and cotton seeding

毒素编号 Toxin No.	毒蛋白含量/(μg/mL) The content of protein toxin	根冠细胞死亡率/% The death rate of root cap cells	幼苗的平均根长/cm The length of the radical root	棉苗萎蔫度/级 The wilting of the cotton seeding
4	503.79	62.80	1.60	2
1	391.00	56.55	1.76	2
2	346.91	44.53	2.31	2
3	78.34	36.36	2.80	1
CK	0	2.00	3.86	0

从表 1 看出,在棉花黄萎病菌毒素制备的四种方法中,不论是毒蛋白含量、根冠细胞死亡率还是对

幼根伸长的抑制与棉苗的毒害等多方面差异极显著。方法 4 收集的毒蛋白含量最高达 503.79

μg/mL, 故其对根冠细胞的杀伤力最大, 细胞死亡率高达 62.8%; 对幼根的抑制力也最强, 幼根平均长度仅为 1.6 cm; 棉苗的萎蔫度高达 2 级。而方法 3 因收集的毒蛋白只有 78.3 μg/mL, 故其根冠细胞死亡率仅为 36.3%, 幼根长度为 2.8 cm。毒素对棉苗幼根的抑制程度, 随着毒蛋白含量的增多而依次加强。总之, 棉苗根冠细胞的死亡率的高低及其幼根生长的抑制强度, 均决定于毒素中毒蛋白含量的大小。

本试验的方法四提取的毒蛋白含量与根冠活细胞死亡率均最高。

### 3 讨论

制备棉花黄萎病菌毒素液的方法还有很多, 但大致是有以下几个步骤: 病菌培养→液体培养→水浴加热→离心过滤, 以后的提取过程可在此基础上不断提升与改进, 本试验在参阅了一系列论文后, 认为方法四是较适宜的鉴定方法。其特点是: 病菌的多次复壮; 制备过程简单, 毒蛋白流失少, 不易被杂菌污染; 毒蛋白含量高等优点。

目前国内学术界一般把黄萎病菌致萎毒素属于非寄主专化性毒素, 但也不排除其中可能存在寄主专化性组分<sup>[15]</sup>。由于黄萎病菌毒素对感病基因型寄主可产生明显致萎症状, 而对抗病基因型寄主致病症状较轻或不明显<sup>[16]</sup>, 因此可利用毒素来代替病原菌作抗性筛选或鉴定。

#### 参考文献:

[1] 陈旭升, 陈永萱, 黄骏麒. 棉花黄萎病致病性生理生化研究进展[J]. 棉花学报, 2001, 13: 183–187.

[2] 林玲, 张爱香, 陈志石, 等. 江苏省棉花黄萎病菌培养特性与致病力的相关性研究[J]. 江苏农业科学, 2005(2): 49–51.

[3] 朱荷琴, 简桂良, 宋晓轩. 棉田黄萎病菌致病型群落结构研究[J]. 棉花学报, 2004(3): 147–151.

[4] 李晓宇, 胡明, 朱宝成, 等. 氨基酸铜对棉花黄萎病株几种酶活性的影响[J]. 棉花学报, 2004(3): 152–155.

[5] 姜占发, 刘大群. 棉花黄萎病鉴定技术现状及展望[J]. 河北农业大学学报, 2002(1): 95–99.

[6] 刘学堂, 宋晓轩, 郭金城. 棉花黄萎病的研究及最新进展[J]. 棉花学报, 1998(1): 6–13.

[7] 刘占国, 马峙英, 张桂寅, 等. 发病时间和发病速度对棉花黄萎病的影响[J]. 华北农学报, 2000, 15(1): 71–75.

[8] 赵化冰. 建国以来我国棉花抗枯、黄萎病品种的演变[M]. 保定: 河北农业大学硕士研究生论文, 2002.

[9] Keen N T, Long M, Erwin D C. Possible involvement of a pathogen produced Protein Lipopolysaccharide complex in Verticillium wilt of cotton[J]. Physiol Plant Pathol, 1972: 317–331.

[10] 戴广辉, 刘俊芳, 李延增. 棉花黄萎病抗病性鉴定新方法探讨[J]. 华北农学报, 1989, 4: 92–97.

[11] 吕金殿, 甘莉, 牛淑珍. 棉花黄萎病致萎毒素的初步研究[J]. 西北农业大学学报, 1988, 16: 17–21.

[12] 陈旭升, 王祝明. 棉花黄萎病菌致萎毒素的分离纯化方法[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20: 2.

[13] 章元寿, 王建新, 顾本康. 用棉花黄萎病菌毒素检测棉花抗病性的研究[J]. 植物保护, 1990, 17(4): 2–4.

[14] 张志良. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 183–184.

[15] 章元寿. 植物病原真菌毒素的研究现状[J]. 真菌学报, 1991, 10(3): 169–181.

[16] Nachmias A. Differential phytotoxicity of peptides from culture fluids of *Verticillium dahliae* race 1 and 2 and their relationship to pathogenicity of the fungi on tomato [J]. Phytopathology, 1987, 77: 506–510.