

棉花黄萎病菌致萎毒素的初步研究

吕金殿 甘莉 牛淑贞 郭西凤

(陕西省农科院)

摘 要

实验室培养棉花黄萎病菌,用查彼克培养基,在25℃下培养15天是病菌致萎毒素产生的适宜条件。病菌危害棉花导致棉株凋萎死亡的毒物质主要是蛋白质,其组份多为糖蛋白,含有17种氨基酸,其中酸性氨基酸占21.2%,碱性氨基酸占8.9%,电泳分离出13条蛋白质条带。棉花品种中棉所10号和FR-1棉苗在病菌毒素稀液内浸至65小时,病情指数分别达到70.45和47.73。

关键词: 棉花; 病菌毒素; 培养条件; 糖蛋白

棉花黄萎病在世界各主产棉区均有发生,我国特别是黄河流域棉区发生较重,是棉花生产上的一个严重病害^[1]。棉花黄萎病菌为什么能导致棉花叶片失绿、失水,表现强烈的萎蔫,严重时整株死亡。国外报道认为,棉花黄萎病菌在代谢活动中,分泌出有毒的物质,这种物质为有毒的蛋白质或者是一种酸性蛋白质—脂多糖的复合体^[2-4],国内未见报道。

我们在过去研究工作的基础上,对棉花黄萎病菌致萎毒素的粗抽提物进行了一些试验,现将1982~1984年的结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

供试棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)由泾阳县三渠村自然病圃病株分离所得。生物测定所用棉苗,品种为感病的中棉所10号和抗病的FR-1。

1.2 方法

病菌培养:将试管斜面棉花黄萎病菌转接到盛100ml查彼克培养液(NaNO₃ 2g, KH₂PO₄ 1g, KCl 1g, MgSO₄ 1g, FeSO₄ 0.02g, 蔗糖30g, 蒸馏水1000ml)的250ml三角瓶内,置摇床于25℃下震荡培养15天,摇床震动往复每分钟为88次。

粗提:将培养15天的病菌培养液进行初步提取。病菌培养液倒入布氏漏斗中,抽气减压过滤,菌体与滤液分别收集。滤液经1500g离心15分钟,上清液经微孔膜(孔

本文于1986年12月25日收到。

径 $0.45 \mu\text{m}$) 超压 (1 kg/cm^2) 过滤, 滤液装入超滤器内 (超滤膜孔径 15 \AA , 截留分子量 1 万以上), 外加高纯氮气超压 (3 kg/cm^2) 过滤, 浓缩 100 倍。将超滤所得浓缩液经 $20,000 \text{g}$ (0°C) 离心 1 小时, 上清液贮存于 -10°C 下, 备用。

生物测定: 粗提物毒性的生物测定, 供试棉苗, 其棉籽经 55°C 热药水处理 30 分钟后, 播于经高压消毒的土壤内, 棉苗长出 1 片真叶时, 作致萎力测定。粗抽提液经 2000 ml 水透析, 检查无 SO_4^{2-} 后, 稀释至蛋白浓度为 0.1 mg/ml , 每试管分装 8 ml , 将供试棉苗插入试管内, 以无离子水及未接菌的查彼克培养液作为空白对照, 于室温 $15 \sim 20^\circ\text{C}$ 下观察记载 65 小时, 每 8 小时记载 1 次棉苗萎蔫情况。

粗抽提液成份分析: ① 菌体干重。将病菌培养液过滤后收集的菌体放入烘箱内, 80°C 下烘 24 小时, 称重。② 蛋白质含量。用凯氏定 N 法, 瑞典 K-Ⅱ 型半微量定 N 仪测定, 以牛血清白蛋白做标准。③ 蛋白质组份。用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法。隔成胶 $T = 3\%$, 分离胶 $T = 7.5\%$, 电极缓冲液 $\text{pH} 8$, Tris-硼酸, 考马斯亮兰 R-250 作蛋白质染色, 过碘酸-Schiff 试剂作糖蛋白染色。④ 氨基酸分析。用 121M B 型氨基酸分析仪测。⑤ 甲苯胺兰法定性测定粘多糖, 乙醚浸提定性测定脂类物质。

2 结果与分析

2.1 培养条件

试验明确了棉花在黄萎病菌产生毒素物质的适宜条件 (表 1)。

表 1 棉花黄萎病菌不同培养条件下试验结果

处 理	菌 体		蛋 白 质		
	干重 (g)	占培养液 %	含量 (mg)	占培养液 %	
不 同 营 养	查彼克液	9.70	0.65	119.40	7.96
	缺 C	0.65	0.04	0	0
	缺 N	0.65	0.04	0	0
	缺 Fe Mg	1.08	0.07	0	0
不 同 培 养 天 数	5	3.90	0.26	13.70	0.91
	10	5.80	0.39	25.70	1.71
	15	9.70	0.65	119.40	7.96
不 同 培 养 温 度 ($^\circ\text{C}$)	10	3.20	0.21	2.00	0.13
	15	5.00	0.33	42.80	2.85
	25	9.70	0.65	119.40	7.96
	30	9.80	0.65	139.00	9.27

注: 供试分析菌液为 1500 ml

培养基成份: 以查彼克培养液为对照, 分别以缺 C, N 和 Fe, Mg 3 个处理培养病菌, 结果培养基中缺 C, N 和 Fe, Mg 的病菌生长很差, 与对照相比, 菌体干重分别减少 93%, 63% 和 89%。在缺 C, N 和 Fe, Mg 的病菌粗抽提液中, 均未分析到蛋白质。

温度: 设 10°C 、 15°C 、 25°C 和 30°C 4 个处理, 结果表明, 在 30°C 上病菌生长与 25°C 基本一致, 其他温度下生长不良。

培养天数 病菌培养不足15天者,生长不好,蛋白质产生极少。

根据试验结果,棉花黄萎病菌产生毒素物质的适宜培养条件确定为查彼克培养液,25℃下震荡培养15天。

2.2 粗抽提液氨基酸分析

取1 ml粗抽提液加1ml 12N HCl, 110℃下水解22小时,取出后倒入蒸皿内,于90℃水浴蒸干,加无离子水定容至5 ml,用于氨基酸分析仪测定(表2)。

从粗抽提液中分析到17种氨基酸,其中酸性氨基酸占21.2%,碱性氨基酸占8.9%。说明粗抽提液中的蛋白质主要是酸性蛋白质。天门冬氨酸、苏氨酸和丝氨酸含量较高,分别占氨基酸总量的12.2%, 8.8%和7.9%,这几种氨基酸是蛋白质与糖形成共价键构成糖蛋白或蛋白多糖的桥梁,这种蛋白质有可能是一种糖蛋白。

2.3 蛋白质组份电泳分析

在2mA/管4℃条件下电泳2~3小时后,取出凝胶,作蛋白质和糖蛋白两种染色。蛋白质染色在三氯乙酸中固定1小时,染色过液,7.5%冰乙酸,5%甲醇水溶液脱色。糖蛋白染色在

表2 棉黄萎病菌培养液粗提取物中17种氨基酸含量

峰号	氨基酸名称	分子量	含量 (mMol)	占总量%
1	天门冬氨酸	133	3.8942	12.22
2	苏氨酸	119	2.8059	8.80
3	丝氨酸	105	2.5295	7.94
4	谷氨酸	147	2.8908	9.07
5	脯氨酸	115	2.5586	8.03
6	甘氨酸	75	3.3046	10.37
7	丙氨酸	89	3.0759	9.65
8	半胱氨酸	121	0.5735	1.80
9	缬氨酸	117	2.5906	8.13
10	蛋氨酸	149	0.1467	0.46
11	异亮氨酸	131	1.1849	3.72
12	亮氨酸	131	2.4648	7.73
13	酪氨酸	181	0.3662	1.15
14	苯丙氨酸	165	0.6537	2.05
15	组氨酸	155	1.1760	3.69
16	赖氨酸	146	1.0021	3.14
17	精氨酸	174	0.6543	2.05

40%乙醇、5%冰乙酸中固定过液,用0.1%高碘酸处理2~3小时,再用0.2%偏重亚硫酸钠处理2~3小时,放入Schiff试剂内染色,用0.01%偏重亚硫酸钠脱色。

由图1看出,从粗抽提液中分离出13条蛋白质条带,其中与蛋白质条带迁移率相同的第1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10等8条能被过碘酸-Schiff试剂染色,从而进一步证明了粗抽提液中多数蛋白质为糖蛋白。

2.4 蛋白质毒性测定

棉苗在棉花黄萎病菌毒素稀释液内浸24小时后陆续开始出现萎焉，到65小时感病品种中棉所10号和抗病品种FR—1病情指数分别达到70.45和47.73，显示出强的致萎能力（图2），但对照组棉苗直到试验结束均未出现萎焉。

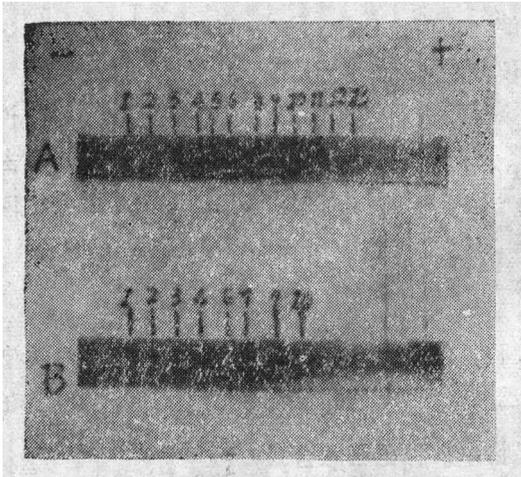


图1 粗抽提液电泳图谱

A. 考马斯亮蓝染色； B. 过碘酸—Schiff染色

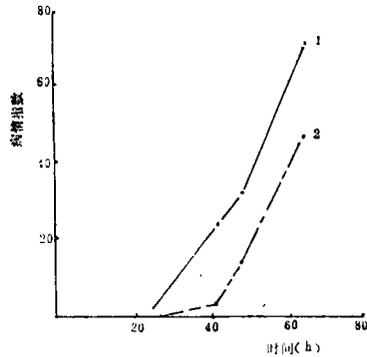


图2 棉黄萎病菌毒素对不同抗性品种致萎力

1—中棉所10号； 2—FR-1

3 讨论

通过对病菌不同营养、温度和天数的培养试验，明确了病菌生长和产生毒素的适宜培养条件为：查彼克培养液、25℃下震动培养15天。确定了分析棉黄萎病菌毒素的粗提程序。初步认为，棉花黄萎病菌导致棉花萎焉的毒素物质主要是蛋白质，其组份多为糖蛋白，经稀释后对棉苗仍具强的致萎力。

试验还发现，用乙醚抽提定性测定，粗提物中还有少量脂类物质存在。用甲基胺兰法定性分析正常培养病菌粗提物中没有发现粘多糖，而在培养中缺C，N或Fe，Mg或在短时间(5天)培养时，其粗提物中发现有粘多糖。这两类物质产生的条件及是否具有致萎作用，有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 仇元、吕金殿。棉花黄萎病菌培养滤液及其应用。西北农学院学报 1978(4) : 1-11
- 2 Mussell H W. Toxic proteins secreted by cotton isolates of *verticillium albo-atrum*, in phytotoxins in plant diseases, wood eds, London, Academic Press, 1972 : 443-445
- 3 Keen N T, Long M. Isolation of a protein-lipopoly-saccharide complex from *verticillium albo-atrum*. *Physiological plant pathology* 1972, 2 : 307-315
- 4 Keen N T, Long M et al. Possible involvement of a pathogen-produced protein-lipopolysaccharide complex in *verticillium wilt* of cotton. *Physiological plant pathology* 1972, 2 : 317-331
- 5 Abraham Nachmas, Virginiabuchner, James Krikum. Comparison of protein-lipopolysaccharide complexes produced pathogenic and non-pathogenic strains of *Verticillium dahliae* from potato. *Physiological plant pathology* 1982, 20 : 213-221
- 6 Malyshva K M, Zeltser S SA. Protein-lipid-polysaccharide complex from the culture and mycelium of the fungus *Verticillium dahliae*. Proceedings of the Academy of Sciences of the USSA, 1968, 179 : 231-234

STUDY ON PHYTOTOXINS OF THE COTTON

VERTICILLIUM 'WILT' PATHOGEN,

Verticillium dahliae Kleb

Lu Jindian Gan Li Niu Shuzhen Guo Xifeng

(Shaanxi Academy of Agricultural Science)

Abstract

Promising production of the toxin of the *Verticillium wilt* pathogen was obtained with an incubation of 15 days at 25°C with czapek culture under laboratory conditions. Main substances inducing cotton wilt were known as proteins composing of glycoproteins of 17 kinds of amino acids with 21.2% of which belonging to acidic amino acids and 8.9% of which being basic amino acids. 13 protein bands had been separated by electrophoresis. With seedlings of cotton varieties Central Cotton No. 3 and RF-1 immersed in the dilution containing phytotoxins for as long as 65 hrs., the severity indices mounted to 70.45 and 47.73 accordingly.

Key words: cotton; pathogen phytotoxin; culture condition; Glyco-protein