

# 雪腐格氏霉产毒培养基的筛选及培养条件\*

左豫虎\*\* 康振生 李振岐 魏国荣

(西北农业大学植物保护系, 陕西杨陵 712100)

**摘要** 对雪腐格氏霉(*Gerlachia nivalis*)产毒培养基的筛选结果表明, 适宜菌株生长和产毒的液体培养基为马铃薯蔗糖培养液(PSB)和添加1%蛋白胨的察氏(Czapek's)培养液。固体培养物玉米粒上的粗毒素产量远高于液体培养基。适宜菌株生长的条件是20℃, pH6~7, 黑暗和静止培养, 适宜产毒的条件是10℃, pH7~8, 光暗交替和静止培养; 培养滤液和从固体培养物中浸提的粗毒素对小麦种子均有毒性, 浸提的粗毒素的毒性远高于培养滤液。粗毒素对小麦胚根生长的抑制作用与浓度密切相关, 与生长率的相关系数为-0.8677 ( $P < 0.01$ )。

**关键词** 雪腐格氏霉, 毒素, 培养条件

**中图分类号** S432.44

雪腐格氏霉[*Gerlachia nivalis*, 异名: 雪腐镰刀菌(*Fusarium nivalis*)]是引起小麦雪霉叶枯病的病原菌。国内外有关该菌能产生毒素的报道很多<sup>[1~3]</sup>, 但对该菌毒素的产生条件、分离提纯、生物学特征及其与致病性的关系、作用方式等方面的研究甚少。本文就雪腐格氏霉毒素(以下简称Gn-毒素)产毒培养基的筛选和适宜菌株生长及产毒的条件进行研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

雪腐格氏霉菌株由西北农业大学植保系植物免疫研究室提供。

### 1.2 培养基

固体培养基为马铃薯蔗糖琼脂(PSB)和玉米粒; 液体培养基为马铃薯蔗糖培养液(PSB)、察氏(Czapek's)培养液、改订理查德(Richard)培养液和添加1%蛋白胨的察氏(Czapek's)培养液。

### 1.3 产毒培养

**菌株移** 在PSA平板上, 于15~17℃培养2周, 沿菌落边缘挑取0.5 cm×0.5 cm的菌块, 接入装有150 mL培养液的250 mL三角瓶中, 或接入装有玉米粒的罐头瓶中。每种培养基接3瓶, 在15~17℃ 12 h光暗交替条件下培养3周。培养物除去菌丝, 培养滤液经高压灭菌, 以消除残存的菌丝和孢子及酶的作用, 然后置冰箱内保存备用。

固体培养物培养3周后, 按宁毓华<sup>[1]</sup>的方法, 稍加改进。称取玉米固体培养物240 g, 以每100 g固体培养物加475 mL 85%酒精的比例浸提72 h, 然后将浸提液用双层纱布过滤1次, 再用滤纸过滤2次, 滤液经60℃水浴挥发浓缩获得9.86 g桔黄色粗毒素制备物。将该制备物定溶于400 mL, 作为粗毒素原液置冰箱备用。

收稿日期: 1995-10-11

\* 国家“八五”攻关课题资助项目; \*\* 现在黑龙江八一农垦大学农学系工作(黑龙江省密山市 158308)。

## 1.4 培养条件

培养物分别置于连续光照(40 W 日光灯距培养物 45 cm),连续黑暗和 12 h 明暗交替处理下,培养温度为 15~17℃. 灭菌培养液的 pH 调节为 4,6,7,8,10. 培养物于 10,15,20,25℃ 4 个温度处理下培养. 菌株分别在振荡和静止条件下培养. 菌株接种后每周取 3 瓶测试,直到第 6 周为止. 各处理的培养物都要称取菌丝干重,滤液进行生物测定.

## 1.5 粗毒素的热稳定性测定

比较通过无菌过滤得到的粗毒素原液和经高温、高压处理得到的粗毒素原液,在相同浓度下对胚根生长的抑制作用.

## 1.6 粗毒素生物学测定

精选小偃 6 号小麦种子,去杂、去劣、去病、表面消毒,用 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液浸种 24 h,然后将露白麦粒置入加有 5 mL 滤液的培养皿内,皿内铺 1~2 张中性滤纸,每皿 30 粒,重复 3 次,另设 3 只加有空白培养液或无菌水的培养皿作对照. 在室温下处理 72 h 后,测量种子胚根长度,滤液毒性以胚根生长率来衡量比较.

$$\text{胚根生长率}(\%) = \frac{\text{处理胚根平均长度}}{\text{对照胚根平均长度}} \times 100$$

# 2 结果与分析

## 2.1 雪腐格氏霉产毒培养基的筛选

菌株在 4 种液体培养基中的生长情况(见表 1). 综合菌株生长和培养滤液毒性结果,表明 PSB 和添加 1% 蛋白胨的察氏(Czapek's)培养液适宜于菌株生长和产毒. 为了保证培养液成分的一致性,在以后的试验中采用添加 1% 蛋白胨的察氏培养液.

表 1 培养基对雪腐格氏霉菌株生长及滤液毒性的影响

培养基	菌丝干重 (mg/瓶)	胚根生长率 (%)	培养基	菌丝干重 (mg/瓶)	胚根生长率 (%)
马铃薯蔗糖培养液	609.0	48.0	察氏培养液	59.0	80.0
添加 1% 胨的察氏培养液	497.0	56.3	改订理查德培养液	15.0	71.4

注:菌丝干重、胚根生长率均为 3 个重复平均值,下同.

## 2.2 菌株的液体培养和固体培养的比较

表 2 浸提粗毒素对胚根生长的抑制作用

体积浓度	胚根长度 (cm)	胚根生长率 (%)	体积浓度	胚根长度 (cm)	胚根生长率 (%)
0(CK)	5.53	—	40	1.48	26.76
1	5.85	105.79	60	0.59	10.67
5	3.71	67.09	80	0.57	10.31
10	3.16	57.14	100	0.23	4.16
20	2.03	36.71			

表 2 列出了从玉米粒培养基中浸提出的粗毒素在不同浓度下对小麦胚根生长的抑制作用. 即使是 20% 的粗毒素的毒性亦明显高于液体培养滤液的毒性,其胚根生长率只有 36.71%,因此可选用固体培养物进行毒素生产. 毒素对小麦种子胚根生长的抑制作用还

表现在与浓度的高度相关性,浓度与胚根生长率的相关系数为 $-0.8677(P < 0.01)$ ,浓度愈高,抑制作用愈强。

### 2.3 影响菌株生长和产毒的因子

表3表明,光照对菌株生长有抑制作用,光暗交替培养下的滤液毒性最强(胚根生长率为48.0%)。菌株在pH6~7范围内生长较好,pH7~8范围内的培养滤液毒性最强,可见菌株生长与产毒对酸碱度的要求存在差异。高温利于菌株生长,低温利于菌株产毒。静止培养下菌丝平均干重高于振荡培养,静止培养的滤液对胚根的抑制作用也明显高于后者。菌株在培养的第2~4周有一快速增长期,第5周滤液毒性表现为最强。

表3 不同培养条件对菌株生长及培养滤液毒性的影响

培养条件	菌丝干重 (mg/瓶)	胚根生长率 (%)	培养条件	菌丝干重 (mg/瓶)	胚根生长率 (%)
光照	连续光照	662.0	温度(°C)	10	31.5
	光暗交替	497.0		15	44.4
	连续黑暗	1026.0		20	59.1
pH	4	126.2		25	60.2
	6	73.5	培养时间(周)	1	117.1
	7	45.5		2	111.4
	8	33.6		3	81.0
10	72.3	4		83.7	
通气	振荡培养	93.8		5	63.4
	静止培养	56.3		6	68.3

综上所述,液体培养基中马铃薯蔗糖培养液既适于菌株生长也有利于产毒,但毒素产量较低。利用固体培养基玉米粒进行产毒培养,毒素产量较高。适宜菌株生长和产毒的因子差异明显,因此在进行菌株培养时要协调各因子,以达到培养的目的。

### 2.4 Gn-粗毒素热稳定性测定

粗毒素热稳定性试验结果表明,当对照和处理的胚根分别为0.57,0.35 cm时,胚根生长率为15.2%和9.3%。说明高温高压处理后的毒素对小麦种子根的抑制作用不仅没有降低,而且还略有提高,可见Gn-毒素是一种热稳定物质。

## 3 讨论

上野等报道添加1%蛋白胨的察氏培养液,于25~27°C静置培养有利于菌株产毒。本试验结果表明,在4种供试液体培养基中,菌株在马铃薯蔗糖培养液中生长最好,添加1%蛋白胨的察氏(Czapek's)培养液中次之,但毒素产量均较固体培养物为低。试验还发现适宜菌株生长和产毒的条件并不一致,这也许是因本研究所用菌种与日本菌种存在差异和测定方法不同所致,其原因有待于进一步研究。此外,未接种的空白液体培养液对麦种胚根生长也有强烈抑制作用,这是液体培养方法的局限性所致。

试验结果表明,Gn-粗毒素具有热稳定性,值得提出的是加热似乎还有激活Gn-毒素致病活性的作用,其原因尚不清楚。

多数报道认为振荡培养有利于致病毒素的产生,但也有报道认为有些病菌在静止条件下培养产毒效果较好<sup>[4]</sup>。本试验得到静止培养有利于Gn-毒素产生的结果。作者认为这

绝非是因为该菌生长不需氧气,而是由于该菌菌丝不发达,振荡断裂后难以恢复生长而导致不利于菌株生长和产毒。其作用机制还有待于进一步研究明确。

该菌在浓度极低时,对麦种根生长有轻微的刺激作用,其作用机理尚不清楚。

#### 参 考 文 献

- 1 宁毓华,冯益民,杨桦等.小麦雪腐病菌粗毒素的提取及其致病性鉴定方法的研究.西北农业学报,1992,1(4):15~18
- 2 商鸿生,王树权,齐艳红等.小麦雪霉叶枯病菌浸染过程.植物病理学报,1989,19(3):155~159
- 3 牛永春,商鸿生,王树权等.中国小麦雪霉叶枯病菌种的鉴定.真菌学报,1992,11(2):43~48
- 4 董金皋,康绍兰,王艳霞等.玉米大斑病菌 *Helminthosporium turcicum* 致病毒素产生的条件及其特性.河北农业大学学报,1993,16(2):13~17

## Selection of Toxin-promoted Media and Determination of Culture Conditions for *Gerlachia nivalis*

Zuo Yuhu Kang Zhensheng Li Zhenqi Wei Guorong

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling Shaanxi, 712100)

**Abstract** The result of the toxin-promoted media selection shows that liquid media fit for the growth and toxin-promotion of *Gerlachia nivalis* is PSB and Czapek's liquid medium (1% pepton extract), the output of crude toxin extracting from corn grain solid media is much higher than from liquid media. The condition for the growth of *Gerlachia nivalis* is a still culture in 20°C, pH 6~7, and darkness; the condition fit for its toxin-promotion is a still culture in 10°C, pH 7~8, light and darkness alternation. Liquid culture filtrate and crude toxin extraction from solid culture are all toxin to wheat seeds with the higher toxicity of the former. It is revealed that the correlation exists between the inhibition of crude toxin to the growth of radicals and its concentration. And the correlation coefficient of the concentration to the growth rate is  $-0.8677$  ( $P < 0.01$ ).

**Key words** *Gerlachia nivalis*, toxin, culture condition