DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2009.05.017

小麦赤霉病菌固体培养基产毒条件研究

罗巧燕[1],曹远银[1*],宋慧君[2],邱宏伟[1],范世奇[1],王玉坤[1]
(1.沈阳农业大学 植物保护学院植物免疫室,辽宁 沈阳 110161;2.辽宁出入境检验检疫局,辽宁 大连 116001)

摘要:为了探讨小麦赤霉病菌的产毒条件,采用胚根抑制法,对不同培养条件(不同的固体培养基、培养时间、通气量、温度)下的产毒量进行了测定。结果表明:以小麦为培养基,其营养成分最适合小麦赤霉病菌毒素的产生,培养 30d 左右为产毒高峰,通气量以 250mL 的三角瓶装 25g 小麦最好,其最适培养温度为 25℃。

关键词:小麦赤霉病;毒素;培养条件
中图分类号:S435.121.4+5　　文献标识码:A　　文章编号:1004-3268(2009)05-0094-04

Study on Toxin Producing Conditions of *Fusarium graminearum* in Solid Media

LUO Qiao-yan[1], CAO Yuan-yin[1*], SONG Hui-jun[2],
QIU Hong-wei[1], FAN Shi-qi[1], WANG Yu-kun[1]
(1. Institute of Plant Immunology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;
2. Liaoning Entry-Exit Inspection Bureau, Dalian 116001, China)

Abstract: The toxin producing conditions of *Fusarium graminearum* were studied with different solid media, culture durations, ventilation and temperature. The amount of toxin was determined with the method of radicle restriction in different cultural conditions. The results showed that the toxin in wheat was relative higher, the peak of toxin producing was about 30d, the best ventilation was 25g wheat per 250mL flask and the best temperature was 25℃.

Key words: Wheat scab; Toxins; Cultural condition

小麦赤霉病是由多种镰刀菌(*Frusarium* spp.)引起的一种世界性真菌病害,是湿润和半湿润小麦生产区的一种严重病害[1]。在我国,该病主要由禾谷镰刀菌(*Frusarium graminearum*)引起,在其侵染小麦的过程中产生大量真菌毒素,主要成分为脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON),人和畜禽食用被 DON 污染的谷物后,会产生呕吐、贫血、免疫抑制、出血及拒食等病症,严重影响人类健康;同时,麦类赤霉病常引起小麦、小黑麦等小籽粒作物的苗腐、茎腐、穗腐,尤其在湿热条件下病情更严重[2,3]。然而,利用其毒素筛选小麦抗赤霉病突变体可为小麦抗赤霉病育种和拓宽抗病资源开辟新途径。利用毒素探讨小麦对赤霉病的抗性机制,开发新的快速抗性鉴定技术在上个世纪 90 年代已经取得了一定进展[2~4]。刘新琼等[5]证明,禾谷镰刀菌粗毒素与纯毒素 DON 具有相同的生物活性,能代替昂贵的纯毒素。因此,本试验对禾谷镰刀菌的培养条件进行探讨,旨在为深入研究禾谷镰刀菌毒素及其应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

小麦赤霉病菌及辽 10 小麦种子,由沈阳农业大

收稿日期:2009-01-05
基金项目:"十一五"国家科技支撑计划项目(2006BAK02A11)
作者简介:罗巧燕(1981-),女,山西大同人,在读硕士研究生,研究方向:农产品真菌毒素免疫检测。
通讯作者:曹远银(1955-),男,湖南常德人,研究员,主要从事分子植物病理学教学与研究工作。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

学植物免疫研究所提供；培养基：小麦培养基、玉米培养基、大米培养基、察氏液体培养基。

1.2 粗毒素的毒性测定

小麦齐穗至始花期，选择尚未开花的麦穗，用注射器向麦穗中部小穗的小花内注入培养好的分生孢子悬浮液（1×10^7个/mL），以注射清水为对照，每天傍晚喷一次水，保持夜间麦穗部处于湿润状态。

1.3 产毒培养方法

转接小麦赤霉病菌于 PDA 培养基上培养 7d，在菌落边缘打取直径 1cm 的菌饼，无菌条件下接种于察氏液体培养基中，25℃振荡培养 4d；之后用血球计数板计数相同的孢子量 1×10^7个/mL，接种于不同的培养基中培养。

1.4 粗毒素的制备

参考罗毅等[6]的方法并有所改进，将禾谷镰刀菌按本试验确定的培养条件培养后，每 50g 固体培养物，用甲醇—水（4∶1）100mL 浸泡，振荡 30min，重复 1～2 次，过滤用约 2 倍体积的石油醚脱脂，弃上层石油醚，下层甲醇—水层旋转蒸发至原体积的 1/10，称为粗毒素。

1.5 毒素的生物活性测定

采用小麦种子胚根伸长抑制法[7,8]：选取饱满的小麦种子，加水浸泡 24h，倒掉水并且用无菌水冲洗 3 遍，将种子胚向下摆在铺有不同浓度（原液、2 倍、4 倍、6 倍、8 倍、10 倍、10 倍、12 倍、14 倍稀释液）的毒素浸湿的滤纸的培养皿内，每皿 10 粒，每处理重复 3 次，清水为对照，置 25～26℃黑暗下培养 48h，测定主根的长度，并计算抑制率。

$$抑制率=\frac{对照种子根长-处理种子根长}{处理种子根长}\times100\%$$

1.6 小麦赤霉病产毒条件的确定

1.6.1 固体培养基的筛选 参考石晓燕等[9]方法，分别以小麦、玉米、大米作培养基，在 28℃温箱中培养。按 1.3 中的方法接种培养，每天摇匀，以防结块，培养 30d，取出后置 80℃下 1h 灭菌，烘干粉碎后，按 1.4 的方法提取毒素，以胚根抑制法进行生物活性测定，比较不同培养基产毒的差异。

1.6.2 培养时间对产毒能力的影响 以小麦为培养基，按 1.3 中的方法接种赤霉病菌，每天摇匀，以防结块，培养 15d、20d、25d、30d、35d、40d，按期取出，按 1.4 的方法提取毒素，以胚根胚芽抑制法进行生物活性测定。

1.6.3 通气量对产毒能力的影响 分别称取 25g、50g、75g 小麦分别装入 250mL 的锥形瓶，按 1.3 接种培养，每天摇匀，以防结块，培养 30d 取出，按 1.4 中的方法制备粗毒素，采用胚根抑制法测定毒素活性。

1.6.4 温度对产毒能力的影响 以小麦为培养基，按 1.3 中的方法接种赤霉病菌，每天摇匀，以防结块，分别在 25℃、28℃、32℃下培养 30d，按 1.4 中的方法制备粗毒素，胚根抑制法测定毒素活性。

2 结果与分析

2.1 小麦赤霉病菌粗毒素的毒性测定

用赤霉病菌的粗毒素接种小麦的小花后，所出现的小穗枯死症状，与用病菌分生孢子接种小花形成的症状完全相同，而用清水处理的麦穗则没有出现病害的症状。这一结果说明，赤霉病菌的粗提物里含有使小麦发病的毒素。

不同浓度的粗毒素对小麦胚根的抑制作用不同，当粗毒素浓度为原液、稀释 2 倍、4 倍、6 倍时，对小麦的胚根胚芽的抑制率几乎为 100%，而粗毒素原液稀释 10 倍以后，对小麦胚根胚芽基本无明显的作用。因此，本试验经过多次试验采用 8 倍稀释液进行以后的试验。

2.2 培养基种类对小麦赤霉病菌产毒能力的影响

在小麦、玉米、大米 3 种培养基中接种小麦赤霉病菌，培养 30d，均产生粗毒素，而其对小麦胚根的抑制率不同。从图 1 看出，3 种培养基对赤霉病菌产毒影响较大，小麦赤霉病菌以小麦为培养基，其粗毒素毒性最强，胚根抑制率为 80.95%，玉米培养基次之，抑制率为 79.84%，大米最低抑制率为 68.85%，说明小麦培养基的营养成分适合赤霉病菌毒素的产生。方差分析结果表明，在小麦、玉米、大米 3 种培养基上产生的小麦赤霉病菌粗毒素对小麦种子胚根的影响均达到了极显著水平（$P<0.01$）。

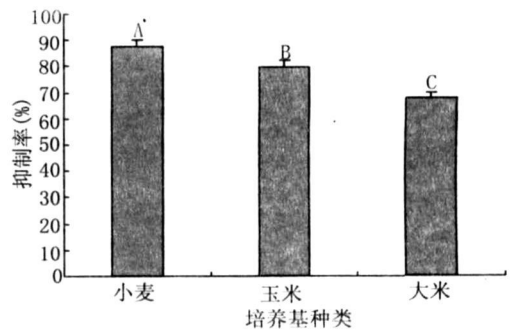

图 1 3 种固体培养基对赤霉病菌毒素产生的影响

2.3 培养时间对小麦赤霉病菌产毒能力的影响

在小麦培养基上接种赤霉病菌，分别培养 15d、20d、30d、35d、40d 都能分泌粗毒素，但产毒素的多

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

少并没有随着时间的延长而一直增加，而是呈现先增加后减少的趋势(表 1)。以培养 30d 粗毒素的毒性最强，其对胚根的抑制率为 80.77%，对胚芽的抑制率为 65.38%，而此后毒素对胚芽的抑制率又逐渐下降，说明培养 30d 左右有利于赤霉病菌产毒，可见培养时间是毒素活性高低的一个重要影响因素；同时从表 1 还可以看出，毒素对胚根的影响大于对胚芽的影响。

表 1　培养时间对赤霉病菌毒素产生的影响

培养时间 (d)	胚根长 (cm)	胚根抑制率 (%)	胚芽长 (cm)	胚芽抑制率 (%)
15	1.18b	66.85	0.83b	47.01
20	1.06c	70.21	0.85b	45.30
25	0.82d	76.94	0.59c	62.18
30	0.69e	80.77	0.54c	65.38
35	0.71e	80.11	0.58c	62.61
40	1.09bc	69.47	0.81b	47.86

注：按 Duncan's 新复极差检测(P=0.05)，同列相同字母表示处理间无显著差异

2.4　通气量对小麦赤霉病菌产毒能力的影响

图 2 结果显示，培养基不同装麦量对小麦赤霉病菌毒素的产生影响较大，装麦量为 25g 时，抑制率最高为 82.00%，装麦量为 75g 时，抑制率较小为 63.45%，装麦量为 50g 时，抑制率为77.70%。装麦量的多少直接影响病菌的通气量，说明通气量对病菌的产毒有一定的影响。方差分析结果表明，装麦量为 25g、50g、75g 时，小麦赤霉病菌产生的粗毒素对小麦种子胚根的抑制作用均达极显著水平(P＜0.01)。

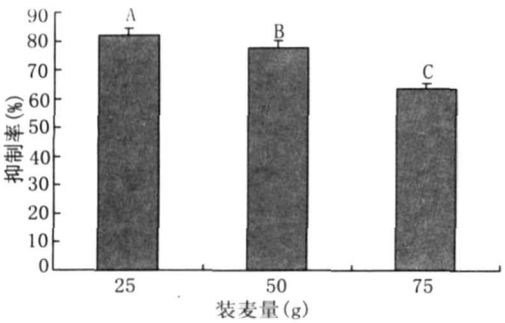

图 2　通气量对赤霉病菌毒素产生的影响

2.5　温度对小麦赤霉病菌产毒能力的影响

从图 3 可以看出，用小麦培养基在不同的温度下培养禾谷镰刀菌，对小麦赤霉病菌毒素的产生有一定的影响。25℃时禾谷镰刀菌毒素致病力最强，抑制率达 79%，22℃时抑制率较低为 60%，28℃时抑制率为 68%。说明在 25℃的温度条件下更适合禾谷镰刀菌的生长，此时其产生的代谢物质也较多，而在较低和较高的温度下菌丝生长缓慢，产生的代谢物质也较少。方差分析结果表明，在 22℃与 25℃条件下，小麦赤霉病菌产生的粗毒素对小麦种子胚根的抑制作用达极显著水平(P＜0.01)，而 28℃与 22℃、25℃比较，其对小麦种子胚根的抑制作用差异不显著。

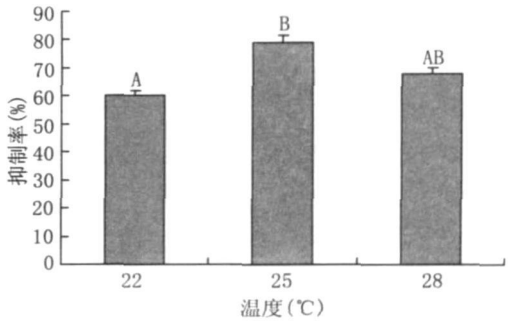

图 3　温度赤霉病菌对毒素产生的影响

3　结论与讨论

适合的培养基和培养条件对真菌毒素的产生及产量乃至对毒素物质最终的提取、纯化都具有重要的作用。培养基的营养成分、温度、培养时间、培养方式等对植物病原真菌产生毒素都有影响。小麦赤霉病菌在固体培养基内可以产生对小麦具有毒性作用的毒素，而且产生毒素的能力受培养条件的影响。

石晓燕等[9] 在液体培养基条件下培养 21～28d，禾谷镰刀菌培养滤液的毒性最强。本研究表明，在固体培养基中，小麦的营养成分比较适合小麦赤霉病菌的产毒，而以培养 30d 左右为最佳产毒时间，Miller 等[2] 的田间试验结果表明，DON 浓度在接种后 6 周达到高峰，随后便迅速下降，认为是植物体内酶对 DON 的降解作用，本试验有类似的现象，但在培养基内进行产毒培养，DON 的降解或转化并不是植物酶的作用，其具体原因有待进一步研究。在麦粒培养基接种培养 30d 时，DON 的产量达到最高，比田间自然情况下 6 周达到高峰的时间早 10d 左右，可能是培养条件更有利于禾谷镰刀菌的生长发育。

通气量影响毒素的产生，较高的通气量对菌丝的生长有利，因此，菌丝接触较多的氧气，利于其生长，从而产生更多的毒素。以小麦为培养基，麦装量太多，影响其菌通气量，不利于赤霉病菌毒素的产生，而以 250mL 瓶装麦量 25g 为宜。培养温度过高过低均影响毒素的产生，在 25℃时适合禾谷镰刀菌的菌丝生长，因此产生的代谢　(下转第 100 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

以后，胚状体诱导率增加，可能是由这种原因引起的。

2）$AgNO_3$ 可以减轻组织培养中材料的褐化程度。在花药培养中产生的乙烯能促使花药的褐化，而控制乙烯发生的有效方法是加入 $AgNO_3$，该法不但提高胚状体的诱导率，而且缩短出胚时间，延长胚状体的产生周期，促进胚状体的发生。王立浩等[7]发现，在辣椒花药培养中添加 $AgNO_3$ 还可以促进愈伤组织生成，提高胚状体的发生率。蔡连华等[8]试验表明，$AgNO_3$ 是影响彩色甜椒花药培养胚状体诱导率的最主要因素。本试验结果表明，$AgNO_3$ 是影响胚状体诱导率的最主要因素，$AgNO_3$ 在 50μmol/L 时胚诱导率最高。

3）近年来，越来越多的研究表明，培养基中添加适量的激素可以提高胚状体诱导率，不同基因型要求的激素浓度亦不相同。王玉英等[1]报道，低浓度的 NAA 利于花粉胚的形成和分化，高浓度却利于愈伤组织的形成。本试验中，NAA 的浓度达到 1.0mg/L，却不经过愈伤组织而直接形成胚状体，这说明较高浓度的 NAA 也可以促进胚状体的形成。2，4-D 在低浓度（0.1mg/L）下可以很好地诱导胚状体的形成，在高浓度下则不利于胚状体的产生。蔡连华等[8]研究表明，彩色甜椒适宜的 KT 浓度为 1.0mg/L 或 1.5mg/L，本试验中添加 KT 浓度为 0.1mg/L 时，胚状体诱导率最高，这也许是由于彩色甜椒比普通辣椒对 KT 浓度要求高所引起的。

参考文献：

[1] 王玉英，孙敬三，王敬驹，等. 小黑麦（*Triticale*）和辣椒（*Capsicum annuum*）花粉植株的诱导[J]. 中国科学：A 辑，1973(1)：104—107.

[2] George L，Narayanaswamy S. Haploid *Capsicum* through expemental androgenesis[J]. Protoplasma，1973，78：467—470.

[3] 李春玲，蒋仲仁. 对甜椒花药培养中一些影响因素的研究[J]. 中国蔬菜，1983(12)：35—37.

[4] 陈肖师. 甜椒花药培养及‘塞花一号’的育成[J]. 中国蔬菜，1988(3)：5—7.

[5] 庄军平，巩振辉，苏菁. 温度对辣椒花药愈伤组织形成的影响[J]. 西北农业学报，2001，10(2)：49—51.

[6] Vaulx-RD-de，Chambonnet-D. *In vitro* anther culture in red pepper，improvement of the rate of plant production in different genotype by treatment at 35℃[J]. Agronomie，1981，1：859—864.

[7] 王立浩，张宝玺，郭家珍，等. 辣椒花药培养中若干影响因素的研究[J]. 园艺学报，2004，31(2)：199—204.

[8] 蔡连华，雷建军，陈国菊，等. 彩色甜椒花药培养若干影响因子的研究[J]. 中国瓜菜，2005(4)：16—19.

（上接第 96 页） 物质较多，即更有利于其毒素的产生。

本试验从培养基种类、培养时间、通气量、温度几个方面研究了小麦赤霉病菌产生毒素的影响因子，明确了该菌产生毒素的最佳培养条件，这为该病原真菌毒素的进一步研究奠定了基础。

参考文献：

[1] Bal G H，Shaner G E. Wheat scab：perspective and control[J]. Plant Dis，1994，78：760—766

[2] Miller J D，Young J C，Sampson D R. Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat[J]. Plant Pathol，1985，7：132—134.

[3] 孟昭赫. 食品卫生检验方法注解微生物部分[M]. 北京：人民卫生出版社，1990：2234—2253.

[4] 柴守玺. 麦类作物赤霉病抗性离体筛选的原理与方法[J]. 麦类作物学报，2001，21(1)：76—80.

[5] 刘新琼，李祥，张向明. 小麦赤霉病与抗（耐）赤霉菌毒素关系的研究[J]. 华中农业大学学报，1999，18(5)：416—418.

[6] 罗毅，胡绪英. 培养物中脱氧镰刀菌烯醇的提取、纯化及鉴定[J]. 军事医学科学院院刊，1989(4)：290.

[7] 刘新琼. 小麦赤霉病菌毒素研究进展[J]. 湖北植保，1997(3)：23—24.

[8] 董金皋. 真菌毒素生物测定方法研究概况Ⅰ[J]. 河北农业大学学报，1992，15(4)：99—102.

[9] 石晓燕，邓福友. 禾谷镰刀菌液体培养产毒条件研究初报[J]. 河北农业大学学报，1992，15(4)：34—38.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net