

生产技术

# 病原菌毒素在作物抗病育种中的应用<sup>\*</sup>

## — 毒素的制备、活性测定及筛选方法

邹继军 杨庆凯

(东北农业大学大豆研究所)

植物病原菌毒素是病原菌产生的,不属于酶类的代谢产物。它能够使寄主产生特定病症反应,在植物病害的发生、发展过程中有明显的致病作用。目前,一个十分明显的趋势是把毒素研究与组织培养技术相结合,进行作物品种抗病性鉴定和抗性材料离体筛选。离体筛选与田间选择相比有很多优点:(1)不受时间的限制,可以在任何季节进行;(2)可以人为地创造严格的培养条件;(3)可以避免田间或温室条件下可能出现的灾害;(4)大大缩小选择所用的时间和空间。为更好的利用这些优点,使毒素得到更广泛应用,本文将对毒素的制备、活性测定及离体筛选方法等加以综述。

### 1 植物病原菌毒素的制备

病原菌经一段时间培养后,经过滤即可得到全毒培养液。全毒培养液或病菌的其它培养物浸提液经萃取和初步层析后可得到粗提毒素。由于萃取层析过程中消除了许多其它成分,粗毒素所含成分就相对简单多了,但它仍不是纯而单一的毒素,很可能是多种有毒成分的混合物。粗毒素再经薄层层析或高效液相层析等方法进一步分离纯化即可得到更纯的毒素。现在组织培养抗性筛选中最常利用的还是粗毒素。现列举几种毒素制备方法以供参考。

1.1 玉米小斑病 T小种毒素制备(谢建敏等,1991) 菌种接种于 PDA斜面→ 25℃培养 7天→改进的 Fries3号培养液→ 26℃,振荡培养 7天→ 15 000g, 30'离心→上清液经 0.45μ 微孔滤膜抽滤→粗毒素

1.2 水稻白叶枯病菌毒素制备 己烷提取白叶枯病菌振荡培养, 28℃, 5~ 7天→ 10 000rpm /s离心→上清液,调 pH= 3→加入等量的乙酸乙酯(重复 3次)→①水相→加入 3倍 95%乙醇或丙酮→ 8 000rpm /s离心→取沉淀加水稀释→水相毒素;②酯相→抽提→取干物质加无水乙醇→毒素粗提物

1.3 小麦赤霉病毒素(DON)制备 粗粉样品 20克(病菌接种于灭菌麦粒, 25℃培养 7天,烘干粉碎)→乙醇:水(3: 1= V: V) 150ml→振荡提取(30分钟),过滤→取 50ml滤液→正己烷(25ml)提取→下层提取液,加适量乙醇(3~ 5ml)→减压浓缩至干(50℃)→残留物,加入乙醇(5ml, 2+ 2- 1)→ Florisil柱(10克,正己烷饱和)→ 100ml正己烷洗脱,去掉洗脱液→ 100ml三氯甲烷:甲醇(9: 1= V: V)洗脱,收集洗脱液→减压浓缩至干(50℃)→残留物,加 2ml乙醇→DON提取液→生物测定,气相色谱分析或气质连谱分析。

### 2 植物病原菌毒素的活性测定方法

利用毒素进行抗性筛选,一个急待解决的问题就是它的使用剂量。如剂量高,死亡率高,易

\* 收稿日期 1997- 04- 23

于导致一些抗病材料的丧失;如剂量低,选择压力小,则不易选出高抗材料。所以,在培养基上施用毒素前,要确定它的生物活性,进而选择适宜的剂量。毒素生物活性测定方法已有很多,但不同方法有时却可能得出不同的结果,在测定过程中,有必要选择抗性材料和感病材料为对照,这不但便于不同方法之间的比较,而且可在一定程度上减少不纯毒素制剂的影响

现列举几种常用的、简便易行的测定方法

2.1 根生长测定法 Luke和 Wheeler(1955)利用含 HV 毒素(维多利亚长蠕孢毒素)制备的一系列稀释液,进行了改进的根生长测定,在润湿纸上萌发并选择均匀一致的燕麦幼苗,放在含有毒素溶液的培养皿中培养。72小时以后,测量每个幼苗最长的根,确定使根延长受到抑制达 50%的稀释浓度。制剂的相对活性以毒性单位和毫单位表示,毫单位是一毫升内可降低感病幼苗根长达 50%的毒素制剂。Pringle和 Braun(1957)把根长受到完全抑制的最大稀释浓度作为参比点。选择这一终点是因为经过几个数量级的稀释都能使根长受到相似的(部分)抑制。在后来的研究中,又求出测试终点的稀释液中毒素的干重,用来估计某一制剂的相对活性。Ludwig(1967)用 5ml 毒素稀释液浸 25粒大麦种子 4到 8小时后移到垫有湿滤纸的培养皿上,3天后记载种子萌发率,以 3种浓度(100%, 50%, 2%)毒素抑制种子萌发的平均值为毒素指数。

2.2 根冠细胞测定法 浸种 24hr→消毒(0.01升汞 0.5hr)→无菌滤纸(湿)催芽,28℃,2~3天芽长 2cm左右→(方法 1)直接置根于毒素中,30℃,2~4hr→放在玻片上→中性红 5分钟→伊斯兰,5分钟→切下根冠细胞敲碎镜检→兰色,为死亡细胞,红色,为活性细胞。(方法 2)取 2~3条根,加 2ml毒素→振荡 10分钟后离心(8000rpm/s)→脱生根冠细胞→0.05%中性红染色 5分钟→0.02%伊斯兰+1滴中性红,5分钟→1滴伊斯兰,5分钟→观察

2.3 叶片测定法 Pringle等(1957)在研究菊池链格孢菌毒素过程中设计出叶片测定法。他们用针刺破高度感病的“二十世纪”梨的新叶表面,每一伤口施用 1微滴含有毒素的溶液,然后将叶片置于湿室内培养。24小时后测量施用点周围发展的黑斑面积。结果表明这种测定方法是有效的,适用于多种类型的试验。康绍兰等(1991)利用玉米小斑病菌毒素涂抹玉米叶片,发现叶片上出现典型的小斑病症状。

2.4 电解质渗漏测定法 以毒素导致电解质渗漏为依据的测定,原为 Wheeler和 Black(1963)提出,后由 Damann等(1974)加以改进,叶片样品用毒素加以短暂处理后,根据周围溶液电导率的变化测定电解质的渗漏。这种测定可以是定量的,因为毒素导致的渗漏率对一定浓度的毒素在 3小时或更长时间内是线性的,而且是恒定的。这种方法在较短时间内(3~5小时)就可得到结果,克服了根生长测定时间较长(需要几天)对某些不稳定毒素制剂定量研究的不利影响。

### 3 筛选方法

Chawla和 Wenzel(1987)最先报道用麦根腐毒素做筛选剂,通过组织培养来筛选抗毒素愈伤组织,并再生出抗病植株。他们从未成熟胚诱导愈伤组织,3~4个月后用毒素进行筛选,采用连续法和间歇法。连续法是连续地将未被杀死的愈伤组织移到含毒素的培养基上,每 3周为 1次,共 4个周期。间歇法在第 2个或第 3个周期后让愈伤组织在无毒素培养基上生长一次,经过选择留下来的愈伤组织有一部分再生植株,经人工接种鉴定,得到具有抗病反应的植株。抗病植株经电泳进行生化鉴定发现,经毒素选择的愈伤组织比未经选择的愈伤组织多一条蛋白谱带(高必达,1991)。

筛选方法应根据实际情况而定,例如,可以在诱导培养基、继代培养基、分化培养基中加同

浓度的毒素,也可以把毒素从低到高成一定梯度加入;还可以选用胚性愈伤组织,打碎成 1~2mm 大小(为加大与毒素接触面积),在液体培养基中振荡后继续培养,选出抗性愈伤组织,然后分化成再生植株进行接种鉴定。

#### 4 应用展望

大量研究表明,利用毒素可以做为一件简单易行的淘汰感病材料,筛选高抗的品系或品种。我国先后在玉米小斑病、小麦赤霉病、小麦根腐病、水稻白叶枯病、油菜菌核病和水稻胡麻斑病等病害的抗病育种中运用了这一方法,并取得了成功。

随着研究的深入,还会有新的毒素被发现(如近年提取到的大豆灰斑病菌毒素),并在毒素的性质、作用机制、生物合成等方面取得更大的进展。最近的一些研究表明(章元寿,1995),毒素不但可用于筛选抗病材料,而且在适当的施用剂量下,还可作为一种外源激发子来诱导抗性 or 促进植物生长。例如,麦根腐长蠕孢菌毒素高浓度抑制植物生长,低浓度却促进叶鞘和根伸长;壳梭孢菌毒素对胡萝卜、豌豆等有增加细胞分裂的作用等。这必将促进毒素在作物抗病育种上的进一步应用。

### 参 考 文 献

- 1 高必达等.麦根腐长蠕孢毒素研究概况.全国首次植物病原真菌毒素研讨会论文摘要汇编,1991,49~ 54
- 2 康绍兰等.诱发小麦根腐病突变体的研究.河北农业大学学报,1991,22(2): 54~ 59
- 3 谢建敏等.病原菌产生的植物毒素对不同抗病性寄主植物叶组织电阻率的影响.全国首次植物病原真菌毒素研讨会论文摘要汇编,1991,20
- 4 章元寿.关于植物病原菌毒素研究中几个问题的商榷.全国第三届植物病原菌毒素学术研讨会论文摘要集,1995,1~ 3
- 5 Damann, K. E. Jr. et al, An assay for *Helminthosporium victoriae* toxin based on induced leakage of electrolytes from oat tissue. *Phytopathology*, 1974, 64 652~ 654
- 6 Luke, H. H., Wheeler, H. E., Toxic production by *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology*, 1955, 45 453~ 458
- 7 Pringle R. B., Scheffer R. P., Host specific plant toxins. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1964, 2 133~ 156
- 8 Pringle, R. B., Braun, A. C., 1957, The isolation of the toxin of *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology*, 1957, 47 369~ 371
- 9 Samaddar, K. R., Scheffer, R. P., Effect of the specific toxin in *Helminthosporium victoriae* on host cell membranes. *Plant Physiol*, 1968, 43 21~ 28
- 10 Scheffer, R. P., Pringle, R. B., Respiratory effects of the selective toxin of *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology*, 1963, 53 465~ 468
- 11 Wheeler, H., Black, H. S., Effect of *Helminthosporium victoriae* and victorin upon permeability. *Am. J. Botany*, 1963, 50 686~ 693