

玉米小斑病菌 O 小种毒素的生物活性测定

商鸿生 李珏仁

(西北农业大学植保系, 陕西杨陵 · 712100)

胡必德

(陕西省农科院粮作所, 陕西杨陵 · 712100)

摘 要 中国玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)小种培养滤液含有活性较强的生理活性物质, 对供试 15 个自交系种子根生长具有明显的抑制作用, 可诱导幼苗和离体叶片产生典型的小斑病症状, 自交系对培养滤液致病作用的抵抗性与幼苗对病菌的致病性密切相关, O 小种培养滤液对玉米根冠细胞具有强烈的致死作用, 根冠细胞对培养滤液的敏感性与幼苗对病菌的感病性间存在明显的正相关。据此, 初步认为 O 小种滤液中的生理活性物质为 O 毒素。

关键词 玉米小斑病菌, O 小种, 毒素, 生物测定

中图分类号 S432.22

玉米小斑病菌最重要的生理小种为 T 小种和 O 小种, T 小种可产生多量的寄主专化性毒素, 称为 T 毒素, 对 T 型细胞质玉米具有选择毒性, 曾引起 1970 年美国玉米小斑病大流行^[1]。一些研究指出, O 小种在体内外均产生少量毒性物质, 抑制玉米种子根生长, 但活性较低, 因而在病害侵染中并无作用^[2]。Yoder 认为 T 小种和 O 小种都产生 O 毒素, 只有 T 小种才产生 T 毒素^[3]。然而, 至今未能在直接的生物测定中证实 O 毒素存在。

多年来, 我国主要栽培的仍然是正常细胞质玉米品种, O 小种是我国玉米小斑病的主要生理小种, 迫切需要澄清 O 毒素的存在问题以及 O 毒素在病害发生过程中的作用。我们于 1987 年~1989 年以我国 O 小种代表性菌株培养滤液为研究素材, 测定了 O 毒素的生物活性。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试菌株 包括 FF-5, 中 O, LZ-6, DF-1, 秦-4 等 5 个 O 小种菌株, 其中中 O 为标准的 O 小种菌株, 由河北农业大学提供, 其余为西北农业大学鉴定出的陕西省代表性 O 小种菌株。

供试寄主 辽马 43、二南二四和罗 31 等玉米自交系由河北农业大学提供, 7943、武 210、自 330、徐 M4、武 109、武 117、M017、吉 63、黄早四、获白、埃及 205 和白 525 等自交系由陕西省粮作所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 O 小种培养滤液制备

供试菌株采用常规单胞分离技术, 获得单胞菌系。用 PDA 平板扩繁后, 切取 6.0 mm 见方的菌丝块, 接种改良 Fries 液体培养基, 置于 SHA-C 型, 恒温水浴振荡器上,

收稿日期: 1992-01-15; 修改稿收到日期: 1992-09-15

在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、振速为 $125 \sim 135 \text{ r/min}$ 条件下培养,每天振荡 16 h. 7 d 后取出,用双层纱布滤去培养液中的菌丝团,再用定量滤纸滤去菌丝碎片和分生孢子,最后用细菌滤器在超低压下抽滤,得到纯净的培养滤液。用 PDA 平板划线分离培养,确认滤液中不会有小斑病菌接种体。滤液保存于 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 冰箱内备用。

1.2.2 O 小种培养滤液生物活性的测定方法

(1) O 小种培养滤液对种子根的生长抑制作用测定参照 Hooker 等的方法^[4],每一处理 15 个芽苗,重复 3 次。计算种子根生长抑制率:

$$\text{种子根生长抑制率(\%)} = \frac{\text{对照种子根长度} - \text{滤液处理的种子根长度}}{\text{对照种子根长度}} \times 100$$

(2) O 小种滤液对玉米离体叶片的致病性测定,参照 Hooker 等的方法^[4],将离体玉米叶片切段培养在 $16 \sim 20^\circ\text{C}$, $1500 \sim 2000 \text{ lx}$ 的条件下,72 h 后记载叶段的浸润区长度(从两端切口到浸润区前缘的距离之和)和症状严重度,每一处理 7~10 个叶段,重复 3 次。严重度划分标准如下:

0 级:叶段鲜绿色,无明显中毒浸润区。

1 级:浸润区长度 3 mm 以下,浸润区占叶片总面积 $1/6$ 以下。

2 级:浸润区长度 3.1~6.0 mm,浸润区占叶片总面积的 $1/6 \sim 1/3$ 。

3 级:浸润区长度 6.1~9.0 mm,浸润区占叶片总面积的 $1/3 \sim 2/3$ 。

4 级:浸润区长度 9.1 mm 以上,浸润区占叶片面积的 $2/3$ 以上。

(3) O 小种滤液对玉米幼苗的致病性测定

将浸透滤液的滤纸片($12 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$),贴附于供试自交系 3~5 叶期幼苗第二叶中部,每叶 3 片,相互间隔适当距离。对照采用改良 Fries 培养液处理。幼苗培养在 $25 \sim 27^\circ\text{C}$, $\text{RH}90\% \sim 100\%$ 的条件下,每天光照 12 h,于光照结束前更换滤纸片,3 d 后记载症状类型和病斑长度。每一处理 10 株,重复 2 次。

(4) O 小种滤液对玉米根冠细胞致死作用的测定

依董金皋等的方法^[5]。离体的玉米根冠细胞一般呈棒状或曲棒状,两端钝圆,原生质含量丰富,无液泡或液泡很小,加入中性红染色液后,活细胞的原生质部分染成红色,细胞壁不着色,死细胞不着色。每一处理镜检 500 个根冠细胞,重复 2 次,按下式计算根冠细胞致死率:

$$\text{根冠细胞致死率(\%)} = \frac{\text{对照根冠细胞存活率} - \text{滤液处理根冠细胞存活率}}{\text{对照根冠细胞存活率}} \times 100$$

2 试验结果

2.1 对玉米种子根的生长抑制作用

供试 O 小种培养滤液对玉米种子根的生长具有明显的抑制作用(见附表),种子根平均缩短 $1.50 \sim 30.7 \text{ mm}$,种子根生长抑制率为 $38.3\% \sim 87.7\%$ 。供试自交系对 O 小种培养滤液的敏感性存在明显差异,辽马 43 和黄早四最敏感,平均抑制率为 85.2% 和 87.7% 。二南二四、7943、武 210、自 330、武 109、武 117、罗 31、吉 63、徐 M4、获白、埃及 205 和白 525 等自交系中度敏感,平均抑制率在 $44.5\% \sim 79.6\%$ 之间, M017 最抵抗,平均抑制率为 38.3% 。

2.2 对玉米离体叶片的毒性

离体叶片法测定表明,供试5个O小种菌株培养滤液对15个玉米自交系离体叶片都表现致病性(附表)。处理后72h,叶段边缘出现水浸状中毒区,后变为褐色枯死并逐渐向内扩展,严重的整个叶片变色。用Fries培养液处理的离体叶片在整个试验期间保持鲜绿色。

供试各自交系间对培养滤液致病作用的抵抗性具有明显差异,且与其对O小种的抗病性明显相关。高度抗病的M017和黄早四的离体叶片对O小种培养滤液表现抵抗,严重度为1级。中等抗性的自交系7943、获白、二南二四、辽马43、白525、徐M4、吉63的离体叶片对O小种滤液的敏感性居中,严重度多为2级,其余中感及高度自交系对O小种培养滤液则表现高度敏感,严重度高达3~4级。

附表 O小种培养滤液的生物活性

项目 (%)	M017	黄早四	7943	二南二四	辽马43	获白	徐M4	白525	吉63	武210	自330	武117	埃及205	罗31	武109
种子根生长抑制率	38.3	87.7	62.4	53.3	85.2	71.7	48.1	66.5	44.5	51.2	56.3	62.6	70.2	79.6	61.4
离体叶片的毒害严重度	1.0	1.0	2.0	2.0	2.5	2.5	3.0	3.0	3.0	3.5	3.0	3.0	3.5	3.5	4.0
根冠细胞的致死率	9.2	18.9	29.5	47.1	43.9	51.8	40.7	43.5	48.2	43.4	45.4	46.9	65.4	87.3	92.7

注:表中数据均为平均值。

2.3 对玉米幼苗的致病性

O小种培养滤液在辽马43、二南二四、罗31、武109、武117和7943等供试自交系幼苗上均可诱导出典型的萎蔫症状,叶片处理后首先变为暗绿色,2d后变为水浸状,3d后或为萎蔫性病斑,叶片下垂,最后枯萎死亡。叶片出现病斑后继续施以培养滤液,病斑会迅速扩大;若停止滤液处理,则很快停止扩展。对照玉米幼苗在整个试验期间无病斑出现。

2.4 对根冠细胞的致死作用

O小种培养滤液处理后,根冠细胞都出现死亡,致死率为9.2%~92.7%(附表)。因供试自交系而不同。供试5个O小种菌株配养滤液对根冠细胞致死作用基本一致。

供试自交系根冠细胞对配养滤液的敏感性与该自交系对O小种的感病性存在显著的正相关。苗期高抗O小种的M017和黄早四,其根冠细胞对O小种培养滤液最不敏感;中度抵抗O小种的自交系7943、二南二四、辽马43、获白、白525、徐M4、吉63以及中度感染O小种的自交系罗31、埃及205、武117、武210和自330等,其根冠细胞对O小种配养滤液中度敏感;高度感染O小种的武109,其根冠细胞对O小种培养滤液高度敏感,致死率高达92.7%。

3 结论与讨论

研究表明,玉米小斑病菌O小种培养滤液中含有活性较强的生理活性物质,对玉米离体叶片和幼苗具有毒性,能诱导出典型的玉米小斑病症状,而且玉米离体叶片对培养滤