

# 低浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液 诱导寄主抗性的研究

商 闯<sup>1,2</sup>, 马春红<sup>2</sup>, 贾银锁<sup>2</sup>, 翟彩霞<sup>3</sup>, 李运朝<sup>2</sup>, 董文琦<sup>4</sup>, 崔四平<sup>2</sup>, 侯立白<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 农学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 河北省农林科学院 遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051;

3. 河北省农林科学院 农业资源环境研究所, 河北 石家庄 050051; 4. 河北省农林科学院, 河北 石家庄 050051; )

**摘要:** 利用低浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液作为激发子诱导玉米获得抗病性。以一对同核异质玉米 B37 自交系为试材, 采用离体叶片接种法检测适宜诱导抗性的低浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液作为激发子诱导玉米抗病性的适宜诱导浓度, 测定与抗病性相关酶的变化。经用 1:50 和 1:60 的低浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理植株, 再接种高浓度(1:10)毒素培养滤液处理的病斑面积分别为(0.30±0.14)和(0.36±0.17)mm<sup>2</sup>, 而对照为(2.70±0.24)mm<sup>2</sup>, 是处理的 7.5~9 倍, 差异极显著。经 0~72 h 的动态检测, 以 1:60 预处理效果为最佳, 与对照相比, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性平均提高了 23.4%, 过氧化物酶(POD)活性平均提高了 65.9%, 有害物质丙二醛(MDA)的含量平均降低了 28.2%。叶片内部所产生的生化反应与叶片表面的抗病病理反应相吻合, 证实低浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素滤液本身能够成功地作为激发子来诱导寄主—玉米获得抗性。

**关键词:** 玉米小斑病菌 C 小种 毒素培养滤液; 苯丙氨酸解氨酶(PAL); 过氧化物酶(POD); 丙二醛(MDA); 诱导抗性

**中图分类号:** S513.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)02-0198-07

## Induced Host Disease by Culture Filtrate of *Bipolaris maydis* Race C Toxin Cultivation in Maize (*Zea mays* L.)

SHANG Chuang<sup>1,2</sup>, MA Chun-hong<sup>2</sup>, JIA Yin-suo<sup>2</sup>, ZHAI Cai-xia<sup>3</sup>,  
LI Yun-chao<sup>2</sup>, DONG Wen-qi<sup>4</sup>, CUI Si-ping<sup>2</sup>, HOU Li-bai<sup>1</sup>

(1. Faculty of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences,

Shijiazhuang 050051, China; 3. Institute of Resources and Environment, Hebei Academy of

Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 4. Hebei Academy of Agriculture and

Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

**Abstract:** Disease to maize southern leaf spot disease was induced by culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation. A pair of homokaryon B37 inbred lines in maize was used as the test material. The toxin activity was measured by the detached leaf method to find its optimal concentration as a plant defense activator that induces maize disease resistance, and several enzymes involved in disease resistance were presented. The lesion area on the leaves was significant difference by ANOVA. They were (0.30±0.14) and (0.36±0.17) mm<sup>2</sup> respectively after pretreated with 1:50 and 1:60 of culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation were (0.30±0.14) and (0.36±0.17) mm<sup>2</sup> respectively. It was decreased 7.5~9 times compared with the CK (2.70±0.24) mm<sup>2</sup>. At the same time, the changes of peroxidase (POD), phenylalanine ammonialyase (PAL), malondialdenvde (MDA) activities were determined. During 0~72 h inspection, the effect of 1:60 concentration was better than that of 1:50, PAL activity increased by 23.4%, POD activity increased by 65.9%, but the malondialdenvde (MDA) content decreased by 28.2% compared with the CK. It was shown that culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation itself can function as an elicitor to induce host

收稿日期: 2008-03-20

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(C2006000744); 国际科技合作资助项目(2006DFB02480); 河北省科学技术研究与发展计划项目(07297162D); 河北省农林科学院发展研究资助项目(A03-2-01-14)

作者简介: 商 闯(1982-), 男, 辽宁鞍山人, 在读硕士, 主要从事植物抗病生理研究。

通讯作者: 马春红(1968-), 女, 浙江金华人, 副研究员, 主要从事植物抗逆生理和遗传育种研究。

侯立白(1951-), 男, 辽宁沈阳人, 博士生导师, 教授, 主要从事农村可持续发展研究。

disease resistance in maize.

**Key words:** *Bipolaris maydis* race C; Culture filtrate of toxin cultivation; Phenylalanine ammonialyase (PAL); Peroxidase (POD); Malondialdehyde MDA (MDA); Induced resistance

玉米小斑病是全世界普遍发生的病害之一。1970年,美国由于大面积连年使用T细胞质(CMS-T)玉米,引起玉米小斑病菌T小种大流行,给生产造成巨大损失<sup>[1,2]</sup>。Smith D R等<sup>[3]</sup>首次报道了玉米小斑病菌中存在T和O 2个生理小种。T小种对T细胞质是专化的,其病害流行的决定因子为其病原菌所分泌的专门浸染T细胞质玉米的致病毒素(HMT-toxin)<sup>[4,5]</sup>,而O小种对雄性不育细胞质专化性很小或没有专化性。1988年,魏建昆等<sup>[6,7]</sup>首次报道了中国存在玉米小斑病菌C小种,使生理小种增加到3个,引起了国内外植物病理学家和作物育种学家的广泛注意,随后国内又进一步从病理学<sup>[8-10]</sup>、形态学<sup>[11]</sup>、生理学<sup>[12]</sup>和分子生物学<sup>[13]</sup>等方面进行了比较系统的研究,均证明C小种是对C细胞质玉米专化侵染的生理小种。

植物诱导抗病性是国际上近期兴起的重要的农业研究领域,被认为是植物保护的新途径和新技术<sup>[14,15]</sup>。诱导抗病性就是利用物理的、化学的以及生物的方法预先处理植株,改变植物对病害的反应,使原来的感病反应产生局部或系统的抗性<sup>[16,17]</sup>。近年来,植物诱导抗病性的方法及其机理的研究十分活跃<sup>[18]</sup>。利用诱导因子激发植物自身的抗病性,以达到控制植物病害的目的,既不污染环境,又有利于农业的可持续发展,因此愈来愈受到人们的重视<sup>[19,20]</sup>。

迄今为止,国内外未见选育出抗T小种的T细胞质的报道。2006年,马春红等<sup>[21]</sup>首次利用低浓度玉米小斑病菌T小种培养滤液作为激发子预处理,成功地诱导了T细胞质对T小种的抗性,但能否利用低浓度玉米小斑病菌C小种培养滤液作为激发子诱导C细胞质对C小种的抗性尚无报道。本试验主要研究用低浓度玉米小斑病菌C小种毒素培养滤液作为激发子诱导寄主—玉米的抗病性,并进行与抗病性相关酶的变化研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试品种:玉米试材基因型为B37的C型不育细胞质(CMS-CB37)及其同核保持系NB37,供试菌种:玉米小斑病菌C小种(race C),供试品种和菌种均由河北省农林科学院遗传生理研究所提供。

### 1.2 方法

1.2.1 玉米幼苗的培养 选饱满玉米种子,用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒5 min,蒸馏水反复冲洗后,在28℃恒温培养箱中浸泡24 h,26℃催芽2 d,待胚根长至1 cm左右,选取生长一致的籽粒种于花盆中土培。培养温度28℃,每天光照12 h,用三叶一心期的幼苗作试验材料<sup>[22,23]</sup>。

1.2.2 毒素培养滤液的制备 玉米小斑病菌C小种菌株PDA培养基上恒温25℃复壮培养7 d,在500 mL三角瓶中装入250 mL Fries液体培养基,每瓶接种4~5个菌丝块( $\Phi=6$  mm),恒温25℃黑暗静置培养15~20 d。过滤获得毒素培养滤液,保存在4℃冰箱内备用<sup>[22]</sup>。

#### 1.2.3 处理

1.2.3.1 适宜诱导抗性的低浓度筛选处理 将滤液用无菌水按体积比稀释配制成一系列的浓度梯度(1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60),采用离体叶片法分别检测其致病性。剪下五叶期幼苗的第4叶片,剪成约8 cm的片段,在离叶缘3 mm处针刺,每穴刺3个针眼,穴距1 mm,取不同浓度梯度的C小种毒素培养滤液0.04 mL滴于小棉球上,然后依次置于各穴上,放置于铺有湿滤纸的培养皿(12 cm×12 cm)内,在25℃保湿连续培养72 h,期间观察C小种毒素培养滤液的致病程度及病斑形成过程。

1.2.3.2 试验处理 选用适宜诱导抗性的低浓度C小种毒素培养滤液分别处理三叶一心期玉米的第三完全叶片,即用其涂在玉米的叶背,用涂蒸馏水作为对照,连续涂3 d。3 d后分别把相应处理的同位叶片剪为大小一致的3段,置于铺有湿滤纸的培养皿(12 cm×12 cm)内,在离叶缘3 mm处针刺,每穴刺3个针眼,穴距1 mm,取高浓度C小种毒素培养滤液(1:10)0.04 mL滴于小棉球上,然后依次置于各穴上,放入人工气候培养箱内,在27℃光照、黑暗各12 h的条件下培养72 h,然后观察并点数病斑数。

#### 1.2.4 相关酶的测定

1.2.4.1 过氧化物酶(POD)活性测定 采用愈创木酚法,测定OD<sub>470</sub>值的变化,以每分钟OD<sub>470</sub>增加0.001所需酶量为一个酶活性单位<sup>[21,24]</sup>。

1.2.4.2 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定 取液氮处理的玉米叶片0.1 g,加5 mL含5 mmol/L的巯基乙醇的硼酸缓冲液,0.2 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP),

少量石英砂在研钵中研磨,在 4℃ 10 000 r/min 离心 15 min,上清液为酶粗提液。取 1 mL 酶液、1 mL 0.02 mol/L L-苯丙氨酸、2 mL 蒸馏水,总体积为 4 mL;对照加 1 mL L-苯丙氨酸、3 mL 蒸馏水,反应液置于恒温水浴 30℃ 保湿,0.5 h 后用 751 型紫外分光光度计在 290 nm 处进行测定,以每小时在 290 nm 处吸收变化 0.01 (OD) 所需酶 (PAL) 量为一单位<sup>[21, 25]</sup>。

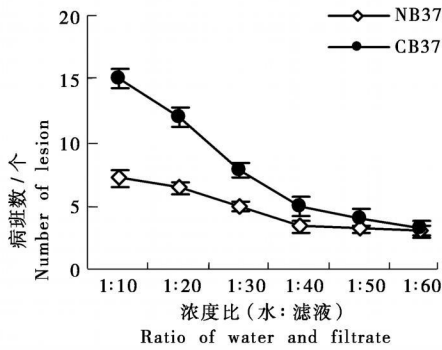


图 1 玉米小斑病菌 C 小种毒素不同浓度的培养滤液对同一基因型不同细胞质玉米叶片感病的影响, n=6

Fig 1 Influence to B37 maize leaves treated by various concentration culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation, n=6

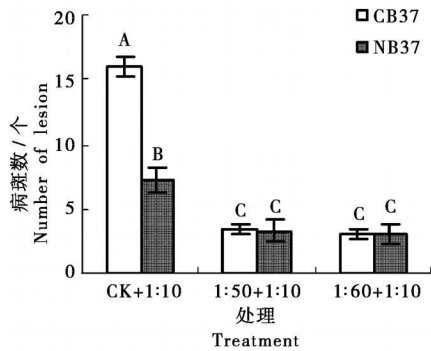


图 2 经 1:50, 1:60 玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理 3 d 后, 再接种 1:10 高浓度滤液培养 72 h 对其病斑数及病斑面积的变化影响

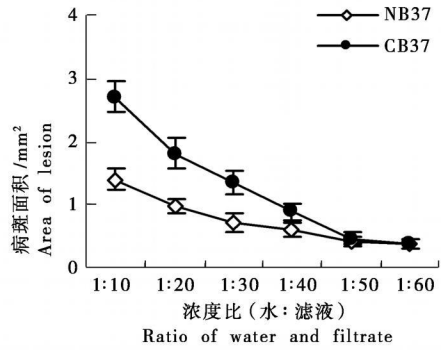
Fig 2 Influence to B37 maize leaves treated by low concentration (1:50 and 1:60) culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation for 3 d and then high concentration (1:10) for 72 h

## 2 结果与分析

### 2.1 适宜诱导抗性的低浓度的筛选

适宜诱导抗性的低浓度的筛选,以玉米叶片感病后的病斑数和病斑面积为感病指标,来检测玉米叶片对各浓度培养滤液的感病程度。从图 1 可以看出,随着毒素培养滤液浓度的降低,玉米叶片的感病情况逐渐减轻。经稀释为 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液处理的 CMS—CB37 与 NB37 玉米叶片后,滤液仍表现出对 C 细胞质有较强的专化性,病斑数和病斑面积均明显高于 NB37, 方差分析表明:经稀释为 1:10, 1:20, 1:30 玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液处理的玉米叶片

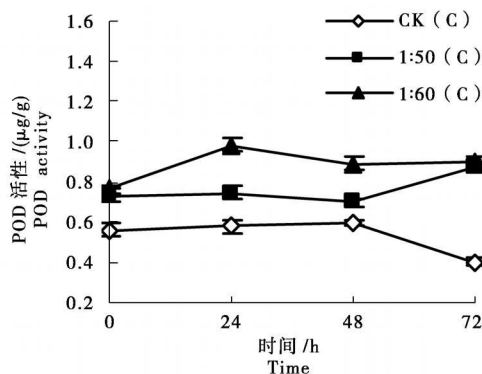
1.2.4.4 丙二醛(MDA)含量测定 称取液氮处理的玉米叶片 0.5 g,加入 10% TCA 2 mL 和少量石英砂研磨至匀浆,再加 3 mL TCA 进一步研磨,匀浆以 4 000 r/min 离心 10 min,上清液为样品提取液。取上清液 2 mL,对照加 2 mL 蒸馏水,加入 2 mL 0.6% TBA 溶液,沸水浴反应 15 min,迅速冷却后再离心 15 min。取上清液,分别在 532, 600 和 450 nm 处用 751 分光光度计测定<sup>[24, 26]</sup>。



后, CMS—CB37 与 NB37 之间的病斑数和病斑面积有极显著差异 ( $p < 0.01$ ), 经稀释为 1:40 玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液处理的玉米叶片后, CMS—CB37 与 NB37 之间的病斑数和病斑面积显著差异 ( $p < 0.05$ ); 而经稀释为 1:50, 1:60 玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理叶片后,此时 C 小种毒素培养滤液对 C 细胞质便失去了固有的对 C 细胞质很强的致病性并不表现出较强的专化性, C 与 N 细胞质之间叶片的感病程度几乎一致, CMS—CB37 与 NB37 之间的病斑数和病斑面积差异不显著 ( $p > 0.05$ ), 病斑少且小, 约 3 个左右, 面积为 0.16 ~ 0.53 mm<sup>2</sup>。鉴于以上结果, 本试验采用稀释为 1:50, 1:60 低浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液作

为诱导和提高寄主—玉米抗病的激发子较为适宜。

图2表明, 经1:50, 1:60玉米小斑病菌C小种毒素培养滤液预处理3d后, 再接种1:10的滤液, 与对照相比, 病斑数减少, 病斑面积降低。方差分析表明, 试验处理和对照间的差异达到了极显著水平( $p < 0.01$ ); 对照接种1:10的高浓度滤液后, C型不育细胞质玉米叶片病斑数和病斑面积显著高于同核异质保持系NB37( $p < 0.01$ ); 1:50, 1:60两个低浓度预处理之间的叶片病斑数和病斑面积, 无论C型不育细胞质, 还是同核异质保持系NB37, 叶片病斑数和病斑面积差异均不显著, 且C细胞质和N细胞质之间也无显著差异。由此说明, 低浓度玉米小斑病菌C小种毒素培养滤液可以作为激发子, 来诱导和提高玉米对小斑病C小种的抗性。



CK(C)为蒸馏水处理 CB37, 1:50(C), 1:60(C)分别为 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液处理 CB37。

CK(C); treat CB37 with sterile water, 1:50(C) and 1:60(C); treat CB37 respectively with 1:50 and 1:60 concentration filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation

图3 1:50 1:60玉米小斑病菌C小种毒素培养滤液预处理CB37叶片3d后, 再接种1:10高浓度滤液培养72h期间POD的变化

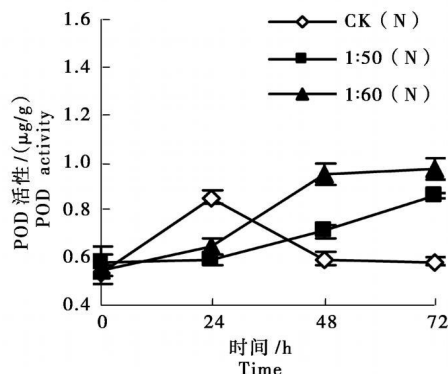
Fig. 3 The change of POP activity in CB37 leaves treated by high concentration(1:10) culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin for 72 h after induced by low concentration (1:50 and 1:60) for 3 d

## 2.2 不同稀释倍数的培养滤液对POD的影响

图3表明, 经稀释为1:50玉米小斑病菌C小种毒素培养滤液预处理的CMS—CB37玉米叶片再接1:10的较高浓度培养滤液后, POD的活性变化在0~48h内呈下降趋势, 并在48h达到最低值, 48~72h又逐渐升高, 呈上升趋势; 经稀释为1:60玉米小斑病菌C小种毒素培养滤液预处理的CMS—CB37玉米叶片再接1:10的较高浓度滤液后, POD的活性变化在0~24h内呈上升趋势, 并在24h上升达到峰值, 24~72h出现下降趋势; 对照CK(C)再接种1:10的较高浓度滤液后, POD的活性变化在0~48h内均呈上升趋势, 并在48h上升达到峰值, 48~72h出现下降趋势。经低浓度培养滤液预处理再接1:10

较高浓度培养滤液后, 不论POD活性如何变化, CMS—CB37玉米叶片中的POD酶活性均高于同类叶片未经低浓度毒素预处理的对照。经0~72h的动态检测, POD活性比对照平均提高了42.6%(1:50)和65.9%(1:60); t测验结果表明, 72h时, 处理组1:60, 1:50(C)与对照CK(C)相比差异极显著( $p < 0.01$ ), 以上均说明本试验以1:60(C)低浓度培养滤液预处理的效果最好。以上证实低浓度培养滤液对C细胞质玉米叶片起到了预先诱导抗小斑病菌C小种的作用。

同时将C细胞质与N细胞质之间进行比较, t测验结果表明, 72h, 1:60(C)与CK(N)两者差异显著( $p < 0.05$ ), 且1:60(C)处理的玉米叶片中POD酶活性高于CK(N), 因此经低浓度C小种毒素培养滤液处理的C细胞质叶片的抗病性显著增加, 甚至比N细胞质玉米的抗病性还要强。



CK(N)为蒸馏水处理NB37, 1:50(N), 1:60(N)分别为1:50, 1:60浓度玉米小斑病菌C小种毒素培养滤液处理NB37

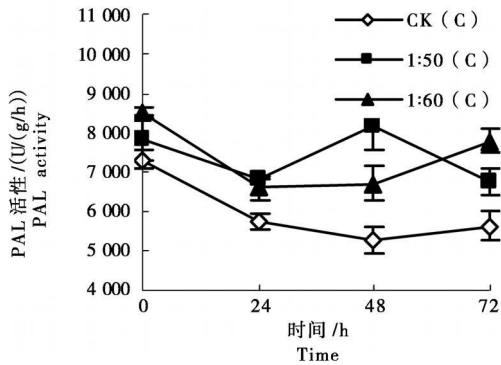
CK (N); treat NB37 with sterile water, 1:50(N) and 1:60(N); treat NB37 respectively with 1:50 and 1:60 concentration filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation

图4 1:50 1:60玉米小斑病菌C小种毒素培养滤液预处理NB37叶片3d后, 再接种1:10高浓度滤液培养72h期间POD的变化

Fig. 4 The change of peroxidase activities in NB37 leaves treated by high concentration(1:10) culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin for 72 h after induced by low concentration (1:50 and 1:60) for 3 d

图4显示, 经低浓度C小种毒素培养滤液处理的NB37玉米叶片中POD的活性都有上升的趋势, 而对照中POD的活性表现为先上升后下降的趋势。经0~72h的动态检测, 处理组1:60(N)的效果要比1:50(N)的效果好。

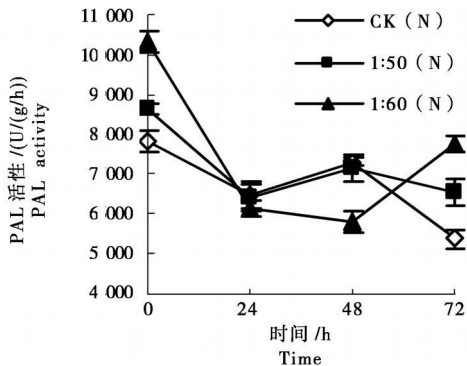
以上结果表明POD的活性变化与叶片病斑面积的变化趋势是相一致的, 即预处理后, 玉米的抗性均增加, 病斑面积减少, POD的活性也相应增加。1:60预处理的POD活性最高, 而相应的叶片的病斑面积也是最小, 这同样说明采用1:60的处理效果最好。



CK(C)为蒸馏水处理 CB37, 1:50(C), 1:60(C)分别为 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液处理 CB37  
CK (C); Treat CB37 with sterile water, 1:50(C) and 1:60(C); treat CB37 respectively with 1:50 and 1:60 concentration filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation

图 5 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理 CB37 叶片 3 d 后, 再接种 1:10 高浓度滤液培养 72 h 期间 PAL 的变化

Fig. 5 The change of PAL activity in CB37 leaves treated by high concentration(1:10) culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin for 72 h after induced by low concentration (1:50 and 1:60) for 3 d



CK(N)为蒸馏水处理 NB37, 1:50(N), 1:60(N)分别为 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液处理 NB37  
CK (N); Treat NB37 with sterile water, 1:50(N) and 1:60(N); treat NB37 respectively with 1:50 and 1:60 concentration filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation

图 6 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理 NB37 叶片 3 d 后, 再接种 1:10 高浓度滤液培养 72 h 期间 PAL 的变化

Fig. 6 The change of PAL activity in NB37 leaves treated by high concentration(1:10) culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin for 72 h after induced by low concentration (1:50 and 1:60) for 3 d

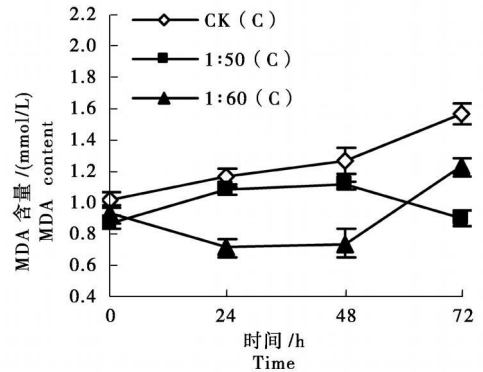
## 2.3 不同稀释倍数的培养滤液对 PAL 活性的影响

图 5 显示, 经稀释为 1:50 玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理的 CMS-CB37 玉米叶片再接 1:10 的较高浓度培养滤液后 PAL 的活性在 0~24 h 内呈下降趋势, 24~48 h 内的 PAL 活性逐渐提高, 48~72 h 又出现下降趋势, 72 h 时与对照差异显著 ( $p < 0.05$ )。经稀释为 1:60 玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理的 CMS-CB37 玉米叶片再接 1:10 的较高浓度滤液后 PAL 的活性变化的趋势为先下

降后上升, 72 h 时与对照差异极显著 ( $p < 0.01$ )。对照的 PAL 活性在 0~72 h 内总体呈现下降趋势。经 0~72 h 的动态检测, PAL 活性比对照平均提高了 23.36% (1:50) 和 23.40% (1:60), 处理组 1:60 (C) 的预处理效果比 1:50 (C) 佳, 但差异不显著。

图 6 显示, 低浓度 C 小种毒素培养滤液预处理 NB37 玉米叶片对 PAL 的诱导作用没有低浓度 C 小种毒素培养滤液预处理 C 细胞质玉米叶片对 PAL 的诱导作用明显。处理组及对照都表现出先下降后上升的趋势, 但处理组的幅度要大于对照。经 0~72 h 的动态检测, 处理组 1:60 (N) 的效果要比 1:50 (N) 的效果好。

以上结果表明, PAL 酶活性的变化与叶片病斑面积的变化趋势是相一致的, 即预处理后, 玉米的抗性均增加, 病斑面积减少, PAL 的活性也相应增加。1:60 预处理的 PAL 活性最高, 而相应的叶片的病斑面积也是最小, 这也证实了 1:60 的处理效果最好。



CK(C)为蒸馏水处理 CB37, 1:50(C), 1:60(C)分别为 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液处理 CB37  
CK (C); Treat CB37 with sterile water, 1:50(C) and 1:60(C); treat CB37 respectively with 1:50 and 1:60 concentration filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation

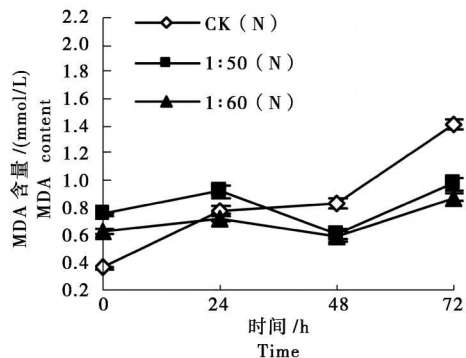
图 7 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理 CB37 叶片 3 d 后, 再接种 1:10 高浓度滤液培养 72 h 期间 MDA 的变化

Fig. 7 The change of MDA content in CB37 leaves treated by high concentration(1:10) culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin for 72 h after induced by low concentration (1:50 and 1:60) for 3 d

## 2.4 不同稀释倍数的培养滤液对 MDA 含量的影响

图 7 显示, 在 0~72 h 内, CMS-CB37 玉米叶片中有害物质 MDA 的含量均低于同类叶片未经低浓度滤液预处理的对照, 并且 2 种处理均出现上升或下降的趋势。以上证实, 低浓度培养滤液对 C 细胞质玉米叶片起到了抑制自身有害物质产生的病理过程, 从而提高了抗病能力。经 0~72 h 的动态检测, MDA 含量比对照平均下降了 21.1% (1:50) 和 28.2% (1:60); t 测验结果表明, 72 h 时, 处理组 1:50 (C), 1:60 (C) 与对照 CK (C) 相比差异极显著 ( $p <$

0.01)。以上均说明本试验以 1:60(C)低浓度培养滤液预处理的效果最好。



CK(N)为蒸馏水处理 NB37, 1:50(N), 1:60(N)分别为 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液处理 NB37  
CK(N): Treat NB37 with sterile water, 1:50(N) and 1:60(N): treat NB37 respectively with 1:50 and 1:60 concentration filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin cultivation

图 8 1:50 1:60 浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理 NB37 叶片 3 d 后, 再接种 1:10 高浓度滤液培养 72 h 期间 MDA 的变化

Fig. 8 The change of MDA content in NB37 leaves treated by high concentration(1:10) culture filtrate of *Bipolaris maydis* race C toxin for 72 h after induced by low concentration (1:50 and 1:60) for 3 d

图 8 中, 经低浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液预处理的玉米叶片中, MDA 含量要高于对照, 在接种高浓度玉米小斑病菌 C 小种毒素培养滤液后的 0~24 h 内玉米叶片中 MDA 含量也是呈上升趋势, 但上升幅度要明显小于对照, 24~72 h 内对照中的 MDA 含量仍然继续上升, 但处理组玉米叶片中的 MDA 含量却开始明显下降, 虽然其间 MDA 含量也有升高, 但上升幅度要明显小于对照。经 0~72 h 的动态检测, 处理组 1:60(N)的效果要比 1:50(N)的效果好。

以上结果表明, MDA 含量的变化与叶片病斑面积的变化趋势是相一致的, 即预处理后, 玉米的抗性增加, 病斑面积减少, 有害物质 MDA 的含量也相应降低。1:60 预处理的 MDA 含量最少, 而相应的叶片的病斑面积也是最小, 这也说明, 1:60 的处理效果最好。

### 3 讨论与结论

经多次玉米叶片对小斑病菌的抗病性鉴定, 证实用低浓度 C 小种毒素培养滤液作为激发子预处理 C 细胞质玉米叶片可以提高 C 细胞质对 C 小种的抗病性。经预处理(1:50 1:60)后, 再接高浓度(1:10)毒素培养滤液, 其叶片的病斑面积为  $(0.30 \pm 0.14) \sim (0.36 \pm 0.17) \text{ mm}^2$ , 而对照为  $(2.70 \pm 0.24) \text{ mm}^2$ , 差异极显著。经生化测定叶片内 POD, PAL 活性分别比对照平均提高了 65.9% 和 23.4%; MDA 含量比对照平均降

低了 28.2%。用激发子诱导玉米获得抗病性, 本试验提供了叶片内部所产生的生化反应与叶片表面的抗性病理反应相吻合的直接证据。

迄今为止, 国内外未见选育出抗 T 小种的 T 细胞质的报道, 抗 C 小种的 C 细胞质亦鲜有所闻; 同时, 也没有见到过如何提高 T 细胞质对 T 小种、C 细胞质对 C 小种抗病性的文章。本实验室先后用低浓度玉米小斑病菌 T、C 小种毒素培养滤液作为激发子, 成功地诱导了 T 细胞质对 T 小种<sup>[17]</sup> 和 C 细胞质对 C 小种的抗性, 证实了以低浓度玉米小斑病菌 T、C 小种毒素培养滤液来诱导寄主对病原菌的生物学抗性具有较为普遍的意义, 为专化性病害的防治开辟了新途径。

本实验室在深入研究 T 小种时, 发现用 T 小种毒素培养滤液中提取其蛋白液和 T 小种菌丝细胞壁的提取液分别预处理叶片后, 再接高浓度 T 小种毒素培养滤液, 均未发现玉米叶片内 PAL 酶活性的提高, 且在叶片上亦未观察到对 T 小种的抗性。故本试验未分离 C 小种毒素培养滤液的不同组分, 而是用其整体对玉米叶片进行低浓度预处理, 获得了玉米叶片病斑数量和病斑面积显著减少及叶片内部 PAL 等酶活性显著提高的结论。为了进一步证实玉米小斑病菌 C 小种毒素对植株抗性的激活作用, 我们认为需要进一步将毒素提纯, 找出以玉米小斑病菌 C 小种纯毒素作为激发子的最佳浓度, 达到生物防治的目的。

致谢: 本文承河北省河北师范大学生命科学学院王立安教授审阅, 并提出宝贵意见, 在此谨表衷心感谢!

### 参考文献:

- [1] Hooke A L, Smith D R, Lim S M, *et al.* Reaction of corn seedling with male-sterile cytoplasm to *Helminthosporium maydis* [J]. *Plant Dis. Rep.*, 1970(54): 708—712.
- [2] Ullstrup A J. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970—1971 [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1972, 10: 37—50.
- [3] Smith D R, Hooker A L, Lim S M. Physiologic races of *Helminthosporium maydis* [J]. *Plant Dis Rep*, 1970, 54: 819—822.
- [4] Miller R J, Koeppe D E. Southern corn leaf blight: Susceptible and resistant mitochondrial [J]. *Science*, 1971, 173: 67—69.
- [5] Bhullar B S, Daly J M, Rehfeld D W. Inhibition of dark CO<sub>2</sub> fixation and photosynthesis in leaf discs of corn susceptible to the host-specific toxin produced by *Helminthosporium maydis* race T [J]. *Plant Physiol*, 1975, 56: 1—7.
- [6] Wei J K, Liu K M, Chen J P, *et al.* Pathological and physiological identification of race C of *Bipolaris maydis* in China

- [ J] . The American Phytopathological Society, 1988, 78: 550—554.
- [ 7] Wei J K, Liu K M, Chen J P, *et al.* Pathological and physiological identification of race C of *Bipolaris maydis* in China [ J] . Phytopathology, 1988, 78(5): 550—554.
- [ 8] 郭兰凯, 刘俊芳, 马春红, 等. HMC 毒素对雄花不育及正常细胞质玉米根冠活细胞的影响[ J] . 作物学报, 1991, 17(1): 54—57.
- [ 9] 崔 洋, 刘克明, 魏建昆, 等. 玉米小班病菌 C 小种毒素的分离、纯化及其植物病理反应[ J] . 植物病理学报, 1991, 21(3): 187—191
- [ 10] 崔 洋, 马春红, 刘克明, 等. 纯化的玉米小班病菌 C 小种毒素生物活性的研究[ J] . 植物病理学报, 1992, 22(2): 175—178.
- [ 11] 刘克明, 吴全安, 刘俊芳, 等. 玉米小班病菌三个生理小种生物学特性比较的初步研究[ J] . 华北农学报, 1989, 4(2): 74—78.
- [ 12] 崔 洋, 刘克明, 魏建昆. 用可溶性蛋白电泳法鉴定玉米小班病菌生理小种[ J] . 华北农学报, 1991, 6(1): 48—52.
- [ 13] Nicholson P, Rezanoor H N, Su H. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and genetic fingerprinting to differentiate isolate of race O, C and T of *Bipolaris maydis*[ J] . J Phytopathology, 1993, 139: 261—267.
- [ 14] Allen S. J. Genetic and induced resistance strategies for controlling *Fusarium* wilt of cotton[ C] //In Proceedings of the Second Australasian Soilborn Diseases symposium, Victoria Australia, 2001: 59—60.
- [ 15] Kessmann H, Staub T, Hofmann G, *et al.* Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals[ J] . Annual Review of Phytopathology, 1994, 32: 439—459.
- [ 16] 张元恩. 植物诱导抗性研究进展[ J] . 生物防治通报, 1987, 3(2): 88—90.
- [ 17] 李 冠, 欧阳光察. 植物诱导抗病性[ J] . 植物生理学通讯, 1990(6): 1—5.
- [ 18] 海蒂弗斯. 植物病理生理学[ M] . 朱有红, 宋左衡. 北京: 中国农业出版社, 1991: 27.
- [ 19] 周仲铭. 林木病理学[ M] . 北京: 中国林业出版社, 1987, 84.
- [ 20] 马春红, 李运朝, 董文琦, 等. 低浓度玉米小班病菌 T 毒素对玉米叶片苯丙氨酸解氨酶活性的诱导研究[ J] . 华北农学报, 2007, 22(1): 40—43.
- [ 21] Ma Chun—hong, Zhai Cai—xia, Wang Li—an, *et al.* Induced resistance by the toxin filtrate of *Bipolaris maydis* race T cultivation[ J] . Agricultural Sciences in China, 2006, 5(9): 678—684.
- [ 22] 王立安, 赵俊霞, 马春红, 等. 玉米根冠脱落细胞中微丝分布的荧光显微观察[ J] . 实验生物学报, 2003, 36(2): 149—154.
- [ 23] 王立安, 马春红, 赵俊霞, 等. HMC 毒素对 C 型不育玉米根冠细胞原生质体及微丝分布的影响[ J] . 植物病理学报, 2003, 33(3): 225—228.
- [ 24] 闫芝芬, 马春红, 魏建昆. 稻瘟病菌致病毒素对水稻雄性不育细胞质的专化性致病机理[ J] . 中国农业科学, 1998, 31(6): 56—61.
- [ 25] 郭红莲, 陈 婕, 高增贵, 等. 不同诱抗剂诱导玉米对灰斑病的抗性及其与 PAL 的关系[ J] . 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 465—467.
- [ 26] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[ M] . 北京: 科学出版社, 1999: 305.