

稻瘟病菌致病毒素的活性测定及其影响条件^{*}

闫芝芬¹ 张红心² 崔四平¹ 王立安¹ 魏建昆¹

(¹河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄 050051;

²南京农业大学农学系, 南京 210095)

摘 要 稻瘟病菌 90-2菌株系是从大田水稻雄性不育细胞质(CMS)上分离的对野败型(W)CMS专化致病的生理小种。研究表明, 该菌株产生的毒素在致病过程中起着一定作用。本试验测定了此菌株在不同 pH 培养基中培养对毒素产生的影响, 毒素的热稳定性及 pH 值变化对毒素活性的影响等。离体叶片法测定毒素活性发现毒素使离体叶段褪绿和细胞坏死, 珍汕 97A 褪绿程度大于珍汕 97B。进一步测定了毒素对 W 珍汕 97A、97B 叶绿素总含量的影响和对 W 珍汕 97A、97B 呼吸作用的影响, 初步测定了粗毒素的致病作用。用根冠细胞法测定了 90-2 菌株毒素对一套 4 种同核异质 CMS 材料的致病力, 表明稻瘟病菌 90-2 菌株是 CMS 野败型的专化生理小种。

关键词 水稻 稻瘟病菌 毒素 雄性不育细胞质

水稻杂种优势的利用为水稻增产带来巨大潜力。目前, 杂交稻制种主要依赖于利用水稻雄性不育细胞质(CMS)。但我国至今仍以“野败”胞质杂交稻为主, 占杂交稻的 90%。这种单一胞质的大面积连年使用有可能导致某种病虫害的发生和流行。例如 70 年代初, 美国由于大面积种植 T_{-cms} 玉米杂交种, 导致玉米小班病菌 T 小种的流行, 使美国的杂交玉米生产遭受严重损失^[1]。这一深刻教训使得遗传育种与植物病理等多学科学者致力于作物胞质感病性的研究。稻瘟病是严重危害水稻的一种真菌性病害, 其病原菌变异快, 致病力强, 常给农业生产造成重大损失。近年我们发现从大田中分离鉴定的稻瘟病菌 90-2 菌株对“野败型(W)”雄性不育细胞具有专化致病性^[2, 3]。试验在明确稻瘟菌素在致病过程中起作用的基础上, 进一步对该菌株毒素的性质、致病力和致病机制进行初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*) 90-2 菌株 (属中 B15), 系从 W 不育系叶片上采集分离的单孢菌系, 接种在高粱粒培养基 (12g 粉碎成颗粒状的高粱粒加上蒸馏水 20ml, 高压灭菌) 26℃ 下, 黑暗培养 25d。

1 1 2 供试寄主 W 珍汕 97A, 珍汕 97B 一套同核异质材料 W 珍汕 97A, D 珍汕 97A, G 珍汕 97A, T 珍汕 97A, 珍汕 97B (湖南杂交水稻研究中心罗崇善提供)。

1 2 试验方法

1 2 1 粗毒素的制备和活性测定 单孢菌系接种在 Fries 液体培养基中 (内装 300ml), 26℃ 黑暗静止培养 25d, 过滤获得毒素滤液。后减压浓缩 8 倍, 三次等体积乙酸乙酯萃取得水相和有机相, 合并有机相, 减压浓缩至粘稠状, 加蒸馏水至原体积后分别测水相和有机相的活性。

1 2 2 pH 值对滤液毒性的影响 90-2 菌株的毒素滤液用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 分别调 pH 值至 2 4 6 8 10 均用乙酸乙酯萃取 3 次, 得水相和有机相, 然后分别减压浓缩, 加入蒸馏水至原滤液体积, 回调 pH 至 6 后进行活性测定。

1 2 3 培养基 pH 值对毒素产生的影响 Fries 液体培养基分别调 pH 值为 4 6 8 10 接种后在 26℃ 下暗培养 25d, 过滤液均调至 pH 6 后用于毒素活性测定。按上述方法粗提后测毒素活性。

1 2 4 毒素的热稳定性 滤液煮沸 8min 冷却后加蒸馏水至原体积, 测毒性变化。

1 2 5 毒素活性测定方法 采用根冠细胞死亡^[4]和离体叶段褪绿或组织死亡法测定。离体叶段法用二叶期幼苗, 截取第二叶片中部同一位置约 1cm 长的叶段, 平放在已铺有滤纸并加有 3ml 粗毒素的培养皿中 (直径 5cm), 盖上皿盖, 置 26℃ 光照培养箱中光照处理 14h, 观察叶段的病变情况, 以蒸馏水处理作对照。

1 2 6 毒素处理对离体叶段叶绿素总含量的影响 取 0.1g 二叶期叶片, 分别用毒素处理 (方法同上) 24h、36h 后取出叶片, 滤纸吸干, 于装有 10ml 丙酮: 无水乙醇 = 1: 1 的试管中常温下萃取 24h, 之后在 722 分光光度计上测定 OD₆₆₃ OD₆₄₅ 并按 $C = 8.02 \text{ OD}_{645} + 20.2 \text{ OD}_{663}$ 计算叶绿素总含量^[5], 以蒸馏水作对照。

1 2 7 毒素对呼吸作用的影响 培养滤液用乙酸乙酯萃取后得到的水相和有机相样品即为粗毒素样品, 将 W 珍汕 97A、珍汕 97B 拔节期 (5 叶期) 展开的顶叶中部位置切成 2mm 宽的片段, 放入直径 5cm 铺有滤纸的平皿中并加入 3ml 粗毒素样品, 分别在 20℃ 下 0 4 16 20 24h 用氧电极法^[5]测定其呼吸变化。

2 结果与讨论

2 1 培养基 pH 值对产毒的影响

不同 pH 条件下的培养物经滤纸过滤的培养滤液, 活性测定采用根冠细胞死亡率法 (表 1), 从表 1 中看出, 培养基的 pH 值对稻瘟菌毒素的产生有一定影响, pH 4 时产生的毒素活性最强, W 珍汕 97A 和 97B 的根冠细胞死亡率均出现最大值。此时对 97A 的损害显著高于 97B, 其他 pH 值处理也出现类似情况。

表 2 为不同 pH 培养基培养的滤液经乙酸乙酯萃取后的水相对水稻根冠细胞死亡的影响, W 珍汕 97A 根冠细胞死亡率以 pH 值 4.0 处理的最高, 表明 pH 4 有利于毒素产生。

表 1 培养基 pH 值对产毒的影响		
培养基 (pH 值)	根冠细胞死亡率(%)	
	W 珍汕 97A	珍汕 97B
4 0	66 7(100 0)	32 7(100 0)
6 0	40 0(60 0)	31. 9(97 6)
8 0	33 3(49 9)	12 5(38 2)
10 0	37 2(56 2)	12 9(39 5)

注: 对照蒸馏水处理根冠细胞死亡率为 3% ~ 5%。

2 2 加热对毒素活性的影响

为明确毒素的热稳定性, 将粗毒素加热 8m in 再用根冠细胞法测毒素的致病活性, 结果见表 3 发现稻瘟菌 90-2菌株产生的毒素对热高度稳定, 加热后毒性不变甚至有所提高, 原因有待进一步研究

2 3 pH 值对毒素活性的影响

测定 (观察时间二叶期为 24h 抽穗期旗叶为 60h)结果见表 4

从表 4看出:① 旗叶比幼叶感病慢, 病情轻 经测定, 不论毒素来自水相或有机相, 不论 pH 值从酸性到碱性, W 珍汕 97A 与珍汕 97B 之间在旗叶上的褪绿程度差异不显著。② 幼叶对不同 pH 条件下萃取的毒素反应, 水相与有机相之间有很大的差异, 例如 pH 2 水相毒素使 W 珍汕 97A 的幼叶全部变黄, 而 pH 2有

机相毒素仅使其叶片的 20% 变黄。③ 一般说, 碱性毒素的活性低于酸性毒素 pH 4的水相毒素使 W 珍汕 97A 的幼叶全部变黄, 而珍汕 97B 的幼叶仅 20% 的叶片变黄, 不育细胞质与正常细胞质之间差异极显著

用离体叶段法对 90-2菌株产生的毒素进行测定, 发现叶段褪绿 为定量分析毒素对野败型不育系及其保持系的影响, 进一步测定了粗毒素处理前后叶绿素总含量的变化(图 1) 结果发现粗毒素处理后 24hW 珍汕 97A 叶绿素总含量比水处理(对照)下降 0 53m g/g, 珍汕 97B 下降 0 38m g/g 36h后两品种分别下降 0 44m g/g和 0 34m g/g 毒素处理后 W 珍汕 97A 的叶绿素总含量下降大于珍汕 97B

表 2 不同 pH 值水相的毒素活性		
处理条件	根冠细胞死亡率(%)	
	W 珍汕 97A	珍汕 97B
pH 4	48 8	30 4
pH 6	38 5	16 0
pH 8	23 8	12 7
pH 10	36 8	18 3

表 3 加热对毒素活性的影响		
处理条件	根冠细胞死亡率(%)	
	W 珍汕 97A	珍汕 97B
滤液	50 00	18 75
滤液加热 8m in	50 00	43 90

注: 表 2 表 3蒸馏水处理根冠细胞死亡率 3% ~ 5%。

表 4 pH 值变化对粗毒素活性的影响					
粗毒素	二叶期		旗 叶		
	W 珍汕 97A	珍汕 97B	W 珍汕 97A	珍汕 97B	
pH 2水相	+++++	++++	+	+	-
pH 2有机相	+	+	++	+	
pH 4水相	+++++	+	++	-	
pH 4有机相	+ -	-	+	-	
pH 6水相	+++++	++	+	-	
pH 6有机相	+	-	++	+	
pH 8水相	++++	+	+-	-	
pH 8有机相	++++	+	++	+	
pH 10水相	+++	+	+	+	-
pH 10有机相	+	-	+-	-	
对照(水)	-	-	-	-	

注: + + + + + 全变黄; + + + + 约 80% 变黄; + + + 约 60% 变黄; + + 约 40% 变黄; + 约 20% 变黄; - 正常。

2 4 毒素对同核异质体的致病力

试验用 pH 4 Fries液体培养基培养的滤液用根冠细胞法测定对同一核背景下不同细胞质的致病性(表 5)。此试验采用了同一核背景下 4种不同 CM S 及其正常细胞质材料,结果更具可比性。90-2菌株毒素处理的水稻野败型 CM S 的根冠细胞死亡率最高,达 38 6%,而保持系珍汕 97B 为 26 1%,两者差异极显著($P=0.01$); D 珍汕 97A 和 T 珍汕 97A 的根冠细胞死亡率较低。

表 5 毒素对水稻同核异质体的致病力比较

细 胞 质	根冠细胞死亡率(%)
CM S W 珍汕 97A	38.6 ± 1.50* *
CM S D 珍汕 97A	15.9 ± 1.22
CM S G 珍汕 97A	29.1 ± 1.26
CM S T 珍汕 97A	14.8 ± 1.40
N 珍汕 97B	26.1 ± 1.38

注:对照蒸馏水处理根冠细胞死亡率为 3% ~ 5%; * 表示差异达 1% 水平。

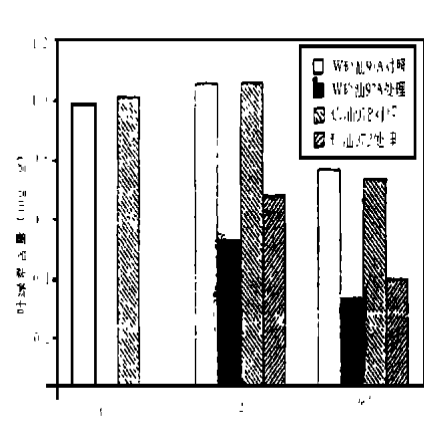


图 1 毒素处理对叶绿素总含量的影响

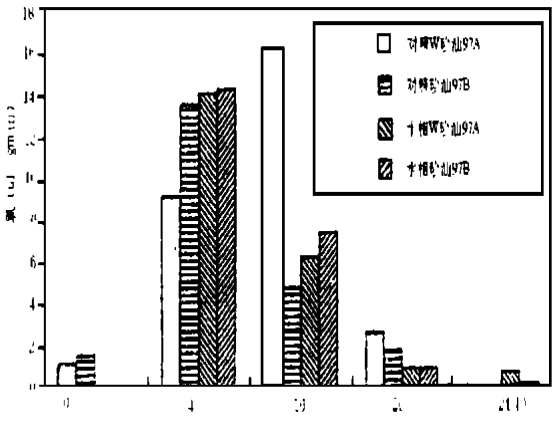


图 2 毒素处理对呼吸作用的影响

采用氧电极法测定了毒素处理 W 珍汕 97A 和珍汕 97B 前后呼吸消耗 O_2 量的变化(图 2)。从图 2 可见, W 珍汕 97A、珍汕 97B 拔节期顶叶的离体叶片用粗毒素处理后,呼吸作用有明显变化。W 珍汕 97A 受刺激后呼吸作用反应敏感, 4h O_2 利用比对照增加 $4.84 \mu l \cdot g^{-1} \cdot m^{-1}$; 珍汕 97B 较不敏感,幅度小(为 $0.692 \mu l \cdot g^{-1} \cdot m^{-1}$); 16h 时 W 珍汕 97A 比对照下降达 $9.96 \mu l \cdot g^{-1} \cdot m^{-1}$, 而珍汕 97B 比其对照高 $3.768 \mu l \cdot g^{-1} \cdot m^{-1}$; 24h 后二者 O_2 的利用几乎丧失。W 珍汕 97A 的呼吸作用对毒素敏感,变化幅度大,下降快,可能其离体叶段线粒体受到破坏或某些呼吸酶类活性丧失大于珍汕 97B 所致。

从一系列活性测定结果可以看出, 90-2 菌株产生的致病毒素是多种成分的混合物。乙酸乙酯萃取后的水相和有机相都有毒性,且不同 pH 值处理后活性不同。90-2 菌株粗毒素引起水稻离体叶段褪绿,并对细胞呼吸有明显的抑制作用。推测该毒素在致病过程中起重要作用。且引起的病理变化是多方面的。

稻瘟病菌变异性很强, 60 年代以来我国的许多地区,稻瘟病的优势小种已更替 3~ 4 次^[6],且各地区出现的生理小种与当地种植品种之间有密切的关系^[7]。植物病原菌产生毒素在植物体内可引起多种毒害反应,如生物膜膨胀破裂、细胞坏死、褪绿等。国外亦有文章论述关于稻瘟菌毒素的分离纯化或病理测定^[8-11]。此毒素是水溶性的,且对热稳定,但不具小种特异性^[11]。

另据文章介绍^[12]已证明毒素致病的病原物有数十种, 其中不少是生产上的重要问题, 如稻瘟病、棉花黄萎病、水稻白叶枯病、小麦赤霉病、玉米小斑病等。其中分寄主专化性毒素和非寄主专化性毒素两类, 对作物雄花不育细胞质专化致病的病原菌已报道的有: ①玉米小斑病菌 T 小种 (*B. maydis* race T) 与玉米黄斑病菌 (*P. maydis*) 均侵染玉米的 T-CMS, ②玉米小斑病菌 C 小种 (*B. maydis* race C) 侵染玉米的 C-CMS, ③ *S. graminicola* 侵染珍珠粟的 S-CMS, ④稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*) 90-2 菌株侵染水稻的野败 -CMS。B. *maydis* race T 产生的专化性毒素的结构及其专化性致病机制已经弄清^[13], 寄主特异性植物病原真菌毒素都是极其重要的天然有机化合物, 它们在主要作物病害的发生与发展过程中作为致病因素起关键作用, 因而对它们进行研究在理论上、实践上都有重大意义。

从水稻不育系上分离得到的稻瘟菌 90-2 菌株, 属于中 B15 一系列试验^[2, 3]及本研究都证实此菌株对目前我国生产上使用的野败型不育细胞质致病力强于其正常细胞质。我们认为, 在长期大面积种植单一野败型不育细胞质杂交种的情况下, 如环境条件合适, 有可能造成病害大流行, 对此应引起重视。

鸣谢: 实验及论文得到了周燮教授和夏凯副教授的指导和审阅。马春红同志参加部分实验工作, 谨致谢意。

参 考 文 献

- Smith DR, Hooker AL, Lin SM, et al. Physiological races of *Helminthosporium maydis*. Plant Dis Rep 1970 54: 819~ 822
- 刘克明, 王连生, 魏建昆, 等. 水稻野败型雄性不育细胞质对稻瘟病菌侵染的反应 (简报). 中国农业科学, 1992 25(2): 92
- 闫芝芬, 马春红, 崔四平, 魏建昆. 水稻雄性不育细胞质质量及其与稻瘟病抗性的关系. 华北农学报, 1996 11(增刊): 69~ 74
- 郑秋玲, 顾梦贤, 郑风英, 等. 稻瘟毒素对水稻根冠活细胞的影响. 华北农学报, 1991 6(2): 108~ 111
- 张志良. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 第二版, 1990
- 张学博. 福建省稻瘟病生理小种研究进展. 福建省农学院学报, 1988 17(4): 361~ 367
- 罗仰奋, 等. 早稻稻瘟病菌生理小种田间小种消长初步观察. 福建稻麦科技, 1989 2 41~ 45
- Velazhahan R, Jeeva ML, Narayanasamy P. Electrolyte leakage from rice calluses and leaves infiltrated with toxin produced by *Pyricularia oryzae*. Indian Phytopathology, 1993 46(2): 178~ 180
- Arase S, Kinoshita S, Kano M, et al. Studies on host-selective infection mechanism of *Pyricularia oryzae* Cavara (2). Production of susceptibility-inducing factor(s) from germination spores and their phytotoxicity. Annals of Phytopathological Society of Japan, 1990 56(3): 322~ 330
- Lebrun MH, Nicolas L, Boutar M, et al. Relationships between the structure and the phytotoxicity of the fungal toxin tenuazonic acid. Phytochemistry, 1988 27(1): 77~ 84
- Kozaka T, Tsuchizawa M, et al. Phytotoxic glycopeptide inducing white head of rice plant produced by *Pyricularia oryzae* Cav. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1985 51(12): 199~ 205
- 王金生. 植物抗病性分子机制. 植物病理学报, 1995 25(4): 289~ 295
- Leving CS. The Texas cytoplasm of maize: cytoplasmic male sterility and disease susceptibility. Science 1990 250: 942~ 947

Detection of Activities of Toxins from *Pyricularia oryzae* and Conditions Affecting the Activities

Yan Zhifen¹ Zhang Hongxin² Cui Siping¹ Wang Lian¹ Wei Jiankun¹

(¹ Agro-physics, Plant Physiology and Biochemistry Institute,

Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051)

(² Agronomic Department, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract *Pyricularia oryzae* 90-2 strain which is isolated from rice CM S in field is selectively pathogenic to rice W -CM S. The strain produces toxin that plays an important role in pathogenic process. This paper reports heat-stability of the toxin and effects of pH on toxin production. The experiments show that toxin from 90-2 strain is heat-stable and variations of pH value to certain extent affects the activities of toxin. The change of pH value of medium also alters the activities of the toxin. We observed that the toxin lead to the yellowing of leaves and cell necrosis. The degree of yellowing of W Zhenshan 97A leaves is larger than that of Zhenshan 97B. The experiments detected the influence of the toxin on total content of chlorophyll and respiration of W Zhenshan 97A and 97B respectively. In addition, we detected the pathogenicity of the toxin to one set of rice materials with homocaryon using the method of root cap cells bioassay. The experiment confirms that 90-2 strain is special susceptibility to rice with W -CM S.

Key words Rice, *Pyricularia oryzae*, Toxin, Male-sterile cytoplasm.