

稻瘟病菌粗毒素的制备及其致病力的测定^{*}

刘文萍 刘丽艳 吕晓波 南相日

(黑龙江省农科院生物技术研究中心)

摘要 同一条件下制备的稻瘟病菌粗毒素对水稻种子萌芽、种子胚芽、胚根的伸长都有明显的抑制作用,并随粗毒素浓度的升高,抑制率增大,对水稻愈伤组织也有明显的毒害作用。不同条件下制备的粗毒素致病力不同,其中培养时间、温度、振荡频率都是影响因子。

关键词 水稻 稻瘟病菌 粗毒素 致病力

中图分类号 S435.113.1

稻瘟病是水稻的主要病害,在水稻各个生育期都可发生,严重影响水稻的产量。稻瘟病的生理小种复杂,进化速度快,迫切需要探索新的途径,培养抗病品种。随着生物技术的发展,利用致病菌毒素为选择压力,离体筛选抗病突变体成为抗稻瘟病育种的有效途径,并有成功报道。制备毒素时,毒素的产量和致病力会因制备方法和条件的不同而有差异,在目前提纯稻瘟病菌毒素还比较困难的情况下,用生物的生长量对毒素进行定量测定,能较准确的反映毒素的制备情况,以指导毒素在抗性筛选中的应用。本文初步探讨稻瘟病菌粗毒素的制备方法和致病力的测定以及有关的影响因素

1 材料与方法

1.1 稻瘟病菌粗毒素的制备

从我省水稻产区采集感染稻瘟病的叶和穗,收取病原菌,经分离培养,得到纯化的混合菌,接种在培养基上扩大繁殖。培养基主要成分为每升中 NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 各 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 0.5\text{g}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 0.1\text{g}$, FeSO_4 , MnSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 各微量,酵母膏 1.0g,蔗糖 20g, pH6.8

取一小块稻瘟病菌菌丝置于上述液体培养基中,振荡培养,150转/分,培养温度 24~25℃,经过一周左右时间的培养,三角瓶中长满球状菌丝,将菌丝过滤,然后经高温高压灭菌放冰箱中备用。

1.2 稻瘟病菌粗毒素的致病力测定

稻瘟病菌粗毒素的致病力测定用其抑制生物的生长量来进行,用公式计算抑制率。

$$\text{抑制率}\% = \frac{\text{CK生长量} - \text{处理生长量}}{\text{CK生长量}} \times 100\%$$

1.2.1 粗毒素对水稻种子萌发的抑制 供试材料为水稻品种滕系 140,取种子 100粒,置于干燥的培养皿中,加入不同浓度的粗毒素液浸泡种子,每天换液一次,22℃下浸泡 3天,然后倒掉粗毒素液,催芽一天,统计萌芽和未萌芽的种子数。

1.2.2 粗毒素液对水稻胚芽、胚根伸长的抑制 取用清水浸泡催芽露白的种子 50粒,摆放在加滤纸的培养皿内,每天用相应浓度的粗毒素液冲洗,培养 3天后取出,量取胚芽和胚根的长

度,计算抑制率

1.2.3 粗毒素对水稻愈伤组织的毒害 在水稻幼穗期接种幼穗,诱导产生愈伤组织,经继代培养,获得大量生长旺盛的愈伤组织。

将不同浓度的粗毒素液加入继代培养基中,培养基为 MS+ 2^o 4- D2. 0mg /L+ 6- BA 0. 5mg /L+ LH300mg /L,蔗糖 3%,琼脂 0. 75%,pH5. 8,然后转入水稻愈伤组织,培养一个月后,称量愈伤组织的生长量,观察愈伤组织受毒害的程度。

2 结果与分析

2.1 粗毒素液对种子萌芽的抑制

试验采用不同浓度的粗毒素液处理,每处理两次重复,取平均值计算抑制率(见表 1)。

表 1 粗毒素液对种子萌芽的抑制

粗毒素液浓度 (%)	种子萌芽数 (个)	萌芽抑制率 (%)	粗毒素液浓度 (%)	种子萌芽数 (个)	萌芽抑制率 (%)
0	94	0	80	74	21. 28
50	77. 5	17. 55	100	70	25. 53

粗毒素液浓度不同,对种子萌芽抑制也不同,随着粗毒素液浓度的升高,水稻种子萌芽数减少,种子萌芽抑制率与粗毒素液浓度呈正相关,表明本试验所制备的粗毒素对种子萌芽有抑制作用,并随浓度的增加,抑制率增大。

2.2 粗毒素液对水稻胚芽、胚根伸长的抑制

用粗毒素液处理已经萌芽的种子,会抑制胚根和萌芽的伸长,浓度越大,抑制程度越大(见表 2)。

试验表明,粗毒素液对胚芽、胚根伸长抑制明显,在同一浓度下,粗毒素对胚根抑制比对胚芽的抑制显著,说明胚根比胚芽对毒素反应敏感。用胚根伸长受抑制的程度来确定毒素的致病力是比较可靠的。

表 2 粗毒素液对水稻胚芽、胚根的抑制

粗毒素液浓度 (%)	胚芽伸长 (mm)	胚芽伸长抑制率 (%)	胚根伸长 (mm)	胚根伸长抑制率 (%)
0	10. 00	0	23. 50	0
50	9. 80	9. 26	22. 65	3. 94
80	9. 63	10. 83	20. 15	14. 55
100	8. 33	22. 87	13. 25	43. 81

2.3 粗毒素对愈伤组织的毒害作用

水稻幼穗愈伤组织在含有不同浓度粗毒素液的培养基上继代培养,均受到不同程度的毒害,表现为生长缓慢,部分变褐死亡,当粗毒素液浓度为 94%时,愈伤组织几乎不生长,变褐死亡(见表 3)。

表 3 粗毒素液对愈伤组织生长的抑制

粗毒素液含量 (%)	愈伤组织增长量 (g)	愈伤组织生长抑制率 (%)	粗毒素液含量 (%)	愈伤组织增长量 (g)	愈伤组织生长抑制率 (%)
0	1. 72	0	80	0. 54	68. 60
50	0. 93	45. 93	94	0. 01	99. 42

结果表明,稻瘟病菌粗毒素对水稻幼穗愈伤组织的生长抑制显著,并随毒素浓度的增加,毒害增大

2.4 不同条件下制备的粗毒素液的致病力

在粗毒素的制备过程中,稻瘟病菌的培养时间、培养温度和振荡频率都影响稻瘟病菌的生长,同时可能影响致病毒素的分泌,通过对不同条件下制备的粗毒素液的致病力测定发现,它们在一定范围内呈现规律性的变化,因此,在制备粗毒素的过程中,控制稻瘟病菌的生长条件,是十分重要的。

3 讨论

从稻瘟病菌的粗毒素中,已提纯出稻瘟病菌素、吡啶羧酸、细交链孢菌酮酸、稻瘟醇、香豆素等5种毒素,如果把它们分离纯化出来,需要复杂的程序和技术,而且纯提取物与粗毒素比较,后者更接近稻瘟病菌作用于水稻的实际情况。粗毒素作为选择压力筛选抗病突变体,关键在于粗毒素的制备是否合乎要求。在本试验中所制备的粗毒素对水稻种子萌芽、胚芽、胚根的伸长都显示了较大的抑制作用,对水稻幼穗愈伤组织也有很强的毒害作用,说明粗毒素有一定的致病力,用它做为选择压力,在愈伤组织水平上筛选抗病突变体,是可能的。

参 考 文 献

- 1 王金陵等. 稻瘟病菌粗毒素的制备及其对水稻毒性的测定. 福建农学院学报, 1988, 17(4): 318~ 322
- 2 殷丽青等. 稻瘟病菌及其毒素对水稻愈伤组织毒害的初探. 上海农学院学报, 1994, 12(1): 52~ 55
- 3 李成云等. 稻瘟病菌粗毒素对水稻的毒性研究. 云南农业科技, 1990(5): 6~ 8

Preparation of Crude Toxin of *Pyricularia Oryzae* and Determination of Its Disease Producing Ability

Liu Wenping Liu Liyan Lu Xiaobo Nan Xiangri

(Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin)

Abstract Crude toxins of *Pyricularia oryzae* produced in the same Conditions had obvious retarding effect to germination of rice seeds and growth of embryo-bud and embryo-root. The experiment indicated that the higher concentration of the crude toxin, the greater inhibited effect. Crude toxin also affected the calli of rice. Crude toxins made in different conditions had different disease-producing ability. Influence factors were culture hours, temperature, shacking frequency etc.

Key words Rice, *Pyricularia oryzae*, Crude toxin, Disease-producing ability