

# 齐齐哈尔玉米穗腐病病原菌的鉴定和致病性测定

刘振库<sup>1</sup>, 贾 娇<sup>2</sup>, 苏前富<sup>2</sup>, 孟玲敏<sup>2</sup>, 晋齐鸣<sup>2\*</sup>

(1. 吉林省种子管理站, 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 吉林 公主岭 136100)

**摘 要:**为明确齐齐哈尔市玉米穗腐病病原菌, 于2013年自黑龙江省齐齐哈尔市玉米种植区采集玉米穗腐病样品, 进行病原物分离、鉴定及致病性测定研究。结果表明: 分离的菌株菌落形态、分生孢子形态与禾谷镰孢菌相同, 但不分泌色素; ITS基因序列与Genebank登记中的禾谷镰孢菌HQ671191.1同源性为100%; 系统发育树状图结果显示该菌株与禾谷镰孢菌位于系统发育树的同一分支; 按照科赫氏法则进行致病性测定, 证实分离的病原菌可造成严重的玉米果穗腐烂。因此将该菌株命名为禾谷镰孢菌齐齐哈尔变种。

**关键词:**玉米穗腐病; 禾谷镰孢菌; 致病性

中图分类号: S435.131.4<sup>9</sup>

文献标识码: A

## Identification of Pathogen and Pathogenicity of Maize Ear Rot in Qiqihaer City

LIU Zhen-ku<sup>1</sup>, JIA Jiao<sup>2</sup>, SU Qian-fu<sup>2</sup>, MENG Ling-min<sup>2</sup>, JIN Qi-ming<sup>2\*</sup>

(1. Jilin Seed Management Station, Changchun 130033;

2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

**Abstract:** To identify pathogens of maize ear rot in Qiqihaer city, samples were collected from maize fields in Qiqihaer City in December, 2013. These pathogens were isolated and identified, and their pathogenicity tested. The results showed that colony morphology and conidial morphology of the isolated pathogen Q-1 was similar with *Fusarium graminearum*, but it did not secrete pigment. The ITS sequence max similarity was 100% with *Fusarium graminearum* (Genebank No: HQ671191.1). The phylogenetic tree showed that the Q-1 was in the same cluster as *F. graminearum*. The pathogenicity test of Q-1 indicated that Q-1 was verified to maize ear according to Koch's Postulot. So the Q-1 was named as *Fusarium graminearum* Qiqihaer.

**Key words:** Maize ear rot; *Fusarium graminearum*; Pathogenicity

玉米在保障国家粮食生产安全方面具有举足轻重的作用, 东北地区是我国玉米的主要生产区, 占全国玉米总产量的70%以上。玉米穗腐病 (maize ear rot) 主要为害玉米的果穗, 造成果穗霉烂, 是玉米灌浆后期及仓储期常见的真菌病害, 严重影响玉米的产量和品质<sup>[1-3]</sup>。该病害在我国发生十分普遍, 特别是乳熟期遭遇多雨潮湿的天气, 导致该病害严重发生。大量研究资料表明, 多达二十余种病原菌均可引起该病害发生, 包括镰孢菌属 (*Fusarium* spp.)、蠕孢菌属 (*Helminthosporium* spp.)、青霉菌属 (*Penicillium* sp.)、曲

霉菌属 (*Aspergillus* sp.) 和链格孢菌属 (*Alternaria* sp.) 等<sup>[4-6]</sup>。其中黄曲霉和镰孢菌还可以产生黄曲霉素和伏马毒素的次生代谢产物引起人和畜禽中毒, 严重时甚至造成死亡<sup>[7-8]</sup>。国内外研究表明禾谷镰孢菌 (*Fusarium graminearum*) 和轮枝镰孢菌 (*F. verticilloides*) 是造成玉米穗腐病的优势病原菌<sup>[9-10]</sup>。我国不同玉米种植区造成穗腐病的优势病原菌也不相同。研究报道, 西南地区的穗腐病病原菌的优势菌株为拟轮枝镰孢菌 (*F. moniliforme*)<sup>[11]</sup>; 甘肃省为轮枝镰孢菌 (*F. verticilloides*) 和黄色镰孢菌 (*F. culmorum*)<sup>[12]</sup>; 河南省层出镰孢菌 (*F. proliferatum*)<sup>[13]</sup>; 东北地区为半裸镰孢菌 (*F. semitectum*)<sup>[14]</sup>; 河北、陕西和吉林省为串珠镰孢菌 (*F. moniliforme*)<sup>[15]</sup>。因此, 针对种植区域明确玉米穗腐病的优势病原菌对玉米穗腐病的防治具有重要的指导意义。

收稿日期: 2014-06-02

基金项目: 吉林省科技厅项目 (c42030803)

作者简介: 刘振库 (1962-), 男, 研究员, 主要从事种子管理工作。

通讯作者: 晋齐鸣, 男, 研究员, E-mail: qiming1956@163.com

2013年,玉米穗腐病在东北地区普遍发生,给玉米仓储带来了很大的困难,使玉米穗腐病成为一个亟待解决的问题。为了掌握齐齐哈尔市的玉米穗腐病优势病原菌,本试验在不同种植区采集玉米穗腐病病样进行分离鉴定,为本地区玉米穗腐病的发生规律和综合防治研究提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本采集和病原菌分离

2013年12月,在黑龙江省齐齐哈尔市玉米种植区采集玉米穗腐病样品。在PDA培养基(土豆200 g,葡萄糖20 g,琼脂15 g)上进行病原菌的分离,转移至Belay培养基( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g, $\text{KNO}_3$  1 g, $\text{KCl}$  0.5 g,淀粉0.5 g,葡萄糖0.2 g,蔗糖0.2 g,蒸馏水定容至1 L)上进行单胞分离,获得纯化的菌株。

### 1.2 致病性测定

将分离的菌株在CMC培养基(羟甲基化纤维素15 g, $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,酵母提取物1 g,蒸馏水定容至1 L)中150 rpm 25℃黑暗培养7 d,纱布过滤,制备 $10^5 \sim 10^6$ 的分生孢子悬浮液,在健康的处于灌浆期的掖478玉米果穗上注射器接种5 mL分生孢子悬浮液,成熟期观察发病症状。

### 1.3 形态学鉴定

将分离的菌株通过形态特征及培养性状进行

病原菌的鉴定,用PDA培养基和PSA培养基(土豆200 g,蔗糖20 g,琼脂15 g)培养观察菌落形态、颜色、分生孢子形态、是否产生厚垣孢子等性状。

### 1.4 分子生物学鉴定

在分离菌株的菌丝体中提取DNA,使用引物ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'和ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATGTGC-3'进行PCR扩增,将获得的单一条带PCR纯化产物送上海生工测序。获得的序列利用NCBI的blast软件进行序列比较分析。利用DNAMAN软件进行聚类分析,绘制同源性树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 标样中分离病原菌的形态特征

在采集的玉米穗腐病标样中,分离获得多种镰孢菌,其中以禾谷镰孢菌齐齐哈尔变种分离频率最高,编号为Q-1。该菌在PDA培养基上,25℃黑暗条件下,菌落生长速度较快,培养120 h菌落直径达75 mm。气生菌丝生长繁茂、簇生,菌落颜色为中间黄色,外围白色,培养基背面红色,不向培养基中分泌色素。在PSA培养基上菌落中间棕褐色,外围白色。在PDA和PSA培养基上均能产生大型分生孢子,0~0.5  $\mu\text{m}$ ,1~6个分隔,未见小型分生孢子,易产生厚垣孢子,厚垣孢子无或串生(图1)。

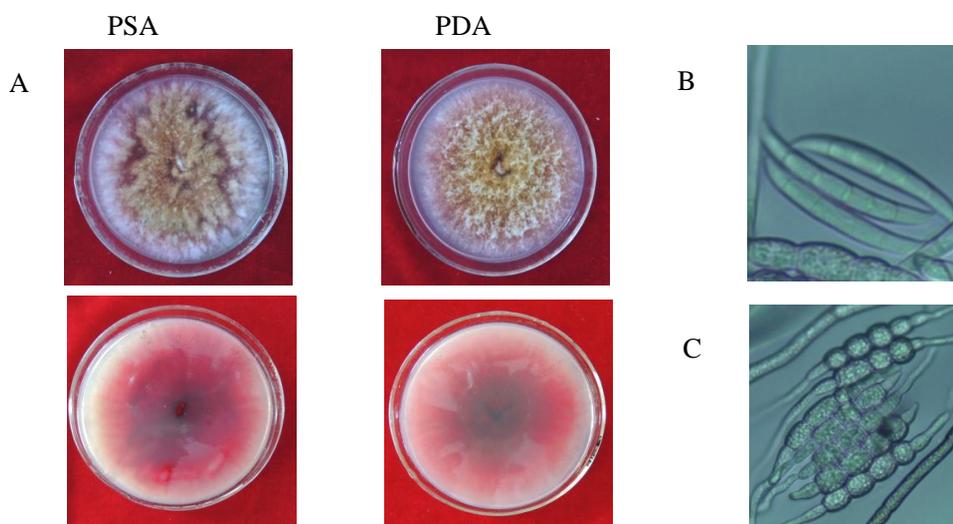


图1 分离菌株的菌落形态、分生孢子和厚垣孢子形态

A:菌落形态;B:分生孢子;C:厚垣孢子

### 2.2 ITS基因序列分析

以ITS1和ITS4引物对该菌株基因组DNA进行PCR扩增,纯化的PCR产物测序获得517 bp的片段。将ITS基因序列利用NCBI网站的BLAST软件

进行比对,菌株的ITS序列为镰孢菌属。菌株与Genebank中禾谷镰孢菌序列同源性高达100%(图2)。利用DNAMAN软件绘制其系统发育树状图,结果表明,该菌株与禾谷镰孢菌属于同一分支。

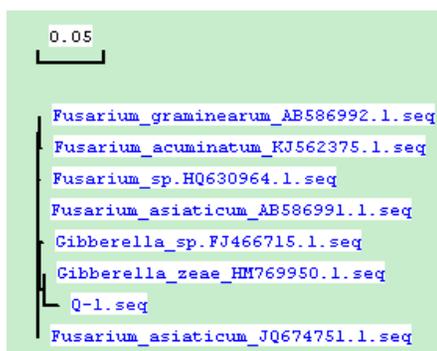


图2 菌株Q-1的遗传聚类分析图谱

### 2.3 致病性测定结果

田间接种 15 d 后,接种部位果穗腐烂,子粒间布满粉色菌丝体。人工接种部位全部发病,病穗率为 100%,接种病穗的症状与自然发病相同(图 3),对照未发病。在接种病穗上分离的病原菌与接种菌株的培养性状相同。



图3 玉米果穗接种菌株Q-1的穗腐症状

## 3 讨论

玉米穗腐病是田间和玉米仓储的重要病害之一,主要以多种镰孢菌复合侵染导致发病。尽管已报道东北地区的玉米穗腐病优势菌株为半裸镰孢菌,但报道吉林省的玉米穗腐病优势菌株为拟轮枝镰孢菌,这可能由于东北地区复杂的土壤类型及田间种植、管理方式不同造成的东北地区不同的玉米种植区域引起玉米穗腐病的优势病原菌也不相同。本试验针对黑龙江省齐齐哈尔市玉米穗腐病的病原菌进行分离和鉴定,结果显示禾谷镰孢菌齐齐哈尔变种为该地区玉米穗腐病的主要病原菌。这表明东北区域造成玉米穗腐病的优势菌株由于区域不同而出现多样化。

根据李晓等文献报道玉米穗腐病致病性测定中采用子粒注射接种法较花丝注射、喷雾法接种

效果好,且操作简单、发病充分、误差较小,因此,本试验选用子粒注射接种法进行致病性测定。结果发现接种的 40 棵植株发病率为 100%,表明禾谷镰孢菌齐齐哈尔变种为玉米穗腐病的病原菌,也表明采用子粒注射接种法鉴定玉米穗腐病操作简便、试验准确。

近几年玉米穗腐病已成为我国玉米生产上的突出问题。本研究针对齐齐哈尔市进行了玉米穗腐病优势病原菌的分离、鉴定,但该病菌的生物学特性及侵染循环等仍有待于进一步研究,为玉米穗腐病的综合防治提供科学依据。

参考文献:

- [1] 陈捷. 我国玉米穗、茎腐病病害研究现状与展望[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 24(1): 21-25.
- [2] Buyuk O, Ozer N. Reearches on zearalenone producing of *Fusarium verticillioides*, the causal agent of maize ear rot, from maize field in West Blacksea[J]. Bitki Koruma Bulteni, 2012, 52(4): 337-347.
- [3] 宋立秋,魏利民,王振营,等. 亚洲玉米螟与串珠镰孢菌复合侵染对玉米产量损失的影响[J]. 植物保护学报, 2009, 36(6): 487-490.
- [4] 任旭. 我国玉米穗腐病主要致病镰孢菌多样性研究[D]. 中国农业科学院, 2011.
- [5] 王晓鸣,石洁,晋齐鸣,等. 玉米病虫害田间手册-病虫害鉴别与抗性鉴定[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.
- [6] Gohari A M, Javan-Nikkhah M, Hedjaroude G A, et al. Genetic diversity of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Iran based on vegetative compatibility grouping[J]. Journal of Plant Pathology, 2008, 90(3): 113.
- [7] 王海涛,魏慧娟. 食管癌高发区玉米中伏马菌素 B1 的检测[J]. 肿瘤防治研究, 1999, 26(3): 168-170.
- [8] 罗晓杨,郭庆元,武小菲,等. 玉米生产品种种子带菌和镰孢菌毒素的检测[J]. 作物杂志, 2009(3): 75-79.
- [9] Murillo W A, Munkvold G P. Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes[J]. Plant Disease, 2008, 92(12): 1695-1700.
- [10] Schaafsma A W, Limay-rios V, Tamburic-illincic L. Mycotoxins and *Fusarium* species associated with maize ear rot in ontario, Canada[J]. Cereal Research Communications, 2008, 36(s.b): 525-527.
- [11] 张小飞,邹成佳,崔丽娜,等. 西南地区玉米穗腐病病原分离鉴定及接种方法研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(6): 2078-2082.
- [13] 郭成,魏宏玉,郭满库,等. 甘肃玉米穗腐病样品中轮枝镰孢菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 植物病理学报, 2014, 44(1): 17-25.
- [14] 张婷,孙晓东,吕国忠. 我国东北地区玉米穗腐镰孢菌的种类及其分离频率[J]. 菌物研究, 2011, 9(1): 9-14.
- [15] 任金平,吴新兰,孙秀华. 吉林省玉米镰刀菌穗腐病和茎腐病病原菌传染循环研究[J]. 玉米科学, 1995(S1): 25-28.