

玉米瘤黑粉病与丝黑穗病高效接种方法的筛选

邹晓威, 夏 蕾, 王 娜, 姜兆远, 李 莉, 郑 岩*

(吉林省农业科学院/农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室, 吉林 公主岭 136100)

摘 要:本研究以高感品种吉单 209 为材料, 接种玉米黑粉菌与玉米丝黑穗菌, 采用玉米茎基部注射、拌菌土、玉米苗期灌根、菌液浸种等 4 种方法, 在模拟田间环境条件下观察玉米植株的发病情况, 并对玉米植株发病情况进行对比分析, 筛选适合玉米黑粉病与玉米丝黑穗病的接种方法。结果显示, 玉米茎基部注射是玉米瘤黑粉病最佳接种方法。玉米茎基部注射和菌液浸种是玉米丝黑穗病较好的两种接种方法。本研究为今后快速评价玉米资源对玉米瘤黑粉病及玉米丝黑穗病抗性提供可靠的接种方法。

关键词:玉米瘤黑粉病; 玉米丝黑穗病; 接种

中图分类号: S435.13

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)01-0028-03

Screening of Efficient Inoculation Methods of Head Smut and Common Smut of Corn

ZOU Xiaowei, XIA Lei, WANG Na, JIANG Zhaoyuan, LI Li, ZHENG Yan*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast, Ministry of Agriculture, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Jidan209, a corn variety highly susceptible to head smut and common smut of corn, was selected as material and inoculated with *Ustilago maydis* and *Sporisorium reilianum*. Four methods were adopted, including injection of corn coleoptile, mixing soil with the disease fungus, watering the roots of maize seedlings with liquid cultures of *Ustilago maydis* and *Sporisorium reilianum*, soaking maize seeds with liquid cultures of *Ustilago maydis* and *Sporisorium reilianum*. Screening The efficient inoculation methods of head smut and common smut of corn were screened by comparing and observing the incidence of corn plants under the simulation of the field condition. The results showed that injection of corn coleoptile was the best inoculation method for common smut of corn. Injection of corn coleoptile and soaking maize seeds with culture liquids of *Sporisorium reilianum* were better than other inoculation methods of head smut of corn. This study will be beneficial for us to screen cron varieties resistant to head smut and common smut of corn.

Key words: Common smut of corn; Head smut of corn; Inoculation

玉米瘤黑粉病为局部侵染性病害, 在玉米生育期内, 任何幼嫩组织均可被侵染。玉米瘤黑粉病病原菌为玉蜀黍黑粉菌(*Ustilago maydis*), 属担子菌门黑粉菌属, 其担孢子产生的单核菌丝无致病力, 只有与另一个亲和交配型的单核菌丝发生交配、细胞融合后才可完成侵染循环。玉米丝黑

穗病为系统性病害, 在玉米苗期完成侵染。玉米丝黑穗病病原菌为玉米丝轴团散黑粉菌(*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), 属担子菌门孢堆黑粉菌属, 其在介质中越冬的冬孢子成为下一年的初侵染源。两种病害均为世界性的重要玉米病害。传统的防治方法主要以种子包衣为主, 但该方法会造成农民生产成本的提高, 并对环境产生不良影响, 选育和推广抗病品种是控制玉米黑粉病与玉米丝黑穗病发生的有效措施^[1]。而抗黑粉病与丝黑穗病资源鉴定是培育抗病玉米新品种的基础, 传统资源评价方式为田间菌土接种法, 该法存在鉴定周期长、用地量多、鉴定群体大、受环境影响

收稿日期: 2016-11-04

基金项目: 吉林省农业科技创新工程自由创新性研究项目(吉财教[2012]1072号)

作者简介: 邹晓威(1983-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事玉米-真菌互作相关研究。

通讯作者: 郑 岩, 男, 博士, 研究员, E-mail: yanzhenga@yahoo.com

较大等缺点,因此建立合适的室内接种技术与方法尤为重要^[2-3]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用的玉米黑粉菌 SG200 菌株及玉米丝黑穗菌 SR1、SR2 菌株均为吉林省农业科学院植物保护研究所玉米与真菌互作实验室保存菌种。供试玉米品种为吉单 209。

1.2 试验方法

1.2.1 接种菌液的制备

从-80℃冰箱保存的冻存管内取 SR1、SR2 菌株菌液至 3 mL 的酵母浸出粉胨葡萄糖培养基 (YPD),取冻存的 SG200 菌株菌液至 3 mL 的酵母蛋白胨蔗糖培养基 (YEPS) 内,28℃震荡培养进行菌株活化,再分别从活化的菌液内取 500 μL 菌液至 100 mL YPD、YEPS 内,28℃震荡培养 12~16 h,至菌液的 OD_{600nm} 值达到 2.0。菌液离心后收集菌体,加适量灭菌纯水溶解,将 SR1、SR2 菌液混合后与 SG200 菌株菌液置于室温下,用于下一步的接种试验。

1.2.2 玉米植株的准备

挑选吉单 209 品种饱满的种子,用 5% 次氯酸钠溶液表面消毒 3~5 min 后,用无菌水冲洗 3 次,28℃下放置在无菌水中浸泡 5 h;将浸泡后的玉米种子转移到铺有滤纸的培养皿中,28℃条件下暗箱培养至种子出芽。

土壤用 70% 的酒精消毒,装于塑料花盆中待用。将出芽的种子播种,每盆 5 粒,将播种后的花盆放入光照培养箱,28℃培养。4 种接种方法分别做 3 次重复试验。

1.2.3 玉米植株的病菌侵染

注射接种法,在玉米 2 叶时,取 1 mL 上述制备的玉米丝黑穗菌菌液注射接种于玉米植株的茎基部,待 3 片叶完全展开时,取 1 mL 上述制备的玉米黑粉菌菌液进行注射接种玉米植株的茎基部,对照为未接种玉米植株。

拌菌土接种法,将灭菌后的土壤与加蒸馏水配成的孢子悬浮液充分混合。分离并检测孢子悬浮液及菌土中的孢子浓度,最终使菌土中孢子含量浓度 1×10^8 个 $\cdot g^{-1}$ 以上^[4-7]。菌土装于塑料花盆中进行播种。

玉米苗期灌根接种法,使用上述制备的玉米黑粉菌菌液及玉米丝黑穗菌菌液,在玉米出苗后进行菌液灌根处理,同时在玉米茎基部用注射器

轻轻划痕造成伤口便于病原菌侵入。

菌液浸种接种法,将步骤 1.2.1 方法获得的两种病原菌菌液,分别取 100 mL 装入 250 mL 的三角瓶中待用;将经消毒处理且在无菌水中浸泡 5 h 的玉米种子放入装有菌液的三角瓶中,28℃培养箱过夜培养,次日播种。

1.2.4 显微镜观察

取叶片的褪绿病斑部位,刮去叶肉组织,使用倒置荧光显微镜 (Olympus BX41, 日本东京) 进行观察。

2 结果与分析

2.1 4 种接种方法的发病情况

玉米黑粉菌与玉米丝黑穗菌采用注射接种方法接种玉米植株 (见图 1),玉米黑粉菌在侵染后第三天出现褪绿病斑,第六天出现肿瘤;玉米丝黑穗菌在侵染后第四天出现褪绿病斑,但直至进入开花期后均未显症。

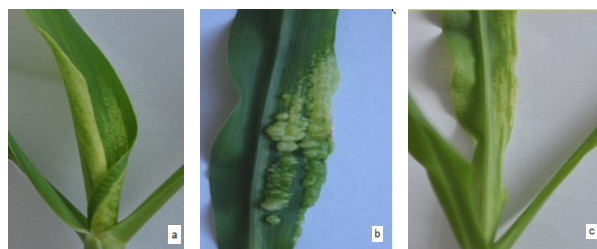


图 1 采用注射接种方法的玉米植株发病情况

- a: 玉米黑粉菌侵染玉米植株第三天的发病情况;
b: 玉米黑粉菌侵染玉米植株第六天的发病情况;
c: 玉米丝黑穗菌侵染玉米植株第四天的发病情况

玉米黑粉菌与玉米丝黑穗菌采用拌菌土的接种方法侵染玉米植株,经 3 次重复试验玉米植株均未出现明显发病症状。

玉米黑粉菌与玉米丝黑穗菌采用玉米苗期灌根接种方法侵染玉米植株后,经 3 次重复试验玉米植株均未出现明显发病症状。

玉米黑粉菌与玉米丝黑穗菌采用菌液浸种接种方法侵染玉米植株后 (见图 2),其中玉米黑粉



图 2 菌液浸种侵染玉米植株的发病症状

菌经3次重复侵染玉米植株均未出现明显发病症状;玉米丝黑穗菌侵染玉米植株后,第一片叶与第二片叶出现褪绿病斑,但不明显,新叶几乎没有出现褪绿病斑,但在玉米进入开花期后,在雄穗上形成黑粉包,雄花基部膨大,内有黑粉。

2.2 显微镜观察

用注射接种与菌液浸种2种方法侵染的玉米叶片发病部位进行镜检观察(见图3),可以清晰地看到玉米黑粉菌与玉米丝黑穗菌菌丝,其他两种接种方法镜检后均未发现有菌丝。

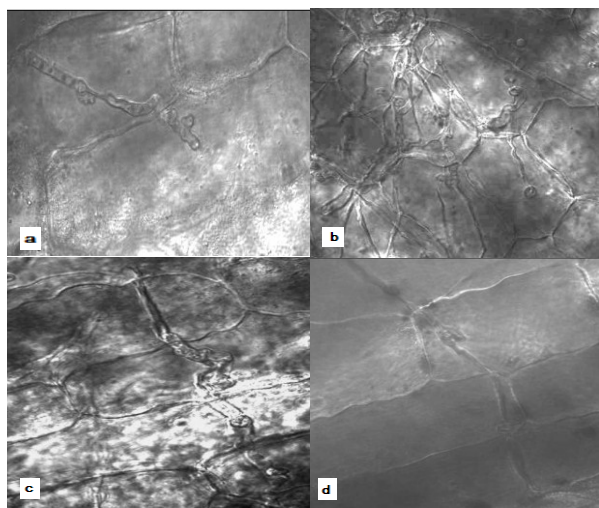


图3 玉米黑粉菌与玉米丝黑穗菌在玉米植株内生长的菌丝

a、b为玉米黑粉菌在玉米植株内生长的菌丝;

c、d为玉米丝黑穗菌在玉米植株内生长的菌丝

3 讨论与结论

根据试验结果显示,注射接种方法能够成功地接种玉米黑粉菌菌株,并在玉米植株的叶片上形成肿瘤。该方法周期短,显症明显,可以应用于玉米黑粉菌的侵染机制、基因功能验证及抗性材料的筛选等方面的研究。

玉米丝黑穗病的室内侵染方法可以选择注射接种方法与菌液浸种方法。玉米丝黑穗菌采用注射接种方法接种玉米植株时,能够在玉米叶片上形成褪绿病斑,镜检时可以观察到菌丝,但进入

开花期后均未显症,该结果与檀国庆等提出的“带菌植株”现象一致,即被侵染的幼苗中菌丝在穗分化前进入花器原始体才能显症,而当菌丝没有进入穗分化前进入花器原始体时就不显症^[8]。菌液浸种的接种方法,病菌主要在种子萌发时进行侵染,侵染部位主要为胚芽,玉米丝黑穗菌侵入后蔓延到生长锥的基部分生组织中,花芽开始分化时菌丝向上进入花器原始体,在雄穗上表现症状^[9-10]。

本研究筛选到适合玉米黑粉菌和玉米丝黑穗菌的室内高效接种方法,为玉米黑粉菌和玉米丝黑穗菌的侵染机制及其与玉米互作规律的研究提供参考,同时也为今后苗期快速评价玉米资源对两种病害的抗性提供了可靠方法。

参考文献:

- [1] 邢跃先,吴凤新,李姝睿,等. 抗玉米丝黑穗病分子标记辅助育种研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(6): 9-13.
- [2] 王振华,孙培元,李宁宁,等. 玉米苗期室内菌土接种丝黑穗病菌侵染条件的优化[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(1): 1-5.
- [3] Baggett J R, Koepsell P A. Field inoculation of sweet corn with the head smut pathogen[J]. Hort Science, 1983, 18(1): 37-39.
- [4] 杨佩文,李家瑞,杨勤忠,等. 十字花科蔬菜根肿病菌休眠孢子的分离与检测[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 301-303.
- [5] 颜伟,蔡士宾,吴纪中,等. 3种小麦纹枯病原菌接种方法的比较[J]. 长江大学学报(自然科学版)农学卷, 2007, 4(4): 1-4.
- [6] 易图永,张宝玺,谢丙炎,等. 辣椒疫病三种接种方法的比较[J]. 中国蔬菜, 2003(2): 16-18.
- [7] Kispatic J, Lusin V. Head smut of maize[J]. Rev Appl Mycol, 1954, 33(5): 291-292.
- [8] 檀国庆,邢跃先,徐明良,等. 玉米丝黑穗病带菌现象的发现与验证[J]. 玉米科学, 2009, 17(3): 120-123.
- [9] 宋淑云,孙秀华,郭文广,等. 玉米种质资源抗丝黑穗病鉴定[J]. 吉林农业科学, 2000, 25(3): 32-33.
- [10] 吴新兰,庞志超. 玉米丝黑穗病的药剂防治效果及其与侵染时期的关系[J]. 吉林农业科学, 1980(4): 76-80.

(责任编辑:王昱)