

玉米灰斑病抗性鉴定技术

徐秀德¹ 董怀玉¹ 姜 钰¹ 刘志恒²

(1. 辽宁省农业科学院植物保护研究所, 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学, 沈阳 110161)

摘要: 对玉米灰斑病菌孢子产生、病菌接种和寄主抗病性测定技术的研究结果表明, 应用玉米叶粉碳酸钙琼脂和玉米叶粉琼脂两种培养基, 温度 24~25℃, 培养 5 天, 病菌可大量产生分生孢子; 于植株喇叭口期, 用注射器将病菌孢子悬浮液注射于植株喇叭口中, 获得了理想的发病效果; 对 20 个玉米自交系注射接种鉴定结果表明, 玉米自交系间抗病性差异明显, 但未发现免疫自交系。

关键词: 玉米灰斑病, 接种技术, 抗病性鉴定

玉米灰斑病 *Cercospora zae-maydis* Tehon & Daiels 是严重威胁玉米生产的叶部病害。1925 年在美国伊利诺州首次发现^[1], 其后许多国家均有发生危害的报道^[1~2], 可造成产量损失达 20%^[3~4]。20 世纪 90 年代, 此病在辽宁省突发流行, 1993 年东港市因该病危害平均减产 10% 左右^[5], 1996 年全省玉米灰斑病大流行, 发病面积 20 余万 hm², 产量损失达 2 亿多 kg, 目前已上升为主要病害。应用抗病品种是防治该病的有效途径, 玉米育种单位已鉴定出一批抗病自交系或品种^[6~8]。研究表明, 病菌在人工培养条件下产孢困难, 人工接种寄主难以发病, 故以往对玉米抗病性的评价是通过田间自然发病调查进行, 而利用人工控制下的接种进行抗病材料筛选的报道甚少, 从而限制了抗病基因的鉴定和有效利用。为此, 作者从病菌生物学特性研究入手, 寻求病菌分生孢子的产生条件, 探索抗病资源鉴定中简便、易行、可靠的田间人工接种方法。

1 材料与方法

1.1 玉米灰斑病菌产孢特性研究

1.1.1 病原菌分离与培养: 从玉米感病植株叶片上采集病斑, 按常规组织分离法进行分离培养, 获取病菌的纯培养。以分生孢子悬浮液涂抹于 PDA 平板培养基上, 产生病菌单孢菌落, 最终获取纯化菌株。

1.1.2 适宜病菌产孢的培养基筛选与制备: 玉米叶浸汁培养基 (maize leaf extract agar, MLEA): 干玉米叶 25~30g 或鲜叶 100g, 水煮 20min, 取其滤液, 加入 20g 琼脂, 定容 1L, 121℃ 下灭菌 30min, 冷却至 45℃ 左右倒入培养皿, 制成平板培养基。玉米叶粉琼脂培养

基金项目: 辽宁省博士启动基金项目资助 (2001102064)

作者简介: 徐秀德 (1955-), 男, 研究员, 主要从事植物病害及作物抗病虫特性研究 (E-mail: xiudex@online.ln.cn)

收稿日期: 2002-04-06

基(maize leaf powder agar, MLPA):玉米叶用小型植物粉碎机粉碎成粉,取 15g 玉米叶粉,加入 15g 琼脂,加水量 1L,121℃下灭菌 30min,制成平板培养基。玉米叶粉碳酸钙琼脂培养基(maize leaf powder plus CaCO_3 agar, MLPCA):取玉米叶粉 15g,加入 2g CaCO_3 ,15g 琼脂,加水量 1L,121℃下灭菌 30min,制成平板培养基。胡萝卜玉米叶粉琼脂培养基(carrot plus maize leaf powder agar, CMLPA):以胡萝卜琼脂培养基为基础,加入玉米叶粉 10g 于 1L 培养基中,灭菌同上,制成平板培养基。V8 培养基(V8 agar)、燕麦片琼脂培养基(oatmeal agar, OA)、胡萝卜琼脂培养基(carrot agar, CA)、PDA 等培养基制备参照 Tutte 的方法^[9]。

1.1.3 接菌与产孢量测定:应用上述 MLEA、MLPA、MLPCA、CMLPA、V8、CA、OA、PDA 等 8 种培养基作为病菌产孢量测定培养基。取 0.5ml 孢子悬浮液(孢子含量 1.0×10^4 个/ml)滴于直径为 9cm 的平板培养基表面,用弯曲玻璃棒涂布均匀。每处理重复 3 次。25℃下培养 5 天后,用 0.1% Tween20 液将分生孢子洗下,用血球计数板计测病菌产孢数量,折算每皿中孢子数量。

1.2 病菌接种与寄主抗病性评价方法

1.2.1 接种方法:在田间试材按顺序排列播种,行长 4m,行距 0.6m,2 行区,小区保苗 24 株左右。每处理 3 次重复。人工培养的病菌分生孢子以无菌水配成孢子悬浮液,孢子含量为 2.5×10^3 个/ml,于植株(9~11)叶喇叭口期,用喷嘴处装有 20ml 注射器针头的手提式喷雾注射器,从植株喇叭口处平行插入针头,将孢子悬浮液注入植株心叶中。每株接种 10ml 菌悬液,每小区接种 15 株左右。

1.2.2 寄主抗病性评价:接种后 30~40 天玉米籽粒生理成熟期,目测调查每小区发病情况。根据受害叶片病斑面积占植株叶片总面积的百分比划分抗性等级。0 级:无病斑,免疫(IM);1 级:叶片病斑面积占叶片总面积 5% 以下,高抗(HR);2 级:病斑面积 5.1%~10%,抗病(R);3 级:病斑面积 10.1%~25%,中等抗病(MR);4 级:病斑面积 25.1%~50%,感病(S);5 级:病斑面积在 50% 以上,高度感病(HS)。

2 结果与分析

2.1 病菌在不同培养基上产孢量比较 本研究对 19 种常用和新组配培养基进行了筛选,获得了可使病菌产孢的 8 种培养基。病菌产孢量比较结果(表 1)表明:(1)病菌在各种培养基上的产孢量存在一定差异,有的达到显著差异。所选择的 8 种培养基中,最适于病菌产生分生孢子的为玉米叶粉碳酸钙琼脂培养基(MLPCA)和玉米叶粉琼脂培养基(MLPA),其次为玉米叶浸汁培养基(MLEA)、V8 汁琼脂培养基、胡萝卜玉米叶粉琼脂培养基(CMLPA)和胡萝卜琼脂培养基;在 PDA 和燕麦片培养基上,病菌虽能产生分生孢子,但数量极少。(2)病菌在玉米叶粉碳酸钙琼脂、玉米叶粉琼脂和玉米叶浸汁 3 种培养基上产孢较稳定,培养 5~7 天孢子数量较大,继续培养产孢量逐渐减少;在 V8 培养基、胡萝卜琼脂培养基和胡萝卜玉米叶粉琼脂培养基上,培养 5 天产孢量达到高峰,其后产孢量迅速下降,而孢子萌发形成菌丝;在 PDA 和燕麦片培养基上,培养 5 天可见少量孢子,继续培养孢子萌发形成菌丝。以上结果显示,玉米叶粉碳酸钙琼脂和玉米叶粉琼脂 2 种培养基适于病菌产生分生孢子,是玉米品种抗灰斑病性鉴定中接种物生产的理想培养基。

表 1 病菌在不同培养基上产孢量比较

Table 1 Comparison of conidia production of *C. zeae-maydis* on various media

培养基 Medium	病菌产孢量(个/皿) Conidia production per petri dish	$\alpha = 0.05$	培养基 Medium	病菌产孢量(个/皿) Conidia production per petri dish	$\alpha = 0.05$
MLPCA	1.28×10^7	a	V8 agar	8.79×10^4	c
MLPA	1.23×10^7	a	胡萝卜 Carrot agar	7.16×10^4	cd
MLEA	3.73×10^5	b	燕麦片 Oatmeal agar	1.00×10^3	e
CMLPA	8.84×10^4	c	PDA	2.60×10^2	f

2.2 寄主抗病性评价结果 1999~2001 年,采用人工注射接种方法对供试玉米自交系的致病性测定结果(表 2)表明,不同玉米自交系间对灰斑病的抗性存在明显差异。供试 20 份材料中,表现 1 级(高抗)试材 3 份,2 级(抗病)试材 5 份,3 级(中等抗病)试材 4 份,4 级(感病)试材 6 份,5 级(高度感病)试材 2 份,未发现免疫类型材料。从试验结果可见,采用人工培养产生的病菌分生孢子,经注射接种鉴定玉米的抗病性技术可行,方法简便适用,结果可靠,可以在玉米抗灰斑病育种工作中应用。

表 2 玉米灰斑病菌对供试玉米自交系致病性测定结果

Table 2 The response of selected corn inbred to *C. zeae-maydis*

品种名称 Variety	接种株数 Plants inoculated	发病率 (%) Incidence	抗病级别 Scale of resistance	抗性 评价 Resistance	品种名称 Variety	接种株数 Plants inoculated	发病率 (%) Incidence	抗病级别 Scale of resistance	抗性 评价 Resistance
Y062	138	100	1.22	高抗 HR	齐 319 Qi 319	126	100	3.00	中抗 MR
Y078	125	100	1.56	高抗 HR	高 8 Gao 8	126	100	3.22	中抗 MR
丹黄 25 Danhuang25	126	100	1.22	高抗 HR	沈 131 Shen 131	137	100	4.22	感 S
Y003	125	100	2.56	抗 R	沈 136 Shen 136	128	100	4.11	感 S
Y023	129	100	2.00	抗 R	丹 340 Dan340	123	100	4.33	感 S
E28	119	100	2.89	抗 R	丹黄 37 Danhuang37	136	100	4.33	感 S
沈 137 Shen 137	136	100	2.22	抗 R	Y081	121	100	4.78	感 S
78599	128	100	2.11	抗 R	9046	120	100	4.67	感 S
丹黄 34 Danhuang34	137	100	3.11	中抗 MR	K12	136	100	5.00	高感 HS
M17	124	100	3.22	中抗 MR	9010	127	100	5.00	高感 HS

3 讨论

采用玉米叶粉碳酸钙琼脂培养基和玉米叶粉琼脂培养基,在 24~25℃ 下培养,是玉米灰斑病菌产孢的理想条件,改变了以往其病菌产孢难和产孢量少的状况。

通过对玉米抗灰斑病接种的多种方法进行探讨,筛选出在植株喇叭口期,应用手提式注射器于植株心叶中注射病菌孢子悬浮液的接种方法,获得了理想的寄主发病效果。采用此人工注射接种的新技术鉴定玉米抗灰斑病性,在我国为首次。应用该技术对 20 份玉米自交系进行抗病性鉴定结果表明,玉米自交系间的抗病性存在明显差异,但未发现免疫试材。鉴定出的 8 份高抗和抗病的玉米自交系可在玉米抗病育种中应用。

Coates (1994) 等^[8]曾经采用 V8 培养基培养玉米灰斑病菌,以孢子悬液喷雾接种玉米

进行抗灰斑病鉴定,接种后用旋转式喷雾设备喷雾保湿,增加病菌侵染的成功率。相比之下,本研究技术采用植株喇叭口期注射病菌孢子悬浮液的方法,利用植株心叶中的自然湿度确保病菌侵染,无需辅助增湿设备保湿,可获得理想的发病效果,而且接种物用量少,大大降低成本,具有简便、实用、成本低等特点。同时本试验采用的玉米叶粉碳酸钙琼脂培养基和玉米叶粉琼脂培养基培养病菌,其产孢量明显大于 V8 培养基。实践表明,本研究中的病菌接种物培养及植株喇叭口期注射接种的方法,可在玉米灰斑病抗病育种工作中应用。

近年来,玉米灰斑病已经成为我国北方玉米上继玉米大、小斑病之后的又一种重要叶部病害,危害极为严重。该研究表明,玉米不同品种间的抗病性存在明显差异。据此,综合利用各地资源及其抗性,加强抗病育种工作是非常必要的。

参 考 文 献

- 1 Tehon L R, *et al.* Notes on the parasitic fungi of Illinois. *Mycologia*, 1927, 19: 110 - 129
- 2 Malcolm C S. Compendium of corn disease. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA, 1980
- 3 Hilty J W, *et al.* The response of maize hybrids and inbred lines to the gray leaf spot disease and effects on Tennessee. *Plant Disease Reporter*, 1979, 63(6): 515 - 518
- 4 白金铠. 杂粮作物病害. 北京: 中国农业出版社, 1997
- 5 吴纪昌, 等. 玉米抗尾孢菌叶斑病鉴定与抗性材料利用. *辽宁农业科学*, 1997, 5: 25 - 28
- 6 Latterell F M. Gray leaf spot of corn: a disease on the move. *Plant Disease*, 1983, 67(8): 842 - 847
- 7 Roane C W, *et al.* Observation on gray leaf spot of maize in Virginia. *Plant Disease*, 1974, 58: 456 - 459
- 8 Coates S T. Sources of resistance to gray leaf spot of corn. *Plant Disease*, 1994, 78: 1153 - 1155
- 9 Tutte J. Plant pathological methods. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA, 1969

The technique for identification of resistance to gray leaf spot on maize

Xu Xiude¹ Dong Huaiyu¹ Jiang Yu¹ Liu Zhiheng²

(1. Institute of Plant Protection, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China; 2. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Conidial production, inoculation and the pathogenicity test of *Cercospora zae-maydis* Tehon & Daiels on maize were studied. The result showed that the pathogen on medium of maize leaf powder agar (MLPA) or maize leaf powder plus CaCO₃ agar (MLPCA), cultured 5 days at 24 - 25°C, was found to produce abundant quantities of conidia. Inocula was inoculated into leaf whorl of plants by a hypodermic syringe at 9 - 11 leaf stage of plant. The increased disease incidence was observed in the fields. Identification of 20 inbred of maize for disease resistance showed that there was significantly different resistance to *Cercospora zae-maydis*, but none was immune to the disease.

Key words: gray leaf spot of maize, technique of inoculation, identification of resistance