

## 广东省甜玉米小斑病菌的生理小种鉴定

张金凤, 蒋 锋, 刘鹏飞, 王小明  
(仲恺农业工程学院, 广州 510220)

**摘要:** 玉米小斑病是中国温暖潮湿玉米产区的重要叶部病害, 并有逐渐加重趋势, 损失严重。笔者从广东省甜玉米主产区采集了4个有代表性的小斑病标样, 分离提纯病原菌, 通过扫描电子显微镜观察玉米小斑病菌的孢子, 并结合病菌生物学特性, 对分离出的4个甜玉米小斑病菌株进行了生理小种的鉴定。结果表明: 4个甜玉米小斑病病原菌的孢子形态和生物学特性完全一致, 孢子表面褶皱较多, 孢子萌发方式大多数均由一端萌发。结合崔洋、刘克明等对玉米小斑病3个生理小种扫描电镜观察, 4个标样菌株孢子符合O小种特征, 因此, 认为广东省甜玉米主产区的小斑病病原菌是同一生理小种类型(O型)。

**关键词:** 甜玉米; 小斑病; 生理小种; 扫描电镜观察

中图分类号: S513; S435.131.4

文献标识码: A

论文编号: 2009-1108

### *Bipolaria maydis* physiological Race Determination of Sweet Corn in Guangdong Province

Zhang Jinfeng, Jiang Feng, Liu Pengfei, Wang Xiaoming  
(Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou 510220)

**Abstract:** *Bipolaria maydis* is an important leaf disease in the warm and humid corn areas in China, and it is gradually add to the trend of serious. Four representative samples of corn southern leaf blight were collected from main sweet corn area in Guangdong province. According to these samples, a race identification of isolated *Bipolaris maydis* strains was made based on surface morphology of spore through scanning electron microscope and race biological characteristics. The results showed that spore of these four samples were mostly the same as the patterns and biological characteristics, all the face of spores had many folds, and germinated from one side. Refer to Cui Yang and Liu Keming observed the morphological characteristics by the scanning electron microscope. The four samples were coincided with *Bipolaris maydis* race "O". Then suggesting that all of *Bipolaris maydis* physiological race in Guangdong province were probably belonged to race "O".

**Key words:** sweet corn, *Bipolaria maydis*, physiological race, scanning electron microscope observation

### 0 引言

玉米小斑病(*Bipolaris maydis*)又叫斑点病, 是中国玉米的主要病害之一, 各玉米产区均有发生, 已成为各类玉米生产中的主要病害<sup>[1]</sup>。近年来, 小斑病在广东省各甜玉米产区有逐渐加重的趋势, 发病率达到30%以上。因此, 加强对全省各甜玉米产区小斑病菌优势小种的监测和系统鉴定, 确定它们的生理小种组成和

分布并对其进行分析、调查, 对于指导甜玉米抗病新品种选育和抗病、高产生优质生产具有十分重要的现实意义。

1970年美国玉米小斑病的大流行, 是由于大面积加速推广对小斑病菌敏感的T型细胞质雄性不育系配制的杂交种, 使小斑病菌内毒力强的群体以迅速繁殖和蔓延而成为优势的群体所造成。1970年Smith等<sup>[2]</sup>

**基金项目:** 广州市科技支撑计划项目“鲜食型玉米抗病核心种质的创建与新品种选育”(2008Z1-E541)。

**第一作者简介:** 张金凤, 女, 1984年出生, 湖南湘潭人, 在读硕士, 从事甜玉米抗病育种和遗传规律方面的应用研究。通信地址: 510220 广东广州市海珠区纺织路东沙街24号院仲恺农业工程学院07级研究生信箱。Tel: 020-89003156, E-mail: lpf2004buildit@yahoo.com.cn, yanyi\_0302@163.com。

**通讯作者:** 王小明, 教授, 1956年出生, 甘肃甘谷人, 硕士生导师, 农林学院副院长, 主要从事特种玉米新品种选育及高产优质栽培研究。

**收稿日期:** 2009-05-25, **修回日期:** 2009-06-16。

根据研究的结果,首次报道了T、O两个生理小种,提出T型雄性不育细胞质玉米对T小种表现严重感病,C和S型雄性不育细胞质及正常可育细胞质玉米对T小种表现抗病,而各种类型的细胞质(T、C、S、N)玉米对O小种都是抗病的。继而Hooker<sup>[3]</sup>进一步报道了T、O两个小种的特征。1979年朱贤朝等<sup>[4]</sup>提出中国玉米小斑病菌中存在类似美国的T、O两个生理小种,并认为T小种在中国广泛存在。1981年罗畔池等根据118个不同来源的小斑菌菌株在8个鉴别寄主上的反应,提出中国玉米小斑菌中存在包括中T,中C,中S,中N、中O和中TCSN等小种在内的16个生理小种<sup>[5]</sup>。1988年魏建昆等<sup>[6]</sup>根据小斑菌对C细胞质玉米的专化致病性,提出中国存在C小种。另外,用光学显微镜观察玉米小斑病病原菌形态以往研究者得出病原菌形态无差异的结论<sup>[7]</sup>。

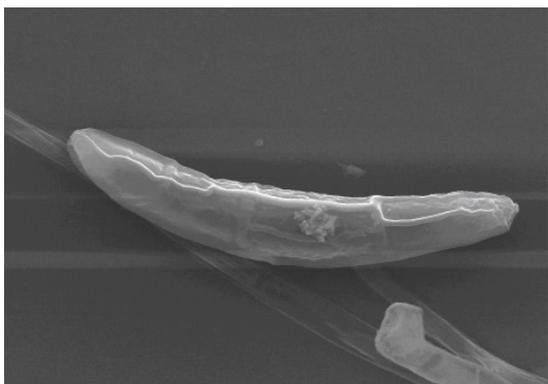
现代扫描电镜技术的发展,可为小斑病病原菌生理小种的鉴定提供更为可靠的保证。这项技术一方面克服了依据寄主对小斑病生理小种的病理反应这一鉴定标准周期长,受环境因素影响大,鉴定结果不稳定的缺点,另一方面,解决了光学显微镜放大倍数小,分辨率低的不足。但目前对玉米小斑病生理小种的扫描电镜观察,还鲜见报道。

笔者从广东省各甜玉米主产区采集代表性的甜玉米小斑病标样,通过扫描电子显微镜观察病菌孢子形态,结合生理小种生物学特性,对其菌株进行了生理小种的鉴定,从而对进一步确定广东省玉米小斑病菌生理小种的组成和分布奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 时间与地点

田间试验于2008年7月,在中山市、英德市、广东省农科院白云基地、广州市番禺区仲恺农业工程学院钟村教学农场进行。室内试验在仲恺农业工程学院植物病理研究室以及中大电镜室完成。



病区1

### 1.2 材料

1.2.1 病原菌的采集与分离 在甜玉米小斑病发生时期,从中山市沙朗(病区1)、英德市横石塘(病区2)、广东省农科院白云基地(病区3)、广州市番禺区仲恺农业工程学院钟村教学农场(病区4)采集具有典型症状的病叶标样,然后通过单病斑分离玉米小斑病菌株,其分离方法采用方中达<sup>[8]</sup>所介绍的方法。

1.2.2 电镜样品的制备 用灭菌的小玻片放在各标样菌落上直至长满菌丝,每个样品准备5个小玻片,待长满菌丝后镜检,以确定玻片上存在有孢子。电镜样品制备方法参照张景强、朴英杰所介绍的方法<sup>[9]</sup>。电镜样品制备的第一步是固定:即挑选孢子分布较散的小玻片放至小号培养皿用戊二醛固定5 h;第二步是冲洗:即用0.1 mol/L磷酸缓冲液洗4次,20 min/次;第三步是脱水:即分别用30%、50%、70%和90%酒精脱水各一次,15 min/次,然后用无水乙醇脱水3次,15 min/次;第四步是置换:即用叔丁醇置换3次,一次15 min;第五步是干燥:即采用冷冻干燥方法,冷冻干燥仪型号为JEOL JFD-320 Freeze Drying Device;最后一步是喷金。样品制备完毕后用热场发射扫描电镜观察拍照,扫描电镜型号为QuANTA400FEG。

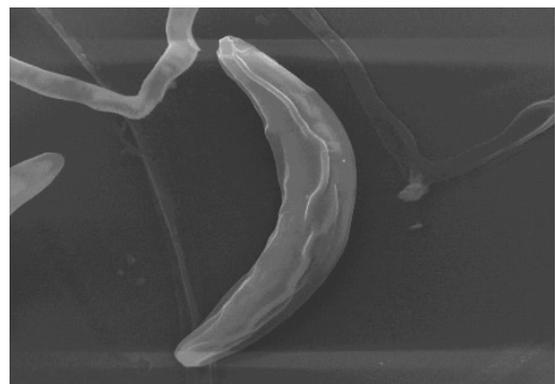
### 1.3 生物学特性观察

分离纯化的菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(简称PDA)上培养,观察其菌落形态,同时将孢子在无菌水中培养3 h,观察其萌发方式。

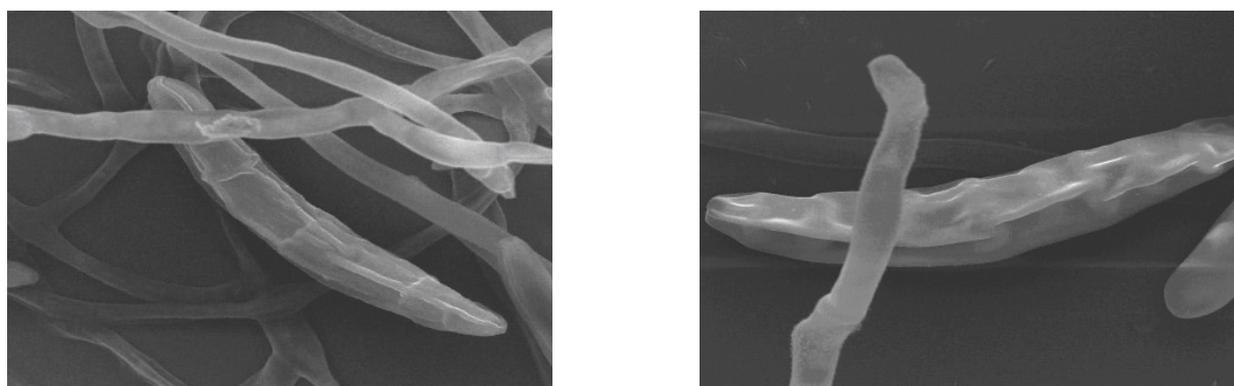
## 2 结果与分析

### 2.1 扫描电镜观察结果

玉米小斑病菌T、C、O3个生理小种的孢子在扫描电镜下观察有明显差异,T小种孢子表面丰满,较光滑。C小种孢子表面较光滑,但有少量褶皱。O小种孢子皱缩较多<sup>[6]</sup>。从扫描电镜观察的结果来看,笔者采集4个样本孢子表面褶皱都较多,可初步断定为O小种(图1)。



病区2



病区3

病区4

图1 玉米小斑病菌生理小种扫描电镜观察

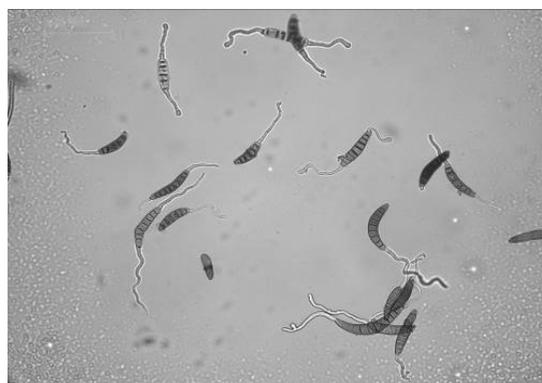
## 2.2 生物学特性观察结果

甜玉米小斑病T、C、O3个生理小种的孢子在无菌水中于25℃下培养3h,分生孢子发芽方式,T小种和C小种几乎全部是孢子两端同时萌发,而O小种多数是一端萌发,少数两端萌发<sup>[10]</sup>。将4个标样菌株分别

接种在PDA斜面上培养数日,用无菌水将分生孢子洗下,将孢子在无菌水中培养3h,在显微镜下观察孢子萌发方式。实验结果得出,4个标样孢子多数一端萌发,结合扫描电镜观察结果,可以断定4个标样生理小种均属于O小种(图2)。



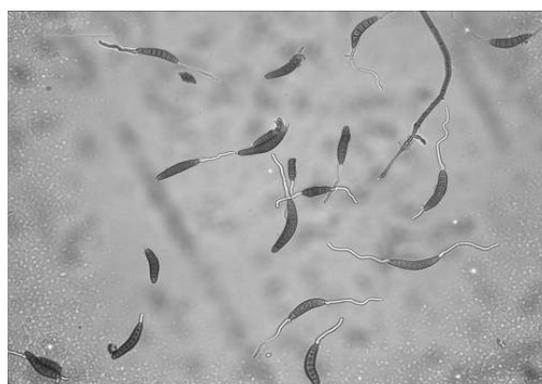
病区1



病区2



病区3



病区4

图2 甜玉米小斑病菌孢子萌发方式观察

## 3 讨论

甜玉米小斑病菌的不同小种在不同地区的出现频率不同,针对不同的生理小种选育和种植抗病品种,并进行品种合理布局,是确保甜玉米生产安全进行的有效途径之一<sup>[11]</sup>。因此,对甜玉米小斑病菌生理小种

进行系统鉴定,确定生理小种的组成和分布情况对指导甜玉米抗小斑病选育种具有很大的实际意义。目前为止,依据病原菌对不同细胞质玉米寄主的病理反应将小斑病菌分别鉴定为“T”小种、“C”小种和“O”小种<sup>[2-5]</sup>。但这一传统的方法鉴定周期长,受环境因素影响大,鉴

定结果不稳定;而且这一鉴别方法还存在一些不科学的地方和异议,例如有些小种不属于T、C、O生理小种,而属于其中两者的中间态,需要用一种更合适的鉴别方法进一步加以确定<sup>[2]</sup>。另外,邓福友等<sup>[12]</sup>认为玉米小斑病菌的群体中,是否存在对当前现有的甜玉米T、C、S、N 4种类型细胞质中的某一类细胞质特有的专化致病的类群,还需要经过广泛深入的研究才能明确。因而,单纯依据对某一类型细胞质专化致病的特征来鉴别小斑病菌生理小种的方法还有待进一步商榷。笔者以甜玉米为材料,分离纯化标样菌株,用扫描电镜观察其孢子形态,克服了依据病原菌对寄主的病理反应和光学显微镜下病菌形态鉴定的局限性,更为真实、准确地反映病原菌的表面结构;同时结合了病原菌的生物学特性,为今后鉴定整个广东省甜玉米小斑病菌主要生理小种的类型提供了一定依据。

#### 参考文献

- [1] 董金皋. 农业植物病理学[M].北京:中国农业出版社,2001:89-93.
- [2] Smith DR. Physiologic races of *Helminthosporium maydis*[J]. Plant Dis Rep, 1970, 54: 819-822.
- [3] Hooker AL. Physiologic races of *helminthosporium maydis* and disease resistance [J]. Plant Dis Rep, 1970, (54): 1109-1110.
- [4] 朱贤朝,吴全安,梁克恭,等.玉米小斑病生理小种研究初报[J].植物病理学报,1979,9(2):113.
- [5] 罗畔池,黄梧芳.我国玉米小斑病菌的生理小种[J].植物病理学报, 1981, 11(3): 40.
- [6] Wei JK. Pathological and physiological identification of race C of *Bipolaris maydis* in China[J]. Phytopathology, 1988, 78(5): 550.
- [7] 崔洋,张召铎,刘克明,等.玉米小斑病菌生理小种扫描电镜观察[J]. 华北农学报, 1990, 5(1): 74-77.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M].北京:中国农业出版社, 1998: 122-125.
- [9] 张景强,朴英杰,蔡福筹,等.生物电子显微技术[M].广州:中山大学出版社, 1993: 132-144.
- [10] 刘克明,吴全安,刘俊芳,等.玉米小斑病菌三个生理小种生物学特性比较的初步研究[J].华北农学报, 1989, 4(2): 74-78.
- [11] 邓福友,黄梧芳.玉米小斑病菌对不同细胞质玉米致病力变异的研究[J].河北农业大学学报, 1989, 12(4): 11-16.
- [12] 邓福友,黄梧芳.关于玉米小斑病菌生理小种的讨论[J].河北农业大学学报, 1991, 14(2): 99-102.

**致谢:** 试验得到仲恺农业工程学院植物病理学重点实验室游春平教授和曾永三教授的很多帮助,特表谢意!