

玉米抗大斑病菌单基因系的建立及其在 *Exserohilum turcicum* 生理小种鉴定中的应用

张桂珍¹, 刘金亮¹, 胡瑞学¹, Ali Khatib Bakar¹,
张艳华¹, Don G. White², 潘洪玉¹

(1. 吉林大学 植物科学学院, 长春 130062; 2. 美国伊利诺伊大学香槟分校 作物科学系, 伊利诺伊 61801, 美国)

摘要: 利用美国 A632, B37, B73, B68, C103, Va26 等 30 个 *Ht* 单基因鉴别寄主, 按美国伊利诺伊大学的大田接种方案与鉴定方法, 建立了适合中国的监测玉米大斑病菌生理小种鉴定的 21 个 *Ht* 单基因系. 从吉林省 15 个地区的不同玉米品种中采集玉米大斑病样本, 采用单孢分离获得了 32 个玉米大斑病菌菌株, 利用已建立的上述 21 个 *Ht* 单基因鉴别寄主, 通过美国的大田鉴定方案进行生理小种鉴定. 结果表明, 这 32 个菌株均为 0 号小种, 并未出现生理小种分化现象.

关键词: 单基因系; 玉米大斑病菌; 生理小种; 鉴定

中图分类号: Q939.95 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2012)01-0134-05

Corn Resistant Single Gene Lines to *Exserohilum turcicum* and Their Application to Identification of Physiological Races of *E. turcicum*

ZHANG Gui-zhen¹, LIU Jin-liang¹, HU Rui-xue¹, Ali Khatib Bakar¹,
ZHANG Yan-hua¹, Don G. White², PAN Hong-yu¹

(1. College of Plant Sciences, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. Department of Crop Sciences, University of Illinois, Illinois 61801, USA)

Abstract: Thirty inbred lines such as A632, B37, B73, B68, C103 and Va26 from the inbred collection at the University of Illinois were used to determine physiological races of *Exserohilum turcicum* in the field. Twenty-one inbred lines from the inbred collection were selected to determine physiological differentiation of *E. turcicum* effectively in China. Thirty-two single conidial isolates of *E. turcicum* were collected throughout 15 farming areas of Jilin Province. All the 32 isolates were race zero. There was no physiological differentiation of the pathogen.

Key words: inbred lines; *Exserohilum turcicum*; physiological races; identification

玉米大斑病(northern corn leaf blight, NCLB)是由真菌 *Exserohilum turcicum* 引起的一种玉米病害, 一般年份减产约 20%, 严重流行年份减产可达 50% 以上^[1], 给玉米的生产带来严重威胁.

玉米大斑病的发生与目前推广的玉米品种抗病性及病原菌生理小种变异密切相关. 因此, 建立适

收稿日期: 2011-05-05.

作者简介: 张桂珍(1986—), 女, 汉族, 硕士研究生, 从事植物病原真菌生物学的研究, E-mail: zgz8866@163.com. 通讯作者: 潘洪玉(1961—), 男, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 从事植物病原真菌分子生物学与作物抗病基因工程的研究, E-mail: panhongyu@jlu.edu.cn.

基金项目: 吉林省国际科技合作计划项目(批准号: 20100723)、长春市国际科技合作计划项目(批准号: 10GH26)和吉林大学研究生创新基金(批准号: 20111078).

合中国的玉米抗大斑病菌单基因系,明确中国玉米大斑病菌生理小种组成及分布频率,对于有针对性地寻找新的抗病基因和培育具有多抗病基因的抗病品种,指导品种合理布局和轮换抗病品种,从而有效延缓病原菌的生理分化,降低病原物种群数量及实现玉米大斑病的可持续控制具有重要意义。

病原菌在 *Ht* 单基因鉴别寄主上的反应型,受鉴别寄主基因的纯度、鉴别寄主对病原物反应差异以及环境条件等因素的影响。目前普遍认为玉米对大斑病抗性的质量性状由 *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* 和 *HtN* 等显性单基因控制^[2],因此国际上采用含有 *Ht* 单基因品种作为鉴定大斑病病菌生理分化的鉴别寄主。目前,国内在玉米大斑病菌生理小种鉴定方面多利用常规鉴别寄主,采用温室接种方法,通过玉米苗期观察进行^[3-8],由于温室内的温度和光照不能完全模拟病原菌的自然发病环境,从而对玉米大斑病菌发病影响较大^[9-10],因此不能及时准确掌握自然条件下玉米大斑病菌生理小种的分化与流行动态。

为完善中国玉米大斑病菌生理小种的鉴定技术,明确吉林省玉米大斑病菌生理小种的分化情况,本文利用吉林大学有害生物综合防治实验室已有的 0,1,2,123 和 123N 等 5 种生理小种,对引进的 30 个美国 *Ht* 单基因鉴别寄主,从生长环境适宜和抗感表现型等方面分析,筛选建立适合中国玉米抗大斑病菌单基因系。同时,利用这些筛选出的 *Ht* 单基因鉴别寄主技术进行大田接种方案,对采自吉林省四平、公主岭、农安、长春、辽源等 15 个地区不同玉米品种的 32 个玉米大斑病菌标样进行生理分化鉴定和分析,以明确吉林省玉米大斑病菌生理分化情况,掌握吉林省玉米大斑病菌生理小种的组成、分布频率及变异动态。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及供试鉴别寄主

1) 吉林大学有害生物综合防治实验室保存的 5 株已知生理小种的玉米大斑病菌菌株:0 号生理小种(803-0),1 号生理小种(803-1),2 号生理小种(803-2),123 号生理小种(803-123)和 123N 号生理小种(803-123N)。2) 2007~2009 年从吉林省四平、公主岭、农安、长春、辽源等 15 个玉米主产区采集到不同玉米品种的玉米大斑病叶样品 60 份。通过组织分离培养,进行单孢分离,共得到 32 个玉米大斑病菌菌株纯培养。

30 个具有 *Ht* 单基因的鉴别寄主由美国伊利诺伊大学 White 教授惠赠,分别为 A619, A619*Ht2*, A632, A632*Ht1*, B37, B37*Ht1*, B37*Ht3*, B68, B68*Ht1*, B68*HtN*, B73, B73*Ht1*, C103, C103*Ht1*, C103*HtN*, H95, H100, H102*HtM*, H103*HtM*, H110*HtM*, H111*HtM*, Mo17, Mo17*Ht1*, Pa*Ht1*, Pa*Ht2*, Pa*Ht3*, Va26, Va26*Ht1*, Va26*Ht2*, Va26*Ht3*。

1.2 鉴定标准

鉴定标准参照国际 CIMMIT 小麦玉米改良中心群体分类标准及中华人民共和国行业标准——玉米抗病虫害鉴定标准《玉米抗大斑病鉴定技术规范(2007202201)》,略有改动。

R 型病斑:病斑初为黄绿色水浸状条斑,之后中间变褐,边缘有明显的较宽黄色晕圈,病斑狭长,出现早,枯死慢,称为褪绿斑;S 型病斑:病斑初为灰绿色水浸状斑,之后扩大为梭形大斑,灰褐色,边缘无明显晕圈,出现晚,枯死快,称为萎蔫斑;MR 型病斑:病斑较窄,呈梭形,褐色,边缘有较宽的黄色圈;MS 型病斑:病斑呈梭形大斑,灰褐色,边缘有较窄的黄色圈。

1.3 生理小种命名

生理小种的命名采用 Leonard 等^[11]提出的新的生理小种命名系统,并参照文献[12]的新命名法。

1.4 玉米抗大斑病菌单基因系的建立

分别将 30 个玉米抗大斑病菌单基因系鉴别寄主的种子种植在划分好的 6 个小区,每个小区 3 行,行距 0.7 m,每行 10 个单基因系,每个单基因系 0.7 m、6 粒种子,出苗后每个单基因系留苗 3~4 株,株距约 0.2 m。将在燕麦麦芽糖(OAT)固体培养基上培养 20 d 的玉米大斑病菌与其培养基一起用搅拌机搅碎,制成孢子悬浮液,稀释浓度至 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 个孢子/mL,在配好的孢子悬浮液中加入几滴体积分数为 0.1% 的吐温-20。每个玉米大斑病菌菌株对应一个小区,随机留一个小区喷吐温水作为对照。采用喷雾接种的方法,在玉米 6~8 叶期进行第 1 次接种,使叶片均匀布满,每株喷约 5 mL,

以后每隔 5 d 接种一次,直至抽穗期,共接种 6 次.在玉米抽穗期至成熟期进行症状调查,共 2 次.

根据已知生理小种的 5 株玉米大斑病菌菌株在 *Ht* 单基因鉴别寄主的症状表现,建立适合检测中国玉米大斑病菌的单基因系.

1.5 生理小种鉴定

分别将 21 个玉米抗大斑病菌单基因系鉴别寄主的种子种植在划分好的 21 个小区,小区的设计方法与鉴定方案同上.

2 结果与分析

2.1 玉米抗大斑病菌单基因系的建立

根据 5 个已知生理小种的玉米大斑病菌菌株在 30 个 *Ht* 单基因系的反应类型,建立适合鉴定中国玉米大斑病菌生理小种鉴定的 21 个单基因系,列于表 1.

表 1 单基因系对不同玉米大斑病菌生理小种的抗性*

Table 1 Resistance of inbred lines to physiological races of *E. turcicum*

单基因系	玉米大斑病菌生理小种						毒力公式
	CK	803-0	803-1	803-2	803-123	803-123N	
A619	R	S	S	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
A632	R	S	S	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
B37	R	S	S	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
B68	R	S	S	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
B73	R	S	S	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
C103	R	S	S	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
H95	R	MS	S	MS	MS	MS	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
H100	R	MS	MS	S	MS	MS	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Mo17	R	S	S	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Va26	R	S	S	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
A632 <i>Ht1</i>	R	R	S	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
B37 <i>Ht1</i>	R	R	S	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
B68 <i>Ht1</i>	R	R	S	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
B73 <i>Ht1</i>	R	R	S	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
C103 <i>Ht1</i>	R	R	S	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Mo17 <i>Ht1</i>	R	R	S	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Pa91 <i>Ht1</i>	R	R	S	MR	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Va26 <i>Ht1</i>	R	R	S	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
A619 <i>Ht2</i>	R	R	R	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Pa91 <i>Ht2</i>	R	R	MR	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Va26 <i>Ht2</i>	R	R	R	S	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
B37 <i>Ht3</i>	R	R	R	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Pa91 <i>Ht3</i>	R	R	MR	MR	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
Va26 <i>Ht3</i>	R	R	R	R	S	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
B68 <i>HtN</i>	R	R	R	R	R	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
C103 <i>HtN</i>	R	R	R	R	R	S	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
H102 <i>HtM</i>	R	R	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
H103 <i>HtM</i>	R	R	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
H110 <i>HtM</i>	R	R	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>
H111 <i>HtM</i>	R	R	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>

* R: 抗病; S: 感病; MR: 中抗; MS: 中感; CK: 吐温水.

由表 1 可见,只接种吐温水的玉米株在这 30 个 *Ht* 单基因鉴别寄主上均不感病;5 个已知生理小种的玉米大斑病菌菌株在 A619, A632, B37, B68, B73, C103, Mo17, Va26, A619*Ht2*, A632*Ht1*, B37*Ht1*,

B37Ht3, B68Ht1, B68HtN, B73Ht1, C103Ht1, C103HtN, Mo17Ht1, Va26Ht1, Va26Ht2, Va26Ht3 鉴别寄主上表现出明显的抗感反应, 而在单基因系 H95, H100, H102HtM, H103HtM, H110HtM, H111HtM, Pa91Ht1, Pa91Ht2, Pa91Ht3 抗感反应不明显, 即出现中度抗病或中度感病, 因此出现中抗或中感的上述单基因系不适合作为中国玉米大斑病菌生理小种鉴定的鉴别寄主. 结合以上鉴定结果, 本文建立了适合鉴定中国玉米大斑病菌生理小种鉴定的单基因系. 此单基因系为 A619, A619Ht2, A632, A632Ht1, B37, B37Ht1, B37Ht3, B68, B68Ht1, B68HtN, B73, B73Ht1, C103, C103Ht1, C103HtN, Mo17, Mo17Ht1, Va26, Va26Ht1, Va26Ht2, Va26Ht3 共 21 种玉米自交系.

2.2 玉米大斑病菌生理小种鉴定结果

本文采用上述建立的 21 个 *Ht* 单基因鉴别寄主对 32 个玉米大斑病菌标样进行生理小种鉴定, 结果列于表 2, 这 32 个菌株在建立的 21 个 *Ht* 单基因鉴别寄主上表型明显, 即在不含 *Ht* 基因的鉴别寄主上均表现为感病, 在含 *Ht* 基因的鉴别寄主上均表现为抗病.

表 2 玉米大斑病菌生理小种鉴定结果*

Table 2 Identification of physiological races of *E. turcicum*

供试菌株	地理来源	鉴别寄主反应型					毒力公式	生理小种
		A	B	C	D	E		
1	白山	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
2	白山	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
3	四平	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
5	四平	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
6	四平	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
7	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
8	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
9	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
11	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
106	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
107	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
313	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
335	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
402	公主岭	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
403	白城	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
509	白城	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
604	白城	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
623	白城	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
715	长春	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
810	长春	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
820	长春	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
1104	长春	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
2603	吉林	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
3008	吉林	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
3106	农安	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
3209	辽源	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
3501	辽源	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
3505	洮南	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
3630	安图	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
5005	敦化	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
5018	中交河	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0
5104	榆树台子	S	R	R	R	R	<i>Ht1Ht2Ht3HtN/0</i>	0

* R: 抗病; S: 感病.

表 2 中, A 代表 A619, A632, B37, B68, B73, C103, Mo17, Va26; B 代表 A632Ht1, B37Ht1, B68Ht1,

B73Ht1, C103Ht1, Mo17Ht1, Va26Ht1; C 代表 A619Ht2, Va26Ht2; D 代表 B37Ht3, Va26Ht3; E 代表 B68HtN, C103HtN. 由表 2 可见, 这 32 个玉米大斑病菌菌株全部为 0 号生理小种. 因此, 吉林省玉米大斑病菌并未出现生理小种分化现象.

综上所述, 在玉米大斑病菌生理小种鉴定中, 病原菌在鉴别寄主上的症状表现受鉴别寄主基因的纯度、寄主对病原菌反应差异及环境等因素的影响. 目前国际上采用含有 *Ht* 单基因品种作为鉴定大斑病菌生理分化的寄主. 本文利用上述 30 个在美国广泛用于玉米大斑病菌生理小种鉴定的 *Ht* 单基因鉴别寄主, 结合已知生理小种的玉米大斑病菌在这些单基因系上的田间症状表现及生长情况, 建立了适合中国玉米大斑病菌生理小种田间鉴定的单基因系, 优化了中国玉米大斑病菌生理小种鉴定技术, 克服了玉米大斑病菌生理小种在常规鉴别寄主和温室条件下鉴定的局限性, 能更真实、准确地反映玉米大斑病菌生理小种的田间变化; 同时结合玉米大斑病菌的生物学特性, 为今后鉴定中国玉米大斑病菌生理小种的类型提供了理论依据.

参 考 文 献

- [1] SUN Shu-qin, WEN Lei-lei, DONG Jin-gao. Identification of Physiological Races and Mating Type of *Exserohilum turcicum* [J]. Journal of Maize Sciences, 2005, 13(4): 112-113. (孙淑琴, 温雷蕾, 董金皋. 玉米大斑病菌的生理小种及交配型测定 [J]. 玉米科学, 2005, 13(4): 112-113.)
- [2] YANG Ji-liang, WANG Bin. The Research Advancement on Genetics of Resistance to *Exserohilum turcicum* in Maize [J]. Hereditas, 2002, 24(4): 501-506. (杨继良, 王斌. 玉米大斑病抗性遗传的研究进展 [J]. 遗传, 2002, 24(4): 501-506.)
- [3] SU Qian-fu, SONG Shu-yun, WANG Wei-wei, et al. The Composition Variation and Dynamic Forecast of *Exserohilum turcicum* Race Physiological Variation in Jilin Province [J]. Journal of Maize Sciences, 2008, 16(6): 123-125. (苏前富, 宋淑云, 王巍巍, 等. 吉林省玉米大斑病菌生理小种的组成变异与动态预测 [J]. 玉米科学, 2008, 16(6): 123-125.)
- [4] JIANG Jing-chun, PAN Shun-fa, JIN Qi-ming. Research Result on Pysiological Races of Pathogen Organism of Corn North Leaf Blight during "Eighth Five Year Plan" [J]. Journal of Maize Sciences, 1995, 3(Suppl): 19-20. (姜晶春, 潘顺法, 晋齐鸣. "八五"期间玉米大斑病病菌生理小种研究结果 [J]. 玉米科学, 1995, 3(增刊): 19-20.)
- [5] WANG Yu-ping, WANG Xiao-ming, MA Qing. Races of *Exserohihun turcicum*, Causal Agent of Northern Leaf Blight in China [J]. Journal of Maize Sciences, 2007, 15(2): 123-126. (王玉萍, 王晓鸣, 马青. 我国玉米大斑病菌生理小种组成变异研究 [J]. 玉米科学, 2007, 15(2): 123-126.)
- [6] LI Chun-xia, SU Jun, GONG Shi-chen, et al. Study on Physiological Form of Corn Leaf Blight in Heilongjiang Province [J]. Journal of Maize Sciences, 2000, 8(2): 89-91. (李春霞, 苏俊, 龚士琛, 等. 黑龙江省玉米大斑病菌生理小种的研究 [J]. 玉米科学, 2000, 8(2): 89-91.)
- [7] GAO Wei-dong, DAI Fa-chao, ZHU Xiao-yang, et al. A Study on Physiologic Specialization in *Exserohilum turcicum* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1994, 27(2): 90-91. (高卫东, 戴法超, 朱小阳, 等. 玉米大斑病菌生理分化研究 [J]. 中国农业科学, 1994, 27(2): 90-91.)
- [8] JI Wei-bo, HE Hai-jun, ZHAO Song-tao, et al. Identification of Physiological Races of *Setosphaeria turcica* in Northeast Corn Region of Heilongjiang [J]. Journal of Maize Sciences, 2010, 18(1): 128-130. (纪伟波, 何海军, 赵松涛, 等. 黑龙江玉米大斑病菌生理分化研究 [J]. 玉米科学, 2010, 18(1): 128-130.)
- [9] Thakur R P, Leonard K J, Leath S. Effects of Temperature and Light on Virulence of *Exserohilum turcicum* on Corn [J]. Phytopathology, 1989, 79(6): 631-635.
- [10] GAO Zeng-gui, ZHAO Hui, ZHANG Xiao-fei, et al. Resistance Identification of the Majority Maize Cultivars to Physiological Races of *Exserohilum turcicum* in Liaoning Province [J]. Seed, 2010, 29(2): 1-3. (高增贵, 赵辉, 张小飞, 等. 辽宁省部分主栽玉米品种对大斑病菌不同生理小种的抗性 [J]. 种子, 2010, 29(2): 1-3.)
- [11] Leonard K J, Levy Y, Smith D R. Proposed Nomenclature for Pathogenic Races of *Exserohilum turcicum* on Corn [J]. Plant Disease, 1989, 73(9): 776-777.
- [12] LIU Guo-sheng, DONG Jin-gao, DENG Fu-you, et al. Preliminary Study on Physiologic Speciafication and New Nomenclature for *Exserohilum turcicum* of Corn in China [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1996, 26(4): 305-310. (刘国胜, 董金皋, 邓福友, 等. 中国玉米大斑病菌生理分化及新命名法的初步研究 [J]. 植物病理学报, 1996, 26(4): 305-310.)

(责任编辑: 单 凝)