

文章编号: 1005-0906(2005)03-0114-03

四川玉米纹枯病菌致病性研究

严吉明, 叶华智, 郑 达, 秦 芸, 伍光庆

(四川农业大学植保系, 四川 雅安 625014)

摘要: 从四川不同生态区采集玉米纹枯病(*Rhizoctonia* spp.)症状的玉米叶鞘,经分离、鉴定,选取 16 个立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)AG1-IA 的菌株和 2 个玉蜀黍丝核菌(*Rhizoctonia zeae*)菌株作为供试菌。在玉米成株期用 PDA 菌丝圆片定位接种于玉米叶鞘内侧,测定供试菌株在玉米植株上的垂直扩展情况(病斑高度、日均扩展速度),区分病菌的致病性。还研究了 AG1-IA 不同致病性菌株体外产纤维素酶和果胶酶活性与致病性的关系。结果表明:分属于两个种的 18 个供试菌株均能侵染玉米,在潜育期上没有差异;病斑高度和病斑日均扩展速度能很好反映出菌株间致病性的差异,*R. solani* AG1-IA 菌株间的致病性有明显差异,*R. zeae* 菌的致病性显著低于 *R. solani* AG1-IA 菌株,体外产果胶酶和纤维素酶的活性大小与致病性有关。

关键词: 玉米;纹枯病;纹枯病菌;致病性;果胶酶;纤维素酶

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

Studies on Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG1-IA and *R. zeae* on Maize in Sichuan

YAN Ji-ming, YE Hua-zhi, ZHENG Da, et al.

(Department of Plant Protection Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: *Rhizoctonia*-diseased specimens were collected from maize plants in different geographic regions in Sichuan. Sixteen *R. solani* AG1-IA isolates and two *R. zeae* isolates were obtained by tissue isolation and species identification, and were inoculated to determine the pathogenicity, using the leaf sheath inoculation method with 5mm discs of pure culture of each isolate in PDA. Lesion length and incubation period were measured. Analysis of data was performed by using DPS(Data Processing System) computer program. The results showed that the incubation period of all tested isolates was similar in 36 hr. All isolates were pathogenic to maize. The lesion height and spreading rate were significantly different among the isolates. There was considerable variation in pathogenicity among tested isolates on maize. The activities of pectinase(PG、PMG) and cellulase markedly increased with increasing pathogenicity of the isolate. It suggested that the activities of cell wall degrading enzymes(CWDE) were may related to pathogenicity.

Key words: Corn; Sheath blight of corn; *Rhizoctonia solani*; Pathogenicity; Pectinase; Cellulase

玉米纹枯病可由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、玉蜀黍丝核菌(*Rhizoctonia zeae*)和双核丝核菌(*Binucleate Rhizoctonia*)引起,主要种群是立枯丝核菌中的融合群 AG1-IA。研究和了解病原物致病性分化和致病性与病菌产细胞壁降解酶的关系,在病原学研究和抗性鉴定与抗病育种等方面具有重要意义。

植物病原物的致病性分化受地理环境、品种、耕作栽培等因素的影响。四川生态条件多样,玉米种植面积大,纹枯病发生重,而对纹枯病菌主要种群 *R. solani* AG1-IA 的致病性分化等方面尚缺乏研究。本研究的目的:(1)测定来源于四川不同生态区的玉米纹枯病菌 *R. solani* AG1-IA 菌株和 *R. zeae* 的致病性,以了解致病性的分化。(2)研究 *R. solani* AG1-IA 中不同致病性菌株产生纤维素酶和果胶酶能力与致病性是否有关联。

1 材料与方法

1.1 供试材料

收稿日期: 2005-02-01

作者简介: 严吉明(1971-),男,四川资中人,助理研究员,硕士,主要从事植物病理学、植物抗病性研究。

Tel:0835-2882175 13608261955

E-mail:Jimingyan@126.com

叶华智为本文通讯作者。Tel:0835-2882734

E-mail:yhz@sicau.edu.cn

供试玉米品种为川单 10。选用无病地,采用宽窄行(行长 500 cm,宽行距 90 cm,窄行距 50 cm,穴距 50 cm,每穴 2 株)种植,常规田间管理。

1.2 供试菌株

从原四川的川东、川南、川西、川北不同生态区采集受玉米纹枯病危害的玉米叶鞘,进行组织分离,获得分离物并按照丝核菌属分类标准进行种类与融合群鉴定。然后选取 16 个 *R. solani* AG1-IA 的菌株和 2 个玉蜀黍丝核菌(*R. zeae*)菌株测定致病性。

1.3 致病性测定

(1)采用菌丝圆片作为接种体。将供试菌株分别接种在 PDA 平板培养基上,在 28℃下培养 76 h,用打孔器从菌落边缘切取菌丝圆片(5 mm 直径)用于接种。

(2)采用成株接种测定。在玉米抽雄初期分别将供试菌株的菌丝圆片定位接种于主穗位下第 5 叶鞘内侧,每菌株接种 10 株。重复 1 次,设置无菌丝圆片作对照。植株接种后观察记载病害症状的初始期,待病害扩展基本稳定后测定病斑在植株上的高度。计算各菌株的潜育期和日均垂直扩展速度,数据采用 DPS(Data Processing System)数据处理软件对各菌株的病斑高度和日均扩展速度进行统计分析。

1.4 菌株产细胞壁降解酶的测定

1.4.1 供试菌株

在进行致病性测定的基础上,选取致病性强(YC2)、中(YX)、弱(BF)不同的菌株作产细胞壁降解酶能力测定。

1.4.2 菌株的产酶培养

采用液体培养,在基础培养基(KNO₃ 30 g、KH₂PO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、FeSO₄·dH₂O 1 000

mL)中添加 1%果胶(柑橘果胶,Sigma 产品)作为产果胶酶诱导培养基;添加 1%羧甲基纤维素 (Sigma 产品)作为产纤维素酶诱导培养基。在 250 mL 三角瓶中,装入 100 mL 培养液分别定量接种供试菌株的菌丝圆片,在 28℃下静止培养 6 d。采用离心和过滤(0.45 μ 滤膜)除去菌丝,上清液即为粗酶液,供酶活测定。

1.4.3 酶活测定

(1)纤维素酶活性测定。以 1%羧甲基纤维素钠(Sigma)为底物,反应混合液为:2 mL 粗酶液+1 mL 底物+2 mL 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液(pH5.0),40℃下反应 30 min,取反应液 1 mL 与二硝基水杨酸试剂(DNS)反应,用 751G 分光光度计在 520 nm 波长下测定 OD 值,根据葡萄糖标准曲线计算生成的还原糖,对照用煮沸杀死的酶液做同样处理。以上述反应条件下每分钟产生相当于 1 μmol 葡萄糖所需酶量为一个酶活单位。

(2)果胶酶活性测定。以柑橘果胶(Sigma)为底物,测定聚半乳糖醛酸甲酯酶(PMG);以果胶酸钠(Sigma)为底物,测定聚半乳糖醛酸酶(PG)。反应混合液为:2 mL 粗酶液+1 mL1%底物液+2 mL 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液(pH5.0),40℃下反应 15 min,取 1 mL 反应液与 DNS 试剂反应,用 751G 分光光度计在 520 nm 波长下测定反应生成的还原物质,对照以钝化酶液做同样处理,用 D-半乳糖醛酸(Sigma)作标准曲线。以上述反应条件下每分钟释放出相当于 1 μmol 半乳糖醛酸的还原物质为一个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 玉米纹枯病菌的致病性

表 1 供试菌株接种玉米叶鞘后的病斑高度

菌株编号	地理来源	潜育期(h)	病斑平均高度(cm/42d)	平均日扩展速度(cm/d)	种 类
YC2	雅安草坝	36	81.5 a	1.9 a	<i>R. s.</i> AG1-IA
YC1	雅安草坝	36	78.0 ab	1.9 a	<i>R. s.</i> AG1-IA
BY	宝兴硃碛	36	76.0 ab	1.8 ab	<i>R. s.</i> AG1-IA
YDv	雅安对岩	36	75.5 ab	1.8 ab	<i>R. s.</i> AG1-IA
YN	雅安南郊	36	73.5 ab	1.8 ab	<i>R. s.</i> AG1-IA
NH1	南充辉景	36	68.5 abc	1.6 abc	<i>R. s.</i> AG1-IA
LJ1	乐山夹江	36	67.0 abc	1.6 abc	<i>R. s.</i> AG1-IA
MB	绵阳北川	36	66.0 abc	1.6 abc	<i>R. s.</i> AG1-IA
NH2	南充辉景	36	62.5 bcd	1.5 abcd	<i>R. s.</i> AG1-IA
YB1	雅安北郊	36	56.5 cd	1.3 bcd	<i>R. s.</i> AG1-IA
YX	雅安西郊	36	54.0 cd	1.3 bcd	<i>R. s.</i> AG1-IA
NH3	南充辉景	36	52.0 cde	1.2 bede	<i>R. s.</i> AG1-IA
YD6	雅安多营	36	46.0 de	1.1 cde	<i>R. s.</i> AG1-IA
LJ2	乐山夹江	36	36.0 ef	0.9 def	<i>R. s.</i> AG1-IA
CB1	重庆北碚	36	36.0 ef	0.9 def	<i>R. s.</i> AG1-IA
BF	宝兴蜂桶寨	36	25.5 fg	0.6 efg	<i>R. s.</i> AG1-IA
YB2	雅安北郊	36	13.4 gh	0.3 fg	<i>R. zeae</i>
CB2	重庆北碚	36	5.0 h	0.1 g	<i>R. zeae</i>

注:在纵列上同一字母表示没有显著差异(P=0.05)。

分属于 *R. solani* AG1-IA 和 *R. zeae* 的 18 个供试菌株对川单 10 玉米都能致病, 潜育期均为 36 h, 但各菌株在玉米上的扩展高度(病斑高度)和日均扩展速度有明显不同(表 1), 表现出致病性有差异。在 *R. solani* AG1-IA 的 16 个菌株中, 分离自雅安草坝的 YC2 菌株在玉米上的病斑高度最大为 81.5 cm, 日均扩展速度为 1.9 cm, 致病性最强。而来自宝兴蜂桶寨的 BF 菌株的病斑高度为 25.5 cm, 日均扩展速度为 0.6 cm, 比 YC2 菌株低 3.2 倍, 其致病性最低。两个玉蜀黍丝核菌菌株在玉米上的病斑高度明显低于所有立枯丝核菌 AG1-IA 菌株。表明它们的致病性比 *R. solani* AG1-IA 低, 而且 *R. zeae* 菌株之间的病斑高度也有明显差异。

2.2 玉米纹枯病菌产细胞壁降解酶的活性与致病性的可能关系

致病性强弱不同的 3 个立枯丝核菌菌株, 在体外产纤维素酶和 2 种果胶酶的活性存在较大差异(表 2)。表现出产酶活性随致病性增强而升高, 致病性强的菌株产 3 种细胞壁降解酶的活性较弱的菌株高 2~3 倍。初步表明玉米纹枯病菌 AG1-IA 的致病性与产细胞壁降解酶活性存在着一定联系。

表 2 不同致病性菌株体外产细胞壁降解酶活性比较

菌株编号	致病性	果胶酶活性		纤维素酶活性
		PG	PMG	Cx
YC2	强	113.0	88.0	35.1
YX	中强	82.1	50.2	20.5
BF	弱	30.4	36.7	16.3

注:酶活以酶活单位/1 mL 培养液表示。

3 结论与讨论

植物病原物普遍存在着致病性的分化, 研究病原物的致病性分化在研究病原物种群组成、抗性鉴定、抗病育种和品种合理布局等方面均有重要意义。对四川 *R. solani* AG1-IA 菌株的研究结果表明, 立枯丝核菌 AG1-IA 菌株间均存在致病性的差异, 这一结果与前人结果相一致。差异表现为病菌在玉米茎上扩展的高度即病斑高度和扩展速度上的差异,

这种差异是数量上的差异, 而且成连续分布, 难以定出一个界限, 只能相对粗略分出强弱的差异。这一结果还表明, 供试的玉蜀黍丝核菌(*R. zeae*)较立枯丝核菌(*R. solani*)AG1-IA 的致病性弱。因此, 在进行抗性鉴定选用菌株时应注意到菌株致病性的差异, 选用致病性强的菌株。

国外对纹枯病菌在水稻和玉米成株期的致病性测定中, 通常是在测量病斑高度和株高后, 计算相对病斑高度(病斑高/株高)来表示致病性大小。我们认为, 由于纹枯病菌在玉米植株上的扩展主要是呈现垂直扩展, 用病斑高度和日均扩展速度就能很好区分致病性差异, 不必计算相对病斑高度。而在进行玉米材料的抗病性鉴定时, 用相对病斑高度更好。

参考文献:

[1] 高卫东. 华北玉米、高粱、谷子纹枯病病原学的初步研究[J]. 植物病理学报, 1987, 17(4): 247-251.

[2] 秦芸, 叶华智, 张敏, 等. 四川雅安山区玉米纹枯病菌的种群组成, 《面向 21 世纪的植物保护发展战略》[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001. 702-704.

[3] White D G. Compendium of Corn Disease, 3rd edition, APS press, 1999.

[4] 唐朝荣, 纪明山, 陈捷, 等. 辽宁省玉米纹枯病病原菌的研究初报[J]. 辽宁农业科学, 1998, (1): 42-45.

[5] 陈厚德, 梁继农, 朱华. 江苏玉米纹枯菌的菌丝融合群及致病力[J]. 植物病理学报, 1996, 26(2): 138-138.

[6] 唐海涛, 荣廷昭, 杨俊品. 玉米纹枯病研究进展[J]. 玉米科学, 2004, 12(1): 90-92.

[7] 赵福顺. 唐山市 2002 年夏玉米纹枯病发生与减产原因的分析[J]. 玉米科学, 2004, 12(增刊): 108-110.

[8] Parmeter Jr J R, Sherwood R T, Platt W D. Anastomosis grouping among isolates of *thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, 1969, 59: 1270-1278.

[9] Pascual C B, Toda T, Raymodo A D, et al. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology*, 2000, 49: 108-118.

[10] Vidhyasekaran P, Ponmalar T R, Samiyappan R, et al. Host-specific toxin production by *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Phytopathology*, 1997, 87: 1258-1263.