

文章编号: 1005-0906(2007)06-0111-03

玉米丝黑穗病侵染率与发病率 关系的 PCR 检测分析

邢跃先, 檀国庆, 李晓辉, 郝文媛, 吴凤新, 王玉贞, 蔡鑫茹

(吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘要: 用 2 个感病的玉米材料接种玉米丝黑穗病菌, 苗期调查侵染率, 开花期调查发病率, 结果表明侵染率显著高于发病率; 在开花期提取未发病植株茎髓组织 DNA 进行 PCR 检测, 结果检测到玉米丝黑穗病菌 DNA 的存在。因此, 通常情况下玉米丝黑穗病侵染率大于发病率。

关键词: PCR; 玉米; 丝黑穗病; 侵染率; 发病率

中图分类号: S435.131.4

文献标识码: A

Study on the Relationship Between Infection Rate and Disease Incidence of Maize Head Smut by PCR

XING Yue-xian, TAN Guo-qing, LI Xiao-hui, et al.

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: By choosing two disease varieties of corn and inoculating spore of maize head smut when planting, and investigating infection rate at seedling stage and disease incidence at blooming stage, we got the result that the infection rate was much higher than the rate of disease. At the same time, we inspected the DNA of healthy plant at blooming stage by PCR, and found the DNA of maize head smut germ. We could draw a conclusion that the infection rate was usually higher than the disease incidence. In the other words, the plant of corn could be healthy even though infected by maize head smut germ.

Key words: PCR; Maize; Head smut; Infection rate; Disease incidence

玉米丝黑穗病是春玉米产区的严重病害之一, 近年来危害尤为严重, 越来越受到普遍关注。关于玉米丝黑穗病研究的报道较多, 如发病条件、发生原因、防治措施和基因定位等。多数研究认为, 玉米被丝黑穗病菌侵染后都会表现发病。然而多年调查研究发现, 同一品种不同年际间、同一品种不同地域间甚至同一品种相邻地块间发病情况存在较大差异。由此提出了玉米丝黑穗病“带菌者”假设, 并设计试验进行验证。

1 材料与方法

收稿日期: 2006-11-14

作者简介: 邢跃先(1974-), 男, 助理研究员, 硕士研究生, 从事玉米遗传育种研究工作。Tel: 0434-6156954

E-mail: xingyuexianzy@163.com

檀国庆为本文通讯作者。

1.1 材料准备

(1) 配制菌土。取土样过筛后与玉米丝黑穗菌粉以质量比 500:1 混匀(浓度 0.2%), 备用。

(2) 播种和接种。取感病自交系黄早四、感病杂交种吉单 209 各 400 粒, 在吉林省农科院玉米所试验地(公主岭)于 4 月 25 日播种, 每穴 4 粒, 种子上覆盖菌土约 2 cm 厚。

(3) 定苗和取样。待苗出齐后每穴留 2 株, 每个品种(系)100 穴, 共 200 株。当幼苗长至 6~7 叶时, 每穴拔走一株提取生长点 DNA 进行 PCR 检测, 得到侵染率, 开花期调查发病率, 比较二者有无差别(间接验证); 取未发病植株茎髓组织, 提取 DNA 进行 PCR 检测, 看其是否携带玉米丝黑穗病菌(直接验证)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取方法(CTAB 法)

取 0.3 g 样品于液氮中充分研磨后, 迅速加入到

65℃浴热的(6 mL CTAB,5 μL 2- 巯基乙醇)混合液中约 1 h,并不断轻摇混匀,取出后冷却至室温;加入 15 μL RNaseA,37℃放置 1 h,加入 1.5 mL 三氯甲烷、异戊醇混合液(24:1),充分混匀后,在 12 000 r/min 离心 5 min 至分相,将上清液转移至离心管;加 1.8 mL 异丙醇及 180 μL 乙酸钠溶液后轻轻摇匀,于 4℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;加 300 μL 70%乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,除去残留乙醇,待沉淀(DNA)干燥后,将其溶解于 100 μL TE 缓冲液中,置于 -20℃备用。

1.2.2 PCR 检测

(1)引物序列。所用引物 PS1 的序列左端为 5′-CAGGTTATGTATGGGCCG-3′,右端为 5′-TGAGC-GATGACCATTC-3′。

(2)扩增体系和程序。PCR 反应体积为 25 μL,其中 Loading Buffer 加 2.5 μL,dNTP(10 mM)加 0.5 μL,Taq 酶加 0.5 μL,引物加 1 μL,加 1 μL 样品 DNA(浓度为 100 ng/μL),加水 18.5 μL。

PCR 反应程序:94℃ 4 min,56℃ 1 min,72℃ 2 min,1 个循环,94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 2 min,36 个循环,72℃ 5 min,4℃保温。

(3)琼脂糖凝胶电泳。称取适量琼脂糖与 TAE 溶液配制 1.5%凝胶,加少量 EB,待胶凝固后加入 PCR 产物,上样 10 μL,并设分子量 Marker。

2 结果与分析

2.1 间接验证结果

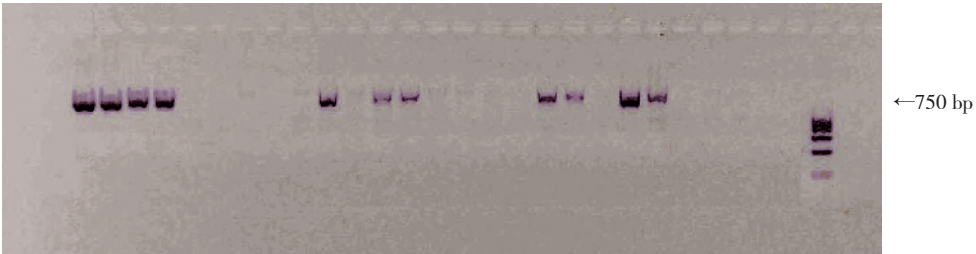
实验过程中要尽可能保持自然环境基本一致,因为提取 DNA 破坏植株生长,所以不能用原植株观察发病率,得到的结果只能作为间接证据(表 1)。从表 1 可以看出,无论是感病的杂交种还是自交系,玉米丝黑穗病的发病率与侵染率之间存在较大差异。

表 1 侵染率与发病率比较		
Table 1	Comparison between Infection Rate and Disease Incidence	%
品 种	侵染率	发病率
Variety	Infection Rate	Disease Incidence
吉单 209	88	60
黄早四	92	64

2.2 直接验证结果

从未发病植株茎髓中提取 DNA,检测有无玉米丝黑穗病菌 DNA 存在,可以直接证明“带菌者”的存在。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,在成像仪上检测结果见图 1 和表 2。从表 2 可以得出,确实存在被玉米丝黑穗病菌侵染而不表现发病的玉米植株。

表 2 琼脂糖凝胶电泳结果统计		
Table 2	The Results of Metaphor gel	株
品 种	被测样本个数	阳性样本个数
Variety	Total of Tested Sample	Total of Positive Sample
黄早四	11	3
吉单 209	10	4



注:1 为玉米丝黑穗病菌 DNA,2~4 为发病植株茎髓组织 DNA,5 为阴性对照,6~16 为黄早四未发病植株茎髓组织 DNA,17~26 为吉单 209 未发病植株茎髓组织 DNA,27 为水(CK),28 为分子量 Marker。
Note: 1 means the DNA of maize head smut fungus; 2-4 mean the DNA of disease incidence pulp plant stems organizations; 5 means negative control; 6-16 mean the DNA of Huangzao4 no disease incidence pulp plant stems organizations; 17-26 mean the DNA of Jidan209 no disease incidence pulp plant stems organizations; 27 means water contrast; 28 means molecular weight Marker.

图 1 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.1 Bands Pattern of Metaphor gel

3 结论与讨论

通过提取玉米幼苗生长点 DNA 及开花期末发病植株茎髓组织 DNA 并进行 PCR 检测,发现玉米丝黑穗病菌 DNA 的存在。由此可以得出结论:通常情况下,玉米丝黑穗病侵染率大于发病率,即存在被玉米丝黑穗病菌侵染而不发病的植株。

玉米丝黑穗病是较为复杂的病害,目前对它的发病机制了解还不是很透彻。针对玉米品种的抗性而言,尚无绝对免疫的品种,抗与不抗是相对的概念。虽然证实了玉米丝黑穗病菌携带者的存在,但究竟是什么原因促使玉米植株由带菌者向发病株转变这个问题有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 李宝英,郑铁军,郭玉莲. 玉米丝黑穗病发病条件的研究[J]. 玉米科学,2005,13(4):121-123.
- [2] 吴新兰,庞志超,田立民,等. 玉米丝黑穗病菌侵染条件与栽培措施的研究[J]. 植物保护学报,1981(1):41-46.
- [3] 刘惕若,薛国兴. 玉米丝黑穗病的防治研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,1982(1):41-48.
- [4] 赵晋锋,等. 玉米丝黑穗病的发生与防治及对抗病育种的一些探讨[J]. 山西农业科学,2003,23(2):117.
- [5] 李中青,等. 玉米丝黑穗病发生原因及防治对策[J]. 山西农业科学,2003(3):70-72.
- [6] Xu M L, et al. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays[J]. Plant Disease, 1999,83(4): 390-395.
- [7] 白金凯,等. 玉米病害的病菌变异与抗病品种选育[J]. 玉米科学,1994(2):67-72.
- [8] 李兴红,等. 玉米苗期对丝黑穗病抗性机制初探[J]. 河北农业大学学报,1995,18(4):39-43.
- [9] 董怀玉,等. 辽宁省玉米丝黑穗病发生原因分析及防治建议[J]. 辽宁农业科学,2003(2):39-40.
- [10] 康绍兰,等. 玉米丝黑穗病菌冬孢子生物学特性的研究[J]. 河北农业大学学报,1995,18(3):57-60.
- [11] 王振华,等. 玉米丝黑穗病的研究进展[J]. 玉米科学,2002(4):61-64.
- [12] 马秉元,等. 玉米对丝黑穗病的抗性与遗传初步研究[J]. 中国农业科学,1983(4):12-17.
- [13] 贺字典,等. 玉米丝黑穗病及病菌生理分化研究进展[J]. 玉米科学,2005,13(4):117-120,131.
- [14] 贾菊生,等. 玉米丝黑穗病菌冬孢子萌发条件的研究[J]. 植物保护学报,1990,17(2):109.
- [15] 李启辉. 玉米丝黑穗病的发生规律与防治对策[J]. 杂粮作物,2004,24(6):353.
- [16] 王明泉. 玉米丝黑穗病的发生和防治方法[J]. 黑龙江农业科学,2004(3):47-48.
- [17] 吕国忠,等. 我国玉米病害发生现状及防治措施[J]. 植物保护,1997,23(4):20-21.

(责任编辑:张 英)