

罗凯,黎青,杨成龙,等. 薏苡黑穗病田间发病形态观察及抗性鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(20):126-128.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.20.028

薏苡黑穗病田间发病形态观察及抗性鉴定

罗凯¹,黎青¹,杨成龙¹,王健¹,班秀芝¹,袁圆²

(1. 贵州省农业科学院亚热带作物研究所,贵州兴义 562400; 2. 贵州省农业科学辣椒研究所,贵州贵阳 550009)

摘要:薏苡(*Coix lacryma-jobi* L.)黑穗病是薏苡主产区主要病害之一,对其产量和品质造成严重的影响。采用田间人工接菌,通过对不同产地薏苡资源发病形态观察和植物体内酶活性变化规律的研究,分析薏苡资源的农艺性状与抗黑穗病的关联性。结果表明,薏苡黑穗病潜伏期较长,发病的早期在分蘖期,并在叶片上产生瘤状凸起,病原菌通过植株维管束转移至植株生长点,最终在籽粒部位发病并表现出明显性状;通过田间鉴定对7份资源进行抗性分级,野生薏苡的抗病性明显优于栽培薏苡,广西Y51对薏苡黑穗病的抗性较差;接菌处理超氧化物歧化酶(SOD)活性表现为先上升后下降趋势,48 h后呈快速下降趋势,最终SOD活性显著低于对照未接种组,为选育抗黑穗病的新品种提供了依据。

关键词:薏苡黑穗病;SOD活性;人工接菌;农艺性状;抗性鉴定

中图分类号: S435.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)20-0126-03

薏苡(*Coix lacryma-jobi* L.)为一年生或多年生药食兼用草本植物,被称为“禾本科之王”,其种植面积逐年增加^[1-2]。但在我国薏苡主产区区内薏苡黑穗病为主要病害,对其产量和品质造成严重的影响^[3-4]。薏苡黑粉病菌(*Ustilago coicis* Brefeld)属担子菌亚门黑粉菌目黑粉菌科,会引起薏苡的真菌性病害^[5],黑粉菌目可对薏苡、玉米、甘蔗、谷子等作物造成严重的经济损失^[6-11]。薏苡主产区栽培品种单一,主要以农家自留种为主,加上病原菌易产生变异,导致原有抗性品种抗病性丧失,对生产造成了严重的损失,致使薏苡产量减少30%~50%,最高可造成80%的减产^[11]。

目前对薏苡黑穗病的研究主要集中在对病原菌生物学特性^[12]、发生条件^[11]及防治工作^[5]等方面,而对田间形态的系统性观察以及该病害的早期鉴定缺乏系统性研究。通过研究发掘优良抗性材料,并利用远缘杂交使优良性状得到聚合,以丰富薏苡抗性材料的多样性极其重要。本研究通过常规田间方法对不同产地薏苡资源进行抗病性鉴定并探寻薏苡黑穗病早期发病的时期以及田间发病形态表现与室内生理变化的关联性,以期防治黑穗病以及抗薏苡黑穗病新品种的选育提供理论参考。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 薏苡种质 7种供试薏苡种质均由贵州省农业科学院亚热带作物研究所保存,详见表1。

表1 供试薏苡种质

品种	种子颜色	种质类别	产地
兴仁小白壳	白	栽培种	贵州
Y51	白	栽培种	广西
Y251	黑	野生种	云南
Y33	黑	野生种	贵州
Y166	黑	栽培种	云南
Y19	白	栽培种	贵州
Y146	花	野生种	四川

1.1.2 菌种 薏苡黑粉病菌粉由贵州省农业科学院亚热带作物研究所研究人员从贵州省兴仁县采集并保存。

1.2 试验方法

1.2.1 田间接菌方法 在播种前1 d采用黑穗病菌粉拌种,每100 g种子接种0.5 g,每小区5 m²穴播,设3次重复,用100 g菌土(含0.5%黑穗病粉)严密覆盖,保持一定的湿度,按正常田间管理,待病株症状明显后统计发病率,第2年用0.8%菌土复鉴,根据2年的发病百分率确定抗黑穗病级别,抗性级分标准参考李戈等的评鉴方法^[13]:植株发病率0为免疫(IM);发病率1%~20%为高抗(HR);发病率>20%~40%为中抗(MR);发病率40%以上为感病(S)。

1.2.2 调查方法 于抽雄开花时测量株高、分蘖数、主茎粗并统计单株发病率,籽粒成熟时统计单株穗粒数。

1.2.3 超氧化物歧化酶(SOD)的测定 选高感薏苡种子Y51温汤浸种20 s后置于培养皿中,加滤纸保湿,于25℃条件下黑暗培养,待种子胚芽萌出并伸长至1 cm时进行接种,接种量同田间试验(0.5 g)。取样时间为接种后0、12、24、36、48、72 h,共6次,以不接种的为对照。

SOD活性的测定方法:在盛有3 mL反应混合液[在54 mL 0.014 5 mol/L DL-甲硫氨酸中加入用0.05 mol/L pH值为7.8的磷酸缓冲液配制的3 μmol/L乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid,简称EDTA),2.25 mmol/L NBT(氮蓝四唑)和60 μmol/L核黄素各2 mL,各溶液均在用前配制,避光放置]的试管中,加入SOD粗酶液,混合后照光

收稿日期:2018-07-06

基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合LH字[2014]7709、黔科合LH字[2014]7683号);贵州省亚热带作物科技创新人才基地(编号:黔人领发[2016]22号)。

作者简介:罗凯(1989—),男,贵州贵阳人,农艺师,主要从事抗病薏苡新品种选育方面的工作。E-mail:sky_lkai@sina.com。

通信作者:杨成龙,博士,副研究员,主要从事基因工程与生物技术研究。E-mail:yangchenglong208@163.com。

10 min,迅速测定 $D_{560\text{ nm}}$ 值,以不加酶液的照光试管为对照。

1.3 数据统计与分析

用 DPS 8.01 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 薏苡黑穗病的田间发病形态观察

薏苡黑穗病为系统性全株侵染病害,种子表面所携带的冬孢子在种子萌发过程由中上胚轴侵入,随着植株的生长在植株体内扩展后在籽粒中产生大量孢子^[13]。由图1看出,薏

苡植株受黑粉菌侵染后,苗期无明显的病斑;薏苡植株到分蘖期后在叶片上出现淡绿色或紫红色(图1-1、图1-2)的瘤状凸起,剥开后可见黑褐色的厚垣孢子粉;薏苡黑穗病在薏苡抽穗初期就表现出明显的症状,由图1-3可看出,出现畸形淡红色穗粒,受害子房膨大并呈近圆形,顶端稍尖细,随着植株生长,厚垣孢子粉由内向外溢出(图1-4),在籽粒的外部形成1层黑褐色的孢子粉,最后部分破裂散落大量的孢子粉(图1-5)。薏苡黑穗病潜伏期较长,且在叶片与穗部都可形成黑粉包,病株多不结实而成菌瘿。



1—黑穗病感染薏苡初期; 2—黑穗病感染薏苡严重期; 3—黑穗病感染薏苡穗分化初期; 4—黑穗病感染薏苡雌穗后期; 5—黑穗病感染薏苡雌穗后期散落

图1 薏苡黑穗病的田间形态观察

2.2 薏苡种植资源的田间抗病性鉴定

对7份不同产地的薏苡连续2年的发病株进行统计,表2的统计结果表明,广西品种Y51的单株发病率分别为92.48%、94.44%,发病率最高,抗病等级为感病(S);贵州野生薏苡(Y33)的单株发病率分别为2.41%、4.80%,发病率最

低,抗病等级为高抗(HR);贵州主栽品种兴仁小白壳的单株发病率分别为29.97%、35.19%,抗病等级为中抗(MR);贵州晴隆县糯性Y19的单株发病率分别为59.03%、73.18%,抗病等级为感病(S);其他产地薏苡的抗病等级均表现为高抗(HR)。

表2 不同品种(系)薏苡的发病率及抗性等级

品种	第1年单株发病率(%)				第2年单株发病率(%)				抗病性等级
	I	II	III	平均	I	II	III	平均	
兴仁小白壳(白)	30.1	27.67	32.23	29.97bB	36.78	33.20	35.60	35.19cC	MR
Y51(白)	93.33	96.91	87.21	92.48aA	94.20	97.65	91.47	94.44aA	S
Y251野(白)	15.01	13.20	10.60	12.93cC	7.60	8.25	10.63	8.23eE	HR
Y33野(黑)	2.28	3.25	1.72	2.41eE	3.92	4.78	5.69	4.80fE	HR
Y166(黑)	10.34	9.40	15.61	11.78dD	17.21	19.28	20.86	19.12dD	HR
Y19(糯白)	55.88	61.46	59.75	59.03bB	77.69	69.54	72.31	73.18bB	S
Y146野(花)	9.76	10.26	8.62	9.55dDE	10.23	9.54	11.38	10.38eE	HR

注:同列数据后不同大、小写字母表示在0.01、0.05水平上差异显著,下表同。

差异显著性分析结果表明,第1年单株发病率最高的广西品种薏苡Y51与其他处理间的差异均达到极显著水平;贵州兴仁小白壳与晴隆县糯性薏苡Y19两者间差异不显著,但两者与其他处理达极显著差异;贵州野生种Y33除与四川野生薏苡Y146在0.05水平上有显著差异外,与其他处理间差异达极显著水平;云南薏苡Y166与野生薏苡Y251、四川野生薏苡Y146三者间差异不显著。第2年复鉴差异显著分析表明,单株发病率以广西薏苡Y51最高,均与其他处理间达显著差异水平;贵州晴隆糯性薏苡Y51与贵州兴仁小白壳间达极显著差异水平;云南薏苡Y166与其他处理间差异极显著;野生薏苡三者间差异不显著。说明野生薏苡较其他处理对黑穗病表现出较好的抗性,另外复鉴单株发病率均较第1年有增加趋势,这可能与冬孢子在土壤中越冬后再侵染植株的过程有关,但须进行相关研究验证。

2.3 薏苡资源田间生长性状的分析

由表3可知,平均株高以Y19最高,为207.03 cm, Y51最矮,为86.90 cm; Y51平均分蘖数最多,为12.67个,具较强分蘖性,兴仁小白壳以4.67个表现为分蘖性最差;主茎粗以野

生种Y33最粗,为2.27 cm, Y51主茎粗最细,为0.30 cm; 平均单株穗粒数以Y166最多,达230.2粒,最少的为Y251,平均单株穗粒数为114.4粒。

差异显著性分析结果表明,兴仁小白壳、Y19糯性薏苡与黑穗病发病率最高的Y51三者间株高达极显著差异,且与其他处理间差异均达到极显著水平;野生种Y33与Y166株高差异不显著,二者与Y251在0.05水平上有显著差异;分蘖数Y51与Y146差异不显著,均与兴仁小白壳、Y251、Y166、Y19糯性达极显著差异,与Y33无显著差异;主茎粗Y146、Y251二者间差异不显著,但与其他各处理均达到极显著差异。由田间生产性状可知,栽培薏苡与野生薏苡在株高、分蘖数、穗粒数上无明显规律性,而主茎粗方差分析结果表明,其与抗病性存在显著差异,这是由所选取供试材料的田间生长性状差异所造成的,与植株抗病性并无关联性。

2.4 薏苡黑穗病菌接种后植株体内SOD活性的动态变化规律

超氧化物歧化酶的生理作用是歧化 O_2^- 产生 H_2O_2 和 O_2 ,作为植物细胞内防御酶系统中的重要成员,其变化规律

表3 不同薏苡品种(系)的田间生长特性

品种	株高 (cm)	分蘖数 (个)	主茎粗 (cm)	平均穗粒数 (粒)
兴仁小白壳(白)	180.43bB	4.67eE	1.26dD	217.8
Y51(白)	86.90dD	12.67aA	0.30fF	152.2
Y251野(白)	152.47cC	8.00cdCD	2.03bB	114.4
Y33野(黑)	169.93bBC	11.33abAB	2.27aA	174.1
Y166(黑)	172.53bBC	9.67bcBC	1.52cC	230.2
Y19(糯白)	207.03aA	6.00deDE	1.06eE	170.4
Y146野(花)	171.70bBC	12.67aA	1.96bB	167.8

可作为植物与病原菌互作过程的重要参考依据^[14]。由图2可知,薏苡种子胚芽轴未接种处理的SOD活性在0~24 h呈先升高后降低的趋势,24~72 h随着胚芽轴生长呈持续上升趋势;接种处理的SOD活性在0~36 h呈上升趋势,36~48 h呈略微下降趋势,48 h后呈快速下降趋势,最终SOD活性明显低于对照未接种组。可以看出,在接种前期未接种处理的SOD活性高于接种处理,24 h后酶活性呈上升趋势,推测此时病菌菌丝开始接触寄主,36~48 h成功侵入寄主完成侵染的过程,这与黄思良等报道的接种2 d后在薏苡胚芽鞘的横向切片中证实病菌侵入寄主的研究结果^[12]相吻合。

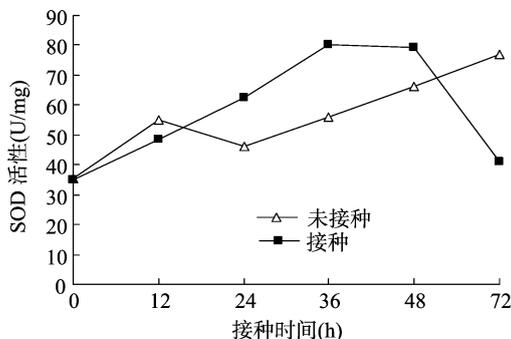


图2 植株体内SOD的动态变化规律

3 结论与讨论

薏苡黑穗病是一种系统性侵染病害,病菌侵染主要集中在种子发芽至不完全叶抽出前的幼苗期,病菌主要从嫩胚芽鞘表皮细胞的凹陷部分形成并在该部位侵入,侵染寄主后的菌丝朝维管束方向扩展^[12],随后转移至生长点,在植株中潜伏一定时间后先在分蘖期薏苡叶片上形成少数淡绿色或多数紫红色的瘤状凸起,在穗分化初期将表现出明显症状,最终在薏苡雌蕊、雄蕊中大量增殖,形成散落的黑色孢子的过程。通过对田间不同薏苡资源的抗病性鉴定结果表明,不同产地薏苡资源对黑穗病表现出不同的抗病性,广西Y51表现为高感薏苡黑穗病,其中野生薏苡较栽培薏苡对黑穗病表现出良好的抗性,为选育高抗薏苡黑穗病新材料与优良的基因筛选提供了良好的理论支撑。另外对薏苡田间农艺性状的研究表明,其株高、分蘖数、单株穗粒数与发病率间无明显相关性,与李戈等的研究结果^[13]相吻合。但在研究过程中发现,茎粗指标与黑穗病抗病性间存在一定的关联性,但在生产上实则无关,其原因可能是本试验选用的供试薏苡材料较少而导致统计结果误差,所以应增加抗黑穗病薏苡新材料的鉴定样本。

植物在抵御病原菌侵入的过程中,寄主防御酶发挥了重要的作用,其中SOD是植物体内与抵抗病原微生物侵染有关的重要酶系之一^[14]。近年来的研究发现,植物受到病原菌侵染后,体内会积累大量活性氧(ROS,如 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 等),同时诱导植物产生主动防御反应,产生如SOD、CAT(过氧化氢酶)、POD(过氧化物酶)等酶类,清除细胞内的活性氧^[15]。Montalbini等发现,受烟草普通花叶病毒(tobacco mosaic virus,简称TMV)病害侵染时,叶片组织中SOD活性上升^[16]。本研究结果表明,植株受黑穗病菌侵染后SOD的活性表现为先上升后下降,侵染后植株SOD活性明显高于未接种对照处理,但48 h后SOD活性又低于未接种对照处理,可见植株受病害侵染后 $O_2\cdot^-$ 在细胞积累会促进SOD合成酶基因的表达,SOD活性呈上升趋势,而过多 $O_2\cdot^-$ 的积累可能会造成受害植株体内SOD防御酶体系崩溃,导致酶活性急剧下降。

参考文献:

- [1] 陈成斌,梁云涛,徐志健,等. 广西薏苡种质资源考察报告[J]. 西南农业学报,2008,21(3):792-797.
- [2] 高微微,赵杨景,何春年. 我国薏苡属植物种质资源研究概况[J]. 中草药,2006,37(2):293-295.
- [3] 杨文成,杨红. 薏苡黑穗病研究初报[J]. 植物医生,1997,10(6):35-36.
- [4] 朱立强,刘根节. 薏苡黑穗病的防治[J]. 特种经济动植物,2005(10):39.
- [5] 刘荣,申刚. 薏苡黑穗病拮抗菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):97-100.
- [6] 贺字典,常连生,高玉峰,等. 玉米对丝黑穗病菌抗性影响因子研究[J]. 玉米科学,2009,17(4):127-131.
- [7] 王纶,王星玉,温琪汾. 中国黍稷种质资源抗黑穗病鉴定评价[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(4):497-501.
- [8] 王斌,王召菊. 谷子黑穗病生理小种研究初报[J]. 中国农学通报,2009,25(10):191-196.
- [9] 温琪汾,刘润堂,王纶,等. 抗、感黑穗病谷子品种几种酶活性的比较研究[J]. 植物遗传资源学报,2003,25(4):318-320.
- [10] Raboin L M, Selvi A, Oliveira K M, et al. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2007,44(1):64-76.
- [11] 周祥,周蓉,马臣丰,等. 贵州薏苡黑穗病发病原因分析及防治[J]. 农技服务,2014,31(6):140-141.
- [12] 黄思良,兼平勉,筱原正行. 薏苡黑穗病菌对薏苡侵染初期过程的解剖学观察[J]. 广西植保,1988(4):19-22.
- [13] 李戈,彭建明,高微微,等. 我国南方薏苡种质资源对黑粉病的抗病性鉴定[J]. 中国中药杂志,2010,35(22):2950-2953.
- [14] 徐春金. 不同薏苡品种黑穗病发生情况调查[J]. 福建农业科技,2014(6):30-32.
- [15] 宋瑞芳,丁永乐,宫长荣,等. 烟草抗病性与防御酶活性间的关系研究进展[J]. 中国农学通报,2007,23(5):309-314.
- [16] Montalbini P, Buonauro R. Effect of tobacco mosaic virus infection of levels of soluble superoxide dismutase (SOD) in *Nicotiana tabacum* and *nicotiana glutinosa* leaves[J]. Plant Science, 1986,47(2):135-143.