

# 玉米丝黑穗病生防放线菌的筛选及 对冬孢子萌发的抑制作用

刘洪亮<sup>1</sup>, 王险峰<sup>2</sup>, 刘 辉<sup>3</sup>, 沈国生<sup>3</sup>, 谢丽华<sup>3</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学植物科技学院, 大庆 163319; 2. 黑龙江省农垦总局植保站, 哈尔滨 150036;  
3. 黑龙江省农垦科学院, 佳木斯 154007)

**摘要:** 从土壤样品分离得到 47 株放线菌, 通过对冬孢子萌发率的测定得到 6 株(S-1、H-21、S-12、H-4、H-13、H-1) 对冬孢子萌发有较好的抑制作用, S-1 菌株及代谢产物对冬孢子萌发抑制率达到 76.56%, 其次为 H-21 和 S-12, 抑制率分别为 70.15% 和 56.87%。

**关键词:** 放线菌; 冬孢子; 代谢产物

中图分类号: S435.131.4<sup>+</sup>2      文献标识码: A      文章编号: 1002-2767(2008)02-0015-03

## Screening of Antagonistic Actinomycete Against Head Smut Disease in Maize and Its Inhibitive to Teliospore Germination

LIU Hong-liang<sup>1</sup>, WANG Xian-feng<sup>2</sup>, LIU Hui<sup>3</sup>, SHEN Guo-sheng<sup>3</sup>, XIE Li-huan<sup>3</sup>

(1. Plant Sciences and Technology College of Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319; 2. Plant Protection Station of Heilongjiang General Cultivation Office, Harbin 150036; 3. Heilongjiang Academy of Agricultural Reclamation Sciences, Jiamusi 154007)

**Abstract:** 47 strains Actinomycete were isolated from soil samples. 6 strains out of them had more inhibitive to teliospore germination. The metabolic products of S-1 was the most inhibitive with inhibition rate 76.56%, H-21 and S-12 came the second with inhibition rate 70.15% and 56.87%, respectively.

**Key words:** actinomycete; teliospores; metabolic products

玉米丝黑穗病于 1876 年在意大利首次报道, 我

国于 1919 年在东北地区首次发现。目前该病已遍布世界各玉米产区。20 世纪 80 年代, 由于抗病品种的推广和使用, 玉米丝黑穗病曾得到了控制, 但 20 世纪 90 年代后期由于气候、栽培方式和品种更换等原因, 玉米丝黑穗病又大面积发生和流行。重庆、山西、内蒙古、云南、辽宁、吉林和黑龙江等省都相继报道玉米丝黑穗病大面积发生。玉米丝黑穗病

收稿日期: 2007-10-24  
基金项目: 黑龙江农垦总局“十一五”重点科技攻关项目 (HNKXIV-03-03-01)  
第一作者简介: 刘洪亮(1981-), 男, 黑龙江大庆市人, 在读硕士, 主要从事农药学研究。E-mail: liuhl\_2001@yahoo.com.cn.  
通讯作者: 刘辉 Tel: 0454-8359195; E-mail: liuhui39@163.com.

[ 18] Yadav S K, Singla-Pareek S L, Reddy M K, et al. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress[ J ]. FEBS Lett, 2005, 579(27): 6265-6271.

[ 19] Jung J, Won S Y, Suh S G et al. The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in Arabidopsis[ J ]. Planta, 2007, 225(3): 575-588.

[ 20] Ciftci-Yilmaz S, Morsy M R, Song L, et al. The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of Arabidopsis to salinity stress[ J ]. Biology Chemistry, 2007, 282(12): 9260-9268.

[ 21] Toshio Yamaguchi, Eduardo Blumwald. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities[ J ]. Trends in Plant Science, 2005, 10(12): 615-620.

[ 22] Yamamoto A, Bhuiyan MN, Waditee R, et al. Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants[ J ]. J Exp Bot, 2005, 56(417): 1785-1796.

[ 23] Neeti Sanan-Mishra, Xuan Hoi Pham, Sudhir K, et al. Pea DNA helicase 45 over expression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield[ J ]. PNAS, 2005, 102(2): 509 - 514.

的再度发生与流行严重影响了玉米的产量和品质,给玉米产量造成了严重损失。东北春玉米区玉米丝黑穗病的大发生,仅 2002 年就造成产量损失 10%~15%,其中黑龙江省发病面积 44 万 hm<sup>2</sup>, 占全省玉米种植面积的 20%;吉林省发病面积 60 万 hm<sup>2</sup>, 占全省玉米面积的 20%;辽宁省发病面积 3.3 万 hm<sup>2</sup>, 占全省玉米种植面积的 2.3%<sup>[1]</sup>。

玉米丝黑穗病是玉米丝轴团散黑粉菌(*Sphacelotheca reiliana*)引起的一种幼苗侵入的系统性病害,病菌主要以冬孢子在土壤、粪肥中或附在种子表面越冬,成为次年的初侵染来源,牲畜取食的病菌孢子经消化道消化后仍具有侵染力。病菌厚垣孢子在土壤中可存活 3~5 a,且侵染期较长。冬孢子萌发产生的“+”、“—”不同的冬孢子萌发后相结合形成的双核菌丝才具侵染力,侵入寄主幼苗生长锥,完成侵染过程,以侵染胚芽为主,根部侵染次之,在胚芽上,胚芽鞘侵染率高于中胚轴,根的各个部位均可侵染,以胚根感染率最高。冬孢子侵染玉米的适宜温度为 21~28℃,需较低或中等的土壤含水量。土壤缺氮时易发病。康绍兰<sup>[2]</sup>等证明玉米丝黑穗病菌冬孢子还可以从叶片侵入,引起局部黄斑症状,病菌在寄主的组织间或细胞内扩展,接种后 50 d 就可以在寄主组织内形成冬孢子。冬孢子能否顺利完成侵染则取决于寄主植物的抗性,土壤中的孢子数量与适宜的侵染时期的温度和土壤湿度。主要危害雌穗和雄穗。侵入前是防治的最适时期<sup>[3]</sup>。冬孢子能否萌发是导致病害发生的重要因素。因此抑制冬孢子萌发是玉米丝黑穗病生物防治的关键。目前玉米丝黑穗病普遍使用种衣剂进行防治,存在对环境兼容性差、病菌产生抗药性等不足。因此筛选防效较好且能与环境亲和的生防制剂具有重要的理论价值和实践意义。

本文针对冬孢子萌发的抑制作用筛选出几株生防放线菌,为玉米丝黑穗病的生物防治奠定了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 土壤样品 取自黑龙江省农垦科学院玉米试验田根际土壤,沈阳农业大学玉米试验田玉米根际土壤。

1.1.2 供试病原菌 玉米丝轴团散黑粉菌(*Sphacelotheca reiliana*);黑龙江省农垦科学院保存菌种。

### 1.2 方法

1.2.1 玉米丝黑穗冬孢子萌发培养基的筛选 筛

选培养基 L-氏培养基<sup>[4]</sup>、改良 PDA 培养基(1%麦芽浸汁,1.8%葡萄糖,2%马铃薯浸汁,1.8%琼脂)、水琼脂+蔗糖培养基、MB-50 培养基(0.1%磷酸二氢钾,0.06%酵母膏,0.04%硫酸镁,0.06%尿素,0.003%硫酸亚铁,5%蔗糖,1.8%琼脂)、营养琼脂培养基、PDA 培养基、水琼脂+葡萄糖、水琼脂+麦芽糖、G.A(2%蔗糖,0.08%硫酸镁,0.3%醋酸氨,0.063%柠檬酸,0.3%磷酸氢二钾,0.008%硫酸铁,0.0014%硫酸锰,0.00004%硫酸铜)、MM 培养基(1%麦芽浸汁,1%麦芽糖,1%马铃薯浸汁,1.8%琼脂)、水+麦芽糖培养基、寄主培养基(2%玉米叶浸汁,1.8%琼脂)。

筛选方法:制备上述 11 种培养基平板,将冬孢子配成一定浓度的孢悬液涂沫在 11 种培养基平板上,低倍镜下每视野 30~40 个冬孢子,每处理重复 3 次,48 h 后观察计算孢子萌发率。

萌发率/%=冬孢子萌发数/观察冬孢子总数×100%

1.2.2 土壤放线菌的分离 土壤样品经阴凉处风干后,称取 10 g 于 90 mL 无菌水中,振荡 30 min 后静止 10 min 系列梯度稀释<sup>[5]</sup>,取 200 μL 稀释 10<sup>-4</sup> 的土壤悬浮液涂布于高氏 1 号培养基上,置于 28℃ 恒温培养,7 d 后分离放线菌并进行纯化。

1.2.3 拮抗放线菌的筛选 (1) 发酵液制备:发酵培养基 1.5%大豆粒(加适量水煮沸 0.5~1.0 h 取滤液),0.5%蛋白胨,0.25%硫酸氨,2.0%葡萄糖,1%淀粉,0.025%硫酸镁,0.02%磷酸二氢钾,0.4%氯化钠,配成水溶液,调 pH 至 7~8,加入 1%碳酸钙 湿热灭菌 30 min<sup>[6]</sup>。将纯化培养好的放线菌菌株接入原始发酵培养液中,在 28℃,180 r·min<sup>-1</sup> 的条件下进行振荡培养。4 d 后,将培养物用灭菌的滤纸过滤,然后再将滤液经 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min。取上清液用孔径为 0.45 μm 滤膜过滤,得到代谢产物<sup>[7]</sup>。(2) 病原菌孢子悬浮液的配制:用接种钩挑取少量冬孢子粉经甲醛高锰酸钾混合液表面消毒。用无菌水配制低倍镜下每视野 30~40 个冬孢子的孢悬液<sup>[8]</sup>。(3) 发酵液对冬孢子萌发抑制率的测定<sup>[9]</sup>:将上述配制好的孢悬液与发酵液 1:1 混合置于水麦芽糖琼脂培养基中。28℃恒温培养 2 d,计算萌发率。孢子萌发以先菌丝长度超过冬孢子半径为准。以孢悬液与发酵培养液 1:1 混合置于水麦芽糖琼脂培养基中培养作为对照,每处理 3 次重复,计算 20 个不同视野冬孢子萌发数。

孢子萌发率/%=萌发孢子数/孢子总数×100%,孢子萌发抑制率/%=(对照孢子萌发率—处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率×100%<sup>[10]</sup>

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米丝黑穗病菌冬孢子萌发培养基的筛选

对 11 种培养基进行筛选, 结果表明(见表 1): 水琼脂与麦芽糖的混合培养基最有利于玉米丝黑穗病菌冬孢子的萌发, 冬孢子萌发率达到 84.49%, 其次是改良 PDA 培养基(在 PDA 中加入 1% 的麦芽浸汁), 冬孢子的萌发率为 74.77%, 两种培养基对冬孢子萌发的促进作用在 5% 的水平上差异显著, 但在 1% 的水平上差异不显著, 筛选出水琼脂与麦芽

表 1 不同培养基对冬孢子萌发的影响

培养基	冬孢子萌发数/个	冬孢子观测总数/个	冬孢子萌发率/%	差异显著水平	
				5%	1%
水琼脂+麦芽糖	109	129	84.49	a	A
改良 PDA 培养基	83	111	74.77	b	AB
PDA 培养基	105	149	70.47	b	B
L- 氏培养基	82	118	69.49	b	B
水琼脂+葡萄糖	91	135	67.41	b	B
MM 培养基	58	106	54.71	c	C
MB- 50 培养基	79	156	50.65	c	C
G. A	34	102	33.33	d	D
寄主培养基	29	118	24.58	e	DE
水琼脂+蔗糖培养基	16	106	15.09	f	EF
营养琼脂培养基	12	162	7.40	f	F

芽糖的混合培养基为冬孢子萌发的最适培养基。

### 2.2 放线菌的分离

采用稀释平板法分离土样中的放线菌, 挑取单菌落进行纯化, 共获得 47 株放线菌分离物, 分别编号为 H-1 ~ H-29, S-1 ~ S-18, 以玉米丝黑穗为靶标菌进一步筛选出有高拮抗活性的放线菌。

### 2.3 拮抗放线菌的筛选

通过 47 株放线菌发酵液对冬孢子萌发抑制率的测定, 从供试的 47 株放线菌中筛选出 6 株对玉米丝黑穗病菌冬孢子萌发有抑制作用的菌株(见表 2), 分别为: H-1, H-4, H-13, H-21, S-1, S-12。其中对冬孢子萌发抑制率超过 70% 的有 2 株: S-1 和 H-21, S-1 发酵液对玉米丝黑穗病菌冬孢子萌发的抑制率最高, 达到 76.56%(见图 1)。

表 2 拮抗放线菌对冬孢子萌发的抑制效果

菌株	对照萌发率/%	处理萌发率/%	冬孢子抑制率/%
S-1	83.67	19.61	76.56
H-21	83.67	24.98	70.15
S-12	83.67	36.09	56.87
H-4	83.67	41.32	50.61
H-13	83.67	42.24	49.52
H-1	83.67	42.47	49.24

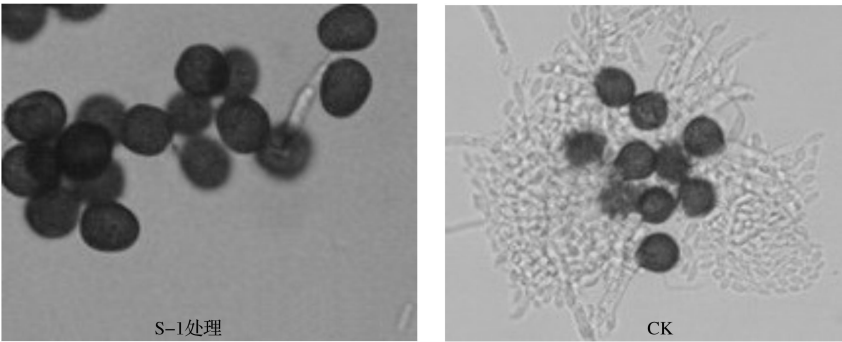


图 1 S-1 发酵液处理的冬孢子萌发结果

## 3 讨论

病菌冬孢子萌发产生的先菌丝可在玉米 5 叶期前完成对玉米的侵染并在植株体内繁殖<sup>[4]</sup>。因此本试验从抑制冬孢子的角度出发, 从玉米根际土壤中分离得到放线菌 47 株, 其中 S-1 发酵液对玉米丝黑穗冬孢子萌发有较强的抑制作用。对冬孢子的萌发抑制率达到 76.56%。推测放线菌菌株发酵代谢物中可能存在某种物质抑制冬孢子的萌发, 有待于进一步的研究。

### 参考文献:

[1] 晋齐鸣, 王晓鸣, 王作英. 东北春玉米区玉米丝黑穗病大发生原因及对策[J]. 玉米科学, 2003, 11(1): 86-87.

[2] 康绍兰, 李兴红, 郭华强. 玉米丝黑穗病菌对玉米叶片的侵染过程[J]. 河北农业大学学报, 1995, 18(4): 128-129.

[3] 郑俊强, 高增贵. 玉米土传病害生物防治的研究进展[J]. 玉米科学, 2005, 13(1): 114-118.

[4] 刘惕若. 黑粉菌与黑粉病[M]. 北京: 农业出版社, 1984.

[5] 俞大绂. 植物病理学和真菌学技术汇编[M]. 北京: 人民教育出版社, 1963.

[6] 潘争艳. 药用植物土壤中拮抗放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. 河南农业科学, 2007(3): 67-68.

[7] 潘争艳, 刘伟成, 裴季燕, 等. 放线菌 III-61、A-21 对蔬菜枯萎病和灰霉病的控制作用[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 92-97.

[8] 张波. 放线菌 Z139 菌株的分离、鉴定及其生物活性[J]. 西北农林科技大学学报, 2005(8): 69-72.

[9] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988.

[10] 杨佩文, 李艳琼. 放线菌发酵提取物对百合炭疽病的抗菌活性筛选[J]. 农药, 2006(8): 71-74.