

采用孢子萌发法测定化合物对黄瓜白粉病菌的生物活性

杨小军^{1,2}, 倪汉文², 杨立军¹, 王少南¹, 喻大昭¹

(1. 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 武汉 430064; 2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要 接种黄瓜白粉菌后 16 h 的黄瓜叶片用透明胶带在子叶表面粘孢子取样的平均发芽率与用台盼蓝染色后在光学显微镜下调查的发芽率分别为 83.7% 和 85.0%, t 测验无显著差异, 表明透明胶带取样的发芽率可以代表黄瓜叶片上白粉病菌孢子的发芽率。采用孢子萌发法和叶碟法分别测定了醚菌酯、植物源活性组分大黄素甲醚(P3D)对 8 个黄瓜白粉病菌株的 EC_{50} 。统计结果表明: 采用两种方法测定醚菌酯、P3D 对黄瓜白粉菌的 EC_{50} 的相关系数的平方值分别为 0.88、0.99, 表明两种方法的测定结果有很强的相关性; 采用该孢子萌发法可评价化合物对植物专性寄生病菌如白粉菌孢子萌发的生物活性。

关键词 孢子萌发法; 白粉病菌; 生物活性

中图分类号 S 432.44

A novel bioassay method—determining the bioactivity of chemical compounds to cucumber powdery mildew by spore germination

Yang Xiaojun^{1,2}, Ni Hanwen², Yang Lijun¹, Wang Shaonan¹, Yu Dazhao¹

(1. Institute for Plant Protection and Soil Science, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;
2. Agronomy and Biotechnology College, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The reliability of a novel bioassay method that was designed to determine the bioactivity of chemical compounds to powdery mildew based on spore germination inhibition was studied. The results showed that sampling spore germination by transparent tapes was simple and reliable. There was a significant correlation between the results by spore germination method and that by leaf disc assay no matter whether synthetic fungicide kresoxim-methyl or biofungicide P3D was used on cucumber powdery mildew. The results indicated that the spore germination method could replace the leaf disc method in fungicide bioassay against this disease.

Key words spore germination method; powdery mildew; bioactivity

黄瓜白粉病菌 [*Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht) Poll.] 为植物专性寄生菌, 只能寄生与之亲和的活体, 不能在人工培养基上生长, 很少采用孢子萌发法评价药剂对该菌的活性。已有的测定化合物对黄瓜白粉菌生物活性方法有子叶法、叶碟法等^[1-5], 在调查病情时大多目测估计病斑(分生孢子堆)大小分级, 统计病情严重度进行评价, 容易扩大试验误差。本试验尝试调查白粉病菌分生孢子的萌发率来评价化合物的活性; 即采用透明胶带在接种 16 h 后的黄瓜子叶表面粘下白粉菌分生孢子^[6], 置光学显微镜下调查孢子发芽情况, 根据不同剂量处理发芽率的高低评价化合物的活性。将该方法与叶

碟法进行了比较, 以期提供一种新的快速准确测定化合物对黄瓜白粉菌生物活性的方法。

1 材料和方法

1.1 供试药剂与黄瓜白粉菌菌种

醚菌酯原药, 纯度 > 95%, 山东京博集团提供; 植物源提取物大黄素甲醚(P3D), 纯度为 98%, 系湖北省农业科学院植保所植物抽提室提纯^[7]。

供试黄瓜品种为新泰密刺, 购于山东省新泰市祥云种业有限公司。供试黄瓜白粉菌菌株 A10、A25、A12、A26、B7、C20、C27 和 C30, 系湖北省农科院植保所植物病理研究室分离保存。

1.2 方法

1.2.1 供试黄瓜苗的培养

将新泰密刺种子浸种 6 h, 催芽后播到直径为 10 cm 盛丰富腐殖质土壤的塑料钵中, 于 MGC-300H 型人工气候箱中[温度(25 ± 0.5) °C, 相对湿度 70%, 光照//黑暗=8 h//16 h 循环]培养 8 d 至子叶完全展开待用。用作叶碟法的黄瓜苗在前述条件下培养至 5 片真叶待用。

1.2.2 黄瓜白粉菌种的培养

将黄瓜子叶离体后摆放在盛 15 mL 含 50 μg/mL 苯并咪唑的水琼脂(保鲜培养基), 直径为 90 mm 的玻璃培养皿中。供试菌株摩擦接种在子叶上, 于上述人工气候箱中培养 8 d 至产生足量分生孢子。

1.2.3 供试药剂浓度配置

将供试药剂 P3D 按 1 mg 原药用 100 μL 丙酮充分溶解, 加 20 μL 吐温 20, 在漩涡振荡器上振荡 2 min, 用 0.025% 吐温 20 水溶液稀释至 10.0、2.50、0.625、0.156 μg/mL 和 0.039 μg/mL; 按同样方法将醚菌酯配成 66.7、7.41、0.823、0.091 μg/mL 和 0.010 μg/mL。

1.2.4 透明胶带粘孢子取样可靠性验证

将 12 片黄瓜子叶离体后正面朝上摆放在保鲜培养基上, 黄瓜白粉菌分生孢子用蒸馏水洗下配成分生孢子含量为 1×10⁶ 个/mL 的悬浮液, 在微量弥雾塔接种到子叶表面, 阴干后盖上皿盖。在 25 °C 避光培养 16 h; 其中 6 片叶用透明胶带将表面孢子粘下, 置光学显微镜下调查发芽情况; 另外 6 片叶采用台盼蓝染色后调查发芽情况^[8], 验证胶带粘孢子取样的可靠性。

1.2.5 孢子萌发法和叶碟法测定药剂生物活性比较

在微量弥雾塔用各浓度梯度药剂处理子叶和叶碟表面, 每浓度梯度 3 片子叶, 20 片叶碟, 阴干后接种白粉菌分生孢子, 孢子萌发法的接种孢子量为 1×10⁶ 个/mL, 叶碟法的为 1×10⁴ 个/mL, 阴干后盖上皿盖, 置人工气候箱中培养。将调查的发芽率转化成抑制率, 计算 EC₅₀; 叶碟法调查时计数叶碟上病菌孢子堆数量, 与对照比较转化成抑制率, 计算 EC₅₀。比较这两种方法测定药剂醚菌酯和 P3D 对 8 个菌株的活性结果。

2 结果与分析

2.1 透明胶带粘孢子取样可靠性验证结果

每片叶调查 8 个低倍视野(调查孢子总数大于

200 个), 计算出的发芽率见表 1。采用透明胶带取样的白粉菌孢子发芽率为(83.6 ± 3.7)%, 采用 Trypan blue 染色后直接调查发芽率为(85.0 ± 1.3)%, t 测验($p=0.39$)显示两种取样方法的发芽率一致, 表明用透明胶带粘孢子取样的发芽率能代表黄瓜白粉病菌孢子在叶片上的实际发芽率。

表 1 透明胶带在黄瓜叶片上粘白粉病菌孢子取样调查发芽率的可靠性验证

取样方法	发芽率/%						
	1	2	3	4	5	6	平均
透明胶带法	83.0	88.8	79.4	82.5	81.0	86.7	83.6±3.7
台盼蓝染色法	83.2	84.4	84.4	86.7	86.3	81.1	85.0±1.3

2.2 孢子萌发法和叶碟法测定药剂生物活性结果

2.2.1 P3D 的测定结果

孢子萌发法和叶碟法测定 P3D 对黄瓜白粉菌 8 个菌株 A10、A25、A12、A26、B7、C20、C27 和 C30 的 EC₅₀ 的相关性分析结果表明, 这两种方法测定的结果有极强的相关性, 相关系数高达 0.99, 达到 1% 显著水平(图 1)。

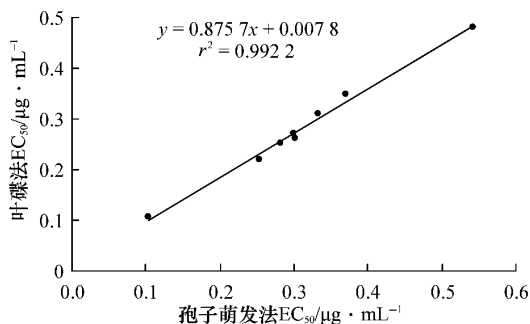


图 1 采用孢子萌发法和叶碟法测定醚菌酯对黄瓜白粉病菌 EC₅₀ 的相关性

2.2.2 醚菌酯的测定结果

和 P3D 测定的结果一样, 用醚菌酯测定的结果也表明, 孢子萌发法和叶碟法测定, 对供试的黄瓜白粉菌 8 个菌株的 EC₅₀ 也有很强的相关性, 相关系数为 0.88, 也达到 1% 显著水平(图 2)。

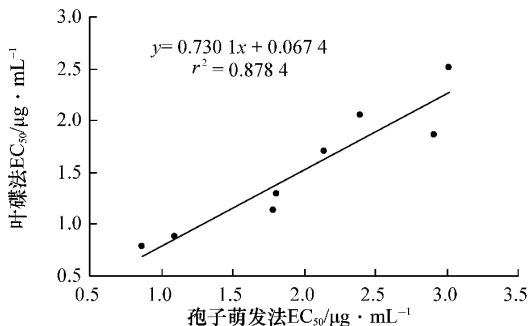
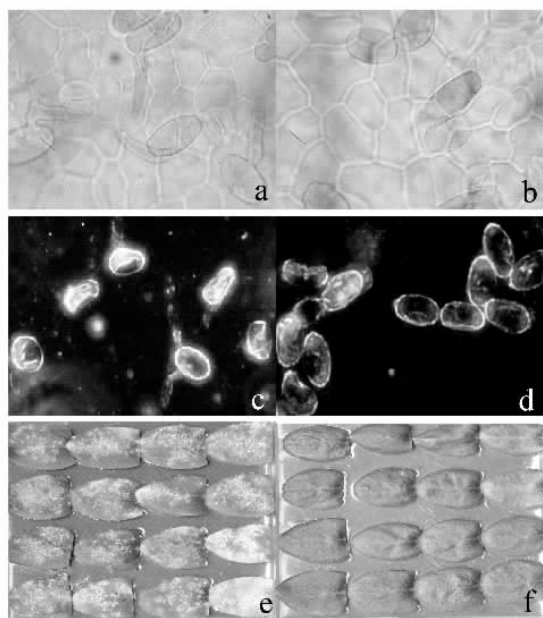


图 2 采用孢子萌发法和叶碟法测定 P3D 对黄瓜白粉病菌 EC₅₀ 的相关性



a、c、e 为空白对照, b、d、f 为 P3D 的 10 $\mu\text{g/mL}$ 处理; a 和 b: 台盼蓝染色, 在 40 $\times$ 10 倍光学显微镜下拍摄; c 和 d: 透明胶带取样, 在 40 $\times$ 10 倍相差显微镜下拍摄; e 和 f: 用 Nikon4500 数码相机拍摄

图3 胶带取样法和台盼蓝染色法对黄瓜白粉菌孢子萌发的影响比较

3 讨论

采用孢子萌发法测定化合物对黄瓜白粉病菌的生物活性是可行的。白粉病菌是植物专性寄生菌, 在人工培养基上很难达到理想的发芽率。尽管有文章报道黄瓜白粉菌在 2% 葡萄糖溶液中的孢子萌发率能达到 63%^[9], 但作为生物活性测定是不够的^[10]。本方法的孢子萌发率在 80% 以上, 而且与黄瓜子叶法、叶碟法等生物测定方法相比较^[1-5], 测定周期短, 培养时间仅需 16 h 左右, 调查时在显微镜下直接计数分生孢子发芽情况, 克服了目测病情分级时因人为估计造成的误差, 此外评价对孢子萌发有作用的化合物的活性特别有用。

化合物醚菌酯的作用机理主要是通过抑制真菌线粒体的呼吸, 阻碍 ATP 的产生而切断真菌的能量代谢^[11], 不仅抑制病原菌孢子的萌发起保护作用, 还具有治疗作用。本试验中孢子萌发法和叶碟法测定结果尽管具有相关性, 但 t 测验表明叶碟法的 EC_{50} 显著低于孢子萌发法的 EC_{50} ($t = 0.003$)。化合物 P3D 的作用机理尚未完全研究清楚, 已经证实具有一定的局部诱导抗病作用(研究结果未发表)。

t 测验结果也表明, 叶碟法的 EC_{50} 显著低于孢子萌发法的 EC_{50} ($t = 0.002$)。说明化合物 P3D 除了抑制孢子的萌发外, 还持续影响白粉病菌进一步发育。

孢子萌发法有一定的局限性, 因为不同化合物对病害的作用机制不同, 有些化合物仅对孢子萌发后的阶段有影响或是通过诱导寄主产生抗性物质对病害或病菌产生作用, 如具有诱导抗病性的 BTH (苯并噻二唑), 并不影响小麦白粉病菌在寄主上的发芽率和附着胞的形成, 但能控制该菌侵入寄主, 降低吸器的形成率^[12]。这类机制的化合物就不适宜用孢子萌发法进行生物活性测定。

参考文献

- [1] 杨小军, 杨立军, 王少南, 等. 药剂对黄瓜白粉菌的室内生物活性测定方法比较 [J]. 湖北农业科学, 2004(3): 40-44.
- [2] COHEN A. A leaf disk assay for detection of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race [J]. Plant Disease, 1993, 77: 513-517.
- [3] 陈喜文, 郝友进, 陈德富. 几种化学诱导物对黄瓜白粉病抗性的诱导作用 [J]. 华北农学报, 2000, 15(4): 103-107.
- [4] 张光明, 王翠花, 张玉勋. 黄瓜白粉子叶接种测定新药防效 [J]. 山东蔬菜, 1997(3): 29-30.
- [5] 王福建, 李宝聚, 姜启良, 等. 99.1% 敌死虫乳油防治黄瓜白粉病毒力测定及田间药效试验 [J]. 中国蔬菜, 2002(2): 29-30.
- [6] 方中达. 植物病理研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 115.
- [7] 喻大昭, 杨立军, 杨小军, 等. 植物源活性物质 P3D 对小麦白粉病菌发育的影响 [C]// 彭友良. 中国植物病理学会 2004 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 458-463.
- [8] 陈年春. 农药生物测定方法 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1990: 149-161.
- [9] DAAY F, QUÉBEC L, BÉLANGER R R. The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber [J]. Plant Disease, 1995, 79(6): 577-580.
- [10] FRYE A, LNNES R W. An arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew [J]. The Plant Cell, 1998, 10(6): 947-956.
- [11] 关爱莹, 胡耐冬. Strobilurin 类杀菌剂 [J]. 世界农药, 2002, 24(2): 16-19.
- [12] JORN G, SANDRA V, GETRUD K B, et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat [J]. The Plant Cell, 1996, 8(2): 629-643.