

小麦白粉病纯化菌种保存方法

曹远银¹ 于基成^{1,2} 刘 秋² 魏松红¹

(1. 沈阳农业大学植物免疫研究所, 沈阳 110161; 2. 大连民族学院, 大连 116600)

摘要: 利用经初选确定的 5 种具有较好保鲜能力的配方, 采用离体叶段滤纸保存法、离体叶段琼脂保存法和试管苗保存法对小麦白粉病菌纯化菌系保存效果进行了研究。结果表明, 对小麦幼苗第一叶叶段保鲜效果最好的配方是沈保 6 号, 当使用 40~60 μg/mL 最适浓度时, 第 25 天叶段绿色仍可达到 90% 以上。保存菌种的最适环境条件研究结果表明, 在 4℃ 冰箱中, 以离体叶片沈保 6 号琼脂保存和离体叶沈保 6 号浸润滤纸保存效果最佳, 在第 40 天叶片绿色仍分别达到 78.0% 和 68.0%, 孢子萌发率可达 26.7% 和 26.8%。

关键词: 小麦白粉病菌; 离体叶段培养; 保存方法

Studies on preservation method for pure isolates of wheat powdery mildew

CAO Yuan-yin¹ YU Ji-cheng^{1,2} LIU Qiu² WEI Song-hong¹

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract: The purpose of the studies was to sieve a good method to preserve the viability of fresh pure isolates of *Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *tritici* Marchal. The efficacy comparisons among 5 leaf-freshening formulations selected from preliminary experiments were performed with three different techniques, i. e. detached-leaf-culture with filter paper, detached-leaf-culture with agar and test tube growing seedlings with soil. The results showed that among 5 formulations the most potent one was Shenbao 6 and its optimum concentration was 40 μg/mL, the green color ratio of wheat leaves was maintained over 90% on the 25th day. Furthermore, tests were also conducted to select ideal preservation environment conditions, the result indicating that at 4℃ in the refrigerator, either the technique to keep detached infected leaves on Shenbao 6 wetted filter paper in covered petri dish or the one to maintain the leaves in Shenbao 6 agar in sealed bottles was ideal for holding the viability of the spores, which could maintain green color ratio of the leaves about 78% and 68% and the spore germination rate about 26.7% and 26.8%, respectively, until the 40th day.

Key words: Powdery mildew of wheat; detached leaf culture; spore preservation method

小麦白粉病是近 10 余年来东北麦区最重要的小麦病害。小麦白粉病菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 属于专性寄生菌, 无论其菌丝体(垫)还是无性阶段的分生孢子, 离开了活寄主后, 维持其生活力的时间都十分短^[1]。在东北春麦区, 小麦白粉病既不

能越冬, 也不能越夏^[2], 一年中至少有 7~8 个月时间不能自然存活。然而, 开展小麦白粉病菌毒性变异及寄主病原互作的各类相关研究都必须用纯化的代表不同毒性谱的病原小种做试材, 因此如何保存小麦白粉病菌的纯化菌系就显得十分重要。为此,

基金项目: 国家“十五”科技攻关课题资助(2001BA509B03/2004BA509B03)

作者简介: 曹远银, 男, 1955 年生, 研究员, 主要从事植物免疫和分子植物病理学研究(email: caoyy66@yahoo.com.cn)

收稿日期: 2004-05-11

我国小麦白粉病研究工作者做了不懈努力与尝试,其中包括采用控温控光条件下活体麦苗逐代转接的菌种保存方法。但这种方法较依赖专门环境条件,工作量也较大,而且在转接时,稍为不慎就容易造成不同小种间的交叉污染^[3]。作者经过连续多年研究探索,现已研制出较为理想的保存方法。该方法采用自制保鲜剂,离体叶段保存,具有对设备要求简单、保存容量大、占用空间小、保存时间长等特点。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦品种:小麦白粉病高感品种小密穗。小麦白粉病菌种:东北春麦区小麦白粉病主要小种5号、11号和15号,分别隔离繁殖备用。小麦离体叶段保鲜液:沈保1号、6号、9号、12号和18号,均由沈阳农业大学植物免疫研究所提供。

1.2 最佳持绿效果的保鲜液种类及浓度的筛选

供试品种小密穗播种在装有沃土的花盆里,在隔离的无锈病、白粉病污染的温室里育苗,幼苗至一叶一心和二叶一心时剪取叶段,采用小麦离体叶段培养皿培养法^[4]。培养皿里放进滤纸,皿中滤纸用一种保鲜液组合润湿,滤纸上叶面朝上平放小麦叶段,盖上皿盖,置于光照条件下(12h光/12h暗)培养,在不同时间里测定小麦叶段的持绿效果。供试保鲜液为5种配方:沈保1号、6号、9号、12号和18号,每种配方为30、40、50、60、70及80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等6种浓度,共30种保鲜液组合备用。试验设5次重复并以60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苯骈咪唑为对照。

1.3 不同浓度的沈保6号对小麦离体第一叶片持绿效果与病情影响

小麦离体叶段培养方法与培养时温度、光照条件同上。沈保6号的浓度为40和60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。抖落法给皿内小麦离体叶段接种白粉病菌,定期调查离体叶段绿色消退及白粉病发展情况。皿内白粉病病情分级和叶片褪色程度分级参考孟凡华等的方法^[4]。

1.4 最佳持绿期效果培养与菌种保存方法比较

1.4.1 离体叶段滤纸保存法:小麦离体叶段培养方法同上。保鲜液为沈保6号,其浓度为40和60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对照处理试剂为60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯骈咪唑。抖落法接种白粉病菌,于 $18 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养直至出现粉孢子后,进行以下处理。① $18 \sim 20^\circ\text{C}$ 与光照12h;② $12 \sim 14^\circ\text{C}$ 与光照12h;③ $12 \sim 14^\circ\text{C}$ 与光照8h;④ $5 \sim 7^\circ\text{C}$

与光照12h;⑤ $5 \sim 7^\circ\text{C}$ 与光照8h,以上5个处理光强均为2000lx;⑥ 4°C 冰箱无光培养;⑦清水湿润滤纸为对照。每隔3天记录叶段褪绿情况和孢子萌发率。

1.4.2 离体叶段琼脂保存法:将60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保6号的1%琼脂倒入小玻璃瓶中,体积约为2mL,121 $^\circ\text{C}$ 灭菌20min。将刚发病的小密穗幼苗第一叶剪成约2cm的叶段,剪口端插入到琼脂中。由不同光照长度和温度条件构成几种组合:三种光照条件:2000lx 12h/天、2000lx 16h/天与无光照;四种温度条件:18~20、10~12、5~7 $^\circ\text{C}$ 及 4°C 冰箱条件。以60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯骈咪唑琼脂为保鲜剂对照,以不加保鲜液的琼脂为空白对照。定期调查记载叶片褪绿情况及其孢子萌发率。

1.4.3 试管苗保存法:将沃土过筛,装入内径约为2cm、长约10cm的试管内,经121 $^\circ\text{C}$ 灭菌20min。小密穗种子经0.1%的升汞表面消毒10min,无菌水洗涤3次,用灭菌的滤纸吸干表面的水分。于超净工作台上在每个试管放5~6粒种子,暗处放置。种子开始发芽后,移至光强为2000lx的日光灯下培养。小麦苗长至一叶一心时,抖落法接种白粉菌。当出现粉孢子时,将试管移至温度分别为18、10和5 $^\circ\text{C}$ 光照条件下及 4°C 冰箱中定期观察小麦苗生长和白粉病情况,记载结果。

2 结果与分析

2.1 最佳持绿效果的保鲜液种类及浓度的筛选

研究表明,5种保鲜液效果最好的为沈保6号,其浓度范围在40~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最优,第25天叶段绿色仍可达到90%以上,相对持绿期最长。沈保1号、18号、9号、12号较适浓度为50~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但持绿期要比沈保6号短近一半(约25天)。在30~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度内,5种保鲜液在高浓度时持绿效果显得更好。

2.2 不同浓度的沈保6号对小麦离体第一叶段持绿效果与病情的影响

试验结果表明,离体叶段滤纸法培养7天后,浓度为30、40、50、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理的白粉病均可达到4⁻级,第9天可达到4级,持绿期达15天以上。浓度为70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的处理白粉病发病较晚,但叶片的绿色程度可与浓度为60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保6号相媲美。不过,从经济的角度综合考虑,用浓度40~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保6号保存菌种应为首选。

2.3 不同保存方法对小麦叶段持绿效果和白粉病菌孢子萌发的影响

2.3.1 离体叶段滤纸保存法

如图 1 所示,用浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保 6 号处理的小麦离体叶段持绿效果比 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稍差。用 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保 6 号处理时,在第 40 天,5、10、18 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内叶段绿色率仅分别为 50%、35%、15% 和 55%;相应地,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯并咪唑对照的持绿效果更低,其叶段绿色率仅分别为 35%、26%、18% 和 40%;而 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保 6 号处理时,绿色率分别高达 68%、40%、25% 和 67%,并且其孢子萌发率分别达到 22.7%、10.2%、8% 和 26.7%,也明显高于 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保 6 号和 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯并咪唑处

理的孢子萌发率。

在同样光照条件下,低温条件有利菌种保存。上述 3 种温度范围内,以 5 $^{\circ}\text{C}$ 保存效果最好。第 40 天,其叶片持绿率 50%,孢子萌发率 22.7% (图 1)。

图 1 数据表明,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱无光条件下保存比在 5 $^{\circ}\text{C}$ 有光条件下叶段褪绿相对缓慢,孢子萌发率高。浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保 6 号处理 40 天后,冰箱内叶片绿色率仍分别达到 55.0% 和 68.0%; 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保 6 号孢子萌发率最高,达到 26.7%。

12h/天和 8h/天两种光照长度对小麦叶段的持绿效果和白粉病菌孢子萌发率没有明显影响 (图 2)。

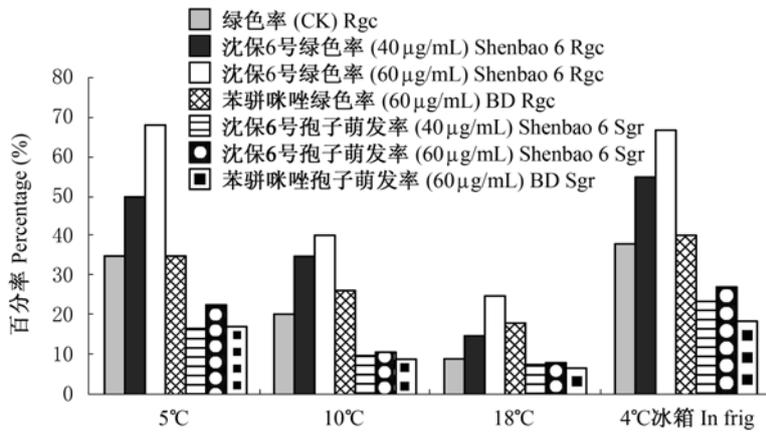


图 1 沈保 6 号处理 40 天后小麦第一叶片绿色率和孢子萌发率

Fig. 1 Green color ratio of primary leaves of wheat seedlings and spore germination of powdery mildew of wheat 40 days after treated with Shenbao 6

Note: Rgc: ratio of green color; Sgr: spore germination rate; BD: benzimidazole. The same for the following figures.

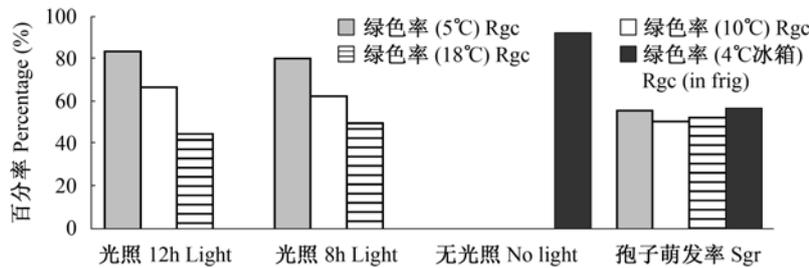


图 2 不同光照时间下离体叶段沈保 6 号 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 滤纸保存 25 天后小麦第一叶绿色率和白粉菌孢子萌发率

Fig. 2 Green color ratio of primary leaves and spore germination rate using detached leaf Shenbao 6 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) filter paper technique on 25th day under different photoperiods

2.3.2 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 沈保 6 号琼脂保存法

结果表明,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存的叶段变黄速度很慢,孢子萌发率也相对高 (图 3)。第 25 天,孢子萌发率为 44.9%,第 40 天,仍可达到 26.8%。18 $^{\circ}\text{C}$

光照培养条件下叶段变黄速度快,孢子萌发率下降也快,第 25 天只有 1.2%。5 $^{\circ}\text{C}$ 、10 $^{\circ}\text{C}$ 光照保存叶段变黄速度次之,孢子萌发率下降速度也稍慢,第 25 天孢子萌发率各为 24.5% 和 18.3%。从图 3 可以

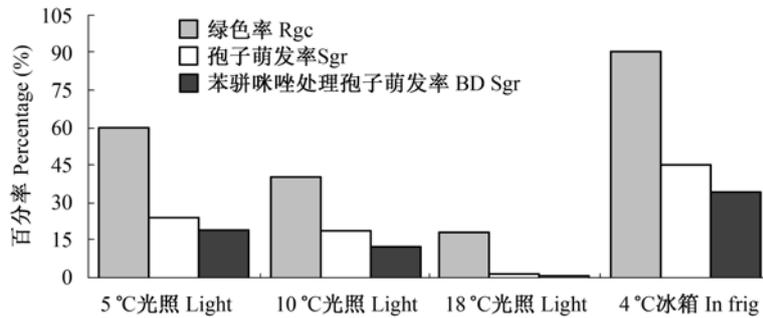


图3 离体叶沈保6号(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)琼脂保存25天后小麦第一叶片绿色率和白粉病菌孢子萌发率

Fig. 3 Green color ratio of primary leaves and spore germination rate using detached leaf Shenbao 6(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) agar technique on 25th day under different photoperiods

看出,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯腈咪唑对照无论是叶段的持绿期还是孢子萌发率均比60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的沈保6号效果差。

2.4 试管苗保存法

试管培养的小麦苗在一叶一心时接种,20 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育24h后,移到温度5、10和18 $^{\circ}\text{C}$ 光照条件下培养。研究表明:10与18 $^{\circ}\text{C}$ 下,7~8天后叶片上开始出现粉孢子;5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下则在10天后出现粉孢子。进一步观察结果表明,①从时间上来看,在5 $^{\circ}\text{C}$ 光照条件下小麦苗生长较为缓慢,保存时间可达40天以上。②从菌丝扩展状态看,以18 $^{\circ}\text{C}$ 光照条件下为最快,10 $^{\circ}\text{C}$ 光照条件下扩展速度次之。③从孢子萌发率看,在5 $^{\circ}\text{C}$ 光照条件下孢子萌发率相对较高。

3 结论与讨论

试验结果表明,利用本实验室配制的5种保鲜液,经过初步筛选,其中保鲜效果最好的是沈保6号。其浓度范围在40~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最优,第25天小麦叶段绿色仍可保持在90%以上。菌种保存方法研究结果表明,沈保6号的保绿效果要明显高于60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯腈咪唑。其中沈保6号离体叶段琼脂保存法和离体叶段滤纸保存法在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存效果最佳。在第40天其叶片绿色仍分别保持在78%和67%,孢子萌发率保持在26.8%和26.7%;60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯腈咪唑则分别为18.4%和17.6%。而且这两种方法操作简单、不占多少空间、不需额外设备和人力、特别容易控制污染等,可以较长期保持

不同毒力的纯化白粉菌菌系的生活力。

另外,离体叶段琼脂保存法还可以用于野外标本采集,不仅解决了传统野外标本采集中样本存活时间短的问题,而且也解决了标本采集中用大试管存放、体积大、易碎等携带极不方便的问题。利用本方法不仅可采集大量的标本,而且随身携带方便,并可进行远距离安全快速邮寄。

离体叶段滤纸保存法,在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中与琼脂保存法效果相同,该方法具有保存菌种量大的优点,但缺点是在标样采集中应用不方便。所以,在实际应用中两种方法可以扬长避短酌情选择使用。

试管苗保存法,在18 $^{\circ}\text{C}$ 光照情况下病情指数较高,但麦苗生长较快,保存时间相对较短;在5 $^{\circ}\text{C}$ 光照条件下,生长较缓慢,潜育期较长,孢子萌发较差,活力较低。与前两种方法比较,还存在麦苗生长的试管空间不足、对设备要求较高以及管理不便等诸多弊端。

参考文献(References)

- 唐伯让,孟繁华. 小麦离体叶段鉴定白粉病抗性方法的研究. 植物保护学报,1995,22(4):309-314
- 杨家书,葛泉清,吴畏,等. 东北春麦区小麦白粉病菌的侵染循环. 植物病理学报,1992,22(1):34-40
- 刘孝坤. 我国小麦白粉病研究进展. 农牧情报研究,1989,8:1-10
- 孟凡华,唐伯让. 6-BA在小麦白粉病离体鉴定中的应用. 山西小麦通讯,1994,2:29-30