

小麦条锈病菌菌种的纯化与保存方法

魏国荣, 王晓杰

(西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 通过对田间收集的小麦条锈菌进行分离和鉴定, 建立了单孢子堆分离方法, 并比较了不同储藏温度下保存不同时间后条锈菌对小麦的致病率, 以探索条锈菌的保存条件。结果表明, 单孢子堆分离法获得的菌种可满足后续研究; 冷冻保存后菌种的致病率均大于 93%, 明显高于冷藏保存后的致病率, 年限越长, 差异性越明显, 表明冷藏保存只适宜菌种的短期保存, 而冷冻保存适宜于长期保存。

关键词: 条锈菌; 菌种纯化; 菌种保存

中图分类号: S435.121.4⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)02-0090-04

Purification and Storage of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

WEI Guo-rong, WANG Xiao-jie

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Uredospores of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from fields were purified and identified to set up single pustule isolation method, which satisfied requirements for further study. The storage conditions were also explored by comparing their pathogenicity after stored at different temperatures for different years. The results showed that the pathogenicity rate of spores stored under frozen conditions was over 93%, much higher than that stored under cold storage condition, the difference more significant with longer years, which indicated that cold storage condition was fit for short-time saving of *Puccinia striiformis* while frozen condition was more proper for its long-time storage.

Key words: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; Culture purification; Culture storage

小麦条锈病是由条形柄锈菌小麦专化型(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)引起的世界性小麦病害, 也是我国小麦上最重要的病害, 主要在我国西北、西南、华北和淮北等地冬麦区和西北春麦区发生。该病害具有分布广、流行性强、危害严重的特点, 一般流行年份可使小麦减产 20% ~ 30%, 大流行年份可使小麦减产 60% ~ 90%, 甚至绝收^[1-2]。小麦条锈菌是专性寄生菌, 不能人工培养, 因此, 菌种的繁殖、纯化和保存在小麦条锈病科学研究中有着重要的意义。本研究在长期实践中探索建立了针对小麦条锈菌的、简便有效的单孢子堆分离纯化方

法与菌种保存方法。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 小麦品种 铭贤 169 为小麦条锈病高感品种; Trigo Eureka、Fulhard、保春 128 (Lutescens 128)、南大 2419 (Mentana)、维尔 (Virgilio)、阿勃 (Abbondanza)、早洋 (Early Premium)、阿夫 (Funo)、丹麦 1 号 (Danish 1)、尤皮 2 号 (Jubilejina 2)、丰产 3 号 (Fengchan 3)、洛夫林 13 (Lovrin13)、抗引 655 (Kangyin 655)、水源 11 (Suwon 11)、中四

收稿日期: 2010-12-22

基金项目: 现代农业产业技术体系建设项目专项资金项目

作者简介: 魏国荣 (1963-), 女, 陕西泾阳人, 实验师, 主要从事小麦条锈病研究。E-mail: zbwgr@nwsuaf.edu.cn

(Zhong 4)、洛夫林 10(Lovrin10)、Hybrid46、*Triticum spelta album* 和贵农 22(Guinong 22)19 个品种为中国小麦条锈病通用的鉴别寄主^[3]。

1.1.2 菌种 小麦条锈菌菌种为田间收集的混合菌种。

1.1.3 主要的材料和仪器 滑石粉、凡士林、4 号昆虫针或接种针、干燥器、冰箱等。

1.2 方法

1.2.1 菌种的纯化

1.2.1.1 小麦的培育 将小麦品种铭贤 169(对已知条锈菌小种均高度感病)种子播种于直径 10cm 的培养钵内,每钵播 8 粒种子,覆土厚约 1cm,置培育室(无条锈菌)15~18℃培养,待苗子长至第 1 叶充分展开时用于接种。

1.2.1.2 小麦条锈菌的接种 将待纯化菌种与滑石粉按 1:20~50 的比例混匀,用喷粉法进行接种。接种后的小麦置于 9~13℃黑暗条件中保湿 24h,然后取出置于温度为(15±2)℃,光强为 8000~10000lx,光照为 16h/d 的条件下培养。

1.2.1.3 小麦条锈菌的纯化 (1)小麦叶片脱蜡 用手蘸无菌水从小麦叶片下部向上抽提摩擦 2~3 次进行脱蜡处理,以听到叶片的摩擦声为宜。

(2)单孢子堆分离接种 选取小麦叶片上刚显孢的单个孢子堆,用一支已灭菌的 4 号昆虫针或接种针(末端尖锐)尖部,蘸取少许凡士林,粘附单个孢子堆上的孢子,轻轻移动针尖至待接种小麦的叶片上。一般以接种中间部位为好,且一片叶片只接种一次。然后另取一根针分离另一小麦叶片上的单孢子堆,如此重复数次即可完成单孢子堆的分离。

(3)小麦条锈菌的繁殖培养 将单孢子堆分离接种的小麦按照 1.2.1.2 所述方法进行常规培养。定期观察其病程发展情况,待肉眼可见侵染点时将其分开移栽,每个培养钵移栽一株,然后用塑料或玻璃罩隔离。待小麦叶片显孢后收集孢子,一盆(即一株)上的菌系为一个纯合的单孢子堆菌株,分别编号后在低温(4℃)下保存。

1.2.1.4 致病类型的鉴定 将 19 个鉴别寄主和对照小麦品种铭贤 169 共计 20 个品种,按顺序编号,每盆播种 4 个品种,待苗子长到一叶期时将每个菌系按上述方法接种、培养,15~20 d 后调查反应型,分 0、0₁、1、2、3、4 六个等级记载(表 1)^[4-5]。其中反应型 0、0₁、1、2 属于抗病表型,3、4 属于感病表型。

参照中国小麦条锈菌生理小种和致病类型^[6-7],根据不同菌系在 19 个鉴别寄主上的反应型,确定其分别属于哪种致病类型。

表 1 小麦对条锈菌的反应类型

反应型	记载符号	品种反应
免疫	0	不产生夏孢子堆,叶色正常,无症状
近免疫	0 ₁	不产生夏孢子堆,但产生枯死斑点和失绿反应
高抗	1	夏孢子堆很小,数量很少,周围有枯死反应
中抗	2	夏孢子堆小到中等,周围有枯死和失绿反应即“绿岛效应”
中感	3	夏孢子堆中等大小,周围无枯死反应,有轻微失绿现象
高感	4	夏孢子堆大而多,基本占满整张叶片

1.2.2 菌种的保存 将新鲜收集的条锈菌菌种置于干燥器内,待夏孢子干燥后进行真空封闭,然后分别在普通冰箱的冷藏室(4℃)和冷冻室(-20℃)以及-40℃冰箱内放置 1~5a。每一储存条件下的菌种分别保存至少 5 份。

将储存菌种按照 1.2.1.2 所述方法分别接种铭贤 169 小麦叶片,按照常规方法培养 15~20 d 后鉴定反应型,统计发病率。每个处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 菌种的纯化与鉴定

待纯化菌种经单孢子堆分离纯化后,在小麦品种铭贤 169 上进行扩大繁殖,然后将分离的不同菌系在 19 个鉴别寄主上进行反应型鉴定。表 2 为条中 32 号菌系纯化后鉴定的结果,经过分离纯化共获得 5 个不同单孢菌系,其反应型在中国鉴别寄主上略有差异,可根据其在鉴别寄主上的分化确定属于哪种致病类型。然后分别进行保存,在小麦锈病研究中可根据不同要求选取不同的单孢菌系。

2.2 菌种的保存

将储存于普通冰箱冷藏室和冷冻室 1~3 a 的小麦条锈菌菌种分别接种小麦品种铭贤 169,结果如表 3 所示。2006 年的菌种(3 a)经冷藏保存后接种小麦,发病率仅为 36.25%,而冷冻保存的发病率高达 93.52%,差异显著。2007 年的菌种(2 a),冷藏保存的发病率与冷冻保存的发病率差异较明显,达到 26.31 个百分点,但低于 2006 年(3 a)同样方式保存的发病率差异。2008 年保存的菌种,冷藏与冷冻保存后小麦的发病率差别较小。另外,不论是在冷藏条件还是冷冻条件下,保存年份愈久,孢子的活力就愈低,而且孢子活力随着时间的延长下降得也愈快。同时也尝试了-40℃保存,该条件下存放 5 a 的小麦条锈菌菌种,接种小麦发病率达到 95.76%,明显高于普通冰箱的冷冻保存。

表 2 小麦条锈菌条中 32 号及各单孢菌系在鉴别寄主上的反应型

鉴别寄主	条中 32 号	单孢菌系 1	单孢菌系 2	单孢菌系 3	单孢菌系 4	单孢菌系 5
T ngo Eureka	4	4	4	3	4	0;
Fullhard	4	4	4	4	0	4
保春 128(Lutescens 128)	4	4	4	4	4	4
南大 2419(M entana)	4	4	4	4	4	3
维尔(Virgilio)	4	4	4	4	4	4
阿勃(Abbondanza)	4	4	4	4	4	4
早洋(Early Premium)	4	4	4	4	4	2
阿夫(Funo)	4	4	4	4	4	4
丹麦 1 号(Danish 1)	4	2	3	3	2	2
尤皮 2 号(Jubilejina 2)	4	4	4	4	0, 1	4
丰产 3 号(Fengchan 3)	4	4	4	4	4	3
洛夫林 13(Lovrin13)	4	4	4	3	4	3
抗引 655(Kangyin 655)	4	4	4	4	4	4
水源 11(Suwon 11)	4	4	4	4	4	4
中四(Zhong 4)	0;	0	0	0	0	0
洛夫林 10(Lovrin10)	4	4	0	3	4	2
Hybrid46	4	0	4	4	4	3
<i>Triticum spelta album</i>	0;	0	0;	0;	0;	0;
贵农 22(Guinong 22)	0;	0	0;	0;	0	0;
铭贤 169	4	4	4	4	4	4

表 3 不同年份保存的小麦条锈菌接种麦苗的发病情况

保存年份	冷藏保存			冷冻保存		
	接种株数/株	发病株数/株	发病率/ %	接种株数/株	发病株数/株	发病率/ %
2008	99	85	85. 86	105	102	97. 12
2007	91	63	69. 23	112	107	95. 54
2006	80	29	36. 25	108	101	93. 52

3 结论与讨论

1) 条锈菌与小麦互作符合典型的“基因对基因”假说, 因此, 纯的条锈菌菌系对于条锈病抗病遗传、条锈菌与小麦不同品种互作等方面的研究具有重要的意义。目前, 单孢子分离的方法较多, 如采用玻璃纤维取孢接种法、水琼脂圆块取孢接种法或简易显微镜琼脂平板块取孢接种法进行单孢子分离^[1-2]。利用上述 3 种方法进行病原菌分离费时、费力, 而且操作起来比较复杂, 还容易造成污染。而本研究建立的单孢子堆分离方法, 简便、易行, 并可满足基本科研需求。但在单孢子堆分离过程中, 笔者建议多挑取几个孢子堆进行分离培养, 以选择满足自己试验要求的菌系用于后续的科学实验。这种单孢子堆分离方法同样也适合小麦叶锈病菌、小麦秆锈病菌、蚕豆锈菌、大麦锈菌和燕麦锈菌等的纯化, 因此给植病工作者提供了一种切实可行的菌种纯化

方法。

2) 小麦条锈菌是严格专性寄生性菌, 只能在活体上寄生, 因此, 要保存该菌种必须将其在感病小麦上进行周年繁殖。但是, 在不断的繁殖过程中菌种易发生适应性变异, 以及容易造成交叉污染, 给研究工作带来很大的不便。因此, 寻找一种简便易行的保存方法, 不仅可以节约大量的人力、物力, 还可为小麦条锈病的基础研究工作提供保障。

常规的保存方法一般是抽真空后封管采用液氮或冷藏保存(4℃), 前者保存的菌种虽然可以 3~5 a 扩繁一次, 但是需要特殊的装置, 并且在保存过程中必须要定期补充液氮, 费用比较昂贵; 而后者保存的菌种存活期比较短, 一般每年都需繁殖一次, 工作量较大。在近 10 a 的小麦条锈病研究过程中, 笔者利用实验室现有条件对小麦条锈菌菌种的保存做了大量尝试, 并对每种方法保存的菌种的活力进行了鉴定。结果表明, 采用普通冰箱冷冻室(-20℃)保存菌种的方法, 孢子的存活率明显高于冷藏保存下的存活率, 年限越长, 差异越明显, 而且冷冻保存 3 a 的菌种致病率仍在 93% 以上, 因此, 冷藏保存的菌种须在 2 a 内用于试验, 而采用冷冻保存法, 菌种保存 3~5 a 甚至更长时间仍可用于科学试验。冷冻法既克服了前人保存菌种方法的缺点, 又简单、经济。

(下转第 99 页)

表 3 不同剂量 15.8%精喹禾灵 EC处理区的测产结果

处理	产量/(kg/hm ²)					显著性		增产率/%
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均产量	5%	1%	
T ₁	1950.11	2050.17	2130.11	2100.11	2057.63	b	C	7.76
T ₂	2050.11	2150.10	2200.12	2200.13	2150.12	cd	CD	12.60
T ₃	2050.13	2300.12	2275.13	2225.12	2212.63	de	DE	15.88
T ₄	2225.14	2350.14	2275.13	2287.50	2284.48	e	E	19.64
T ₅	2200.10	2100.11	2220.14	2150.14	2167.62	d	CDE	13.52
T ₆	2000.00	2050.17	2100.50	2140.50	2072.79	bc	C	8.55
CK	1800.11	1920.10	1900.10	2017.50	1909.45	a	A	—

3 结论与讨论

1) 15.8%精喹禾灵 EC 是春油菜田防除旱雀麦和野燕麦的优良除草剂, 适宜剂量分别为 375 mL/hm²、300 mL/hm², 在油菜 2~5 叶期(旱雀麦 1~4 叶期、野燕麦 2~4 叶期)每公顷对水 300 L 茎叶喷雾处理, 对 2 种杂草的防效在 80%以上。

2) 15.8%精喹禾灵 EC 对油菜安全, 在推荐剂量下防除杂草后油菜增产 10%以上。

3) 15.8%精喹禾灵 EC 仅对油菜田旱雀麦、野燕麦有效, 使用后还需注意及时防除阔叶类杂草。

参考文献:

[1] 李扬汉. 中国杂草志[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[2] 辛存岳, 邱学林, 郭青云, 等. 青海湖环湖地区农田杂草的防治[J]. 植物保护, 2001, 27(2): 42-43.

[3] 辛存岳, 郭青云. 青海春油菜连作区田间草害成因及可

持续治理对策[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006: 347-349.

[4] 余绪斌. 精禾草克防除油菜田旱雀麦试验初报[J]. 青海农林科技, 2002(1): 23.

[5] 魏有海, 郭青云, 郭良芝, 等. 青海省旱雀麦生物学特性及其发生危害与防除[J]. 中国植保导刊, 2010, 30(1): 30-32.

[6] 杨小琴, 黄祖红, 楼守炳. 精喹禾灵乳油防治油菜田禾本科杂草试验初报[J]. 浙江农业科学, 2009(2): 395-396.

[7] 郭良芝, 郭青云, 辛存岳, 等. 5%精喹禾灵 EC 防除春油菜田野燕麦药效试验研究[J]. 甘肃农业, 2006(8): 92.

[8] 陆强, 冯克强. 8.8%精喹禾灵 EC 防除冬油菜田禾本科杂草的研究[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(1): 42.

[9] 翁华, 邱学林, 郭青云, 等. 8%精喹禾灵乳油防除春油菜田野燕麦的效果研究[J]. 甘肃农业科技, 2005(2): 49-50.

[10] 林昌志. 5%精喹禾灵微乳剂的研究和开发[J]. 安徽化工, 2004(1): 33-34.

(上接第 92 页)同样, -40℃条件保存更优于普通冰箱冷冻室的存放, 但是其保存费用也明显高于后者。此外, 对小麦叶锈病菌、小麦秆锈病菌、蚕豆锈菌、大麦锈菌和燕麦锈菌等不同菌种利用上述冷冻方法进行保存, 同样取得了比较理想的效果, 说明这种冷冻保存方法适合于一般锈菌菌种的保存。

由于实验室条件在不断改善, 菌种保存的方法也在不断更新。目前, 笔者正在尝试利用 -80℃条件保存小麦条锈菌, 3~5a 后进行接种试验, 期望能够长时间保存该菌种, 以利于今后的科学研究, 但这需要一个较长的时间去完成。

参考文献:

[1] 李振岐, 曾士迈. 中国小麦锈病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.

[2] 李振岐, 商鸿生. 小麦锈病及其防治[M]. 上海: 上海科技出版社, 1989.

[3] 中国农业科学院植物保护研究所. 小麦抗病虫害性评价技术规范第 1 部分: 小麦抗条锈病评价技术规范(农业行业标准)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.

[4] 万安民. 小麦条锈菌鉴别寄主和小种命名现状[J]. 植物病理学报, 2003, 33(6): 481-486.

[5] 万安民, 吴立人, 金社林, 等. 2000—2001 年我国小麦条锈病发生和生理小种监测结果[J]. 植物保护, 2002, 28(3): 5-9.

[6] 全国小麦条锈菌生理小种监测协作组. 1998 年我国小麦条锈病发生情况和生理小种监测结果[J]. 植物保护, 1999, 25(5): 15-17.

[7] 贾秋珍, 金社林, 曹世勤, 等. 2002—2003 年甘肃省小麦条锈菌生理小种监测结果[J]. 植物保护, 2005, 31(2): 44-47.