

小麦白粉菌喷雾接种方法建立及其在生物测定上的应用

Establishment of inoculation by spray of wheat powder mildew conidia and its application in the bioassay determination

史文琦 刘美玲 陈婷婷 薛敏峰 龚双军* 杨立军*

(湖北省农业科学院植保土肥研究所, 农业部华中作物有害生物综合治理重点实验室,
农作物重大病虫害防控湖北省重点实验室, 武汉 430064)

SHI Wenqi LIU Meiling CHEN Tingting XUE Minfeng GONG Shuangjun* YANG Lijun*

(Hubei Province Key Laboratory for Control of Crop Diseases, Pest and Weeds; Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crop in Central China, Ministry of Agriculture; Institute of Plant Protection and Soil Science, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, Hubei Province, China)

目前, 黄瓜、南瓜、西瓜、葫芦、辣椒、番茄、草莓、葡萄、苹果、甜瓜、橡胶和烟草上的白粉菌可采用分生孢子水悬浮液喷雾法和抖落法进行接种(Sivapalan, 1993); 而小麦、大麦、月季、豌豆和苜蓿上的白粉菌只能采用抖落法接种(刘爱媛, 2002; 纪程等, 2013)。但抖落法在接种前难以定量; 且存在操作误差, 接种差异大, 试验重复性差。针对小麦白粉菌接种方法在药剂生物测定中存在的问题, 本研究拟建立一种稳定且可重复的小麦白粉菌喷雾接种方法, 以期小麦室内苗期抗性鉴定、白粉菌-寄主互作表型精准鉴定提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及菌种: 小麦材料为铭贤 169, 高感小麦白粉病, 在蛭石: 草炭: 土壤=1:1:2 的育苗基质中培养至第 1 叶完全展开时备用; 小麦白粉菌菌株 52-27 采自新疆维吾尔自治区; 均由湖北省农业科学院植保土肥研究所小麦病害课题组保存并提供。

培养基、药剂、试剂及仪器: 水琼脂(water agar, WA)培养基: 琼脂 5 g、0.2% 苯并咪唑 3 mL、蒸馏水 1 L。95.5% 三唑酮(triadimefon)原药, 中国农业大学种子病理药理实验室。电子氟化液 FC-40、NOVEC™ 7100, 3M 中国有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。Poter 喷雾塔, 英国 Burkard 科学仪器公司; Olympus CX43 光学显微镜, 奥林巴斯(中国)有限公司。

1.2 方法

载浮剂的筛选: 选取 FC-40、NOVEC™ 7100、异十六烷和去离子水作为小麦白粉菌分生孢子载浮

剂。取铭贤 169 小麦第 1 片完全展开叶中段, 正面朝上放于 WA 平板上, 接种菌株 52-27 分生孢子, 于 17±1℃、18 h 光照/6 h 黑暗条件下培养, 待产生大量分生孢子, 收集备用。分别称取 12 mg 分生孢子, 加入上述 4 种载浮剂 4 mL, 振荡 30 s 制成分生孢子悬浮液。取小麦铭贤 169 第 1 片完全展开叶中段, 以每个 WA 平板上正面朝上摆 10 片长约 3 cm 的叶段为 1 个重复, 每种载浮剂 3 次重复, 采用喷雾塔喷雾接种 4 mL 分生孢子悬浮液, 分别以等量载浮剂喷雾处理为阴性对照, 观察对小麦叶片有无伤害。接种后于上述培养条件下培养 7 d, 采用手持 10 倍放大镜统计白粉菌侵染点数并比较发病均匀程度。

表面活性剂的筛选: 在分生孢子悬浮液中添加表面活性剂会使接种更加均匀分散, 选择吐温-20、农乳 500 号和十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)进行筛选。分别取 4 mL 分生孢子悬浮液, 加入吐温-20、农乳 500 号使二者终浓度均为 2.5%(V/V), 加入 SDS 使其终浓度为 10 mg/L。喷雾接种和调查方法同上。

分生孢子悬浮液浓度的筛选: 于 4×10 倍显微镜下, 调整分生孢子浓度分别为 5~10、15~20、30~40、50~60 和 70~80 个, 每个浓度取 4 mL 进行喷雾接种, 以筛选最佳接种浓度, 接种和调查方法同上。

所建喷雾接种法的应用效果: 通过测定三唑酮对小麦白粉菌菌株 52-27 的 EC₅₀ 来比较所建喷雾接种法和抖粉法在生物测定上的效果。将三唑酮原药配成质量浓度为 1×10⁴ mg/L 的母液, 分别稀释至 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg/L 备用。参照上述方法

制备铺有4片叶段的WA平板,采用所建喷雾接种法喷雾白粉菌分生孢子悬浮液4 mL,晾干后再用喷雾塔将药液喷洒到叶段上,每浓度喷洒4 mL,放置过夜,晾干后调查,方法同上。每4片叶段为1个重复,每个浓度3次重复,以喷雾等量清水为空白对照,以喷雾等量 1.25×10^{-3} mg/L 甲醇为阴性对照。抖粉法接种是在铺有4片叶段的WA平板上吹接10 d菌龄的白粉菌分生孢子,药剂处理方式同上。整个试验设9次平行重复。计算药剂对白粉菌的抑制率及抑制中浓度 EC_{50} 。抑制率=(对照侵染点数-处理侵染点数)/对照侵染点数 $\times 100\%$ 。以抑制率的概率值为 y 轴,药剂质量浓度对数为 x 轴,求出毒力回归方程 $y=a+bx$ 和决定系数,计算 EC_{50} 。用SPSS 20.0软件统计9次试验 EC_{50} 的平均数、标准差、变异系数和95%置信限。

1.3 数据分析

采用SPSS 20.0软件对试验数据进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同载浮剂对接种效果的影响

FC-40和NOVEC™ 7100对小麦叶片无伤害,载浮白粉菌分生孢子后对其萌发无影响,能形成侵染点且接种均匀;其中FC-40载浮后形成的侵染点为69个,显著多于NOVEC™ 7100载浮后的52个($P < 0.05$)。异十六烷对小麦叶片有一定伤害,具似开水烫伤症状;去离子水载浮分生孢子后对小麦叶片不

能形成侵染点。因此选择FC-40作为载浮剂。

2.2 不同表面活性剂对接种效果的影响

添加表面活性剂SDS和吐温-20的喷雾接种处理小麦单个叶片上病斑数分别为99个和87个,前者显著高于后者($P < 0.05$),而二者均显著高于阴性对照($P < 0.05$);添加农乳500号喷雾接种处理没有形成侵染点。因此选择SDS作为表面活性剂。

2.3 不同孢子浓度对接种效果的影响

随着白粉菌分生孢子悬浮液浓度的升高,小麦单个叶片上的病斑数显著增加($P < 0.05$)。当浓度为50~60、70~80个时,病斑数分别为81、95个,变异系数分别为28.34、39.87,但多数病斑连在一起,影响调查结果准确性;当浓度为30~40个时,病斑数为64个,变异系数为16.79,但部分病斑连在一起;当浓度为5~10个时,病斑数仅21个,变异系数为17.83,不利于数据处理;当浓度为15~20个时,病斑数为47个,数量适中,分布均匀,便于调查,确定为最适接种浓度。

2.4 所建喷雾接种法在生物测定上的应用效果

采用抖粉法接种后,三唑酮对小麦白粉菌菌株52-27的 EC_{50} 较大,为0.61 mg/L,变异系数较大,为35.27,9个测量值在置信限范围内的有6个。采用喷雾法接种后,三唑酮对小麦白粉菌菌株52-27的 EC_{50} 较低,为0.09 mg/L,变异系数较小,为14.50,9个测量值都在置信限范围内(表1)。表明所建喷雾接种法对供试小麦白粉菌菌株更敏感、效果更稳定。

表1 不同接种方法下三唑酮对小麦白粉菌菌株52-27的 EC_{50}

Table 1 The EC_{50} of triadimefon to wheat powder mildew 52-27 strain by different inoculation methods

接种方式 Inoculation method	EC_{50} 平均数(范围) Mean of EC_{50} (range)/ (mg/L)	标准差 SD	变异系数 Coefficient variation	95% 置信限 95% confidence interval	置信限外(内)个数 No. of confidence limits outside (inside)
抖粉法 Shake conidia	0.61 (0.45~0.71)	0.21	35.27	0.50~0.71	3(6)
喷雾接种法 Spray inoculation	0.09 (0.08~0.10)	0.01	14.50	0.08~0.11	0(9)

3 讨论

本研究建立的小麦白粉菌喷雾接种法以FC-40载浮分生孢子,加入10 mg/L表面活性剂SDS,在4 $\times$ 10倍显微镜下每视野分生孢子数为15~20个,接种效果良好,可用于小麦杀菌剂敏感性测定和小麦白粉菌抗药性监测。Sørensen et al. (2016)发现用NOVEC™ 7100悬浮小麦条锈菌 *Puccinia striiformis* 分生孢子并喷雾接种小麦,接种效果明显,抗性鉴定表型稳定。本研究发现其同类产品FC-40的效果优于NOVEC™ 7100,这可能与不同的专性寄生菌有关,也可能与载浮剂的物理性质不同有关。抖粉法不能保证每次接种量一致,测定的 EC_{50} 值差异大,重复性差;喷雾接种法可以精准控制接种量,减少由于接种浓度造成的人为误差,测定结果更稳定可靠。

参考文献 (References)

- JI C, QIU XQ, ZHANG H, JIAN HY, WANG QG, TANG KX. 2013. Powdery mildew resistance identification of Chinese old garden roses. *Northern Horticulture*, (9): 146-148 (in Chinese) [纪程, 邱显钦, 张颢, 蹇洪英, 王其刚, 唐开学. 2013. 中国古老月季资源的白粉病抗性鉴定. *北方园艺*, (9): 146-148]
- LIU AY. 2002. Identification method of resistance of pea to powdery mildew using detached leaves. *Journal of Plant Protection*, 29 (2): 119-123 (in Chinese) [刘爱媛. 2002. 豌豆离体叶片鉴定白粉病抗性方法. *植物保护学报*, 29(2): 119-123]
- SIVAPALAN A. 1993. Effects of water on germination of powdery mildew conidia. *Mycological Research*, 97(1): 71-76
- SØRENSEN CK, THACH T, HOVMØLLER MS. 2016. Evaluation of spray and point inoculation methods for the phenotyping of *Puccinia striiformis* on wheat. *Plant Disease*, 100(6): 1064-1070

(责任编辑:李美娟)