

禾谷多粘菌对小麦梭条斑花叶病毒的
传播及其土壤侵染潜力的测定

陈剑平

(浙江省农业科学院病毒学实验室, 杭州 310021)

S432.41

A 提要 从大田侵染小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)的小麦病根中挑取禾谷多粘菌休眠孢子堆, 接种受侵染小麦品种扬麦4号, 经砂培养纯化, 获得5个禾谷多粘菌分离物, 但都为无毒。无毒多粘菌休眠孢子堆接种表现WSSMV症状的小麦, 经培养可诱获病毒, 并可经接种后将病毒传播给无病小麦。供试的4个大小麦禾谷多粘菌分离物都可对大小麦进行交叉侵染, 产生同样数量(每克鲜根 10^5 个游动孢子)的游动孢子产量。供试5个病土和2个无病土样品中, 都具有强大的多粘菌侵染潜力, 即使稀释3125倍, 甚至15625倍, 还可以监测品种扬麦4号根上观察到休眠孢子堆, 而且病土中WSSMV侵染潜力也很强, 经稀释625倍, 甚至15625倍, 还能在监测植株根上检测到病毒。

关键词 禾谷多粘菌, 小麦梭条斑花叶病毒, 分离, 诱毒, 传毒, 侵染潜力

小麦; 梭条花叶病毒
禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)是禾本科植物的一种专化寄生菌, 传播小麦梭条斑花叶病毒(Wheat Spindle Streak Mosaic Virus, WSSMV)等9种禾谷类病毒。WSSMV是我国小麦上的一种重要病害, 在浙江、江苏、湖北、河南、陕西等省均造成危害, 至今都是使用抗病品种进行防治。侯庆树等经多年研究, 认为我国WSSMV存在着致病性分化^[1]。由于小麦品种的抗性会随着病毒新株系的出现而丧失, 以及禾谷多粘菌也是其他麦类病毒的介体, 从而要研究WSSMV株系及多粘菌小种在病害流行病学中的作用, 必须先分离纯化禾谷多粘菌分离物、建立其培养和诱毒、传毒体系, 测定土壤中禾谷多粘菌和WSSMV的侵染潜力。本文报道上述方面研究的初步结果。

材料与方 法

1 毒源 5个供试毒源(病土和病小麦根)分别来自四川雅安、陕西长安、浙江安吉和新昌, 以及江苏宜兴的小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)病田, 其中浙江和江苏的毒源复合侵染土传小麦花叶病毒(SBWMV)^[2]。2个无病土样品来自浙江省农科院农场和英国洛桑试验站农场的小麦田。WSSMV和SBWMV抗血清分别由美国堪萨斯州立大学K. Z. Haufler博士和美国内布拉斯加州州立大学W. G. Langenberg教授赠送。

2 禾谷多粘菌纯系的分离和培养 在双筒镜下, 用尖头镊子从小麦病根上挑取禾谷多粘菌休眠孢子堆(不带根表皮组织)于盖玻片上的水滴中, 每片放50—60个休眠孢子堆, 接种经催芽的小麦种子(感病品种扬麦4号或浙麦1号), 然后参见文献^[3]进行砂培养。

本文于1992年10月15日收到, 1992年12月19日修回

• 通讯地址: Virology Laboratory, Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, UK

3 WSSMV 摩擦接种 用典型症状的新鲜小麦病叶,以 1g:10ml 的比例加入 pH7.0 0.1mol/L K_2HPO_4 ,在组织捣碎机中捣碎,过滤,每 50ml 汁液中加入 1g 金刚砂(500 目),用喷枪接种繁殖寄主(扬麦 4 号),接种压力为 $4 \times 10^5 Pa$,接种后,麦苗用自来水冲洗,遮荫 24 小时,在人工气候室或温室(温度 10℃,光照时间 12 小时/天,光照强度 14000 Lux)生长至症状出现。

4 禾谷多粘菌饲毒和传毒 在经摩擦接种表现 WSSMV 症状的小麦植株根上,接种经纯化的无毒禾谷多粘菌安吉分离物的休眠孢子堆,继续按文献^[2]方法培养以伺获 WSSMV,培养 6 星期后,从小麦根上释放禾谷多粘菌游动孢子,接种经催芽处理的扬麦 4 号种子进行传毒试验。游动孢子浓度测定,接种和培养方法参见文献^[2]。

5 大小麦禾谷多粘菌分离物的交叉侵染 用经纯化的禾谷多粘菌上海农科院和浙江萧山大麦分离物^[2]休眠孢子堆接种小麦品种扬麦 4 号和浙麦 1 号,以大麦品种早熟 3 号为对照;反之,用禾谷多粘菌四川雅安和浙江安吉小麦分离物休眠孢子堆接种大麦品种早熟 3 号和盐辐矮早 3,以扬麦 4 号为对照。接种、培养方法参见文献^[2]。8 星期后,从大小麦根上分别释放游动孢子,并计算出每克根释放的游动孢子产量。

6 土壤中禾谷多粘菌和 WSSMV 侵染潜力 取上述 5 个供试病土和 2 个无病土样品,用研钵研磨碎后,去除石块和植物残体,再用消毒细砂系列稀释成 1/25,1/125,1/625,1/3125,1/15625 和 1/78125。每一稀释度分别种 10 颗扬麦 4 号种子,然后置温室按摩擦接种植株培养条件培养。在培养的 8 个星期中,第 2—3 星期保持土壤水过饱和。8 星期后用双筒镜检查每株小麦根中禾谷多粘菌休眠孢子堆,并用 ELISA^[1]检测每株小麦根中的 WSSMV。

结果与分析

1 禾谷多粘菌纯系的分离和培养 田间采集的病麦根,除含有禾谷多粘菌休眠孢子堆外,还含有其他多种真菌,必须除去^[3]。通过从田间病麦根上挑取禾谷多粘菌休眠孢子堆,接种经催芽的扬麦 4 号和浙麦 1 号,经砂培养 8 星期后,获得了四川雅安、陕西长安、浙江安吉和新昌、江苏宜兴等 5 个小麦禾谷多粘菌纯系。接种此 5 个纯系于扬麦 4 号种子,所有成苗的植株不表现症状,ELISA 也检测不到 WSSMV 和 SBWMV,表明为无毒禾谷多粘菌纯系,重复 3 次挑取休眠孢子堆进行接种培养,都没有分离到带有 WSSMV 和/或 SBWMV 的禾谷多粘菌纯系。

2 禾谷多粘菌饲毒和传毒 将无毒的禾谷多粘菌浙江安吉小麦分离物休眠孢子堆接种于表现 WSSMV 症状的侵染品种扬麦 4 号的根上,10℃温室中进行砂培养,培养 8 星期后,从小麦根上释放禾谷多粘菌游动孢子,测得其浓度为 $7.91 \times 10^5/ml$,然后用此游动孢子悬浮液接种经催芽的扬麦 4 号种子,15℃接种 8 小时后,将种子种于 5 个塑料钵头,每钵 3 粒种子,10℃下进行砂培养。6 星期后,2 个钵内各有一株苗表现 WSSMV 症状,表明禾谷多粘菌可从病小麦根上伺获 WSSMV,并将其传播给健康小麦植株。继续培养,病株数没有增加。待休眠孢子形成后,收集表现症状植株根上的休眠孢子堆。

将以上实验收集的带有 WSSMV 的禾谷多粘菌休眠孢子堆接种经摩擦接种表现 SBWMV 症状的小麦根部,以试图伺获 SBWMV,但二次重复都没有成功。不过,被接种的 6 株小麦植株,经培养 4 星期后,用 ELISA 不仅可检测到 SBWMV,而且其中 3 株还可检测到 WSSMV,表明禾谷多粘菌将其携带的 WSSMV 传给了已侵染 SBWMV 的小麦植株。

3 大小麦禾谷多粘菌分离物的交叉侵染 用禾谷多粘菌 2 个大麦分离物(上海农科院和浙江萧山)、2 个小麦分离物(四川雅安和浙江安吉)的休眠孢子堆分别接种小麦和大麦。每个大麦分离物接种 2 个小麦品种(扬麦 4 号和浙麦 1 号),并以感病大麦品种早熟 3 号为对照;同样每

个小麦分离物接种 2 个大麦品种(早熟 3 号和盐辐矮早 3), 并以扬麦 4 号为对照。每个多粘菌/品种组合各设 3 个塑料钵, 每钵 3 株苗, 对照组合各设 1 个钵 3 株苗。10℃下砂培养 8 星期后, 以钵为单位从麦根上释放游动孢子, 测定各游动孢子悬浮液浓度, 并折算成每克鲜根游动孢子产量。结果表明, 各多粘菌分离物/品种组合中每 3 个钵大小麦根上游动孢子产量相近, 表 1 为各禾谷多粘菌分离物在不同大小麦品种根上游动孢子的平均产量。从表 1 结果可见, 4 个供试的禾谷多粘菌大小麦分离物不仅可侵染其来源大麦或小麦寄主, 而且可以同样程度地交叉侵染小麦或大麦, 产生同样数量的游动孢子, 不存在寄主专化性。传毒试验表明, 这个游动孢子产量对病毒的有效传播是足够的。

表 1 4 个不同来源的禾谷多粘菌分离物对大小麦的交叉侵染

Table 1 Cross infections of the four different sources of *Polygramma graminis* isolates to barley and wheat plants

禾谷多粘菌分离物 <i>P. graminis</i> isolate		接种品种 Inoculated cv	根鲜重 Root fresh wt(g)	游动孢子浓度 Zoospore concentration (50 ml, 10 ⁴)	每克根游动孢子产量 Zoospore Production per gram of fresh root (10 ⁵)
分布 Location	原始寄主 Original host				
上海 Shanghai	大麦 Barley	扬麦 4 号 Yangmai 4	3.52	3.90	5.30
		浙麦 1 号 Zhamai 1	7.13	0.44	0.65
		早熟 3 号(对照) Zhaoshu 3(ck)	8.47	1.04	0.62
萧山 Xiaoshan	大麦 Barley	扬麦 4 号 Yangmai 4	4.27	12.60	14.23
		浙麦 1 号 Zhemai 1	7.64	3.08	2.37
		早熟 3 号(对照) Zhaoshu 3(ck)	16.00	7.95	2.49
雅安 Ya'an	小麦 Wheat	早熟 3 号 Zhaoshu 3	4.34	2.26	2.33
		盐辐矮早 3 Yanfuaizhao 3	4.94	1.47	1.43
		扬麦 4 号(对照) Yangmai 4(ck)	10.78	6.25	2.90
安吉 Anji	小麦 Wheat	早熟 3 号 Zhaoshu 3	7.10	3.00	2.09
		盐辐矮早 3 Yanfuaizhao 3	6.64	1.89	1.29
		扬麦 4 号(对照) Yang mai 4(ck)	6.30	24.40	19.40

4 土壤中禾谷多粘菌和 WSSMV 的侵染潜力 取供试的 5 个病土和 2 个无病土,经细砂 5 倍系列稀释至 1/78125,每稀释度种 10 株扬麦 4 号小麦,10℃ 温室培养 8 星期后,用双筒镜检查每株小麦根上的禾谷多粘菌休眠孢子堆,并用 ELISA 检测每株小麦根中的 WSSMV,2 次重复结果相似,表 2 为一个实验的结果。从表 2 可见,不管是病土,还是无病土,都含有大量的禾谷多粘菌,无明显差异,应用此方法,即使将土样稀释 3125 倍,甚至 15625 倍(雅安、新昌、安吉)还能检测到禾谷多粘菌侵染。同样,在病土中,结合 ELISA 试验,即使稀释 625 倍,甚至 15625 倍(雅安、新昌)也可有效地检测到 WSSMV。由于禾谷多粘菌和 WSSMV 的侵染潜力几乎处于同一水平,只要小麦根部受禾谷多粘菌侵染 WSSMV 就有可能发病,从而推测多粘菌孢子内带毒量是很大的。结果也表明,禾谷多粘菌地理分布很广,即使是无病田,也存在很强的侵染潜力,稀释 3125 倍,甚至 15625 倍,还能有效地侵染小麦,从而只要 WSSMV 等土传病毒传入,就可建立侵染,蔓延,造成危害。在各土样中,还经常可见到油壶菌(*Olpidium*)和腐霉(*Pythium*)等低等专性寄生菌。为了排除这些杂菌可能的干扰,在精确实验中,应该使用纯化了的禾谷多粘菌分离物。

表 2 种子系列稀释度土样中的小麦植株根上禾谷多粘菌和 WSSMV 的检测

Table 2 Detection of *Polymyxa graminis* and WSSMV in roots of bait wheat plants grown on serial dilutions of soil samples

供试土样 Soil samples tested	侵染禾谷多粘菌和 WSSMV 的植株百分率 % of plants infected with <i>P. Graminis</i> and WSSMV					
	土样系列稀释度 * Serial dilutions of soil samples *					
	1/25	1/125	1/625	1/3125	1/15625	1/78125
病土 Infected soils						
雅安 Yaan	100(40)**	100(50)	70(10)	40(10)	10(0)	0(0)
长安 Changan	100(70)	100(40)	40(10)	10(0)	0(0)	0(0)
新昌 Xinchang	100(60)	80(40)	80(50)	80(40)	40(10)	0(0)
安吉 Anji	100(30)	90(10)	50(40)	70(20)	30(0)	0(0)
宜兴 Yixing	100(80)	90(60)	90(20)	40(0)	0(0)	0(0)
无病土 Health soils						
杭州 Hangzhou	100(0)	100(0)	70(0)	40(0)	0(0)	0(0)
洛桑 Rothamsted	100(0)	80(0)	50(0)	10(0)	10(0)	0(0)

* 每一稀释度土样种 10 株苗 10 plants per dilution

** 括号内数据为经 ELISA 检测含有 WSSMV 的植株百分率

Data in parentheses showed percent of WSSMV infected plants detected by ELISA tests.

讨 论

要测定土壤中禾谷多粘菌休眠孢子堆的绝对数量,不同环境条件下休眠孢子萌发率、带毒率、带毒量以及侵染小麦根系导致发病所需的最小游动孢子数量,是非常困难的,然而,要

确定一个品种或种质是否抗多粘菌介体,必须搞清上述问题才能提出确切的、具有科学意义的指标。研究表明,在实验室条件下,50—60个休眠孢子堆所释放的上千个游动孢子可以有效地建立侵染,但在受侵染小麦品种扬麦4号和浙麦1号上繁殖纯化所获得的5个禾谷多粘菌纯系无一带有WSSMV,表明禾谷多粘菌带毒率很低,从病麦根上挑取的休眠孢子堆可能都无毒,或带毒的休眠孢子未萌发,也可能萌发释放的游动孢子未能有效地侵染小麦。我们从侵染大麦和性花叶病毒(BaMMV)的大麦根上分离纯化的禾谷多粘菌也遇到同样的情况,并用胶体金标记技术证实禾谷多粘菌带毒率很低(仅约1%)^[6]。

多次实验表明,要使游动孢子接种成功,必须用新制备的高浓度(大于 10^5 /ml)游动孢子悬浮液(含0.5%小牛血清)在15℃条件下迅速接种。但绝大部分游动孢子因操作损伤或没及时接触到根系而失去了侵染性。要确定品种和种质是否对多粘菌介体具有抗性,可能应该考虑寄主植物对游动孢子敏感性而不是寄主根上所形成的休眠孢子堆数量。因为有些品种和种质,游动孢子可以有效地将病毒传播进去,但游动孢子在其根上不完成生活史,从而不形成或极少形成休眠孢子堆,如果把这类品种或种质视为多粘菌抗原是没有科学意义的。

在我们的实验体系中,虽然尚未直接分离到带有WSSMV的禾谷多粘菌纯系,但可容易地通过饲毒试验,使无毒多粘菌分离物变成带有WSSMV,并可将WSSMV传播给小麦植株的多粘菌介体,然而,试图将带有WSSMV的多粘菌分离物通过饲毒试验以获得SBWMV则没有成功,从而尚无法断定一个禾谷多粘菌孢子是否可同时携带2种病毒。这个有意义的实验尚在继续中。

有研究表明,禾谷多粘菌存在寄主专化性或生理小种。Signoret(私人通讯)发现法国Card的WSSMV病田中的禾谷多粘菌不能侵染大麦,但对小麦则具有很强的侵染性。Bastin等^[6]从大麦根上获得的5个多粘菌分离物仅侵染大麦而不侵染小麦。相反,Barr^[7]在加拿大报道,禾谷多粘菌小麦分离物可以侵染大麦和小麦。本研究供试的4个多粘菌大小麦分离物均可同样程度地侵染大麦和小麦。从而认为不同地区分布的禾谷多粘菌存在着寄主范围的差异。

在不同稀释度的土样中种植受侵染小麦品种,通过禾谷多粘菌休眠孢子堆观察和WSSMV血清学检测,可以灵敏而有效地诊断不同来源土样中禾谷多粘菌和WSSMV的侵染潜力,监测病害蔓延趋势和危害程度。有些地区,由于环境条件不适于发病,或使用抗病或耐病品种,因症状没有表现而在生产上受到忽视,成为隐藏着的毒源,或一旦耕作制度变化或更换品种病害就会暴发。针对这些情况,此项技术在病害普查中具有现实意义。

参 考 文 献

- 1 侯庆树,周益军,程兆榜,等.小麦梭条花叶病致病类型的比较研究.第二届全国病毒学学术会议论文集,1991,277
- 2 陈剑平.我国大麦黄花叶病毒及其介体禾谷多粘菌研究进展.中国病毒学,1992,8(2):181—184
- 3 陈剑平,董冯佳,陶金斐,等.胶体金免疫电镜技术检测和鉴定病汁液中不同形态的植物病毒.植物病理学报,1993,23(2)
- 4 陈剑平,阮义理.应用F(ab')₂-酶联吸附分析法检测大麦黄花叶病毒.中国病毒学,1991,6(4):356—364
- 5 Chen Jiangping, M J Adams, Luan Yili. Barley Mild Mosaic Virus inside its fungal vector *Polymyxa graminis*. *Annals of Applied Biology*, 1991, 118: 615—621
- 6 Bastin V, Boute C, Maraite H. Inoculum potential and host range of *Polymyxa graminis*. *Bulletin OEPP - EPPO Bulletin*, 1989, 19(3): 541—546

- 7 Barr D J S, V E Handland-Hartmann. Zoospore ultrastructure of *polycytrium plurigibbosum*. Canadian Journal of Botany. 1979, 57(1) : 48~53

Transmission of Wheat Spindle Streak Mosaic Virus by *Polymyxa graminis* and Inoculum Potential of the Infected Soils

Chen Jianping

(Virology Laboratory, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Five virus free isolates of *Polymyxa graminis* were purified through sand culture of susceptible wheat cv Yangmai 4 inoculated with selected cystosori from diseased wheat roots which were collected from wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV) infected fields. The virus free *P. graminis* acquired WSSMV by mean of inoculation of the cystosori to the roots of wheat plants bearing WSSMV symptom and then transmitted the virus to the healthy wheat plants after further inoculation. The four isolates of *P. graminis* (2 from wheat and 2 from barley) tested cross infected barley (cvs Zhaoshu 3 and Yanfuaizhao 3) and wheat (Yangmai 4 and Zhemai 1) to give large zoospore production per gram of fresh root ($10^5/g$). Either the three infected soils or the two healthy soils tested had powerful inoculum potential of *P. graminis* and WSSMV, of which, cystosori on bait plants (cv Yangmai 4) growing on soil dilution of 1/3125, even 1/15625, were still observed, meanwhile, WSSMV was detected from the roots of bait plants growing in the soil which were diluted of 1/625, even 1/15625.

Key Words *Polymyxa graminis*, Wheat Spindle Streak Mosaic Virus, Isolation, Virus Acquisition, Virus Transmission, Inoculum Potential