

# 禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)侵染及传毒体系的研究<sup>\*</sup>

田兆丰<sup>\*\*</sup> 陈笑瑜 朱 坤 于嘉林<sup>\*\*\*</sup> 刘 仪

(中国农业大学农业生物技术国家实验室 北京 100094)

**摘 要:**在人工气候箱内,以小麦为寄主建立了专性寄生禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis*)的侵染体系,使 *P. graminis* 能够快速大量繁殖,生活史缩短为 13~15d。简化了单孢子堆分离以及病根表面消毒等分离纯化方法,对接种菌源材料、寄主苗龄、温度、pH 值及营养液成分等影响因素进行了测定,优化完善了 *P. graminis* 的砂培条件。建立了针对小麦黄花叶病毒(wheat yellow mosaic virus, WYMV)的稳定高效室内传毒体系。在此体系上,真菌传带病毒的效率可达 70%。机械接种病毒后的小麦显症时间可缩短至 30d 左右。

**关键词:**禾谷多粘菌,小麦黄花叶病毒,侵染,真菌传毒

中图分类号 S432.4 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2000)04-0352-58

禾谷多粘菌(*Polymyxa graminis* Ledingham)为鞭毛菌亚门多粘菌属的低等专性寄生菌,除了能够侵染大麦、小麦和水稻等多种重要农作物并可能影响植物生长以外,其重要性在于作为介体传播植物病毒,对作物造成危害。*P. graminis* 可传播的植物病毒至少有 11 种<sup>[1]</sup>,如小麦黄花叶病毒(WYMV)、土传小麦花叶病毒(SBWMV)和大麦黄花叶病毒(BaYMV)等。*P. graminis* 休眠孢子的抗逆能力极强,病毒可在其中存活多年,在我国长江中下游、淮河及渭河流域冬小麦种植区,由于 *P. graminis* 对于 WYMV 的广泛传播已使小麦黄花叶病的危害范围和程度不断扩大和加深,已成为小麦生产上的重要问题<sup>[2,3]</sup>。目前对于 *P. graminis* 的研究还比较缺乏,仅有一些形态和生活史的初步观察<sup>[4,5]</sup>。对于 *P. graminis* 的最适发育条件、影响侵染的因素以及与寄主的关系,尚存在许多未弄清楚的问题。

本文探索在人工气候条件下,建立一套适合 *P. graminis* 快速发育、侵染寄主植物,并能高效传播病毒的试验体系,为对真菌传播病毒的机制进行更为深入的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 *P. graminis* 和病毒的来源

感染 WYMV 的小麦样品分别于 1993~1997 年采自河南省潢川县。经光学显微镜检查含有 *P. graminis* 的小麦根凉干后,置于室内阴凉干燥处保藏备用。具有明显黄花

<sup>\*</sup>“863”计划资助项目(863-101-04-01-05)

<sup>\*\*</sup>现工作单位为北京市农林科学院植保环保所,北京 100081

<sup>\*\*\*</sup>通讯作者

作者简介:田兆丰(1966-),女,山西榆社人,北京市农林科学院植保环保研究所,助理研究员,硕士,主要从事植物分子病毒学研究

收稿日期:1999-03-04,修回日期:1999-06-03

叶症状、并经血清学试验证明含有 WYMV 的小麦叶片保存于 - 80℃ 冰箱中。供试小麦为高度感病品种鄂恩 1 号。

1.2 培养条件

参照彭日荷等关于甜菜多粘菌( *P. betae* )砂培的方法<sup>[6]</sup>,并进行了以下改良。选用 200 目左右河砂,经浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 处理,灭菌烘干后备用。感病小麦种子经表面消毒,播种于砂子中,隔日浇灌经 1:2 稀释的营养液<sup>[7]</sup>。25℃ 下萌发 4~5d,待小麦长出 3~4 条 2~3cm 长的幼嫩须根时移栽到砂培盒中,并用 *P. graminis* 接种,所用有机玻璃砂培盒大小为 25cm×15cm×7cm,一侧有溢水孔。接种后的麦苗于光照植物生长箱(哈尔滨东联电子技术开发公司,HPG-280 型)中培养,每日光照 16h,光照强度为 8000Lux。

1.3 *P. graminis* 的分离纯化

采用两种方法分离纯化 *P. graminis* (1)用田间采集的病麦根直接接种小麦幼苗,25℃ 或 18℃ 下培养 20d 以上和 40d 以上,待形成的休眠孢子发育成熟后,取 1cm 根段置于载玻片上,滴加无菌水压片,在光镜下用刀片切取或针头挑取只含 *P. graminis* 休眠孢子堆而不含其它杂菌的根段。然后用分离出的休眠孢子堆接种小麦,每处理接种孢子堆不少于 50 个。(2)田间采集的含 *P. graminis* 及其它杂菌的病根,洗净后用 1% 的次氯酸钠或 0.1% 的升汞表面消毒,无菌水漂洗三次后接种麦苗。25℃ 下生长 20d 后镜检真菌在根中的侵染情况。

1.4 温度和 pH 对 *P. graminis* 发育的影响

将经接种的小麦幼苗分别置于 30℃、25℃、18℃、13℃ 下生长,每处理 5 个重复,接种 5d 后,每天取麦根光镜检查 *P. graminis* 的侵染繁殖情况。接种后每天从 25℃ 和 18℃ 条件下培养的砂培盒中取营养液,在光镜下用血球计数板检测流动孢子的释放数量。

将营养液的 pH 值分别调至 5.0 5.5 6.0 7.0 7.5 8.0 9.0 9.5 10.5,每处理 5 个重复,接种后 25℃ 培养 20d 后光镜检查每厘米根长的休眠孢子堆数,观察不同 pH 对 *P. graminis* 侵染繁殖的影响。

1.5 *P. graminis* 侵染小麦

1.5.1 病根中 *P. graminis* 的接种 将携带 *P. graminis* 的干病根、新鲜病根洗净泥土后剪碎研磨,移植麦苗的同时将病根直接埋入幼苗根部。接种 3d 后,每天取麦根洗净后用 0.1% 棉兰的乳酚油染色,在光镜下检查 *P. graminis* 的侵染繁殖情况。

1.5.2 *P. graminis* 游动孢子的接种 取 25℃ 或 18℃ 下接种 9d 以上的幼苗,用水迅速冲去砂子,滤纸吸干余液后,把根浸于含 0.1%BSA 的 1:5 稀释的营养液中 30min,镜检游动孢子释放情况并收集游动孢子。在收集游动孢子之前 3~4d 不浇灌营养液,以利于成熟的游动孢子集中释放。所收集游动孢子悬浮液经 3000r/min 离心 2min,取上清液再经 7000r/min 离心 5min,获得浓缩的游动孢子。所得游动孢子经镜检和计数后,分别稀释至 1000 个/mL、500 个/mL 和 100 个/mL,取 1mL 游动孢子液接种砂培盒中的健康小麦幼苗,25℃ 下培养 20d 后镜检。每处理 5 个重复。

1.6 WYMV 的接种与真菌传播

1.6.1 *P. graminis* 传播 WYMV 收集携带 WYMV 的 *P. graminis*,接种砂培盒中的小麦苗,分别在恒温 25℃ 和恒温 18℃ 以及变温条件下(18℃→13℃、10℃ 或 8℃)培养,同时

每隔 30~40d 续种二叶期的小麦健苗于砂培盒中 ,并给予 5~7d 的短时间高温( 18℃ )处理 ,以利于续种小麦的生长及多粘菌的发育。观察记录各种温度条件下小麦的发病情况 ,并用间接酶联免疫吸附测定法( ID-ELISA )检测根或叶片中 WYMV 的含量 ,确认传毒效率。

1.6.2 WYMV 的机械接种 :以新鲜或 - 80℃ 冷冻保存的感病小麦叶片为材料 ,直接使用研磨汁液或参照于嘉林等方法<sup>[8]</sup>对病毒进行粗提纯 ,然后机械摩擦接种在 20℃ 生长至二叶期的小麦根部。接种后置于 8~10℃ 的光照培养箱中生长 ,待小麦显症后 ,用酶联法检测病毒含量。

## 2 结果和分析

### 2.1 *P. graminis* 的分离纯化

在田间采集的病麦根中 ,除含有 *P. graminis* 休眠孢子堆外 ,还含有油壶菌( *Olpidium* spp. )链格孢菌( *Alternaria* spp. )或疫霉( *Phytophthora* spp. )等杂菌。在 25℃ 下用干病根直接接种的麦苗 ,7d 后便可检查到以上杂菌 ,13d 方可见多粘菌休眠孢子堆的生成。

由表 1 可见 ,孢子堆分离法对禾谷多粘菌的纯化效果最好 ,但此法操作较麻烦、费时。用次氯酸钠对干根进行 60min 的表面消毒对 *Alternaria* 和 *Phytophthora* 的抑制效果很好 ,但对同样是厚壁的 *Olpidium* 效果不好。而 0.1% 升汞对这几种杂菌均有很好的杀伤效果 ,但当消毒时间延长至 40min 时 ,对 *P. graminis* 也具有一定的杀伤作用。所以用 0.1% 升汞对干病根消毒 20min 左右 ,可获得不含有杂菌的 *P. graminis* ,且简便省时。

表 1 多粘菌分离纯化方法的比较

Table 1 Comparison of different methods for *Polymyxa graminis* isolation

Method	Control	Isolation of cystosori	Sterilization by 1% NaClO <sub>3</sub>		Sterilization by 0.1% HgCl <sub>2</sub>	
			30 min	60 min	20 min	40 min
<i>P. graminis</i>	4/5*	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5
<i>Olpidium</i> spp.	4/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5
<i>Alternaria</i> spp.	4/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5

\* Samples infected by fungi/Plants assayed

### 2.2 环境因子对 *P. graminis* 侵染和发育的影响

2.2.1 砂培体系的基本条件 :实验表明 ,经 1:2 稀释的营养液能较好地保证 *P. graminis* 萌发、侵染并满足小麦生长需要。接种后 13d ,可镜检到 *P. graminis* 休眠孢子堆( 图 1A ) ,而未经稀释的营养液在 pH7.0 时会产生大量沉淀 ,阻碍了 *P. graminis* 萌发和侵染 ,呈现发育滞后现象。由于 *P. graminis* 的发育需要良好的透气性和一定的持水量 ,所以培养基质河砂的粒度不宜过大或过小。

2.2.2 温度对 *P. graminis* 发育的影响 :温度对 *P. graminis* 的发育速度和生活史具有明显的影响。温度升高 ,菌的发育速度加快 ,完成生活史的时间缩短 ,但在根中形成的休眠孢子数量减少 ,而且休眠孢子发育质量差 ,呈不规则形状、孢子堆结构疏松( 图 1B )。从表 2 可以看出 ,*P. graminis* 建立侵染的温度范围较宽 ,但其最适温度范围应在 18℃ ~ 25℃ 之间。

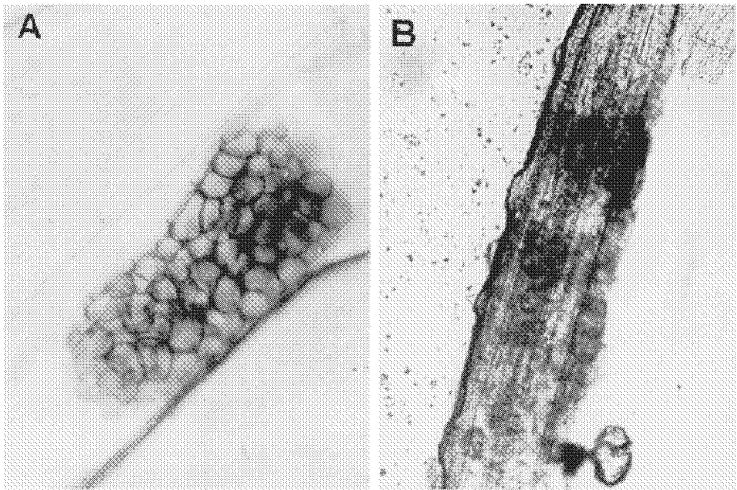


图 1 砂培条件对 *P. graminis* 孢子堆的影响

Fig. 1 Effent of sand culture of *P. graminis* cystosori

A. The morphology of normal cystosori ; B. Abnormal cystosori.

表 2 不同温度下 *P. graminis* 形成休眠孢子堆的时间及其在根中的密度

Table 2 The time course of *P. graminis* cystosori deveopment and its density in infected root at different temperatures( cystosori/cm )

$t/^{\circ}\text{C} \backslash t/\text{d}$	7	10	13	20	25	30	>50
30	*	+( 18 )	N	N	N	N	N
25	—	*	++( 35 )	N	N	N	N
18	—	—	—	—	*	++( 38 )	N
13	—	—	—	—	—	—	+( 27 )

\* Phase of cystogenous plasmodia of *P. graminis* ; + :Relatively numbers of cystosori ; — :No cystosori ; N :Not detected.

不同温度条件下 *P. graminis* 释放游动孢子的时间不同 ,休眠孢子萌发释放初次游动孢子在 25℃ 下仅需 1~2d ,在 18℃ 下需 5~6d。 *P. graminis* 从侵染植物到释放二次游动孢子在 25℃ 下需 7~8d ,在 18℃ 下需 13~14d ,温度高时二次游动孢子释放虽早 ,但游动孢子释放总量较少( 图 2 )。

**2.2.3 pH 值对 *P. graminis* 侵染的影响** :在 pH 为 5.0 和 10.5 的情况下 ,检查不到 *P. graminis* 的侵染 ,pH 为 5.5 和 9.5 时 ,真菌的侵染量比 pH 为 6.0~8.5 时明显降低 ,所以 *P. graminis* 生长所需的 pH 范围应为 6.0~8.5。 在最适 pH 值下( 7.0~7.5 ) ,每厘米根中的平均休眠孢子堆数量可达到 30 个以上 ,较 pH 为 5.5 或 9.5 时高约 4 倍。

**2.3 *P. graminis* 的侵染特性**

**2.3.1 表根中 *P. graminis* 对小麦的侵染和繁殖特性** :不同的接种材料影响 *P. graminis* 的侵染及繁殖。 用携带 *P. graminis* 的干病根、新鲜病根和麦田病土接种小麦幼苗 ,定期观察比较 *P. graminis* 的发育状况 ,结果表明用病土和新鲜病根接种 ,*P. graminis* 完成生活史需 17d ,而用干病根接种只需 13~15d。 用病土接种完成生活史所需时间的延长 ,可能是因为土壤中复杂的根际微生物对菌的侵染有一定的拮抗作用 ,而新鲜病根中的

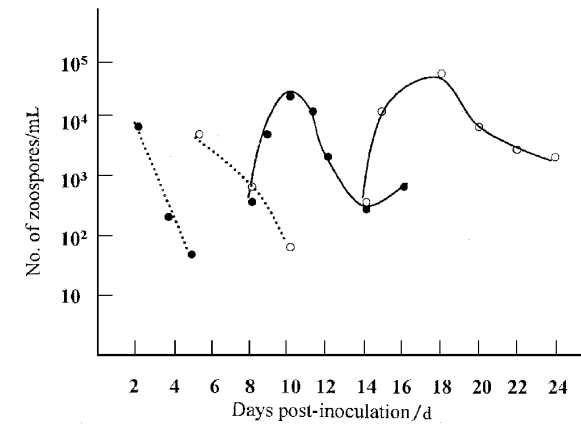


图2 两种温度下游动孢子的发生情况比较

Fig.2 Comparison of zoospores development at 25℃ and 18℃

● :At 25℃ , ○ :At 18℃ ; ..... :Primary zoospores germinating from *P. graminis* cystosori in dried roots ; — :Discharge of secondary zoospores after infection of *P. graminis*

3h ,用 300 μg/mL 的甲霜灵浇灌小麦 ,杀死未侵入的游动孢子 ,25℃ 下测定 *P. graminis* 建立侵染所需要的最短时间。结果表明 ,游动孢子在 1h 内可以建立侵染 ,2h 后侵染产生的休眠孢子数量不再增加 ,说明游动孢子完成侵染的时间为 1~2h。

表3 游动孢子的体外存活时间

Table 3 Survival longevity of zoospores *in vitro*

Storage time before inoculation/h	24	36	48	60	72	84	96
Numbers of cystosori per centimeter of root( 25℃ )	>30	>30	17	0	0	—	—
Numbers of cystosori per centimeter of root( 18℃ )	>30	>30	>30	>30	21	12	0

## 2.4 WYMV 的接种与真菌传播

2.4.1 *P. graminis* 对于 WYMV 的传播特性 经恒温 and 变温条件试验 ,所得结果证明温度与传毒的效率关系非常密切。以携带 WYMV 的 *P. graminis* 接种小麦幼苗 ,25℃ 或 18℃ 条件下恒温培养 3 个月以上 ,小麦并未显症 ;接种后先在 18℃ 下培养 15~20d ,再转到低温 (13℃、10℃ 和 8℃ )下继续生长 ,可在不同时间内表现症状。其中以经 18℃ 培养后即转于 8℃ 下继续生长的小麦显症最快 ,低温下生长 30~40d 后出现典型的黄花叶症状 ,其他变温条件处理的小麦显症的时间则在 60d 以上。用间接 ELISA 检测 *P. graminis* 接种后小麦体内的 WYMV ,结果表明温度较高时 (25℃ ) ,*P. graminis* 也可以传播 WYMV ,但病毒在寄主体内的含量较低 ,随着温度的降低病毒的含量随之增高。由此可见 ,虽然较高的温度 (如 18℃ 下培养 20d 左右 ) ,有利于 *P. graminis* 萌发、侵染及传毒 ,但较低的温度 (如 8℃ ) 则更利于病毒在寄主体内增殖 ,在此条件下 ,培养盒中循环不断地产生的带毒游动孢子侵染健麦 ,从而形成稳定的传毒体系。从上述传毒试验砂培盒中随机抽取 13 株麦苗 ,其中 10 株表现有不同程度的小麦黄花叶症状 ,显症率为 77% ,用间接酶联法检测

病叶 ,证实 9 株已被 WYMV 侵染 ,说明 *P. graminis* 的传毒率约为 70%(表 4)。

表 4 砂培盒中真菌传毒植株的酶联检测结果

Table 4 ELISA test of WYMV in plants infected by *P. graminis* transmission in sand culture pots

Sample	None	- CK	+ CK	1	2	3	4	5	6	- CK
<i>OD</i> <sub>450</sub> Absorbance	0.00	0.22	1.08	0.60	0.39	0.45	0.46	0.33	0.49	0.22
Visual estimation	-	-	+++	++	-	++	++	-	++	-
Sample	None	- CK	7	8	9	10	11	12	13	- CK
<i>OD</i> <sub>450</sub> Absorbance	0.00	0.22	0.56	0.41	0.36	0.35	0.41	0.43	0.43	0.22
Visual estimation	-	-	++	+	-	-	+	+	+	-

2.4.2 WYMV 的机械接种 :在五次试验中共接种小麦 124 株 ,目测平均发病率为 68% ,酶联检测平均带毒率为 62.5% ,但在不同处理之间发病情况差别较大。其中 ,两批用新鲜病叶研磨汁液直接接种的 66 株小麦 ,在 30d 左右便可出现黄花叶症状 ,酶联检测的阳性比例分别为 80% 和 100%。而用冰冻材料或经有机溶剂处理的粗提纯病毒接种的小麦 ,显症时间则一般需 60d 以上 ,感染比率也较低。

3 讨论

通过对 *P. graminis* 与侵染有关的生物学特性的研究 ,与同属真菌 *P. betae* 的生物学特性相比较 ,证明两者的侵染、发育以及其与环境条件的相关性等各方面都基本一致。*P. graminis* 的侵染繁殖受温度、酸碱度及土壤通气状况等多种环境因素的影响 ,其中温度直接影响了多粘菌在寄主体内的发育速度<sup>[7]</sup>。这种现象与田间小麦秋播早 ,温度高 ,雨水充足时 ,来年多粘菌侵染数量大 ,小麦发病严重的表现相一致。关于温度等因素是直接影响了多粘菌的活性 ,还是通过对寄主植物的影响导致了对菌的影响 ,其中机制还不清楚<sup>[9,10]</sup>。另外 ,休眠孢子萌发条件试验表明 ,*P. graminis* 只有受鲜活小麦根分泌物诱导时 ,才能大量萌发。而且不经诱导而释放的部分游动孢子接种小麦后 ,不能有效建立侵染。实验中曾取经营养液浸泡 15d ,已不再释放游动孢子的病根接种小麦 ,发现这种病根很快又可萌发产生游动孢子 ,并有效侵染小麦根系。这一结果与田间经轮作多年后播种小麦仍然发病的现象也是吻合的。这说明休眠孢子的萌发不仅受其内在因素以及水分等必须条件的控制 ,而且鲜活寄主根系对它的诱导作用也是举足轻重的。由本文研究结果可见 ,*P. graminis* 的生长发育对外界环境如温度、pH 等有很宽的适应范围 ,而且其休眠孢子具有很强的抗逆性 ,所以小麦病根中的 *P. graminis* 休眠孢子经长期保存后仍能侵染小麦并使小麦发病<sup>[11]</sup>。

参 考 文 献

[ 1 ] Campbell R N. *Annu Rev Phytopathol* ,1996 ,**34** :87~108.  
[ 2 ] 李大伟 韩成贵 邢怡明 ,等 . 植物病理学报 ,1997 ,**27** :303~307.  
[ 3 ] 陶家凤 秦家忠 肖际亨 ,等 . 植物病理学报 ,1980 ,**10** :15~25.  
[ 4 ] Admas M J. *Annals of Applied Biology* ,1991 ,**118** :479~492.  
[ 5 ] Barr D J S. *Canadian Journal of plant pathology* ,1979 ,**59** :194.  
中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 6 ] 彭日荷 韩成贵 刘 仪 等 . 菌物系统 ,1997 ,16 ( 4 ) 307~310.
- [ 7 ] Adams M J , Swaby A G , Macfarlane I. *Annals of Applied Biology* ,1986 ,109 :561~572.
- [ 8 ] 于嘉林 晏立英 冯继东 等 . 病毒学报 ,1995 ,11 :248~254.
- [ 9 ] Slykhuis J T. *Phytopathology* ,1974 ,64 :554~557.
- [ 10 ] Slykhuis J T. *Phytopathology* ,1970 ,60 :319~331.
- [ 11 ] Adams M J. *Soil Use and Management* ,1990 ,6 :184~189.

## DEVELOPMENT OF A SYSTEM FOR *POLYMYXA GRAMINIS* INFECTION AND TRANSMISSION OF WHEAT YELLOW MOSAIC VIRUS\*

Tian Zhaofeng Chen Xiaoyu Zhu Kun Yu Jialin Liu Yi

( National Laboratories for Agrobiotechnology , China Agricultural University , Beijing 100094 )

**Abstract :** In growth chambers , a system was developed for infection of *Polymyxa graminis* to wheat ( *Triticum aestivum* L. ) , which is an obligate parasite. By the system , the fungus could be propagated in large quantity rapidly and the life cycle of *P. graminis* in wheat was observed in a period of 13 to 15 days. The methods for separating *P. graminis* as single cystosori from cultured wheat roots or dried roots were simplified. By tests for the factors affecting on *P. graminis* infection , including inocula types , seedling age of host plants , temperatures , pH value and nutrient contents etc. , the system was modified to more perfection. With an integration of optimal temperature and other elements in the system , which affect on infection and development of *P. graminis* , wheat yellow mosaic virus ( WYMV ) was transmitted constantly and efficiently by the fungal vector. In average , 70% of wheat plants inoculated by the viruliferous fungi could infected by WYMV and the typical symptom of wheat mosaic disease would appear at 30 days post-inoculation mechanically.

**Key words :** *Polymyxa graminis* , Wheat yellow mosaic virus , Infection , Virus transmission by fungus