

一种稻瘟病菌培养产孢培养基的配制与效比分析

吴斯骏¹, 孙强², 陈洪凡¹, 杨增青¹, 徐沛东¹, 杨迎青¹, 兰波^{1*}

(1. 江西省农业科学院植物保护研究所, 江西南昌 330200; 2. 中华人民共和国黄岛出入境检验检疫局食品处, 山东青岛 266555)

摘要 [目的] 筛选产孢效果好、成本低、操作简便的培养基。[方法] 采用稻秸浸出液与 PDA 培养基为主要成分配制 6 组不同培养基, 比较其稻瘟病菌的培养产孢情况。[结果] 配组稻秸浸出液:PDA 培养基=1:1 具有最快的培养速率和最大的产孢量, 并且与燕麦片培养基和大麦粒培养基相比在产孢效率和经济成本上也更具有优势。[结论] 该新型培养基在水稻稻瘟病菌致病性与水稻品种抗瘟性鉴定研究中具有较高的应用价值。

关键词 稻瘟病菌; 产孢; 培养基; 配制

中图分类号 S435.111.4⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)18-0118-03

Preparation and Effect Ratio Analysis of a Medium for *Pyricularia oryzae* Culture and Sporulation

WU Si-jun¹, SUN Qiang², CHEN Hong-fan¹ et al (1. Plant Protection Research Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang, Jiangxi 330200; 2. Huangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266555)

Abstract [Objective] The aim was to screen out a medium with good spores effect, low cost and simple operation. [Method] The culture effect of *Pyricularia oryzae* sporulation of six groups of culture medium which used rice straw leaching liquid and PDA culture medium as main components was compared. [Result] The formula rice straw extract:PDA medium = 1:1 had the fastest culture rate and the largest amount of sporulation. Compared with oatmeal culture medium and barley culture medium, the culture medium also had advantages in the efficiency and economic cost of sporulation. [Conclusion] The new culture medium has good application value in the identification of pathogenicity and blast resistance of rice varieties.

Key words *Pyricularia oryzae*; Sporulation; Culture medium; Preparation

稻瘟病是水稻的首要病害^[1-2]。在稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)生理分化以及水稻种质资源的抗瘟性接种测定等研究中都需要人工培养菌株, 以获得大量分生孢子。国内外曾先后做过诱发稻瘟比较产孢方法及筛选适宜产孢培养基^[3-5], 最常见的是采用高粱、稻节、大麦或小麦粒等组织培养基培养稻瘟病菌分生孢子。但这些产孢方法操作过程繁琐、培养时间长, 产孢效果不甚理想, 且在培养过程中容易受到杂菌污染^[6]。关于常用的燕麦片培养基、米糠培养基、粗面粉培养基、玉米粉培养基和酵母淀粉培养基等的产孢试验也有报道^[6-9], 但有的产孢效果不理想, 有的培养材料不易获得。为获得产孢效果好、成本低、操作简便的培养基, 笔者采用当地水稻副产物水稻秸秆为主要原料, 通过不同配方的配组确定了一种新型的稻瘟病菌培养产孢培养基。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。1-10(ZB13), 由江西省农业科学院有害生物控制重点实验室保存。

1.1.2 供试培养基。稻秸浸出液: 30 g 稻秸剪碎, 用 1 000 mL 清水浸泡 16~24 h; 马铃薯浸出液: 200 g 马铃薯去皮, 切碎, 用 1 000 mL 清水浸泡 2 h; 稻秸玉米粉培养基: 稻秸 30 g, 玉米粉 20 g, 琼脂 18 g, 清水 1 000 mL; PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 清水 1 000 mL; 燕麦片培养基: 燕麦片

50 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 16 g, 水 1 000 mL; 配组①: 稻秸浸出液+马铃薯浸出液(1:1); 配组②: 稻秸浸出液+PDA 培养基(1:1); 配组③: 稻秸培养基+马铃薯浸出液(1:1); 配组④: 稻秸培养基+PDA 培养基(1:1); 配组⑤: 稻秸培养基; 配组⑥: PDA 培养基。

1.2 方法

1.2.1 产孢方法。从已纯培养的供试菌株中挑取大小相同的菌块接种到 6 种供试配方培养基的培养皿(9 cm)上, 置于在 28 ℃恒温箱中培养。待平板上菌丝长满后(约 7 d), 置于室内组织培养架上黑光灯光照培养 3 d, 室温 25~28 ℃。待充分产孢后, 每皿用 15 mL 蒸馏水洗下孢子, 100 倍显微镜下计数孢子数量。

1.2.2 同一菌株在不同配方培养基上产孢量的比较。供试菌株 1-10 在 PDA 培养基上活化后, 用打孔器获得直径 5 mm、成熟度一致的菌碟, 接种于不同配方培养基中央, 28 ℃培养 7 d, 再置于黑光灯下照射 3 d, 用 15 mL 灭菌水洗下表面菌丝, 尼绒纱布过滤, 即获得稻瘟菌分生孢子悬浮液, 用 100 倍显微镜观察, 计数一个视野下孢子的数量, 重复 3 次, 取平均值进行比较。

1.2.3 同一菌株在不同产孢培养基上生长速度的比较。供试菌株 1-10 在不同配方培养基上 28 ℃培养 7 d 后, 测量菌落直径, 计算稻瘟菌生长速度, 重复 3 次, 取平均值进行比较。

2 结果与分析

2.1 同一菌株在不同配方培养基上生长速率比较 由表 1 和图 1 可知, 6 种不同配组的培养基对稻瘟病菌的培养速度有显著差异。供试菌株 1-10 在培养基配组①、配组②、配组③、配组④、配组⑤、配组⑥上 28 ℃培养 7 d 的平均菌落直径

基金项目 国家重点研发计划项目(2016YFD0200808); 国家重点研发计划项目(2016YFD0300700); 江西省水稻产业体系科研专项(JXARS-02-04); 国家重点研发计划项目(2017YFD0301604)。

作者简介 吴斯骏(1987—), 男, 江西庐山人, 助理研究员, 硕士, 从事水稻抗病育种研究。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事水稻真菌病害研究。

收稿日期 2018-03-22

表 1 同一菌株在不同配组培养基上的生长速度比较

Table 1 The comparison result for growth rate of the same strain in different mediums

培养基组方 Medium formula	培养 7 d 菌落直径 Diameter of the colony after 7 days of culture			平均值 Average
	I	II	III	
①	7.68	7.72	7.59	7.66 a
②	7.56	7.63	7.66	7.62 ab
③	7.59	7.08	7.46	7.38 b
④	7.43	7.51	7.58	7.51 ab
⑤	6.51	6.44	6.39	6.45 c
⑥	7.49	7.27	7.43	7.39 b

注:同列数据后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著
Note:Different lowercase letters at the same column indicated significant differences at 0.05 level among treatments

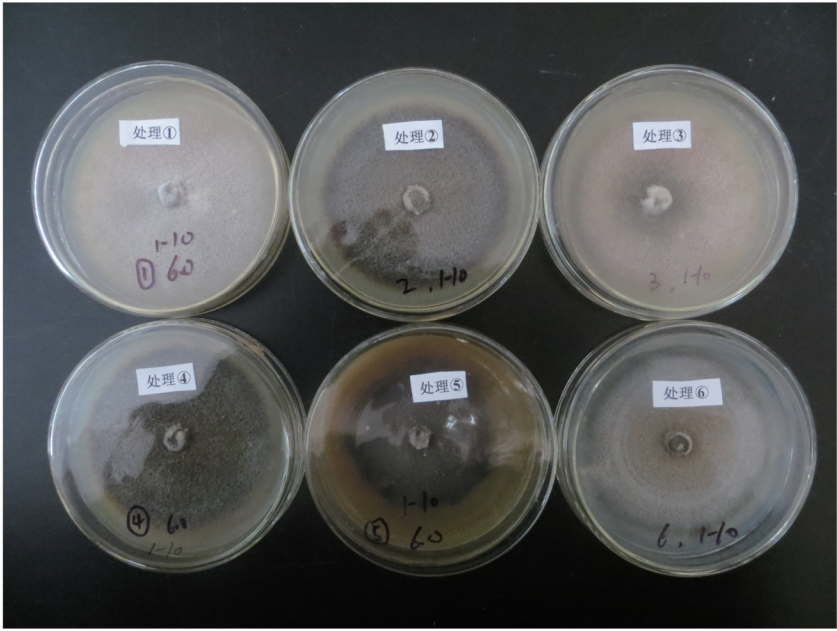


图 1 菌株 1-10 在 6 种不同配组培养基上的生长情况

Fig.1 The growth conditions of strain 1-10 in the six kinds of mediums

表 2 同一菌株在不同配组培养基上的产孢量比较

Table 2 The comparison result for spore production quantity of the same strain in different mediums

培养基组方 Medium formula	100 倍显微镜视野下孢子数 The number of spores under 100× microscopical vision			平均数 Average
	I	II	III	
①	35	37	34	35.3 a
②	52	49	50	50.3 b
③	46	41	43	43.3 c
④	38	34	35	35.6 a
⑤	45	43	46	44.6 c
⑥	18	21	19	19.3 d

注:同列数据后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著
Note:Different lowercase letters at the same column indicated significant differences at 0.05 level among treatments

2.3 配组②与燕麦片培养基、大麦粒培养基培养、产孢的优势比较 利用配组②、燕麦片培养基、大麦粒培养基各培养供试菌株 1-10 并产孢,比较整个产孢周期长度、产孢量和经济成本。其中,产孢量的比较利用燕麦片培养基各 1 L 制成 50 个培养平板培养稻瘟病菌并产孢,并用 1 000 mL 无菌水洗下所有平板上的菌丝、孢子,用双层纱布过滤获得孢子悬

液,100 倍显微镜下镜检孢子数,记录一个视野下的孢子数量,3 次重复,取平均值。用容器量取 1 L 大麦粒做成大麦粒培养基,接种供试稻瘟病菌产孢,产孢后用 1 000 mL 洗下大麦粒上的稻瘟病菌孢子,双层纱布过滤,100 倍显微镜下镜检孢子数,记录一个视野下的孢子数量,3 次重复,取平均值。

2.2 同一菌株在不同配方培养基上产孢量比较 由表 2 可知,供试菌株 1-10 在 6 种不同配组培养基上的产孢量相差较大,差异显著。利用培养基配组①、配组②、配组③、配组④、配组⑤、配组⑥产孢在一个显微视野下的平均孢子数分别为 35.3、50.3、43.3、35.6、44.6、19.3 个。配组②产孢最好,其次为配组③和配组⑤,再其次为配组①和配组④,配组⑥产孢最差。

液,100 倍显微镜下镜检孢子数,记录一个视野下的孢子数量,3 次重复,取平均值。用容器量取 1 L 大麦粒做成大麦粒培养基,接种供试稻瘟病菌产孢,产孢后用 1 000 mL 洗下大麦粒上的稻瘟病菌孢子,双层纱布过滤,100 倍显微镜下镜检孢子数,记录一个视野下的孢子数量,3 次重复,取平均值。

由表 3 可知,3 种培养基配组②、燕麦片培养基、大麦粒培养基整个产孢周期所需要的天数分别为 10、12、15 d,每个

表 3 3 种不同培养基培养稻瘟病菌产孢比较

Table 3 Sporulation comparison of three kinds of mediums to culture

培养基 Medium	产孢周期 Sporulation period d	平均产孢量 Average sporulation quantity 个/视野	经济成本 Economic costs	原料来源 Raw material source
配组② Formula	10	42	+	+
燕麦片培养基 Oatmeal medium	12	32	++	++
大麦粒培养基 Barley medium	15	35	++	++

注:“+”表示成本的高低以及来源的难易程度,“+”越多表示成本越高,原料来源越难获得
Note:“+”indicated the cost and resource,and the more “+” was,the higher the cost was,the harder the raw material source was

显微视野下平均产孢量分别为 42、32、35 个。可见, 配组②在产孢量与产孢周期上均优于燕麦片培养基和大麦粒培养基, 综合培养基原料的经济成本与获得难易程度, 认为配组②在稻瘟病菌培养产孢方面是一种非常理想的新型培养基组方, 适宜广泛推广应用。

3 结论与讨论

从总体趋势看, 该研究配制的 6 种稻瘟病菌产孢培养基菌株生长速率从快到慢依次为配组②、配组①、配组④、配组③、配组⑥、配组⑤; 产孢量在 6 种不同配制培养基上从多到少依次为配组①、配组⑤、配组③、配组④、配组①、配组⑥。由此可见, 配组②是最佳的稻瘟病菌培养、产孢培养基, 其主要成分为 1 份稻秸浸出液与 1 份 PDA 培养基等比例混合而成。供试菌株在该培养基上生长最快, 菌丝生长最旺, 产孢量最多, 并且菌丝生长状态与产孢量之间呈正相关。

该研究配制的配组②培养基(稻秸浸出液:PDA 培养基=1:1, V/V)接种稻瘟病菌生长速度最快, 产孢量最多, 这对于一般的稻瘟病菌生理小种鉴定、致病性分化研究和水稻品种抗性鉴定研究完全能够达到要求。该研究进行了配组②、燕麦片培养基、大麦粒培养基稻瘟病菌产孢培养各项指标比较, 发现供试菌株在配组②培养基上从接菌到产孢所需时间

为 10 d, 燕麦片培养基为 12 d, 大麦粒培养基为 15 d; 产孢量从多到少分别是配组②(42 个/显微视野)、大麦粒培养基(35 个/显微视野)、燕麦片培养基(32 个/显微视野)。可见, 配组②培养基在稻瘟病菌产孢等各项指标上不比燕麦片培养基和大麦粒培养基差, 反而略有优势, 综合考虑培养基原料的经济成本及来源难易程度, 认为在配组②是在稻瘟病菌培养、产孢研究中更具有优势的培养基, 至少是目前主要稻瘟病菌产孢培养基的有益补充, 具有很高的应用价值。

参考文献

- [1] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1979.
- [2] 朱明哲. 田间试验及统计分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [3] 陈永萱. 诱发稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)分生孢子产生的方法[J]. 南京农业大学学报, 1983, 6(2): 39-43.
- [4] 孙国昌, 申宗坦, 孙漱沅. 稻瘟病菌产孢条件的研究[J]. 浙江农业大学学报, 1990, 16(1): 51-54.
- [5] OU S H. Rice diseases[M]. Kew Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1972: 368.
- [6] 王国平, 罗宽. 稻瘟病菌产孢培养基的筛选[J]. 湖南农学院学报, 1989, 15(2): 58-62.
- [7] 杨绳桃. 稻瘟病菌的分离与产孢试验[J]. 湖北农业科学, 1988(10): 26-28.
- [8] 李桦. 稻瘟病菌培养技术的研究[J]. 植物保护, 1986, 12(4): 45-46.
- [9] 兰波, 李湘民, 杨迎青, 等. 稻瘟病菌产孢技术研究[J]. 江西农业学报, 2012, 24(2): 74-76.
- [10] 尹娟, 费良军, 程东娟. 均质土壤毛管水上升特性室内试验研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(6): 91-94.
- [11] 苗强强, 陈正汉, 田卿燕, 等. 非饱和含黏土砂毛管上升试验研究[J]. 岩土力学, 2011(S1): 327-333.
- [12] 程东娟, 张亚丽. 土壤物理实验指导[M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2012: 1-54.
- [13] PELUFFO M, PARDO F, SANTOS A, et al. Use of different kinds of persulfate activation with iron for the remediation of a PAH-contaminated soil[J]. Science of the total environment, 2016, 563/564: 649-656.
- [14] AHN C K, KIM Y M, WOO S H, et al. Soil washing using various nonionic surfactants and their recovery by selective adsorption with activated carbon[J]. Journal of hazardous materials, 2008, 154(1/2/3): 153-160.
- [15] TAYLOR T P, PENNELL K D, ABRIOLA L M, et al. Surfactant enhanced recovery of tetrachloroethylene from a porous medium containing low permeability lenses: 1. Experimental studies[J]. Journal of contaminant hydrology, 2001, 48(3): 325-350.
- [16] SHI Z, SIGMAN M E, GHOSH M M, et al. Photolysis of 2-chlorophenol dissolved in surfactant solutions[J]. Environmental science & technology, 1997, 31(12): 3581-3587.
- [17] YEH D H, PENNELL K D, PAVLOSTATHIS S G. Toxicity and biodegradability screening of nonionic surfactants using sediment-derived methanogenic consortia[J]. Water science and technology, 1998, 38(7): 55-62.
- [18] 沈钟, 赵振国, 康万利, 等. 胶体与界面化学[M]. 4 版. 北京: 化学工业出版社, 2012: 99-100.
- [19] SO H, AYLMOORE L. How do sodic soils behave? The effects of sodicity on soil physical behavior[J]. Australian journal of soil research, 1993, 31(6): 761-777.

(上接第 101 页)

科技论文写作规范

作者 论文署名一般不超过 5 个。中国人姓名的英文名采用汉语拼音拼写, 姓氏字母与名字的首字母分别大写; 外国人姓名、名字缩写可不加缩写点。

文内标题 文章内标题力求简短, 一般不超过 20 字, 标题内尽量不用标点符号。标题顶格书写, 文内标题层次不宜过多, 一般不超过 4 级, 分别以 1; 1.1; 1.1.1; 1.1.1.1 方式表示。