



技术与方法

稻瘟病菌分生孢子的诱发及保存方法

孔秀英

(中国农业科学院品种资源研究所, 北京 100081)

稻瘟病是水稻的主要病害之一,分布广,危害大,因此广大科研工作者对稻瘟病菌的致病性,生理生化特性及品种的抗病性等方面进行了广泛而深入细致的研究。但无论哪一方面的研究工作最关键的一个环节就是获取足够量的接种体—稻瘟病菌分生孢子,它是各项研究工作顺利进行的根本保证。本文介绍了国内外对稻瘟病菌分生孢子的诱发和保存方法的研究概况。

1 诱发稻瘟病菌分生孢子产生的方法

1.1 燕麦培养基

日本古田、关口^[1]用燕麦培养基诱发稻瘟病菌分生孢子的产生。燕麦培养基的制备方法是把 50g 燕麦在温水中浸泡 30min,再煮沸 30min,煮熟后加入蔗糖 20g、琼脂 15g 使其溶解,加蒸馏水使总量为 1L,装入培养皿经常规灭菌,接种菌株,待菌丝盖满整个培养皿后,进行刷洗,放在日光灯或水银灯下光照 2d 或 3d 即可得到较多的成熟度一致的孢子。由于此法具有产孢多且成熟度一致的优点,倍受日本研究者的青睐,应用比较广泛^[2]。清泽先生^[3]利用此法获取了大量分生孢子以进行品种抗稻瘟病机制的研究。

1.2 大麦粒培养基

中国研究者一般采用大麦粒培养基诱发稻瘟病菌产生大量的分生孢子。多数研究者是按全国统一的稻瘟病菌生理小种研究方法实施此法的^[4],罗宽等人所用的方法与此法不同处是放置状态时辅以荧光照射^[5,6]。

大麦粒培养基的优点是产孢量大,但比较费事,又易感染霉菌。

1.3 稻叶稻秆稻节琼脂培养基

针对大麦粒培养基的缺点,陈永莹^[7]等人探讨了简便易行而又无污染杂菌的诱发分生孢子产生的方法。他的研究表明,稻叶马铃薯琼脂培养基(RLP-PDA)在连续的紫外光照射下能使稻瘟病菌产生大量分生孢子。刘安国^[8]将已接种稻瘟病菌的水稻叶片移植于马铃薯蔗糖琼脂培养基上,5—8d 时每段叶片(1—2cm)可产生 600—700 万以上个孢子;孙国昌等^[9]在对 17 种培养基的产孢比较研究中得出,玉米粉稻秆琼脂培养基最适稻瘟病菌分生孢子的产生,其次是稻叶马铃薯琼脂培养基、稻秆琼脂培养基和燕麦片琼脂培养基。印度的一位研究者 Satyanarayana^[10]指出附加 1% 葡萄糖的水稻节抽提物洋菜培养基可使稻瘟病菌产孢丰富。

1.4 其它诱发方法

王国平^[11]从 50 种培养基中筛选出一种培养时间短、产孢好,不易污染杂菌的粗面粉琼脂培养基(每 1000ml 水中加 15g 琼脂,20g 粗面粉),应用这种培养基在直径 75mm 的培养皿中培养 12d,可获得每毫升含量为 7.6×10^4 — 6.69×10^5 个分生孢子的悬浮液 100ml,可人工接种约 5000 株稻苗。Atkins 和 Marc-hett 等^[12-14]用 2% 米糠琼脂培养基培养稻瘟病菌;Bhattacharya^[15]的研究表明在用精米 2% 改进的胡萝卜 PDA 基础培养基上能促进 IARI 菌丝分生孢子的产生,而稻草浸出液(5%)可推迟该菌孢子的形成。

从上述诱发稻瘟病菌分生孢子产生的各种方法中可以看出,选择合适的培养基是促进稻瘟病菌分生孢子产生的主要条件之一。培养基

中的某些营养成分具有诱发稻瘟病菌分生孢子产生的作用。Ito 等人^[16]测定了7个分离菌株的孢子形成与各种基物的依赖关系,结果证明稻叶粉末和意大利黑麦草粉能促进分离株分生孢子的形成,而萝卜、菜豆和马铃薯的粉末只有轻微的刺激作用,虽然含有稻叶或稻秆的培养基能促进分生孢子的产生,但具体是哪种成分有此功能尚不清楚。燕麦粉培养基能促进稻瘟病菌分生孢子的产生,是因燕麦粉中醇溶蛋白起作用的结果。醇溶蛋白在燕麦粉中含量丰富,可用70%的乙醇提取^[17]。此外,醇溶蛋白在大麦粒中含量也很高,占总蛋白量的40—60%,是种子蛋白的重要组成部分,大麦粒培养基对稻瘟病菌的诱发作用能否归功于它还有待深入研究。

在稻瘟病菌分生孢子形成的过程中,光照起一定的促进作用,有效的波长范围为290—420nm的近紫外光^[18,19]。大森中岛对光质的研究表明蓝黑色荧光灯比白色荧光灯对孢子形成的促进效果更为明显^[2],而利用光暗交替照射诱发孢子形成的效果更为突出^[19]。

2 稻瘟病菌分生孢子的保存方法

在植物病理研究中保持病原物致病性的稳定尤为重要,但稻瘟病菌的致病性比较容易发生变异^[20]。稻瘟病菌通常接种于PDA培养基上低温下保存,但Nobuaki等研究表明,有些稻瘟病菌在PDA培养基上进行继代培养时易发生致病性变异^[21]。在以稻瘟病菌菌丝体保存时,应用时需再度传代培养产生分生孢子。这一过程比较费时费力,甚至还会碰到人工接种时稻苗和孢子的培养难以配合的问题^[22]。鉴于上述两点,各国的研究者对稻瘟病菌的孢子保存技术进行了研究。

2.1 干燥低温保存法

稻瘟病菌在燕麦片培养基产生的分生孢子短期保存方法是:将孢子洗下制成孢子悬浮液,用真空泵将孢子收集在滤纸上进行干燥,干燥后的孢子连同滤纸放在干燥器内,放-20℃或-5℃冷库里保存,几个月后稻瘟病菌的致病性仍无改变,使用时可随时取出配制成孢子

悬浮液^[23]。孢子的长期保存方法是将长满孢子的燕麦片培养基光照后,原封不动地放置一周以上,待培养基完全干燥后用毛笔收集干燥状态的孢子,将其放进有吸湿剂的密闭容器里,置-20℃冷冻装置里保存^[24,25]。

2.2 干燥液氮保存法

稻瘟病菌在玉米粒培养基上形成分生孢子后,待玉米粒干燥,放进盛有有机溶剂Uythane和genetron 113的烧杯里振荡10min过滤,收取滤纸上的孢子和菌丝碎片,在40℃温风下干燥并进一步粉碎,过细筛筛选孢子,用小安瓿瓶以氮气置换一部分空气,保存于-170℃的液氮中,多数菌株能长期保存,且致病性基本稳定^[26,27]。

2.3 干燥法

中国70年代末,罗宽等人^[28,29]用大麦粒干燥低温保存稻瘟病菌孢子。由于此法存在易被霉菌污染的缺点,所以没被推广应用。90年代,孙国昌等人^[30]报道了一种简易有效的稻瘟病菌孢子的保存方法。稻瘟病菌在大麦粒培养基上产孢后,将大麦粒表面的孢子用蒸馏水洗脱,再用真空泵将孢子滤干,置装有砂芯漏斗的普通滤纸上,风干后载孢滤纸放置室温下干燥保存。保存10个月以上,小种的致病性仍保持稳定,如果放置低温(4℃或-20℃)条件下,保存时间会更长。

纵观以上稻瘟病菌孢子的各种保存方法,得出干燥和低温是延长孢子存活期,使致病性稳定的主要因素,其中干燥更为重要,而低温只有在干燥条件下才能发挥作用。

参 考 文 献

- [1] 高坂卓尔,山崎义人. 稻瘟病和抗病育种, 长春: 东北师范大学出版社, 1986, 114—121.
- [2] Namai J. Tohoku Journal of Agricultural Research, 1985, 35 (1/4): 69—75.
- [3] Kiyosawa S. Oryza, 1976, 13(1): 1—32.
- [4] 全国稻瘟病菌生理小种联合试验组. 植物病理学报, 1980, 10(2): 71—82.
- [5] 罗宽, 王国平, 王国馨, 等. 植物保护学报, 1984, 11(3): 175—182.
- [6] 罗宽, 黄声仪, 王国平, 等. 植物病理学报, 1985, 15(2): 115—119.
- [7] 陈永壹. 南京农学院学报, 1983, (2): 39—43.

- [8] 刘安国. 微生物学通报, 1976, 3(3): 26—28.
- [9] 孙国昌, 申宗坦, 孙澈沅. 浙江农业大学学报, 1990, 16(1): 51—54.
- [10] Satyanarayana K. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 1986, 16(3): 329—330.
- [11] 王国平, 罗宽. 湖南农学院学报, 1989, 15(2): 58—62.
- [12] Atkins J G, Johnston T H. Phytopathology, 1965, 55(9): 993—995.
- [13] Atkins J G, Robert A L, Adair C R. Phytopathology, 1967, 57(3): 297—301.
- [14] Marchetti M A, Lai X, Bollich C N. Phytopathology, 1987, 77(6): 799—804.
- [15] Bhatta-charya D, Bose S K. Indian Phytopathology, 1981, 34(3): 382—383.
- [16] Ito I, Yamaguchi J. Ann Phytopath Soc Japan, 1979, 45(5): 699—704.
- [17] Namai J. Ann Phytopath Soc Japan, 1983, 49(2): 274—276.
- [18] Ou S H. Rice Diseases, Kew, Surrey, England Commonwealth Mycological Institute, 1972, 97—184.
- [19] Padhi B. Zndian Journal of Mycology and Plant Pathology, 1986, 16(1): 59—62.
- [20] 欧世瑞, 侯明生译. 湖北农业科学, 1987, (9): 36—39.
- [21] Matsuyama N, Yamaguchi T. Ann Phytopath Soc Japan, 1981, 47(4): 457—463.
- [22] 张君成. 广西农学院学报, 1989, 8(4): 46—48.
- [23] 饭岛章彦, 寺沢租. 关东病虫研报, 1977, 24(1): 28.
- [24] 关口义兼, 桜井义郎. 日本植物病理学会报, 1973, 39(2): 155.
- [25] 关口义兼, 守中正. 日本植物病理学会报, 1978, 44(3): 346.
- [26] Latterell F M, Rossi A E. Phytopathology, 1986, 76(2): 231—235.
- [27] Latterelli F M. Proc. Horiz. Resist. Blast Dis. Rice CIAI Ser. CE-9 Cali, Colombia, 1975, 199—234.
- [28] 罗宽, 黄声仪, 王国馨. 植物保护, 1981, 7(4): 26.
- [29] 浙江农业科学院植保所稻瘟病研究室. 浙江农业科学, 1979, (5): 47—48.
- [30] 孙国昌, 申宗坦, 孙澈源等. 中国水稻科学, 1989, 3(1):