

稻瘟病菌孢子保存技术

孙国昌* 申宗坦 (浙江农业大学, 杭州; *现在地址: 浙江省农业科学院, 杭州)

孙漱源 陶荣祥 施 德 (浙江省农业科学院, 杭州)

Preservation Technique of *Pyricularia oryzae* Conidia

Sun Guochang*, Shen Zongtan (Zhejiang Agriculture University, Hangzhou, * present address: Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou)

Sun Shuyuan, Tao Yongqiang, Shi De (Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou)

Abstract: Freshly produced conidia were collected from barley grain medium by washing with distilled water, the spore suspension is filtered onto filter paper in a funnel, dried at 30–35°C, and stored in desiccator at indoor, 4°C and –20°C. The conidia retained their original level of viability and pathogenicity after 10 months indoor, there are further preservation times at 4°C and –20°C. Thus, the problem is solved that culture rice seedling can not synchronize with sporulation culture of blast fungus during the artificial inoculation.

Key words: *Pyricularia oryzae* Cav.; Conidia; Viability; Pathogenicity; Conidia preservation

提 要: 将载有稻瘟病菌孢子的滤纸置于不同温度和干燥条件下保存, 经分期测定, 室内干燥保存, 经10个月, 不论是孢子活力和致病性一般均可维持原有水平。低温干燥保存则能保存更长的时间。这样解决了目前人工接种中稻苗和孢子的培养难以配合的问题。

关键词: 稻瘟病菌; 孢子; 活力; 致病性; 孢子保存

稻瘟病菌的保存, 早期均采用菌丝体保存法, 但在保存中有些菌株的致病性由于继代培养导致变异^[1,2,3]。鉴于稻瘟病菌的接种体系分生孢子, 采用菌丝体保存, 在应用时需再度移接培养以产生孢子, 因而培养周期长, 工作量大, 并且接种稻苗的培育和孢子的培养必须取得适当同步的进程, 才能得心应手。70年代 Latterell 报道了将稻瘟病菌分生孢子置于真空干燥的安瓿瓶内, 保存于–170°C的液氮中, 多数菌株能长期保存且致病性基本稳定^[9, 10]。关口义兼和饭岛章彦等报道了将稻瘟病菌孢子吸附于滤纸表面或与滑石粉混合, 置于干燥器内, 保存于5°C和–20°C条件下, 经数月仍保持其致病性^[6–8]。70年代末我国曾采用大麦粒培养稻瘟病菌干燥保存法^[4, 5], 但由于容易发生霉变污染,

而且保存时所占体积较大, 未能得到广泛应用。因此, 根据我国稻瘟病菌培养和接种的实际情况, 以及当前的保存条件进行了本研究, 旨在探讨孢子的适宜保存方法和致病性的变化, 从而提出简易有效的保存技术。

材 料 和 方 法

1. 供试菌株和保存方法 应用致病性不同的稻瘟病菌 ZA₆₃(82–41)、ZB₁(926)、ZC₁₅(80–33)和ZF₁(82–97)等4个小种在大麦粒培养基上培养, 产孢后将麦粒表面的孢子用蒸馏水洗脱, 再用真空泵将孢子滤于装有砂芯漏斗的普通滤纸上, 随后将滤纸轻轻取出, 分别置于30~35°C下风干, 按以下4种处理方法, 分别保存。

1988年9月3日收到。 Received Sep. 3, 1988

(1) 室温铝盒保存。风干的载孢滤纸置于铝盒中, 室温下保存;

(2) 室温干燥保存。风干的载孢滤纸置于干燥器中, 在室温下保存;

(3) 4℃干燥保存。风干的载孢滤纸置于干燥器中, 放在普通冰箱内保存;

(4) -20℃干燥保存。风干的载孢滤纸置于干燥器中, 放入-20℃低温冰箱内保存。

2. 孢子存活力和致病性测定 上述的

各处理于处理前进行孢子发芽和致病性测定, 供致病性测定的品种有我国稻瘟病菌7个鉴别品种和二九青、红突31、城特232、农虎6号等4个品种。经上述4种保存处理后每隔3~4个月, 分别取出部分样品(即滤纸), 置于30毫升蒸馏水中充分搅拌, 经过滤后取出2~3滴浓度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的孢子悬浮液置于凹玻片内, 在28℃下保湿培养24小时, 然后镜检计算孢子发芽率, 每个处理2次重复。与此同时将不同处理的孢子悬浮

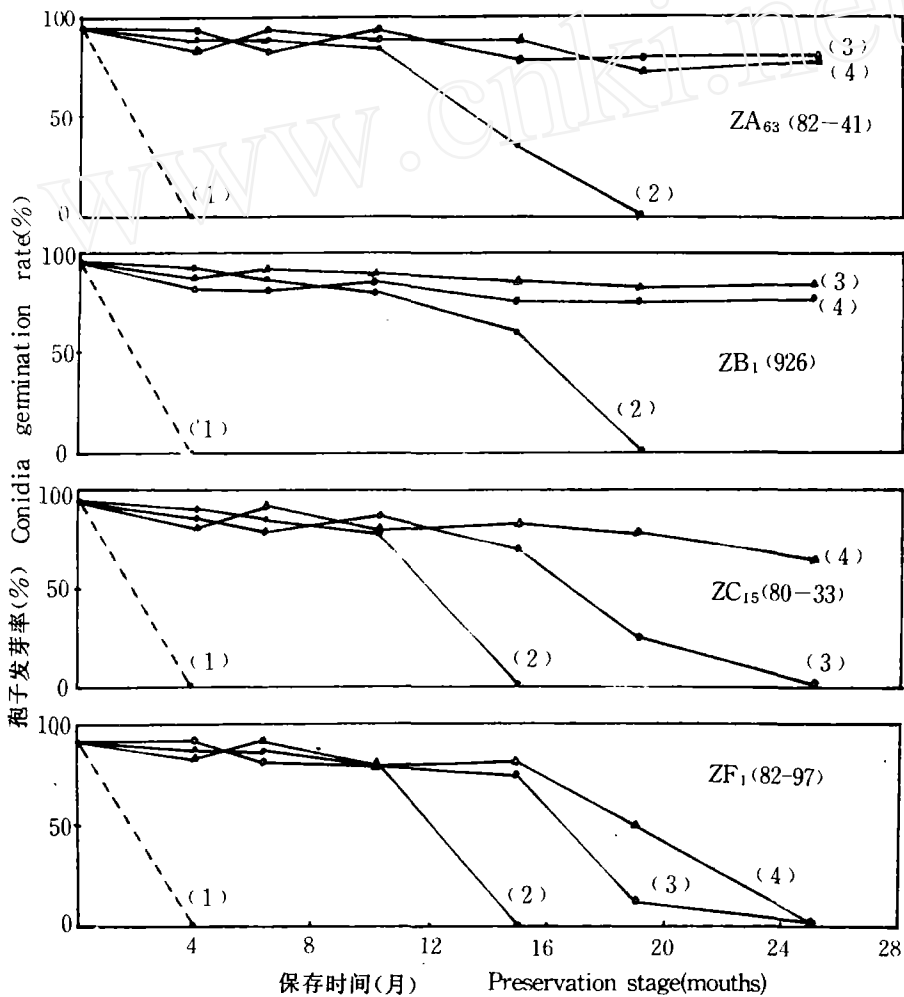


图1 不同保存条件对稻瘟病菌孢子存活率的影响

Fig.1. Effect of preservation conditions on conidia viability of *Pyricularia oryzae*

(1) 室温铝盒保存 (stored in aluminium box indoor) (2) 室温干燥保存 (stored in desiccator indoor)
(3) 4℃干燥保存 (Stored in desiccator at 4℃) (4) -20℃干燥保存 (Stored in desiccator at -20℃)

表1 稻瘟病菌孢子在不同保存条件下的致病性

Table 1. Pathogenicity of *Pyricularia oryzae* conidia in various preservation condition

| 小种 Race | 保存条件 Preservation condition | 保存时间(月数) Preservation stage(months) | | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | 0 | 4 | 6.5 | 9.5 | 15 | 19 | 25 |
| Z _{A63} (82-41) | 室温铝盒 Aluminium box, indoor | Z _{A63} | —* | | | | | |
| | 室温干燥 Desiccator, indoor | Z _{A63} | Z _{A63} | Z _{A63} | Z _{A61} | Z _{A61} | — | — |
| | 4℃干燥 Desiccator, 4℃ | Z _{A63} | Z _{A63} | Z _{A63} | Z _{A61} | Z _{A61} | Z _{A61} | Z _{A61} |
| | -20℃干燥 Desiccator, -20℃ | Z _{A63} | Z _{A63} | Z _{A63} | Z _{A61} | Z _{A61} | Z _{A61} | Z _{A61} |
| Z _{B1} (926) | 室温铝盒 Aluminium box, indoor | Z _{B1} | — | | | | | |
| | 室温干燥 Desiccator, indoor | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{E1} | Z _{B1} | — | — |
| | 4℃干燥 Desiccator, 4℃ | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{E1} | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{B1} |
| | -20℃干燥 Desiccator, -20℃ | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{B1} | Z _{B1} |
| Z _{C15} (80-33) | 室温铝盒 Aluminium box, indoor | Z _{C15} | — | | | | | |
| | 室温干燥 Desiccator, indoor | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | — | — | — |
| | 4℃干燥 Desiccator, 4℃ | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | — | — |
| | -20℃干燥 Desiccator, -20℃ | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} | Z _{C15} |
| Z _{F1} (82-97) | 室温铝盒 Aluminium box, indoor | Z _{F1} | — | | | | | |
| | 室温干燥 Desiccator, indoor | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | — | — | — |
| | 4℃干燥 Desiccator, 4℃ | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | — | — |
| | -20℃干燥 Desiccator, -20℃ | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | Z _{F1} | — |

*表示孢子已丧失活力。 Conidia inviability.

液分别接种于上述的抗、感不同的籼、粳稻品种上，以测定其致病性的变化。

结果 和 分 析

1. 保存条件和孢子存活力 经保存4个月后，除室温铝盒保存的各小种孢子全部丧失活力外，其余各处理的孢子发芽均正常，发芽率达83%以上，与处理前测定（对照）结果一致。保存10个月后，在不同温度条件下，干燥保存的三种处理孢子发芽率仍在80%以上，保持原有活力，各小种之间无明显差异。保存15个月后，供试的4个小种的孢子在4℃和-20℃干燥条件下保存，其孢子发芽率均能保持原有水平，而在室温下干燥保存的，除Z_{B1}（926）小种的孢子发芽率达61%外，其余3个小种均显著下降或丧失活力。保存19~25个月后，小种间在不同

保存条件下存活率的差异更大（图1）。表明干燥和低温是延长孢子存活期的主要因素，其中尤以干燥为甚，低温只能在干燥前提下才发挥其作用。概括上述，干燥低温显然有利于稻瘟病菌孢子的保存，但鉴于室温干燥保存设备简易，且能维持10个月以上的活力，可以适应接种的需要，因此是目前我国条件下较实用的一种保存技术。

2. 保存条件和孢子致病性 孢子保存除需测定孢子存活期和存活率外，还需进一步明确孢子经保存后其致病性的变化。结果表明不同处理经间隔不同时期在我国稻瘟病菌7个鉴别品种及其它抗感品种上的鉴定，供试的4个小种除Z_{A63}（82-41）在保存9个月后，从Z_{A63}变为Z_{A61}外，其余3个小种的致病性都保持稳定（表1），而且接种后的病斑型反应与保存前比较，无明显差异。

结 语

1. 室温干燥保存孢子存活期可达10个月以上, 4℃干燥保存可达15个月以上, -20℃干燥保存可达20个月以上, 孢子发芽率与对照基本一致。

2. 保存的4个小种中ZA₆₃产生变异, 其余3个小种稳定, 今后拟进一步加强这方面

的研究, 并扩大小种的试验范围, 探讨不同小种的孢子保存后其致病性的变化, 以筛选人工接种的稳定菌株。

3. 本研究的保存方法简便, 一次保存的孢子可供全年使用, 因而可以根据接种的需要随时提供大量的接种体。

4. 本保存方法可以保持前后试验中接种体的一致性。

参 考 文 献

- (1) 方中达, 1979. 植病研究方法, 农业出版社
- (2) 孙漱源等, 1986. 水稻稻瘟病及其防治, 上海科技出版社
- (3) 金敏忠等, 1981. 浙江省稻瘟病菌生理小种研究, 浙江农业科学(3): 101—106
- (4) 罗宽等, 1981. 稻瘟菌长期保存试验, 植物保护7(4): 26
- (5) 浙江农业科学院植保所稻瘟病研究室, 1979. 稻瘟病菌菌种保存试验小结, 浙江农业科学(5): 47—48
- (6) 关口义兼等, 1973. いもち病菌孢子的保存温度と病原性, 日本植物病理学会报39(2): 155
- (7) 关口义兼等, 1978. いもち病菌干燥孢子的保存について, 日本植物病理学会报44(3): 346
- (8) 饭岛章彦等, 1977. 接种用いもち菌の干燥孢子的作成および保存について, 关东病虫研报24(1): 23
- (9) Latterell FM, 1975. Phenotypic stability of Pathogenic Race of *Piricularia oryzae* and It Implications for Breeding of Blast Resistance Rice varieties. Proc. Horiz. Resist. Blast Dis. Rice CIAI Ser. CE 9, Cali. Colombia, pp199—234
- (10) Latterell FM *et al*, 1986. Longevity and Pathogenic Stability of *Piricularia oryzae*. *Phytopathology* 76(2): 231—235