

# 稻瘟病菌生物学特性及产孢条件研究

唐力琼, 张 玲\*, 胡运高, 杨国涛, 李海青

(西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

**摘要:** 研究稻瘟病菌生物学特性及产孢条件, 可以为水稻抗稻瘟病育种提供依据。为此, 比较了从不同生态区分离得到的 4 个稻瘟菌株(T1、T4、8400J2、YL5)间生物学特性的差异, 并对其产孢条件进行了深入研究。结果表明: 不同稻瘟菌株在菌落形态、菌丝结构、孢子特性等方面均存在明显差异。影响稻瘟菌产孢的条件中, 光照时间是最主要的因素, 以 12 h 光暗交替处理时其产孢量最高; 培养基和培养温度对稻瘟菌的产孢量也存在显著影响; 4 个稻瘟菌株的生物学特性差异明显, 其中 8400J2 产孢量最高。确定稻瘟菌的最佳产孢条件为: 选用米糠培养基、在 28 °C 左右培养、以 12 h 光暗交替诱导 48 h, 此条件下 8400J2 菌株的产孢量可达  $9.25 \times 10^4$  个/mL。

**关键词:** 稻瘟菌; 生物学特性; 产孢条件

中图分类号: S435.111.4<sup>+</sup>1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0097-04

## Biological Characteristics and Sporulation Condition of *Magnaporthe grisea*

TANG Li-qiong, ZHANG Ling\*, HU Yun-gao, YANG Guo-tao, LI Hai-qing

(School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

**Abstract:** In this paper, the biological characteristics of different rice blast fungus strains isolated from different ecological regions were compared and their sporulation conditions were studied in depth. The results showed that colony morphology, hyphal structure and spore properties of different rice blast strains were significantly different. Illumination time was the most important factor for rice blast fungus sporulation, and the highest spore amount appeared under 12 h light and dark alternating processing; medium and incubation temperature could significantly affect its sporulation. The biological characteristics of 4 rice blast fungus strains were significantly different, in which 8400J2 had the highest sporulation. The optimal sporulation condition was using rice bran medium, culturing at 28 °C and inducing for 48 h with 12 h alternating light and dark, under which the sporulation of 8400J2 reached  $9.25 \times 10^4$  spores/mL.

**Key words:** *Magnaporthe grisea*; biological characteristics; sporulation condition

目前, 水稻抗病育种是控制稻瘟病害最经济有效的措施, 而了解稻瘟菌株间的差异及对选育对象进行稻瘟菌接种鉴定是抗稻瘟病育种的关键<sup>[1-2]</sup>, 因此, 探索稻瘟菌的生物学特性和产孢条件具有重要意义。对于稻瘟菌产孢方法的研究已有较多报道, 但多集中在采用不同培养基诱导稻瘟菌产生孢子方面, 如采用以燕麦、大麦、高粱、稻草、米糠、粗面粉、

玉米粉、酵母淀粉等为主要原料的培养基诱导产孢差异明显, 但效果不尽相同<sup>[3-4]</sup>。此外, 孔秀英等研究表明, 光照、温度等因素对稻瘟菌产孢有一定的影响<sup>[5]</sup>。罗朝喜等研究表明, 稻瘟菌产孢力是由多基因控制的数量性状, 基因具有连锁效应<sup>[6-8]</sup>。由此可见, 影响稻瘟菌产孢的因素很多, 但是系统研究稻瘟菌产孢条件的报道鲜见。为此, 通过研究温度、光照

收稿日期: 2011-11-08

基金项目: 四川省“十一五”育种攻关项目(2006yzgg-1); 国家科技重大专项(10zgc001)

作者简介: 唐力琼(1987-), 女, 四川资阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 水稻抗稻瘟病育种。E-mail: tangliqiong88@126.com

\* 通讯作者: 张 玲(1959-), 女, 四川绵阳人, 副教授, 主要从事水稻抗稻瘟病育种研究。E-mail: zhangling@swust.edu.cn

时间及培养基对不同稻瘟菌株产孢量的影响,筛选适合稻瘟菌产孢的最佳条件,以期为水稻抗稻瘟病育种提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试菌株:从不同生态区分离得到的稻瘟菌菌株 T1、T4、8400J2、YL5,由四川农业大学植物病理实验室提供。

培养基:马铃薯琼脂培养基(PDA)、山口富夫培养基<sup>[9]</sup>、米糠培养基<sup>[10]</sup>、番茄燕麦培养基<sup>[11]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 形态学观察 将 4 个供试菌株接种于 PDA 培养基上,于 28℃ 黑暗培养。自接种之日起,连续 10 d 定时定点测量菌落直径,最后绘制各菌株菌丝生长曲线。培养过程中观察菌落形态,培养结束后显微观察菌丝形态。

1.2.2 产孢条件研究 试验采用四因素四水平正交设计(表 1),考虑 A(温度)、B(光照时间)因素以及 A、C(培养基)因素之间的交互作用,采用  $L_{32}(4^9)$  正交设计表。共设置 32 个处理,每处理重复 4 次。

表 1 稻瘟菌产孢条件的正交试验因素水平

水平	因素			
	温度(A)/℃	光照时间(B)/h	培养基(C)	菌株(D)
1	23	0	PDA	T1
2	28	12	山口富夫	T4
3	33	24	米糠	8400J2
4	38	48	番茄燕麦	YL5

注:光照 0、12、24、48 h 分别表示黑暗培养 48 h,以 12 h 为单位光暗交替培养 48 h,以 24 h 为单位光暗交替培养 48 h,连续光照 48 h,光照强度为 1 200 lx。

接种菌株后在 28℃ 黑暗培养 10 d,刮掉全部气生菌丝,再诱导产孢,48 h 后统计各处理产孢量。数据用 DPS 软件进行方差分析,多重比较采用 Duncan's 新复极差法。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同稻瘟菌株形态特征

2.1.1 菌落特性 4 个稻瘟菌株在 PDA 平板上菌落均呈近圆形,都能产生水溶性黑色色素。T1 从菌落中心到边缘依次是灰白色、黑色、白色,气生菌丝稀薄;T4 菌落从中间到边缘依次是褐色、淡褐色、黑褐色、白色,气生菌丝极不发达;8400J2 气生菌丝发达,菌落中间部分菌丝浓密、健壮、白色,向外菌丝逐渐稀薄;YL5 菌落形态和菌丝特征与 8400J2 相似,但是边缘菌丝较 8400J2 更稀薄(图 1)。

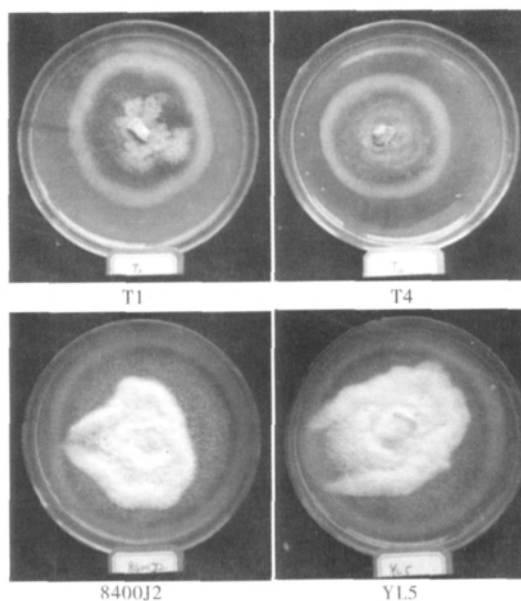


图 1 不同稻瘟菌菌株的菌落形态

2.1.2 菌丝特性 用 LEICA DM2500 显微系统拍摄的稻瘟菌菌株菌丝形态如图 2 所示。4 个菌株菌丝均有分枝,其中,T4 菌丝分枝夹角较小,且节间较长;8400J2 菌丝有明显的“打圈”现象(箭头所示)。

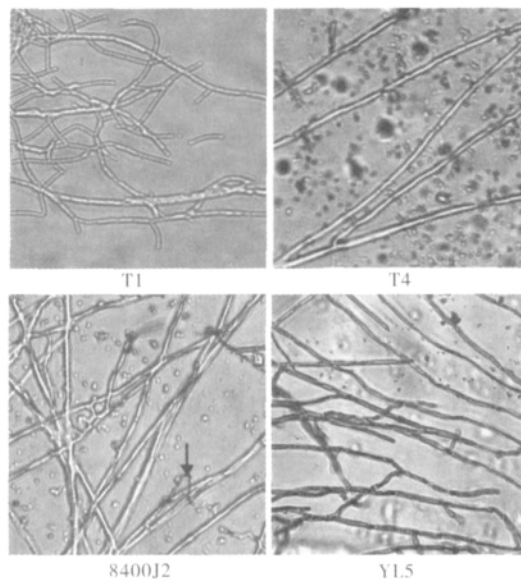


图 2 不同稻瘟菌菌株的菌丝形态(40×)

2.1.3 孢子特性 图 3 表明,4 个菌株孢子均呈洋梨形,T1、T4、8400J2、YL5 孢子大小依次为  $(25 \sim 28) \mu\text{m} \times 9 \mu\text{m}$ 、 $(20 \sim 24) \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$ 、 $(24 \sim 29) \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$ 、 $(27 \sim 32) \mu\text{m} \times 9 \mu\text{m}$ 。其中,T1 孢子有 2~3 个隔膜,顶端尖,基部钝圆;T4 孢子大多具有 2 个隔膜,两端均钝圆;8400J2 孢子大多具有 1 个隔膜,基部尖,顶端钝圆;YL5 孢子细长,两端均较尖,隔膜 1~3 个不等。

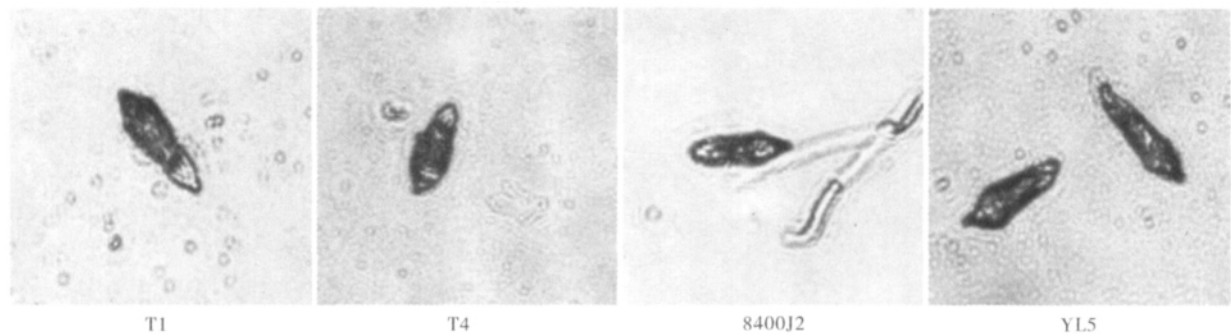


图 3 不同稻瘟菌菌株的孢子形态(40×)

2.2 稻瘟菌菌丝生长速度

图 4 表明,T1、T4、8400J2、YL5 的菌丝在 PDA 培养基中生长均表现出先快后慢、培养 3~4 h 出现生长拐点的相同趋势。其中,T1 菌丝的最高日均生长量达到 5.7 mm,比其他菌株高 1.4~2.4 mm。

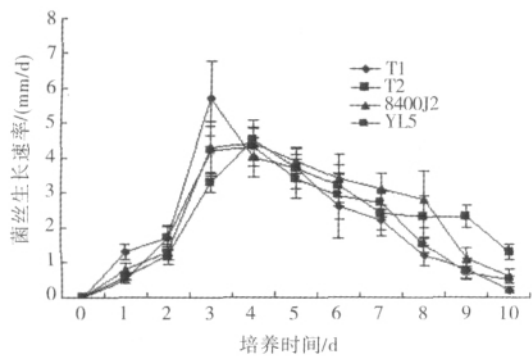


图 4 稻瘟菌菌丝生长曲线

2.3 不同因素对稻瘟菌产孢的影响

对正交试验中不同因素下稻瘟病菌产孢量进行 F 测验分析,结果见表 2。由表 2 可见,不同因素及因素间互作的产孢量差异均达到显著或极显著水平;区组的影响不显著。各因素对产孢量的影响程度表现为:光照时间>培养基>菌株>温度>温度与光照时间的交互作用>温度与培养基的交互作用。

表 2 不同因素下稻瘟菌产孢量的方差分析

变异来源	SS	DF	MS	F
区组	2.023 4	3	0.674 5	0.201 84
A 因素	93.835 9	3	31.278 6	9.359 92**
B 因素	182.023 4	3	60.674 5	18.156 46**
A×B	81.023 4	3	27.007 8	8.081 91**
C 因素	165.835 9	3	55.278 6	16.541 77**
A×C	35.585 9	3	11.862 0	3.549 63*
D 因素	138.835 9	3	46.278 6	13.848 58**
误差	340.859 3	102	3.341 758	

注: \* 表示达 5%显著水平, \*\* 表示达 1%显著水平。

分别对正交试验中各因素下的平均产孢量进行多重比较分析(表 3),结果表明,不同温度下稻瘟菌产孢量差异均达显著水平,产孢量表现为:28℃>23℃>33℃>38℃;4 种光照时间下稻瘟菌产孢量均存在显著差异,产孢量表现为:12 h>24 h>48 h>0 h;4 种培养基中,只有 PDA 培养基与山口富夫培养基间稻瘟菌产孢量差异不显著,产孢量高低顺序为:米糠培养基>PDA 培养基>山口富夫培养基>番茄燕麦培养基;4 个稻瘟菌菌株产孢量依次为:8400J2>YL5>T1>T4,其中稻瘟菌菌株 T1 与 T4 之间产孢量差异不显著,其他菌株产孢量均存在显著差异。因此,稻瘟菌的最佳产孢条件为:选用米糠培养基、在 28℃左右培养、以 12 h 光暗交替诱导 48 h。经试验,8400J2 菌株在此条件下产孢量居所有组合中最高,可达  $9.25 \times 10^4$  个/mL。

表 3 不同因素下稻瘟菌产孢量的多重比较结果

温度/℃	产孢量均值/ ( $\times 10^4$ 个/mL)	光照 时间/h	产孢量均值/ ( $\times 10^4$ 个/mL)	培养基	产孢量均值/ ( $\times 10^4$ 个/mL)	菌株	产孢量均值/ ( $\times 10^4$ 个/mL)
28	3.7188a	12	4.1875a	米糠	4.4688a	8400J2	3.9375a
23	3.0000b	24	3.1563b	PDA	2.3750b	YL5	3.2500b
33	2.1875c	48	1.9688c	山口富夫	2.0625b	T1	1.7188c
38	1.4375d	0	1.0313d	番茄燕麦	1.4375c	T4	1.4375c

注:同列不同小写字母表示差异达 5%显著水平。

3 结论与讨论

3.1 不同稻瘟菌菌株生物学特性及产孢量比较

本试验的 4 个稻瘟菌菌株,在生物学特性和产

孢量方面均存在明显差异,这可能是由不同生态区寄主品种、气候条件和种植结构等外部条件影响其遗传结构引起的<sup>[12-15]</sup>。其中 8400J2 产孢量最高,下一步将以它为对象进行更深入的生理生化和分子遗

传研究。

### 3.2 培养基对稻瘟菌产孢的影响

培养基对稻瘟菌产孢有显著影响,可能是因为其中某些营养成分具有诱发稻瘟菌分生孢子产生的作用<sup>[5]</sup>。王宝华等研究表明,稻瘟菌在燕麦片培养基上产孢效果最好<sup>[16]</sup>。殷丽青等研究表明,40:50:12的玉米粉稻草培养基上稻瘟菌产孢效果最好<sup>[17]</sup>。本试验结果表明,稻瘟菌在米糠培养基上产孢量最高,番茄燕麦培养基上产孢量最低。稻瘟菌在不同培养基上产孢量不同,可能与不同稻瘟菌菌株要求的营养成分不同有关。

### 3.3 温度对稻瘟菌产孢量的影响

稻瘟菌分生孢子形成的温度范围为10~35℃,以25~28℃且伴以高湿条件为最适<sup>[18-19]</sup>。在本试验中,28℃时稻瘟菌产孢量最高,23℃较33℃条件下稻瘟菌产孢量高,38℃时产孢量最低,与前人研究基本吻合。表明高温极不利于稻瘟菌孢子的产生,这是否与高温抑制其某些酶及生物大分子的活性有关,有待进一步研究。

### 3.4 光照时间对稻瘟菌产孢量的影响

光暗交替刺激是稻瘟菌株大量产孢的重要条件,连续黑暗甚至昏暗的光照可能会抑制稻瘟病菌孢子的释放<sup>[20]</sup>。本研究发现,稻瘟菌在12h光暗交替条件下产孢量显著高于其他处理,黑暗处理几乎不产孢,连续光照处理可以产生少量孢子。

在本试验条件下,选用米糠培养基、在28℃左右培养、以12h光暗交替诱导48h,可以得到大量稻瘟菌分生孢子。今后的研究中,应探讨更多因素对稻瘟菌产孢的影响,并利用现代分子生物学手段对控制稻瘟菌产孢的基因进行定位,对这些基因的表达环境作深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 崔勇,刘自旭.水稻稻瘟病抗性基因的研究[J].山西农业科学,2008,36(12):40-43.
- [2] 刘水芳.天津市稻瘟病菌生理小种动态变化研究[J].天津农业科学,1990(1):15-17.
- [3] 王国平,罗宽.稻瘟病菌产孢培养的筛选[J].湖南农学院学报,1989,15(2):58-62.
- [4] 洪建民,童贤明,徐福寿.中国水稻病害及其防治[M].

上海:上海科学出版社,2006.

- [5] 孔秀英.稻瘟病菌分生孢子的诱发及保存方法[J].微生物学通报,1995,22(5):308-310.
- [6] 罗朝喜,李进斌,李云成.稻瘟病菌产孢遗传规律分析[J].西南农业学报,1998,11(2):63-67.
- [7] Shi Z, Leung H. Genetic analysis and rapid mapping of a sporulation mutation in *Magnaporthe oryzae* [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1994, 7(1):113-120.
- [8] Shi Z, Leung H. Genetic analysis of sporulation in *Magnaporthe grisea* by chemical and insertional mutagenesis [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1995, 8(6):949-959.
- [9] 陈昱,钟鸣,侯玉柱,等.稻瘟病菌粗毒素的致病力测定及其对水稻幼苗生理生化的影响[J].种子,2006,25(5):20-23.
- [10] 阮洪椿,黄永康,陈如福,等.稻瘟病菌培养基筛选试验[J].福建稻麦科技,2004,22(1):31-32.
- [11] 赵颖,祖艳群,李元. UV-B 辐射增强对水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 生长和产孢的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(增刊):1-5.
- [12] 周益军,白绢,程兆榜,等.我国稻瘟病菌群体多样性研究[J].中国水稻科学,2004,18(3):277-280.
- [13] 张亚玲,靳学慧.不同稻瘟菌菌株在PDA培养基上生长差异分析[J].植物保护科学,2005,21(10):295-298.
- [14] 何月秋,唐文华.水稻稻瘟病菌研究进展(一)水稻稻瘟病菌多样性及其变异机制[J].云南农业大学学报,2001,16(1):60-63.
- [15] 李华,顾才东,高玉凤,等.宁夏稻瘟病菌群体分布及小种的毒力测定[J].华北农学报,2008,23(2):160-162.
- [16] 王宝华,郑武,鲁国东.稻瘟菌产孢培养基的筛选[J].福建农业科技,2002(2):1-2.
- [17] 殷丽青,陈全庆.培养基和光照对稻瘟菌产孢量的影响[J].上海农业科技,1991(5):48,43.
- [18] 刘志恒.稻瘟病[J].新农业,2002(7):38-39.
- [19] 罗梅花.水稻稻瘟病的发生与防治[J].现代农业科技,2010(10):158,161.
- [20] Lee K, Singh P, Chung W C, et al. Light regulation of asexual development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2006 (43):694-706.