

稻曲病菌培养条件的优化

程艳辉, 曹远银*, 张 晶, 陈雯舒
(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 采用组织分离法从稻曲球上分离到病原真菌, 通过柯赫法则鉴定, 该病原菌为稻曲病菌。对稻曲病菌的实验室培养条件进行优化, 结果表明, 该菌能够在 PDA 培养基上正常生长, 其生长温度在 15~35℃, 最适生长温度为 28℃, 温度过低或过高均抑制菌丝生长; 在 pH 为 4~10 的 PDA 培养基上均能生长, 最适 pH 值为 5~8; 同时测定了不同碳源和氮源对菌丝生长的影响, 其中蔗糖和硝酸钙对菌丝生长最为有利; 病原菌在胨本哲氏培养基中生长最快。

关键词: 稻曲病菌; 分离培养; 温度; 培养基; pH; 碳源; 氮源

中图分类号: S435.111.4⁺6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)05-0120-04

Optimization on the Culture Conditions of *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak

CHENG Yan-hui, CAO Yuan-yin*, ZHANG Jing, CHEN Wen-shu
(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The pathogen was isolated from diseased plant. Through Koch's postulates, the pathogen was identified as *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak. The study on culture conditions of the fungus in laboratory showed that the tested strain grew normally on PDA culture medium. The temperature range for its growth was between 15℃ to 35℃ and the optimal growth temperature was 28℃. The low or high temperature completely inhibited the mycelium growth. The range of pH was 4—10, and the optimal pH was 5—8. Sucrose and Ca(NO₃)₂ were separately the best carbon and nitrogen source for the mycelium growth among the tested carbon sources. The pathogen grew the fastest on Wakimoto toceshi medium among the solid culture media tested.

Key words: *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak; Isolation and culture; Temperature; Medium; pH; Carbon source; Nitrogen source

由稻曲病菌(*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak)引起的稻曲病(rice false smut)通常被认为是水稻的一种次要病害, 广泛分布于世界各稻区。该病主要危害水稻穗部, 在杂交稻、优质稻上发生较普遍, 减产严重的可达 10%~20%^[1]。近年来, 由于气候条件的变化、水稻品种的不断更新、耕作制度的改变及氮肥用量的加大和施肥水平的提高, 稻曲病危害渐趋严重, 已成为水稻生产上的重要病害之一^[2-3]。该病严重影

响了水稻的品质和产量, 是水稻优质、高产的又一大障碍, 另外稻曲病菌产生的毒素不但影响种子发芽, 降低水稻产量和稻谷品质, 而且对人畜有害^[4], 已成为生产上亟待解决的问题。因此, 控制稻曲病的发生发展, 对水稻生产及粮食安全至关重要。为了深入研究稻曲病的危害特点和控制方法, 需要掌握稻曲病菌最优的人工培养条件^[5-6]。为此, 研究了温度、pH、碳源、氮源、培养基等因素对稻曲病菌菌丝生长的影响,

收稿日期: 2011-01-07
基金项目: 辽宁省“十一五”农业攻关项目(2008214001)
作者简介: 程艳辉(1984-), 女, 黑龙江萝北人, 在读硕士研究生, 研究方向: 稻曲病菌接种技术和防治。
E-mail: xiaopishuaige@163.com
* 通讯作者: 曹远银(1955-), 男, 湖南澧县人, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物免疫学与分子植物病理学研究。
E-mail: caoyy66@yahoo.com.cn

并对该菌的培养条件进行了优化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌源 新鲜的稻曲球于2009年9月采自沈阳农业大学水稻所稻田中,经分离培养后保存于4℃冰箱中备用。

1.1.2 仪器 湿热灭菌器:上海苏豪智能系统有限公司;超净工作台(型号:DL-CJ-1N):广州晟实实验仪器有限公司;电热恒温培养箱(型号:DNP-9052):上海精宏实验设备有限公司。

1.1.3 培养基 (1)PK培养基:马铃薯200g、磷酸氢二钾0.5g、硫酸镁0.5g、蛋白胨0.5g、蔗糖17g、琼脂17g、H₂O 1L;(2)燕麦片琼胶培养基:燕麦片30g、琼脂17g、H₂O 1L;(3)马铃薯蔗糖(PSA)培养基:马铃薯200g、蔗糖20g、琼脂17g、H₂O 1L;(4)马铃薯葡萄糖(PDA)培养基:马铃薯200g、葡萄糖20g、琼脂17g、H₂O 1L;(5)胨本哲氏培养基:马铃薯300g、蔗糖15g、蛋白胨5g、Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.5g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.0g、琼脂17g、H₂O 1L;(6)大米汁培养基:大米200g、琼脂17g、H₂O 1L;(7)牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏3g、蛋白胨5~10g、H₂O 1L。

1.2 病原菌的分离鉴定

1.2.1 病原菌的分离 将稻曲球放入75%的乙醇溶液中消毒5s,再用1%的升汞消毒5~8min,然后用无菌水冲洗3次^[7]。将稻曲球的内层组织切成小块,置于PSA(含硫酸链霉素50mg/L)培养基的表面,每皿3块,28℃黑暗培养。7d后挑取平板培养基上的菌丝体,移植于试管斜面培养基上。通过显微镜观察菌丝和孢子的形态特征,初步判断分离培养的菌种是否为稻曲病菌。

1.2.2 病原菌致病性的鉴定 将分离培养的病菌,用少量无菌水稀释成菌悬液。在水稻破口抽穗时,用注射器吸取菌悬液,从稻苞下端注射进去,接种量约1~2mL,接种后外罩塑料薄膜,内喷水雾,16℃条件下保湿处理48h,26℃条件下保湿处理72h。之后移至室外自然条件下,经常喷水保持湿度。逐日观察接种后水稻穗部的发病情况,待穗部发病后再进行分离培养,从而确定其是否为致病病原。

1.3 稻曲病菌培养条件的优化

1.3.1 温度对病菌菌丝生长速率的影响 (1)无菌条件下,沿菌落边缘取直径5mm的菌丝块,移植于PDA平板中央^[8],分别在10、15、20、25、30、35℃的恒温条件下培养,每个处理5个重复。10d后用十字

交叉法测量菌落直径,并计算菌丝的日生长速率。(2)无菌条件下,沿菌落边缘取直径5mm的菌丝块,分别移植于PDA平板中央,分别在24、25、26、27、28、29、30、31℃的恒温条件下培养,每个处理设5个重复。20d后测量菌落直径,计算菌丝的日生长速率。

1.3.2 pH对病菌菌丝生长速率的影响 在PDA培养基中分别滴加1mol/L的HCl或NaOH溶液,在无菌条件下将pH调节为4、5、6、7、8、9、10等7个梯度。无菌条件下,沿菌落边缘切取直径5mm的菌丝块,分别移植于各平板中央,28℃下恒温黑暗培养,每个处理5个重复。20d后测定菌丝的日生长速率。

1.3.3 培养基对病菌菌丝生长速率的影响 无菌条件下,沿菌落边缘切取直径5mm的菌丝块,分别移植于1.1.3所述的7种培养基平板上,28℃下恒温黑暗培养,每个处理5个重复。20d后测定菌丝的日生长速率。

1.3.4 碳源对病菌菌丝生长速率的影响 供试碳源种类包括蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、果糖、乳糖、甘露醇。

碳源在培养基中的添加量,根据各自碳含量相对2%蔗糖的含碳量进行折算,将供试7种碳源置于PDA培养基(不含碳)中,组合配成7种培养基,以不加碳源的PDA培养基作为对照。无菌条件下,沿菌落边缘切取直径5mm的菌丝块,分别移植于上述培养基上,28℃下恒温黑暗培养,每处理5个重复。20d后测定菌丝的日生长速率。

1.3.5 氮源对病菌菌丝生长速率的影响 供试氮源种类包括硝酸钙、氯化铵、硫酸铵、硝酸钾、谷氨酸、酵母膏、蛋白胨。

氮源在培养基中的添加量,根据各自氮含量折合浓度为0.1mol/L。将供试7种氮源与基础PDA培养基组合成7种培养基,以基础PDA培养基作为对照。无菌条件下,沿菌落边缘切取直径5mm的菌丝块,分别移植于上述8种培养基上,28℃下恒温黑暗培养,每个处理设5个重复。20d后测定菌丝的日生长速率。

1.4 数据处理

采用SPSS统计软件对数据进行统计分析,采用Duncan's新复极差法进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 稻曲病菌的鉴定

分离的病菌,通过人工接种,在水稻的稻穗上能

产生与田间自然状态下相似的发病症状,即菌丝在谷粒内形成块状,逐渐膨大,使颖壳张开,露出淡黄色块状物;之后逐步增大,包裹全颖,形成比正常谷粒大 3~4 倍的菌块,表面平滑,最后龟裂,散出墨绿色粉末。根据稻曲病病原的形态特征以及该病害在水稻穗部的发病症状^[7],可确定分离培养的菌株为水稻稻曲病的病原。

2.2 温度对稻曲病菌菌丝生长的影响

首先测定适合稻曲病菌生长的温度范围,结果表明:15~35℃下稻曲病菌菌丝均能生长(表 1)。为了进一步明确稻曲病菌生长的最适温度,于 24~31℃范围内每隔 1℃设置 1 个处理,观察菌丝的生长状况。结果(表 2)表明,以 28℃最为适合,菌丝日生长速率达 1.51mm/d,温度过高或过低均抑制菌丝生长。

表 1 不同温度对稻曲病菌菌丝生长的影响(1)

温度/℃	第 10 天菌落平均直径/mm	生长速率/(mm/d)
10	0.0eE	0.00
15	2.8dD	0.19
20	4.4cC	0.29
25	10.1aA	0.67
30	9.6bB	0.64
35	4.3cC	0.29

表 2 不同温度对稻曲病菌菌丝生长的影响(2)

温度/℃	第 20 天菌落平均直径/mm	生长速率/(mm/d)
24	23.0fF	1.15
25	25.8dD	1.29
26	26.5cC	1.33
27	28.0bB	1.40
28	30.2aA	1.51
29	23.5eE	1.18
30	16.2gG	0.81
31	15.8hH	0.79

2.3 pH 对稻曲病菌菌丝生长的影响

从表 3 可以看出,稻曲病菌在 pH 4~10 均能生长。当 pH 值为 5~8 时,菌丝生长较好;其中 pH 为 6 时,菌丝生长最好,第 20 天菌落直径达到 30.2 mm,平均日生长速率为 1.51mm/d。

表 3 不同 pH 对稻曲病菌菌丝生长的影响

pH	第 20 天菌落平均直径/mm	生长速率/(mm/d)
4	18.0fF	0.90
5	25.8cC	1.29
6	30.2aA	1.51
7	29.0bB	1.45
8	25.4dD	1.27
9	19.8eE	0.99
10	15.2gG	0.76

2.4 培养基对稻曲病菌菌丝生长的影响

由表 4 可知,稻曲病菌在胨本哲氏培养基上生

长最好,日生长速率为 1.50mm/d;其次为马铃薯葡萄糖培养基,日生长速率为 1.32mm/d;之后依次为马铃薯蔗糖、大米汁、PK、燕麦片琼胶培养基;在牛肉膏蛋白胨培养基上生长最差。

表 4 不同培养基对稻曲病菌菌丝生长的影响

培养基类型	第 20 天菌落平均直径/mm	生长速率/(mm/d)
PK	18.5eE	0.93
马铃薯蔗糖	24.8cC	1.24
马铃薯葡萄糖	26.4bB	1.32
胨本哲氏	30.0aA	1.50
大米汁	19.2dD	0.96
牛肉膏蛋白胨	14.4gG	0.72
燕麦片琼胶	17.0fF	0.85

2.5 不同碳源对稻曲病菌菌丝生长的影响

由表 5 可知,7 种碳源均有利于稻曲病菌生长。在以蔗糖为碳源的培养基中,稻曲病菌的菌落直径最大,达到 28.9mm,日生长速率为 1.45mm/d;其余碳源,按生长的稻曲病菌菌落直径大小依次为葡萄糖、麦芽糖、果糖、淀粉、乳糖、甘露醇。

表 5 不同碳源对稻曲病菌菌丝生长的影响

碳源类型	第 20 天菌落平均直径/mm	生长速率/(mm/d)
蔗糖	28.9aA	1.45
麦芽糖	20.1eE	1.01
葡萄糖	22.5cC	1.13
淀粉	17.2gG	0.86
果糖	19.4fF	0.97
乳糖	16.3dD	0.82
甘露醇	15.4bB	0.77
CK	10.2hH	0.51

2.6 不同氮源对稻曲病菌菌丝生长的影响

由表 6 可知,以硝酸钙作为氮源对菌丝生长的促进作用最为明显,第 20 天测得的菌落直径为 27.8mm,日生长速率为 1.39mm/d。菌株在以硝酸铵和氯化铵为氮源的培养基上生长的菌落直径与对照组相比差异不大,表明这 2 种氮源对稻曲病菌生长的促进作用不明显。其余氮源,按稻曲病菌菌落直径大小依次为蛋白胨、谷氨酸、硝酸钾、酵母膏。

表 6 不同氮源对稻曲病菌菌丝生长的影响

氮源类型	第 20 天菌落平均直径/mm	生长速率/(mm/d)
硝酸钙	27.8aA	1.39
氯化铵	21.9fF	1.10
硝酸铵	21.3gG	1.07
硝酸钾	23.7dD	1.19
谷氨酸	24.4cC	1.22
酵母膏	22.8eE	1.14
蛋白胨	25.2bB	1.26
CK	17.8hH	0.89

3 结论与讨论

本研究结果表明, 稻曲病菌在 15 ~ 35 °C 均能够生长, 24 ~ 29 °C 下菌株长势明显优于其他温度, 其中最适的生长温度为 28 °C, 这与刘明霞等^[9]报道的基本一致。稻曲病菌在 pH 4 ~ 10 均能生长, 这与张舒等^[10]报道的存在差异, 他们认为稻曲病菌在 pH 10 条件下几乎不生长, 造成差异的原因可能是区域地理环境不同。pH 5 ~ 8 时病菌生长较好, 以 pH 为 6 时菌丝生长最好, 第 20 天菌落直径可达 30.2 mm。稻曲病菌在胨本哲氏培养基上生长最好, 日生长速率可达 1.50 mm/d, 其次为马铃薯葡萄糖培养基, 生长最差的是牛肉膏蛋白胨培养基, 与刘明霞等^[9]报道的基本一致。在加入不同碳源的培养基上, 稻曲病菌的菌落直径均大于对照组(不含碳源), 表明供试碳源均有利于菌丝生长; 其中菌株在以蔗糖为碳源的培养基上生长最快, 因此, 蔗糖可作为最适碳源。将不同氮源加入 PDA 中用于培养稻曲病菌, 菌株的菌落直径均大于对照组(不含氮源), 表明供试氮源均有利于菌丝生长, 以硝酸钙对菌株生长的促进作用最为明显, 而硝酸铵和氯化铵为氮源对菌丝生长的促进作用最差。

表中数据均采用 SPSS 统计软件进行统计分析, 采用 Duncan's 新复极差检验法检验。从检验结果来看, 每个处理之间都有极显著差异, 但从生长速率等实际数据来看, 这种差异性并不十分明显, 可

能与该菌生长缓慢以及菌落培养时间等因素有关。

参考文献:

[1] 宰素珍. 杂交稻稻曲病的发生与防治[J]. 现代农业科技, 2009(22): 162, 164.

[2] 张君成, 张炳欣, 陈志谊, 等. 稻曲病菌分生孢子的生物学研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(1): 44-47.

[3] 陆凡, 陈志谊, 陈毓苓, 等. 稻曲病菌生物学特性及其侵染循环中某些未确定要点的研究[J]. 江苏农业学报, 1996, 12(4): 35-40.

[4] 张君成, 陈志谊, 张炳欣, 等. 稻曲病菌的形态学观察研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(6): 517-523.

[5] Roy A K. Records of heavy attacks of hunts and false moot of rice[J]. International Rice Research Newsletter, 1980, 5(6): 5.

[6] 王疏, 白元俊, 周永力, 等. 稻曲病菌的病原学[J]. 植物病理学报, 1998, 28(1): 19-24.

[7] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1996.

[8] 王桂华, 李桂荣. 稻曲病菌人工培养方法[J]. 植物病理学报, 1990, 20(1): 22.

[9] 刘明霞, 秦姝, 李颖, 等. 稻曲病菌分离技术、培养条件研究[J]. 辽宁农业科学, 2009(6): 20-22.

[10] 张舒, 喻大昭, 陈其志. 稻曲病原菌生物学特性研究[J]. 湖北农业科学, 2009, 40(12): 3015-3017.