

水稻白叶枯病菌及细菌性条斑病菌培养及接种

马海港, 袁猛*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: myuan@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 马海港, 袁猛. (2018). 水稻白叶枯病菌及细菌性条斑病菌培养及接种. *Bio-101* e1010180. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010180.

实验原理: 水稻白叶枯病由稻黄单胞菌稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)引起, 自然条件下由水稻的伤口或水孔侵入水稻叶片, 进入木质部进行繁殖, 由叶片向叶鞘侵染, 最终造成叶片枯萎。水稻细菌性条斑病由稻黄单胞菌稻生致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*)引起, 自然条件下由水稻的气孔或伤口侵入水稻叶片, 病斑起初为暗绿色水渍状, 沿叶脉扩展呈细线状, 严重时同样造成叶片枯萎。本实验介绍了这两种细菌的培养、接种及调查方法。

实验目的: 鉴定水稻对白叶枯病菌及细菌性条斑病菌的抗性情况。

关键词: 水稻白叶枯病菌, 水稻细菌性条斑病菌, 细菌培养, 接种, 病情调查

材料与试剂

1. 枪头
2. 0.5 ml 离心管
3. 注射器
4. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*
5. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*
6. Tryptone (Oxoid, England, catalog number: LP0042)
7. Agar (武汉创新生物技术有限公司, 中国, catalog number: BM0212)
8. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
9. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
10. NaCl (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
11. KCl (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)

12. KH_2PO_4 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
13. 蔗糖 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
14. 甘油 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
15. 马铃薯培养基 (见溶液配方)
16. PBS (见溶液配方)

仪器设备

1. -70 °C 冰箱
2. 超净工作台
3. 接种环
4. 温箱

实验步骤

一、水稻白叶枯病菌及细菌性条斑病菌的培养

1. 取出于-70 °C 保存的菌株, 于超净工作台上用灭菌枪头吸取菌液至土豆斜面培养基上, 用灭菌接种环涂布均匀。
2. 置于 28 °C 温箱内培养 3 天, 细菌长成亮黄色, 可将其置于 4 °C 存放一个月, 使用时按照步骤 1 中所述方法将其转接至新的培养基上。
3. 再次转接后的生根管置于 28 °C 温箱内培养 2 天, 细菌长成亮黄色, 可用于保存菌株或接种实验。

二、水稻白叶枯病菌及细菌性条斑病菌的菌株保存

上述步骤 3 中培养好的菌体, 若需长久保存菌株时, 向生根管中加入 10-30 ml 灭菌的 30%甘油, 与菌体混匀后, 分装至灭菌的 0.5 ml 离心管中, 置于-70 °C 长久保存。

三、水稻白叶枯病菌的接种及调查方法

1. 菌体于 28 °C 温箱内培养 2 天长成亮黄色后, 用 PBS 溶液稀释, 采用比浊法将浓度稀释至约 9×10^9 个细菌/ml。
2. 接种采用剪叶法, 于水稻孕穗期接种 (也可于水稻幼苗期接种)。接种时用剪刀蘸取

菌液，剪去剑叶（幼苗期接种时选取完全伸展的叶片接种）叶尖约 2 cm 长部分。每个单株至少接种 5 片剑叶。

3. 通常在接种 14 天或 21 天后进行调查。调查时量取病斑长度及病叶长度，依据病斑面积（病斑长度/病叶长度）衡量病情。每个单株至少调查 5 片剑叶。

四、水稻细菌性条斑病菌的接种及调查方法

1. 细菌的培养及稀释同白叶枯病菌。
2. 接种采用渗透法(视频 1)或针刺法(视频 2)，于水稻幼苗期或孕穗期接种。幼苗期接种时选取完全伸展的叶片接种，孕穗期接种时选取剑叶接种。采用渗透法接种时，用一次性注射器吸取菌液，将注射口按住叶片，用力推动注射器，使菌液通过压力渗入叶片内。采用针刺法接种时，用一次性注射器吸取菌液后，将注射口装上针头，推动注射器使针孔中充满菌液，之后将针头刺入叶片，菌液随针头被带入叶片内。



视频 1. 渗透法接种水稻细菌性条斑病



视频 2. 针刺法接种水稻细菌性条斑病

3. 通常在接种 14 天或 21 天后进行调查。调查时用刻度尺测量病斑长度, 每个单株至少测量 5 片剑叶并取其平均值作为该单株的发病长度。(图 1)

注:

- 1) 温度为 25-30 °C、湿度高的环境容易发病, 温度过低或过高、空气湿度过低时发病情况差。因此接种时应留意环境条件的变化。
- 2) 接种应在可控制的条件下进行, 避免造成病菌扩散, 导致疫情。
- 3) 水稻细菌性条斑病为全国植物检疫性病害之一, 应慎重接种。

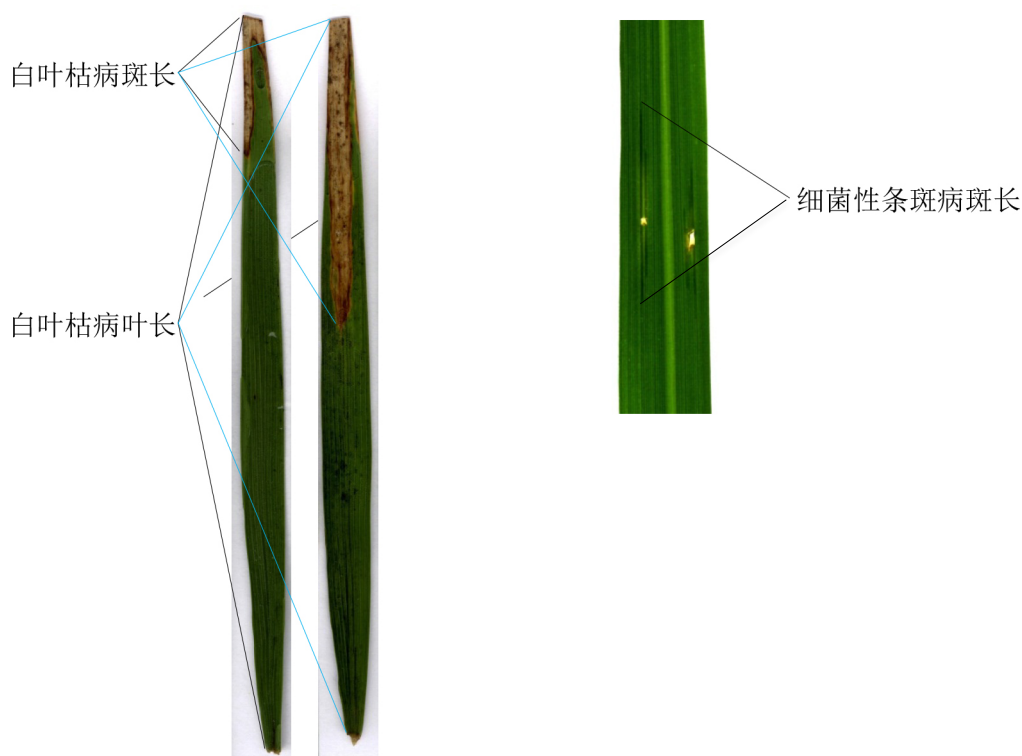


图 1. 水稻白叶枯病及细菌性条斑病接种结果示意图

溶液配方

1. 马铃薯培养基

马铃薯	300 g (去皮煮熟后过滤取汁液)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.5 g
Tryptone	5 g
蔗糖	15 g
Agar	20 g

加蒸馏水至 1 L，调 pH 至 6.8-7.0，分装至生根管中，封口后灭菌，趁热将生根管倾斜待培养基凝固，使培养基在生根管中形成斜面。

2. PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.628 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

加入灭菌去离子水至终体积为 1 L，用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.4。