



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106957890 A

(43)申请公布日 2017.07.18

(21)申请号 201710174893.5

(22)申请日 2017.03.22

(71)申请人 恩施土家族苗族自治州农业科学院

地址 445000 湖北省恩施土家族苗族自治州恩施市施州大道517号

(72)发明人 吴尧 吴双清 王林 揭春玉

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有限公司 11246

代理人 夏艳

(51) Int. Cl.

C12Q 1/18(2006.01)

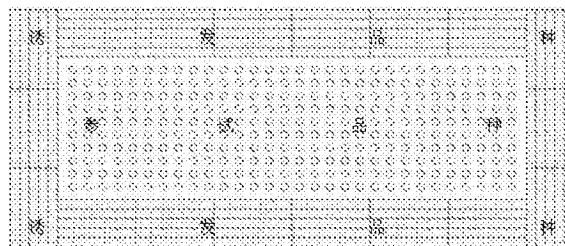
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种提高水稻品种穗瘟室内人工接种鉴定准确性的方法

(57)摘要

本发明属于水稻抗病育种技术领域,尤其涉及一种提高水稻品种穗瘟室内鉴定准确性的方法,步骤为:(1)育苗;(2)菌株活化;(3)诱导产孢;(4)孢子悬浮液配制;(5)喷雾接种;(6)诱发品种育苗及小区病原的培育;(7)鉴定结果调查。本发明是以室内人工接种鉴定为基础结合自然诱发鉴定的特点,通过引入诱发品种,并分期播种,使鉴定材料长期处于持续稳定致病压力之下,从而简化试验操作,不会人为对鉴定品种植株造成伤口,病原背景清晰,环境条件可调,鉴定时间安排灵活,重复性高,使大规模穗瘟室内人工鉴定成为可能。



1. 一种提高水稻品种穗瘟室内人工接种鉴定准确性的方法,其特征在于,步骤包括:

(1) 育苗:根据水稻品种的数量确定试验小区大小,小区为矩形,每个品种1行,每行10株,行间距约10cm,育苗土采用稻田土,小区四周条播丽江新团黑谷作为诱发品种;

(2) 菌株活化:将保存的单孢菌株活化于番茄燕麦培养基的平板中,28℃黑暗培养3d~5d;

(3) 诱导产孢:小麦浸泡至吸水充分,用锥形瓶分装,每瓶分装小麦150g,湿热灭菌45min,自然冷却,挑取步骤(2)中菌落边缘健壮菌丝,转接至锥形瓶中,28℃黑暗培养10d,期间每24h摇动一次,使菌丝均匀生长,当菌丝布满培养基质后,将培养基质倒出用清水搓洗,去掉表面气生菌丝,沥干,平铺于洁净的浅盘中,盖上一层洁净纱布,放置于恒温光照培养箱中,黑光灯照射,温度设置为28℃,使小麦粒表面大量产生分生孢子;

(4) 孢子悬浮液配制:用蒸馏水配制0.05%的吐温-80溶液,用该溶液震荡搓洗小麦粒,过滤,配制成孢子悬浮液,每个菌株配制500mL菌液;

(5) 喷雾接种:待秧苗长至三叶一心时,用透明塑料薄膜将小区四周隔离,隔离高度为2m,顶部用无纺布覆盖,用微型喷雾器将步骤(4)中配置好的菌液均匀喷施于小区内水稻叶片上,盖上遮阳网,20℃~30℃保温保湿3d,然后取下遮阳网;

(6) 诱发品种育苗及小区病原的培育:诱发品种采用丽江新团黑谷,育苗容器使用可移动的条状育苗盘,第1期诱发品种与鉴定品种同时播种,当第1期诱发品种长到三叶一心期时,播种第2期诱发品种,前期诱发种移至外侧,后期诱发品种置于内侧;当第2期诱发品种长到三叶一心时,播种第3期诱发品种,前两期诱发种移至外侧,第3期诱发品种置于内侧;依次类推,直至鉴定品种成熟;

(7) 鉴定结果调查:调查记载方法参考中华人民共和国农业行业标准《水稻品种试验稻瘟病抗性鉴定与评价技术规程NYT2646-2014》。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述番茄燕麦培养基:番茄汁150mL、燕麦40g、琼脂20g、加水至1000mL。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述浅盘内平铺一张湿润的吸水纸。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(6)中,所述诱发品种分期播种,培育小区病原。

## 一种提高水稻品种穗瘟室内人工接种鉴定准确性的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于水稻抗病育种技术领域,尤其涉及一种提高水稻品种穗瘟室内鉴定准确性的方法。

### 背景技术

[0002] 水稻是我国乃至世界的重要粮食作物。稻瘟病(*Pyricularia oryzae* Cav.)是我国主要水稻病害之一,与纹枯病、白叶枯并称水稻三大病害,严重威胁水稻生产安全。稻瘟病在水稻整个生育阶段皆可发生,主要危害水稻叶片、茎秆、穗部。按危害时期及部位的不同,主要可分为苗瘟、叶瘟、叶枕瘟、节瘟、穗颈瘟、支梗瘟和谷粒瘟。其中因穗瘟直接影响水稻产量而最为受到重视。目前防治稻瘟病最经济有效的措施依然是抗病品种的选育与利用,而水稻品种抗稻瘟病鉴定是抗病育种的基础及前提。

[0003] 根据病原的来源及环境因素的控制情况,目前水稻品种抗稻瘟病鉴定主要分为自然诱发鉴定和室内人工接种鉴定两大类。自然诱发鉴定是指利用自然环境中已有的病原在自然的温度、湿度、光照等环境因素影响下对水稻品种造成侵染,从而通过水稻品种的发病表现对其进行鉴定。自然诱发鉴定具有鉴定结果准确,病原对水稻品种致病压力持久稳定,单次可以鉴定大量样本,鉴定结果直接反映水稻生产状况等优点,但是存在着鉴定结果严重依赖自然气候条件,易受极端天气影响,一年只能进行一次鉴定试验,病原种群背景复杂,鉴定重复性差等缺点。室内人工接种鉴定是指病原和环境因素全部或部分受人为控制,从而对水稻品种进行抗病鉴定。室内人工接种鉴定具有病原背景清晰,环境条件可调,鉴定试验安排灵活不受农时限制,重复性好等优点,但目前广为采用的室内人工接种鉴定存在着对试验操作人员要求高,病原对水稻品种致病压力难以持久稳定等缺点。而且目前室内人工接种鉴定主要是进行苗期叶瘟鉴定,水稻生产中最受重视的穗瘟鉴定因其试验难度大反而较少被采用。穗瘟室内人工鉴定难度主要在于水稻穗瘟易感生育期在孕穗期至破口期,此期间若仅依靠有限次数的人工喷雾接种,稻瘟病病原很难从植株表面侵入。目前进行穗瘟室内人工鉴定主要是通过在水稻叶鞘内进行人工注射稻瘟病孢子悬浮液来诱发穗瘟,但是该方法会对植株造成伤口,会对鉴定结果造成影响,而且人工成本太高,难以进行大规模鉴定。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是以室内人工接种鉴定为基础结合自然诱发鉴定的特点,通过引入诱发品种,并分期播种,使鉴定材料长期处于持续稳定致病压力之下,从而简化试验操作,不会人为对鉴定品种植株造成伤口,病原背景清晰,环境条件可调,鉴定时间安排灵活,重复性高,使大规模穗颈瘟室内人工鉴定成为可能。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:一种提高水稻品种穗瘟室内人工接种鉴定准确性的方法,步骤包括:

[0006] (1) 育苗:根据水稻品种的数量确定试验小区大小,小区为矩形,每个品种1行,每

行10株,行间距约10cm,育苗土采用稻田土,小区四周条播丽江新团黑谷作为诱发品种;

[0007] (2) 菌株活化:将保存的单孢菌株活化于番茄燕麦培养基的平板中,28℃黑暗培养3d~5d;

[0008] (3) 诱导产孢:小麦浸泡至吸水充分,用锥形瓶分装,每瓶分装小麦150g,湿热灭菌45min,自然冷却,挑取步骤(2)中菌落边缘健壮菌丝,转接至锥形瓶中,28℃黑暗培养10d,期间每24h摇动一次,使菌丝均匀生长,当菌丝布满培养基质后,将培养基质倒出用清水搓洗,去掉表面气生菌丝,沥干,平铺于洁净的浅盘中,盖上一层洁净纱布,放置于恒温光照培养箱中,黑光灯照射,温度设置为28℃,使小麦粒表面大量产生分生孢子;

[0009] (4) 孢子悬浮液配制:用蒸馏水配制0.05%的吐温-80溶液,用该溶液震荡搓洗小麦粒,过滤,配制成孢子悬浮液,每个菌株配制500mL菌液;

[0010] (5) 喷雾接种:待秧苗长至三叶一心时,用透明塑料薄膜将小区四周隔离,隔离高度为2m,顶部用无纺布覆盖,用微型喷雾器将步骤(4)中配置好的菌液均匀喷施于小区内水稻叶片上,盖上遮阳网,20-30℃保温保湿3d,然后取下遮阳网;

[0011] (6) 诱发品种育苗及小区病原的培育:诱发品种采用丽江新团黑谷,育苗容器使用可移动的条状育苗盘,第1期诱发品种与鉴定品种同时播种,当第1期诱发品种长到三叶一心期时,播种第2期诱发品种,前一期诱发种移至外侧,后一期诱发品种置于内侧;当第2期诱发品种长到三叶一心时,播种第3期诱发品种,前两期诱发种移至外侧,第3期诱发品种置于内侧;依次类推,直至鉴定品种成熟;

[0012] (7) 鉴定结果调查:调查记载方法参考中华人民共和国农业行业标准《水稻品种试验稻瘟病抗性鉴定与评价技术规程NYT2646-2014》。

[0013] 进一步的,步骤(2)中,所述番茄燕麦培养基:番茄汁150mL、燕麦40g、琼脂20g、加水至1000mL。

[0014] 进一步的,步骤(3)中,所述浅盘内平铺一张湿润的吸水纸。

[0015] 进一步的,步骤(6)中,所述诱发品种分期播种,培育小区病原。

[0016] 本发明的有益技术效果是:本发明是以室内人工接种鉴定为基础结合自然诱发鉴定的特点,通过引入诱发品种,并分期播种,使鉴定材料长期处于持续稳定致病压力之下,从而简化试验操作,不会人为对鉴定品种植株造成伤口,病原背景清晰,环境条件可调,鉴定时间安排灵活,重复性高,使大规模穗瘟室内人工鉴定成为可能。

## 附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0018] 图1是本发明试验田布局分布图。

## 具体实施方式

[0019] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于

本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0020] 一种提高水稻品种穗瘟室内人工鉴定准确性的方法,包括以下步骤:

[0021] (1) 育苗:根据水稻品种的数量确定试验小区大小,小区为矩形,每个品种1行,每行10株,行间距约10cm,育苗土采用稻田土。小区四周条播丽江新团黑谷作为诱发品种。小区布局如图1所示。

[0022] (2) 菌株活化:将保存的单孢菌株活化于番茄燕麦培养基(番茄汁150mL,燕麦40g,琼脂20g,加水至1000mL)的平板中,28℃黑暗培养3d~5d。

[0023] (3) 诱导产孢:小麦浸泡至吸水充分,用锥形瓶分装,每瓶分装小麦150g,湿热灭菌45min,自然冷却。挑取步骤(2)中菌落边缘健壮菌丝,转接至锥形瓶中,28℃黑暗培养10d,期间每24h摇动一次,使菌丝均匀生长。当菌丝布满培养基质后,将培养基质倒出用清水搓洗,去掉表面气生菌丝,沥干,平铺于洁净的浅盘中,浅盘内预先平铺一张干净湿润的吸水纸,铺放的厚度要薄,尽量不要堆叠。盖上一层洁净纱布,放置于恒温光照培养箱中,黑光灯照射,温度设置为28℃,3d后小麦粒表面即有大量分生孢子产生。

[0024] (4) 孢子悬浮液配制:用蒸馏水配制0.05%的吐温-80溶液,用该溶液震荡搓洗小麦粒,过滤,配制成孢子悬浮液,每个菌株配制500mL菌液。

[0025] (5) 喷雾接种:待秧苗长至三叶一心时,用透明塑料薄膜将小区四周隔离,隔离高度为2m,顶部用无纺布覆盖。用微型喷雾器将步骤(4)中配置好的菌液均匀喷施于小区内水稻叶片上,盖上遮阳网,20℃~30℃保温保湿3d,然后取下遮阳网。

[0026] (6) 诱发品种育苗及小区病原的培育:诱发品种采用丽江新团黑谷,育苗容器使用可移动的条状育苗盘,第1期诱发品种与鉴定品种同时播种,当第1期诱发品种长到三叶一心期时,播种第2期诱发品种,前一期诱发种移至外侧,后一期诱发品种置于内侧;当第2期诱发品种长到三叶一心时,播种第3期诱发品种,前两期诱发种移至外侧,第3期诱发品种置于内侧;依次类推,直至鉴定品种成熟;

[0027] (7) 鉴定结果调查:调查记载方法参考中华人民共和国农业行业标准《水稻品种试验稻瘟病抗性鉴定与评价技术规程NYT2646-2014》。每株水稻的病级以发病最重的单穗为准,损失率分级标准见表1。0级-3级定为“R”,5级-9级定为“S”。每个品种有3株以上(含3株)表现为“S”则该品种记为感病,否则记为抗病。

[0028] 表1水稻穗瘟单穗损失率分级标准

[0029]	病级	病情
	0	无病

---

	1	小支梗发病，每穗损失 $\leq 5.0\%$
	3	主轴或穗颈发病，每穗损失 $5.1\% \sim 20.0\%$
[0030]	5	主轴或穗颈发病，谷粒半瘪，每穗损失 $20.1\% \sim 50.0\%$
	7	穗颈发病，大部分瘪谷，每穗损失 $50.1\% \sim 70.0\%$
	9	穗颈发病，每穗损失 $>70.0\%$

---

注：当没有穗瘟，而有结瘟时，结瘟按穗瘟的稻谷实际损失的级别计。

[0031] 注：本表参照NYT 2646-2014中表A.3编制。

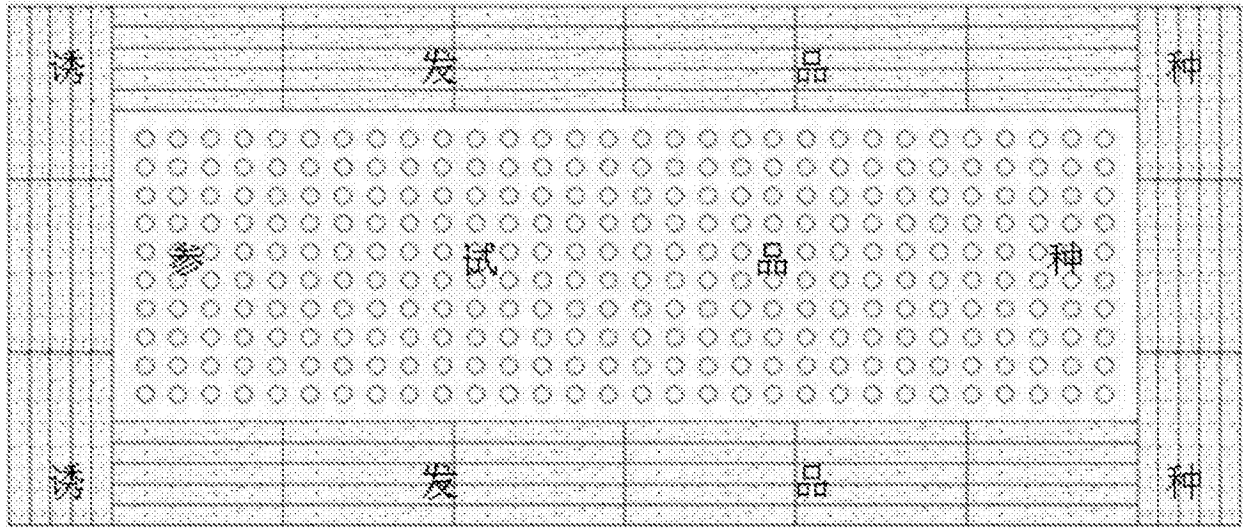


图1