

狗尾草旋孢腔菌单子囊孢子分离技术

郭 慧

(北京农业大学,北京 100094)

摘要 通过分离工具的改进,分离时间的选择,孢子成熟度的识别和培养基的选择,提高了狗尾草旋孢腔菌单子囊孢子的分离成活率。

关键词 狗尾草旋孢腔菌;单子囊孢子;分离

对狗尾草旋孢腔菌 [*Cochliobolus setariae* (Ito et Kurib.) Drechsl.] 杂交后代进行四分体分析,需在挑取单个子囊内 8 个子囊孢子,并保证其全部成活的基础上进行。本文报道的狗尾草旋孢腔菌单子囊孢子分离技术,通过分离工具的改进,分离时间的选择及孢子成熟度的识别和培养基的选择,提高了该菌单子囊孢子的分离速度和分离后的成活率。

(一) 玻璃针的制备

取直径为 1.5—2mm 的细玻璃棒,在酒精灯上烧红后,均匀用力向两侧平拉,直至拉断。玻璃针分为剥离针和挑取针两种。剥离针拉断后,需在酒精灯火焰内快速沾一下,使其针端略变圆钝,以减少在剥离过程中对子囊孢子壁的机械损伤。挑取针则要求针端细长,便于挑取。

(二) 分离时间的选择

在诱导狗尾草旋孢腔菌有性世代常用的 Sach 培养基上接种后,培养 25—30 天,为最佳分离时间。过早则由于孢子不成熟,萌芽率低。过晚则由于成熟过度,不易获得含 8 个子囊孢子的完整子囊。

(三) 成熟子囊壳,子囊及子囊孢子的识别

成熟的子囊壳一般较大、黑色、具喙。成熟的子囊内孢子丰满、充实。成熟的子囊孢子略带橄榄绿色。

(四) 分离用培养基

先在 4% 水琼脂培养基上分离。因 4% 水琼脂较硬,便于操作。挑取后的单子囊孢子立即转移到完全培养基琼脂块上,完全培养基营养丰富,有利于孢子萌发、生长。

(五) 单子囊孢子的分离

用接种针挑取成熟的子囊壳放在无菌载玻片上,加盖无菌盖玻片后,用接种针柄轻轻敲击盖玻片,直至子囊壳破碎。

将沾有压碎的子囊壳内含物的盖玻片取下,放在置于无菌载玻片上的 4% 水琼脂块上(图 1)轻轻按压,使盖玻片上的子囊,子囊孢子转移至水琼脂块上。将水琼脂块置于显微镜下观察,寻找完整的或稍有破裂的,但子囊孢子未损失的子囊。用剥离针轻轻将子囊挑破后,加一小滴无菌水,在无菌水的作用下,子囊壳内缠在一起的子囊孢子会漂浮,分散。必要时可

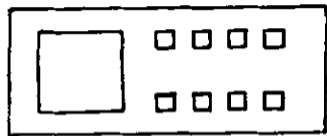


图1 水琼脂及完全培养基琼脂块放置的位置

用剥离针帮助缠在一起的孢子分散开。待孢子分散后,换用挑取针一一挑取,分别转移至载玻片另一端放置的8块完全培养基上(图1)。然后将8块带有单子囊孢子的琼脂块转移至完全培养基上培养。

(六) 结果与讨论

在狗尾草旋孢腔菌单子囊孢子的最初分离中,由于机械损伤及其它原因造成分离后的孢子萌发成活率低,很难进行完整的四分体分析,经采用上述方法后,所分离的单子囊孢子萌发成活率可达到90%以上。使在该菌中进行四分体分析得到了技术上的保障。

单子囊孢子的萌发成活率除受其成熟度的影响外,自子囊中逐一分离挑取过程中避免机械损伤是十分重要的一个环节。

(1992-3-7 收稿)