

一种简捷的玉米大斑病病菌单孢分离方法

高金欣 高增贵* 张小飞 张硕 陈璐

(沈阳农业大学植物保护学院 农业部北方农作物病害免疫重点开放实验室 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 介绍一种利用普通光学显微镜直接分离玉米大斑病病菌单孢子的方法。该方法是通过敲打叶片先将孢子转移至水琼脂培养基上, 然后利用自制的简易挑孢针在低倍镜下直接挑取大斑单孢子, 从而达到分离纯化的目的。结果表明, 此法虽然有一定的操作难度, 但简便易行, 污染少, 高效快捷, 为玉米大斑病病菌生理小种鉴定、DNA 遗传多态性的进一步研究做了积极有益的基础工作。该方法值得推广到其他种类大型孢子真菌的单孢分离工作中。

关键词: 玉米大斑病病菌, 单孢分离, 纯化

A Simple and Feasible Method for Single-spore Isolation of *Exserohilum turcicum*

GAO Jin-Xin GAO Zeng-Gui* ZHANG Xiao-Fei ZHANG Shuo CHEN Lu

(Key Laboratory of Northern Crop Immunology of China's Ministry of Agriculture, Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

Abstract: This paper introduces a method for single-spore isolation of *Exserohilum turcicum* with general light microscope. Spores are displaced from the corn leaf to Water Ager by tapping, single-spore of *Exserohilum turcicum* are then picked with simple homemade needle at low magnification so as to achieve purification. Although the method was slightly sophisticated, it was simple, practical, less contaminating and highly effective. The application of the method is contributive to rapid identification of physiological races and DNA genetic polymorphism of *Exserohilum turcicum*. It is more suitable for single-spore isolation of the pathogenic fungi with large conidiospores.

Keywords: *Exserohilum turcicum*, Single-spore isolation, Purification

单孢分离是植物病理学的基本技术, 是病原真菌分离和纯化的主要手段之一, 是进行病原菌鉴定、生理生化、遗传变异等方面研究的基础。要开展玉米大斑病病菌(*Exserohilum turcicum*)生理小种鉴定和DNA遗传多态性的研究, 首先必须掌握单孢分离技术^[1]。目前, 常用的单孢分离方法主要有平板

稀释法^[2]、眉毛针挑取法^[3]、微块注射法^[4]、直接挑取法^[5]等。以往对玉米大斑病病菌进行单孢分离常采用平板稀释法, 此法虽然容易被操作者掌握, 但操作程序繁琐。为简化单孢分离过程, 笔者吸取了国内外单孢分离方法的优点, 在直接挑取法基础上不断改进, 总结出一套较为简单、准确、快速的单

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目(No. 2006BAD08A06); 辽宁省自然科学基金项目(No. 20082123)

*通讯作者: Tel: 86-24-88487149; 信箱: gaozenggui@sina.com

收稿日期: 2010-04-28; 接受日期: 2010-06-17

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

孢分离法,几乎无杂菌污染,克服了以往单孢分离的缺点。现将该方法简要介绍如下。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

干燥的玉米大斑病叶标样,医用硫酸链霉素,PDA培养基,水琼脂培养基,无菌水,封口膜,手术刀,酒精灯,灭菌载玻片,自制挑孢针,直径分别为60 mm和90 mm的灭菌培养皿若干,普通光学显微镜,超净工作台,培养箱。

简易挑孢针的制作方法:截取一段直径为0.5 mm,长约5 cm的细钢丝,将一端弯成圆环状便于指捏,另一端用钳子夹平,作为单孢分离用。注意挑孢针不可制作太长,否则在显微镜下观察时很容易晃动,不便于操作。

1.2 单孢分离方法

1.2.1 孢子载体的制备:将水琼脂培养基倒入直径为60 mm的培养皿内,掌握培养基厚度1 mm-2 mm为宜。待培养基凝固后,用已消毒的手术刀将培养基划分成等宽的3条,挑出一条置于载玻片上待用。

1.2.2 孢子选取:如果病叶上孢子较多,可以直接将病叶背面的感病部位在孢子载体正上方1 cm-2 cm处轻轻敲打2-3次(背面腐生菌较少);如果病叶上孢子较少,则需将病叶背面的感病部位在孢子载体上轻轻蘸拭,然后置于4倍物镜下观察找到尚未萌发的单孢子,并将单孢子移至视野中间。如果许多孢子聚集在一起,可以用灭菌后的涂布器蘸取少量无菌水从孢子载体的一边至另一边反复涂抹,直至显微镜下可以观察到单个孢子为止,注意切勿用力过猛而损坏培养基表面。

1.2.3 蘸取单孢:用右手拇指和食指捏住挑孢针的圆环部,将挑孢针的顶端和中部在酒精灯外焰处烧红灭菌。将针头插入灭菌的水琼脂平板上冷却,然后在显微镜下移至载玻片上的圆形聚光区域内。如果手悬空不稳,可以将小拇指或无名指搭在载物台上。在目镜下观察,将针头轻轻在物镜下晃动,直至观察到针尖。将针尖移至单个孢子正上方,然后慢慢下移,轻轻蘸取单孢子。如果挑孢针尖端的一面蘸不上,可以再用另一面,反复蘸试,直至视野下单孢消失,则单孢已粘到针尖上。

1.2.4 转移单孢:提前在直径为90 mm的PDA平板(加入适量硫酸链霉素)上用记号笔做出4个标记,将挑孢针针尖在一个标记处轻轻划动4-5次,即将孢子转移出来。用同样方法在另外3个标记处接种,然后用封口膜将培养皿封好,置于培养箱中26°C下培养。

1.2.5 转移大斑病菌菌落:培养3-5 d后,即可产生单株菌落,选取一个长势比较好的菌落转移至斜面培养基中保存待用。

2 结论与讨论

玉米大斑病是由长蠕孢类病菌侵染引起的一种严重叶枯性病害,在我国东北、华北北部和南方凉山地区曾几度流行,严重影响玉米产量和品质^[6],其病原菌主要寄生在玉米叶片上,从活体的玉米叶片中获得必要的营养,在人工培养基上生长相对缓慢。近年来,发病的叶片组织内除了含有玉米大斑病病菌外,往往含有大量的链隔孢(*Alternaria*)等腐生菌。由于腐生菌在人工培养基上生长较快,用常规的叶部病原真菌分离方法分离,常被杂菌污染,成功率低。若采用单孢分离法直接挑取单个孢子,能够有效地避免病组织所带杂菌的污染,大大提高分离成功率。经过改进的直接挑取法为玉米大斑病菌单孢分离提供了一种简便易行的方法。

本文所描述的方法与其他单孢分离方法相比有以下特点:(1)在显微镜下直接蘸取单个孢子,分离到的单孢几乎无杂菌污染,保证了单孢的正常生长发育,成功率达90%以上,同时免去了分离培养中消毒、培养、纯化等一系列过程。通过直接敲打病斑部位获得孢子进行分离,免去了孢子悬浮液的制备过程,省时省力。该方法虽然操作上有一定难度,技巧性强,但简单易学,操作者稍加练习即可掌握。(2)该方法准确度高,分离速度快,培养时间短,不仅适合于玉米大斑病病菌的分离,而且适合于许多孢子相对较大、颜色较深的真菌,如玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、玉米弯孢菌(*Curvularia lunata*)、链格孢(*Alternaria alternata*)等无性型真菌的分生孢子等。由于高倍镜下观察受显微镜工作距离的限制,不易操作,对于一些相对较小、颜色较浅的孢子,如木霉菌(*Trichoderma*)、镰孢菌(*Fusarium*)的小孢子等分离较为困难。(3)所需工具简单,挑孢针完全可以

自行制作,不需要特殊的设备和严格的无菌环境,一般条件下均可进行操作。

本方法的关键点是:(1)水琼脂培养基过厚影响透光观察,厚度以1 mm-2 mm为宜,可在平板培养基内加80-100单位的医用硫酸链霉素防止细菌污染。(2)转移单孢时,挑孢针避免晃动,同时关闭超净工作台通风设备,以免单孢子掉落。当单孢子长出小菌落时,应及时转接至斜面上培养。(3)孢子密度是影响单孢分离效率和成功率的主要因素,孢子密度低则容易去除非目标孢子,也容易选择操作视野,不仅单孢分离率高且分离速度快。

参 考 文 献

[1] 姜开梅,范静华,朱有勇.玉米大斑病的分离、培养及

产孢方法的研究.云南农业大学学报,2004,19(3):272-274.

[2] 方中达.植病研究方法.第3版.北京:中国农业出版社,1998:137-140.

[3] 林代福.单孢分离的眉毛挑针法.山东农业生物学报,2003,22(5):462-463.

[4] 刘永翔,朱国胜,刘作易.一种简单的竹黄菌(*Shiraia bambusicola*)单孢分离法.菌物研究,2008,6(1):49-50,56.

[5] 孙广宇,张天宇.一种简单单孢子分离技术.植物检疫,1996,10(1):40-41.

[6] 赵辉,高增贵,张小飞,等.我国玉米大斑病菌生理小种种群动态分析.沈阳农业大学学报,2008,39(5):551-555.

征订启事

2011年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-2)

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网 址	E-mail
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn	tongbao@im.ac.cn
微生物学报	2-504	月刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn/	actamicro@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwxxyj.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	360	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	www.zwyczy.cn	zwyczyxb2003@163.com
植物学报	2-967	双月刊	480	www.chinbullbotany.com	cbb@ibcas.ac.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishscichina.com	zgsckx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	120	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	www.chinacrops.org/zwxp	xbzw@chinajournal.net.cn