



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103805521 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 21

(21) 申请号 201410053966. 1

(22) 申请日 2014. 02. 17

(71) 申请人 四川农业大学

地址 611130 四川省成都市温江区惠民路
211 号四川农业大学农学院

(72) 发明人 龚国淑 张敏 陈华保 梁银萍
祁小波 雷雨 杨继芝 杨春平

(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 龚燮英

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006. 01)

C12R 1/645 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种获得遗传同质小麦白粉病菌的快捷方法

(57) 摘要

本发明公开了一种获得遗传同质小麦白粉病菌的快捷方法。在体视显微镜下,用特制的挑针挑取单个分生孢子转移到离体叶段上。叶段置于含有苯并咪唑(50ppm)保鲜基质的培养皿中,(17±1)℃下,光暗交替培养7d后形成一至多根孢子链,17d后形成直径约0.5cm的粉霉堆。这种一次性得到纯一菌株的技术流程,比普通纯化技术减少了至少3个循环,节约20-30d,且这种方法得到的菌株是完全遗传同质的,为有关小麦白粉病菌的后续研究提供了材料保障。

1. 一种获得遗传同质小麦白粉病菌的快捷方法,其特征在于,在体视显微镜下,用特制的挑针挑取单个分生孢子转移到离体叶段上;叶段置于含有 50ppm 苯并咪唑保鲜基质的培养皿中,(17±1)℃下,光暗交替培养 7d 后形成一至多根孢子链,17d 后形成直径约 0.5cm 的粉霉堆。

2. 根据权利要求 1 所述的快捷方法,其特征在于,所述的特制的挑针制作方法为:取长约 13 厘米的竹签,粗细如牙签或棉签,修为光滑的圆柱形,一端削尖后从中剖开一细缝,将较粗直的眉毛基部插入缝隙内,留出 2mm 的尖端,用万能胶或透明胶带固定眉毛基部于竹签内。

一种获得遗传同质小麦白粉病菌的快捷方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物病理学技术领域,涉及一种获得遗传同质小麦白粉病菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)的快捷方法,除该种真菌外,也可用于其它白粉菌的纯化。

背景技术

[0002] 1. 目前主要采用的技术规程

[0003] 普通纯化技术为采用单孢子堆纯化菌种。将从各地采集的小麦白粉病标样在隔离条件下抖落接种在新的小麦幼苗上,接种后 4 ~ 6d 检查麦叶上可见的侵染点,用剪刀剪下具有尚未产孢的单个侵染点的叶段,将其置于含有苯并咪唑保鲜基质的培养皿中,在 $(17 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的光照培养箱中 (8000lx 光照, 14h/d) 培养,待长出分生孢子后,再次接于新的置有小麦叶段的培养皿中,4 ~ 6d 后再检查麦叶上可见的侵染点,用剪刀剪下具有尚未产孢的单个侵染点的叶段,再将其置于含有苯并咪唑保鲜基质的培养皿中。此过程需重复 3 次,然后扩大繁殖,获得所谓“纯化”的单孢子堆菌株。若采回的是单孢子堆,此过程可减少 1 次。

[0004] 用上述单个孢子堆抖落接种后,立即在光学显微镜或体视显微镜下检查,发现在同一位点上,既有单个孢子,也有 2 个或 3 个呈链的孢子,也有多个聚集成团的孢子堆。可见,用上述过程得到的所谓“纯化”菌株,实际上并非完全遗传同质。另外,上述纯化程序耗时较长,大约需要 45d。这期间需要不断培养小麦幼苗,一般一个年度往往需要纯化的菌株可能达 100 个以上,这样一来涉及的工作量很大,占用的空间很多。由于纯化菌株的时间拖得较长,很多材料在不断转纯的过程中死掉了。

[0005] 在此背景下,本发明采用在体视镜下直接挑取单孢子进行纯化的方法,此法大大缩短了纯化过程,简化了程序,而且能获得完全遗传同质的菌株。本发明的纯化方法,还可适用于其它白粉菌的纯化。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种能获得遗传同质小麦白粉病菌的快捷技术,以便为白粉病菌的相关研究提供遗传背景一致的菌株。

[0007] 基于这一目的,本发明的技术方案为:

[0008] 一种获得遗传同质小麦白粉病菌的快捷方法,在体视显微镜下,用特制的挑针挑取单个分生孢子转移到离体叶段上;叶段置于含有苯并咪唑 50ppm 保鲜基质的培养皿中, $(17 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下,光暗交替培养 7d 后形成一至多根孢子链,17d 后形成直径约 0.5cm 的粉霉堆。

[0009] 具体流程:

[0010] (1) 制作挑针取长约 13 厘米的竹签,粗细如牙签或棉签,修为光滑的圆柱形,一端削尖后从中剖开一细缝(约 1mm),将较粗直的眉毛基部插入缝隙内,留出大约 2mm 的尖端,用万能胶或透明胶带固定眉毛基部于竹签内。

[0011] (2) 保湿小麦白粉病标样取新鲜小麦白粉病标样,轻轻抖落老熟的分生孢子→置于保湿器内→(17±1)℃培养 24h(8000lx 光照,12h/d),待长出新鲜的分生孢子备用。

[0012] (3) 准备离体叶段将大约 2cm 长的健康叶段正面向上放置在载玻片的一端,用 Marker 笔在中间轻划一个记号,也可不用作记号。

[0013] (4) 挑取单个分生孢子从新鲜粉霉堆上挑取少量分生孢子抖落在载玻片的另一端上,置于体视显微镜载物台上,在 40 ~ 60 倍下用挑针的毛尖轻轻粘取玻片上的单个孢子,然后再将带有单个孢子的毛尖轻轻接触叶片 1-2 次(解剖镜下检查针尖上没有孢子后,即可确认孢子被挑到叶片上了;如果不放心,可在体视显微镜下把针尖上的孢子放于叶段的记号旁,此法比前者耗时)。用同样的方法,也可直接从新鲜粉霉堆上挑取,用针尖轻轻触碰略弯曲的孢子链顶端,将单个孢子粘于针尖,然后把单个孢子放于叶段上。

[0014] (5) 培养转移叶段于含苯并咪唑(50ppm) 保鲜基质培养皿内→在(17±1)℃的光照培养箱中(8000lx 光照,14h/d) 培养,大约 6 ~ 7d 可见侵染点,将单个叶段转移于另一培养皿培养,直到出现粉霉堆(其上的孢子即为遗传同质的后代)。

[0015] (6) 扩繁将带此粉霉堆的叶段放置在无菌的载玻片上,再次置于体视显微镜下→用挑针从此粉霉堆上挑取任意多的分生孢子→在体视显微镜下将分生孢子抖落在健康叶段上,可在一个叶段上多次重复接种,以后一个叶段上可繁殖很多粉霉堆。用此方法只要获得一个纯的粉霉堆,就可繁殖大量的分生孢子。

具体实施方式

[0016] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,本发明用以下具体实例进行说明,本发明主要针对小麦白粉病菌进行快速纯化,但本发明不局限于这些具体实施例。具体实施方法如下:

[0017] 1、健康麦苗的培育

[0018] 选用感病的小麦品种“川农 26”或其它感病品种,用 75% 乙醇浸种 3min,无菌水冲洗 3 次,放入保湿容器内,在 22℃ 下催芽 1 ~ 2d。在 2.5cm 直径、20cm 长的大试管中盛入 3cm 厚的无菌细泥土,再把已催芽的小麦种子播入试管中,每支试管播 5-7 粒,套上 5 层纱布或 1 层过滤膜。(17±1)℃光照培养箱(12h 光-暗交替)培养至 3 叶时备用。

[0019] 2、离体叶段的准备

[0020] 待小麦叶片中部宽度达到大约 5mm 时可用于剪取离体叶段。将中部比较平展的叶段剪为长约 2cm 的叶段备用。

[0021] 3、标样的采集和保存

[0022] 于小麦白粉病盛发时期,赴各地采集新鲜小麦白粉菌标样,抖落上面的老孢子,样品装于洁净的自封袋中,尽快带回实验室纯化。如果样品多,可暂时贮存于 5℃ 冰箱中或接种于事先培养好的无菌麦苗上待纯化。

[0023] 4. 保鲜基质的制备

[0024] 在无菌培养皿内垫一层滤纸,加入含 50ppm 苯并咪唑的溶液浸湿。

[0025] 5. 挑针的制备

[0026] 取长约 13 厘米的竹签,粗细如牙签或棉签,修为光滑的圆柱形,一端削尖后从中剖开约一细缝,将较粗直的眉毛基部插入缝隙内,留出大约 2mm 的尖端,用万能胶或透明胶

带固定眉毛基部于竹签内。

[0027] 6. 单个分生孢子的获得

[0028] 在载玻片的一端放置约 2cm 长的健康叶段 5 片,为了便于观察,可在叶段上用 Marker 笔做上标记。从新鲜粉霉堆上挑取少量分生孢子抖落在载玻片的另一端,置于体视显微镜载物台上,在 40 ~ 60 倍下用挑针的毛尖轻轻粘取玻片上的单个孢子,然后再将带有单个孢子的毛尖轻轻接触叶片 1-2 次(解剖镜下检查针尖上没有孢子后,即可确认孢子被挑到叶片上了;如果不放心,可在体视显微镜下把针尖上的孢子放于叶段的记号旁,此法比前者耗时)。用同样的方法,也可直接从新鲜粉霉堆上挑取,用针尖轻轻触碰略弯曲的孢子链顶端,将单个孢子粘于针尖,然后把单个孢子放于叶段上。受孢子萌发率的影响,一般一个样品至少做 5 个重复叶段。将已经获得单孢子的叶段转移于含苯并咪唑保鲜基质培养皿内。

[0029] 7. 培养和观察

[0030] 带有单孢子的叶段在 $(17 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的光照培养箱中 (8000lx 光照, 14h/d) 培养,大约 6 ~ 7d 可见侵染点,将带有单个侵染点的叶段转移单独培养,避免长出的分生孢子互相扩散,直到侵染点出现粉霉堆(其上的孢子即为遗传背景一致的后代)。

[0031] 8. 扩繁

[0032] 将单个粉霉堆的叶段放置于无菌的载玻片上,再次置于体视显微镜下→用针从此粉霉堆上挑取任意多的分生孢子→在体视显微镜下将分生孢子抖落在健康叶段上,可在一个叶段上多次重复接种,以后一个叶段上可繁殖很多粉霉堆。用此方法只要获得一个纯的粉霉堆,就可繁殖大量的分生孢子。

[0033] 不同处理的试验结果

[0034] 从表 1 看出,用自制的眉毛挑针通过挑取单孢子,完成 1 个样品 5 个接种点大约需要 5 ~ 8min,出现侵染点的时间 6 ~ 7d,形成粉霉堆大约 10 ~ 12d。用眉毛挑针比用解剖针所需时间短,主要原因是由于解剖针比眉毛硬,不易粘附孢子,且将孢子移到叶段时容易刺伤叶表皮,不利于白粉菌的侵入;出现粉霉堆的时间比抖落法(对照)约推迟 2d,但用抖落法至少还要 2 ~ 3 个循环才能纯化菌种,且不能确定繁殖的孢子是遗传同质的材料。

[0035] 从表 2 看出,用解剖针挑取单孢子成功率较低,主要原因是容易刺伤叶表皮,不利于白粉菌的侵入;用自制的眉毛挑针挑取单孢子成功率较高,达 70% 以上,如果用单孢子链成功率更高,可达 85% 以上,比用单个粉霉堆抖落接种的成功率更高,由于单个粉霉堆在叶段上端抖落时难以保证孢子能到达叶段上。因此,当材料上孢子量较少时,采用本发明更能提高成功率。

[0036] 表 1 不同纯化方法所需时间

[0037]

处理	从样品到离体叶段上 (min)			从接种到出现侵染点 (d)			从接种到形成粉霉堆 (d)		
	眉毛针	解剖针	抖落法	眉毛针	解剖针	抖落法	眉毛针	解剖针	抖落法
单孢子	8	10	5	7	8	6	15	16	15
单链孢子	7	10	5	7	8	6	15	15	15
多链孢子	5	5	5	6	7	5	13	14	13

[0038] 注：抖落法特指用单个粉霉堆作接种体的普通纯化法，以此作对照，其侵染点可能是单个孢子或单链孢子或多链孢子形成。单链孢子：一般指从单根孢子链顶端挑取 2—3 个孢子，此法适宜对遗传背景要求不严格的情况。多链孢子：是指从粉霉堆上随意挑取多个孢子，此法适宜扩繁。

[0039] 表 2 不同纯化方法获得粉霉堆的成功率(%)

[0040]

处理	眉毛针	解剖针	抖落法*
单孢子	72.5	32.5	不确定
单链孢子	78.6	34.6	不确定
多链孢子(可用于扩繁)	85.5	85.3	76.2

[0041]

[0042] 应当理解的是，对本领域普通技术人员来说，可以根据上述说明加以改进或变换，而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。