



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105349432 B

(45)授权公告日 2019.02.05

(21)申请号 201510765142.1

(22)申请日 2015.11.11

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105349432 A

(43)申请公布日 2016.02.24

(73)专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 马占鸿 孙秋玉 张克瑜 王树和

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

C12N 3/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 103865812 A,2014.06.18,

CN 101654659 A,2010.02.24,

于凯等.“多堆柄锈菌侵染不同抗性玉米的组织病理学研究”.《植物保护》.2011,第37卷(第3期),第77页材料与方法.

魏国荣等.“小麦条锈病菌菌种的纯化与保存方法”.《河南农业科学》.2011,第40卷(第2期),第90-91页.

陈翠霞等.“南方玉米锈病及其抗性鉴定”.《植物病理学报》.2003,第33卷(第1期),第86-87页.

阮义理等.“玉米多堆柄锈菌的初侵染源探讨”.《植物保护》.2002,第28卷(第4期),第55页.

阮义理等.“玉米多堆柄锈菌的生物学特性”.《玉米科学》.2001,第9卷(第3期),第82-85页.

冉炜.“14种病害的科赫法则实验”.《道客巴巴》.2013,第1-13页.

审查员 樊艳爽

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种玉米多堆柄锈菌的单孢扩繁方法

(57)摘要

本发明涉及生物病菌的单孢扩繁方法,具体公开了一种玉米多堆柄锈菌的单孢扩繁方法,挑取病叶上的玉米多堆柄锈菌的单孢子堆接种到健康玉米苗上,初繁后利用新的健康玉米苗先后经转接和喷接,获得扩繁的单孢系;所述健康玉米苗为三叶一心苗期的玉米苗.该分离方法成功率高,耗时短,可以同时大量菌系的扩繁,便于基于玉米多堆柄锈菌单孢系进行分析的研究。

1. 一种玉米多堆柄锈菌的单孢扩繁方法,其特征在于,挑取病叶上的玉米多堆柄锈菌的单孢子堆接种到健康玉米苗上,繁殖后利用新的健康玉米苗先后经转接和喷接,获得扩繁的单孢系;所述健康玉米苗为三叶一心苗期的玉米苗;

所述方法包括如下步骤:

(一) 种苗;

(二) 菌种初繁:挑取病叶上的玉米多堆柄锈菌的单孢子堆接种到健康玉米苗叶片上;

(三) 单孢系转接:待初繁的玉米苗发病后,将生长在叶片上的全部孢子挑接到健康的玉米苗上;

(四) 收集孢子粉;

(五) 单孢系喷接:将收集的孢子粉配制成孢子悬浮液,以喷雾的形式接种到多株健康的玉米苗上,得到足够的孢子粉;

其中,步骤(二)接菌到健康玉米苗的第二叶和/或第三叶上,每片叶子只接种一个单孢子堆;步骤(三)和(五)同时接菌到多株健康玉米苗的第二叶和第三叶上;

步骤(二)、(三)和(五)中,玉米苗接菌后,20-30℃的条件下,保湿24-48h,之后转移到光照充足,空气相对湿度80%以上,温度20-30℃的环境条件下继续培养。

2. 根据权利要求1所述的扩繁方法,其特征在于,所述步骤(三)或步骤(五)可转接1~3代。

3. 根据权利要求1或2所述的扩繁方法,其特征在于,所述健康玉米苗在接菌之前,对玉米苗的第二片叶和第三片叶进行脱蜡处理。

4. 根据权利要求3所述的扩繁方法,其特征在于,所述步骤(二)和步骤(三)在接菌前,利用0.05%吐温20处理脱蜡后的叶片。

5. 根据权利要求1所述的扩繁方法,其特征在于,步骤(一)包括玉米种子催芽和播种;玉米种子催芽方法具体为:选取饱满的玉米种子,用0.1%的双氧水在室温条件下浸泡种子24h-48h,倒掉液体或取出种子,在种子上面盖上湿纸巾或湿布,在通风处催芽。

6. 根据权利要求5所述的扩繁方法,其特征在于,所述步骤(一)中,玉米种子前端长出1-2mm胚根后即可播种,播种时,胚根朝上且朝向种植容器的中心。

7. 根据权利要求4所述的扩繁方法,其特征在于,所述步骤(五)中,孢子悬浮液的配制方法为:每1-5mg孢子加10-20mL 0.05%吐温20。

一种玉米多堆柄锈菌的单孢扩繁方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物病菌的单孢扩繁方法,具体地说,涉及一种玉米多堆柄锈菌的单孢扩繁方法。

背景技术

[0002] 玉米多堆柄锈菌可以引起玉米南方锈病,1972年首次在我国海南发现,2003年以后,该病在我国20多个省份都有发生,因此该病从次要病害升为主要病害。玉米成为我国的第一大粮食作物,因此防治玉米南方锈病迫在眉睫。

[0003] 公开号为CN102146439A和CN102174647A的中国专利申请分别公开了普通型和南方型玉米锈病病原真菌的检测引物及分子检测方法,但并未公开如何得到玉米柄锈菌单孢扩繁体系。

[0004] 近几年,玉米南方锈病开始得到大家的重视,其中在研究其群体遗传时,所用的菌应该是纯菌系,而由于受到没有扩繁单孢系方法的限制,所用的菌系从叶片上直接刮取的大量单孢子堆,这是一种混合菌系,不是纯菌系,因此对其研究结果具有影响。另外其他研究也受到没有该方法而无法开展。也有利用单个孢子进行研究,但需要使用试剂盒,成本高,限制了对大量样品的研究。

[0005] 玉米南方锈病很多研究需要基于纯的菌系开展,该菌是转性寄生菌,只能在活的玉米植株上存活和繁殖,扩繁单孢系比较困难,国内外也没有报道过玉米多堆柄锈菌单孢系的扩繁。因此现在亟需一套玉米多堆柄锈菌单孢扩繁体系,即得到纯化后的菌系。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供一种玉米多堆柄锈菌的单孢扩繁方法。

[0007] 为了实现本发明目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 一种玉米多堆柄锈菌的单孢扩繁方法,挑取病叶上的玉米多堆柄锈菌的单孢子堆接种到健康玉米苗上,繁殖后利用新的健康玉米苗先后经转接和喷接,获得扩繁的单孢系;所述健康玉米苗为三叶一心苗期的玉米苗。

[0009] 所述病叶为田间采集的玉米南方锈病病叶,病叶上的一个单孢子堆往往由一个单孢子繁殖而来。

[0010] 选择三叶一心苗期的健康玉米苗进行接菌,玉米苗更易发病。

[0011] 进一步地,所述方法包括如下步骤:

[0012] (一) 种苗;

[0013] (二) 菌种初繁:挑取病叶上的玉米多堆柄锈菌的单孢子堆接种到健康玉米苗叶片上;

[0014] (三) 单孢系转接:待初繁的玉米苗发病后,将生长在叶片上的全部孢子挑接到健康的玉米苗上;

[0015] (四) 收集孢子粉;

[0016] (五) 单孢系喷接: 将收集的孢子粉配制成孢子悬浮液, 以喷雾的形式接种到多株健康的玉米苗上, 得到足够的孢子粉;

[0017] 其中, 步骤(二) 接菌到健康玉米苗的第二叶和/或第三叶上, 每片叶子只接种一个单孢子堆; 步骤(三) 和(五) 同时接菌到多株健康玉米苗的第二叶和第三叶上。

[0018] 需要说明的是, 当需要扩繁的单孢子堆为多个时, 可以接菌到多株健康玉米苗上。利用多少玉米苗, 第二叶和第三叶是否均接种, 取决于实际扩繁目标, 在此基础上所做的调整, 不偏离本发明宗旨。

[0019] 每株接种第二叶和第三叶, 是由于第一叶容易干枯, 第二和第三叶开始发病时, 第四叶还没长好, 因此能够更加充分地利用营养。

[0020] 进一步地, 步骤(二)、(三) 和(五) 中, 玉米苗接菌后, 20-30℃的条件下, 保湿(湿度100%) 24-48h, 之后转移到光照充足, 空气相对湿度80%以上, 温度20-30℃的环境条件下继续培养。

[0021] 孢子的萌发需要水, 在上述温度湿度条件下, 可保证孢子的萌发率最高。保湿之后的玉米苗转移到光照充足的温室或培养箱里继续培养, 光照充足有利于叶片营养的制造, 进而更有利于产孢。

[0022] 进一步地, 获得的孢子量不够喷接时, 所述步骤(三) 和步骤(五), 可转接或喷接1~3代。

[0023] 进一步地, 所述健康玉米苗在接菌之前, 对玉米苗的第二片叶和第三片叶进行脱蜡处理。

[0024] 进一步地, 所述步骤(二) 和步骤(三) 在接菌前, 利用0.05%吐温20处理脱蜡叶片。对玉米苗进行脱蜡处理, 利于菌的侵染。

[0025] 所述脱蜡处理可选择本领域的常规手段, 例如, 可用酒精消毒后的手指轻轻摸去叶片上的蜡质。

[0026] 接菌时, 所述步骤(二) 在脱蜡的叶片上均匀喷洒0.05%吐温20, 然后用消毒的挑针或注射器挑取感染南方锈病的玉米叶片上边缘清晰的单孢子堆, 转接到脱蜡处理后的玉米叶片上。

[0027] 初繁时, 挑取玉米叶片上边缘清晰的单孢子堆, 防止被其他菌系污染。

[0028] 进一步地, 所述步骤(三) 在脱蜡的叶片上均匀喷洒0.05%吐温20后, 用消毒的挑针或注射器, 挑取步骤(二) 培养的孢子, 均匀接种到脱蜡后的叶片上; 均匀接种有利于在叶片上发病均匀。

[0029] 进一步地, 所述步骤(五) 直接在叶片上喷孢子悬浮液。不用先喷洒0.05%吐温20, 孢子悬浮液里的水分足够孢子的萌发。

[0030] 进一步地, 步骤(一) 包括玉米种子催芽和播种; 玉米种子催芽方法具体为: 选取饱满的玉米种子, 用0.1%的双氧水在室温条件下浸泡种子24h-48h, 倒掉液体或取出种子, 在种子上面盖上湿纸巾或湿布, 在室温通风处催芽一天。

[0031] 如果浸泡时间短, 则发芽较慢, 若浸泡时间长, 则由于缺氧, 发芽率明显降低。

[0032] 进一步地, 所述步骤(一) 中, 玉米种子前端长出1-2mm胚根后即可播种, 播种时, 胚根朝上且朝向种植容器的中心。这样能够使第一叶和第三叶都向内生长, 第二叶向外生长,

方便接菌和收菌。

[0033] 进一步地,所述步骤(五)中,孢子悬浮液的配制方法为:每1-5mg孢子粉加10-20ml 0.05%吐温20。之后,可使用喷壶等用具使孢子悬浮液以喷雾的形式对玉米苗进行喷接,进一步扩大单孢系的繁殖。

[0034] 本发明的有益效果在于:

[0035] 本发明提供的玉米多堆柄锈菌单胞系扩繁体系,在提供的样品单孢子堆边缘清晰,没有其他污染的情况下,初繁成活率90%以上,喷接成功率99%。潜育期只有4-5天,接菌第7天开始产孢,15到20天产生大量孢子。而成株玉米潜育期需要20天,大大缩短了繁菌时间。因此该方法具有时间短、成活率高的特点,对于研究玉米南方锈病的研究,提供了繁菌基础。

附图说明

[0036] 图1为本发明玉米种植方式图;

[0037] 图2为本发明南方锈病转接后发病图。

具体实施方式

[0038] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0039] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0040] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0041] 实施例1

[0042] 实施例1用于说明本发明所述的方法

[0043] 1、种苗

[0044] 1) 选择口径为100mm小花盆,土与基质按1:1混合,装满花盆。

[0045] 2) 选取饱满的种子,用0.1%的双氧水室温条件下浸泡种子48h,然后倒掉水,在种子上面盖上湿纸,在通风处诱芽,待种子前端长出2mm左右胚根播种。

[0046] 3) 将装好土的花盆用平底培养皿压平,浸水10分钟,待表层土微微湿润,用镊子挑选10粒已发芽种子放入花盆中,种植时胚根朝上且朝向花盆中心。最后在种子覆盖一层浮土。

[0047] 2、菌种初繁

[0048] 1) 待玉米长到三叶一心的时期接菌。

[0049] 2) 接种前,对玉米苗进行脱蜡处理,然后在叶片上均匀喷洒0.05%吐温20。

[0050] 3) 将微型注射器蘸75%酒精灼烧进行杀菌处理,冷却后,挑取两个玉米叶片上边缘清晰的单孢子堆,并转接到健康的玉米叶片上,分别接种到玉米苗的第二叶和第三叶上,每片叶子只接种一个孢子堆。由于夏孢子堆为无性繁殖过程,我们认为一个单孢子堆往往由一个单孢繁殖而来。接种下一个单孢系时,微型注射器再次灼烧。

[0051] 4) 将接种后的玉米苗置于保湿箱中,保湿24h,温度控制在25-30℃之内。

[0052] 5) 然后转移到光照充足的温室或培养箱里继续培养,温度25-30℃之内,空气相对

湿度80%左右。

[0053] 3、单孢系转接

[0054] 待初繁的玉米苗发病后,在孢子粉开始散落前,用微型注射器将生长在两片叶子上的孢子粉分别转接到新的健康的两盆玉米苗上,分别编号A、B。接种前,对玉米苗进行脱蜡处理,然后在叶片上均匀喷洒0.05%吐温20。接种后的培养条件同菌种初繁的4)和5)。

[0055] 4、收集菌种

[0056] 发病后,开始收集A和B盆苗的单孢子堆。先收集A,称量纸接着叶片,将夏孢子从叶片上轻轻刮下来。收集B之前,需要向空气中喷水,沉降孢子,并再次对手进行消毒,然后收菌。

[0057] 5、单孢系喷接

[0058] 将收集的A和B的孢子粉分别配制成孢子悬浮液,浓度1mg孢子加10ml 0.05%吐温20。用微型小喷壶(15ml)以喷雾的形式分别接种到三盆健康的玉米苗上,分别编号A-1、A-2和A-3,B-1、B-2和B-3。接种后的培养条件同菌种初繁的4)和5)。待发病后收集孢子,A和B各三盆苗均总共收到收集0.5ml的夏孢子。

[0059] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。



图1

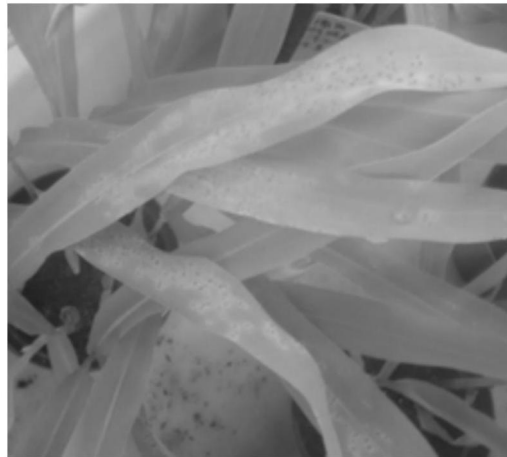


图2