

# 一种高效分离水稻细菌性条斑病菌的新方法

岑贞陆<sup>1</sup>, 黄思良<sup>1\*</sup>, 胡春锦<sup>1</sup>, 谢玲<sup>1</sup>, 李卫民<sup>2</sup>

(1. 广西农业科学院植物保护研究所, 广西南宁 530007; 2. 长江大学农学院, 湖北荆州 434025)

**摘要** [目的]介绍一种将常规方法改进成为一种适用于分离存放时间过久的细条病样本的新方法。[方法]用注射器渗压法将病害标本的研磨液接种水稻叶片形成新鲜病斑后,再按改进的常规方法进行分离纯化。[结果]该新方法分离纯化可直接得到单菌落。[结论]该方法是一种适用于分离存放时间过长的水稻细菌性条斑病菌标本的方法。

**关键词** 水稻; 细菌性条斑病菌; 分离

中图分类号 S435.11 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)26-08269-01

## A New Method for Effective Isolation of Rice Bacterial Leaf Steak

CEN Zhen-lu et al ( Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

**Abstract** [Objective] A new method for long store of isolated rice bacterial leaf steak sample was introduced according to the conventional method. [Method] Specimen homogenate was inoculated to the rice leaf by injector osmotic pressure method and then the new and fresh disease lesion appeared. Modified conventional method was adopted for isolation. [Result] Single colony was easily obtained by this isolation method. [Conclusion] This was an efficient method to isolate the pathogen of the rice bacterial leaf steak sample after longtime store.

**Key words** Rice; Bacterial leaf steak; Isolation

由 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* 引起的水稻细菌性条斑病(以下简称细条病), 为国内植物检疫对象。1957年广东省首先发现该病害, 而后随着引种调种、南繁加代以及材料交换逐步传播蔓延, 至今已成为我国南方稻区的主要病害之一<sup>[1-4]</sup>。为了进行细条病菌的致病型分化或 DNA 多态性研究, 通过分离纯化获取大量的不同来源地的细条病菌是必要的。常规病原菌分离方法是《植病研究方法》介绍的用浓度 75% 酒精和用浓度 0.1% 升汞液表面消毒处理<sup>[5]</sup>。实际工作中, 在实验室里进行分离的样本往往不是从病区采集的新鲜样本。细条病菌在危害过程中, 特别是危害中后期常常带有其他腐生菌, 采用传统病原菌分离方法杂菌量多, 增大了柯氏法则中分离菌回接的工作量, 因此分离提纯工作耗时长, 而特殊培养基的配制又相对麻烦。按常规方法对采集时间过久的标本进行细条病菌分离纯化效果差, 往往不易成功。笔者将常规的分离方法改进成为一种适用于分离存放时间过久的细条病样本的方法。

### 1 具体操作步骤

先将已经霉烂的样本剔出, 对已经干枯的样本, 若颜色不变为黑色, 仍为可用材料。注意挑选出叶片上附着干燥菌脓较多的样本, 将其剪成约 0.5 cm 的叶段, 取约 3 g 样本加 10 ml 无菌水与少许石英砂在无菌条件下研磨, 充分研磨后过滤至无菌的容器。用不带针头的无菌注射器吸足滤液后, 将注射器口贴住感病水稻品种叶片, 依靠压力将注射器内的滤液渗透到水稻叶片上, 直至叶片形成水渍状(约 1 h 后水渍状自行消失)。确认叶片表现出细条病的症状后, 再经过 2~3 d 待病斑稍变长时将病部剪下。将病叶剪成约 0.3

cm<sup>2</sup> 的小块后置于带有开关的漏斗(漏口有滤网)内, 然后在超净工作台上往漏斗内加入 75% 酒精, 浸泡约 10 s 后排干酒精, 同样方法用升汞处理 5 min, 再用无菌水冲洗 3~4 次, 然后用无菌镊子将消毒处理后的叶片置于无菌的研钵, 加入约 5 ml 无菌水后充分研磨, 用移液枪取 1 ml 的研磨液加入 9 ml 的无菌水中, 连续稀释 4 次, 用接种环分别取一环第 3 次和第 4 次的研磨稀释液在 NA 培养基(蛋白胨 5 g, 牛肉膏 1 g, 酵母膏 1 g, 蔗糖 10 g, 琼脂 17 g, 水 1 000 ml)平板上划线培养。待平板上长出菌落, 将单菌落移至斜面上培养, 48 h 后将病菌稀释成 10<sup>8</sup> cfu/ml 的悬浮液, 用不带针头的无菌注射器吸足悬浮液后, 将注射器口贴住水稻叶片, 借助压力将悬浮液渗透接种到水稻叶片上, 直至叶片形成水渍状, 3~4 d 后观察叶片发病情况, 确认是细条病症状, 经柯氏法则确认其致病性后, 将病菌纯培养后保存备用。

### 2 特点

(1) 由于病害样本是经接种后形成的新鲜样品, 分离成功率大, 杂菌量为减少。

(2) 在确认菌株致病性时, 采用注射器渗压的方法进行接种与常用的针刺法进行接种相比较, 植株发病提早 1~2 d, 不需保湿处理。

(3) 经稀释 3~4 次后的研磨液, 在 NA 培养基平板上划线培养后, 可直接得到单菌落, 省去菌株纯化的工作量。

### 参考文献

- [1] 赖传雅. 农业植物病理学: 华南本[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 18-21.
- [2] 范怀忠, 伍尚忠. 广东省珠江三角洲水稻细菌性条斑病(白叶枯)研究简报[J]. 植病知识, 1957(1): 6-8.
- [3] 童贤明, 徐静. 水稻细菌条斑病研究概况[J]. 植物检疫, 1996, 10(3): 173-177.
- [4] 姬广海, 许志刚. 水稻品种对细菌性条斑病的抗性研究[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(2): 164-166.
- [5] 方中达. 植物病理学研究方法[J]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 163-165.

基金项目 广西回国基金项目(桂科回 0639010); 广西青年科学基金(桂科青 0728031); 广西农业科学院科技发展基金重点项目[2004004 Z]; 广西农业科学院科技发展基金(006026)。

作者简介 岑贞陆(1972-), 男, 广西田东人, 助理研究员, 从事植物病害研究。\* 通讯作者, E-mail: silianghuang@126.com。

收稿日期 2007-05-21