

食用真菌的单孢子分离方法

滕 红

(浙江省农科院, 杭州)

摘要 介绍一种高准确性的单孢子分离方法。本法以盖玻片碎块代替琼脂切片作为单孢子的载体, 用自制的吸孢器作干孢子水相转移分离。具有镜检容易, 分离准确, 效率高等优点。

食用菌单孢子分离是食用菌育种的重要技术手段。国内这方面已作了许多工作,但简单易行,准确高效的方法并不多。本人在长期的单孢子分离实践中,使用比较了各种方法,取各家之长,大量改进了液相吸孢法,经一年多的反复使用,效果良好。现将这一方法介绍如下。

(一) 制作吸孢微管

1. 粗拉: 取长约 170mm, 内径 2mm, 外径 4mm 的玻璃管一支, 洗净烘干。将玻璃管一端放在酒精喷灯上烧灼封口, 另一端含在口中边吹边转, 使封口端形成一外径约 7mm 的玻璃泡。接着用镊子夹住烧红的玻璃泡外端, 离开火焰向两边迅速直拉, 拉成长约 30cm 的针管。再用剪刀在距玻璃泡中心约 15cm 处剪断针管。

2. 细拉: 把针管距玻璃泡 12cm 处小心放在酒精灯火焰边慢慢烘软, 用镊子夹住断口端迅速直拉至其自然断裂。低倍镜(150 倍)镜检, 观察针管是否通畅, 断口是否平整。

3. 弯管: 把针端部分放在酒精灯火焰底部外缘, 慢慢烘烤, 用镊子轻按针端, 逐渐把针头弯成直角, 弯口部约 0.5cm 长。

(二) 制作吸孢器

把制成的吸孢微管一端套上一根约 0.5m 长的细乳胶输血管。输血管另一端套在 5ml 以上注射器上。选任一可微调的升降器。如显微镜镜筒, 解剖镜升降台(作者选用拆去镜筒的解剖镜升降器, 图 1)。用橡皮筋或胶布把吸孢微管管口垂直向上固定在升降器上。

(三) 制备湿室

取一根长约 100mm, 宽约 18mm 的有机玻璃条, 在酒精灯火焰边用镊子仔细弯成中间宽约 15mm 的对称直角凹条, 小心磨去突起部分, 用加拿大胶固定在载玻片上。

(四) 操作步骤

1. 制备孢子悬液: 在无菌室内, 用接种环刮取收集的孢子少许, 放入 0.1% 琼脂水溶液中, 振荡均匀。

2 吸孢微管定位: 显微镜和吸孢器用酒精

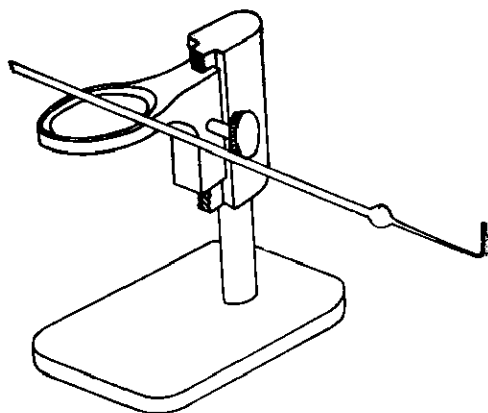


图 1 吸孢器图示

棉花擦抹消毒。把显微镜置于身体左侧, 吸孢器置于右侧。把湿室夹在载物台移动器上, 用手移动吸孢器, 使微管口处于低倍镜视野中, 调节显微镜焦距使管口清晰可见, 再微微移动吸孢器, 使微管口处于视野中心。

3. 盖片: 取消毒载玻片一块, 左右两边各加无菌水一滴, 用镊子取盖玻片一块轻轻盖在载玻片左边。再把另一块盖玻片压成 7—8 块碎片, 再把碎片排列在载玻片右边, 吸去多余水份。

4. 涂片: 用接种环沾 1—2 环孢子悬液涂布于盖玻片中央, 略干片刻。再加半滴无菌水于盖玻片左边, 然后把载玻片翻转放在湿室上。

5. 吸水: 移动湿室使无菌水滴处于微管口上方, 上升管口使之接触液面, 然后下降管口脱离水滴。依靠毛细管作用, 微管内便含少量的水。

6. 挑单孢: 移动湿室并调节焦距至清楚地看见孢子, 再调节湿室位置, 使视野中出现涂布液边缘的干孢子, 把孤立的单孢子处于视野中心, 向上调节吸孢微管, 使管口套住单孢子。左手轻推注射器, 微管内的水便会洗落单孢子。再轻拉注射器, 则单孢子就随水被吸入微管内。下调微管, 使管口离开玻片。移动湿室使碎片处于管口上方, 向上调节微管, 使管口接触碎片, 轻推注射器, 则单孢子就随水附在碎片上, 下降

微管脱离碎片。重复上述动作，至每块碎片都含有一个单孢子。将碎片用镊子分开放置在平板内倒置培养。

(五) 问题和讨论

1. 针管必须自然断裂，否则断口不平整，影响孢子的吸放。

2. 涂片不必全干，否则孢子不易观察。

3. 本法分离单孢子的过程始终在显微镜视野内进行，准确性高。

4. 因为是左右手分工操作，且微管管口直径略大于孢子，所以分离速度很快。

5. 作者进行的是双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 和香菇 (*Lentinus edodes*) 的单孢子分