

# 蜜环菌遗传测定的单孢分离和培养方法\*

赵俊 田淑敏 王玉玲 秦国夫

(国家林业局森林病虫害防治总站 沈阳 110034)

**摘要** 从平板中直接分离担子菌萌发孢子的单孢分离方法,主要利用自制的毛细管和显微玻璃针等简单工具操作。该法简便快速,抗污染,获得单孢率高。同时报道一种改进型的担子菌互交不育性测定用培养基 MEJA,与国内外目前常用的 SR 和 MEA 培养基相比,增加一项判断标准,使互交不育性和互交可育性的反应更加清晰可靠。

**关键词** 蜜环菌, 单孢分离, 培养基

**分类号** Q93-33 **文献识别码** B **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0207-209

---

\* 国家自然科学基金青年基金项目 (No.39500001)

Project of Chinese National Natural Science Fund for Young Researchers (No.39500001)

1998-03-02收稿, 1998-06-09修回

## A METHOD OF SINGLE SPORE ISOLATION AND CULTURE FOR *ARMILLARIA* GENETIC TEST

Zhao Jun Tian Shumin Wang Yuling Qin Guofu

(General Station of Forest Pest Control, National Forestry Bureau, Shenyang 110034)

**Abstract** A method are described for isolation of single spore. Under the microscope, the germinated single spore of the *Armillaria* and other Agaricales can be isolated directly by a handmade pipette and a glass microneedle. the method modified from Kari Korhonen's and operation are better than former. As same times, A improved medium MEJA for intersterility experiments of *Armillaria* are reported, by added of fresh malt extract juice to the melt extract powder which were adopted widely, the medium make compatible and incompatible reaction clarify exactly.

**Key words** *Armillaria*, Single-spore isolation, Medium

在现代伞菌分类中,遗传交互不育性试验是鉴定以生物种为基础的分类种非常有用的工具,而单孢菌株的分离和配对培养是交互不育性试验两大关键环节。单孢分离目前主要两类方法,一是孢子悬液稀释平板法,另一是用安装在显微镜镜头上的一个工具来操作或借助于专用的显微操作器。但是对于像蜜环菌这样萌发和生长速度较慢的担子菌来说,前一方法难以避免孢子悬液或培养过程的杂菌污染,后一方法又难以普及推广。Korhonen(1978)报道了一种直接分离单孢的毛细管法,作者等在使用过程中又进一步简化改进,在几年的实践中,证明是简便高效的方法。

伞菌交互不育性配对试验中常用的培养基是1.5%~3%的MEA(Malt Extract Agar),早期也使用SR培养基。作者的实验室长期使用这两种培养基,但发现蜜环菌在2%的MEA上有时难以判别,特别是单孢菌株退化或两个远缘菌株配对时,而SR培养基则有时在生物种内的非亲和性和半亲和性反应不易区分,我们改进的MEJA培养基有效地克服了上述两种培养基的不足。兹将用于蜜环菌遗传交互不育性测定的单孢分离和培养方法介绍如下。

### 1 单孢分离

#### 1.1 工具制备

**1.1.1 显微玻璃针** 用4~6号玻璃棒自行拉制而成。前半部0.5mm左右粗,5cm长,前端烧圆,前端弯成135°左右的小弯,后半部10cm左右长。

**1.1.2 显微玻璃刀** 将敲碎的细小玻璃片用万能胶粘

于自行拉长的玻璃针顶端。

**1.1.3 显微移植管** 用4~6号玻璃管自行控制而成。前半部1.0mm左右粗,5cm长,前端弯成135°小弯,后半部10cm长,内置一段脱脂棉。

#### 1.2 单孢分离操作方法

**1.2.1 萌发孢子的制备** 制备水琼脂的孢子萌发用培养基,可用下述3种方法制备萌发孢子。(1)将一产孢子实体悬挂于敞盖的培养皿上方一定时间,待孢子落于培养基上适当密度后(用显微镜检查)停止收集。(2)切取一片菌褶或用无菌滤纸制作的孢子印,用镊子在培养基上轻轻涂抹,并用接种针使孢子堆散开。(3)用无菌水调制较稀的孢子悬液在干燥一周后的培养基上划线,这样水分可立即被培养基吸收。置25℃下培养等待萌发。

需要注意的是孢子在萌发培养基上的密度不可太大,否则影响分离效率,方法(1)中,只要使子实体斜靠在培养皿一侧即可在培养基上产生孢子密度梯度,便于在孢子稀疏处操作。方法(2)中要在培养基上留出一定的操作空间。

**1.2.2 单孢挑取** 当孢子萌发时,首先把环境及工具彻底消毒,然后用显微镜低倍视野(10×10)在开盖的培养皿中寻找刚萌发的孢子(芽管长度为3~5倍孢子大小为最佳)。用灭菌的显微玻璃针把视野内未萌发或萌发后生长不良孢子以及杂菌杂物拨去,留下一个目标孢子。把移植管缓缓移入视野中,锁住目标,轻轻按下并轻转动显微移植管以使管中培养基易于取出,用洗

耳球吹至灌有 Shaw III 培养基的试管斜面上(见图1)。显微玻璃针在每次重复使用前先在75%酒精中洗一下前半部,然后在酒精灯上烘干以便杀死外壁上多余的孢子或杂菌。显微移植管则先过75%酒精再用洗耳球将管中的酒精吹出,然后在酒精灯上烤干。

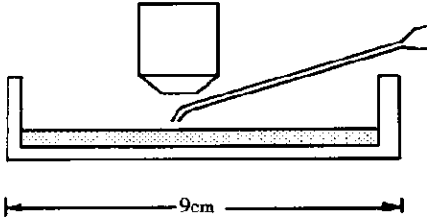


图1

影响单孢分离效率和成功率的因素主要是孢子密度和培养湿度和厚薄等。孢子密度低则容易将非目标孢子去除,也容易选择操作视野,不仅单孢率高且分离速度快,平均每2min可分离出一个孢子。培养湿度过大容易在下显微移植管时造成非视野的孢子随培养基渗出液流回移植处并粘于管外壁或顶端,影响试管中的单孢率,平板培养基薄或湿度大时都容易导致移植管中附有单孢的培养基块“流产”,过厚影响透光观察,一般在3mm厚效果较好。

1996年以来我们用此方法分离了近百个实体的3000余个单孢,单孢率在85%以上,污染率在0.1%以下,是一种较理想的方法。

**1.2.3 菌丝段的分离:**从单孢菌落边缘用显微刀切下一段菌丝,轻轻上提离开琼脂表面,使菌丝粘于刀上,移动培养皿寻找宽阔视野放下,然后用显微移植管按单孢方法转移至试管中。这也是一种较好的单倍体菌丝分离方法。

## 2 遗传互交不育性试验的培养方法

### 2.1 材料和方法

**2.1.1 培养基:** MEA培养基1L含20g麦芽粉(Malt Extract, Sigma, U.S.A.), 20g琼脂。SR培养基1L含40g麦芽粉, 20g葡萄糖, 20g琼脂粉, 5g蛋白胨。MEJA培养基1L含10g麦芽粉, 150mL国产麦芽汁, 20g琼脂。

**2.1.2 接种方法:** 对峙接种的两个菌株之间相距2~3mm, 25℃温度下培养3~4周, 见文献[1]。

**2.1.3 可育性判断:** 蜜环菌物种的遗传交配实验中, 配对的两菌株相遇3~4周后, 若两白色菌落之间存在一明显的黑色对峙拮抗线且不产生菌索则为互交不

育, 菌株属于两个不同的生物种。若两菌落都由白色菌落转变为褐色壳皮状菌落形态且产生大量菌索则为互交可育, 菌株属于同一生物种。

### 2.2 试验结果

**MEA培养基:**不同生物种之间由于互交不育性而产生的对峙黑线(拮抗线)非常明显不产生菌索, 极易判断, 但可育性反应不产生褐色壳皮状菌落, 只是菌落变黄, 降低生长速度, 甚至有时难以判断。由于菌落生长速度慢, 在大培养皿上可同时接种4个点。

**SR培养基:**可育性反应非常明显地产生褐色壳皮状菌落, 但缺点是菌落生长速度快, 菌索数量大而长, 在同一培养皿中不能同时接种4个点, 同时互交不育性的不同生物种间的拮抗黑线不明显。

**MEJA培养基:**可育性的交配反应产生褐色壳皮状菌落形态, 而且产生大量菌索。不同生物种间的不育性反应产生的拮抗黑线也非常明显, 而且不产生菌索, 在大培养皿上可同时接种4个点, 可明显提高实验效率。

## 3 讨论

改进的单孢分离法不需要特殊的设备和严格的无菌环境, 一般的条件下均可进行操作。分离速度快, 一般人员稍加训练即可操作, 一个熟练人员3min可分离一个。另外就是选优性好, 可以直接选择性分离那些萌发生长速度快、长势好的单孢, 这对于伞菌的杂交选育具有重要意义。

改进的培养方法继承了目前国际上通用的两种培养基的优点而摒弃了各自的不足, 用该法判断结果准确, 避免了有时因可育性反应不明显而经常进行重复交配试验。

这些方法的成功运用使得我们能够在短时间内测定近万个交配组合, 准确地鉴定了一些新的生物种和分类种。

## 参 考 文 献

- [1] 贺伟, 秦国夫, 沈瑞祥. 真菌学报, 1996, 15(1): 9~16.
- [2] Korhonen K, Hännikä V. Karstenia, 1978, 20: 19~22.
- [3] Shaw III. C. G, Roth L F. Phytopath, 1976, 66: 1210~1213.
- [4] Anderson J B, Ullrich R. Mycologia, 1979, 71: 402~414.
- [5] Volk T J, Burdsall H H, Banik M T. Mycologia, 1996, 88(3): 484~491.
- [6] Sasek V. Karstenia, 1978, 18: 49~52.