

一种简便的单孢分离法*

人们在观察一种真菌病害的标本时,不一定都能检查到子实体而作出诊断。同时,在病部表面或组织中检查到的真菌,也并非一定就是其病原物。对病害病原物的确定,最好的方法是分离、培养、回接后的发病鉴定和病原物的再分离。目前采用的菌种纯化和单孢分离法,国内有著名植物病理学家方中达先生介绍的琼胶平板稀释法、稀释纯化法、琼胶平板表面单孢子挑取法等多种,笔者曾试用其一二种^[1]。由于国产培养皿的光学性能差,镜检时费力又费时,不容易找到孢子,特别是无色、较小的孢子。现经本人多次实验,摸索出了一种简便的单孢分离方法,介绍如下。

1 材料和方法

1.1 材料与设备 无菌室或超净工作台、显微镜、培养皿(直径9 cm和6 cm各若干只)、琼脂培养基、无菌水、具细长嘴的皮头滴管、金属打孔器(直径5 mm)、接种针、培养箱、载玻片、酒精灯、试管斜面PDA培养基。

1.2 方法 ①将显微镜移入无菌室或超净工作台,事先已灭过菌的培养皿(皿内置一片载玻片)、无菌水、具细长嘴的皮头滴管及金属打孔器、直径9 cm和6 cm的空培养皿、接种针、酒精灯等所需工具也同时放入室内备用,室内用紫外灯灭菌40 min。②把溶化了的琼脂培养基带进接种室,然后倒入直径9 cm的空培养皿内(厚度为1~2 mm)。③待琼脂培养基冷却后,用在酒精灯火焰上灭过菌的金属打孔器在培养基上打出许多小琼脂薄圆饼。④用接种针挑出十几个琼脂小圆饼放在无菌、直径9 cm培养皿内的载玻片上,并在每个小圆饼上用接种针划一下,使小圆饼向两边分开成扇形,中间留部分空处。⑤用无菌水逐级稀释法制成孢子悬浮液,使其在160倍显微镜下每视野约有4~5个孢子。⑥用具细长嘴的皮头滴管(在酒精灯火焰上灭菌)吸取上述孢子悬浮液,逐一滴入琼脂小圆饼的中间空出部分处,每处一滴即可。⑦每一载玻片置培养皿内,在25℃温箱内培养过夜,并贴上标签。⑧一昼夜后,皿内孢子已萌芽,带入接种室内镜检,发现有萌芽孢子,即可选最容易挑出的单孢子移入PDA试管斜面培养基,置25℃培养箱内培养备用。

2 试验结果

近来,笔者已用此法从攸县油茶(*Camellia yunsienensis* Hu)和普通油茶(*Camellia oleifera* Abel)各个生长器官的病组织上,经分离培养后挑取了油茶炭疽菌(*Colletotrichum camelliae*)和交链孢属一种菌(*Alternaria* sp.) 50多个具生活力的单孢子,成功率达95%以上。经筛选获取保存了20多个单孢菌系,供致病力测定和分子真菌系统学研究之用。实践证明,此法简单方便,省力、省时,可靠性大,凡对病原菌的组织分离培养有一定操作经验者,稍加练习,即可掌握。

参 考 文 献

- 1 方中达. 植病研究方法, 北京: 农业出版社, 1979. 127~129.
- 2 CMI. Identification of Fungi: Some techniques in use, 4i-4v (Teaching material of the international course of "Identification of Fungi and Bacteria of Agricultural Importance"), 1985.
(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 杨婉琴)

1992-03-17收稿。

*本试验曾得到翁月霞副研究员的启发和指导, 特此致谢。