

食用菌单孢分离技术

张术丽¹,陈影²,陈亮²

(1. 黑龙江农业职业技术学院 生物工程系, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 吉林农业大学 菌物研究所, 吉林 长春 130118)

食用菌育种的方法有杂交育种、诱变育种、选择育种、原生质体融合技术和基因工程技术等。其中杂交育种是食用菌新品种选育中应用最广, 成效最显著的育种方法。杂交育种的理论基础是通过单倍体交配实现基因重组, 通过双亲性状的优势互补或借助于某一亲本的优点去克服另一亲本的缺点, 通过选择适当的亲本进行交配, 从杂交后代中筛选出具有双亲优良性状或超亲性状的菌种。此方法适用于异宗结合的食用菌, 即 2 个不同担孢子萌发成的单核菌丝进行配对, 实现双核化, 形成子实体。食用菌杂交育种中的关键步骤之一是单孢分离。该文总结了金顶侧耳子实体单孢分离的技术要点以及注意事项, 旨在为食用菌研究提供理论参考。

1 孢子分离法

孢子分离法是用食用菌成熟的有性孢子(担孢子或子囊孢子)萌发培育成菌丝体而得到菌种的方法。食用菌的有性孢子具备双亲的遗传特性, 变异几率大, 生命力强, 培育成的菌种质量好。因此, 有性孢子是选育优良新品种和杂交育种的好材料。单孢分离法的操作程序见图 1。

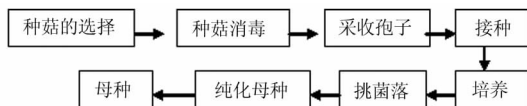


图 1 单孢分离的一般程序

Fig. 1 The general procedure of single spore isolates

2 单孢分离的技术要点

2.1 种菇的选择

为了能够取到不受污染的子实体, 采用套袋法^[1]培育种菇。在超净工作台中, 向栽培瓶中接种供试菌株, 接种后半拧上瓶盖, 放入 25℃ 恒温

培养箱中黑暗培养。待菌丝长满栽培瓶后无菌条件下进行搔菌, 用接种铲将培养基表面的菌丝挖净, 灌入无菌水, 高于料面 2 cm, 用塑料膜封口, 放置一夜。第 2 天在超净工作台中倒净栽培瓶中剩余的水, 套上已灭菌的带孔塑料袋, 置于 20℃ 有光的培养室中进行出菇培养。每个菌株 10 个重复, 当菌盖长到 1.0~1.5 cm 时, 去劣存优, 最后选择至少 3 个菌株, 做好标记, 除去菇朵外围小菇, 喷适量清水, 20℃ 恒温培养, 随时检查种菇的生长情况。最后选择具备亲本典型优良性状的种菇, 当菌盖展开且未散孢子之前, 及时采摘和取孢子。

2.2 孢子收集

在灭菌后的超净工作台中, 将采摘的子实体切下菌盖, 菌褶向下置于无菌培养皿中, 放置 24 h, 获得孢子印。形成孢子印后, 在无菌条件下, 取出菌盖, 盖上培养皿, 标记好菌株的名称, 用保鲜膜封口, 孢子印备用。

2.3 孢子分离

在超净工作台中, 用手振荡装有 1.5 mL 无菌水的离心管, 用 3 mm×5 mm 无菌滤纸条沾取离心管盖中的无菌水, 滤纸条润湿即可, 蘸取孢子, 放入装有 2.0 mL 无菌水的离心管, 充分振荡, 用移液枪吸取 1 mL 孢子原液, 注入装有 9 mL 无菌水的试管中, 不断抽吸 4~5 次, 此时孢子液浓度为 10^{-1} , 依次稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 每稀释一个梯度, 换一个灭菌后的枪头, 防止污染稀释液, 将原液在血球计数板中计数, 记录原液孢子的密度。将不同梯度的悬浮液吸取 80 μ L 注入 9 cm 平板培养基中涂布, 每个稀释度涂布 3 个平板, 然后封口, 记录不同稀释度下的平板数。将培养皿置于 25℃ 黑暗条件下培养, 5 d 后孢子萌发, 培养期间, 每天要取出观察, 严格挑选发育匀称、生长快速的单个菌落, 能从背面对光看见白点的单个菌落进行标记, 无菌条件下挑取孢子, 迅速移入斜面培养基, 然后再进行纯化培养, 初步

收稿日期: 2013-05-06

第一作者简介: 张术丽(1977-), 女, 吉林省德惠市人, 在读博士, 讲师, 从事食用菌栽培和育种研究。E-mail: zsl09291@yahoo.com.cn.

浅议园林景观工程造价控制

刘红娟,徐秋林

(上海建津建设工程咨询有限公司,上海 200120)

摘要:针对园林景观工程造价难以控制的现状以及园林景观工程造价控制存在的问题,分析了影响园林景观工程造价的因素,分别对决策阶段、设计阶段、招标阶段、施工阶段以及竣工养护阶段提出了园林景观工程全过程造价控制的相应对策。

关键词:园林景观工程;造价控制;影响因素

中图分类号:TU986

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)11-0115-03

园林景观工程是一个综合性的工程,主要包括园林建筑、堆土造型、园路广场、亲水平台、假山、铺地、景石景亭、喷泉照明、雕塑小品、护坡水景,还有名目繁多的乔木、灌木、地被、草坪、绿篱及水生植物的种植等内容^[1]。园林景观工程造价是指建设一项园林景观工程中,在土地市场、设备市场、苗木市场、技术劳务市场以及承包市场等交易活动中所形成的园林景观建设工程价格^[2]。园林景观工程具有其独特性,主要体现在:一是园林景观具有多专业综合性、材料革新性;二是园林绿化大部分的实施对象都是有生命的活体,靠“三分种植七分管理”,特别是苗木品种数以百计,外观形象千姿百态,种植方法、养护措施、施工季节和地点也不尽相同;三是园林工程建设在景观小品、植物配置和古典建筑等方面则更讲究艺术性,追求艺术美,其效果需要给人以格外美的感受;四是园林景观工程是各项配套工程的最后一环,工期

较紧、受自然条件限制、需协调配合的事项较多,不可预见因素也多,而且工程量分散不便于监督管理。正是由于园林景观工程的这些特殊性,导致了园林景观工程造价控制的复杂性。

1 影响园林景观工程造价难以控制的因素

当前,影响园林景观工程造价的因素主要有4点:(1)前期工作没有做好,不按照可行性研究分析和初步设计批复中的投资额进行设计和施工,超项严重。(2)设计阶段不按批准的绿地面积控制规模;设计方案不合理,通常很多园林景观设计常常为了营造项目美观效果而忽略了一些现实问题,比如园林项目中引入大量外来树种,导致苗木成活率偏低等。(3)按规定该进行招标的项目未进行招标,或者是招投标方法不完善导致工程造价缺乏竞争力。(4)施工阶段主观意志多,随意更改设计、增加建设内容以及提高建设标准等。所有这些均是导致概算超估算、预算超概算以及结算超预算问题的主要因素。

收稿日期:2013-07-31

第一作者简介:刘红娟(1983-),女,湖南省邵东县人,硕士,从事工程造价管理工作。E-mail:42865521@qq.com。

获得单核菌株。

2.4 单核菌丝的鉴别

当挑取的单个孢子的菌落长到2 cm时,挑取边缘菌丝置于载玻片上,用1%的番红染色1 min,再滴入清水,盖上盖玻片,用滤纸吸取多余的液体。先放入10倍显微镜下进行观察,当检测到菌丝时,再转入40倍的显微镜下进行观察,若无锁状联合,可初步认为是单孢萌发而生成的单核菌丝,然后转接到斜面培养基上培养,再用双重荧光染色法^[2]进一步鉴定,确定为单核菌丝。

3 注意事项

无菌操作对食用菌的单孢分离成功与否至关重要。因此在操作过程中,要确保培养环境清洁干净。首先避免子实体受污染,灌入培养瓶的水要事先进行灭菌,各操作环节材料用具要灭菌。操作要尽量快速。

参考文献:

- [1] 姚方杰.金顶侧耳基因连锁图谱与双-单交配机制解析及高温型菌株选育研究[D].长春:吉林农业大学,2002:21.
- [2] 刘桂娟.黑木耳不亲和因子构成及优良品种选育的研究[D].长春:吉林农业大学,2011:9.