

## 滤纸片低温干燥法保存丝状真菌

尹良芬 (华中农业大学植物科技学院作物学实验教学中心, 湖北武汉 430070)

**摘要** 将待保存菌株接种在PDA培养基平板中央,在菌落周围放置直径3~5 mm的圆形无菌滤纸片,待真菌菌丝(孢子)长满滤纸片后,将其取出放入无菌培养皿中,放置在底部盛有变色硅胶的干燥器中干燥3~5 d。将干燥后的带菌滤纸片再转入底部装有无菌变色硅胶的无菌离心管中,用封口膜封口,放入透明冷冻盒内-20 ℃保存。通过对保存周期为2~7年的15种真菌菌种共计260个菌株的存活情况及部分菌株的致病性进行检测,发现保存的菌种存活率高,致病性和生物学特性不易退化。因此,滤纸片低温干燥法保存丝状真菌菌种,具有对设备要求简单、占用空间小、保存容量大、保存时间长、工作效率高等优点。

**关键词** 菌种保存;滤纸片干燥;低温;存活率;致病性;丝状真菌

**中图分类号** R 446.5 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2022)12-0005-06

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.12.002



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Drying Filter Paper at Low Temperature to Preserve Filamentous Fungi

YIN Liang-fen (Experimental and Teaching Center of Crop Science in College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

**Abstract** The strains to be preserved were inoculated in the center of the PDA medium plate, a circular sterile filter paper with a diameter of 3 to 5 mm was placed around the colony. After the fungal hyphae (spores) were overgrown with the filter paper, took it out and put it into a sterile petri dish, and placed it in a desiccator filled with discolored silica gel at the bottom to dry for 3 to 5 days. Dried filter paper pieces were then put into centrifuge tubes with sterile silica gel at the bottom. After sealing with parafilm, the centrifuge tubes were finally put into a transparent freezer box and stored at -20 ℃. Through the detection of 260 isolates from 15 fungi species that preserved for 2-7 years, it was found that most of the detected strains maintained high survival rate and high virulence, and their biological characteristics do not degenerate easily. Using drying filter paper at low temperature to save filamentous fungi has the advantages such as requires simple equipments, occupies small space, has large storage capacity, keeps long storage time, and has high efficiency.

**Key words** Fungi strain conservation; Drying filter paper pieces; Low temperature; Survival rate; Pathogenicity; Filamentous fungi

菌种是生物学研究工作正常运行的物质基础。菌种质量的高低决定着研究工作的成败。为使自然界分离的优质菌株能够保持原有的优良性状,最大限度地发挥作用,就需要尽可能完好地保存菌种。

微生物菌种的保存方法较多,各有优缺点。大体上可分为4类,即继代法、干燥法、低温干燥法和超低温冷冻法<sup>[1-3]</sup>。继代法,也叫定期移植法,即把菌种移植到斜面培养基上进行保存的方法;该方法操作简便、适用广泛,不需要特殊设备;但缺点是微生物的生长和代谢活动几乎没有被抑制,因而保存时间较短,需要经常进行移植(90 d或者更短时间就需要移植一次),烦琐费时;而且最致命的还是多次继代培养后菌种的生物学特性退化,失去原有的优良性状<sup>[1-5]</sup>。干燥法是将菌种干燥后放置干燥环境保存的方法<sup>[1]</sup>,该方法保存时间长,但需要一直放置在干燥器中,保存容量小。低温干燥法是将待保存真菌孢子悬浮在保护剂中,加干燥剂(如硅胶等)抽真空进行干燥后,封口低温保存<sup>[1]</sup>;该保存方法菌种的存活率高、保存时间长、菌种稳定性高,但操作烦琐且需专用设备<sup>[1]</sup>。超低温冷冻法是将菌种制成悬液,加入保护剂如甘油等分装到离心管或者冻存管中,或者将菌种培养到滤纸片上,干燥后保存于-80 ℃的超低温冰箱或者液氮(-196 ℃)中;该方法保存时间长、菌种不易退化,但操作复杂,需特殊设备,液氮还需要定期添加<sup>[5-7]</sup>。此外,还有很多上述方法改进的保存方法,如矿物油保存法<sup>[1,8]</sup>、Richards保

存法<sup>[9]</sup>、滤纸低温保存法<sup>[10-11]</sup>。

上述滤纸保存方法中,只利用真菌孢子进行保存的方法适用范围较窄,因为一些真菌菌株人工培养时不会产生孢子,或者即便产生分生孢子其量也非常小,无法利用该方法进行保存;而利用菌丝(孢子)进行保存的方法,虽然扩大了菌种的保存范围,但由于信封与塑料密封袋的低密闭性,硅胶容易受潮,需要定期进行更换,增加了工作量以及更换过程中菌种被污染的风险。此外,信封或者硫酸纸袋都不透明,导致查找菌种不方便,而且活化菌种以及更换硅胶时需要逐层打开塑料密封袋、信封及硫酸纸袋,因而工作效率低。笔者介绍一种改进的滤纸片低温干燥保存法,即将带菌滤纸片保存在添加有变色硅胶的透明离心管中,然后放置于透明冷冻盒内进行保存。经过改进后,上述保存方法中存在的问题都能得到很好的解决,从而能够更好地保存菌种。

## 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

**1.1.1 供试菌种。**褐腐病菌 *Monilinia fructicola*、*Monilia mumecola*、*Monilia yunnanensis*、*Monilinia linhartiana*;实腐病菌 *Diaporthe eres*、*Diaporthe fusicola*;炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、*Colletotrichum acutatum*;纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*;黄萎病菌 *Verticillium dahliae*;枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*;小斑病菌 *Bipolaris maydis*;赤星病菌 *Alternaria alternata*;黑根霉 *Rhizopus nigricans*;犁头霉 *Absidia*。

**1.1.2 供试材料。**单孔或双孔文具用打孔器,孔径4 mm左右;普通定性滤纸;1.5 mL或2.0 mL离心管(也可换为螺口、平底的指形管);变色硅胶(规格型号HG/T 2765.4-2005,青

**作者简介** 尹良芬(1974—),女,云南罗平人,高级工程师,博士,从事植物病理研究。

**收稿日期** 2021-09-18

岛海洋化工有限公司);普通玻璃干燥器;封口膜(PARAFILM);透明塑料冷冻盒,规格不限。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 变色硅胶干燥。**将变色硅胶倒入玻璃培养皿或者瓷盘中,放入烘箱 80 °C 干燥 2 h 至硅胶变为深蓝色(干燥的变色硅胶呈深蓝色,根据吸湿量的多少颜色会依次呈淡蓝色、蓝白色、蓝紫色和粉红色)后冷却,然后倒入玻璃干燥器中备用。

**1.2.2 变色硅胶灭菌。**将变色硅胶倒入玻璃培养皿中,烘箱 160 °C 灭菌 2 h<sup>[1]</sup>,冷却后加入无菌离心管中备用。

**1.2.3 滤纸片及其灭菌。**用打孔器将定性滤纸打成直径 3~5 mm 的圆形滤纸片,放入玻璃培养皿中,121 °C 湿热灭菌 15 min 后放超净工作台上备用。

**1.2.4 带菌滤纸片制作。**将待保存的真菌接种在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)平板的中央,在接种点的周围均匀摆放数个灭菌滤纸片,于恒温培养箱中 25 °C 黑暗培养(该条件为大部分丝状真菌培养的最适条件)<sup>[1,12-13]</sup>。培养过程中菌丝(孢子)生长到滤纸片上。滤纸片长满菌丝(孢子)后取出,放置于无菌培养皿中。

**1.2.5 带菌滤纸片干燥。**将放置有带菌滤纸片的培养皿放入底部盛有干燥变色硅胶(呈深蓝色)的干燥器内,盖上盖子干燥 3~5 d。

**1.2.6 带菌滤纸片保存。**取 1.5 mL 的无菌离心管,于超净工作台酒精灯火焰旁将无菌变色硅胶加入离心管底部,然后将

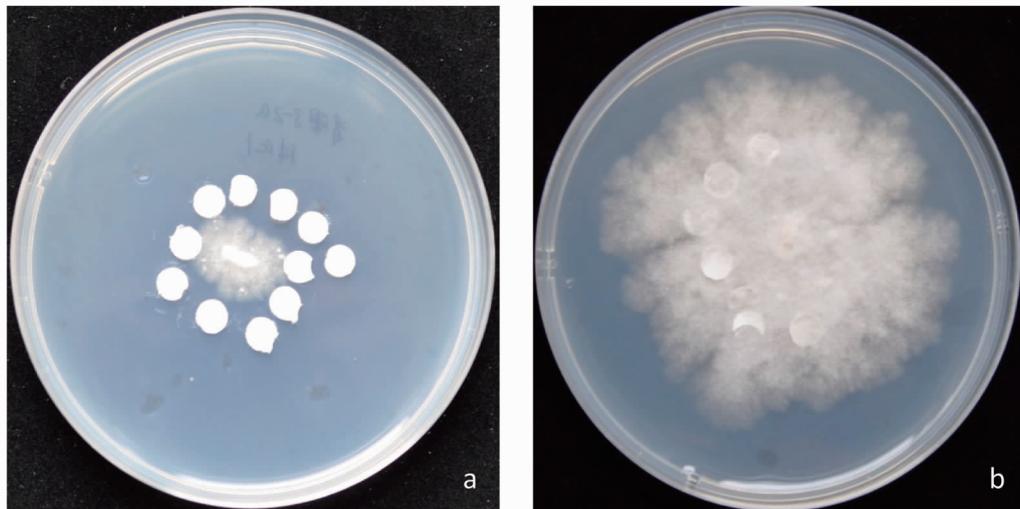
干燥好的带菌滤纸片放入其中。用记号笔在离心管上写上菌种名称或编号及保存日期并用封口膜封口,最后放入透明冷冻盒中-20 °C 冰箱长期保存。

**1.2.7 滤纸片低温干燥法保存菌种的存活率测定。**取低温干燥法保存菌种滤纸片放置于 PDA 培养基上,25 °C 黑暗培养数天后检查其存活率。存活率计算:同一种真菌移植的 10 片滤纸片中,能够长出菌丝的滤纸片所占的百分比。如果同一种真菌保存有多个菌株且活化过其中的数个菌株,则存活率为活化过的所有菌株的平均值。

**1.2.8 滤纸片低温干燥法保存菌种的致病力测定。**在活化好的待测菌种如褐腐病菌菌落边缘用直径为 5 mm 的打孔器打取菌丝块,接种到该菌种的寄主(核果或仁果类水果)果实上(果实先用同样的打孔器打孔,然后将菌丝块菌丝面朝下塞到孔里),将接种果实放入底部铺有湿纸巾的瓷盘里,用保鲜膜盖上后放入光照培养箱中,(23±1) °C<sup>[14-20]</sup>、光照条件 12 h/12 h<sup>[12-15]</sup> 培养 1~7 d 观察发病情况并测量病斑大小,计算病斑扩展速率并评价该菌种的致病力。

## 2 结果与分析

**2.1 带菌滤纸片制作** 菌种移植培养时,先在 PDA 培养基平板中部放置数片无菌滤纸片,然后将待保存菌种的菌丝块置于无菌滤纸片围成的圆圈中央;如果接菌后想保存,则将滤纸片放置在菌落边缘先端菌丝尚未到达的地方(图 1a),这样菌丝往外生长扩展时就会长到滤纸片上。待整个滤纸片都长满菌丝(孢子)时,带菌滤纸片制作完成(图 1b)。



注:a.菌种培养初期放置无菌滤纸片;b.菌丝或孢子长满滤纸片,成为带菌滤纸片

Note: a. Sterile filter paper pieces were placed during fungus culture; b. Fungus-bearing filter paper completed after fungi grew on them

图1 褐腐病菌 *Monilia mumecola* 带菌滤纸片的制作

Fig.1 Making of fungi-bearing filter paper of *Monilia mumecola*

**2.2 带菌滤纸片干燥** 将长满菌丝(孢子)的带菌滤纸片转移到无菌培养皿中(图 2a),然后放置于底部盛有干燥变色硅胶的玻璃干燥器中干燥 3~5 d(图 2b)。

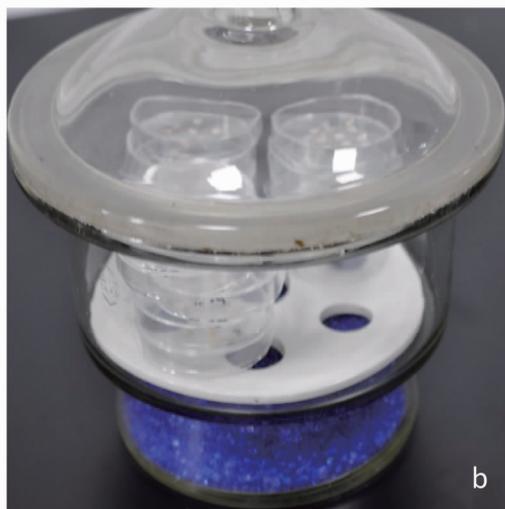
**2.3 带菌滤纸片保存** 干燥后的带菌滤纸片放入底部装有变色硅胶的 1.5 mL 无菌离心管,用封口膜(PARAFILM)封口(图 3a),后放入透明冷冻盒内,于-20 °C 冰箱中长期保

存(图 3b)。

**2.4 变色硅胶不同湿度时颜色变化** 变色硅胶吸湿后其颜色因湿度不同会发生改变。干燥状态呈深蓝色,此时湿度为 0(图 4a);湿度约为 10%时呈淡蓝色(图 4b);湿度约为 25%时呈蓝白色(图 4c);湿度约为 40%时呈蓝紫色(图 4d);湿度约为 50%时呈粉色(图 4e)。菌种保存过程中如果变色硅胶

呈粉红色,表明其吸湿性已经很弱,无法继续维持所保存菌

种的干燥环境,需要进行更换。



注:a.带菌滤纸片转移到无菌培养皿中;b.放入干燥器中进行干燥

Note:a.Transferring fungi-bearing filter paper pieces into sterile petri dish;b.Drying fungi-bearing filter paper pieces in a dryer

图2 带菌滤纸片干燥

Fig.2 Drying fungi-bearing filter paper pieces



注:a.干燥的带菌滤纸片保存于离心管中;b.冷冻保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中

Note:a.Dried fungi-bearing filter paper pieces were conserved in the centrifuge tubes;b.Stored in a refrigerator at  $-20^{\circ}\text{C}$

图3 带菌滤纸片的冷冻保存

Fig.3 Conservation of fungi-bearing filter paper pieces

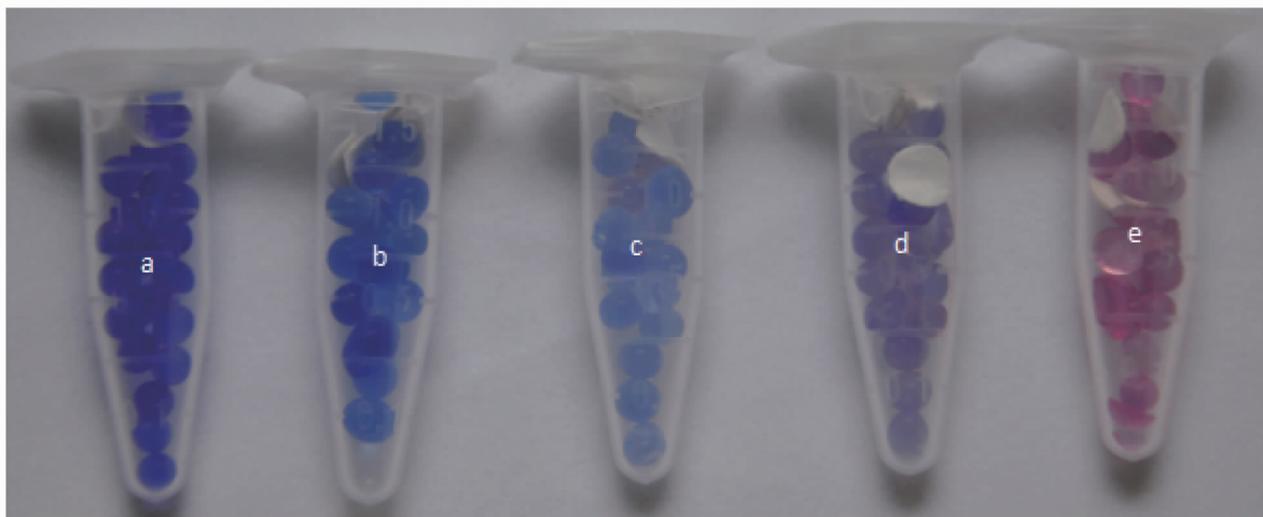
**2.5 保存菌种干燥状态检查** 从冰箱中取出冷冻盒,直接通过冷冻盒的透明底部观察离心管中硅胶颜色的变化(图5),硅胶颜色为粉色时需要进行更换。常使用的冷冻盒规格为100格(10行10列),利用该保存方法,100个菌种的干燥状态检查只需要几秒钟的时间。

**2.6 滤纸片低温干燥法保存菌种的存活率及生物学特性测定** 该研究检测了用滤纸片低温干燥法保存的15种真菌260株菌株的存活率。结果表明,除水稻纹枯病菌外,其他菌种的存活率达80%以上,多数菌种的存活率达100%。从表1可以看出,人工培养能够产生分生孢子或者菌丝浓密的菌种成活率最高,可达100%;而不产生分生孢子且菌丝稀疏的菌种存活率相对较低。水稻纹枯病菌保存了2次,2013年保存

的菌种,2014—2017年活化成功,2018年未活化成功;2018年保存的菌种,2021年活化时存活率达70%。与水稻纹枯病菌相似,桃褐腐病菌 *M.yunnanensis* 在人工培养时不产生分生孢子,菌丝也较稀疏,2012—2020年共保存了281株来自不同地区及寄主上的该病原菌菌株,数年间活化过其中的45个菌株且全部存活。

另外还观察了上述15种真菌活化后的生物学特性,如菌落生长特性、产孢特性等,发现与分离初期的菌种没有太大差异。如褐腐病菌 *M.fructicola*,保存4年的、来自桃的分离菌活化后与刚分离的、来自枇杷的分离菌一样,在PDA培养基上菌落都呈褐色,产生大量分生孢子。且保存4年的桃分离菌菌落生长速率为14 mm/d,而刚分离的枇杷菌株为

15 mm/d<sup>[14-20]</sup>, 差异不大。



注: a.深蓝色; b.淡蓝色; c.蓝白色; d.蓝紫色; e.粉色

Note: a.Dark blue;b.Light blue;c.Blue-white;d.Purple blue;e.Pink

图4 变色硅胶颜色变化

Fig.4 Color change of silica gel

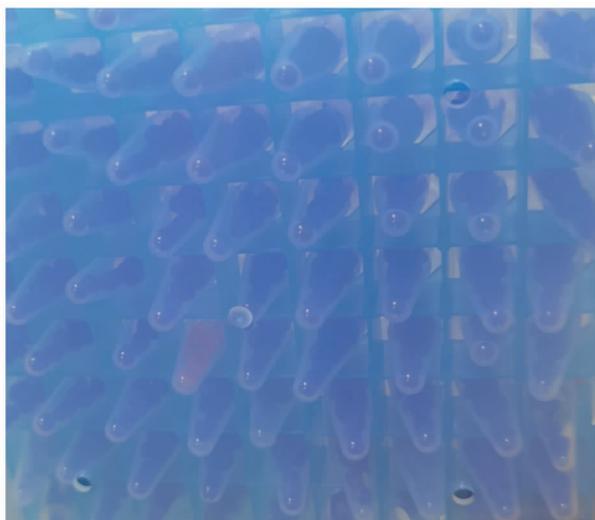


图5 通过透明冷冻盒底部检查菌种干燥状态

Fig.5 Dry state check through the bottom of the transparent freezer box

**2.7 滤纸片低温干燥法保存菌种的致病力测定** 为测定该方法保存菌种的致病力是否存在退化现象, 该研究挑选了3种培养性状及保存年限不同的褐腐病菌与新分离菌株进行致病力对比试验。3个保存菌种分别是保存4年的 *M.fructicola*、保存6年的 *M.mumecola*、保存7年的 *M.yunnanensis*。其中, *M.fructicola* 人工培养时能产生大量分生孢子, 存活率为100%; *M.mumecola* 人工培养时不产生分生孢子, 但菌丝浓密, 存活率也为100%; *M.yunnanensis* 人工培养时不产生分生孢子, 菌丝稀疏, 存活率为98%。新分离菌株为分离自枇杷的 *M.fructicola*, 3个保存菌种分离自桃。所以在枇杷及桃上都进行了回接试验。

接种结果如图6所示, 新分离菌 *M.fructicola* 在枇杷和桃

上都能致病, 产生褐色病斑及大量分生孢子(图6a、e); 保存4年的 *M.fructicola* 菌在枇杷和桃上也产生褐色病斑及大量分生孢子(图6b、f); 保存6年的 *M.mumecola* 菌(图6c、g)及保存7年的 *M.yunnanensis* 菌(图6d、h)也产生差不多大小的褐色病斑, 但分生孢子相对较少, 这是由于不同种之间的差异造成的。

同样是属于 *M.fructicola* 的菌株, 来自枇杷的新分离菌株接种枇杷时, 病斑扩展速度为17.4 mm/d; 而保存4年, 来自桃的菌株则为15.9 mm/d; 但接种桃时, 来自枇杷的新鲜菌株病斑的扩展速度为12.8 mm/d; 来自桃、保存4年的菌株病斑扩展速度却为14 mm/d<sup>[14-20]</sup>。这些数据说明菌种的致病力与保存年限没有直接关系, 也就是说该方法保存的菌种其致病力没有明显退化。

### 3 讨论与结论

以前的滤纸片保存方法是让菌丝(孢子)长在滤纸上, 干燥后放入硫酸纸袋中, 外面用塑料密封袋封口或者在硫酸纸袋和塑料密封袋中间加一个装有干燥变色硅胶的信封, 放入-20℃冰箱进行保存。该方法的优点是保存的菌种范围广且保存时间长, 缺点是硫酸纸袋和塑料密封袋的密闭性较差, 会导致菌种受潮因而保存时间不长, 硅胶容易受潮, 需要定期进行更换, 增加了工作量以及更换过程中菌种被污染的风险。此外, 由于信封或者硫酸纸袋都不透明, 导致查找菌种、活化菌种以及更换硅胶时需要逐层打开塑料密封袋、信封及硫酸纸袋, 工作效率低下。

该研究介绍的滤纸片低温干燥法保存真菌菌种, 利用离心管作为保存容器进行菌种保存。离心管密闭性高, 又添加了硅胶干燥剂, 能长时间为所保存菌种提供干燥的环境, 菌种在这种条件下代谢极低, 因而保存时间长, 且其生物学特性不易发生退化。同时, 离心管和冷冻盒均为透明, 通过冷

冻盒盖子即可方便快捷地查找目标菌种;而从透明冷冻盒底部及四周可见离心管中变色硅胶的颜色,据此可判断所保存菌种的干燥状态以及是否需要更换变色硅胶等。离心管的高密封性可有效隔绝外界湿气,因此不需要经常更换硅胶。华中农业大学植物科技学院作物学实验教学中心用此法所

保存的数千份菌种中,有数百份为保存 10 年以上的菌种,仅有个别菌种其离心管中的硅胶变为粉色,需要更换,其他绝大多数都不需要更换。另外,此法活化菌种及更换变色硅胶都比较方便,只需要打开离心管盖子进行操作即可。

表 1 滤纸片低温干燥法保存菌种的存活率测定

Table 1 Survival rate detection of strains preserved by dried filter paper at low temperature method

菌种名称 Name of fungi species	寄主 Host	保存时间 Conservation time	活化时间 Activation time	活化菌株数 Activated strains//株	存活率 Survival rate//%	菌种培养特征 Strain culture characteristics
褐腐病菌 <i>Monilia yunnanensis</i>	桃、李、杏、梨、苹果	2012—2021 年	2012—2021 年	45	98 <sup>#</sup>	不产孢,菌丝稀疏
褐腐病菌 <i>Monilia mumeicola</i>	桃、李、杏、樱桃	2013—2020 年	2013—2020 年	50	100	不产孢,菌丝浓密
小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>	玉米	2013-10	2014—2020 年	7	100	产孢,菌丝浓密
赤星病菌 <i>Alternaria alternata</i>	烟草	2013-10	2014—2020 年	7	100	产孢,菌丝浓密
枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	棉花	2013-10	2014—2020 年	9	100	产孢,菌丝稀疏
黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	棉花	2013-10	2014—2020 年	9	100	不产孢,菌丝稀疏
纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	水稻	2013-10	2018-05	1	0	不产孢,菌丝稀疏
褐腐病菌 <i>Monilinia fructicola</i>	核果类水果及枇杷	2010—2020 年	2012—2021 年	55	100	大量产孢,菌丝稀疏
炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	柑橘	2014-12	2019-09	1	100	大量产孢,菌丝稀疏
炭疽病菌 <i>Colletotrichum acutatum</i>	桃	2016-05	2020-09	1	100	大量产孢,菌丝稀疏
纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	水稻	2018-07	2021-02	1	70	不产孢,菌丝稀疏
黑根霉 <i>Rhizopus nigricans</i>		2013-10	2014—2020 年	7	100	不产孢,菌丝浓密
犁头霉 <i>Absidia</i>		2013-10	2014—2020 年	7	100	不产孢,菌丝浓密
实腐病菌 <i>Diaporthe eres</i>	桃	2017—2019 年	2018—2020 年	20	80	部分产孢,菌丝一般
实腐病菌 <i>Diaporthe fusicola</i>	桃	2017—2019 年	2018—2020 年	15	80	部分产孢,菌丝一般
褐腐病菌 <i>Monilinia linhartiana</i>	木瓜	2017—2019 年	2019-2020 年	25	80	不产孢,菌丝稀疏

注:#.表示活化时,有个别菌株会出现个别滤纸片活化不成功的情况

Note: # indicates that during activation, some strains may fail to activate individual filter paper



注:a~d.接种 1 d 后;e~h.接种 5 d 后。病斑来自 a、e.新鲜 *M.fructicola* 菌种;b、f.保存 4 年 *M.fructicola* 菌种;c、g.保存 6 年 *M.mumeicola* 菌种;d、h.保存 7 年 *M.yunnanensis* 菌种

Note:a~d.1 day after inoculation;e~h.5 days after inoculation.The symptoms came from a,e.fresh isolated *M.fructicola* isolate;b,f.*M.fructicola* isolate preserved for 4 years;c,g.*M.mumeicola* isolate preserved for 6 years;d,h.*M.yunnanensis* isolate preserved for 7 years

图 6 新分离菌株及滤纸片低温干燥法保存菌株的致病力测定

Fig.6 Pathogenicity detection of isolates from freshly isolated and preserved by drying filter paper at low temperature method

利用滤纸片低温干燥法进行保存时,如果一次性保存的菌种数量比较大,通常先将滤纸片围成圆圈放置在培养基平板上,再将菌块接到圆圈中央,这样同一把镊子消毒后可以放置多皿滤纸片,从而提高工作效率。菌种培养过程中如果想保存,则需要将滤纸片放置在菌落边缘先端菌丝尚未到达的培养基上,这样菌丝才能长到滤纸片上;如果菌落已经长满培养皿或者菌落边缘快要到达培养皿边缘则不建议进行菌种保存,此时无法保证足够量的菌丝(孢子)长到滤纸片上。对于菌丝特别稀疏的菌种进行保存,可先将无菌滤纸片用灭菌的马铃薯葡萄糖水培养基(PDB培养基,即PDA培养基去掉琼脂)泡一下,滤纸片上扩展的菌丝(孢子)量会增加。保存过程中添加到离心管里的灭菌硅胶粒需要使用新的,而干燥用的硅胶粒则可以反复使用。

滤纸片低温干燥保存方法中,2013年保存的水稻纹枯病菌于2018年活化时其存活率为0,第2次保存的存活率也不高。而同样是人工培养时不产生孢子或者产生极少量孢子,且菌丝也稀疏的褐腐病菌 *M.yunnanensis* 和 *M.linhartiana* 却能达到80%以上的存活率。尤其是 *M.yunnanensis* 菌种,从2012年开始华中农业大学植物科技学院作物学实验教学中心共分离保存过281株来自不同寄主及地区的菌株,且活化过其中的45个菌株,没有出现1例存活率为0的情况。水稻纹枯病菌存活率低下的原因不明。木瓜褐腐病菌中有些菌株的菌丝非常稀疏,滤纸片上几乎看不见菌丝,导致保存的菌种存活率低下。

虽然利用滤纸片低温干燥保存方法出现水稻纹枯病菌5年后存活率为0的情况,但相比华中农业大学植物科技学院作物学实验教学中心同时使用过的继代保存法和石蜡油保存法,该方法的优势仍很明显。滤纸片保存的所有菌种同时都进行过PDA斜面4℃冰箱保存,除黑根霉、犁头霉、褐腐病菌 *M.fructicola* 3个菌种2年后仍能存活外,其他菌种尤其水稻纹枯病菌存活周期短的仅90d,长的能达1年以上。而利用该方法保存,即便2018年活化时存活率为0的水稻纹枯病菌,其在2014—2017年却每年都能活化成功。此外,继代保存的菌种还会出现生物学特性退化的情况,如利用继代法保存的棉花黄萎病菌、棉花枯萎病菌等多次继代保存后会出现不产生分生孢子的情况。而石蜡油保存的菌种,虽然5年以后仍能存活,但放冰箱里只能直立,占用空间较大,且活化时菌落带有黏性,碰过石蜡油的接种针在酒精灯上灼烧灭菌时会发出炸裂声,油花四溅,同时散发出石蜡油的异味。

致病力测定试验可以看出,同样的 *M.fructicola* 菌种,保存4年的菌种致病力与刚分离的菌种没有区别,说明该保存方法能够很好地保存菌种的优良性状,菌种的生物学特性不易退化。对于人工培养时不产生孢子、菌丝稀疏的菌种,要解决成活率低下的问题,只需要在菌种保存时加大保存滤纸

片的数量,同时活化时1次取2张或者3张滤纸片进行活化即可。

滤纸片低温干燥保存方法有效规避了继代保存法多次继代培养而导致的菌种活力下降以及冷冻保存法需要特殊设备且费用高昂的问题。该保存方法中滤纸片放置在离心管中保存,不仅占用空间小,保存容量大,一个普通冰箱的冷冻室就能够轻松保存数千份菌种。此外,菌种取用方便,需要时找到所需菌种打开封口,取出1片滤纸片进行活化,余下的菌种封口放回去继续保存。

综上所述,该保存方法具有对设备要求简单、占用空间小、保存容量大、保存时间长、取用方便及菌种成活率高、致病力强、生物学特性不容易退化、工作效率高等优点,值得推广应用。

### 参考文献

- [1] 方中达. 植物研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 142-146.
- [2] 郭玲玲. 微生物菌种保藏方法及关键技术[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(3): 105-108.
- [3] 徐莹. 药品微生物检验用菌种保藏方法[J]. 检验检疫学刊, 2019, 29(1): 73-74.
- [4] 黄霞云. 人工传代、低温与超低温法保存菌种的效果比较观察[J]. 现代医院, 2006, 6(8): 73-74.
- [5] 梁梅娟, 陈亚波, 苏佩冰. 菌种超低温保存法与人工传代法的比较[J]. 现代食品, 2018(21): 184-186.
- [6] 吴婧, 李东明, DE HOOG G S, 等. 病原性丝状真菌的菌种保藏方法[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(5): 305-307.
- [7] 王华, 杜立业, 李华. 微生物液氮超低温保存研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(1): 1-5.
- [8] 杨之为, 李有志, 宗兆锋. 矿物油中保存真菌存活期限的检测[J]. 西北农业大学学报, 1996, 24(3): 100-103.
- [9] 易龙. 烟草赤星病菌菌种保存及致病性研究[J]. 植物保护, 2008, 34(1): 92-95.
- [10] 吴波明, 郭芳芳, 王宁, 等. 真菌快速保存方法: CN201710796139.5[P]. 2018-02-09.
- [11] 曹美林, 李佳, 邓慧, 等. 滤纸片低温冷冻法保存微生物菌株的临床应用[J]. 实验与检验医学, 2015, 33(3): 279-281, 303.
- [12] 尹良芬, 马琼瑶, 陈育. 桃溃瘍病的鉴定[J]. 西南农业学报, 2011, 24(5): 1748-1752.
- [13] 尹良芬, 都胜芳, 蔡明历, 等. 野生柑橘炭疽病鉴定[J]. 西南农业学报, 2017, 30(3): 590-594.
- [14] YIN L F, CHEN S N, CHEN G K, et al. Identification and characterization of three *Monilinia* species from plum in China[J]. Plant disease, 2015, 99(12): 1775-1783.
- [15] CHEN G K, DU S F, LI G Q, et al. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on Chinese sour cherry (*Cerasus pseudocerasus*) in southwestern China[J]. Plant disease, 2016, 100(1): 224.
- [16] YIN L F, CAI M L, DU S F, et al. Identification of two *Monilia* species from apricot in China[J]. Journal of integrative agriculture, 2017, 16(11): 2496-2503.
- [17] YIN L F, DU S F, CHAISIRI C, et al. Phylogenetic analysis and fungicide baseline sensitivities of *Monilia mumeicola* in China[J]. Plant disease, 2019, 103(9): 2231-2236.
- [18] YIN L F, MO W, GUO D Y, et al. First report of brown rot of *Prunus mume* caused by *Monilinia fructicola* in China[J]. Plant disease, 2020, 104(4): 1253.
- [19] YIN L F, ZHANG S Q, DU J, et al. *Monilinia fructicola* on loquat: An old pathogen invading a new host[J]. Journal of integrative agriculture, 2021, 20(7): 2009-2014.