

DOI:10.11937/bfyy.201607032

茶薪菇厚垣孢子研磨酶解纯化与显微萌发特征观察

张筱梅, 朱维红, 苗晓燕, 王蒙蒙

(保定学院 生化系, 河北 保定 071000)

摘 要:以茶薪菇 SM 菌株为试材,研究了 4 种分离纯化方法对厚垣孢子分离纯化的影响,并观察其显微萌发特征。结果表明:研磨酶解方法较好,在 1.0% 蜗牛酶和 1.0% 纤维素酶,30℃、4 h 条件下,菌丝碎片酶解消失,孢子饱满,数量达 1.9×10^5 个/mL;显微镜检发现多数厚垣孢子萌发点位于孢子侧面,萌发菌丝具锁状联合结构,萌发后原孢子的液泡体积增大,胞内充满大液泡。

关键词:茶薪菇;厚垣孢子;酶解条件;萌发位点

中图分类号:S 646.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)07-0130-04

近年来我国茶薪菇生产发展迅速但菌种退化现象日趋严重^[1-4]。常规有性孢子育种存在选种过程复杂,耗时过长,菌种不纯等难题。观察发现,茶薪菇无性繁殖可产生厚垣孢子,孢子壁厚对外界不良环境有较强抵御能力^[5-7]。课题组多年研究发现,茶薪菇厚垣孢子萌发可形成双核菌丝,进一步分化形成子实体,是育种保藏的良好材料,但成熟后厚垣孢子与菌丝连接紧密,通过一般研磨及密度梯度离心很难分离纯化,为此亟待寻找一种合适厚垣孢子分离纯化的有效方法。该研究通

过显微直接观察萌发特征,记录比较了茶薪菇厚垣孢子的 4 种分离纯化方法,确定了研磨酶解协同纯化茶薪菇厚垣孢子的优选方法,旨在为茶薪菇厚垣孢子纯化育种和生理生化及分子生物学研究提供试验参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 茶薪菇 SM 菌株由保定学院细胞实验室保藏。

1.1.2 培养基 马铃薯 10.0 g,麦麸 3.0 g,玉米粒 2.0 g,葡萄糖 2.0 g, KH_2PO_4 0.1 g, MgSO_4 0.05 g,琼脂 1.8 g^[3]。

1.1.3 菌丝培养与厚垣孢子形成 菌株活化后转平板,26℃ 恒温培养 10~15 d,当菌丝长满平板,表面开始干燥

第一作者简介:张筱梅(1957-),女,本科,教授,研究方向为食药用真菌应用。E-mail:zhxm06@163.com。

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2013104055)。

收稿日期:2015-12-15

Performance and Correlation Analysis of Main Characters of Tomato Fruit Before and After Storage

CAO Xia¹, WU Chuncheng¹, SUN Zhongfeng², MAO Xiujie¹, KUANG Yuanyuan¹, ZHENG Qian¹

(1. College of Horticulture Science and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao, Hebei 066600; 2. College of Education, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao, Hebei 066600)

Abstract: Taking nine tomato strains as material, the interrelation of physical properties and main characters during storage of tomato were studied. The results showed that the hardness was extremely significantly negative correlation with the content of soluble solid and significantly negative correlation with the decay rate; the cohesiveness was extremely significantly positive correlation with the gumminess and the chewiness, and significantly positive correlation with the springiness of fruit; the springiness was extremely significantly positive correlation with the chewiness, and extremely significantly negative correlation with the respiration; the gumminess was extremely significantly positive correlation with the chewiness, and significantly negative correlation with the decay rate. The hardness and the gumminess measured using Texture Analyzer could be used as an important indicator of resistance to storage.

Keywords: tomato; texture analyzer; hardness; gumminess; storage

颜色渐深时,镜检厚垣孢子数量,达到要求停止培养,冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 孢子分离与纯化 研磨法(CK):刮取平板菌丝于研钵中,加无菌水适度研磨 3~5 min,120 目筛过滤,1 000 r/min 离心 2 min,沉淀稀释镜检计数,观察孢子分离情况^[5]。纸过滤法:刮取菌丝研磨(方法同上)后 1~4 层擦镜纸过滤,滤液镜检计数。密度梯度离心法:刮取菌丝研磨后,0.34 mol/L 蔗糖溶液 3 000 r/min 离心 10 min,上清液 0.25 mol/L 蔗糖溶液 6 000 r/min 离心 15 min,沉淀镜检计数^[6]。研磨酶解协同法:研磨离心得到初分离厚垣孢子沉淀,稀释计数后加入复合酶(蜗牛酶:纤维素酶质量比 1:1),酶浓度 0.5%、1.0%、2.0%;酶解温度 20、30、40℃;酶解时间 1、2、3、4、5、6、16 h。酶解后 2 000 r/min 离心 2 min 洗涤 2 次,沉淀稀释后镜检计数,比较不同酶解浓度、温度和时间对茶薪菇厚垣孢子分离纯化的影响。

1.2.2 不同孢子处理与显微萌发特征观察 酶解纯化孢子稀释制成孢子液($1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/mL),经 20 h 不同处理后镜检观察厚垣孢子萌发形态,芽管着生位置,锁状联合结构,液泡形态大小及原生质浓密等情况,计算厚垣孢子萌发率(10 个随机视野的平均萌发数)。温度处理:孢子液分别于 22、25、35、40、55℃ 处理 6 h,25℃ 再保温 14 h。酸碱处理:制成 pH 3~11 的孢子液,25℃ 处理 20 h 后,每 5 h 观察记录。

2 结果与分析

2.1 厚垣孢子分离纯化方法比较

表 1 表明,研磨酶解纯化效果最好,多次镜检未见菌丝碎片,孢子饱满数量较多,为 1.9×10^5 个/mL;过滤及密度离心效果较好,菌丝碎片明显减少,但 2 种方法的孢子数量及饱满度明显下降,其中过滤法的 2 层纸过滤,孢子数量减至 2.1×10^5 个/mL,4 层纸降至 0.3×10^5 个/mL,表明随纸层数增加,菌丝及孢子数均减少,

表 1 厚垣孢子纯化方法的比较

Table 1 Comparison of chlamydospore purification methods

分离方法 Separation method	孢子数 Number of spores /(个·mL ⁻¹)	菌丝碎片 Hyphal fragments	孢子饱满度 Plumpness of spore
研磨(CK) Grinding(CK)	3.5×10^5	+++++	+++
过滤 Filter	0.7×10^5	++	++
密度离心 Density centrifugation	1.5×10^5	++	++
酶解 Enzymatic decomposition	1.9×10^5	—	+++

注:3 层纸过滤,+++孢子饱满,一无菌丝碎片,++有菌丝碎片,+++++菌丝碎片很多。

Note:Filtered by 3 layers of paper;+++ full of spore;— no hyphal fragments;++ some hyphal fragments;+++++ lots of hyphal fragments.

4 层过滤后,菌丝片段基本去除,孢子数下降 11.7 倍,大多数孢子流失,不利于后续试验进行;研磨效果最差,孢子数量虽多, 3.5×10^5 个/mL,但夹杂大量菌丝及细小菌丝片段,与孢子交织在一起,不能达到纯化目的。

2.2 酶解条件对厚垣孢子纯化的影响

2.2.1 酶液浓度对厚垣孢子纯化的影响 由图 1 可以看出,30℃ 酶解 4 h 条件下,随酶浓度增加,菌丝碎片逐渐消失,孢子数减少;0.5% 酶浓度处理下孢子数 2.85×10^5 个/mL,菌丝碎片较多,1.0%~2.0% 酶解处理菌丝消失,但孢子数下降明显,其中 1.0% 处理孢子数 1.52×10^5 个/mL,2.0% 处理仅 0.35×10^5 个/mL。综合比较以 1.0% 酶液浓度纯化厚垣孢子比较有利。

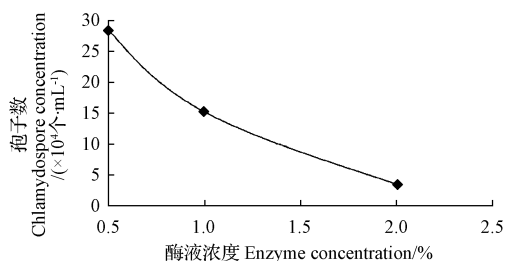


图 1 酶液浓度对厚垣孢子数的影响

Fig. 1 Effect of enzyme concentration on chlamydospore concentration

2.2.2 酶解温度对厚垣孢子纯化的影响 试验表明,1.0% 复合酶 30℃ 酶解 4 h 效果较好,菌丝碎片消失,厚垣孢子数 0.95×10^5 个/mL;20℃ 时厚垣孢子较多,菌丝碎片亦多;40℃ 厚垣孢子数多,达 2.1×10^5 个/mL(图 2),菌丝碎片亦多,表明 30℃ 酶活最高,20℃ 酶活较低,40℃ 酶活明显下降。

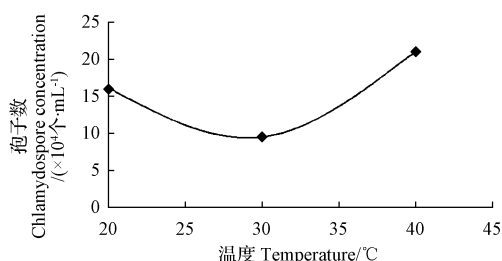


图 2 酶解温度对厚垣孢子数的影响

Fig. 2 Effect of enzymolysis temperature on chlamydospore concentration

2.2.3 酶解时间对厚垣孢子纯化的影响 随酶解时间延长菌丝碎片量逐渐下降,孢子数亦减少。酶解 1~2 h 孢子数较多, $1.8 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个/mL,菌丝碎片多,观察可知,有些菌丝与孢子相连;4 h 酶解处理孢子数 0.95×10^5 个/mL,菌丝碎片消失,孢子纯化效果最好;

5~6 h 孢子数有所减少,无菌丝片段;处理 16 h 仍可见孢子,但数量较 4 h 下降 6.8 倍(图 3),分析认为随酶解时间延长,孢子被酶解数量减少,同时酶活逐渐消失,残存少量孢子。

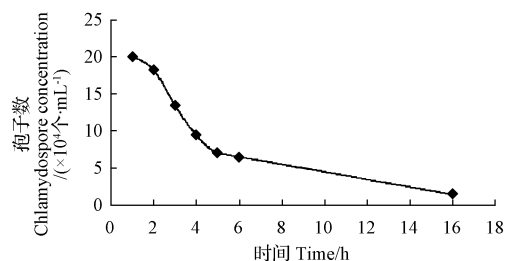


图 3 酶解时间对厚垣孢子数的影响

Fig. 3 Effect of hydrolysis time on chlamydospore concentration

2.3 厚垣孢子萌发特征观察

2.3.1 孢子萌发形态结构观察 显微镜下茶薪菇厚垣孢子多呈液滴状或梨形,处理后一般 12 h 开始萌发。不同处理茶薪菇厚垣孢子萌发的基本特征差异不大,多数萌发点位于孢子侧面,少数位于孢子与菌丝断裂处,未见孢子顶部发芽。镜下可见萌发芽管的锁状联合结构,表明萌发细胞为双核菌丝(图 4)。不同处理的孢子萌发时间及萌发率有所不同,25℃ pH 7.0~7.5 萌发率高,35~40℃ pH 9.5~11.0 处理芽管原生质浓度增加,分布不均,表明高温、碱性环境对茶薪菇厚垣孢子萌发有一定作用。观察发现,萌发前孢子内有一些明显小液泡,萌发后胞内产生较大液泡,甚至充满原孢子细胞,说明液泡对孢子萌发、细胞生长有重要作用,认为通过液泡吸水膨胀作用,可将孢内原生质成分顶入新生芽管内,完成孢子萌发生长过程(图 5)。

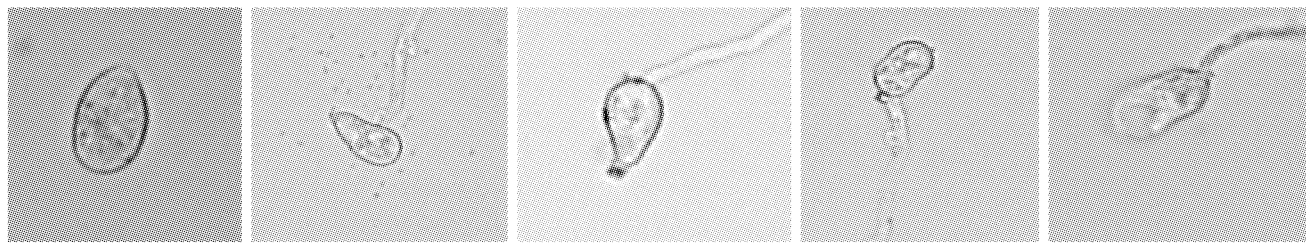


图 4 茶薪菇厚垣孢子萌发中液泡变化

Fig. 4 The vacuoles changes on chlamydospore germination of *Agrocybe chaxingyu*

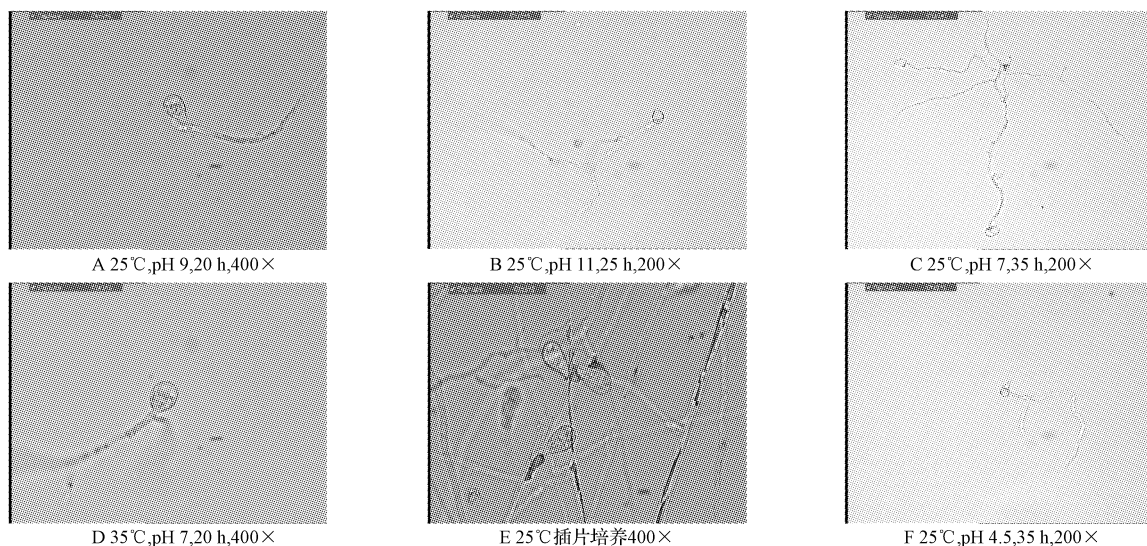


图 5 茶薪菇厚垣孢子萌发特征

Fig. 5 Characteristic of chlamydospore germination of *Agrocybe chaxingyu*

2.3.2 温度对厚垣孢子萌发的影响 观察发现,纯化后不同温度处理的孢子萌发有所差异,其中 22~25℃ 随温度增加萌发率升高,25℃ 最高达 39.4%,25~55℃ 随着温度增加萌发率逐渐下降,55℃ 处理未见萌发(图 6),可

能是高温超出孢子耐受温度导致死亡。此外,酶解后茶薪菇厚垣孢子萌发率有所增加,较对照增加 1.2%~6.4%,可能与酶解后孢子壁变薄有一定关系。

2.3.3 pH 值对厚垣孢子萌发的影响 多次试验表明,

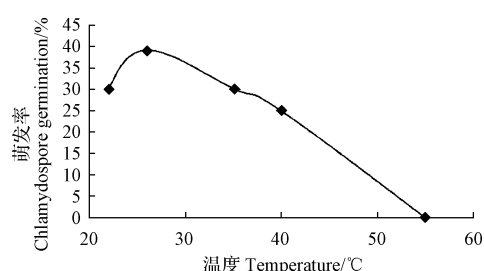


图6 温度对厚垣孢子萌发的影响

Fig. 6 Effect of temperature on chlamydospore germination

pH 7.0~9.0 处理效果好,萌发率 59.1%~64.7%;pH 3.0 孢子未萌发,pH 3.0~7.0 随着 pH 增加萌发率升高,pH 9.0~11.0 随着 pH 增加萌发率降低(图 7),表明偏碱性条件适于孢子萌发,偏酸性环境不适宜其萌发。

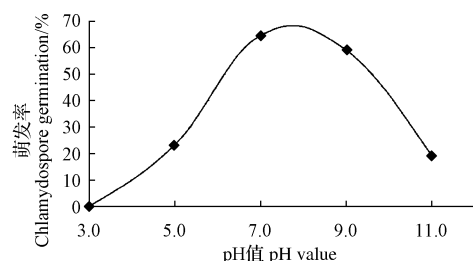


图7 pH 值对厚垣孢子萌发的影响

Fig. 7 Effect of pH value on chlamydospore germination

3 结论与讨论

目前有关厚垣孢子及其分离纯化的研究较少,谢宝贵等^[6]在草菇厚垣孢子研究中采用菌丝研磨 20%~60%蔗糖密度离心,分离孢子达到纯化效果。试验发现该法不适宜纯化茶薪菇厚垣孢子,因为研磨密度离心后依然残留较多细小菌丝片段,影响厚垣孢子分离纯度。

研磨酶解纯化厚垣孢子以 1%纤维素酶与 1%蜗牛酶(1:1),30℃酶解 4 h 效果较好,该法简单有效,孢子萌发快,纯度高数量较多,是茶薪菇厚垣孢子分离纯化的优选方法,但酶解纯化用时较长,费用增加,有待于进一步摸索改进。

参考文献

- [1] 袁广峰,徐瑞雅,张树斌,等. 茶薪菇培养物中粗三萜含量测定及抗氧化抗肿瘤活性研究[J]. 食用菌学报,2007,14(2):45-47.
- [2] 郑毅,余望,施巧琴,等. 茶薪菇人工栽培及营养成分分析[J]. 中国食用菌,1999,18(5):13-14.
- [3] 张筱梅,张焕英,张渊,等. 茶薪菇多孢快速育种简报[J]. 中国食用菌,2008,27(3):14-16.
- [4] 欧阳小丽,张晓昱,王宏勋. 茶薪菇菌丝体多糖提取方法的研究[J]. 中国食用菌,2003,23(5):35-36.
- [5] 张筱梅,张焕英,张渊. 猴头菌单核菌丝厚垣孢子的观察[J]. 菌物系统,2003,22(3):436-440.
- [6] 谢宝贵,江玉姬,刘文金,等. 草菇厚垣孢子研究[J]. 食用菌学报,1996,3(4):27-31.
- [7] 张静峰,朱坚. 草菇厚垣孢子的研究[J]. 中国食用菌,2003,23(1):13-14.

Grinding Enzymolysis Purification and Microscopic Observation of Germination Characteristics on Chlamydospore of *Agrocybe chaxingu*

ZHANG Xiaomei, ZHU Weihong, MIAO Xiaoyan, WANG Mengmeng
(Department of Biochemistry, Baoding University, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: With SM strain of *Agrocybe chaxingu* as the experimental material, by comparative studies of four separation methods and purification of *Agrocybe chaxingu* chlamydospore were conducted and its germination characteristics were observed. The results showed that the grinding enzymolysis method yielded better results under the condition of 1.0% snailase, 1.0% cellulase, 30℃ and 4 hours, the hyphal fragments enzymatically decomposed and disappeared, and the spores appeared plumpy with concentration up to 1.9×10^5 /mL. Microscopic observations results found that the most chlamydospore germination happened on the flanks of the spore, and mycelium germinated with joint structures in lock shapes. The volumes of the spore vacuoles increased since germination while the spores were filled with large vacuoles.

Keywords: *Agrocybe chaxingu*; chlamydospore; enzymolysis conditions; germination position