

环境条件对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

张 渊, 张筱梅, 朱维红, 张翠娜

(保定学院 生化系, 河北 保定 071000)

摘 要:以采用研磨加酶解的方法提纯的茶薪菇厚垣孢子为试材,研究了环境条件对厚垣孢子萌发的影响。结果表明:茶薪菇厚垣孢子萌发的最佳温度为 25℃,最适 pH 为 7.5;光线对厚垣孢子的萌发有显著抑制作用,培养基成分对孢子的萌发率无明显影响。

关键词:茶薪菇;厚垣孢子;萌发条件;影响因素

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0146-03

菌种保藏不当是引起食用菌菌种退化的重要原因之一,许多食用菌的菌丝体不适于在冰箱中保存,而在常温下保藏,种性退化速度较快。厚垣孢子是担子菌中常见的一种无性孢子,对干燥、寒冷等不良环境有较强的抵抗能力。据谢宝贵等^[1]报道,在 4℃下,草菇厚垣孢子保藏 14 d 后,萌发率没有下降。所以用厚垣孢子保存菌种是克服多核化菌丝连续转管传代,减慢生长时间避免累加菌龄而引起菌种老化变性的有效手段^[2]。另外,厚垣孢子作为食用菌无性繁殖的方式之一,可保持原菌株的遗传特性,因此也是菌种复壮、诱变育种、转基因育种的好材料。

目前对担子菌厚垣孢子的研究报道很少,张筱梅等^[3]、林梦藻^[4]分别对猴头菇和草菇的厚垣孢子做了细胞学和形态学观察;张静峰等^[5]研究了不同的 C/N 比对草菇厚垣孢子形成的影响,但对茶薪菇厚垣孢子的研究尚鲜见报道。现以茶薪菇厚垣孢子为试材,初步研究了环境条件对厚垣孢子萌发的影响,以期为厚垣孢子进一步的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试茶薪菇引自河北省微生物研究所。

斜面培养基(PDA):马铃薯 20%、葡萄糖 2%、琼脂 1.8%、水 1 000 mL。液体培养基:马铃薯 20%、葡萄糖 2%、水 1 000 mL。CM 培养基:葡萄糖 2%、蛋白胨 0.5%、

MgSO₄ 0.05%、K₂HPO₄ 0.1%、KH₂PO₄ 0.046%、琼脂 1.8%、水 1 000 mL。WA 培养基:琼脂 2%、水 1 000 mL。

酶解液:纤维素酶与蜗牛酶按 1:1 配比溶于蒸馏水,浓度各为 1%。经微孔滤膜过滤除菌后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝体的培养 刮取茶薪菇斜面菌丝放入盛有 20 mL 液体培养基的小三角瓶中,28℃条件下静置培养数天,待表面长满白色菌丝即可。

1.2.2 厚垣孢子的提取 取培养好的茶薪菇菌丝体加少量无菌水于研钵中研碎,80 目钢筛过滤后收集滤液于离心管中离心,弃上清液后称重,按比例加入细胞壁酶解液于 30℃下酶解,以破坏与厚垣孢子连在一起的菌丝体,4 h 后,酶解完毕,用擦镜纸过滤,以除去残留菌丝。滤液离心后弃上清液收集沉淀,加无菌水再次离心,得到纯化的厚垣孢子,加适量无菌水后用血球计数板计数厚垣孢子产量。稀释到 10³ 个/mL 后涂布平板。

1.2.3 厚垣孢子的萌发处理 设置 pH 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5 六个梯度,将厚垣孢子涂布于不同 pH 的 PDA 平板上培养。将厚垣孢子分别涂布于 PDA、CM 和 WA 3 种培养基平板上培养。将涂布好厚垣孢子的 PDA 平板分别置于连续光照、12 h 光暗交替、连续黑暗的恒温光照箱中培养。将涂布好厚垣孢子的 PDA 平板分别置于 18、20、23、25、28、30、32℃条件下培养。每处理 3 次重复,除温度试验外,其它处理培养温度均为 28℃,测定各处理厚垣孢子的萌发率和萌发天数。

1.2.4 厚垣孢子萌发率的计算 将涂布好厚垣孢子的培养基平板置于 28℃培养箱中培养数天,待菌落萌发后计数萌发菌落。厚垣孢子萌发率(%)=平板萌发菌落数/平板涂布的厚垣孢子数目×100%。

2 结果与分析

2.1 茶薪菇厚垣孢子的纯化

显微观察表明,茶薪菇的厚垣孢子多呈水滴形或椭

第一作者简介:张渊(1968-),女,硕士,副教授,现主要从事微生物育种与应用等研究工作。

责任作者:张筱梅(1957-),女,教授,研究方向为微生物及细胞学。

基金项目:河北省科技厅自然科学基金资助项目(C2013104055);

河北省科技厅科技规划资助项目(12236308);河北省教育厅资助

项目(Z2011106)。

收稿日期:2014-04-21

圆形,有些是由菌丝顶端或中部细胞膨大形成,也有通过菌丝体短小的侧枝膨大而成(图1)。厚垣孢子与菌丝细胞混杂连接在一起,需要首先对其提纯。对于厚垣孢子纯化的方法鲜有报道,该试验尝试了已报道过的方法,但效果均不理想,仍有菌丝细胞和厚垣孢子混在一起,该试验在研磨法的基础上利用细胞壁酶进一步破坏菌丝细胞,经酶解4 h后再用擦镜纸过滤,可得到纯化的厚垣孢子。

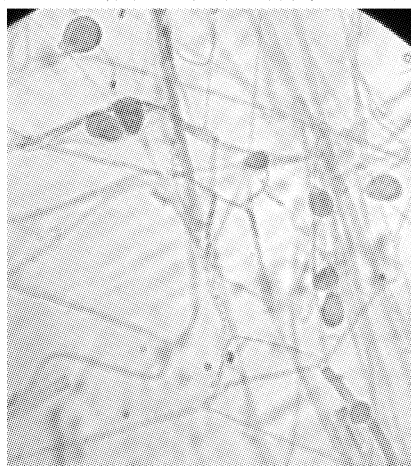


图1 茶薪菇厚垣孢子

Fig. 1 Chlamydospore of *Agroclybe chaxingu*

2.2 pH 值对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

由表1可以看出,pH 值对茶薪菇厚垣孢子的萌发有较明显的影响,在 pH 3.5~8.5 的范围内厚垣孢子均可萌发,但以 pH 7.5 的培养基上生长最好,萌发时间最早,仅3 d 平板即可见零星的萌点,之后菌丝长势旺盛,密度大,颜色洁白(图2),萌发率达到14.6%,pH 的升高或降低,孢子萌发时间逐渐延长,萌发率下降。pH 3.5 时已经明显抑制孢子的萌发,9 d 时才露出萌发菌落,萌发率只有9.2%,而且长势较弱,从菌落可见到露

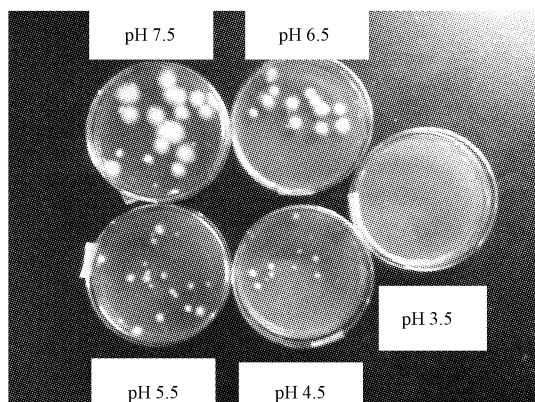


图2 pH 值对厚垣孢子萌发的影响

Fig. 2 Effect of pH on chlamydospore germination of *Agroclybe chaxingu*

出气生菌丝需要3~4 d 时间。以上试验结果表明,茶薪菇厚垣孢子最适生长 pH 为7.5。

表1 pH 值对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

Table 1 Effect of pH value on chlamydospore germination of *Agroclybe chaxingu*

pH 值 pH value	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5
最早萌发时间 The earliest germination time/d	9	5	4	4	3	4
萌发率 Germination rate/%	9.2	10.2	10.4	12.6	14.6	13.0
菌丝长势 Growth of mycelium	+	++	+++	++++	+++++	++++

2.3 温度对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

从表2可以看出,茶薪菇厚垣孢子在20~28℃范围内均可正常萌发,在28℃下萌发时间最早,4 d 菌落可见,但萌发率略低于25℃处理;在温度20~25℃条件下孢子的萌发率无明显差别,但以25℃处理下菌丝长势最好。18℃时孢子萌发时间显著受到抑制,9 d 才可见萌发菌落,且生长缓慢,萌发率则未受显著影响。而在30、32℃条件下厚垣孢子未萌发(涂布9 d 时观察),说明温度低于20℃或高于30℃时均不适于茶薪菇厚垣孢子的萌发。将孢子未萌发的平板重新置于28℃条件下培养,经6 d 后重新可见萌发菌落,与萌发率其它温度处理相比亦未受明显影响。试验结果表明茶薪菇厚垣孢子最适生长温度为25℃,在30℃以上条件的平皿培养下不萌发,但在32℃时仍能保持活力,当温度适宜时,恢复一定时间后仍可重新萌发。课题组在凹玻片中观察厚垣孢子时,发现在40℃条件下仍可萌发,由此也说明厚垣孢子对不适环境具有较强的抗逆性,可应用于菌种保藏。

表2 温度对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

Table 2 Effect of temperature on chlamydospore germination of *Agroclybe chaxingu*

温度 Temperature/℃	18	20	23	25	28	30	32
最早萌发时间 The earliest germination time/d	9	6	5	5	4	—	—
萌发率 Germination rate/%	14.5	15.1	15.0	15.4	12.8	12.5 (恢复萌 发后)	12.0 (恢复萌 发后)
菌丝长势 Growth of mycelium	+	++	+++	++++	++++	++	++

2.4 光线对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

由表3可知,光线对茶薪菇厚垣孢子有较明显的抑制作用,厚垣孢子涂布9 d 后观察,在80%光强度连续光照条件下,厚垣孢子始终没有萌发,连续黑暗条件下厚垣孢子可正常萌发,其萌发天数和萌发率未受影响,在12 h 光照和黑暗交替处理的条件下,厚垣孢子可萌发,萌发时间晚于黑暗处理3 d,萌发率也较低。说明该处

理在光照条件下孢子萌发受到抑制,而在黑暗条件下恢复正常,因此其萌发时间和萌发率受到一定影响。

表 3 光线对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

Table 3 Effect of light on chlamydospore germination of *Agrocybe chaxingu*

处理 Treatment	连续光照 Continuous light	12 h 光、暗交替 12 hour alternating light and dark	连续黑暗 Continuous darkness
最早萌发时间 The earliest germination time/d	—	7	4
萌发率 Germination rate/%	0	8	15.2
菌丝长势 Growth of mycelium	—	+	+++

2.5 培养基对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

由表 4 可知,厚垣孢子在 3 种培养基下的萌发率没有明显差别,其中未添加其它营养成分的琼脂培养基(WA)萌发率达到 18.0%,说明单纯就孢子萌发而言对培养基的营养成分要求不高,但萌发速度会受培养基成分的影响,WA 培养基较 CM 和 PDA 晚萌发 1 d。此外培养基对孢子萌发后的菌落形态和菌丝长势也有较明显的影响,PDA 培养基上形成的菌落外缘明显、长势旺盛、气生菌丝发达、浓密、颜色洁白,而 CM 培养基上萌发菌落无明显外缘,彼此之间长成一片,颜色乌白,菌丝

表 4 培养基对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响

Table 4 Effect of culture medium on chlamydospore germination of *Agrocybe chaxingu*

处理 Treatment	PDA	CM	WA
最早萌发时间 The earliest germination time/d	5	5	6
萌发率 Germination rate/%	16.8	18.0	18.5
菌丝长势 Growth of mycelium	+++	+	+

沿培养基表面呈匍匐状延伸,气生菌丝不发达,且长势弱,密度稀疏,WA 培养基上孢子萌发后菌落外缘明显,但长势也较弱,密度低,菌丝呈匍匐生长(图 3)。

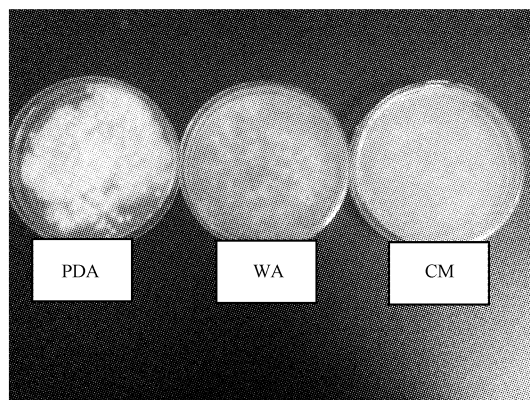


图 3 培养基对茶薪菇厚垣孢子萌发菌丝的影响

Fig. 3 Effect of culture medium on mycelium of chlamydospore germination of *Agrocybe chaxingu*

3 结论

在食用菌生产栽培过程中,菌种退化现象十分普遍,厚垣孢子作为担子菌无性繁殖的方式之一,因其较好的抗逆性,可用于菌种的保藏,同时也可作为菌种选育和复壮的好材料。该试验结果表明,茶薪菇厚垣孢子最佳萌发温度为 25℃,最适 pH 为 7.5 左右,光线对孢子的萌发具有明显抑制效果,培养基成分对孢子的萌发率无显著影响。

参考文献

- [1] 谢宝贵,江玉姬,刘文金,等. 草菇厚垣孢子的研究[J]. 食用菌学报, 1996, 3(4): 25-29.
- [2] 林杰. 草菇厚垣孢子的生物学特性[J]. 生物学通报, 1992(2): 25.
- [3] 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(3): 436-440.
- [4] 林梦藻. 草菇厚垣孢子细胞学观察[J]. 食用菌, 1991(1): 43.
- [5] 张静峰,朱坚. 草菇厚垣孢子的研究[J]. 中国食用菌, 2004(3): 436-440.

Effect of Environment Conditions on Chlamydospore Germination of *Agrocybe chaxingu*

ZHANG Yuan, ZHANG Xiao-mei, ZHU Wei-hong, ZHANG Cui-na
(Department of Biochemistry, Baoding University, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: Taking the chlamydospore of *Agrocybe chaxingu* by grinding and enzyme decomposition method, the effect of environment condition factor on chlamydospore germination of *Agrocybe chaxingu* was studied. The results showed that the optimum temperature for germination was 25℃, the optimum pH value was 7.5, light could significantly inhibit the germination of chlamydospore, and the culture medium composition had no significant effect on the germination rate of chlamydospore.

Key words: *Agrocybe chaxingu*; chlamydospore; germination condition; influencing factor