

实用

真菌生理学

P.M. 罗宾逊 著〔英〕

PRACTICAL
FUNGAL
PHYSIOLOGY

贵州人民出版社

0.32

责任编辑 方 爽

封面设计 胡朝惠

技术设计 夏顺利

实验真菌生理学

英J.P.M. 罗宾逊 著

Copyright © 1978 by John Wiley & Sons Ltd.

梁宗琦 刘爱英 译

李永顺 周 建 译

贵州人民出版社出版发行

(贵阳市延安中路9号)

贵州新华印刷厂排版

江西修水印刷厂印刷

贵州省新华书店经销

787×1092毫米 32开本 5.5印张 120千字

1988年5月第1版 1988年5月第1次印刷

印数1—2,000

书号 13115·77定价: 1.80元

ISBN 7-221-00595-8/Q.07

内 容 简 介

本书是一本介绍真菌生理学实验的工具书。书中较系统地介绍了丝状真菌从孢子萌发,菌丝生长,直至最后形成典型菌落的生长发育过程。对此过程每阶段的各实验都有详细的操作说明。此外,本书还包括了与普通真菌有关的其它内容:真菌的繁殖,真菌的营养,真菌产生的形态发生物质,老化和菌落形态学,抑菌作用和连续培养等。书中的大部分实验以操作流程图表形式列出,有关的其它知识和注意事项则用简明的文字加以叙述。绝大多数的实验皆不需要精密和昂贵的仪器设备。

本书可供大专院校有关专业的师生以及其它从事真菌科研和生产的工作者参考。



前 言

真菌作为实验材料一直未被充分利用。不少真菌生长迅速，为此可借助它们快速地进行实验。作为生理学研究的材料，真菌优于很多高等植物。本书所选用的真菌，是那些易于培养和研究的菌类。除真菌的恒化培养实验外，其余实验都不需要精密的仪器和设备。

此书可作大学的真菌学实验课教材。其中一些实验也适用于有关中级学校高年级学生选作。

我要感谢 Queen's 大学植物系的同事们在我准备写此书期间的大力支持，我也要感谢那些允许我复制过去出版的资料的杂志和出版者。我特别要感谢 David Park 对我的鼓励和对原稿的批评指正。此外，本书的有些实验尚涉及一些没有解答的问题。希望读者在进行实验过程中对所观察到的结果提出自己的看法。

P. M. 罗宾逊

于 Belfast, 1978.

译 者 的 话

本书是一本实用的工具书。书中较系统地介绍了真菌从孢子萌发直至菌落形成,以及相关的营养、繁殖、形态发生和老化等生理学方面的基础实验。特别可贵的是,这些实验一般都不需要精密的仪器和昂贵的设备,因而有较大的适用范围和实用价值。为此,我们将其译出奉献给广大读者。

本书第一、四、五、六、九各章及附录由梁宗琦译;第二章及全部线条图复制由刘爱英负责;第七和第八章由李永顺译;第三章由周建译。各章译稿皆经集体校审并最后由梁宗琦统一整理定稿。

译 者

1985年于贵阳花溪

目 录

前言

第一章 孢子萌发..... (1)

第一节 萌发过程..... (1)

第二节 孢子聚集数量对萌发时程的影响..... (7)

第三节 孢子萌发的自身抑制..... (10)

第四节 萌发孢子的向自性..... (17)

第五节 趋氧性..... (21)

第二章 菌丝生长..... (25)

第一节 生长时程..... (29)

第二节 菌丝生长的抑制..... (33)

第三节 菌丝生长的机制..... (35)

第四节 菌丝的形态发生..... (38)

第五节 切割的菌丝段..... (40)

第六节 菌丝对营养的向性..... (43)

第七节 菌丝对氧的向性..... (46)

第三章 菌落形成..... (50)

第一节 菌落形成的形态学..... (52)

第二节 营养对菌落形态的影响..... (54)

第三节 离心生长机理及菌落形成模式..... (59)

第四节 隐蔽生长..... (66)

第五节 阶段转化..... (69)

第四章 真菌的繁殖..... (73)

第一节 藻状菌纲..... (77)

第二节 子囊菌纲..... (84)

第三节 担子菌纲..... (94)

第四节 不完全菌类..... (97)

第五章 真菌的营养..... (107)

第六章 真菌产生的形态发生物质..... (113)

第七章 老化及菌落形态学..... (119)

第八章 抑菌作用..... (130)

第九章 连续培养..... (136)

参考文献

附录

缩写..... (158)

实验用真菌..... (159)

实验用细菌..... (161)

实验室技术..... (162)

菌种保藏单位..... (163)

结果处理..... (165)

第一章 孢子萌发

第一节 萌发过程

真菌孢子阶段与营养阶段的一个一般区别特征是成熟菌丝的代谢活性比孢子高。休眠孢子进行呼吸，开始萌发的孢子通常可通过氧消耗量的增加而测定。孢子形成期间贮存了供活细胞基础代谢的物质，但由于含水量低，故只能以最低的速率进行代谢。

当供给适宜的营养物时，大多数真菌的孢子很快萌发。孢子萌发通常需要碳源、氮源以及适宜的温度和 pH 值。孢子萌发最明显的标志是大小增加，易为细胞质染色剂着色。其原因可能是由于通透性增强。液泡出现在孢子的原生质中。一些真菌的芽管可从孢子表面的任一处发出，但另一些则只能从某一或某些特定部位发出。这些部位通常叫做芽孔。

孢子萌发的前期已用少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*) 的孢子囊孢子作了研究 (Ekundayo 和 Carlile, 1964; Ekundayo, 1966)。孢子直径的增加与时间呈线性关系，它的体积比芽管出现前增大 20 倍。此外，虽然一些真菌的膨大程度有明显差异，但结果仍相似，实验操作流程图中列出了研

究少根根霉吸收染料和孢子膨大实验的步骤。典型的实验结果见图1。在一小时内大约90%的孢子囊孢子被美兰染色，再过一小时孢子开始萌发。这个实验还可以半小时左右的间隔测定孢子的直径。它的平均直径随时间增加呈直线上升。进行这些实验时应特别注意孢子囊孢子膨大时的形状有无变化。当它具有特殊形状时，一个着色的孢子囊孢子的细胞形状与通透性改变有相关性吗？那些不膨大不被染色的孢子囊孢子的特征是什么？

电镜观察多种真菌萌发的孢子表明，孢子膨大期间在原孢子壁内形成一层或几层新壁。葡枝根霉 (*Rhizopus stolonifer*) 和有性根霉 (*R. sexualis*) (Hawker和Abbott, 1968)，雅致小克银汉霉，(*Cunninghamella elegans*) (Hawker et al., 1970)，刺胞小克银汉霉 (*Cunninghamella echinulata*) (Khan, 1975) 和灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) (Gull和Trinci, 1971) 等新细胞壁的形成已有报道。灰葡萄孢在孢子萌发前形成三层新细胞壁。

实验操作流程图1. 少根根霉孢子囊孢子对美兰的吸收

接种少根根霉孢子囊孢子于麦芽琼脂斜面上，25℃培养6天。

加5ml 无菌蒸馏水于斜面上，轻摇10秒钟，将孢子悬液倾入一无菌的麦氏瓶中。(Mc Cartney bottle)。用力振荡孢子悬液使孢子分散。

用接种环挑取孢子悬液于S琼脂平板上的赛璐芬玻璃纸

片上，涂布均匀。 25°C 培养，每隔半小时取出玻璃纸片于美兰水溶液中（1%（W/V））染色5分钟。镜检观察孢子的膨大、对染料的吸收和孢子萌发。

注：

1.培养基制备。麦芽琼脂培养基：麦芽浸出物，30g；琼脂，12g（或按厂家建议）；加入蒸馏水至1,000ml。S琼脂培养基：葡萄糖，0.7g； $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.5g； KH_2PO_4 ，0.2g； NH_4NO_3 ，0.1g；琼脂12g；加蒸馏水至1,000ml。15磅灭菌15分钟，而后倾10—15ml于灭菌的培养皿（塑料或玻璃）中。

2.可使用PT300赛璐芬玻璃纸（英国赛璐芬公司）。将玻璃纸剪成约 2cm^2 的小方块，于蒸馏水中煮沸1分钟。移这些玻璃纸于一装有新鲜蒸馏水的结晶皿中，15磅高压灭菌15分钟备用。

3.如果需要，用目测微尺测量25个孢子的直径（见实验操作流程 图8）。记载100个孢子的萌发和对美兰的吸收。

4.常见的玻璃容器（容量28ml）可代替麦氏玻璃瓶。这两种容器都要有橡皮垫的铝质螺旋盖，并可高压灭菌。普通的玻璃瓶颈比麦氏瓶大，故使用更方便，特别在以后需用吸管稀释的实验中更是如此。

研究孢子萌发过程多用那些孢子大且萌发快的真菌。如雅致小克银汉霉和白地霉（*Geotrichum candidum*）就是两种这样的真菌。前者的孢子囊孢子球形并有长的细刺，而后者的节孢子主要是两端凸圆的圆筒状至柱状。雅致小克银汉霉的孢子囊孢子萌发形成一个或数个芽管。这些芽管刚发出时，由于被孢子外壁上的细刺包围，所以有时难以看见。白

地霉的节孢子萌发时，从柱状孢子的一端发出一个芽管，稍后可出现第二个芽管。

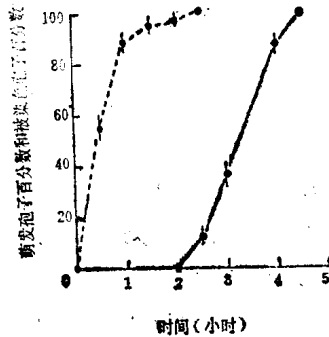


图1.在S琼脂上25℃少根根霉的孢子囊孢子
对美兰的吸收(……)。萌发时程(——)。
图上每点记载了250个孢子。点上的垂
直线代表该数值的95%置信界。

在实验操作流程图2中介绍了研究以下两种真菌孢子萌发时程的步骤，它们典型的萌发时程曲线见图2。实验操作流程图2中的方法可作如下更改，将孢子涂布于平板上，用同一平板在适当的时间进行观察。这种方法可以获得满意的效果。由于记载需要，平板要在较低温度下放置，因而萌发率可能下降。另一实验方法是涂布平板后，于一定间隔时间移出带有孢子的琼脂小块进行观察。

这两种真菌的孢子萌发时程也可用液体培养基测定。用10ml无茵的麦芽汁从一支麦芽琼脂上洗下孢子，而后倾入一个具棉塞的100ml三角瓶中。放入30℃水浴中轻轻振摇，

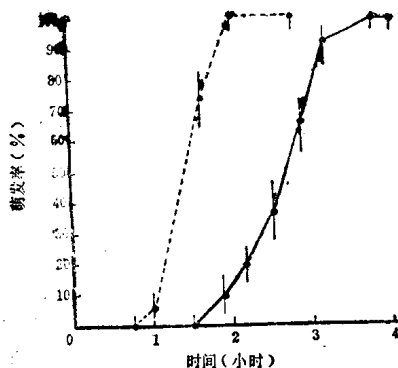


图2 雅致小克银汉霉 (.....) 的孢子囊孢子和白地霉 (——) 的节孢子在S琼脂上, 20℃的萌发时程。图上每点是100个孢子的萌发数, 点上的垂直线代表该数值的95%置信界。

间隔取出一滴孢子液于载片上, 盖上盖玻片后用20×的接物镜观察记载孢子萌发数。

实验操作流程 图2 雅致小克银汉霉和白地霉的孢子萌发时程

将每种真菌接种一支麦芽琼脂斜面, 25℃培养3天, 斜面长满孢子后备用。

白地霉

加10ml 无菌蒸馏水于斜面上, 轻轻振荡10秒钟, 将孢

雅致小克银汉霉

加4ml 无菌蒸馏水于斜面上, 用力振荡30秒, 将孢子悬液

子悬液倾入一无菌的麦氏瓶中。在6个S琼脂平板上分别划线接种一菌环孢子液，或滴加0.2ml孢子悬液并均匀涂布。

平板于30℃培养。1.5小时后进行观察。记载100个孢子的萌发数。再过0.25小时取另一平板观察记载。以0.25小时的间隔继续取新的平板观察记载孢子萌发数。将结果作图。

倾入一无菌的麦氏瓶中，用力振荡1分钟。在6个S琼脂平板上分别划线接种一菌环孢子悬液或滴加0.2ml孢子悬液并均匀涂布。

平板于30℃培养。0.75小时后观察一个平板，记载1,000个孢子的萌发数。再过0.25小时取另一平板观察记载孢子萌发数。以0.25小时的间隔继续取平板观察记载萌发孢子。将结果作图。

注：

1. 最好用20×的接物镜观察记载孢子萌发。为避免接物镜前透镜蒙上水气，可在欲观察的平板部位盖上一块盖玻片。

2. 只记载那些互不接触孢子的萌发，即不记载那些成团的孢子。

3. 注意！记载孢子萌发时不可带倾向性。为此可使用目镜测微尺，这样就可记载一定小格中的孢子而避免重数。

4. 每处理观察记载小于100个孢子也可获得理想的结果，但不能少于50个孢子。

5. 麦芽培养液：成分与麦芽琼脂相同（见实验操作流程图1），但不加琼脂。其它培养基见实验操作流程图1。

6. 平板在接种前先于35℃保温24小时，这样接种涂布孢子悬液的效果更好。其原因是悬浮孢子的水被快速吸收，观察时可避免孢子移动。

第二节 孢子聚集数量对 萌发时程的影响

孢子能以不同的方式相互作用，所以当—个孢子与其相邻的孢子分开时就有不同的反应，其中之一就是萌发时程的差异。这种差异可用白地霉按实验操作流程图 2 的步骤进行研究。记载孢子萌发时，既数 100 个互不接触的单个节孢子的萌发数，也数 100 对两两连接但与其它节孢子相分离的成对节孢子的萌发数。作此实验白地霉是一种很方便的微生物，因它的节孢子成链，即使涂平板时仍可相互连接。将结果作图。

在此实验中出现的—问题之一是，在每一选定的时间内要记载如此大量节孢子的时间问题。在记载的时间内节孢子仍可继续萌发，这就会加大处理中孢子萌发的百分数。有几种方法可克服这种误差。学生每两人—组，—个记载单个分离的节孢子萌发数，另—人则同时记载成对节孢子的萌发数。另—种办法是，记载前将平板翻转，滴加—小滴 (0.2ml) 适当稀释度的正丙醇于皿盖上，这样就会将节孢子和它的芽体杀死。

单节孢子和成对双节孢子萌发的典型时程曲线见图 3。在此实验中，—般成对节孢子比单节孢子萌发的速度更快。这种刺激孢子萌发的作用主要是在节孢子萌发时程曲线的前期。有时单节孢子和成对节孢子的萌发时程并无差异，但从

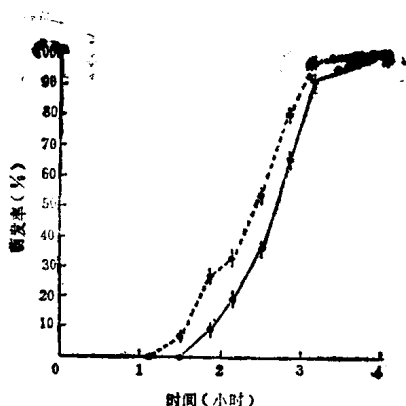


图3 白地霉单节孢子(——)和成对双节孢子(……)在S琼脂上30℃的萌发时程。图中每一点为1,000个节孢子的统计数。单节孢子与它相邻的孢子至少相距一个孢子长度。成对节孢子是选那些以一端相连并与其它节孢子至少相距一个孢子长度的双孢子。每点上的垂直线段是表示该值的95%置信界。

未见单节孢子比成对节孢子萌发得更快。

解释这些结果的最简单假说之一是：节孢子产生一种或多种代谢产物。这类物质能刺激促使芽管发出各过程中的一个或多个过程。在孢子聚集数量多时，这类物质就会更浓。改动实验可记载3、4或5个一小团节孢子的萌发时程。较大的孢子团出现新的问题。一个100个单节孢子的样品通常比由较大孢子团组成的样品先全部萌发。然而，孢子团中的

一些节孢子则可先于任何单节孢子而萌发。事实上，在较大孢子团中的有些节孢子是不萌发的。

用雅致小克银汉霉研究孢子聚集数量对萌发生时程的影响也很方便。实验操作流程图3介绍了具体的方法。最先萌发的孢子囊孢子通常出现在成簇的孢子团中。这种真菌孢子的芽管生长迅速。在很多分散的单个孢子尚未萌发的时候，从孢子团中长出的较长的芽管一般很容易看见。此实验引出了一个新问题：聚集的孢子主要是刺激孢子提前萌发，还是也刺激菌丝的伸长生长率？

实验操作流程图3． 雅致小克银汉霉孢子聚集数量对孢子囊孢子萌发生时程的影响

用在麦芽琼脂斜面上25℃培养3天的雅致小克银汉霉的孢子涂布接种于一个麦芽琼脂平板上。25℃培养3天。

将已接种培养的平板去盖后翻转扣在一个未接种的去盖麦芽琼脂平板上。紧握两个平板勿使其移动并突然从工作台上垂直拿起。这样，就会从上面的平板掉一些孢子在下面的平板上，其中也会有一些孢子团。一个培养了3天的平板可供接种几个平板。为了得到适当密度的孢子数，垂直拿起两个平板的用力大小和时间需要摸索。

于30℃培养6个接种的平板。在0.75, 1, 1.25, 1.5, 2和3小时后，从培养箱中分别取一平板观察记载单个（和其它孢子分开的）和孢子团中孢子的萌发数。将结果绘图。