

茯苓单个担孢子培养和配对试验*

余元广 胡廷松 梁小苏 潘素芬

(广西壮族自治区医药研究所, 南宁)

茯苓 [*Poria cocos* (Fr.) Wolf] 在我国分布较广, 过去产量较大的有湖北、安徽、云南等省。近年来广西茯苓生产发展较快, 占全国产量的 50% 左右。各地生产用茯苓菌种, 虽属同一个种, 但菌株之间形态和生理上都有差异。目前广西栽培用菌种主要是 P₅₇₈ (中国科学院微生物研究所从湖南分离的菌种, 简称 P) 和 J₆₁ (广西昭平农药厂从湖北引种分离的菌种, 简称 J)。两菌株有明显的不同特点: 前者结苓早, 个小, 苓形不规则; 后者结苓晚, 个大, 圆形, 吊丝苓较多。为了提高茯苓的质量、产量和培育新菌种, 我们进行了 P、J 两菌株的配对试验。试验过程中, 人工诱发子实体成功, 能长年取得无杂菌的孢子堆。用改制的微型毛细管针挑取单孢, 分离和培养单孢菌株, 并进行单孢菌株配对试验。

一、茯苓子实体的诱发和孢子的收集

茯苓子实体是茯苓的有性繁殖器官, 也是茯苓的分类依据。茯苓子实体平伏贴生在菌核、段木和土壤的表面, 类似蜂窝状, 呈白色或微黄色。要获得孢子作为育种的原始材料, 必须先有产生孢子的子实体。但在自然界中茯苓子实体的形成常受季节的限制, 而且有的菌系不易形成子实体, 如 P 菌系在野外至今未发现子实体。为了克服这些困难, 我们利用树根、段木、菌核等作材料, 诱发形成子实体, 使一年四季均能获得孢子进行单孢分离和配对试验。

(一) 子实体的诱发

将人工接种过茯苓菌种的马尾松树根或段木, 放在地下室培养, 室温 24—25℃, 相对湿度

100%。4—7 天后子实体形成。再培养 2—3 天, 子实体由白色变微黄色, 形成 0.5—1.5 厘米的子实体层, 内有多角形或不规则形的小孔, 此时便可收集到散落的孢子。

(二) 斜面培养子实体

用段木等培养子实体的方法尚局限于 J 系菌株, P 系菌株用上法尚未获得子实体。而且用上法因子实体在外界环境暴露时间较长, 5—6 天后便变质萎缩, 污染杂菌, 不易纯化培养。采用斜面培养 P 和 J 菌系的子实体都获得较满意的结果。所收集的孢子均具有良好的发芽率。方法如下: 将茯苓菌核去皮后用灭菌的利刀切成 1—1.5 厘米的小方块, 用 0.1% 升汞处理 30 秒, 75% 酒精处理 60 秒, 无菌水洗涤后接入 PDA 斜面, 26—30℃ 下培养。

用斜面培养诱发子实体, 从接种至开始形成子实体, P 系菌株需 26—34 天, 子实体形成率为 80—91.5%。J 系菌株比 P 系形成子实体

表 1 P、J 菌系形成子实体情况

菌种	接种斜面 (支)	开始形成子实体*		
		时 间 (日)	斜 面 (支)	形成率 (%)
P 系菌核	94	34	86	91.5
P 系菌核	10	26	8	80
J 系菌丝体	11	14	11	100
J 系菌丝体	6	13	6	100

* 27—29℃ 恒温培养

* 本试验得到俞大绾教授的指导; 本文承广西农学院陈育新副教授和本所吴书斌老师审阅和修改。

早而且形成率高(表1)。试管内形成的子实体不易衰老,可连续收集孢子20—42天。

(三) 孢子的收集

子实体形成后6—7天,孔口张开即为成熟,孢子开始散落。散落速度大约每分钟1—3个/视野(150倍显微镜下观察)。收集孢子时,将试管内的子实体孔口向下,放入大小适当的载玻片,对正子实体下方平置,12小时后,即见玻片上有乳白色的孢子散落层。

二、单孢子培养

利用改制的微型玻璃毛细管针分离出单孢子,将单孢子移入PDA斜面,28—30℃下培养。

孢子经吸水膨胀,12小时后,孢子由稻颖形变为卵形,24小时后变为哑铃形,36小时后拉长为长瓜形。48—72小时开始分枝,5—6天后肉眼可见到初生菌丝。单孢子菌丝不形成菌落。菌丝稀疏,向四方伸长呈蛛网状。菌丝分泌物酸度很高,pH为2—2.5。这是用以鉴别茯苓菌丝与其它杂菌的特征。

确定单孢菌株需要有一个观察过程,一般培育50天左右。若菌丝体出现子实体,可能不是单孢,不宜作为配对菌株。

三、单孢菌株配对

担子菌纲的真菌菌丝体大部分不产生分生孢子,仅在子实体上产生担孢子。一般认为担孢子具单核单倍体,而茯苓的担孢子则有所不同。用Feulgen法染色,确定茯苓担孢子在萌发前为多核的性细胞,核的个数和大小都不一样(图1)。我们在试验过程中,发现茯苓担孢子菌株

互相配对时其菌丝接触界面有差别,故认为茯苓担孢子也有正负性的表现。但要证实其确实存在,还要做大量的细胞学工作。

(一) 同菌系单孢菌株配对

方法:将同菌系两个不同单孢菌株的菌丝体(连同小块培养基)移接在同一PDA斜面中央。22—24℃培养4—5天,两菌株的菌丝交界处出现两种情况,一种是形成一条细小的褐色沟线,数日后,沿着沟线形成菌索,褐色消失;另一种情况是两菌株之间的菌丝交互生长,融为一体。在3个菌系的配对试验中,J菌系33对组合,有13对形成菌索,占39.4%,20对不形成菌索,占60.6%。P菌系27对组合,有11对形成菌索,占40.7%,16对不形成菌索,占59.3%。E菌系(湖北英山茯苓)33对组合中,14对形成菌索,占42.2%,19对不形成菌索,占57.6%。配对过程中菌丝体产生菌索和不产生菌索,究竟哪种现象属于配子配对,还待深入研究。仅从第一代培养结果可看出,配对菌株经过60—90天培养,形成子实体的数量有明显差别。出现菌索的配对组合形成子实体能力强,占44.7%;没有菌索的配对组合形成子实体少,占6.5%(表2)。我们认为前者配对成功的可能性较大。因为形成有性生殖器官——子实体的数量较多,后者显著减少。从表2中可以看出,在配对过程中,凡形成菌索的配对菌株,产生子实体的能力比不形成菌索的配对菌株高6.9倍。

子实体是性结合的特殊阶段,只有双元菌丝体才能形成子实体。这种菌丝体具有不同性的两组细胞核。细胞核在形成子实体阶段结合,故认为产生子实体多的配对菌株,配对成功的可能性大。

(二) 不同菌系单孢菌株配对

为了探索不同菌系单孢菌株配对机率,为茯苓杂交育种创造条件,在J系菌株中选出J₁₄₄菌株为代表,与P系不同菌株进行配对试验。在24个配对中有18对形成菌索,占75%;6对不形成菌索,占25%。目前该项工作仍在继续进行。



图1 茯苓担孢子多核体(×4,000)

表 2 两菌系配对后形成子实体情况

组合菌系	形成菌索			不形成菌索		
	配对组	子实体数		配对组	子实体数	
	合 数	组合数	%	合 数	组合数	%
J×J	20	7	35	24	1	4.1
P×P	12	6	50	17	2	11.6
E×E	15	8	53.3	21	1	4.9
总 计	47	21	44.7	62	4	6.5

四、讨论

通过试验,我们认为菌株配对的关键在于取得单孢菌株。单孢菌株的初生菌丝,其细胞核不一定是单个,可能是多核,但其染色体为单倍体,这是菌株配对的前提。试验证明,P、J两菌系的单孢菌株配对的成功希望很大。如果用P、J双方的菌核组织分离出来的菌丝体配对则很难结合,两者菌丝体共同培养时,中间就产生



图 2 P、J 菌系的菌核菌丝接触后的死亡情况
(黑线上为 J 菌系)

一条褐色的分界线,呈烧焦状。最后,有一方菌丝体变褐死亡或生长不良(图 2)。而用双方的单孢菌株配对就无此现象。说明用单孢菌株育种较有把握。

菌株配对成功后如何进行比较试验、化学成分和生化指标的测定和定向培育等问题还很多。为了减少试验工作的盲目性,必须详细观察子实体组织内的细胞核,担子和担孢子的细胞核结构及染色体变化规律,质配和核配的方式和时期,以便更好地开展茯苓育种工作。