

蘑菇属九个种担孢子的电镜观察

李荣春¹, R. Noble²

(1. 云南农业大学食用菌研究所, 云南昆明 650201; 2. 英国国际园艺研究中心, 英国沃里克郡 CV35 9EF)

摘要: 蘑菇属(*Agaricus* L.)的分类中,担孢子形态和大小是区分种的一个重要指标。虽然现在世界许多研究所都在运用分子生物学技术和相互亲和性来重新评价该属的分类,但担孢子的大小仍然是种划分的重要指标。介绍了一种新的供扫描电镜观察担孢子的简易的样品制作技术,并对野蘑菇(*A. arvensis*),大紫蘑菇(*A. augustus*),双孢蘑菇(*A. bisporus*), *A. essettei*, 短柄蘑菇(*A. maleolens*),白杵蘑菇(*A. nivescens*),双环林地蘑菇(*A. placomyces*),亚绒毛蘑菇(*A. subfloccosus*)和白林蘑菇(*A. sylvicola*)共9个种的担孢子进行观察测量,发现:(1)用扫描电镜测量的结果与用光镜测量的结果具有较一致的线性相关关系($R^2=0.9857$);(2)在种间或者种内菌株间的孢子形态和大小存在着较大的差异,可以作为分类的一个重要指标;(3)在精确的孢子测量方面扫描电镜是一种快速、方便的方法。

关键词: 蘑菇属; 担孢子观察; 扫描电镜

中图分类号: Q944.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)03-0233-03

Observation of spores of 9 species in *Agaricus* under scanning electron microscope

LI Rong-chun¹, R. Noble²

(1. Institute of Edible Fungi, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China;

2. Horticulture Research International, Warwick CV35 9EF, UK)

Abstract: Of the morphological characteristics used in the taxonomic classification of the genus *Agaricus*, spore dimensions are used as an objective measurement in differentiating species. Work at HRI and elsewhere is now re-examining the taxonomy of the genus, using molecular techniques and inter-fertility tests. However, spore measurements remain an important criterion in the identification of isolates. A simple preparation technique for spore measurements using scanning electron microscope (SEM) is described. Spore measurements of either wild collections or compost cultivated sporophores of the following *Agaricus* species were made: *A. arvensis*, *A. augustus*, *A. bisporus*, *A. essettei*, *A. maleolens*, *A. nivescens*, *A. placomyces*, *A. subfloccosus* and *A. sylvicola*. Measurements using a SEM were closely and linearly correlated ($r^2=0.97$) with measurements using light microscope. There were significant differences in spore size and shape, both between species and within a species. The SEM offers a rapid and easy alternative to light microscopy for accurate spore measurement.

Key words: *Agaricus*; spores observation; scanning electron microscope

蘑菇属(*Agaricus*)的分类主要是依据宏观和微观形态学特征以及化学颜色反应、气味等特征^(1~3),其

中重要的是微观特征,特别是担孢子的大小。最近许多学者利用分子生物学技术和相互亲和性测试对蘑

收稿日期: 2000-12-21

作者简介: 李荣春(1959-),男,云南玉溪人,副教授,植物学专业,主要从事食用菌分子育种和栽培研究。

基金项目: 英国 MAFF 资助(M50)

菇属的分类重新进行分析^[4,5],但不管怎样,精确地对担孢子进行测量,在科及科以下等级单位的鉴定仍是具有重要价值的关键指标,它在对新的分类技术、方法分析中可起到相互印证的重要作用。

在分类中描述的担孢子的大小以前都是依据光镜下的观察。但现在最新的普通光学显微镜的最大分辨率也仅为 $0.2 \mu\text{m}$ ^[6]。而蘑菇属一些种担孢子的宽少于 $3 \mu\text{m}$,所以要在光学显微镜下精确地测量担孢子就成为一个问题。再加上不同的人测量可能带来不同的误差,例如孢子样品的含水量和制样方式,以及制片时用水封片还是用氢氧化钾溶液封片等^[7,8],虽然 Singer^[9]指出从孢子印上取样是获得较高成熟率孢子的一种方法,但孢子成熟度的变化可能是孢子测量误差的另一原因。

扫描电镜在蘑菇属孢子研究上应用早被介绍^[9],

并被广泛地应用在观察孢子壁上的修饰^[10-12]。临介点干燥技术成功地应用于真菌孢子的制备^[13],但是此方法复杂且可能在处理时对不同孢子特别是细胞壁产生不同的反应。而空气干燥法的结果是无法和临介点干燥法的结果相比的^[9]。在我们的实验室,从孢子印取样后不经过干燥处理,直接用于扫描电镜的观察和测量是切实可行的,因为它们自然是自然干燥的,任何处理都可能导致孢子的形态,大小的人为改变。

标准的扫描电镜的分辨率可高达 4 nm ($0.004 \mu\text{m}$)^[14],并可在不同的放大倍率下观察蘑菇属孢子的形态并测量,因此可以消除光镜下观察测量的误差。

本研究的主要目的是:(1)观察测量蘑菇属中 9 个种的担孢子的大小范围;(2)比较同一种内不同菌株之间的孢子大小变异;(3)比较在扫描电镜下测量的孢子大小与光镜下孢子大小的关系。

表 1 蘑菇属的 9 个种的 24 个菌株的来源
Table 1 Sources of 24 strains of *Agaricus* spp.

种名 Species	菌株编号 No. of strain	采集地点 Location	种名 Species	菌株编号 No. of strain	采集地点 Location	种名 Species	菌株编号 No. of strain	采集地点 Location
野蘑菇 <i>A. arvensis</i>	94-31	英国 UK	<i>A. essettei</i>	R20	荷兰 Holland	双环林地蘑菇 <i>A. placomyces</i>	99-9	英国 UK
野蘑菇 <i>A. arvensis</i>	AA0390	美国 US	短柄蘑菇 <i>A. maleolens</i>	94-4	英国 UK	亚绒毛蘑菇 <i>A. subfloccosus</i>	A119	英国 UK
野蘑菇 <i>A. arvensis</i>	AA0373	美国 US	短柄蘑菇 <i>A. maleolens</i>	94-34	英国 UK	亚绒毛蘑菇 <i>A. subfloccosus</i>	A. sub6	瑞士 Switzerland
大紫蘑菇 <i>A. augustus</i>	97-1	英国 UK	白杵蘑菇 <i>A. niveoscens</i>	94-22	英国 UK	亚绒毛蘑菇 <i>A. subfloccosus</i>	K1552	加拿大 Canada
双孢蘑菇 <i>A. bisporus</i>	96-4	英国 UK	白杵蘑菇 <i>A. niveoscens</i>	95-3	英国 UK	亚绒毛蘑菇 <i>A. subfloccosus</i>	W4II	英国 UK
双孢蘑菇 <i>A. bisporus</i>	ARP174	美国 US	白杵蘑菇 <i>A. niveoscens</i>	AR1	法国 France	亚绒毛蘑菇 <i>A. subfloccosus</i>	W4IV	英国 UK
双孢蘑菇 <i>A. bisporus</i>	JFB III	英国 UK	白杵蘑菇 <i>A. niveoscens</i>	MU3	英国 UK	白林蘑菇 <i>A. sylvicola</i>	94-37B	英国 UK
<i>A. essettei</i>	93.7	英国 UK	白杵蘑菇 <i>A. niveoscens</i>	94-33	英国 UK	白林蘑菇 <i>A. sylvicola</i>	MU19	英国 UK

1 材料与方 法

1.1 样品材料

蘑菇属的 9 个种的 24 个菌株的来源见表 1。孢子采自成熟子实体收集的孢子印上。

1.2 制样观察

用粘有导电且具粘性的炭膜的样品台直接在孢子印上托印粘上孢子,然后喷上一薄层导电金,就置于剑桥 S2000 型扫描电镜下测量照像。工作电压为 10 KV ,工作距离约为 10 mm 。

1.3 每个菌株的 40 个孢子的长(L)和宽(W)在扫描电镜下被测量

按照 Callac^[15]的方法同样数量的孢子的长和宽

也被在光学显微镜下测量。

2 结果和讨论

9 个种的 24 个菌株的孢子的平均大小见表 2。野蘑菇和 *A. essettei* 的孢子明显的大于其它种,而双环林地蘑菇的孢子明显的小于其它种(表 2,图版 I)。野蘑菇和 *A. essettei* 的孢子有最大的长宽比(长:宽=1.45),而短柄蘑菇比较圆(长:宽=1.16)。这 9 个种的孢子的形态和大小与 Capelli^[16]的观察一致。在电镜下孢子样品以干燥状态测量到的孢子大小大约是在水环境中光镜下测得的 95.4%。光镜下测得的孢子大小与电镜下测得的孢子大小具有线性相关关系(图 1)。

表 2 蘑菇属 9 个种的 24 个菌株的担孢子的平均长和宽
Table 2 The average length and width of the spore of 24 strains in *Agaricus*

菌株编号 No. of strain	孢子 Spore		菌株编号 No. of strain	孢子 Spore		菌株编号 No. of strain	孢子 Spore	
	长 Length(μm)	宽 Width(μm)		长 Length(μm)	宽 Wide(μm)		长 Length(μm)	宽 width(μm)
94-31	7.05±0.33	4.74±0.27	R20	7.45±0.37	5.05±0.32	99-9	4.02±0.20	2.83±0.10
AA0390	7.08±0.32	5.10±0.28	94-4	5.21±0.26	4.43±0.26	A119	5.26±0.26	4.01±0.18
AA0373	7.09±0.25	4.96±0.22	94-34	5.01±0.22	4.35±0.15	A. sub6	5.63±0.29	4.20±0.21
97-1	5.67±0.47	3.88±0.29	94-22	6.54±0.24	4.90±0.25	K1552	5.32±0.28	4.03±0.32
96-4	6.01±0.24	4.53±0.28	95-3	5.79±0.42	4.32±0.20	W4II	5.75±0.28	4.18±0.20
ARP174	6.00±0.42	4.87±0.22	AR1	5.71±0.29	4.36±0.31	W4IV	5.59±0.24	4.04±0.19
JFB III	6.21±0.28	4.74±0.29	MU3	5.66±0.32	4.18±0.39	94-37B	6.11±0.31	4.25±0.20
93.7	7.28±0.38	5.17±0.24	94-33	5.96±0.19	5.25±0.19	MU19	5.97±0.36	4.01±0.12

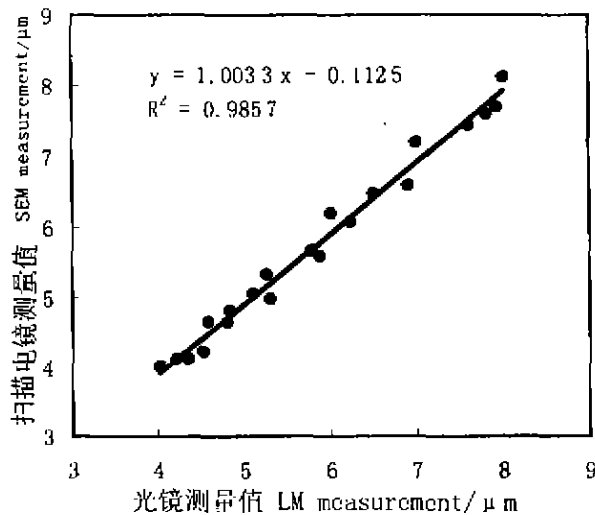


图 1 电镜和光镜下担孢子测量的相互关系图

Fig. 1 Relationship between spore measurements from light and scanning electron microscopes

除白杆蘑菇外,同种不同菌株间的担孢子的大小没有较大差异。白杆蘑菇的 MV3 菌株与 94-33 菌株的担孢子的宽以及 94-22 和 AR1 菌株的担孢子的长表现出较大差异,但是通过核的 rRNA 的 ITS 区域的测序分析认为它们属于同一 ITS 组。

本研究所采用的双孢蘑菇(*A. bisporus*)菌株都是 90% 产生 2 个孢子的菌株,测量时遇到特别大或特别小的孢子时,由于考虑到它们可能是分别来自单孢担子和 3、4 孢担子,所以没有把它们列入计算平均值的 40 个担孢子内。Callac^[15]发现两孢亚种(*A. bisporus* var. *bisporus*)的担孢子明显地比四孢亚种(*A. bisporus* var. *burnettii*)的担孢子长和宽。

3 结 论

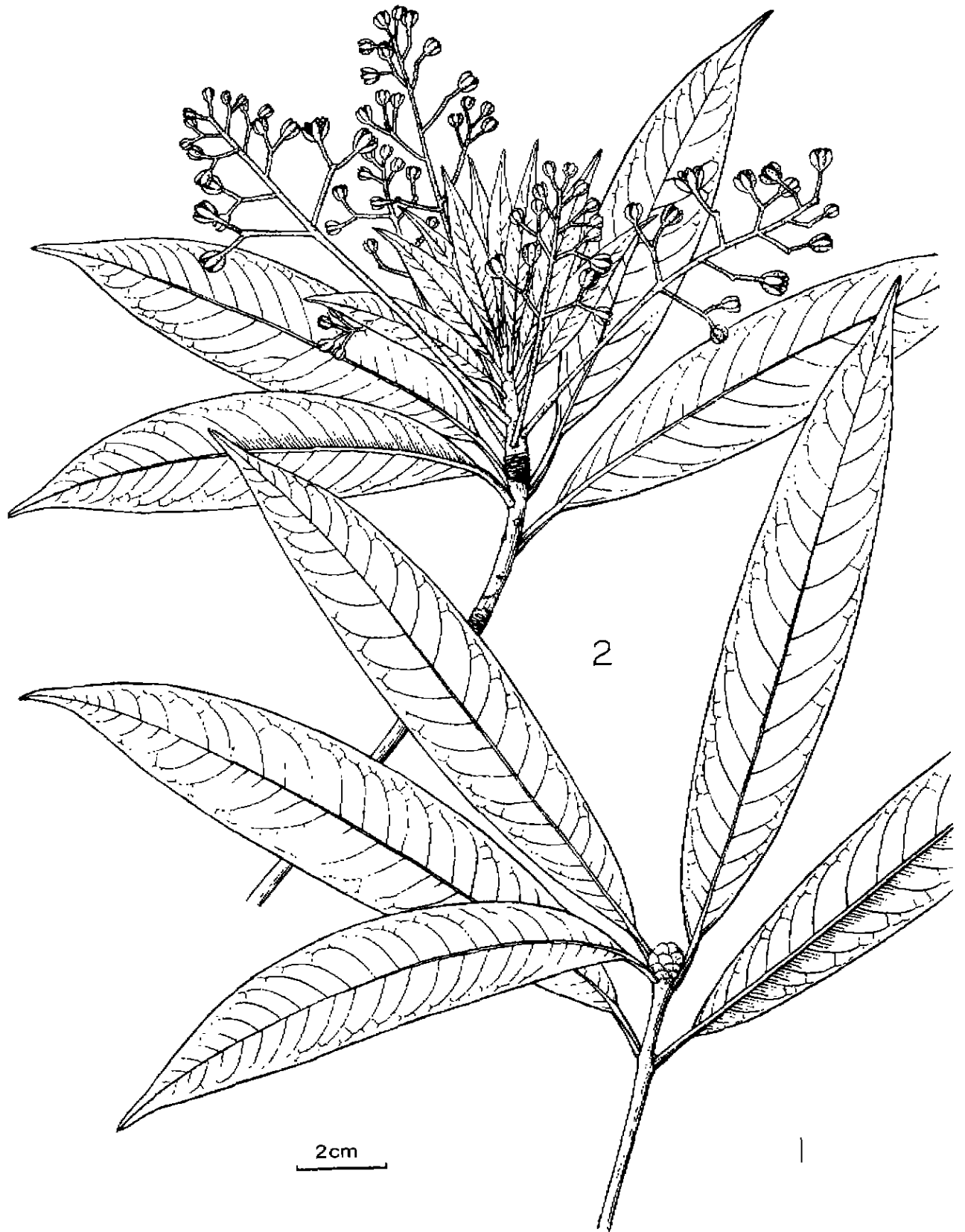
我们发现了一种简便的在扫描电镜下精确测量蘑菇属不同种担孢子大小的方法。在扫描电镜下担孢

子大小与光镜下担孢子大小表现出较好的线性相关关系。担孢子的干燥状态在电镜下测量的大小稍微小于在光镜水封片状态下测量的大小,其相关关系式为 $y=1.0033x-0.1125$, $R^2=0.9857$ (图版 1)。蘑菇属不同种担孢子形态和大小具有较大差异,可以作为分种的重要参考指标。种内不同菌株间的差异除了白杆蘑菇的菌株之外,则表现出较大的一致性。

参考文献:

- [1] Lange J E D. Melanosporae. *Psalliotta* [J]. *Flora Agaricina Danica*, 1939, 4: 53-62.
- [2] Heinemann P. Essai d'une clé de détermination des genres *Agaricus* et *Micropsalliotta* [J]. *Sydowia*, 1977, 30: 6-37.
- [3] Singer R. The *Agaricales* in modern taxonomy [M]. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1986. 1-221.
- [4] Mitchell A D, Bresinsky A. Phylogenetic relationship of *Agaricus* species based on IT-2 and 28S ribosomal DNA sequences [J]. *Mycologia*, 1999, 91: 811-819.
- [5] Kerrigan R W, Callac P, Xu J, Noble R. Population and phylogenetic structure within the *Agaricus subfloccosus* complex [J]. *Mycol. Res.*, 1999, 103: 1515-1523.
- [6] Bradbury S. An introduction to the optical microscope [M]. Oxford: Oxford University Press, 1989. 1-35.
- [7] Harter L L. The personal element and light as factors in the study of the genus *Fusarium* [J]. *J. Agric. Res.*, 1941, 62: 97-107.
- [8] Maire R. Remarques sur les causes de divergences entre les auteurs des dimensions des spores [J]. *Bull. Soc. Myc. Fr.*, 1926, 42: 43-50.
- [9] Stalpers J A, Van Zaayen A. Scanning electron microscopy of basidiospores of *Agaricus bitorquis* and of healthy and virus-infected *Agaricus bisporus* [J]. *Mushroom Science*, 1981, 11: 449-454.

(下转第 238 页 Continue on page 238)



Machilus pauhoi Kanehira 与 *M. Polyneura* H. T. Chang 比较图

1. Kanehira 认定的刨花 *M. pauhoi* Kanehira (据 H. H. Chung 2897, 福建延平); 2. 典型的 *M. polyneura* H. T. Chang (据 W. Y. Chun, IBSC No. 92889, 香港)。