

光、溫度及培養基對鬚鬚黴生長的影響^{***}

許淑娥* 劉桂蘭**

摘要

本實驗以鬚鬚黴在不同光、溫度及培養基下加以探討，結果顯示在24°C下，PDA及SMA兩種培養基，對鬚鬚黴菌絲生長最為快速，孢子囊也易成熟。

將孢子囊柄置於空氣(對照組)及置於石蠟油(paraffin liquid)實驗組中生長，其結果顯示：對照組有屈向光源生長，而實驗組則背向光源生長的現象。

鬚鬚黴在不同的維生素B₁液體培養基中，以每100毫升之液體培養基中含有3.2μg生長情形最佳。又利用鬚鬚黴具有缺乏維生素B₁之特徵，因而此可應用於生物檢定上。

緒言

鬚鬚黴菌屬(*Phycomyces* spp.)在台灣尚缺乏詳細的記錄，但約100年前，歐美各國已開始有分離報告之記錄。尤以最近幾年來該菌有關之生理特性，有性生殖及孢囊孢子之性別遺傳方面已有許多有趣之報告。筆者等利用暑假進修期間，僅能做有關光、溫度及培養基對鬚鬚黴生長的影響。現把各種實驗結果整理出來以供有關方面做為參考。

台灣地區一年四季溫度高，雨量多，濕度亦高，所以梅雨季來臨時在豆渣上、鼠糞、堆肥及麩包上常被發現生長黴菌，其中少數寄生於植物或動物上導致病害。多數腐生菌廣存於森林土壤和草食性動物的糞便。毛黴菌目就包括有55屬，約有600種，其中毛黴菌科是最大的一科，約有60種，現將毛黴菌科中的鬚鬚黴的特性，略述如下：

1. 具有生長良好之菌絲及常不分枝直立的孢子囊柄，柄粗直長，具有金屬反光性的翠綠色。
2. 無性生殖依靠孢子囊孢子(sporangiospore)來繁殖。孢子囊初期呈金黃色，內含有胡蘿蔔素，成熟後轉變成黑褐色。孢子囊孢子藉風力和水力散佈。

3. 有性生殖依靠配子囊之結合，配子囊來自雌雄同株(homothallic)或雌雄異株(heterothallic)，雌雄菌株外型相似，生理特徵不同。一般以“+”與“-”來區分雌雄的特徵，由配對的菌絲相對突起形成前配子囊(progametangium)形成配子囊(gametangium)，最後結合形成結合孢子(zygospore)，結合子呈鉗狀(tongue-shape)，結合孢子具有厚壁外有雙分叉狀的附屬物(appendage)，便於動物携走而傳播。

本論文研究目的有：①鬚鬚黴生長的最適溫度及培養基。②用菌絲頂端或菌絲後較老的部位接種，測量孢子囊柄生長之速率。③光對鬚鬚黴孢子囊柄生長的影響。④在不同濃度的維生素B₁下，測定鬚鬚黴生長的速率。

材料及方法

一、材料：

1. 菌種：鬚鬚黴(*Phycomyces blakesleeanus*)，係由師大生物研究所真菌實驗室簡秋源教授所提供。
2. 準備工作：菌種培養所需器材如：酒精燈、培養皿、錐形瓶、試管、鑷子、滴管、鑽孔器及解

*台灣省立花蓮女子高級中學教師

**新竹縣關西富光國民中學教師

***國立台灣師範大學生物研究所第三期暑期進修班專題研究之一部分

剖針等預先準備妥當。所用玻璃儀器均先浸入清潔液 (cleaning solution) 含重鉻酸鉀 ($K_2Cr_2O_7$) 100 克溶於 100 毫升熱水中，完全溶解，再慢慢加入硫酸 1,500 毫升，浸過一夜，再放入肥皂水中刷洗，最後用水沖洗兩次使之乾淨。惟清潔液會傷及皮膚及衣服處理時要謹慎小心。培養皿在清潔過後，需置於乾淨的盤子上晾乾，兩個一組使用白紙包好放入烤箱 (oven) 內，以 $180^\circ C$ 烘乾滅菌 2 至 3 小時後備用。

3. 培養基的製置：

a. 馬鈴薯培養基 (Potato Dextrose Agar)：簡稱 PDA，取去皮馬鈴薯 200 克，放入燒杯加入蒸餾水 500 毫升置於電鍋中，煮過 20 分鐘，將上層澄清液以紗布過濾倒入兩公升之錐形瓶中，加入葡萄糖 (dextrose) 20 克，洋菜 (agar) 15 克，最後加入蒸餾水使總體積為 1 升。其中 400 毫升之混合液經滅菌後，做成平板培養基 20 個，剩餘的 600 毫升倒入錐形瓶 (100 毫升)，試管，每一錐形瓶倒入 40 毫升，試管 15 毫升各 20 個，再置於高溫高壓滅菌器內以 1.2 kg/cm^2 壓力及 $121^\circ C$ 溫度下，試管做成斜面培養基，待凝固後置於冰箱內備用。

b. 合成毛黴培養基 (Synthetic Mucor Agar)：簡稱 SMA，其組成是葡萄糖 (dextrose) 40 克，天門冬醯胺 (asparagine) 2 克，磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 0.5 克，硫酸鎂 ($MgSO_4$) 0.25 克，氯化噻胺 (thiamine chloride) 0.005 克，洋菜 (agar) 15 克及蒸餾水 (dist H_2O) 1 升，其滅菌及培養基裝備手續均與 PDA 相同。

c. 合成毛黴液體培養基 (Synthetic Mucor Liquid Medium) 如 (b) 法但不加入洋菜，然後配製成每 100 毫升液體培養基中分別含有 $0.4 \mu g$ ， $0.8 \mu g$ ， $1.2 \mu g$ ， $1.6 \mu g$ ， $2.0 \mu g$ ， $2.4 \mu g$ ， $2.8 \mu g$ ， $3.2 \mu g$ 及 $3.6 \mu g$ (微克) 的維生素 B_1 之濃度 (取 thiamine chloride $100 \mu g/1 \text{ ml}$ 稀釋 250 倍得 $0.4 \mu g/1 \text{ ml}$ 之 thiamine chloride， $1 \text{ cc} + 99 \text{ cc}$ 之 SMA 液體培養基而成使每 100 毫升的 SMA 液體培養基中含有 $0.4 \mu g$ 之 thiamine chloride)，然後分別裝入 250 毫升錐形瓶內，俟滅菌後備用。

二、方法：

1. 由貯藏菌種取出菌絲片斷接種於斜面培養基上，待五至六天後，有孢子囊成熟後，再將單孢子囊成熟後，再將單孢子囊移入平板培養基中。

2. 約兩天平板培養基內佈滿了菌絲但未見孢子囊被形成時，使用 0.5 公分已滅菌之鑽孔器插入平板培養基中，取外圈和內圈各六個菌盤 (disc)，分別接種在 12 支試管平面培養基上，觀察記錄內外圈菌盤之直徑大小，長出孢子囊柄的長度，待五天後取樣，測量孢子囊柄的高度，求其平均值。

3. 將佈滿菌絲平板培養基，用直徑 1.3 公分已滅菌之鑽孔器插入使外圈成 24 個菌盤，分別接種入含 PDA 之培養基的錐形瓶 12 個，及含有 SMA 培養基之錐形瓶 12 個之中央，每一組二瓶，然後分別放在 $5^\circ C$ ， $10^\circ C$ ， $16^\circ C$ ， $20^\circ C$ ， $24^\circ C$ 及 $28^\circ C$ 之培養箱中，每天按時記錄菌盤之直徑，孢子囊柄的長度及孢子囊形成的情形。

4. 將已添加維生素 B_1 的各種不同濃度包括： $0.4 \mu g$ ， $0.8 \mu g$ ， $1.2 \mu g$ ， $2.0 \mu g$ ， $2.4 \mu g$ ， $2.8 \mu g$ ， $3.2 \mu g$ 及 $3.6 \mu g$ 之 SMA 液體培養基，分別各投入 6 個成熟之孢子囊孢子，置於 $24^\circ C$ 之培養箱中，俟兩星期後，用濾紙濾去培養液，留下菌絲及孢子囊，並放在 $80^\circ C$ 之烤箱，經過 18 小時後，稱取其乾重量。

5. 將佈滿菌絲平板培養基，用已滅菌之鑽孔器 (直徑 0.5 公分) 插入外圈形成 6 個菌盤，分別接種於 6 支試管平面培養基內，然後將試管放入已製作好的凹陷保麗龍之中間，每組二支共三組，用黑紙包住口徑 4 公分之大試管內面，僅留由底層起 8 公分處開一小洞，以管口朝下方式，插入保麗龍板之外圈 (裝置如圖三)，然後移入 $24^\circ C$ 有照光的培養箱中，觀察孢子囊柄生長的方向。經過三天後，將一組中其中一支試管沿着管壁慢慢加入已滅菌的石蠟油 (paraffin liquid)，(注意：不要直接滴於孢子囊柄上，以免受石蠟油之影響而使孢子囊之彎度改變)，每天觀察記錄孢子囊柄在空氣中，在石蠟油中照光下生長的方向。

結 果

1. 取內外兩圈菌盤接種於試管平面培養基中，經過五天之後，發現接種內圈菌盤於 PDA 錐形瓶培養基之孢子囊柄長度平均值是 2.8 公分，外圈則

是4.0公分。內圈菌盤接種於SMA 錐形瓶培養基之孢子囊柄長度之平均值是3.5公分，外圈則是6.6公分。

2. 兩種培養基分別在5°C, 10°C, 16°C, 24°C及28°C定溫培養箱中，其菌落的直徑及孢子囊柄長度之測量結果，如表(-)和(二)：

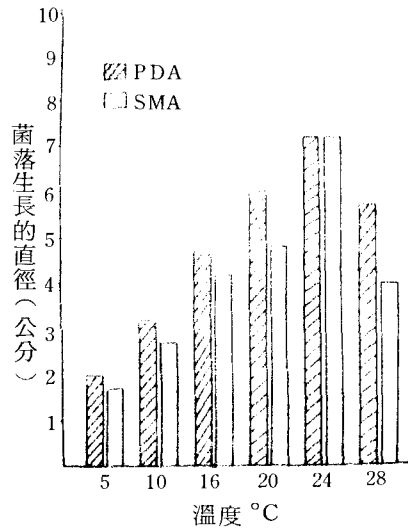
表(-) 鬍鬚黴在不同溫度下，生長四天菌落生長的情形

溫度	天數 菌落直徑長 (公分)	第一	第二	第三	第四
		天	天	天	天
5°C	PDA	0.4	0.4	0.5	2.0
	SMA	0.1	0.1	0.8	1.7
10°C	PDA	0.5	0.5	2.5	3.2
	SMA	0.7	0.7	1.9	2.7
16°C	PDA	1.8	2.1	4.2	4.7
	SMA	1.0	1.2	2.3	4.2
20°C	PDA	2.7	5.5	5.8	6.0
	SMA	2.2	2.7	4.2	4.7
24°C	PDA	4.3	6.5	6.8	7.2
	SMA	2.3	3.2	4.2	7.2
28°C	PDA	1.9	4.2	4.2	5.7
	SMA	1.7	2.1	2.3	4.0

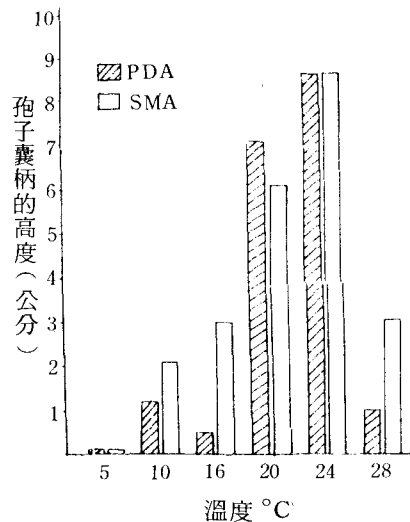
表(二) 鬍鬚黴在不同溫度下，生長四天孢子囊柄生長的情形

溫度	天數 孢子囊柄高度	第一	第二	第三	第四
		天	天	天	天
5°C	PDA	—	—	0.1	0.1
	SMA	—	—	0.1	0.1
10°C	PDA	0.1	0.5	1.0	1.2
	SMA	0.1	0.5	2.0	2.1
16°C	PDA	0.4	0.4	0.5	0.5
	SMA	0.1	0.2	2.0	3.0
20°C	PDA	1.5	2.8	6.5	7.0
	SMA	1.5	2.0	5.5	6.0
24°C	PDA	5.6	7.8	8.1	8.5
	SMA	3.6	4.5	5.5	8.5
28°C	PDA	0.1	0.5	0.6	1.0
	SMA	1.0	1.0	1.5	3.0

3. 第四天以後，不同溫度下菌落直徑及孢子囊柄長度有顯著的差別，如圖一和圖二。此明顯的顯示出在24°C下，PDA和SMA兩種培養基均對菌落之擴大及孢子囊柄之成長為最適。

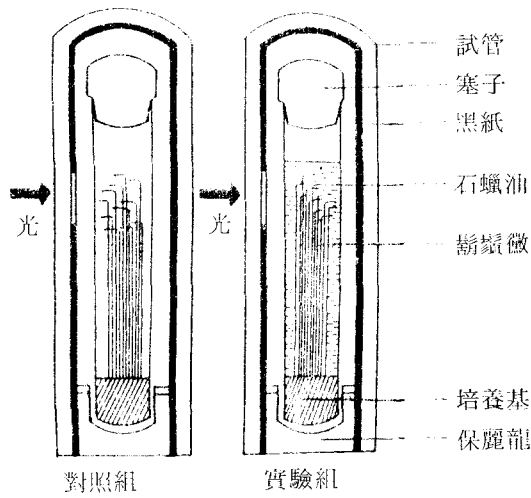


圖一 鬍鬚黴在不同溫度下，第四天菌落生長情形



圖二 鬍鬚黴在不同溫度下，第四天孢子囊柄生長情形

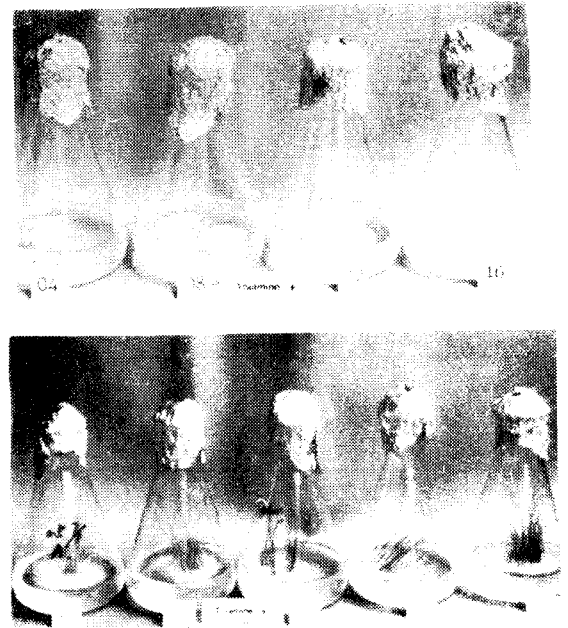
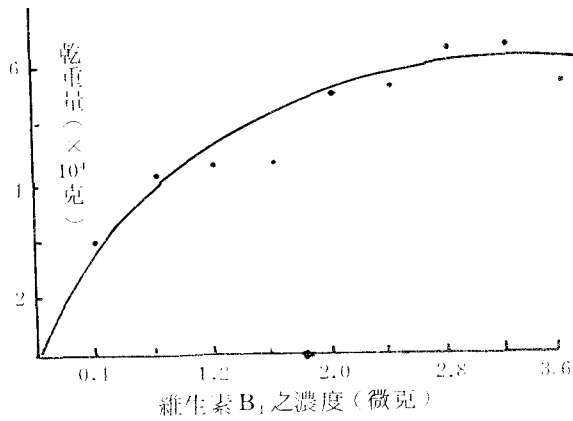
4. 在24°C 培養箱光照下，對照組（孢子囊柄在空氣中）屈向光源生長，而實驗組（孢子囊柄在石蠟油中），有背向光源生長，如圖三和四。



圖三 鬍鬚微之趨光性實驗裝置

5. 維生素B₁ 在不同濃度下由圖五顯示出在 100 毫升液體培養基中含有 3.2 μg 的維生素 B₁ 的濃度其菌落直徑及孢子囊柄之生長速率最快，亦是維生素 B₁ 在某一閾值 (threshold) 內，濃度之增高及其生長速率亦隨之增加之情形。

6. 經過兩星期之後，將其過濾，菌絲及孢子囊在 80°C 之烤箱中，經過 18 小時烤乾後，稱其乾重量如表三。在不同之維生素 B₁ 之濃度下，所生長的曲線圖如圖六。



圖五

圖六 不同濃度維生素B₁下，鬍鬚微菌絲生長之乾重量測定之圖示。

表三 不同濃度維生素B₁下，鬍鬚微菌絲生長之乾重量數據

維生素 B ₁ 之濃度 μg (微克)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8	3.2	3.6
乾 重 量 g (克)	0.2957	0.4231	0.4437	0.4318	0.5545	0.5616	0.6152	0.6363	0.5893

討 論

菌絲頂端接種，生長快速的原因是由於菌絲頂含有大量的粒線體、核、細胞質、核糖體及泡囊 (vesicle) 皆有助於菌絲之迅速生長，究其原因係由細胞質內泡囊向菌絲頂端位移同時供給壁形成物量做為其可延伸生長之原動力所致。

在低溫或高溫下鬍鬚黴之菌絲擴大及孢子囊柄之生長有抑制作用。然而在 24°C 下，PDA 與 SMA 之培養基對菌絲生長及孢子囊柄最為快速，但在其他的溫度下，由圖二可見仍以 SMA 之培養基較佳。

光照下，孢子囊柄在空氣中生長有屈向光源生長之現象。根據物理學之觀點，光由介質疏進入介質密，則產生聚光。而在此若把孢子囊柄的橫切面當作一個透鏡 (cylindrical lens)，因而光聚集於背面接受吸收以後，此區內的生長激素或酵素 (enzyme) 便趨活化，致使細胞增殖快速，而產生孢子囊柄向光彎曲。

孢子囊柄置於石蠟油中，則有背向光源生長之現象。如上所述及的，光由介質密進入介質疏之處會產生散光，所以背向光源生長區所獲得光量較少。因而，背向光源生長區內細胞生長較緩慢而產生背向光源生長。

前人研究證明鬍鬚黴是屬於維生素 B₁ 缺乏種類，因此要求適當的維生素才能生長。在本實驗中，配製不同濃度的維生素液體培養基，結果顯示出，

極少量的維生素 B₁，就會影響其生長的差異，如圖五及圖六，因此一般可以把鬍鬚黴應用於生物檢定，測量食物中所含之維生素 B₁ 量的有無。

致 謝

本研究承蒙恩師 簡秋源教授的熱心指導與鼓勵，深為感激，特此致謝。

參考文獻

1. Castle, E. S. 1942. Spiral growth and reversal of spiraling in *Phycomyces* and their bearing on primary wall structure. *Am. J. Bot.* 29: 664~72.
2. Deacon, J. W. 1980. Introduction to modern mycology. Blackwell Sci., Publ., 197 pp.
3. Grove, S. N., C. E., Bracker, and D. J. Morre, 1970. An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*. *Am. J. Bot.* 57: 245~266.
4. Ingold, C. T. 1978. The biology of *Mucor* and its allies. 13~15 pp. & 37~41 pp.
5. Moore-Landecker, E. 1972. Fundamentals of the fungi. 482 pp.

Effects of Light, Temperature and Medium on the Growth of *Phycomyces blakesleeanus*

Shu-Er Hsu and Kuei-Lan Liu

ABSTRACT

Of media tested, *Phycomyces blakesleeanus* grew well on PDA and SMA under the incubation of 24 C in the darkness.

Curvature results from unequal growth on the sides of the elongating region towards and away from the stimulus, the side remote from the light growing faster. Phototropism in this organism was illustrated and discussed.

Effect on hyphal growth of *P.blakesleanus* obtained by dry weight of mycelium in liquid medium containing 3.2 μg of thiamine was detected as grown well. Therefore, this fungus may be used for the bio-assay of this vitamin in foods of unknown thiamine content.