

观察酵母菌子囊孢子及其形成过程的简易方法

金建玲*

(山东大学微生物系, 济南 250100)

摘要 以美蓝作染色剂, 采用单染色的水浸片法观察酵母菌的子囊孢子, 方法简便; 观察子囊孢子形成过程中处于不同阶段的细胞形态, 效果良好; 可使生孢率的计算得以改进。

关键词 酵母菌; 子囊孢子; 染色方法

* 本文得到高东老师的指导, 特此致谢。

酵母菌是教学、科研和工业生产中应用最广泛的真核微生物之一。酵母菌子囊孢子形成与否是酵母菌分类鉴定的一个关键步骤,也是微生物教学工作中观察真核微生物有性生殖的好材料。因此,建立一种检测酵母菌子囊孢子的快速简便方法,很有必要。

有关酵母菌子囊孢子的形成条件^[1,2]及观察方法^[3,4]已有报道。但是上述方法只能用来区分营养体细胞和子囊孢子,而不能用来观察处于生孢中间阶段的细胞形态。在本室的工作基础上^[1,2],本文用改进的简易染色法——美蓝染色法,观察了酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、汉逊氏酵母属(*Hansenula*)的三株菌的生孢过程,得到良好效果。

材料和方法

1. 菌株:酿酒酵母 AS2. 399 (*S. cerevisiae*), 八孢裂殖酵母 AS2. 1148 (*Sch. octosporus*), 异常汉逊氏酵母 AS2. 294 (*H. anomala*)。

2. 培养基:酵母完全培养基^[5]、Kleyn 生孢培养基^[2]、Mcclary 生孢培养基^[2]、生孢培养基Ⅲ(%) : 0.82 醋酸钠, 0.18 氯化钾, 0.1 酵母膏, 2 琼脂。

3. 染色液: 0.05—0.1% 亚甲基蓝(美蓝)。

4. 菌体培养和子囊孢子形成: 将供试菌种接种于酵母完全培养液中, 28℃ 培养过夜。次日按 1/10 接种量移种后摇床培养 4—6 小时。离心收集菌体, 并用生理盐水洗涤, 涂各种生孢斜面, 28℃ 培养。

5. 染色观察: 在载玻片上加一滴生理盐水, 用接种环取少许培养物加入其中, 涂匀; 再加一滴美蓝染色液, 混匀后加盖片在高倍镜下观察。

结果和讨论

1. 培养条件与生孢的关系: 不同菌株在不同生孢培养基上的生孢能力不同。AS2. 1148 在三种生孢培养基上的生孢能力都很强。

AS2. 399 在 Macclary 培养基上生孢一般, 在其余两种生孢培养基上则生孢很强。AS2. 294 只在生孢培养基Ⅲ上生孢较强, 而在其余两种生孢培养基上则生孢较弱。

2. 美蓝染色的效果:

(1) 营养细胞与子囊孢子的区分: 生孢培养物经美蓝染色后, 在显微镜下很容易区分子囊孢子与营养体细胞。死的营养体细胞着色均匀, 呈深蓝色; 活的营养体细胞无色(若含液泡, 液泡是一透明区); 成熟的子囊孢子质地均一, 呈浅蓝色, 孢壁呈蓝色。

(2) 处于生孢不同阶段的细胞形态的观察: 旺盛生长的营养体细胞含有液泡(图 1a); 液泡消失后细胞核拉长(图 1b); 随后细胞进行第一次减数分裂, 形成含有两个子核的细胞(图 2a); 两个子核再进行第二次减数分裂(图 2b), 形成含有 4 个子核的细胞(图 3a)。伴随着细胞核的分裂, 细胞质浓缩并集中到子核周围, 形成原孢子; 随后形成孢子壁, 子囊孢子成熟(图 3b)。

3. 生孢率的计算: 由于美蓝染色可区分死活细胞, 因此计算生孢率时, 可排除死细胞的影响, 即

$$\text{生孢率} = \frac{\text{生孢的子囊数}}{\text{活营养体细胞} + \text{生孢的子囊数}}$$

由此计算方法得出的生孢率, 比文献报道^[1]值偏高, 原因就在于生孢率的计算公式中, 分母中扣除了不能生孢的死细胞一项所致。

4. 美蓝染色的特点: 与检测酵母菌子囊孢子常用的孔雀绿-番红染色法及石炭酸复红-美蓝染色法相比, 具有以下特点: 涂片无须干燥, 操作简单、迅速。由于细胞不同组分对美蓝的还原力不同, 因此容易区分子囊孢子与营养细胞, 还能观察处于生孢不同阶段的细胞形态。能区分死活细胞, 使生孢率的计算得以改进。与碘液法相比, 适应性更好, 层次也更清楚。

酵母子囊孢子的美蓝染色法, 简便、快速、实用, 可在教学、科研和生产中应用。用该染色法观察了三株不同属酵母的生孢培养物, 均取

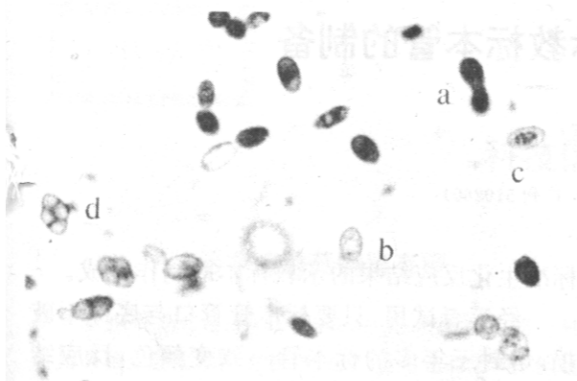


图1 AS2.399 美蓝染色图(×1200)

a. 死细胞;b. 活细胞(含液泡);c. 活细胞(液泡消失);d. 含4个孢子的成熟子囊

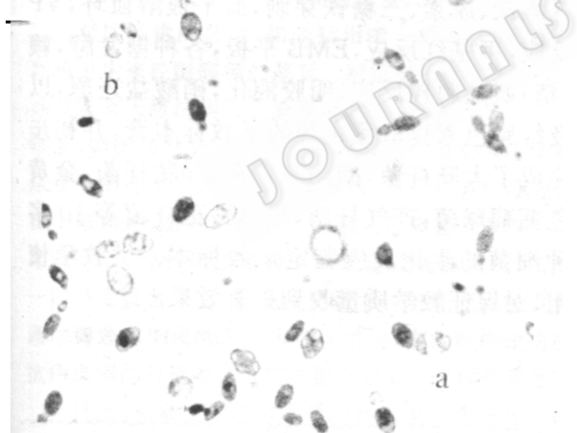


图2 AS2.399 美蓝染色图(×1200)

a. 第一次减数分裂后的二核细胞
b. 正在进行减数分裂的细胞

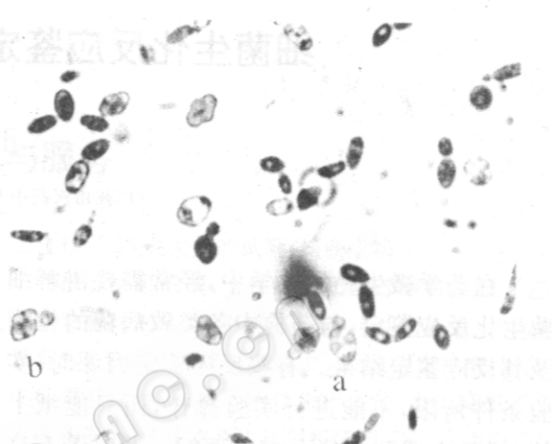


图3 AS2.399 美蓝染色图(×1200)

a. 第二次减数分裂后的四核细胞(即含4个原孢子的不成熟子囊)
b. 含4个孢子的成熟子囊

得良好效果。能观察到生孢的不同阶段,在微生物教学工作中更有使用价值。

参 考 文 献

1. 高东等:中国酿造,2:13,1983.
2. 王金盛等:中国调味品,7:5,1990.
3. 胡瑞卿:微生物学通报,17(2):84,1990.
4. 熊春林:微生物学通报,19(4):248,1992.
5. 白毓谦等:微生物实验技术,第478页,山东大学出版社,济南,1987.

(1992-12-22 收稿)