

菌核侧耳菌丝染色方法的研究

李荣同* 龚光禄 陈连水 包水明 杜伟

(东华理工大学生物系 江西 抚州 344000)

摘要: 在对菌核侧耳单双核菌丝进行染色方法的研究中,通过采用不同的菌丝培养方法,比较2种固定液及3种染液的染色效果,优化出菌丝染色方法,进而得出一套稳定可靠的鉴定菌丝的细胞核染色技术。

关键词: 菌核侧耳, 单核菌丝, 双核菌丝, 细胞核染色

A Optional Staining Method for the Hyphae's Nuclear of *Pleurotus tuber-regium*

LI Rong-Tong* GONG Guang-Lu CHEN Lian-Shui BAO Shui-Ming DU Wei

(East China Institute of Technology, Department of Biology, Fuzhou, Jiangxi 344000, China)

Abstract: We have obtain a steady and reliable dyeing methods for the uniuucleate and dicaryotic hyphae of *Pleurotus tuber-regium* by using different foster hyphae way, comparing two kinds of fastness liquid and three dye stuff on the hyphae nuclear stain effect, and then optimization grouping.

Keywords: *Pleurotus tuber-regium*, Uninucleate hyphae, Dicaryotic hyphae, Nuclear stain

目前,真菌菌丝按细胞核的数目分为单核、双核及多核菌丝。因此单核、双核菌丝的确定是进一步确认菌丝融合群^[1],及其运用生化和分子生物学等手段对其遗传多样性和系统演化关系等方面研究的第一步,也是关键的一步。据报道,国内外学者康振生^[2]、黄江华^[3]、宁平^[4]、Bandoni^[5]、Tu^[6]、Yamamoto^[7]等,他们在真菌细胞核染色方面已作了大量的探讨工作,但以担子真菌为材料进行研究的较少。本实验用担子真菌中的菌核侧耳为研究材料,采用3种不同的菌丝培养方法,分别用Giemsa染液、改良苯酚品红染液以及醋酸洋红染液对担子真菌菌丝的染色技术与方法进行的研究比较,以期从中优化出菌丝染色方法,应用于菌丝的细胞核染色鉴定,进而为食用菌的遗传育种、原生质体单核化、融合

群的归属以及食用菌染色体工程等方面的发展与研究提供稳定可靠的技术手段。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

东华虎奶 1号^[8]菌株,由东华理工大学食用菌研究中心提供。

1.2 培养基

PDA 固体斜面培养基;黄豆浆液体培养基(PDY)。参照文献^[8]的配制方法配制。

1.3 试剂

F.A.A 固定液;卡诺氏固定液(Carnoy's Fluid);改良苯酚品红染液;醋酸洋红(Aceio Carmine)染液;姬姆萨染液。参照文献^[3]、^[4]、^[9]的配制方法

* 通讯作者: Tel: 86-794-8258851; ✉: lirongtong@163.com
收稿日期: 2008-12-03; 接受日期: 2009-02-04

配制。

1.4 实验步骤

1.4.1 菌丝获得: 单核菌丝, 通过子实体孢子喷射法^[4]收集纯化单孢子, 培养出单核菌丝。

双核菌丝, 由东华理工大学食用菌研究中心提供。

1.4.2 菌丝培养方法: 气生菌丝, 将单核、双核菌丝分别接种于PDA斜面固体培养基中, 待菌丝长满1/2试管后备用; 基内菌丝, 将单核、双核菌丝分别接种于PDY液体培养基中, 25°C、150 r/min下摇瓶培养5 d~6 d备用; 玻片菌丝, 将单核、双核菌丝分别接种于PDA平皿固体培养基中, 并插入洁净无毒的盖玻片, 让菌丝直接长在盖玻片上, 待菌丝长至盖玻片1/3处时取出盖玻片备用^[8]。

1.4.3 实验流程: 材料培养-展片-固定-染色-镜检

1.5 研究方法

1.5.1 不同的菌丝培养方法对展片效果的影响: 分别取出上述培养的基内菌丝、气生菌丝和玻片菌丝, 在滴有水滴的载玻片上进行展片, 待其干燥后于显微镜下低倍观察其菌丝的展片情况。如此重复4组, 取平均。

1.5.2 不同固定液对染色效果的影响: 取出上述实验中展片效果最好的单核菌丝, 置于载玻片上, 滴加FAA和Carnoy's固定液, 分别固定0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、20 h、24 h后, 进行染色, 待其干燥后于显微镜高倍镜下观察。重复4组, 取平均。

1.5.3 不同染色时间对染色效果的影响: 取出上述实验中展片效果最好的单核菌丝, 置于载玻片上, 用上述实验中固定效果最好的方法固定后, 滴加适量的Giemsa染液, 分别染色0、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min。洗掉多余的染液, 待其干燥后于显微镜高倍镜下观察。重复4组, 取平均。对双核菌丝亦作同样的处理。

1.5.4 不同染液对染色效果的影响: 取出上述实验中展片效果最好的单核菌丝, 置于载玻片上, 用上述实验中固定效果最好的方法固定后, 分别滴加适量的姬姆萨染液、改良苯酚品红染液以及醋酸洋红染液, 染色时间为上述中效果最好的时间后。洗掉多余的染液, 待其干燥后于显微镜高倍镜下观察。重复4组, 取平均。对双核菌丝亦作同样的处理。

2 结果分析

2.1 不同的菌丝培养方法对展片效果的影响

据1.3.1的方法, 得到结果见表1。由表可知, 玻片菌丝的展片效果最好, 重叠菌丝少或无, 菌丝沿着玻片辐射开, 菌丝整齐无紊乱纠缠现象, 展片后的菌丝断裂无或少, 并且总能在盖玻片上找到合适的观察范围。基生菌丝较好, 但菌丝重叠现象相对严重, 在展片后的菌球周围也能找到合适的观察范围。而气生菌丝展片困难, 且菌丝紊乱、断裂严重, 在同一张展片上很难找到合适的观察范围。

表1 不同的菌丝培养方法对展片效果的影响
Table 1 The mycelium of different training methods on the effect of film exhibition

材料 Material	基内菌丝 In base hypha	气生菌丝 Aerial hypha	玻片菌丝 Cover glass hypha
效果 Effect			

注: “▼/▽”: 操作(挑展)易/难; “/”: 重叠轻/严重; “▲/△”: 紊乱纠缠轻/严重; “/”: 菌丝断裂少/多; “★/☆”: 观察范围广/窄。
Note: “▼/▽”: Operation easy/hard; “/”: Overlap minor/serious; “▲/△”: Entangled disorder minor/serious; “/”: Fracture less/more; “★/☆”: Observation and wide/narrow.

2.2 不同固定液对染色效果的影响

据1.3.2的方法, 染色镜检可知: F.A.A固定液, 对菌丝的渗透力强, 经1 h~2 h时间固定即可, 细胞形态保存较好, 染色均匀、色差明显、结构清晰、核浆对比鲜明。Carnoy's固定液, 对菌丝的渗透力较弱, 固定时间较长12 h~20 h。

2.3 不同染色时间对染色效果的影响

据1.3.3的方法, 得到结果见表2。由表可知: 单核菌丝染色的最佳时间为15 min~20 min; 双核菌丝25 min~30 min。

2.4 不同染液对染色效果的影响

据1.3.4的方法, 得到结果见表3和图1。由表可知: 姬姆萨染液效果最好, 细胞核相清晰隔膜清楚(图1A-B)。改良苯酚品红染液次之, 单核菌丝却隔膜模糊不易辨别(图1C), 双核菌丝染色较淡(图1D)。醋酸洋红染液, 很难观察到核相, 就是偶尔见到核, 也找不到隔膜(图1EF)。

2.5 小结

通过以上的研究可以得出, 担子真菌菌丝染色鉴定方法与步骤为:

1) 菌丝培养 一般采用 PDA 平皿插片法让菌丝直接长在盖玻片上;

2) 固定 取出培养好的菌丝用 F.A.A 固定液进行固定 1.5 h~2.0 h;

3) 清洗 用清水冲洗固定好菌丝 3~5 次, 然后自然晾干(或酒精灯焰干燥)。

4) 染色 在菌丝处滴加适量 Giemsa 染液, 染色 15 min~20 min(双核 25 min~30 min)。

表 2 不同染色时间对染色效果的影响
Table 2 Different time of the dye staining effect

时间 Time (min)	0	5	10	15	20	25	30	35	40
单核菌丝 Uninucleate hyphae	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
双核菌丝 Dicaryotic hyphae	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++

注:“-”: 菌丝模糊透明, 核浆分辨不清;“+”: 可见胞壁核相不清;“++”: 可见暗的胞壁和核;“+++”: 胞壁和核相清晰可见。

Note:“-”: Fuzzy mycelium and transparent, clear to distinguish the nucleus;“+”: Only walls are stained and no clarity;“++”: Walls and nuclei are very faintly stained;“+++”: Walls and nuclei are stained with clarity.

表 3 不同染液对染色效果的影响
Table 3 Different dye stain on the effect of

染液 Dye	姬姆萨染液 Giemsa dye	改良苯酚品红染液 Improved fuchsin phenol dye	醋酸洋红染液 Aceio Carmine
单核菌丝 Uninucleate hyphae	+++	++	-
双核菌丝 Dicaryotic hyphae	+++	++	+

注:“-”: 胞壁核相不清;“+”: 可见胞壁核相不清;“++”: 可见暗的胞壁和核;“+++”: 胞壁和核相清晰可见。

Note:“-”: Walls and nuclei are stained no clarity;“+”: Only walls are stained and no clarity;“++”: Walls and nuclei are very faintly stained;“+++”: Walls and nuclei are stained with clarity.

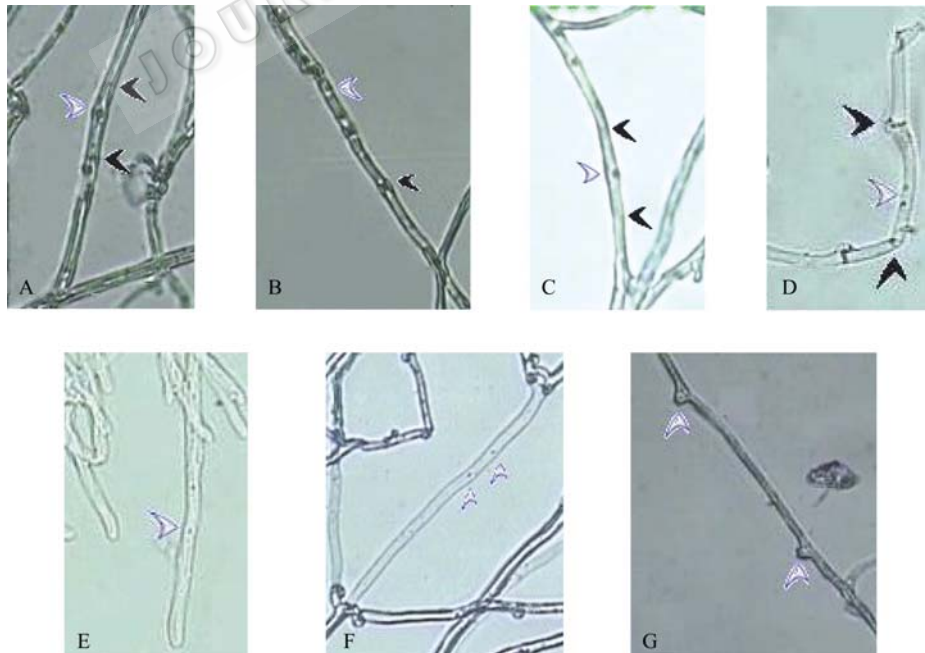


图 1 不同染液染色效果图(400×)

Fig. 1 The effect maps of different dye staining(400×)

注: ACE: 单核菌丝; BDFG: 双核菌丝; AB: Giemsa 染液; CD: 改良苯酚品红染液; EF: 醋酸洋红染液。

Note: ACE: Uninucleate hyphae; BDFGH: Dicaryotic hyphae; AB: Carnoy's fluid; CD: Phenol improved magenta dye; EF: Aceio carmine.

5) 清洗 倾斜玻片,用清水缓缓冲洗,直至流水变清。

6) 镜检 自然(或酒精灯焰)干燥后低倍镜下找到视野,再换高倍镜下进行镜检。

3 讨论

一种状似锁臂的菌丝连接锁状联合,是大多数担子真菌双核细胞分裂繁殖的一种方式^[10]。因此,在近年报道的许多文献中,常常通过在显微镜下观察菌丝,若无锁状联合就是单核菌丝^[11],有锁状联合的为双核菌丝^[12]。但是,本文作者在观察菌丝时发现,单核菌丝生长过程中由于产生一定量的厚垣孢子而紧贴在菌丝上,而形成锁状联合假象。并且,在双核菌丝的生长初期也很难看到其锁状联合现象(如图 1B)。因此,在显微镜下通过观察菌丝有无锁状联合来鉴定单核、双核菌丝是不够准确的。

目前,进行真菌菌丝的染色鉴定技术主要有荧光染色技术与普通的碱性核染液染色技术。据报道,1993年康振生等所探讨的双重荧光染色技术通过确定细胞核数目来鉴定菌丝,虽然荧光染色技术能使核发出较强的荧光,但胞壁却很难发出荧光,因此,在观察过程中不能观察到菌丝隔膜^[7],且该技术设备要求高。2001年黄江华等,比较了5种不同的染色方法对丝核菌细胞核的染色效果,得到了番红O-KOH染色效果好,但其显微镜下的菌丝隔膜和核相任然很模糊^[3]。宁平等用多孔菌中的茯苓菌为材料,对Giemsa、番红O-KOH、结晶紫、石炭酸碱性复红以及Hoechst33258,5种染料对茯苓菌丝进行染色研究。得出,Giemsa染色效果最好,虽然两个核相非常清晰,但难以辨别出是否有锁状联合和菌丝隔膜^[4]。

笔者选用担子真菌中的菌核侧耳为研究材料,采用3种不同的菌丝培养方法,分别用Giemsa染液、改良苯酚品红染液以及醋酸洋红染液对担子真菌菌丝的染色技术与方法进行比较研究。得出,菌丝直接长在盖玻片上的菌丝展片效果最好,其次是

用液体培养基(PDY)培养的基生菌丝。而染液为Giemsa染液效果最好,改良苯酚品红染液次之,醋酸洋红染液效果最差(见图1)。另外,笔者在研究中发现,在很多情况下,双核菌丝锁状联合的喙状突起内存在一个细胞核(图1G-H)。其原因,是锁状联合时核移动的过程,还是保留在喙突中完成核行为,尚待进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] 李华荣. 丝核菌的菌丝融合群及其遗传多样性研究的新进展. 物系统, 1999, 18(1): pp.100-107.
- [2] 康振生, 李振岐, 商鸿生. 等. 植物病原真菌细胞核和隔膜的双重荧光染色技术. 真菌学报, 1993, 12(2): pp.174-176.
- [3] 黄江华, 杨媚, 戚佩坤. 等. 丝核菌细胞核染色技术的研究. 仲恺农业技术学院学报, 2001, 14(4): pp.13-17.
- [4] 宁平, 程水明. 茯苓菌丝的核相及染色技术研究. 安徽农业科学, 2006, 34(19): pp.4887-4888.
- [5] Bandoni Andoni RJ. Sufranin O as a nuclear stain for fungi. *Mycologia*, 1979, 71: pp.873-874.
- [6] TU CC, Kimbroug JW. A rapid staining technique for *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia*, 1973, 65: pp.941-944.
- [7] Yamamoto DT, Uchida JY. Rapid nuclear staining of *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia*, 1982, 7(4): pp.145-149.
- [8] 李荣同, 包水明. 大型珍稀真菌——菌核侧耳. 中国文化教育出版社出版, 2005, 11, pp.70-96.
- [9] 郑国昌. 生物显微技术. 人民教育出版社, 1978, pp.5-43.
- [10] 黄年来. 中国食用菌百科. 北京: 中国农业出版社, 1993, pp.68-85.
- [11] 申进文. 香菇939菌株单核菌丝和双核菌丝多糖产量比较. 园艺学报, 2007, 34(4): pp.941-946.
- [12] Lin Fangcan, Wang Zhongwen, Dai Jianghong. Application of OWE-SOJ technique to the determination of mating interactions in *lentinula edodes*. *Acta Edulis Fungi*, 2000, 7(4): pp.8-10.