

一种便于丝状真菌显微观察的培养方法

孙建广¹, 周欣¹, 肖佳雷², 尹静^{1,*}, 詹亚光¹, 战妍¹, 姜丽超¹, 巩媛¹

¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040; ²黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所, 哈尔滨150086

摘要: 在真菌培养过程中, 对其个体形态与群体(菌落)形态进行实时观察与鉴定是很必要的。本文利用半培养基培养法结合显微操作技术, 对丝状真菌个体与群体进行形态学观察。结果表明, 该方法无需染色与制片, 不破坏菌丝正常生长状态, 可实时进行形态学检测, 对多个菌种在自然生长状态下的菌丝与菌落特征进行观察, 操作简单、方便、快捷, 从而降低了成本及工作量。

关键词: 丝状真菌; 形态观察; 鉴定

A Convenient Culture Method for Observing Filamentous Fungi

SUN Jian-Guang¹, ZHOU Xin¹, XIAO Jia-Lei², YIN Jing^{1,*}, ZHAN Ya-Guang¹, ZHAN Yan¹, JIANG Li-Chao¹, GONG Yuan¹

¹College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Farming and Cultivation Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

Abstract: It is important to observe and identify the morphology of individual form and group (colony) during the cultivation of fungi. In this study, half medium combined with micromanipulation technique was used to observe the morphological changes in individual and group of filamentous fungi. The results showed that this novel method could be used to make real-time measurements of the morphology of filamentous fungi without dyeing and slicing, and does not affect the normal growth of mycelia. In addition, it can be applied to many strains for observing the mycelium undergoing natural growth and the colony characteristics simultaneously. Overall, in this experiment, a simple and rapid method is designed for the observation of individual and colony morphology of filamentous fungi, which needs a low cost and workload.

Key words: filamentous fungi; morphological observation; identification

由于植物内生真菌物种丰富, 数量庞大, 而且与其他生物之间具有紧密的生态关系, 为天然活性物质的丰富来源, 因而引起人们的广泛关注, 成为目前国内外研究的热点之一(官珊等2005; Kumar等2012; Zhang等2011; 周芳等2003; Deng等2013), 因此, 如何快速、有效地观察和鉴定数量庞大的内生真菌种属分类及其生长特性显得尤为重要(彭钧2010; 龚国利等2012)。对于丝状真菌的鉴定, 通常采用宏观特征观察与分子鉴定相结合的方法(杜连祥和路福平2006; 魏超等2012; 刘烁等2012)。根据丝状真菌的形态特征, 宏观特征鉴定方法又分为个体形态和群体形态特征的鉴定(沈平和陈向东2007)。因此, 同时获得较好的菌丝显微特征与菌落特征对真菌鉴定至关重要。

然而, 在研究丝状真菌形态特征的传统方法中, 个体与群体的形态观察往往分开进行, 在个体形态观察中以制片观察为主, 包括菌丝挑取制片法(杜连祥和路福平2006)、插片法(苏鸿雁等

2006)、载片培养法(林启美1997; 沈平和陈向东2007)、琼脂槽培养法(林启美1997; 杜连祥和路福平2006)、仪器设备自动制片法(刘烁等2012; 翁秀琴等2012)等。这些方法有以下不足之处: (1)菌丝挑取制片往往出现菌丝重叠、菌丝自然生长状态遭到破坏的现象, 不能获取正常的真菌显微形态; (2)载片培养法需要制作湿室, 操作过程繁琐复杂, 对操作人员以及实验器材要求较高; (3)仪器设备自动制片法要求样本在压力差作用下, 待检样品通过选择性过滤膜的筛选后进行制片和观察, 该方法仅局限于细胞、细菌、花粉等颗粒材料, 无法对丝状材料进行制片, 且处理过程中有外力作

收稿 2013-09-16 修定 2014-01-20

资助 国家基础科学人才培养基金(J1210053)、国家自然科学基金(31101171)、东北林业大学高等学校教学改革及细胞生物学重点课程建设项目。

* 通讯作者(E-mail: yinjing20135@163.com; Tel: 0451-82191752)。

用,无法使材料保持自然状态,同时,仪器设备较为昂贵。以上方法在获取真菌显微特征的同时,均不能获得菌落层次上的形态特征,在丝状真菌观察鉴定中增加了工作量。因此,在丝状真菌观察鉴定工作中有必要建立新的方法。本实验方法将丝状真菌个体形态观察与群体(菌落)形态观察相结合,无需制片,操作简便、高效,在以往文献中尚未见报道。

材料与方法

材料为从黑龙江省野生大豆(*Glycine soja* Sieb. et Zucc.)分离出来的内生真菌:黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)菌株Y-5-L-5和Ysy-s 21-3、锐顶镰刀菌(*Fusarium acuminatum*)菌株Sys1、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)菌株Y2r 23。

采用刘尹强等(1993)的方法配制PDA (potato dextrose agar)培养基,灭菌后备用。使用前将培养基融化,在无菌、干燥的培养皿中加入10~15 mL,待其冷凝后制成2~3 mm厚度的平板;用无菌手术刀沿培养基直径垂直于培养皿底部进行切割,移去一半培养基,并用刀片清理干净培养基碎片;将带有一半培养基的培养皿正面开口朝上放在超净工作台内,蒸发多余水分使其微干;用接种针挑取待鉴定的真菌培养物,接种于培养基与培养皿交界处,盖上培养皿盖子,用石蜡膜密封后标记,于28 °C下黑暗中培养。根据丝状真菌的生长特点,选取不同培养时间进行观察。以在完整培养基平板上培养的菌丝为对照。

真菌菌落外观形态特征采集采用日本佳能60D相机(18~200 mm IS),技术参数为:APS-C规格数码相机单反,1 800万有效像素,10倍光学变焦。对菌落的显微观察使用德国蔡司公司的正立生物显微镜Axioskop 2 plus FL,技术参数:消色差-消球差多功能聚光镜;照明系统为100 W卤素灯,柯勒照明;五档荧光分光器;HB050, HB0103光源。采用Axioplan 2 imaging MOT软件进行图像采集与分析。

结果与讨论

图1显示,纯化培养20 d的黑附球菌Y-5-L-5在完整培养基与半培养基上生长的菌落特征差异不大,菌落平坦,中央呈橙黄色,菌落外围呈现白色

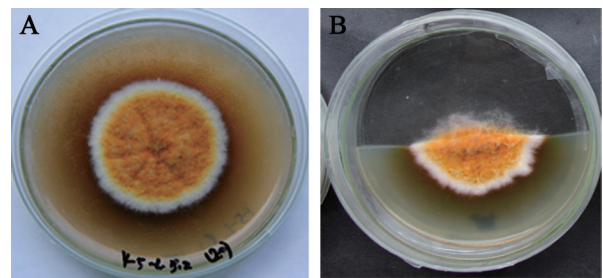


图1 黑附球菌Y-5-L-5在完整培养基(A)与半培养基(B)中菌落生长的比较

Fig.1 Growth comparison of *E. nigrum* Y-5-L-5 colony on complete culture medium (A) and half culture medium (B)

菌丝,菌落生长过程中出现同心圆和放射纹,其质地呈毡状,分泌橙黄色物质到培养基中。采用半培养基培养时,由于无培养基的一侧营养匮乏,以致菌落生长缓慢,菌丝稀疏,无黄色物质分泌,培养皿底层透明,透光度良好,可清晰辨别正在生长的白色菌丝,便于菌丝菌落特征的显微观察;在有培养基的一侧,菌丝生长正常,可对菌落特征进行观察和描述,获得不同生长时期的菌落特征,包括大小、颜色、表面的纹饰、质地、高度、边缘、基面着色以及外渗物情况等,可作为分类鉴定的依据。

采用蔡司Axioskop 2 plus FL荧光显微镜的不同放大倍数,对半培养基中黑附球菌Y-5-L-5的菌落进行显微结构观察。结果显示,半培养基一侧的菌落显微结构清晰,菌丝呈透明状,有隔和显著的分枝,菌丝生长过程中相互连接,形成梯状或网格状,菌丝中部分隔间充满黄色分泌物(图2-C),且有渗出(图2-C),菌丝分隔处有多个细胞核聚集(图2-C),暂无孢子着生。

真菌孢子的形成是生殖循环的终结,是真菌的休眠体,观察孢子萌发在某些真菌的分类鉴定上有一定的价值。图3显示的为半培养基上不同菌落孢子的显微结构(蓝色滤光片下),可清晰地观察到锐顶镰刀菌由气生菌丝特化而形成的真菌孢子头,其中孢子排列规则(图3-A);同时还可观察到尖孢镰刀菌菌丝生长后期游离的棒状或颗粒状的孢子(图3-B和C)及黑附球菌菌丝聚集在一起形成的子囊壳(图3-D)。可见,采用半培养基法,可对真菌孢子形态、结构、数量、着生方式及菌丝的特

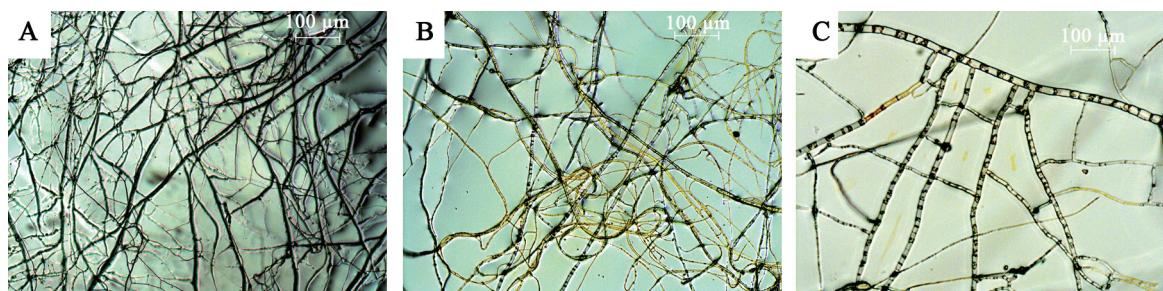


图2 半培养基上黑附球菌Y-5-L-5菌落的显微结构观察

Fig.2 Microstructure of *E. nigrum* Y-5-L-5 colony on half culture medium

目镜为10×;物镜分别为:2.5×(A)、10×(B)和20×(C)。

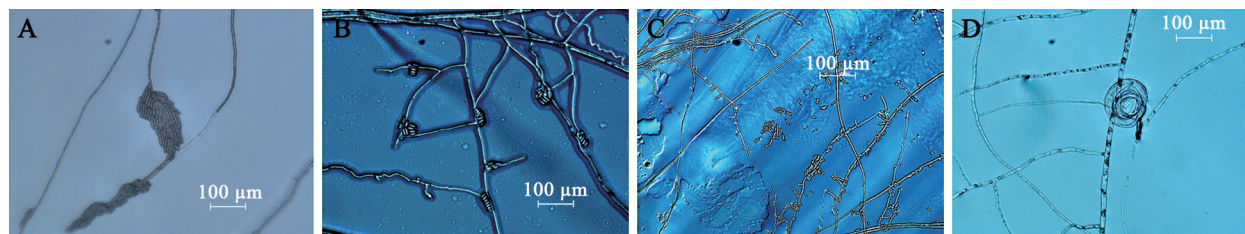


图3 半培养基上菌落孢子的显微结构观察(20×)

Fig.3 Microstructure of spore colonies on half culture medium (20×)

A: 锐顶镰刀菌; B、C: 尖孢镰刀菌; D: 黑附球菌。

化结构(如菌丝束、子座和菌核等)进行显微观察,有助于菌种的鉴定。

本文的方法将丝状真菌个体与群体(菌落)的形态观察相结合,无需染色与制片,操作简单,能保证真菌生长的稳定性,更好地反映样品的实际情况,而常规的真菌菌丝观察方法需挑菌、制片或染色,加盖玻片,很难使菌丝保持良好的结构,且操作繁琐、费时费力(林启美1997; 马天等2011; 张媛等2012; 蒋莲秀等2013)。另外,本文的方法可更准确鉴定真实状态下菌丝的生长长度及结构特征,为微生物学菌落特征的鉴定提供了一种简单而快速的新方法。但该方法也有不足之处。首先,由于培养皿有一定厚度(1 cm左右),用培养皿直接对生长在皿中的菌丝进行观察和照相时,物镜最大倍数仅能调节到40×进行观察,不能进行100×物镜的显微观察,因此,如需研究更为精细的特征,还要进一步结合显微制片的方法。其次,菌株培养过程中,由于菌种不同,可能在培养后期会有液体分泌物存在,若分泌物过多,培养皿表面会存在水蒸气,不利于观察;但如能在菌丝生长过程的不同时期及时观测,可避免此现象发生。另外,采用

半培养基进行真菌培养时,由于无培养基的一侧营养不足,菌丝体生长受到影响,如色素积累量、生长速率等均显著低于有培养基的一侧,这不利于真菌分泌产物和生长量的鉴定。然而,根据我们用此法对从野生大豆中分离的100余株内生真菌菌落进行观察和测序鉴定的结果来看,其对培养早期菌丝生长、孢子形态、结构、数量、着生方式及菌丝的特化结构影响并不大,因为一般在5~8 d已完成产孢及菌丝特化结构的形成(真菌接种在半培养基中有培养基一侧的边缘,前期营养可供应菌丝生长),在此期间进行菌丝形态学观察,能够反映出真菌的正常生长状态而不影响分类的形态学鉴定。如在形态学鉴定的同时还需分析生长量和次生产物,可利用半培养基中有培养基一侧的菌丝体进行检测。

参考文献

- 杜连祥,路福平(2006). 微生物学实验技术. 北京: 中国轻工业出版社, 23~24
 龚国利,陈志宣,陈松,王娜,刘丽丽(2012). 高产漆酶白腐真菌的分离与鉴别. 陕西科技大学学报(自然科学版), 30 (6): 79~83
 官珊,钟国华,孙之潭,胡美英(2005). 植物内生真菌的研究进展. 仲

- 恺农业技术学院学报, 18 (1): 61~66
- 蒋莲秀, 黄光玲, 吴丹, 何义, 钟毓娟(2013). 三种常用细菌染色法的改良. 医学理论与实践, 26 (8): 1068~1069
- 马天, 宋月星, 邹先彪(2011). 真菌的组织病理学特殊染色. 中国真菌学杂志, 6 (6): 367~369
- 林启美(1997). 琼脂薄片法在土壤细菌和真菌生物量测定中的应用. 中国农业大学学报, 2 (增刊): 59~64
- 刘烁, 潘锋, 肖文(2012). 基于数字全息活体细胞动态相衬显微观察. 北京航空航天大学学报, 9: 21~27
- 刘尹强, 王雅平, 潘乃穰, 陈章良(1993). 马铃薯葡萄糖琼脂干燥培养基的制造方法. 专利号: 93104723
- 彭钧(2010). 一种细胞或细菌的染色方法. 专利号: 201010529398
- 沈平, 陈向东(2007). 微生物学实验. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 51~58
- 苏鸿雁, 李明, 刘晓轩(2006). 捕食线虫真菌玻片制作方法的改进. 大理学院学报, 5 (6): 25~26, 30
- 魏超, 郭灵安, 戴晓航(2012). 草莓微生物学检查及肠杆菌和霉菌鉴定. 西南农业学报, 25 (6): 2104~2107
- 翁秀琴, 朱伟峰, 张振华(2012). Gomori氨银-微波法染色显示真菌在临床的应用. 检验医学与临床, 9 (21): 2743~2744
- 张媛, 张媛媛, 万康林, 李振军(2012). 诺卡菌的培养和染色特征研究. 中国人兽共患病学报, 28 (3): 230~236
- 周芳, 高玉葆, 马文江(2003). 缺磷对黑麦草-内生真菌共生体生长和根中酚含量的影响. 植物生理学通讯, 39 (4): 321~324
- Deng Z, Zhang R, Shi Y, Hu L, Tan H, Cao L (2013). Enhancement of phytoremediation of Cd- and Pb-contaminated soils by self-fusion of protoplasts from endophytic fungus *Mucor* sp. CBRF59. *Chemosphere*, 91: 41~47
- Kumar V, Rajauria G, Sahai V, Bisaria VS (2012). Culture filtrate of root endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes the growth and lignan production of *Linum album* hairy root cultures. *Process Biochem*, 47: 901~907
- Zhang G, Sun S, Zhu T, Lin Z, Gu J, Li D, Gu Q (2011). Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*, 72: 1436~1442