

小麦条锈菌夏孢子芽管核染色方法的改进研究*

李振岐 陆和平 马青 E.L.Sharp M.Reinhold

(西北农学院植保系) (美国蒙大拿大学植病系)

海登汉氏苏木精法也称铁矾苏木精法⁽¹⁾,是常用的真菌细胞核染色方法,R.Little & J.G.Manners (1969)⁽²⁾曾报导用此法可对小麦条锈菌夏孢子芽管核进行染色,但R.B.Volin (1971)⁽³⁾;井金学、商洪生(1980);李振岐、E.L.Sharp和M.Reinhold (1983)在对小麦条锈菌夏孢子芽管核的染色试验中均发现用此法染核难以掌握。为此,李振岐和E.L.Sharp等于1983年3—4月结合小麦条锈菌异核作用研究需要,对海登汉氏苏木精染色方法进行了改进研究。在反复试验中发现,改用稀释乳酚油做分色剂,并将分色步骤移到用桔红G染色之后,可比较容易地对小麦条锈菌夏孢子芽管核进行染色。1983年5月—1984年8月李振岐、陆和平、马青等又在此基础上进行了补充改进试验,着重研究了染色时间及本方法的适应范围和与此法配套的相应的制片技术等。现此项研究已基本完成,简报如下。

一、小麦条锈菌夏孢子芽管核染色方法的改进研究

自1983年3月至1984年8月,我们先后在美国蒙大拿大学植病系和西北农学院植保系对用海登汉氏苏木精染色法染小麦条锈菌夏孢子芽管核进行了一系列改进试验,研究出了一套较好的改进式海登汉氏苏木精染核方法。现将染色方法步骤介绍如下:

1.孢子水化:将供试夏孢子放在表面皿内,置干燥器中,在18—25℃下保湿6—24小时,使之充分吸水膨胀。

2.制备培养基平板:将洁净、经过干热灭菌的载玻片在刚刚融化的0.2%水洋菜培养基上轻轻地平沾一下,随即翻转朝上,置于水平支架上,待凝固后备用。

3.将水化后的夏孢子用干毛笔轻轻地蘸起,均匀地弹撒在培养基平板上。

4.孢子萌发。在大培养皿内倒入一薄层蒸馏水并平行放置两根短玻璃棒,然后将载有夏孢子的培养基平板放在玻璃棒上,置于7℃冰箱中使孢子萌发,一般经5—8小时,待芽管伸长到孢子的5—7倍时取出。

5.将载有萌发孢子的平板放入50%绍丁氏固定液(Schaudins fluid) (饱和氯化

*①康振生、刘松洁、葛迅、邢优美参加了部分工作。

②本刊编辑室收到此稿时间:1984年9月22日。

汞水溶液100毫升，无水乙醇50毫升，蒸馏水150毫升，冰醋酸6毫升），固定1小时。

6.水洗：细心地用蒸馏水漂洗两次。

7.干燥：将平板放入42℃的恒温箱中或放在加热板上（复盖防尘），干燥6—24小时。

8.水洗：取出用蒸馏水冲洗1分钟。

9.媒染：在4%铁明矾媒染液（4%硫酸铵水溶液200毫升，冰醋酸2毫升，浓硫酸0.4毫升）中媒染10小时。

10.水洗：取出用蒸馏水冲洗。

11.染色：放入0.5%海登汉氏苏木精染液（苏木精1克，96%乙醇10毫升，蒸馏水190毫升，碘酸钠或碘化钠0.1克）中染色8小时。

12.水洗：取出用蒸馏水冲洗。

13.脱水：在50%、75%、95%和100%酒精中逐级脱水。

14.在0.25%桔红G（orange G）酒精溶液中复染5分钟。

15.用无水酒精冲洗。

16.分色：将平板置于显微镜下，小心滴加分色剂一滴，当观察到芽管细胞质的染色基本褪完、细胞核（染成兰黑色）明显出现时，立即滴加纯甘油，停止褪色，然后加盖玻片进行观察，绘图或拍照。完成褪色后，滴加甘油，用吸水纸吸去分色剂，再用甘油明胶封片可制成半永久性封片。

本染色程序可简化如下表：

孢子水化（6—12小时）→制平板→孢子萌发（7℃ 5—7小时）→固定（1小时）
 ↔42℃干燥（6—24小时）↔铁明矾媒染（10小时）→苏木精染色（8小时）↔脱
 水洗 水洗 水洗
 水（50%→75%→95%→100%酒精）→桔红G染色（5分钟）→稀释乳酚油分
 无水酒精冲洗
 色（在显微镜下）→加纯甘油停止褪色→甘油明胶封片。

自孢子水化、萌发至完成褪色大约经过40小时左右。经很多次的试验，大约对上万个芽管核染色结果充分证明，本方法易于掌握，染色效果良好。正常条锈菌夏孢子芽管中一般为两个核（如附图1），而异核体的夏孢子芽管中则为3个或4个核（如附图2）。

芽管中的核一般被染成兰黑色。

二、小麦条锈菌夏孢子核的直接染色试验

对小麦条锈菌夏孢子核的直接染色不仅可由于免去孢子萌发环节大大节约时间，同时也可比芽管染核更准确地反映异核体的核数。在我们染芽管核过程中有时可观察到少数夏孢子核被染的情况，因而使我们联想到条锈菌夏孢子核的直接染色成功与否，可能与夏孢子的成熟度有关。为此，我们于1984年6—7月对不同成熟度的夏孢子进行了直接染核试验。结果表明，刚刚成熟可抖落的夏孢子染核效果较好。正常的夏孢子一般为

两个核，而异核体的夏孢子为3—4个核（如附图3和附图4）。孢子过嫩，成熟度不够；或成熟过度，已经老化的孢子，染核效果均差。

三、改进式海登汉苏木精染核方法的适用范围测定

为了解改进式海登汉苏木精染核方法的适用范围，1984年3—7月从真菌五个亚门中选择变异性较大的致病菌二十种，即鞭毛菌亚门中的*Phytophthora infestans*, *Peronospora parasitica*；接合菌亚门中的*Rhizopus stolonifer*；子囊菌亚门中的*Gibberella zeae*, *Erysiphe graminis*；担子菌亚门中的*puccinia recondita f.sp. tritici*, *puccinia graminis tritici*, *puccinia striiformis*, *Ustilago hordei*；半知菌亚门中的*Exlerohium (Helminthosporium) turcicum*, *Drechsler (Helminthosporium) maydis*, *Helminthosporium gramineum*, *Fusarium oxysporum f. vasinfectum*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium graminearum*, *piricularia oryzae*, *Gloeosporium fructigenum*, *Rhizoctonia solani*, *penicillium sp*, *Alternaria sp*，进行了染核试验。

试验证明，改进式海登汉苏木精染核方法，对真菌五个亚门中有代表性的20种变异性较大的致病菌的细胞核均有良好的染色效果（参阅附图5—23）。鞭毛菌、接合菌其芽管菌丝无隔，多核；子囊菌、担子菌、半知菌其菌丝隔膜清晰；子囊菌、担子菌核相规则，而半知菌的核变异性很大，特别是菌丝尖端可具1—多核，各种菌不等。此外，还观察到在半知菌、担子菌中其芽管和菌丝之间均有融合现象。在玉米小斑病菌、棉花立枯病菌、禾谷镰刀菌、棉花枯萎病菌和青霉菌中H形菌丝融合现象相当普遍，并且观察到桥丝中有核的移动。

四、结论和讨论

综上一系列试验结果可以得出如下结论：改进式海登汉苏木精染核方法是一种染色效果良好，易于掌握且适应范围相当广泛的真菌细胞核染色方法。可以预期，这一方法的推广应用将为真菌变异和细胞遗传学研究提供一个有力手段。

本改进式海登汉苏木精染色法与R. Little & J. G. Manners所介绍的海登汉苏木精染色方法相比较有以下几点改进：

1. 分色剂改用稀释乳酚油，并且将分色步骤移至用桔红G染色之后。
2. 进一步确定了媒染和染色的时间。
3. 在萌发之前增加了孢子水化环节。
4. 提出了用此法直接染夏孢子核的技术关键和与此法配套的半永久性制片技术。

参 考 文 献

- 1.方仲达:《植病研究方法》,1979年,农业出版社。
- 2.俞大绂:《植物病理学和真菌学技术汇编》,1977年,人民教育出版社。
- 3.郑国锷:《生物显微技术》,1978年,人民教育出版社。
- 4.李振岐:“小麦品种抗锈性丧失问题的研究现状和进展”,1979年,西北农学院印。
- 5.J.H.Burnet 1976《Fundamentals of Mycology》.
- 6.R.Little & J.G. Manners 1969 Somatic recombination in yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) Trans.Br.Mycol,53(2), 259—267.
- 7.R.B.Volin 1971
physiological race determination and enviromental factors affecting the development of infection type in stripe rust (博士论文) .

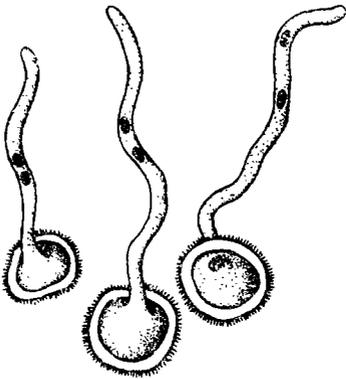


图1 *Puccinia striiformis*
正常夏孢子芽管2核

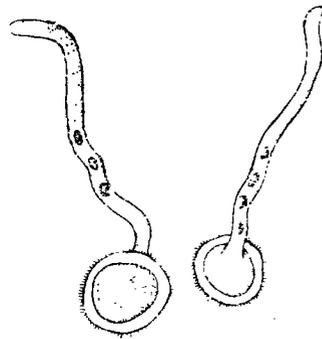


图2 *Puccinia striiformis*
异核体——夏孢子芽管3—4核

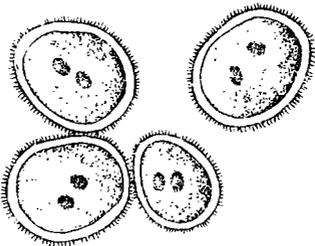


图3 *Puccinia striiformis*
正常夏孢子2核

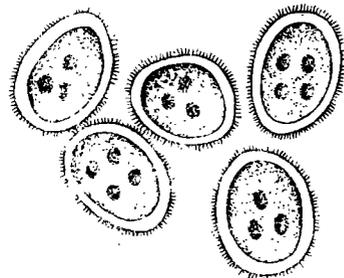


图4 *Puccinia striiformis*
异核体——夏孢子3—4核

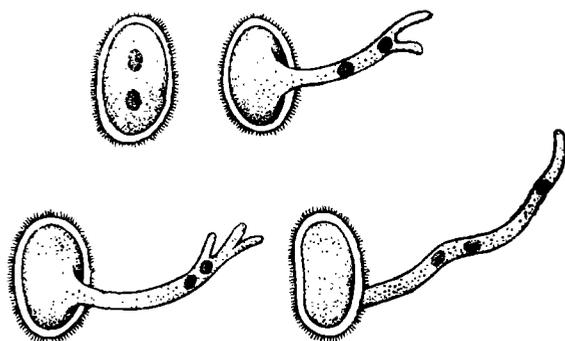


图5 *Puccinia graminis tritici*夏孢子及芽管核相

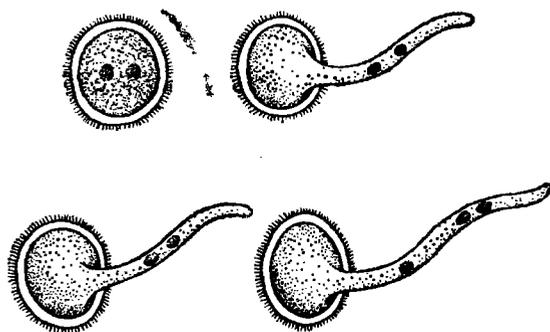


图6 *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*夏孢子及芽管核相



图7 *Rhizopus stolonifer*孢囊孢子芽管及菌丝核相

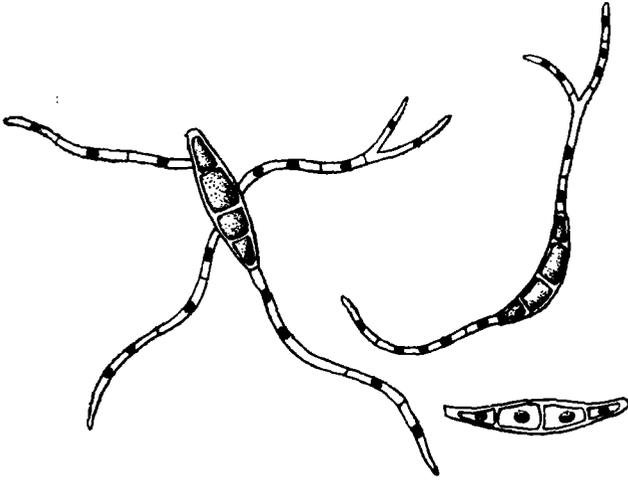


图8 *Gibberella zeae*子囊孢子及芽管核相

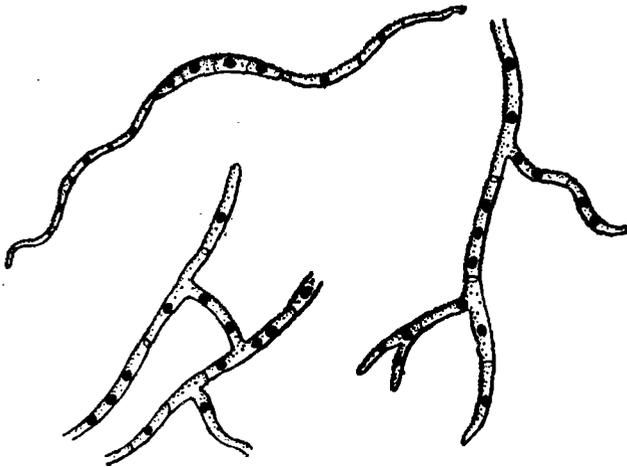


图9 *Fusarium graminearum*分生孢子、芽管及菌丝核相

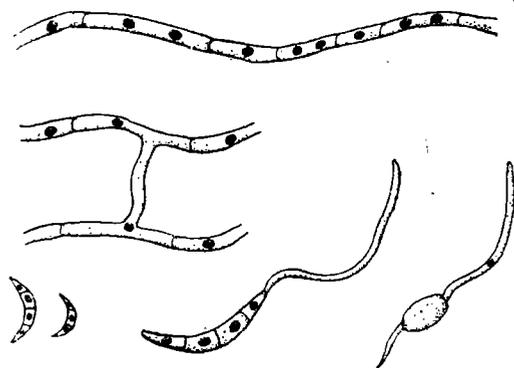


图10 *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* 菌丝、分生孢子及芽管核相

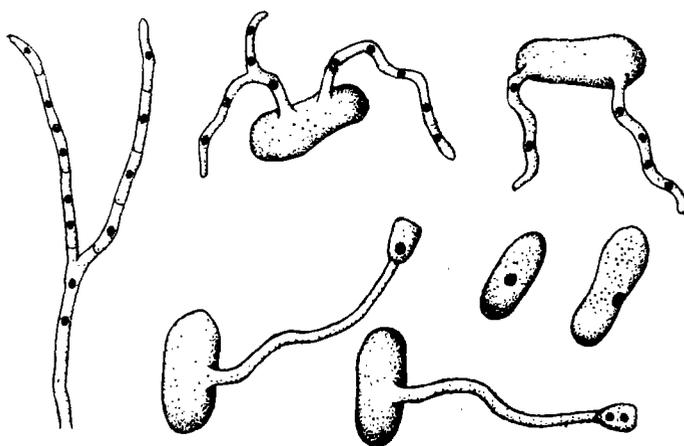


图11 *Gloeosporium fructigenum* 分生孢子、芽管及菌丝核相

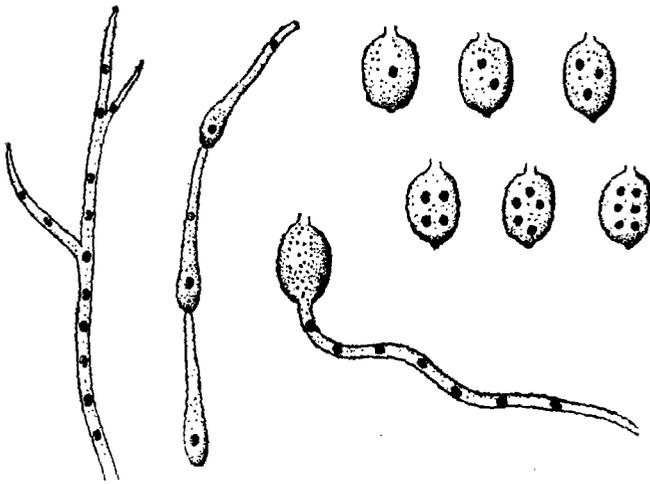


图12 *Phytophthora infestans* 菌丝、孢囊梗、孢子及芽管核相

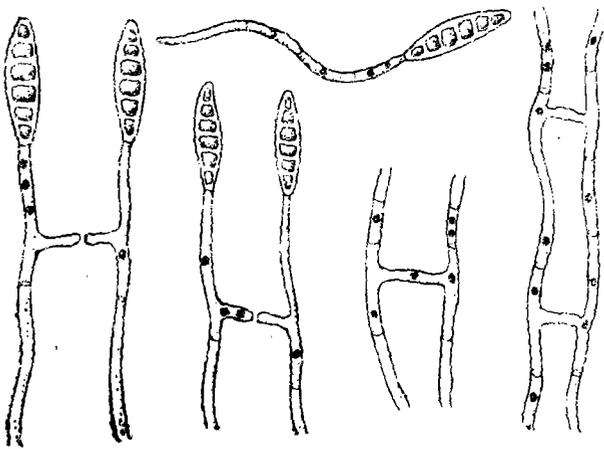


图13 *Drechsler (Helminthosporium) maydis* 分生孢子芽管及菌丝核相

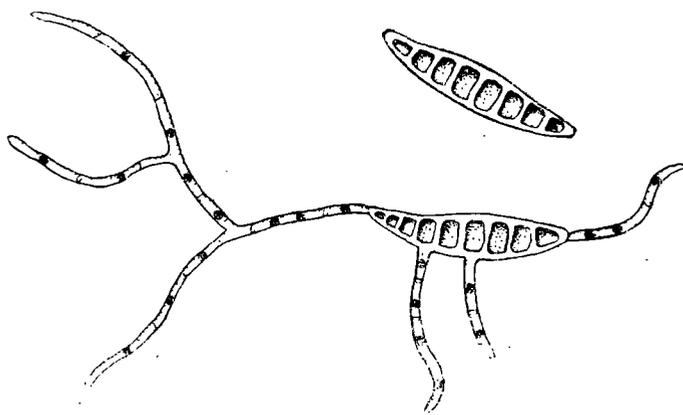


图14 *Exslerohilum* (*Helminthosporium*) *turcicum*分生孢子芽管核相

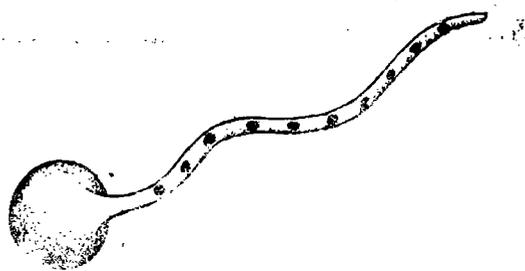


图15 *Peronospora parasitica*孢子囊萌发及芽管核相

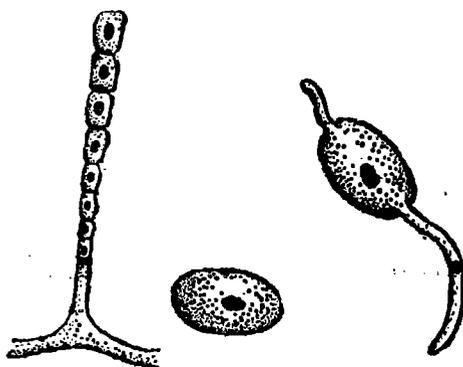


图16 *Erysiphe graminis*粉孢子、芽管核相

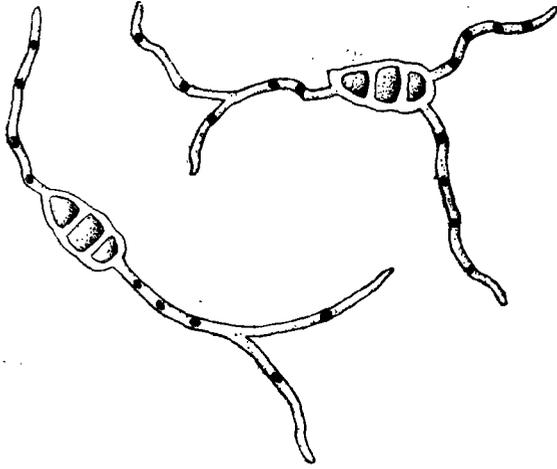


图17 *Piricularia oryzae*分生孢子芽管核相

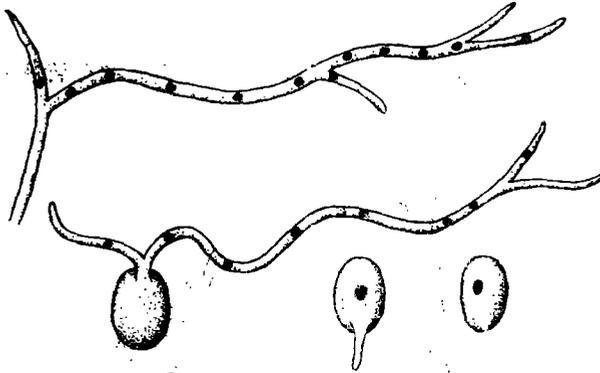


图18 *Verficillium dahliae*菌丝、分生孢子及芽管核相

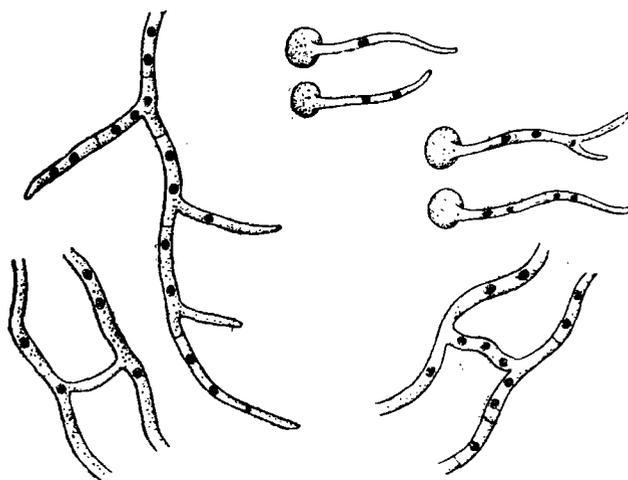


图19 *Penicillium* sp.分生孢子芽管及菌丝核相

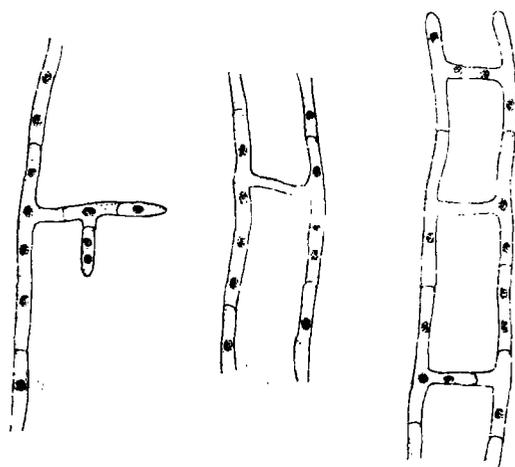


图20 *Rhizoctonia solani*菌丝核相



图21 *ustilago hordei*担子及担孢子核相

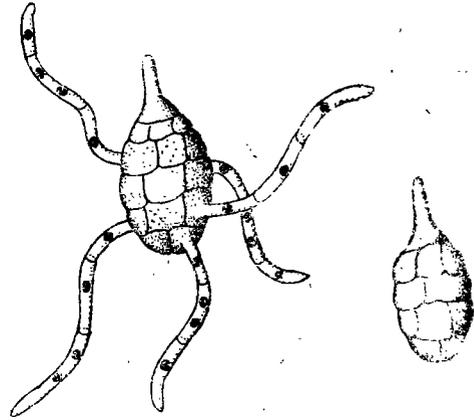


图22 *Alternaria* sp.分生孢子芽管核相

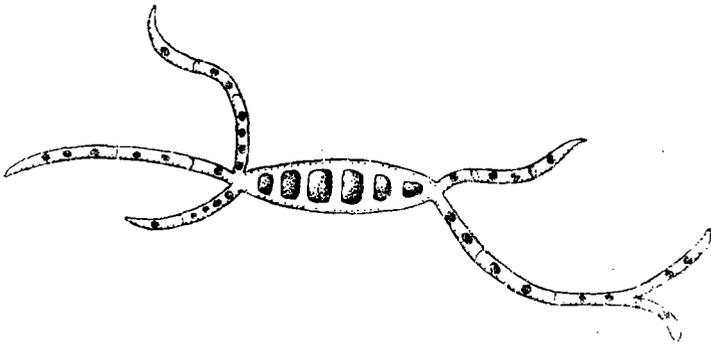


图23 *Heiminthosporium gramineum*分生孢子芽管核相

Studies on Modification Of Haidenhains Haematoxylin Method For Staining Germ Tube Nuclei Of Stripe Rust Of Wheat

Li Zhenqi Lu Heping Ma Qing (North-western College of Agriculture) E.L.Sharp M.Reinhold (Montana State University U.S.A)

Abstract

Haidenhains Haematoxylin is widely used for staining nuclei of fungi. In 1969 R.Little and J.G. Manners reported that they could successfully stain germ tube nuclei of stripe rust by this method. And yet, according to the experiences of R. B. Volin (1971), Jing Jinxue, Shang Hongsheng (1981), Li Zhenqi and E. L. Sharp (1983), it is difficult to use this method to stain germ tube nuclei of stripe rust. For this reason in Feb.-Mar.1983, Li Zhenqi and E.L. Sharp began to modify this method and found that taking dilute (adding $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ glycerin)lactophenol instead of 4 per cent of ferric alum as the differentiator could easily stain germ tube nuclei of stripe rust, and then from May 1983 to April 1984, Li Zhenqi, Lu Heping, Ma Qing et al. continued to modify this method, and found that using this modified Haidenhains Haematoxylin method could successfully stain uredospore nuclei, if the uredospores used are just, ripe, and also found that the nuclei of more than 20 species of pathogenic fungi belonging to 5 suborders could be successfully stained by this method. Thus, we think that the modified Haidenhains Haematoxylin method can be considered as a simple, useful, and widely adaptable method for staining nuclei of fungi.