

小麦条锈菌夏孢子和芽管细胞核 荧光染色技术

康振生 李振岐 商鸿生 马青 王惠文

(西北农业大学植保系, 陕西杨陵·712100)

S432.44

摘 要 用荧光染料 DAPI 研究结果表明, 小麦条锈菌夏孢子染核的最适浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$, 染色时间为 3 min; 夏孢子芽管染核的适宜浓度为 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$, 染色时间为 2~3 min. 本研究还发现 DAPI 对分属于 5 个亚门中的 30 种植物病原真菌的孢子(孢子囊)、芽管和菌丝同样具有较好的染核效果。

关键词 小麦; 双孢锈属; 夏孢子; 细胞核; 染色(生物学)/条锈菌; 芽管; 病原真菌; 荧光染色

中图分类号 Q93-333; Q949.329.302

真菌细胞核染色通常采用海登汉氏苏木精法, 但用该法观察小麦条锈菌夏孢子芽管的细胞核往往难以奏效。李振岐等^[1]对该方法进行了改进, 获得了良好的染色效果, 但染色程序仍较繁复, 时间较长, 分色程度亦较难掌握。为适应小麦条锈菌异核作用研究中检测大量试材的要求, 急需探索程序简便、快速准确的染核方法, 荧光染色是可行的途径, 但关于真菌细胞核荧光染色, 目前国内外仅有少数报道^[2~4]。为此, 作者于 1989~1991 年研究了小麦条锈菌细胞核的荧光染色法, 并对田间快速染色技术和荧光染色所适应的范围进行了深入的探讨。

1 材料和方法

1.1 供试菌种

参试真菌共 30 种, 其中除油菜霜霉菌、莴苣霜霉菌、油菜白锈菌、桃缩叶病菌、桧柏锈菌、海棠锈菌和毛白杨锈菌采自田间外, 其余均为本系植病实验室和植物免疫研究室保存的菌种。

1.2 荧光染料及配制

荧光染料(4,6-Diamidino-2-phenylindole DAPI)为 Sigma 化学试剂公司的产品。称取 3 份 5 mg 的 DAPI, 分别用少量蒸馏水、50%乙醇和 pH6.8 的磷酸缓冲液溶解后, 用相应溶剂定容为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液, 于 4℃ 下避光保存备用。使用时, 用相应溶剂分别将母液稀释成浓度为 10, 5, 3, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的染色液, 用于染色试验。

收稿日期: 1991-10-18

* 国家自然科学基金资助项目

1.3 荧光染色处理

1.3.1 小麦条锈菌夏孢子芽管的染色 小麦条锈菌夏孢子芽管按李振岐^[1]介绍的载玻片萌芽法获得。染色时,在芽管部位滴 1~2 滴染色液。染色液浓度设 10, 5, 3, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 个水平,染色时间分别为 1, 2, 3, 5 min。染色后,经蒸馏水冲洗,滴加 40%甘油,加盖盖玻片,镜检。

1.3.2 小麦条锈菌夏孢子的染色 ①室内制样:在干净的载玻片上分别滴加四个浓度的染色液,然后将新采集的新鲜夏孢子或存放多年(已失活)的夏孢子轻轻抖在染色液上,染色 3~5 min,加盖盖玻片,镜检。②田间制样:在室内先将 1 cm×0.5 cm 的双面胶带纸贴于玻片中央,备用。在田间用玻片的胶带纸部分与小麦叶片上的夏孢子堆多次接触,粘取夏孢子。随后,在胶带纸部分滴加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的染色液,染色 3~5 min,经蒸馏水冲洗后,用 40%甘油封片。将此玻片带回室内,于第 3, 5, 10, 20, 30, 40 d 后镜检观察夏孢子细胞核,以确定该方法染色效果的持续时间。

1.3.3 其它植物病原真菌的染色处理 ①菌丝:用灭菌载玻片粘取少许 0.2% 的琼脂培养基,凝固后在无菌条件下接种待检菌种。在 28℃ 或室温下培养 3~5 d 后,在菌落上滴加 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的染液 1~2 滴,染色 2~3 min 后镜检。②芽管:在已产孢的培养基上挑取病菌孢子,接种于上述带培养基的玻片上,在高湿条件下放置培养。待孢子萌发后进行染色处理。染液浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,染色 2~3 min。③孢子或孢子囊:从已产孢的培养基上挑取病菌孢子涂于干净的玻片上,滴加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的染液,染色 3~5 min 后,加盖盖玻片镜检。

1.4 荧光显微镜观察及照相

本研究应用 Olympus 荧光显微镜, U 激发片, 屏障滤片为 435 nm, 显微照相使用乐凯 ASA 10°/21° 黑白胶卷, 照相时间为 8~15 s。

2 结 果

2.1 小麦条锈菌夏孢子芽管细胞核

为确定 DAPI 对小麦条锈菌夏孢子芽管细胞核染色的适宜浓度和时间,用 10, 5, 3, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等浓度的 DAPI 溶液处理夏孢子芽管,染色 1, 2, 3, 4, 5 min 后分别观察和比较染色效果。结果表明,当 DAPI 浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 染色时间为 2, 3 min 时染色效果最佳。夏孢子芽管中的细胞核呈球形,发出明亮的蓝色荧光(图版 I-1, 2)。除典型的双核体外,还见到了 3 核、4 核体(图版 I-3)。DAPI 的浓度增高到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,芽管顶端往往发出强烈的荧光,影响细胞核观察和拍照效果。若 DAPI 的浓度低至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,芽管中细胞核荧光过弱难以辨识。

用蒸馏水、50%乙醇和磷酸缓冲液(pH6.8)分别配制染色液,比较染色效果。结果发现它们对夏孢子芽管细胞核的染色效果相当,均较好。

2.2 小麦条锈菌夏孢子细胞核

DAPI 染色液不同浓度和不同染色时间的比较结果表明,夏孢子细胞核染色的最适浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,较芽管染色的适宜浓度要高。夏孢子细胞核染色程序十分简单,在清洁的玻片上滴一滴 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DAPI 染液,将夏孢子直接置入染液中,染色 3 min

后, 便可获得较好的染色效果(图版I-4)。失活的夏孢子用该方法处理后, 细胞核仍明显可见, 其发光程度与新鲜夏孢子相似。

为了大量检测田间小麦条锈菌夏孢子的核相, 使用贴于玻片上的双面胶带纸, 在田间直接粘取夏孢子, 用 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 液染色 $3\sim 5\ \text{min}$, 甘油封片, 带回室内镜检, 观察发现, 对胶带纸上夏孢子的染色效果与室内直接染色的效果相当, 并且其细胞核的发光时间可持续 $40\ \text{d}$ 。在田间直接染色处理的夏孢子中, 也观察到了3核和4核体(图版I-5)。此外, 附着于胶带纸上的一些其他真菌孢子, 如白粉菌的分生孢子、链格孢菌的分生孢子等, 细胞核也都清晰可见。

2.3 荧光染料 DAPI 细胞核染色的适应范围测定

为进一步了解荧光染料 DAPI 对植物病原真菌染核的适用范围, 作者选择了五个亚门的 30 种植物病原真菌分别进行了孢子(孢子囊)、芽管或菌丝体的染色试验。观察结果表明, 孢子(孢子囊)经 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DAPI 染色 $3\ \text{min}$ 、芽管和菌丝经 $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的染液染色 $2\sim 3\ \text{min}$, 其细胞核均可发出蓝色的荧光, 易于观察辨认。适应于该染色方法的有以下植物病原真菌: 黄瓜腐霉菌、番茄晚疫病病菌、棉铃疫病病菌、十字花科霜霉菌、莴苣霜霉菌、油菜白锈菌、甘薯软腐病菌、桃缩叶病菌、小麦赤霉菌、小麦白粉菌、小麦条锈菌、小麦叶锈菌、大麦条锈菌、桧柏锈菌、小麦散黑穗病菌、玉米丝黑穗病菌、海棠锈菌、毛白杨锈菌、菜豆锈菌、棉花黑斑病菌、柑桔青霉菌、玉米大斑病菌、小麦根腐病菌、棉花枯萎病菌、小麦雪霉叶枯病菌、棉花红粉病菌、水稻初瘟病菌、棉花黄萎病菌、棉花立枯病菌和向日葵锈菌等(图版I-6, 7; 图版II)。

3 讨 论

关于植物病原真菌细胞核的荧光染色方法, 国内外已有少量报道, 但仍无较为系统的研究。本文对小麦条锈菌夏孢子和芽管的荧光染核方法进行了研究, 确定了荧光染料 DAPI 的最适染色浓度和时间, 以及该染料对植物病原真菌的适用范围。研究结果表明, 该方法操作简单, 易于掌握, 染色迅速(染色时间由常规方法的 $2\sim 3\ \text{d}$ 缩短到 $3\sim 5\ \text{min}$)。更重要的是对小麦条锈菌夏孢子、芽管以及 5 亚门中的 30 种植物病原真菌的孢子、芽管和菌丝细胞核的染色效果良好, 极易观察。作者认为该方法是观察植物病原真菌的细胞核和研究其核行为的良好手段。

本文报道的小麦条锈菌夏孢子田间快速荧光染色处理方法, 对夏孢子细胞核染色效果良好, 并且所处理的夏孢子经 $40\ \text{d}$ 后仍可发出明亮的荧光。因此, 本方法适于在田间直接处理大量的夏孢子样品, 以减少夏孢子萌发这一环节。并且该方法也适用于其他叶围真菌孢子的细胞核染色。

在所有经 DAPI 处理的菌丝样品中, 除棉立枯病菌的细胞核和隔膜可被同时观察到以外, 其他病原真菌菌丝中仅可观察到细胞核, 未能观察到隔膜。因而尚需进一步研究同时辨识细胞核及细胞隔膜的荧光染色技术。

参 考 文 献

- 1 李振雄, 陆和平, 马 青等. 小麦条锈菌夏孢子芽管核染色方法的改进研究. 西北农学院学报, 1985(1): 1~13
- 2 罗信昌, 陈大年. 食用真菌核荧光染色技术的研究. 真菌学报, 1990; 9(1): 64~68
- 3 Hooley P. Duplication cycle in nuclei of germination zoospore of *phytophthora drechsler* as revealed by DAPI staining *Trans Br Mycol Soc*, 1982(79): 563~566
- 4 Staples R C, Gross D, Triburzy R *et al*. Changes in DNA Content of nuclei in rust uredospore germings. *Exp Mycol*, 1984(6): 293~302

The Technique of Flourescence Staining Nuclei of Uredospore and Germ Tube of Wheat Stripe Rust

Kang Zhensheng Li Zhenqi Shang Hongsheng Ma Qing Wang Huiwen

(Dept. of Plant Protection, Northwest Agricultural University, Yangling, Shaanxi, China, 712100)

Abstract Research results indicated that optimal staining concentration for uredospore was 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and staining time is 3 min, and that optimal staining concentration for germ tube was 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the staining time 2 to 3 min. Furthermore, it was found in the study that the nuclei in spores (sporangia), germ tube and mycelia of 30 species of pathogenic fungi from 5 subdivisions could be successfully stained with DAPI.

Key words *Triticum aestivum*; *Puccinia*; urediniospore; cell nucleus; staining (biology) / *Puccinia striiformis* West; germ tube; pathogenic fung; flourescence staining