

银耳二型态细胞差异性的初步研究*

刘娟¹ 马爱民^{1* * *} 盛桂华² 陈立国³ 谢笔钧¹

(华中农业大学食品科技学院 武汉 430070) (山东理工大学生命科学学院 淄博 255049)

(华中农业大学植物科技学院 武汉 430070)

摘要 :以银耳的担孢子、节孢子和菌丝体为材料,通过显微观察和电泳分析揭示银耳二型态细胞间的差异性。显微形态及核相观察表明:节孢子直径略大于担孢子,担孢子为单核细胞,节孢子绝大多数为单核细胞,少数为双核细胞,菌丝体为双核细胞并具有典型的锁状联合结构。总蛋白及同工酶电泳分析表明:菌丝相总蛋白谱带多于酵母相,过氧化物及酯酶与酵母相存在一定差异,而多酚氧化酶基本相同。因此,伴随银耳二型态细胞两相形态的转变,细胞代谢水平发生了相应变化。

关键词 银耳 二型态 显微观察 总蛋白 同工酶

中图分类号 :Q935 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)05-0880-05

Preliminary Study on the Differences of Dimorphic Cells in *Tremella fuciformis* *

LIU Juan¹ MA Ai-Min^{1* * *} SHENG Gui-Hua² CHEN Li-Guo³ XIE Bi-Jun¹

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049)

(College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract In order to reveal the differences among the dimorphic cells, basidiospores, arthrospores and mycelia of *Tremella fuciformis* were subjected to microscopical observation and electrophoresis analysis. Morphology and nucleus phase showed that arthrospores are larger than basidiospores in diameter, basidiospores are mononuclear cells, the majority of arthrospores are dikaryocytes and the mononuclear cells are in minority, mycelia are dikaryocytes with typical clamp connection. The whole protein and isozyme analysis indicated that the mycelial form contains more bands than that of yeast form and some differences in peroxidase and esterase between the two forms were found, while the polyphenol oxidase are almost similar. Therefore, corresponding changes in metabolism level are occurred during the form transition of the dimorphic cell in *T. fuciformis*.

Key words :*Tremella fuciformis*, Dimorphism, Microscopical observation, Whole protein, Isozyme

真菌的二型态现象(dimorphism)是指某些真菌在其生活史中,营养体可呈现出两种不同的细胞形态,即丝状体相(mycelial form)和酵母相(yeast form)。具有二型态的真菌种类很多,目前研究的比较多的有玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)、白假丝酵母(*Candida albicans*)、巴西芽生菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等^[1]。

银耳(*Tremella fuciformis* Berk.)作为一种高等担孢子菌,也具有二型态现象。银耳的二型态现象表现为具有不同极性的可亲合的担孢子能够相互诱导产生交配型信息素,长出萌发管,融合并形成菌丝,

菌丝在培养过程中因外界环境因素的刺激在其边缘处可形成节孢子。银耳的担孢子和节孢子均为酵母状细胞,能反复芽殖,银耳的菌丝具有典型的锁状联合结构。Kobayasi 和 Tubaki、Fox 和 Wong 等先后指出银耳生活史中存在酵母相和菌丝相两种形态,且其担孢子在配对过程中受限制性双因子交配系统的控制^[2,3]。盛桂华等则系统地研究了银耳孢子产生交配型信息素的培养条件^[4]。但关于银耳酵母相和菌丝相二型细胞间差异的研究目前在国内外尚未见报道。

本文对银耳菌丝相和酵母相细胞的形态与核

* 中国科学院微生物研究所资源中心资助项目

** 通讯作者 E-mail: aiminma@mail.hzau.edu.cn

收稿日期:2006-12-31,修回日期:2007-04-04

相进行显微观察 ,并对各自的总蛋白、过氧化物同工酶、酯酶同工酶和多酚氧化酶同工酶进行电泳分析 ,为进一步揭示银耳二型态的发生机理提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 银耳担孢子 Tr3、Tr8 ,银耳纯菌丝 Tr38 和银耳节孢子 TrJ38 由本实验室保存。其中 Tr3、Tr8 为一对交配型 A、B 因子都不同的担孢子 ,Tr38 为 Tr3、Tr8 配对形成的纯菌丝 ,TrJ38 为 Tr38 在培养过程中形成的节孢子。

1.1.2 培养基及培养条件 本实验采用的培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA , Difco) ,培养温度为 25℃。担孢子 Tr3、Tr8 和节孢子 TrJ38 转至斜面上活化 3~5d ,Tr3 和 Tr8 以“ V ”字形交配接种于培养基培养 5~7d 纯菌丝 Tr38 培养 20~25d 左右。

1.2 方法

1.2.1 显微观察 :分别挑取少量 Tr3、TrJ38、Tr38 以及“ V ”字形交配接种的 Tr3 和 Tr8 内角处的芽孢置于 25μg/mL 荧光染液(Hoechst33258 , Sigma)中 ,进行显微形态观察和核相观察。

1.2.2 总蛋白电泳 :分别取适量 Tr38、TrJ38 以及等量混合的 Tr3 和 Tr8(以下简称 Tr3 + Tr8)菌体 ,液氮研磨后加入等量提取液(0.05mol/L Tris-HCl ,

pH6.8 ; 2% SDS) ,沸水浴 10min 后取上清加入 4 倍体积丙酮 , - 20℃放置 2h ,离心得沉淀 ,丙酮挥发完全后加入适量提取液溶解沉淀 ,上清液即为待分析的蛋白。蛋白质浓度测定参照 Lowry 法进行^[5]。SDS-PAGE 浓缩胶浓度为 5% ,分离胶浓度为 12%。

1.2.3 同工酶电泳 :分别取适量 Tr38、TrJ38 和 Tr3 + Tr8 菌体置入预冷研钵 ,液氮研磨后加入等量的预冷提取液(0.05mol/L Tris-HCl , pH6.8) ,离心取上清备用。常规 PAGE 浓缩胶浓度为 5% ,分离胶浓度为 8%。过氧化物酶和多酚氧化酶同工酶染色方法参照薛俊杰等^[6]。酯酶同工酶染色方法参照贾定洪等^[7]。

2 结果与分析

2.1 银耳二型态细胞的显微形态及核相观察

显微形态观察表明 ,银耳的菌丝体和担孢子及节孢子间的形态差异明显。担孢子和节孢子均为酵母状细胞 ,且节孢子直径略大于担孢子。交配型 A、B 因子都不同的一对担孢子配对时能产生萌发管。节孢子在培养过程中也能形成萌发管。银耳的菌丝体具有典型的锁状联合结构。在银耳担孢子和节孢子的培养过程中均能观察到有部分酵母相细胞转变成拉长的丝状细胞 ,有时拉长的细胞或未拉长的细胞还可以和其它细胞连接起来形成链状的假丝态细胞。(见图 1)

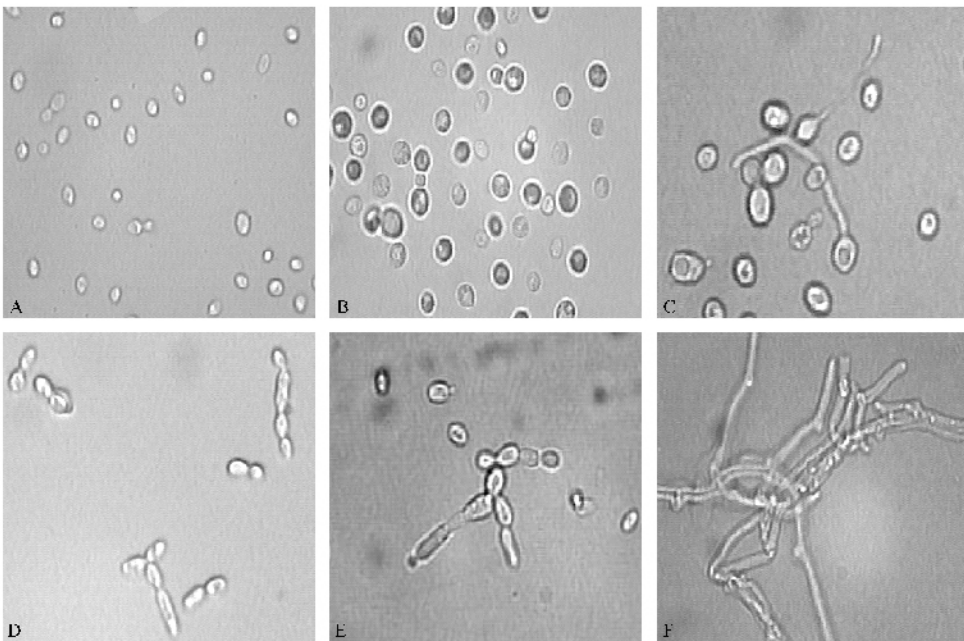


图 1 银耳二型态细胞形态显微观察

A. 担孢子 × 400 ; B. 节孢子 × 400 ; C. 芽孢萌发管 × 400 ; D. 担孢子丝状体 × 400 ; E. 节孢子丝状体 × 400 ; F. 菌丝体 × 400

核相观察结果表明,银耳的担孢子均为单核细胞,节孢子中绝大多数为单核细胞,少数为双核细胞

胞。银耳菌丝为双核菌丝。担孢子和节孢子形成的丝状体态细胞为单核多细胞(见图2)。

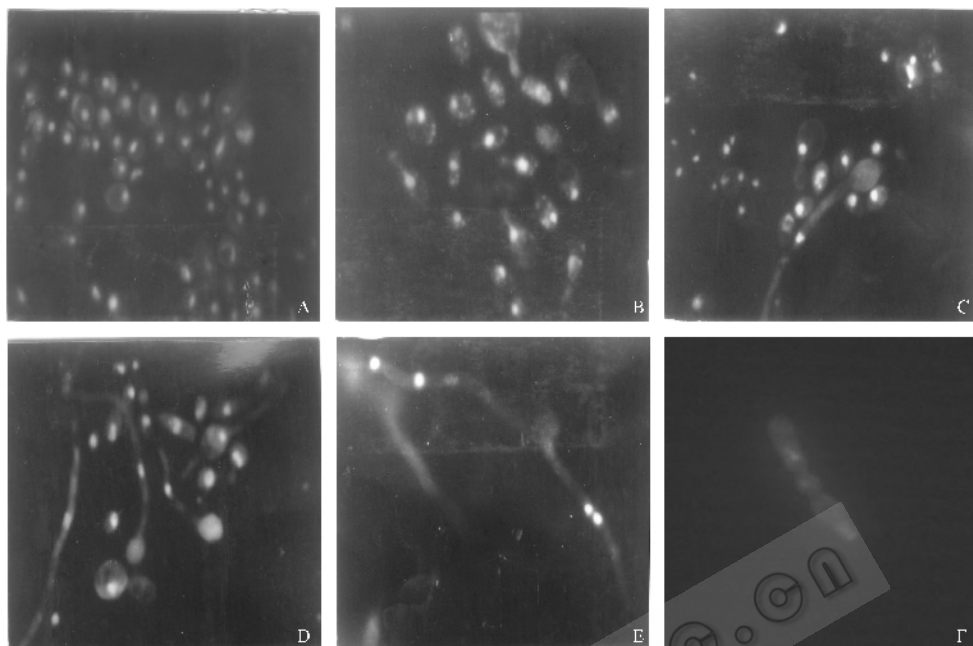


图2 银耳二型态细胞核相显微观察

A.担孢子 $\times 400$; B.节孢子 $\times 400$; C.担孢子萌发管 $\times 400$; D.节孢子萌发管 $\times 400$; E.菌丝体 $\times 400$; F.丝状体态细胞 $\times 400$

2.2 银耳二型态细胞总蛋白电泳图谱

总蛋白电泳图谱表明,在银耳二型态转化的过程中,总蛋白出现了一定差异。其中,菌丝相的蛋白谱带最多,且大分子量蛋白的量明显高于两种酵母相细胞,中等分子量和低分子量蛋白中主带的数目也比酵母相细胞高。节孢子和担孢子在蛋白图谱上也有差异,担孢子中等分子量的蛋白谱带比节孢子蛋白谱带多一条,但是节孢子在低分子量蛋白上谱带比担孢子多一条(见图3所示箭头)。两种酵母相细胞在大分子量蛋白上的差异不大。

2.3 银耳二型态细胞同工酶电泳图谱

酯酶同工酶谱和表1显示:担孢子 Tr3 + Tr8 有5条主带,菌丝 Tr38 有4条主带和4条弱带,节孢子 TrJ38 也有5条主带。 R_f 值在 0.35 ~ 0.50 范围中的谱带差异不大,但是从 R_f 值大于 0.50 范围的酶谱来看,两相的酯酶差异比较显著,并且各自都具有特征谱带(见图4A图示箭头)。

从多酚氧化酶同工酶谱和表2可以看出,担孢子、节孢子和菌丝的多酚氧化酶差异并不显著,三者都有 R_f 值在 0.5 ~ 0.7 范围中的4条主带,不过担孢子和节孢子的酶带比菌丝的酶带颜色稍深(见图4B图示箭头)。

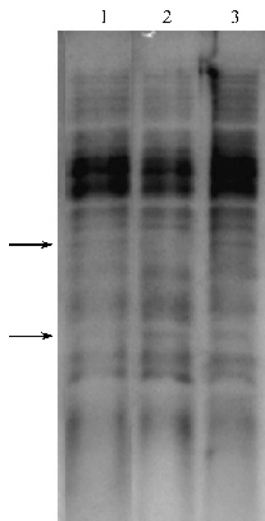


图3 银耳二型态细胞总蛋白电泳图谱

(1 Tr3 + Tr8, 2 TrJ38, 3 Tr38)

过氧化物同工酶谱和表3显示:担孢子、节孢子和菌丝的过氧化物酶同工酶带差异也比较显著。担孢子有4条主带,菌丝有5条主带和2条弱带,节孢子也有3条主带和2条弱带。从 R_f 值为 0.075 的带上来看,节孢子的酶带颜色稍弱于担孢子和菌丝。在 R_f 值为 0.8 ~ 0.95 范围中,菌丝的酶带要显著多于担孢子和节孢子(见图4C图示箭头)。

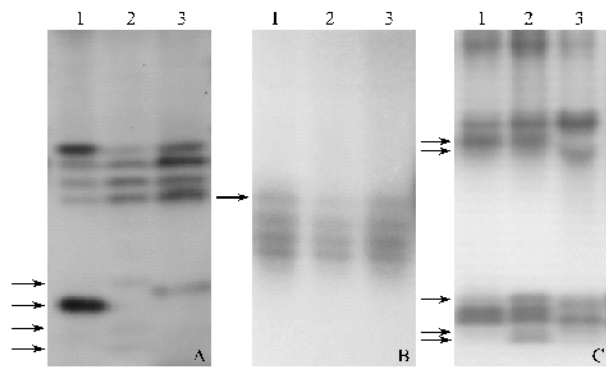


图 4 银耳二型态细胞同工酶谱

(1 Tr3 + Tr8, 2 Tr38, 3 TrJ38)

A. 酯酶同工酶谱; B. 多酚氧化酶同工酶谱; C. 过氧化物同工酶谱

表 1 酯酶同工酶相对迁移率(R_f)

	酶带(R_f)								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Tr3 + Tr8	0.350	0.388	0.450	0.500			0.813		
Tr38	0.350	0.388	0.450	0.500	0.725		0.813	0.875	0.928
TrJ38	0.350	0.388	0.450	0.500		0.750			

注: I ~ IX 为从负极到正极对酶带的编号。以下同。

表 2 多酚氧化酶同工酶相对迁移率(R_f)

	酶带(R_f)			
	I	II	III	IV
Tr3 + Tr8	0.500	0.563	0.625	0.688
Tr38	0.500	0.563	0.625	0.688
TrJ38	0.500	0.563	0.625	0.688

表 3 过氧化物酶同工酶相对迁移率(R_f)

	酶带(R_f)								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Tr3 + Tr8	0.075	0.288	0.350			0.850			
Tr38	0.075	0.288	0.350		0.813	0.850	0.875		0.950
TrJ38	0.075	0.288		0.400		0.850		0.888	

3 讨论

通过显微形态与核相观察可以看出,银耳的担孢子和节孢子在培养过程中能反复芽殖,产生大量酵母状细胞,可亲合的酵母状细胞配对后能长出萌发管,融合并形成具有锁状联合的双核菌丝。此外,在担孢子和节孢子中均发现有丝状或链状的细

胞存在。因而从细胞形态水平上来说,银耳的二型态可以分为三个层次(1)一对可亲合的担孢子或节孢子配对后长出萌发管,融合并形成具有锁状联合的双核菌丝(2)担孢子和节孢子在培养的过程中能形成丝状的拉长形和链状的假丝形,统称为丝状体态(3)纯菌丝在培养的过程中因外界环境因素的刺激在其边缘处能形成单核或双核的酵母状节孢子。

从总蛋白的电泳图谱可以看出,在由酵母相转变为菌丝相的过程中,有新的蛋白质成分合成或者说原有的蛋白成分在数量上有增加。Truckses 等研究 *S. cerevisiae* 的二型态时发现,两个内膜蛋白 Sho1 和 Msb2 是营养饥饿条件下丝状体细胞形成所必须的^[8]。*C. albicans* 在其二型态的变化过程中,可溶蛋白也发生了变化^[9]。对银耳的二型态来说,目前还缺少相关的分子水平上的理论依据。为了进一步对银耳二型态的生理生化进行研究,需将差异蛋白进行分离纯化,研究其组成、结构、理化性质及生理功能等,为二型态的发生机制做出合理解释。

同工酶是具有相同或相似催化功能而分子结构不同的一类酶,同工酶分析是通过基因产物来认识基因的存在和表达,即通过生化表现型来反映基因型的存在方式,细胞在生理代谢上的不同能够表现在同工酶的差异上^[7]。张晓云等对二型态真菌热带假丝酵母的酵母相和菌丝相菌体的苹果酸脱氢酶和超氧化物歧化酶进行同工酶电泳分析时发现型态的转换伴随了同工酶的变化^[10]。从银耳两相的同工酶酶谱来看,酵母相和菌丝相的酯酶及过氧化物酶存在一定差异,而多酚氧化酶基本相同,仅在酶活强弱上有差异。目前还不能肯定这种差异是否与酶蛋白的细胞定位有关,但可以肯定在银耳二型态的转换过程中,细胞代谢水平上出现了差异,同工酶起到了一定作用。由于同工酶是特殊的蛋白质,其表达的差异性是由基因调控的,故可以进一步探讨基因调控与细胞型态的关系。

真菌细胞的形态主要取决于细胞壁的形状,外界物理、化学和营养等因素会影响转型生长的最初启动因子,从而诱导出不同的代谢应答,给细胞壁成分以不同的影响^[11]。因此银耳的二型态转换是一个非常复杂的过程,除了可能受到外界信号包括温度、pH 值以及培养成分等多种因素的影响外,还可能涉及到细胞内部多条信号转导途径。关于银耳二型

态外部和内部的影响因素正在进一步探讨中。

参考文献

- [1] Bölker M. Microbiology , 2001 , **147** (6) : 1395 ~ 1401.
- [2] Kobayasi Y , Tubaki K. Trans Mycol Soc , 1965 , **6** (1) : 29 ~ 36.
- [3] Fox R D , Wong G J. Canad J Bot , 1990 , **68** (1) : 107 ~ 111.
- [4] 盛桂华 , 陈立国 , 马爱民. 华中农业大学学报 , 2003 , **22** (4) : 352 ~ 354.
- [5] Lowry O H , Rosebrough N J , Farr A L. Journal of Biological Chemistry , 1951 , **193** (1) : 265 ~ 275.
- [6] 薛俊杰 , 张震云 , 弓春瑞 , 等. 山西农业大学学报 , 2000 , **20** (1) : 55 ~ 58.
- [7] 贾定洪 , 郑林用 , 张小平 , 等. 西南农业学报 , 2006 , **19** (3) : 502 ~ 506.
- [8] Truckses D M , Garrenton L S , Thorner J. Science , 2004 , **306** (26) : 1509 ~ 1511.
- [9] Niimi M , Shepherd M G , Monk B C. Arch Microbiol , 1996 , **166** (4) : 260 ~ 268.
- [10] 张晓云 , 韦一能. 广西师范大学学报 , 1998 , **16** (4) : 80 ~ 84.
- [11] Nemecek J C , Wüthrich M , Klein B S. Science , 2006 , **312** (28) : 583 ~ 588.