

## 捕食线虫菌物玻片标本制作方法\*

刘雪峰<sup>1,2</sup> 张克勤<sup>1\*\*</sup>

(云南大学云南省生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地 昆明 650091)<sup>1</sup>

(云南省林业科学院 昆明 650204)<sup>2</sup>

**摘要:** 采用玻片培养——棉蓝染色法解决了食线虫菌物永久玻片制作中存在的一些问题; 小室培养加盖玻片的方法解决了捕食器不能用高倍镜和油镜观察的难题, 并且可以拍摄到高质量的显微图象; 刮片法改进了临时玻片的制作方法。

**关键词:** 捕食线虫菌物, 玻片, 制作方法

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0092-04

### SLIDE MAKING METHODS FOR PREDACIOUS NEMATODE FUNGI

LIU Xue-Feng ZHANG Ke-Qin

(Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resource, Yunnan University, Kunming 650091)<sup>1</sup>

(Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204)<sup>2</sup>

**Abstract:** Some problems were settled in making permanent slide for predacious nematode fungi by slide cultivation and cotton blue stain. Method of small-hole culture covered with slides could obtain high quality images, which solved the problem that trapping device couldn't be observed with high-power microscopes and oil-immersion microscopes. Scraping slide technique improved the method of making temporary slides.

**Key words:** Predacious nematode fungi, Slide, Making method

玻片标本是研究捕食线虫菌物生物性状重要依据, 是食线虫菌物分类不可缺少的研究手段。捕食线虫菌物玻片标本不易用常规方法制作, 并始终是一个难题。为此, 许多菌物分类学家不断地改进和完善捕食线虫菌物临时玻片、永久玻片的制作方法。Dudington<sup>[1]</sup>提出了威尼斯松节油制片方法, 用 FAA 固定含菌物的琼脂块, 水洗, 苏木精染色, 流水冲洗转入 10% 甘油, 用 Methyalted spirit 脱甘油, 无水酒精脱水, 移入 10% 威尼斯松节油乙醇液中, 干燥器中干燥, 在凹玻片上制片。制片过程比较烦琐, 在琼脂块存在的情况下观察效果不理想。Coetzee & Eicker<sup>[2]</sup>报道了玻片培养法, 优点是解决了菌丝移到载玻片上的问题, 不足之处是在去掉培养基时容易破坏菌丝的形态特征。高仁恒等<sup>[3]</sup>研究了培养皿直接观察法, 优点是可直接用显微镜观察捕食线虫菌物

\* 国家基金重点项目 (No. 30230020)

云南省应用重点基金 (No. 1999C0001z)

科技部 973 前期研究项目 (No. 2002ccc02800)

\*\* 联系人 Tel: (0871) 5031093, E-mail: kqzhangl@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-03-19, 修回日期: 2003-06-22

的捕食器、孢子的形态特征,而不易在高倍镜或油镜下观察,即使观察到也不易拍到高质量的图片,也不能制成永久玻片。张克勤<sup>[4]</sup>提出了小室培养法,优点是可以连续观察菌物的发育过程,但不易制成永久玻片。在前人研究方法的基础上,改进了玻片制作方法和观察方法。用玻片培养—棉蓝染色法解决了永久玻片制作中存在的一些问题。如:标本较难移到载玻片上,或被移到载玻片上的标本形态特征不完整,标本不易着色,染色后容易褪色等。采用小室培养加盖玻片的方法解决了捕食器不能用高倍镜和油镜观察的难题,同时可以得到高质量的显微图象。现将改进的捕食线虫菌物玻片制作和观察方法总结如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

制片材料:载玻片、盖玻片(18mm×18mm)、60mm、100mm培养皿、标签。化学试剂:加拿大树胶、甘油、棉蓝染液、水合氯醛碘液。半玉米粉琼脂培养基(CMA):玉米粉20g、水1,000 mL、琼脂20g。水琼脂培养基(WA):琼脂20g、水1,000mL。线虫:燕麦饲养的腐生线虫(*Panagrellus redivius*)。菌种:捕食线虫菌物活体菌种若干。

### 1.2 方法

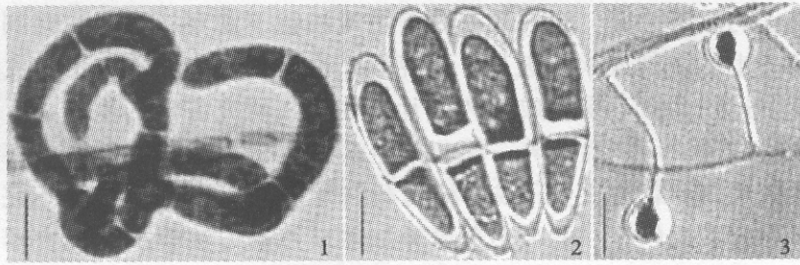
(1) 菌种培育:将需要研究的菌种接入60mm培养皿的CMA培养基的中部,倒置于25℃温箱中,培养7d。(2) 永久玻片制作方法(玻片培养棉蓝染色法):①载玻片培养菌落:打开培养好菌落的培养皿,在菌落上用无菌刀切取0.5cm×0.5cm的小块放于无菌、干净的载玻片中部,将载玻片连同培养小块放入无菌的100mm的培养皿中,用封口膜封住培养皿的边缘防止水分蒸发;在培养皿上写上菌种编号和时间,置于25℃温箱中,培养数天;当菌落在载玻片上长好后,去掉培养基小块,菌落培养结束;②染色:在载玻片菌落的中部滴1滴棉蓝染液,用盖玻片盖好,当染液分布好后,用酒精灯火焰加热;③脱色:在盖玻片一端滴加数滴甘油,在盖玻片另一端放置1条20mm×40mm的滤纸条,24h左右可脱去玻片上的蓝染料,被甘油所取代;④封片:用加拿大树胶沿盖玻片边缘封盖,阴干;⑤在玻片两端粘贴标本的标签,放入玻片盒,以后可以随时取用。(3) 临时玻片制作方法(刮片法):在载玻片中间滴加一滴碘液,然后打开培养好菌落的培养皿,在菌落边缘用盖玻片刮取少许菌丝,用镊子夹住盖玻片,将盖玻片边缘与碘液接触,轻轻地放下盖玻片,避免产生气泡,然后镜检。(4) 捕食器观察方法(小室培养加盖玻片法):打开培养好菌落的培养皿,在菌落中部用无菌刀挖去0.6cm×1.5cm的小块,制作小观察室,加入事先用无菌水洗好的线虫悬液1~2滴,有50多条线虫。重新放入温箱中培养。24~48h后,取出培养皿,在低倍镜下观察是否有捕食器形成,若有捕食器形成,用无菌刀再切去观察室外四周的培养基,使观察小室扩大到2cm×2cm左右,然后滴加1滴无菌水或碘液,盖上盖玻片,用400倍显微镜或油镜直接观察捕食器的形态特征,同时拍照。

## 2 结果

### 2.1 永久玻片

见图1。

采用培养封片法,将捕食线虫菌物的标本封固在玻片中,捕食线虫菌物的菌丝、

图1 永久玻片 (标尺 = 10 $\mu$ m)

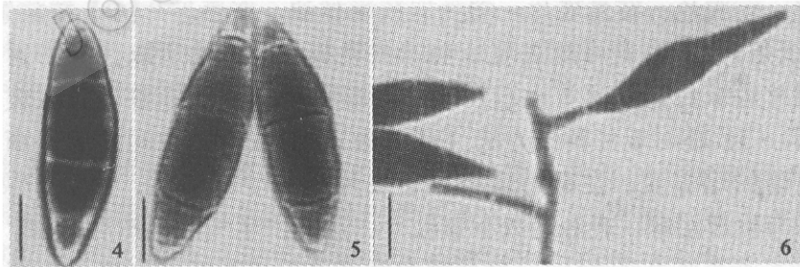
1 三维菌网 (400 $\times$ ), 2 弯孢节丛孢的分生孢子 (400 $\times$ ), 3 粘球 (400 $\times$ )

孢子、捕食器都被染成蓝色, 菌丝、孢子、捕食器的分隔和背景近无色, 菌物的形态十分清晰, 尤其是可以很好地观察到孢子与孢子梗的连接方式; 与胶带纸粘片法相比较, 新方法观察效果和图片质量都很好, 尤其是三维菌网的效果要更好一些。该方法解决了菌丝不易转移到载玻片上, 即使移到了载玻片上菌丝的形态也不很完整并不易长期保存的难题。但是, 该方法略有不足之处, 若过火温度掌握不好, 分生孢子内的原生质体易产生强烈收缩, 分生孢子的形态有些失真, 立体感不强, 这个问题有待制作技术水平提高来解决。

## 2.2 临时玻片

见图2。

临时玻片常采用胶带纸粘帖、棉蓝做染液的方法制片。该方法优点是制片速度, 观察效果良好, 菌物的形态特征比较完整。缺点是孢子染色过深, 放置时间不能过长, 过长玻片上似有一层水雾, 拍摄的图片效果较差。采用刮片法, 以碘液作染色剂效果良好。菌物的形态特征比较完整、清晰, 制作速度也很快, 染色深浅适中, 观察效果和图片拍摄效果都很好, 尤其是分生孢子分隔不十分清晰的种类采用该方法效果更佳。缺点是碘液易引起孢子表面粗糙, 把碘液浓度适当降低可以解决该问题。

图2 临时玻片 (标尺 = 10 $\mu$ m)

4~5 多头节丛孢的分生孢子 (400 $\times$ ), 6 坚菌丝单顶孢分生孢子梗和孢子 (400 $\times$ )

## 2.3 捕食器小室观察方法

图3为两种观察捕食器的方法, 一种是胶带纸粘片法, 另一种是直接观察培养皿法。在鉴定、形态描述方面这两种方法效果较好。但是, 直接观察培养皿法不能用高倍镜和油镜来观察, 也就不能拍摄高质量的清晰的显微图片。因此, 使之应用受到限制。新方法是在高仁恒等<sup>[3]</sup>培养皿直接观察法的基础上改进的, 无论观察效果还是拍摄效果都十分好。可以用高倍镜多次连续观察捕食器形成过程及线虫被捕食的过程, 还可用油镜观察捕食器的细微结构, 避免了高倍镜和油镜被污染的问题, 提高了所拍摄的显微图片的质量。

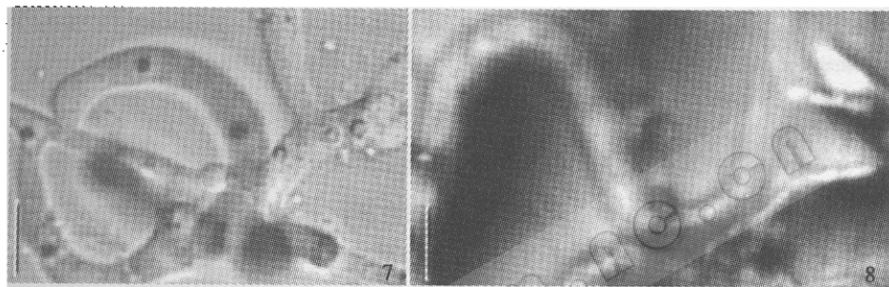


图3 捕食器小室 (标尺 =  $10\mu\text{m}$ )

7 三维菌网 (400 $\times$ ), 8 被捕捉的线虫和粘性分枝 (400 $\times$ )

### 3 小结

研究方法和手段的改进促进了研究水平的提高。永久玻片、临时玻片和捕食器观察方法的改进, 为捕食线虫菌物研究提供了新方法。

### 参考文献

- [1] Coetzee J C, Eicker A. *Phytophylactica*, 1990, **22**: 361 ~ 362.
- [2] Duddington C L. *Trans Brot Mycol Soc*, 1955, **38**: 97 ~ 103.
- [3] 高仁恒, 雷丽萍, 刘杏忠. *真菌学报*, 1996, **15** (3): 304 ~ 305.
- [4] 张克勤. *食线虫菌物研究*. 昆明: 云南大学出版社, 2000. 38 ~ 39