

木耳菌丝老化过程的微形态学研究

袁立 许修宏*

东北农业大学资源与环境学院 哈尔滨 150030

摘要: 分别从显微和超微结构观察木耳菌种老化过程中菌丝细胞的形态变化。结果显示: 接种后 30d 时, 光镜下观察到菌丝结构均匀紧凑, 细胞壁光滑; 电镜下观察到细胞结构完整, 内含物丰富, 各种细胞器形态规整, 没有老化现象。接种后 60d 时, 光镜下菌丝部分肿胀, 色泽加深; 电镜下细胞壁疏松, 线粒体和液泡肿大, 细胞核不规则肿胀, 核仁消失, 脂肪滴和囊泡增多, 并有少量电子致密度高的嗜钺性黑色颗粒状物质出现, 表明菌丝开始老化。90d 时, 光镜下部分菌丝严重肿胀, 且色泽更深; 电镜下线粒体和液泡肿胀明显, 部分细胞核破裂, 脂肪滴、囊泡和电子致密度高的嗜钺性黑色颗粒状物质显著增多, 细胞壁更加疏松。120d 时, 光镜下许多菌丝开始断裂, 色泽进一步加深; 电镜下细胞壁塌陷, 膜系统也随之解体, 线粒体等细胞器部分溶解消失。150d 时, 光镜下大部分菌丝完全断裂, 并失去菌丝形态; 电镜下细胞膜及其内含物已基本消失, 只剩部分严重塌陷的细胞壁残骸。由此表明, 木耳菌丝的老化是一个由个别向整体逐渐过渡的不可逆的过程。

关键词: 木耳, 老化, 显微结构, 超微结构

Micromorphological studies on senescence process of hyphae in cultivated *Auricularia auricula-judae*

YUAN Li XU Xiu-Hong*

College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Process of senescence in hyphae of cultivated *Auricularia auricula-judae* was observed microstructurally and ultrastructurally. In 30d after inoculation, the hyphae were uniform and well-knit; the cell wall was smooth. Under transmission electron microscope, the cells were intact, with abundant inclusions and all organelles were normal. In 60d part swelling hyphae were observed and the color of hyphae were darker. Under transmission electron microscope, the cell wall was unconsolidated, and the

基金项目: 科技部十一五科技支撑项目 (No. 2008BADA1B01); 科技部林业公益性行业科研专项 (No. 201104048); 黑龙江省科技厅计划项目 (No. KT05A400-1); 哈尔滨市科技攻关计划 (No. 2007AA6CN105)

*Corresponding author. E-mail: howard2857@hotmail.com

收稿日期: 2010-12-17, 接受日期: 2011-03-22

mitochondria and vacuole were swollen; nuclei were irregularly swollen, and nucleoli disappeared, and then granules and vesicles increased. Meanwhile, a few electron-dense granules appeared, which indicated the senescence of hyphae. In 90d membrane of part of the nuclei was broken, and a great amount of lipid granules, vesicles and electron-dense granules were observed. The cell wall was further loose. In 120d lots of hyphae became fractured and the color was much darker. Under transmission electron microscope, collapse of cell wall and disintegration of cytomembrane system were observed, and part of cell organelles, such as mitochondria, disappeared. In 150d most of hyphae were completely fractured and lost their shapes, and the cytomembrane and cell inclusions were almost disappeared, but part of collapsed cell walls were observed. It was indicated that the senescence process of *Auricularia auricula-judae* hyphae was irreversible, which developed from individual to whole cells gradually.

Key words: *Auricularia auricula-judae*, senescence, microstructure, ultrastructure

木耳 *Auricularia auricula-judae*, 属于担子菌门 Basidiomycota, 伞菌纲 Agaricomycetes, 木耳目 Auriculariales, 木耳科 Auriculariaceae, 其肉质细腻, 营养丰富, 含有人体必需的多种氨基酸、肝糖、维生素和矿质元素等, 并具有降血脂、抗血栓、降血糖、清肺益气、补血活血、镇静止痛等功效, 是一种天然的食药兼用菌 (李玉 2001; 戴玉成和杨祝良 2008; 戴玉成等 2010)。由于木耳的上述主要性状, 木耳已经成为我国最主要的食药真菌之一, 因此近年来对木耳种类间亲缘关系、遗传多样性、分子标记、同工酶谱多样性等都进行了一定的研究 (闫培生等 2002; 李黎等 2010; 张介驰等 2007; 唐利华等 2008; 边银丙等 2000)。但有关木耳菌丝老化的研究在国内外还未见报道。

老化现象 (senescence 或 aging) 发生在所有生物中, 搞清楚老化发生的机理并延长生物寿命是人们一直关心的问题。木耳菌种在生产过程中随着菌龄的增加, 养分的消耗, 必然会出现老化现象。老化的菌种生命力下降, 抗杂菌能力弱, 出耳迟, 直接影响到菌丝的生长及子实体的产量和品质 (丁湖广 2006)。从微形态上观察菌丝细胞老化过程的变化是研究老化现象最直观、有效的方法。尤其是电镜技术被公认为是检测细胞形态变化最可靠的方法 (林琳等 2008)。本文通过对木耳菌丝老化过程的显微和超微结构形态变化的研究, 初步探讨木耳菌丝形态学上的老化现象, 以期对木耳菌丝老化

及其他食用菌菌丝的老化机理提供形态学参考和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种: 黑 29, 由黑龙江省微生物研究所提供。

1.1.2 供试培养基: 95%麦粒+5%杂木屑, 200g/瓶, 含水率为 50%。

1.2 菌丝培养

接种后于 24℃ 恒温培养箱中培养。以 30d 为一个菌龄段, 共培养 150d, 即 5 个菌龄段。每个菌龄段定期进行菌丝观察。

1.3 光学显微结构观察

在超净工作台内挑取少量不同菌龄的菌丝于载玻片上, 滴 0.2mL 5%结晶紫染液, 用接种针将菌丝完全拉开, 盖好盖玻片, 静置 5min, 待整个菌丝完全染色后, 置于 1,000 倍显微镜下观察并拍照。

1.4 透射电镜超微结构观察

在无菌条件下挑取不同菌龄的菌丝, 依次经 2.5%戊二醛 (pH6.8) 前固定, 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8) 冲洗 3 次, 2%四氧化锇后固定, 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8) 冲洗 3 次, 逐级乙醇脱水, 丙酮浸透, Epon812 树脂包埋, 梯度聚合, 修块, 超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, H-7650 透射电子显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

30d 时, 光镜下大部分菌丝形态均匀, 细胞壁光滑, 层次单一, 菌丝内细胞间的连接非常紧密 (图 1-A)。透射电镜观察显示, 细胞壁紧密光滑, 细胞质分布均匀, 规整的细胞核和核仁, 线粒体、液泡和内质网等细胞器很容易识别 (图 2-A)。表明菌丝细胞正常, 没有老化迹象。

60d 时, 光镜下观察到大部分菌丝出现肿胀, 尤其在菌丝隔膜处较为明显 (图 1-B), 菌丝色泽加深。电镜下观察到大部分细胞壁有所膨胀疏松; 细胞质凝聚, 色泽加深, 并有少量电子致密度高的嗜钼性黑色颗粒状物质出现; 脂肪滴和囊泡均有增多; 液泡体积变大, 数量也有所增加; 部分质壁分离; 线粒体稍有肿大, 数量也有所减少; 细胞核不

规则的肿胀, 核仁消失 (图 2-B)。表明菌丝细胞已发生老化。

90d 时, 光镜下大部分菌丝进一步肿胀, 色泽也更深 (图 1-C)。透射电镜观察显示, 细胞壁更加疏松, 大部分呈现虫洞状表面, 并附着有大量电子致密度高的嗜钼性黑色颗粒状物质。细胞核溶解消失; 细胞膜和细胞质也部分溶解; 液泡间相互融合肿大, 几乎占据了整个细胞内部, 部分衰退的细胞器被挤压到细胞边缘; 脂肪滴和囊泡数量显著增多; 线粒体数量进一步减少, 体积更加肿大, 表面也附着电子致密度高的嗜钼性黑色颗粒状物质 (图 2-C)。核的消失以及细胞壁、细胞膜和细胞器的部分溶解, 表明菌丝细胞发生了严重的改变和老化。

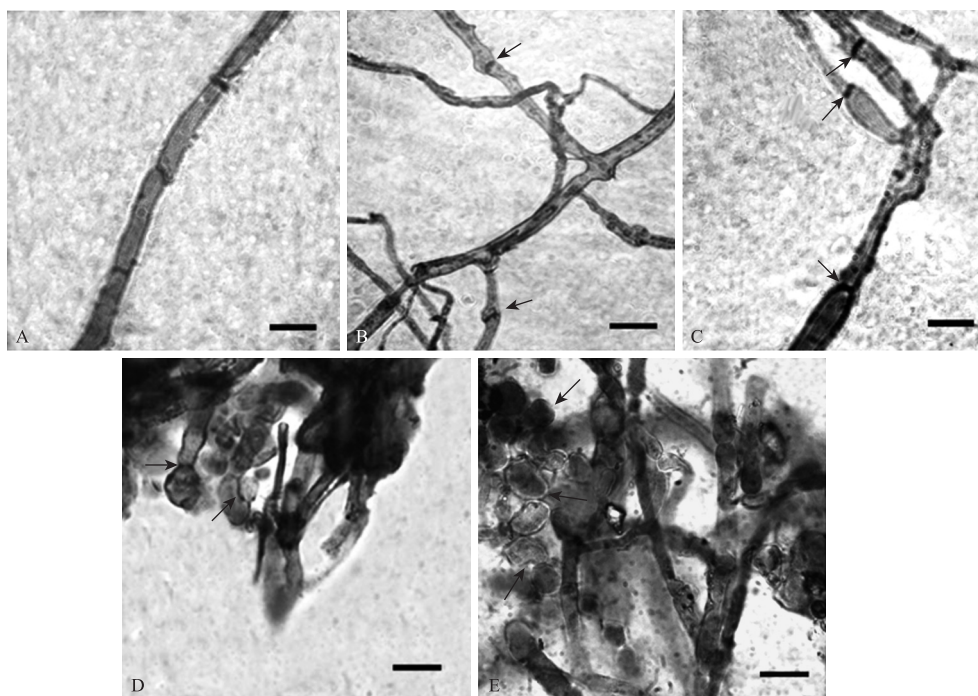


图 1 木耳菌丝老化过程的显微结构特征 A: 菌丝形态均匀, 细胞壁平整光滑; B: 菌丝颜色加深, 部分菌丝出现肿胀, 隔膜处较为明显 (箭头处); C: 菌丝进一步肿大, 色泽加重 (箭头处); D: 出现许多不规则泡状型肿胀细胞 (箭头处); E: 大部分菌丝完全断裂, 呈不规则空泡状 (箭头处)。A, B, C, D, E 分别代表接种后 30d, 60d, 90d, 120d, 150d 菌龄的菌丝。标尺=10 μ m。

Fig. 1 The senescence process of *Auricularia auricula-judae* hyphae (LM). A: The hyphae were normal, and the cell walls were smooth; B: The hyphae became darker, part of hyphae were swelling, and the septa were obvious (arrows); C: The hyphae became more swollen and darker (arrows); D: Large amount of irregularly swelling cells appeared (arrows); E: Most of hyphae were completely fractured, and irregular vacuole-like cell presented (arrows). A, B, C, D and E represents respectively the observations made in 30d, 60d, 90d, 120d and 150d after inoculation. Bars=10 μ m.

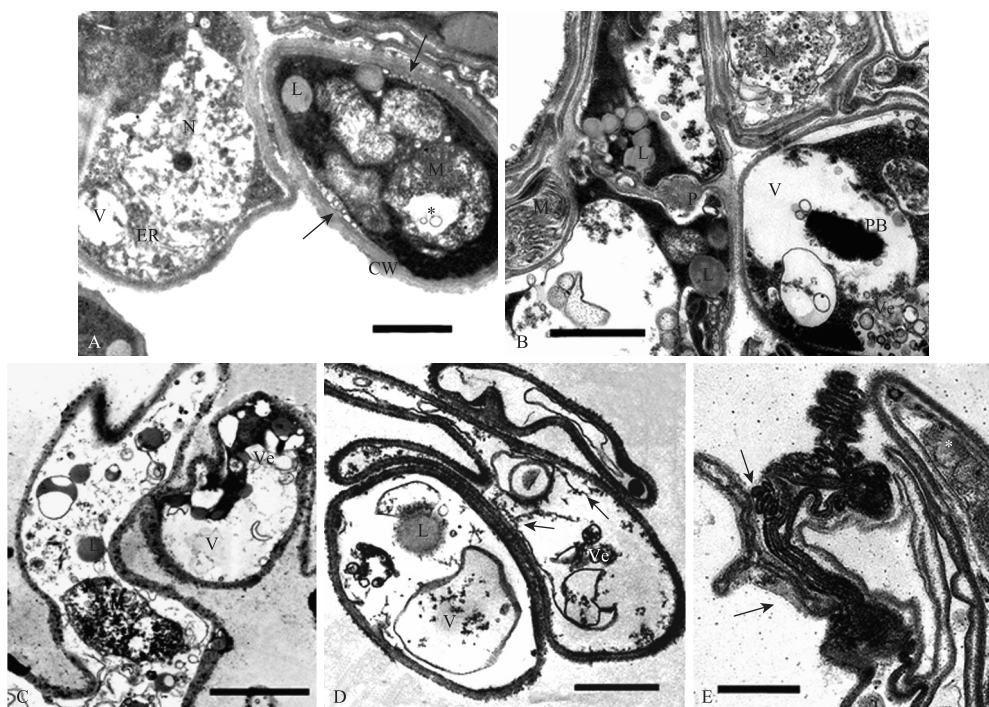


图 2 木耳菌丝老化过程的超微结构特征 A: 细胞结构完整, 可见核仁 (N), 有少量脂肪滴 (L), 细胞壁和膜之间有膜边体存在 (箭头处), *为线粒体 (M) 中央拟核区; B: 细胞核 (N) 不规则的肿胀, 核仁消失, 液泡 (V) 变大, 中间有高电子致密度的多聚磷酸体 (PB), 桶孔覆垫 (P) 被堵塞, 线粒体也有轻微肿胀; C: 液泡 (V) 继续肿胀, 脂肪滴 (L) 和囊泡 (Ve) 明显增多, 细胞壁和线粒体表面附着高电子致密度的黑色颗粒状物质; D: 细胞间相互粘附, 电子致密度高的黑色颗粒状物质依然存在, 细胞膜部分解体断裂 (箭头处), 液泡 (V) 也部分溶解, 脂肪滴 (L) 和囊泡 (Ve) 减少; E: 完全瓦解的菌丝细胞凝聚成一团, 箭头方向为严重塌陷的细胞, 细胞器几乎全部消失, *为还未完全瓦解的细胞. 标尺=2 μ m. A, B, C, D, E 分别代表接种后 30d, 60d, 90d, 120d, 150d 菌龄的菌丝细胞. N: 细胞核; M: 线粒体; V: 液泡; Ve: 囊泡; L: 脂肪滴; PB: 多聚磷酸体; P: 桶孔覆垫; CW: 细胞壁; ER: 内质网.

Fig. 2 The senescence process of *Auricularia auricula-judae* hyphae (TEM). A: The intact structure of cells: its nucleolus (N) and a few lipid granules (L) were observed; some lomasomes (arrows) were located between cell wall and cytomembrane; "*" was the central nucleoid in mitochondria (M); B: The nuclei (N) became irregularly swollen and nucleolus disappeared; the vacuoles (V) became larger and the electron-dense polyphosphate (PB) appeared; the parenthesome (P) was blocked, and the mitochondria (M) became slightly swollen; C: The vacuole (V) constantly swelling; lipid granules (L) and vesicles (Ve) were obviously increased, and many electron-dense granules adhered to the surface of cell wall and mitochondria (M); D: The cells adhered together, and the electron-dense granules still existing; part of cytomembrane was disintegrated and ruptured (arrows), and the vacuoles (V) as well dissolved; the lipid granules (L) and vesicles (Ve) were decreased; E: The hyphae were completely disintegrated as agglomeration and the wall severely collapsed (arrows); organelles mostly disappeared. "*" was incompletely collapsed cell. Bars=2 μ m. A, B, C, D and E represents respectively the observations made in 30d, 60d, 90d, 120d and 150d after inoculation. N: Nuclei; M: Mitochondria; V: Vacuole; Ve: Vesicle; L: Lipid granule; PB: Polyphosphate; P: Parenthesome; CW: Cell wall; ER: Endoplasmic reticulum.

120d 时, 光镜下大部分菌丝严重肿胀, 呈不规则状, 有断裂痕迹, 且色泽进一步加深 (图 1-D)。电镜下显示, 大部分菌丝的细胞壁塌陷退化, 细胞间相互粘附, 电子致密度高的嗜钨性黑色颗粒状物质依然附着在细胞壁上; 线粒体变形溶解; 很多脂

肪滴、囊泡以及细胞膜和液泡也溶解消失 (图 2-D)。细胞壁和细胞膜的瓦解以及细胞质的解体表明菌丝细胞发生了很严重的老化。

150d 时, 显微形态菌丝大部分肿大断裂, 呈现不规则空泡状, 很少有完整的菌丝形态 (图 1-E)。

超微结构菌丝细胞壁严重塌陷褶皱, 细胞质消失, 各细胞凝聚成一团, 彼此粘附, 大部分已不能辨别单个细胞形态 (图 2-E); 电子致密度高的嗜钨性黑色颗粒状物质、脂肪滴和囊泡基本消失。随着细胞器和细胞膜的解体, 以及细胞壁的塌陷, 细胞发生了不可逆的老化和死亡。

3 讨论

细胞壁是维持细胞形态及菌丝形态的关键, 也是细胞的重要保护屏障。随着菌丝培养时间的延长, 细胞壁逐渐疏松, 最后严重塌陷, 使细胞失去了原有的形态, 菌丝也随之解体。60d 到 120d 时细胞壁及细胞质中出现的电子致密度高的嗜钨性黑色颗粒状物质与细胞壁和色泽的改变可能有直接关系。蒋选利等 (2005) 在小麦条锈菌细胞的超微结构变化过程中和 Umer & van Griensven (1997) 在蘑菇衰老过程中均观察到了这种现象。张华等 (2008) 指出电子致密度高的黑色嗜钨类物质是分析分泌物合成、转运及分泌的重要依据。因此, 推断此物质可能跟细胞色素等的分泌、转运有关。

线粒体通过呼吸作用释放大量能量, 供细胞代谢所用。木耳菌丝细胞内线粒体数量的多少和形态的完整性直接决定细胞生命力的强弱。有研究表明, 真菌老化的发生与线粒体 DNA 的改变有密切的关系 (孙狄 1990)。Bok *et al.* (2003) 指出老化菌丝表现为空泡的形成, 核和线粒体膜的分解, 线粒体脊的消失和基质中高密度物质的积累。而且人们还发现一种被称为质粒 DNA (plasmid DNA, 简称 plDNA) 的老化因子就来自于线粒体 (Kuck *et al.* 1981)。笔者采用詹纳斯绿染色法检测了不同菌龄菌丝粗提液中的线粒体数量和形态变化, 发现随菌龄的增长线粒体数量减少, 体积增大。因此线粒体形态学上的变化也可作为木耳菌丝老化现象的指标。

液泡对细胞质酸碱度的平衡以及各种离子的调节起重要作用, 同时还是细胞代谢物的储存场所, 并且含有不同酸性环境的水解酶, 与溶酶体有相同的作用 (Klionsky *et al.* 1990)。老化的细胞经

常会伴随液泡数量的增多和体积的增大 (Bok *et al.* 2003)。因此这一现象也可作为木耳菌丝老化的参考指标。

脂肪滴一部分来自细胞质溶胶中, 一部分来自细胞膜结构系统 (郑国铝 1992), 其数量的增多是细胞质凝聚和细胞膜结构系统解体的标志 (蒋选利等 2005), 也是菌丝细胞开始老化解体的标志。另外, 囊泡作为真菌中数量最多的细胞器, 主要用来储存、消化或传送物质, 如细胞的产物或废弃物 (Neil & Geoffrey 1995)。因此其数量的变化也直接影响木耳菌丝细胞功能的改变。

细胞核作为最主要的细胞组成, 承载着细胞的遗传物质。在菌丝细胞老化过程中, 核表现出不规则的肿胀, 核仁消失, 最后核的降解也说明木耳菌丝细胞发生了不可逆的老化。

经观察表明木耳菌丝在培养 60d 时细胞开始肿胀, 细胞壁, 细胞器, 细胞膜和细胞核均发生改变和衰退, 并且随着培养时间的延长, 这种衰退细胞的比例越来越大, 程度也愈加严重。表明木耳菌丝的老化出现在接种后 60d, 并且发生着不可逆的改变。

在整个木耳菌丝老化过程中, 同一菌龄的菌丝中, 并不是所有细胞都发生相同程度的老化, 在老化细胞的周围也有较健康的细胞, 150d 时还有个别未完全衰老的细胞, 表明老化是一个由个别向整体逐渐过渡的不可逆的过程。此外, 细胞发生的这些变化是菌丝老化的结果还是原因, 有待进一步研究。

[REFERENCES]

- Bian YB, Luo XC, Zhou Q, 2000. Polymorphisms of esterase isozyme spectrum among cultivated *Auricularia auricula-judae*. *Mycosystema*, 19: 87-90 (in Chinese)
- Bok JW, Ishida KI, Griffiths AJF, 2003. Ultrastructural changes in *Neurospora* cells undergoing senescence-induced by kalilo plasmids. *Mycologia*, 95: 500-505
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27: 801-824 (in Chinese)
- Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised

- checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29: 1-21 (in Chinese)
- Ding HG, 2006. The causes and prevention measures on degradation and aging of strains. *Edible Fungi*, 2006(1): 39-40 (in Chinese)
- Jiang XL, Kang ZS, Li ZQ, Wei GR, 2005. Ultrastructural changes of *Puccinia striiformis* in resistant wheat varieties. *Mycosystema*, 24: 123-129 (in Chinese)
- Klionsky DJ, Herman PJ, Emr SD, 1990. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*, 54: 266-292
- Kuck U, Stahl U, Esser K, 1981. Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in *Podospora anserina*. *Current Genetics*, 3: 151-156
- Li L, Fan XZ, Xiao Y, Zhou Y, Bian YB, 2010. The physiological characteristics and genetic diversity analysis of *Auricularia auricula-judae* cultivated germplasm in China. *Mycosystema*, 29: 644-652 (in Chinese)
- Li Y, 2001. *Auricularia auricula-judae* in China. Changchun Press, Changchun. 1-451 (in Chinese)
- Lin L, Jiang Q, Wang TH, 2008. Research methods for apoptosis of filamentous fungi. *Mycosystema*, 27: 474-481 (in Chinese)
- Neil ARG, Geoffrey MG, 1995. The growing fungus. Alden Press, Oxford. 78-80
- Sun D, 1990. Senescence and plasmid in fungi. *Acta Mycologica Sinica*, 9: 81-92 (in Chinese)
- Tang LH, Xiao Y, Bian YB, 2008. ISSR fingerprint analysis and SCAR marker of major cultivated strains of *Auricularia auricula-judae* in China. *Mycosystema*, 27: 243-251 (in Chinese)
- Umar MH, van Griensven LJLD, 1997. Morphological studies on the life span, developmental stages, senescence and death of fruit bodies of *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 101: 1409-1422
- Yan PS, Jiang JH, Wang DC, Luo XC, Zhou Q, 2002. Molecular taxonomic relationships of *Auricularia* species inferred from RAPD markers. *Mycosystema*, 21: 47-52 (in Chinese)
- Zhang H, Zhao BD, Ji H, Liang ZM, Weng ML, Yang TX, Cui H, 2008. Effects of water stress on ultrastructure of tobacco leaf trichome. *Acta Tabacaria Sinica*, 14: 45-47 (in Chinese)
- Zhang JC, Ma QF, Zhang PQ, Dai XD, Han ZH, Kong XH, 2007. Identification of cultivated strains of *Auricularia auricula-judae* from northeastern China by ISSR marker. *Mycosystema*, 26: 534-538 (in Chinese)
- Zheng GC, 1992. Cytobiology. 2nd edition. Higher Education Press, Beijing. 9-37 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 边银丙, 罗信昌, 周启, 2000. 木耳栽培菌株酯酶同工酶的酶谱多样性研究. 菌物学报, 19: 87-90
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. 菌物学报, 27: 801-824
- 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. 菌物学报, 29: 1-21
- 丁湖广, 2006. 菌种退化与老化原因及防止措施. 食用菌, 2006(1): 39-40
- 蒋选利, 康振生, 李振岐, 魏国荣, 2005. 抗病品种中小麦条锈菌细胞的超微结构变化过程. 菌物学报, 24: 123-129
- 李黎, 范秀芝, 肖扬, 周雁, 边银丙, 2010. 中国木耳栽培种质生物学特性及遗传多样性分析. 菌物学报, 29: 644-652
- 李玉, 2001. 中国黑木耳. 长春: 长春出版社. 1-451
- 林琳, 姜俏, 汪天虹, 2008. 丝状真菌细胞凋亡研究方法. 菌物学报, 27: 474-481
- 孙狄, 1990. 真菌的老化和质粒. 真菌学报, 9: 81-92
- 唐利华, 肖扬, 边银丙, 2008. 中国黑木耳主要栽培菌株 ISSR 指纹分析及 SCAR 标记. 菌物学报, 27: 243-251
- 闫培生, 蒋家慧, 王东昌, 罗信昌, 周启, 2002. 利用 RAPD 标记构建木耳属种间关系的研究. 菌物学报, 21: 47-52
- 张介驰, 马庆芳, 张丕奇, 戴肖东, 韩增华, 孔祥辉, 2007. 用 ISSR 分子标记鉴别东北地区黑木耳生产菌株的研究. 菌物学报, 26: 534-538
- 张华, 赵百东, 冀浩, 梁志敏, 翁梦苓, 杨天旭, 崔红, 2008. 水分胁迫对烤烟腺毛超微结构的影响. 中国烟草学报, 14: 45-47
- 郑国锷, 1992. 细胞生物学. 第二版. 北京: 高等教育出版社. 9-37