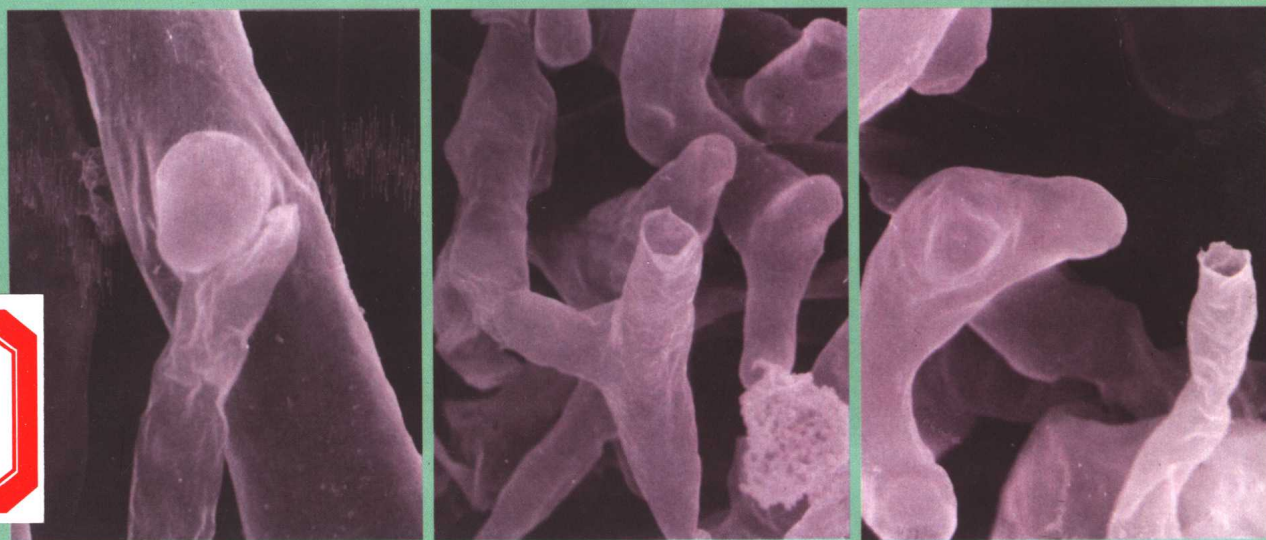


真菌原生质体技术

ZHENJUN YUANSHEG ZHITI JISHU

张志光 编著□

湖南科学技术出版社□



19.32
1

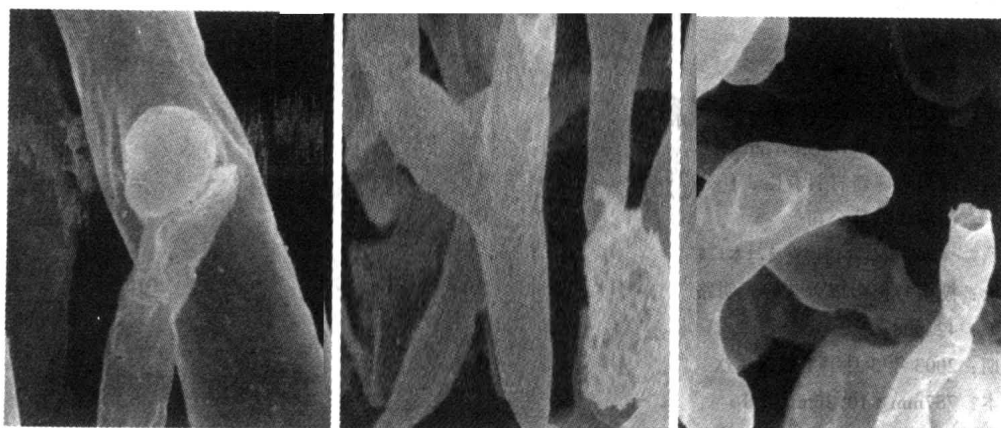
湖 南 师 范 大 学 出 版 基 金 资 助 出 版

真菌原生质体技术

ZHENJUN YUANSHEG ZHITI JISHU

张志光 编著□

湖南科学技术出版社□



HA Mo/05

真菌原生质体技术

编 著：张志光

责任编辑：刘奇琰

出版发行：湖南科学技术出版社

社 址：长沙市湘雅路 280 号

<http://www.hnstp.com>

印 刷：湖南飞碟新材料有限责任公司

衡阳印务分公司

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址：湖南省衡阳市黄茶岭光明路 21 号

邮 编：421008

出版日期：2003 年 3 月第 1 版第 1 次

开 本：787mm×1092mm 1/16

印 张：13.25

字 数：323000

书 号：ISBN 7-5357-3671-8/S·478

定 价：21.50 元

(版权所有·翻印必究)

序

真菌原生质体技术是真菌细胞工程的关键技术之一。真菌原生质体由于去掉了细胞壁的障碍,使得远缘杂交更为有效,而且原生质体还可作为基因转移的受体,在真菌遗传操作中具有十分重要的作用。同时,原生质体更易受诱变的影响,从而使得真菌性状或代谢方面发生改变。因此,原生质体技术在真菌遗传育种和生物技术研究方面具有广阔的应用前景。

张志光教授长期致力于真菌原生质体技术杂交育种工作,积累了丰富的经验,在食用真菌、医药真菌和工业真菌等领域,利用原生质体技术进行育种取得了很大进展,先后发表真菌原生质体技术论文 40 余篇,创造了较好的经济效益和社会效益。

现在,张志光教授将自己多年的工作积累及心得,精心整理,汇集成书。书中既阐述了原生质体分离再生、诱变、融合和基因转移等基本原理,又介绍了实际操作及应用方法和技术。书中很多内容是作者研究所得,并参考了国内外在这一领域的最新进展,文字简炼流畅,图文并茂,理论性、科学性和实用性均很强,确是真菌育种工作者不可多得的好书!在此我十分高兴地向生物工程技术和生物遗传育种工作者推荐。

中国工程院院士 官春云

2003 年 1 月 1 日

前 言

真菌原生质体技术 (fungal protoplast technology) 也称原生质体融合技术 (fungal protoplast fusion technology), 是真菌细胞工程的主干技术, 包括原生质体分离、融合、再生、转化、诱变和检测等系列技术体系。原生质体融合打破了细胞壁和“性”的障碍, 使得真菌的远源杂交和相同交配型的杂交成为可能。分子细胞学的兴起为原生质体技术的诞生和发展提供了科学的理论基础; 而原生质体技术作为一种技术手段用于生命科学的研究, 促进了生命科学的发展。原生质体技术应用于医药、食品、轻工、农业、林业等产业部门的菌种改良, 促进了相关部门产业的发展。

湖南师范大学生命科学学院真菌研究室从 20 世纪 80 年代初开始进行真菌原生质体技术的研究和应用工作。历经 20 年, 研究的真菌有 20 余种, 开展了种内、种间融合以及原生质体诱变和基因转化工作; 同时还与医药、轻工、食品等厂家协作, 用原生质体技术改良生产菌种, 提高质量, 改进质量, 降低成本, 取得了很好的效果。该室先后参加原生质体技术相关研究工作的教师、博士生和硕士生有: 张天晓、李东屏、陈作红、方芳、张平、周素荣、王磊、龙顺敏、郭建春、邹寿长、陈志高、熊清、谢庆云、罗定军、姚若松、陈静、卿志荣、秦湘红、陈琼花、李剑、陈豫等以及部分本科学生。书中融进了他们的研究资料。因此, 这是集体智慧和劳动的结晶。本书第三章第二节和第四章第二节、第五节由张晓元编写, 第六章第七节由方芳博士编写。插图由胡雅玲老师绘制。刘建强、胡劲松硕士为本书编排、初稿打印和校对等做了大量细致的工作, 付出了艰辛的劳动, 在此表示深深的谢意。

本书从基础理论、技术体系、应用实例等方面详细论述了真菌原生质体及其技术操作, 以及作者 20 多年的研究积累。其编写体系是以原生质体融合的操作程序为依据建立的。作者除了研究真菌原生质体技术以外, 尚研究过放线菌和植物原生质体技术。因此, 在编写此书时, 为了更好地说明问题, 在资料取舍上, 以真菌的资料为主, 并介绍了少量的放线菌和植物原生质体资料。

本书涉及 122 种真菌, 这些真菌的种名在书中第一次出现时我们都附以学名以备考证, 第二次以后出现则只写中文名。有些真菌的种名甚至属名都几经变化, 我们还是尊重原作者的意见, 未行改动。真菌分类基本采用 Ainsworth 等 (1983) 系统。

本书即将出版之际, 我深深地怀念我的贤妻纵平女士, 她对本书的编写给予了极大的关心与支持。即使在病危期间, 她仍鼓励我快把书稿写完。为了赶在她逝世一周年纪念日之前完成书稿的编写工作, 这几个月我夜以继日地工作, 终于提前两个月完成了书稿的编写。本书能够成稿有一半功劳是我亡妻的。我将把这本书作为最圣洁的祭品献给我的亡妻, 以慰她在天之灵! 呜呼! 哀哉!

限于编者的水平, 书中难免错误之处, 希望各位同行和广大读者在使用过程中随时向我们提出批评和指正, 不胜感激!

张志光

2002 年 8 月

目 录

第一章 真菌细胞和原生质体技术	(1)
第一节 真菌的细胞构造	(1)
一、细胞壁	(1)
二、细胞核	(3)
三、质膜	(4)
四、线粒体	(4)
五、核糖体	(4)
六、内质网	(4)
七、膜边体	(4)
八、液泡系	(5)
九、高尔基体、微管和微丝	(5)
十、质粒	(6)
第二节 真菌的染色体和基因组	(6)
一、真菌染色体	(6)
二、染色体数目和大小	(8)
三、基因组	(11)
第三节 真菌细胞分裂	(15)
一、细胞周期	(15)
二、无丝分裂	(15)
三、有丝分裂	(15)
四、减数分裂	(22)
第四节 原生质体和原生质体融合技术	(26)
一、原生质体概念	(26)
二、原生质体融合技术	(26)
三、原生质体融合技术的特点	(29)
第二章 原生质体分离和鉴定	(32)
第一节 原生质体分离方法和分离程序	(32)
一、分离方法	(32)
二、分离原生质体的程序	(33)
第二节 影响原生质体分离的因素	(33)
一、培养基和培养方法	(33)
二、溶壁酶	(35)
三、渗透压稳定剂	(40)
四、菌龄	(41)
五、螯合剂对原生质体稳定性影响	(42)

六、预处理对原生质体分离的影响	(42)
第三节 原生质体释放的方式和机制	(44)
一、原生质体释放过程及方式	(44)
二、原生质体形成的形态学变化	(46)
第四节 孢子原生质体的分离	(48)
一、用分生孢子分离原生质体	(48)
二、用担孢子分离原生质体	(49)
第五节 原生质体鉴别和保藏	(49)
一、原生质体细胞核染色技术	(49)
二、原生质体的活力鉴别	(50)
三、原生质体脱壁鉴定	(51)
四、原生质体电子显微镜制样方法	(51)
五、原生质体的计数	(52)
六、细胞培养小室在真菌原生质体研究中的应用	(53)
七、原生质体的超低温保存	(54)
八、荧光素标记法	(56)
第三章 溶壁酶和渗透压稳定剂	(58)
第一节 溶壁酶	(58)
一、细菌产生的溶解真菌细胞壁的酶群	(58)
二、真菌产生的溶壁酶	(64)
三、动物产生的溶壁酶	(66)
四、溶壁酶应用实例	(66)
第二节 渗透压稳定剂	(70)
一、常用的渗透压稳定剂	(71)
二、真菌细胞的水势与渗透作用	(71)
三、原生质体所处溶液体系的渗透压组成与变化	(73)
四、渗透压稳定剂对真菌原生质体的作用	(73)
第四章 原生质体融合	(75)
第一节 原生质体融合分类法	(75)
一、亲本性分类法	(75)
二、诱导融合因子性质分类法	(76)
三、亲缘关系分类法	(78)
第二节 遗传标记	(79)
一、形态学标记	(80)
二、营养缺陷型标记	(80)
三、抗性标记	(83)
四、同工酶标记	(84)
五、灭活原生质体标记	(85)
六、荧光标记	(86)
七、分子标记	(87)

第三节 原生质体融合程序	(88)
一、原生质体融合的程序操作和融合过程	(88)
二、原生质体融合原理	(95)
三、影响原生质体融合因素分析	(96)
第四节 融合子的检测	(100)
一、筛选融合子的方法	(100)
二、融合子遗传标记的检测	(101)
三、融合子的细胞学鉴定	(101)
四、结实性与子实体形态	(102)
五、生理、生化分析	(103)
六、免疫学鉴定	(104)
第五节 亲本遗传相容性和融合子的稳定性	(104)
一、亲本的遗传相容性	(104)
二、原生质体融合子的稳定性	(106)
第五章 原生质体再生	(112)
第一节 原生质体再生的原理和方式	(112)
一、细胞壁的再生	(112)
二、结构和功能的修复	(113)
三、转化	(114)
第二节 影响原生质体再生的因素	(116)
一、原生质体的融合与再生	(116)
二、原生质体的结构与再生	(117)
三、菌态和菌龄对原生质体再生的影响	(117)
四、培养基和再生方式对原生质体再生的影响	(117)
五、渗透压稳定剂对原生质体再生的影响	(118)
六、培养温度对原生质体再生的影响	(119)
七、溶壁酶对原生质体再生的影响	(119)
八、钙离子对原生质体再生的促效作用	(120)
九、整合剂对原生质体再生的影响	(120)
第三节 原生质体再生的方法及再生培养基	(120)
一、再生方法	(120)
二、再生率的计算方法	(122)
三、原生质体再生培养基	(122)
第六章 原生质体转化和诱变	(124)
第一节 酵母菌的原生质体转化	(124)
一、转化程序	(124)
二、酵母的载体及其选择系统	(126)
三、摄入 DNA 的机制	(127)
四、酵母细胞中的异源基因表达	(128)
五、游离细胞核和细胞质遗传成分原生质体的转移	(129)

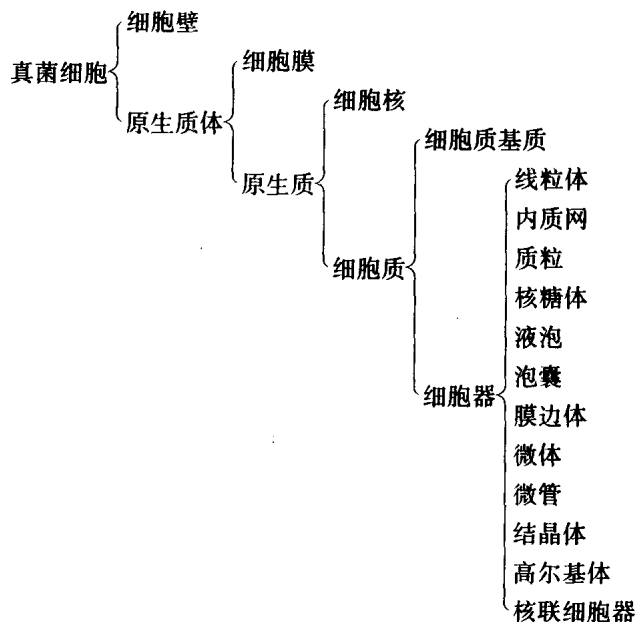
第二节 丝状真菌原生质体遗传转化	(132)
一、转化的步骤及发展史	(132)
二、转化方法	(133)
三、选择性标记	(134)
四、丝状真菌的启动子	(135)
五、丝状真菌转化的特点	(135)
六、外源基因表达及转化子的稳定性	(137)
第三节 真菌原生质体诱变	(139)
一、真菌原生质体诱变及其特征	(139)
二、真菌原生质体诱变程序	(141)
三、真菌原生质体诱变育种实例	(142)
第七章 原生质体技术的应用	(147)
第一节 原生质膜、染色体和抗药性机制	(147)
一、在细胞质膜和细胞壁形成的研究上的应用	(147)
二、药物对真菌作用的机制	(148)
三、在染色体 DNA 研究上的应用	(149)
第二节 真菌原生质体和次级代谢	(150)
一、初级代谢和次级代谢	(150)
二、原生质体在次级代谢研究中的应用	(151)
三、原生质体融合与青霉素合成	(154)
四、原生质体再生与抗生素的合成	(155)
第三节 单核、同核和巨大原生质体	(157)
一、原生质体单核化	(157)
二、利用单核原生质体育种的优势	(158)
三、影响单核原生质体分离的因素分析	(159)
四、单核原生质体再生菌丝遗传性状的分析	(159)
五、同核原生质体在次级同宗结合的食用菌杂交育种中的应用	(161)
六、巨大原生质体的形成及应用	(163)
第四节 杂交育种和杂种优势表达	(166)
一、杂种优势的概念	(166)
二、杂种优势表达途径实例	(166)
三、有关真菌杂种优势利用的几个问题	(178)
第五节 多倍体培育	(179)
一、相同交配型的原生质体融合	(179)
二、单倍体与双倍体原生质体融合	(180)
三、多倍体酵母培育及 STA 基因表达	(181)
附 录 微生物学名与中文名对照	(185)
参考文献	(194)

第一章

真菌细胞和原生质体技术

第一节 真菌的细胞构造

真菌的细胞由细胞壁和原生质体两部分构成。原生质体由细胞膜 (cell membrane) 和原生质构成。原生质 (protoplast) 是细胞膜内含有的生活物质, 包括细胞核 (nucleus) 和围在核四周的细胞质 (cytoplasm)。细胞内除细胞核以外的原生质叫细胞质, 而核内所含的原生质叫核质 (nucleoplasm)。细胞质又可分为细胞质基质 (cytoplasmic matrix) 和细胞质的细胞器 (cytoplasmic organelles)。前者是包括大分子链和分子聚合物的一种异质系统, 其中还含有很多酶、新陈代谢产物以及水溶液中一些可溶性的先驱物质; 而后者所指的细胞器是那些具有某些特殊的功能、一定的化学组成和膜包围成有形态学特点和结构分化的组分, 包括线粒体、质粒、内质网、核糖体、液泡、泡囊、膜边体、微体、微管、溶酶体等。



一、细胞壁

(一) 细胞壁结构

细胞壁是细胞的最外层结构单位，它集中了细胞 30% 左右的干物质。坚固的细胞壁保持了细胞的形状。生长着的菌丝壁在光学显微镜下是均匀的，但孢子的壁则有各种不同形状和厚度的纹饰。在电子显微镜下观察真菌的细胞壁有时呈现层状的薄片结构。粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 细胞壁共分四层 (图 1-1)：①最外层为无定形葡聚糖，厚度约 87nm；②第 2 层为糖蛋白形成粗糙的网，埋在蛋白质中，厚度约 49nm；③第 3 层为粗蛋白质层，厚度约 9nm，可能还混有其他成分；④第 4 层为几丁质构成的微纤丝，可能还有蛋白质成分，厚度约 18nm。

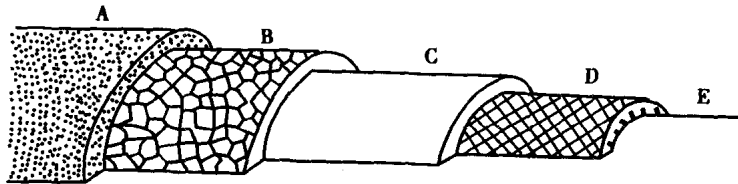


图 1-1 粗糙脉孢菌菌丝细胞壁结构 (邢来君等, 1999)

A. 葡聚糖层 B. 糖蛋白层 C. 粗蛋白质层 D. 几丁质层 E. 质膜

酵母菌的细胞壁在电镜下为清晰的两层。外层由几丁质、葡聚糖及蛋白质等组成，这层壁容许乙酸、丙酸、琥珀酸及甘油酸等通过，而拒绝淀粉和蛋白胨通过；内层由葡聚糖和甘露聚糖组成，容许乙酸和丙酸通过，拒绝甘油和琥珀酸通过。从葡聚糖、甘露聚糖和蛋白质的分布看，最外层是甘露聚糖，最内层是葡聚糖，中间为富含蛋白质的结构所隔开。

(二) 细胞壁的主要成分

1. 细胞壁化学成分的变化：真菌细胞壁的厚度因种类和菌龄而不同，一般为 100~250nm，真菌细胞壁的主要成分是多糖，如几丁质 (甲壳质)、脱乙酰几丁质、纤维素、葡聚糖、甘露聚糖等，此外还有蛋白质、类脂、无机盐等。真菌细胞壁的成分并非固定不变，因类群不同多糖的种类和数量不同。就是同一种真菌，不同的菌态其组成细胞壁的化合物比例和种类也不尽相同。两型真菌鲁氏毛霉 (*Mucor rouxianus* (Calm.) Wehmer) 在生活史中既能以丝状体出现，也可以单细胞的酵母状出现，单细胞菌体的细胞壁厚且有两层，丝状体的细胞壁只有一层，其厚度只有单细胞壁的 1/10。酿酒酵母的细胞壁几丁质成分只占整个细胞壁成分的 1%~2%，而芽殖孢子痕的几丁质占壁总成分的 50%。

2. 细胞壁几种主要化学成分：

(1) 微丝状的碳水化合物的聚合物：在大多数真菌中细胞壁微纤丝的组分为几丁质，即 β -(1-4) 键连接的 N-乙酰氨基葡萄糖为单元的无支链多聚体。裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 细胞壁的几丁质含量很低，其细胞壁微丝要素主要是由 β -(1-3) 键的葡萄糖残基所组成的支链聚合物，但带有 β -(1-6) 键长 15~30 个葡萄糖单位的侧支。卵菌类的樟疫霉 (*Phytophthora cinnamomi* Rands) 和棘腐霉 (*Pythium acanthicum* Drechsl.) 细胞壁的微丝状碳水化合物聚合物是有一支链的葡聚糖聚合物，其主链有 β -(1, 4) 键，侧支有 β -(1, 3) 键和少量的纤维素，纤维素是以 β -1, 4 葡萄糖链为单元的多聚体。

(2) 无定形的碳水化合物的聚合物：在丝状真菌中有着分布范围广泛的葡聚糖，普通的几种是：一种支链 β -(1, 3)， β -(1, 6) 键的聚合物，一种支链 α -(1, 3) 键的聚合物。一种以上的聚合物能同时发生于同一细胞内。例如裂褶菌 (*Schizophyllum commune* Fr.) 细胞壁既有 α -(1, 3) 键、聚合物和 β -(1, 3) 键、 β -(1, 6) 键，葡聚糖同时存在 (De Vries, 1974)。

酵母的细胞壁是特别不均一的。在酿酒酵母的细胞壁中，除微丝的 β -(1, 3)键、 β -(1, 6)键的均聚物外，主要组分是一个支链磷酸甘露聚糖聚合物，其骨架是由 α -(1, 6)键甘露糖残基的组成，其侧支为 α -(1, 2)键，也有 α -(1, 3)键。此外，在酵母的细胞壁中尚有半乳甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖。接合菌亚门中，以脱乙酰几丁质为主，而不像其他真菌中的葡聚糖和甘露聚糖。担子菌亚门的小麦秆锈病菌 (*Tuccinia graminis*) 的质孢子细胞壁中也有脱乙酰几丁质，此外尚有葡甘露聚糖。

(3) 蛋白质和糖蛋白：子囊菌亚门中的许多菌，含 S-基团和 SH-基团推测是在蛋白质中 (Oliver, 1974)。某些蛋白质至少是附着细胞壁上的各种酶，特别是转化酶，而且这些酶几乎完全是糖蛋白。例如，在酵母中附在壁上的酶有葡聚糖酶、甘露聚糖酶、蔗糖酶、碱性磷酸酶和酯酶等。葡聚糖酶和甘露聚糖酶可能在出芽时软化细胞壁。某些糖蛋白是作为细胞壁的结构发生。例如，在酿酒酵母中有两种甘露聚糖成分，其中之一是与蛋白质相结合。酵母菌细胞壁的外层是磷甘露聚糖，而肽-磷甘露聚糖位于其内，并可能通过二价离子与外层结构的磷甘露聚糖形成络合物。

(4) 脂类：脂类物质占整个细胞壁的一小部分。例如，鲁氏毛霉的菌丝细胞壁脂类占整个细胞壁组分的 5.7%，孢子则为 9.8%，孢囊梗只占 4.8%。脂类在细胞壁内的功能尚不太清楚。

二、细胞核

(一) 细胞核的形状和大小

真菌的细胞核比其他真核生物的细胞核要小，一般直径为 2~3 μ m，但也有例外，如接合菌亚门中的蛙粪霉 (*Basidiobolus ranarum* Eid.) 核的直径可达 25 μ m。细胞核形状变化很大，通常为椭圆形、球形等。例如，草菇 [*Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) Sing.] 一个菌丝菌体细胞内有三种细胞核：大核，直径平均 5.04 μ m，显微染色时染成蓝色颗粒状的染色质分布在染成红色的核液中，通常大核进行有丝分裂，增加核的数目。小核，直径平均 1.68 μ m，染色质不呈颗粒状，整个细胞核均匀地染成蓝色。迁移核 (Migrating nuclei)，呈蝌蚪状，一端膨大，另一端则尖细，其长度可达 16.8 μ m，染色质呈颗粒状。一个细胞内迁移核的迁移方向都是一致的。迁移核除在细胞质内移动外，同时还能通过横隔膜的孔，由一个细胞转移到另一个细胞中 (张树庭, 1975)。

不同真菌细胞核的数目变化很大，青霉属 (*Penicillium*) 和须霉属 (*Phycomyces*) 的一个细胞内可能有 20~30 个细胞核，占细胞总体积的 25%~30%。担子菌纲的单核菌丝 (初级菌丝) 和双核菌丝 (次级菌丝)，一个细胞内有 1 个或 2 个或多个细胞核，占总体积的 0.5%。决定真菌中细胞核和细胞质比值的因素是什么，至今还不太了解。一个菌丝不同部位的细胞其核数目是有差异的，值得注意的是丝状真菌，菌丝顶部区域往往没有细胞核。

有些真菌因细胞染色体倍性不同，则细胞核的数目也不同，如酱油曲霉 (*Aspergillus sojae* Sakag. et Thom) 单倍体分生孢子平均有 4.22 个细胞核；而双倍体的分子孢子，平均有 2.21 个核。米曲霉 [*Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn.] 的分生孢子细胞核数目也表现出这样的趋势，二倍体的分生孢子的细胞核数目为单倍体的一半，前者每个孢子平均有 1.9 个核，后者有 3.5 个核。

(二) 细胞核的结构

在固定与染色的真菌细胞中，可看到下列细胞结构：①核被膜；②染色质；③核质；④核仁。

核被膜 (nuclear envelope) 是由两层膜所组成, 包围在核外, 把核和细胞质隔开。两层膜的中间为空隙, 叫核周腔 (perinuclear space), 宽约 10~30nm。外膜与内质网相连, 其上有核糖体。因此, 有人认为核膜是内质网的一部分, 内质网腔与核周腔是相通的。

用 Feulgen 染色反应证明真菌在细胞分裂期间, 其染色质几乎全是常染色质的, 而异染色质则很少。通过电子显微镜技术研究真菌的染色质, 已有脉孢菌属、柄孢壳属、镰刀菌属和鬼伞属的一些种被证实具有异染色质的结构。可是有些真菌由于异染色质的区域很少, 所以很难在电镜下将染色质显示出来 (Girbardt, 1970)。

核仁 (nucleolus) 经常出现于间期细胞核中, 在细胞核分裂期间, 发生周期性的变化, 有时消失, 有时再出现; 但有些真菌在核分裂期, 核仁是永存的。水霉属和被囊霉属的电子显微镜研究结果表明, 每一个分裂间期的细胞核有一个明显的核仁, 核仁通过核膜与细胞质中的中心粒 (即核联细胞器) 相连接 (Heath, 1974a, b)。蛙粪霉属 (*Basidiobolus*) 的核仁电子显微镜研究可看到核仁有 3 种成分: ①纤维成分。其中含有纤维, 电子密集不透明, 形成网状物。②颗粒成分。其中含有密集的颗粒, 分散在纤维网中, 可能是前核糖体颗粒。③核仁液泡, 也称核仁空隙 (nucleolar intersties), 为圆珠形的光亮区, 出现在颗粒区。其功能可能与前核糖体颗粒的储藏和运输有关。核仁也像核质一样是有基质的, 称核仁基质, 其中含有骨架和基质物质。

核质 (nucleoplasm) 是间期核内非染色或染色很浅的物质, 染色质与核仁悬浮其中。当这些基质呈半固体状态时称核质, 呈现液体状态时称核液。

三、质膜 (plasmalemma)

真菌质膜也像其他生物的质膜一样, 主要由磷脂双分子层和镶嵌其上的蛋白分子构成。

四、线粒体 (mitochondria)

真菌线粒体的形状是多种多样的, 可以是圆形、椭圆形, 有的可延长到 30 μ m, 有的呈分枝状。圆形的线粒体普遍存在于菌丝顶端, 而椭圆形的则常见于菌丝成熟部分。真菌线粒体的形态是可变的, 常因细胞种类、生理状况和外界环境条件不同而发生变化。如根霉的菌丝及未成熟的孢子的线粒体呈球形; 成熟的孢子为巨大的扭曲形; 萌发中的孢子又变为球形, 数目增多。真菌细胞不同生长周期, 如在生长、分裂、分化各不同过程中, 线粒体也有所变化。线粒体是适应一定目的而相应地发生变化的细胞器。

五、核糖体 (ribosome)

真菌的核糖体包括 60S 和 40S 两种主要亚基。大的亚基包括 25SRNA、5.8SRNA、5S-RNA 和 39~41 种蛋白质; 40S 亚基包括 18S RNA 和 30 种蛋白质。25S RNA 分子的分子质量在各种真菌中是有一定区别的, 而 18S RNA 的区别不大。

六、内质网 (endoplasmic reticulum, ER)

真菌内质网的形状、大小和在细胞内分布的数量与环境条件、发育阶段和生理状况有关, 一般在幼嫩菌丝细胞中比较多。

七、膜边体 (lomasome)

膜边体又称“边体”、“连缘体”。它是某些真菌菌丝细胞中的一种特殊细微质膜结构, 位于细胞膜和细胞壁之间的单层膜包围的细胞器。膜边体的形状和位置与细菌的中体 (mesosome) 相似, 有人建议称为“真菌中体”。这种结构尚未在真菌以外的其他生物细胞中发现。膜边体由高尔基体或由内质网的特殊部位形成。它与高等植物细胞的质膜体 (plasmalemmasome) 的形状和位置相似, 但来源不同, 前者来源于细胞内膜, 后者来源于细胞质膜,

即由质膜的内面形成。

膜边体的形态变化很大,可为管状、囊状、球状、卵圆形,成为多层折叠的膜,能互相结合或与其他细胞器或膜相结合。内有泡状物或颗粒状物。膜边体内含有几丁质水解酶和几丁质合成酶,并含有细胞壁前体物质。膜边体的功能可能与细胞壁的形成有关。

八、液泡系 (vacuome)

液泡系是指在细胞内,凡是由膜所包围的小泡和液泡,除线粒体外都属于液泡系。它包括液泡 (vacuole)、泡囊 (vesicles)、溶酶体 (lysosome) 和微体 (microbody) 等。

(一) 液泡 (vacuole)

液泡的形态变化很大,液泡的大小和数目随着菌龄而增多和增大。小液泡可以聚集成大液泡,例如水霉属的菌丝亚顶区最初有许多小的液泡,尔后慢慢聚集成大的液泡。反之,大液泡也可分解成小的液泡,例如啤酒酵母的细胞就有大液泡分解为小液泡的过程。液泡由液泡膜和细胞液构成。真菌液泡膜的组分尚不太清楚,但液泡的内含物十分特殊,主要是碱性氨基酸,如精氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸和谷氨酰胺等。液泡中的氨基酸常游离到液泡外。所有的多磷酸盐都储藏在液泡内。液泡内还有多种酶,如蛋白酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶、核酸酶、纤维素酶等。

(二) 泡囊 (vesicles)

所有生长的真菌菌丝的顶端细胞都有大量的泡囊,而且哪里有细胞壁合成哪里就不难见到泡囊。它是由单层膜包围所形成的囊泡状的结构,并含有蛋白质、多糖、磷酸酶等。终极腐霉 (*Pythium ultimum* Trow) 的泡囊有大小两种,直径分别为 250nm 和 50nm。云芝的大泡囊直径为 160~180nm,微泡囊直径为 50~60nm (Grove 等, 1970b)。有些真菌如白绒鬼伞 (*Coprinus lagopus* Fr.) 和水霉中只有一种大小的泡囊。泡囊和菌丝的顶端生长有关,可以释放胞外酶和细胞壁的合成物质,例如玫瑰红葱红霉 (*Oedocephalum roseum*) 的菌丝细胞壁合成时,大泡囊直径约 100nm,含有细胞壁的建成物质;微泡囊直径约为 40nm,含有软化细胞壁的酶。在细胞扩展时,此时没有明显的合成作用,则只有微泡囊的发生,没有大泡囊的发生。酿酒酵母在出芽生殖时,其泡囊内含有大量的葡聚糖酶及其他的酶 (Matile 等, 1971)。有些寄生性的真菌的泡囊可能和高等植物的寄主植物相关。泡囊是由内质网和高尔基体的特殊部位形成的。

(三) 溶酶体 (lysosome)

溶酶体是存在于细胞质中的微小泡,大小为 400nm 左右。它含有各种水解酶,能作用于蛋白质、核酸和多糖类。这种颗粒具有溶解和消化的作用。在须霉属的泡囊梗中曾发现过自体吞噬泡的次级溶酶体 (Thornton, 1968)。

(四) 微体 (microbody)

微体也是细胞质内的细胞器,由一层膜所包围的圆球形颗粒,直径为 0.5~1.5nm,功能与代谢有关。微体可以形成伏鲁宁体,在子囊菌和担子菌中常与隔膜结合形成孔塞。

九、高尔基体、微管和微丝

(一) 高尔基体 (golgi body)

高尔基体仅在根肿菌、前毛壶菌、卵菌等真菌中有报道。在接合菌、子囊菌和担子菌中很少有报道。

(二) 微管和微丝 (microtubules and microfilaments)

微管是真菌细胞质骨架成分之一,具有许多功能,如保持细胞的形状,染色体运动,细

胞内的运输等。微丝的功能与物质的运输和细胞质的运动有关。

十、质粒

过去只知道细菌和放线菌有质粒，真菌质粒最早在酵母菌中被发现，继而在柄壳孢中发现质粒。随后认识到质粒在真菌中广泛存在，并可以构建带有原核和真核两类复制起点的杂种载体用做穿梭质粒，于原核或真核寄主中均可复制并表达。真菌质粒的构型有两类：一种为线形 DNA 链；另一种为环状 DNA。按其存在的形式进行研究，将已发现的 30 多种真菌质粒归为以下三类：

(1) 与线粒体 DNA 同源者：如鹅柄壳孢菌 (*Podospira anserina*) 的菌丝体内有共价连接的闭环 DNA 即质粒，大小为 2.4kb，周长为 0.75 μ m。菌丝测序表明，生长初期质粒 DNA 整合在线粒体基因组中，菌丝老化前期，质粒 DNA 从线粒体 DNA 上摘离下来，在线粒体中复制扩增。线粒体破裂后，从线粒体中释放出来，在细胞质中自律复制，通过菌丝融合侵染健康菌丝。当质粒 DNA 在细胞质大量地自我复制后，菌丝即开始老化，生长速度缓慢，气生菌丝大量减少，基生菌丝变得细弱，菌丝膨大，形成空泡而破裂。核基因的突变能阻止质粒 DNA 释放，也阻止了老化的进程，说明真菌菌丝的老化受核基因和质粒基因控制。细胞的前老化期加入 DNA 复制抑制剂，可使老化延期发生，而加入蛋白质合成抑制剂不起作用。此质粒与细胞色素 C 氧化酶内含 (Col) 基因序列相同。鹅柄壳孢菌的可移动的内含子包括以下步骤：①在幼菌丝体中 pl DNA 是 Col 基因。②在每个 mRNA 中 Col 加工后，幼嫩菌丝细胞内存在大量的 pl DNA 转录模本。③在老化的菌丝细胞内，pl DNA 形成是以 DNA 拼接，或内含子环状 RNA 的反转录而发生。④一旦释放，扩增的质粒转移到线粒体或核的结构基因内。线粒体基本功能的封闭，继而导致细胞的死亡 (梁平彦, 1992)。

(2) 独立于线粒体的质粒：如粗糙脉孢菌的环状质粒，独立存在于细胞质内，大小为 3.6kb。麦角菌 [*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.] 中已发现 4 种质粒，分子质量分别为 10.0kb、6.6kb、5.3kb 和 1.1kb。DNA 与 DNA 杂交分子杂交证明，4 个质粒有同源性 (Tudzyski, 1983)。

(3) 位置不明的质粒：例如尖镰孢菌 (*Fusarium Oxysporum*) 的环状质粒，分子质量为 46.7kb，这种质粒与尖镰孢菌的致病性有关。当这种质粒消失时，其致病性随之消失。这种质粒已克隆到大肠杆菌中，并能复制和表达，表现为对某些抗菌剂的抗性，具有利用琼脂作惟一碳源的能力以及多聚半乳糖醛酸酶，可作基因工程载体。

第二节 真菌的染色体和基因组

一、真菌染色体

真菌的染色体在细胞生活周期的大部分时间里都是以染色质 (chromatin) 的形式存在的。染色质是一种纤维状结构，也叫染色质丝，它是由最基本的单位——核小体 (nucleosome) 成串排列而成的。核小体使得染色质中 DNA、RNA 和蛋白质组织成为一种致密的结构形式。在细胞核的大部分区域，染色质丝的折叠压缩程度比较小，进行细胞染色时着色较浅，这一部分染色质叫常染色质 (euchromatin)。常染色质中 DNA 的包装比例 (packing ratio) 约为 1000~2000，即 DNA 的实际长度是染色质长度的 1000~2000 倍。细胞分裂时，常染色质进一步折叠压缩，形成典型的染色体结构，这时 DNA 的包装比约为 10000。着丝点等部位的染色质在细胞分裂间期就折叠得非常紧密，和细胞分裂时期染色体的情况差不

多,这部分叫异染色质 (heterochromatin),其 DNA 包装比在整个细胞周期中没有多大变化。异染色质分两类:一类叫组成型异染色质,其 DNA 序列从来不转录,如卫星 DNA;另一类叫机动性异染色质,在某些情况下为常染色质,在另外一些情况下为异染色质。细胞进入分裂期,染色质丝组装成染色体。

由于真菌染色体微小和染色技术上的困难,致使在光学显微镜下研究真菌染色体进展缓慢。同一种真菌,不同的研究者报道的染色体数目差别悬殊。如酿酒酵母,最初文献报道有 4 条染色体 8 个基因 (Lindgren, 1951);以后经过 10 多年的研究,报道有 14 条染色体 8 个基因 (Mortimer, 1966);到了 20 世纪 70 年代则扩展到 17 个染色体和 3 个断片,定位的基因超过了 150 个 (Mortimer 和 Schild, 1980, 1985);到了 20 世纪 90 年代初,定位的基因已超过 300 个以上。尽管现代生物染色体研究技术已非常先进,但对于真菌染色体研究来说,尚存在不少的困难。

(一) 真菌染色体研究技术的困难和进展

1. 微小的染色体和复杂的真菌核体 (nuclear apparatus): 真菌的细胞核比其他真核生物的细胞核都要小,一般直径为 $2\sim 3\mu\text{m}$,而高等植物则在 $5\sim 20\mu\text{m}$ 之间。例如酵母菌的染色体小到和大肠杆菌的大小差不多,在光学显微镜下是不可识别的微小结构。

许多真菌细胞分裂时核膜不消失,染色体在核膜内分散性能差;典型的中期板又很难被发现,终变期和中期是比较容易染色的,但它们却往往成团;有的真菌分裂前中期染色体首尾相连;有的真菌细胞核发生部分穿孔现象,部分染色质溢至细胞质,这些特点都为真菌的核型分析和染色体研究带来困难。

2. 显微染色技术的困难和改进:

(1) 铁矾-苏木精染色方法是研究真核生物细胞核和染色体经典方法。可是用该方法染色真菌的细胞核,在许多情况下只有核仁被染上颜色,染色质却难染上色,致使在相当长的时间内把某些真菌的核仁当成细胞核,使真菌细胞核学的研究走过了一段曲折的路程。

铁矾-苏木精对真菌细胞核染色的效果主要取决于固定剂的性质。如果用含有甲醛或氯化汞的固定剂固定真菌的细胞,用铁矾-苏木精染色,染色质就完全染不上颜色,核仁周围就是一个无色透明的亮区。改变固定剂的性质,或改用铬-钼酸等混合物固定,则核仁和染色质皆可被染上颜色,就不会把分裂期有规律变化的核仁与染色体混为一谈。

(2) Feulgen 染色法是研究分裂期细胞核的有效方法,但用于真菌细胞核染色的效果却很差。某些真菌分裂期的细胞核,由于 DNA 含量低,或者由于水解过程中染色质强烈地散开,或者有些真菌的细胞核被证明是常染色质的,异染色质含量较少,可能导致 Feulgen 染色效果较差。C. F. Robinow 及其同事改进了真菌细胞核 Feulgen 染色法,在水解样品的基础上,用酸性染料将其固定,核仁完全没有被染上色,而核仁周围的染色质完全被染上色。

3. 电子显微染色技术的困难和改进: 由于应用电子显微镜研究真菌细胞核分裂相,对于真菌减数分裂和有丝分裂有了更清楚的了解,如脉孢菌属 (*Neurospora*)、柄孢壳属 (*Podospora*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、鬼伞属 (*Coprinus*) 等许多种真菌的染色体组型得到了系统的研究 (Girbardt, 1970)。但最初应用电子显微镜研究真菌的染色体存在一些困难:在透视电镜下,用常规的电子显微镜技术制片染色,真菌的染色体很难观察清楚,原因是某些真菌细胞核常染色质较多,异染色质较少,染色体就存在固定和染色的困难。有许多真菌核仁在分裂期不消失,发生规律性的变化,在电子显微镜下区别核仁和染色质是有一定困难的。但通过技术改进,这个问题已得到解决。如将电子显微镜观察的真菌材料先用谷氨酸乙

酯固定,用核糖核酸酶(RNase)处理,最后用钨酸固定,用醋酸铅染色,染色质比核仁的物质反差更大。

利用改进后的固定和染色技术,在酿酒酵母菌减数分裂的研究上取得了突破性的进展,证实酿酒酵母第一次减数分裂前期也分为细线期、粗线期、双线期和终变期。前期染色体凝集,形成联会复合体和重组,染色体“花束状”排列等。技术措施:①减数分裂高峰期制备原生质体;②用多聚甲醛固定原生质体;③硝酸银染色(Dresser, 1988)。

虽然利用电子显微镜技术研究真菌细胞核分裂和染色体取得了巨大的进展,可是利用电子显微镜技术进行染色体的计数研究是困难的。

4. 脉冲电泳技术的应用:脉冲电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)技术是20世纪80年代中期兴起的核型分析技术,已广泛用于真菌的核型分析和核型多态性研究,为真菌细胞学和遗传学的深入研究和创造了新的条件。PFGE的出现使得染色体数目及大小的测定获得了巨大进展。它不仅使大于50kb DNA分子的分离成为现实,而且能分离10Mb以上的巨型DNA片断。

20世纪80年代中后期,发明了一系列脉冲场电泳装置,并应用于大片断DNA分离。垂直交变电场(orthogonal field alternation gel electrophoresis, OFAGE)克服了脉冲场梯度电泳(pulsed field gradient gel electrophoresis, PFGGE)分离的DNA带向外歪曲而难以比较各片段迁移率的缺点,使凝胶中间的DNA带有所改良,但凝胶边缘的DNA带仍然歪曲。电场转换电泳(fixed inversion gel electrophoresis, FIGE)能使DNA带更直,但只能分离800kb以下的片断,且不能给出清晰的分辨率。转动凝胶电泳(rotating gel electrophoresis, RGE)采用单一的均质电场,通过间歇地或不连续转动电场中的凝胶板而改变电场而作用于凝胶,从而使DNA分子在垂直的泳道上分离开来,但琼脂糖浓度必须高于1.5%,否则凝胶易破裂。转动电场电泳(rotating field electrophoresis, RFE)中凝胶板是固定不变的,但电场方向处于转动变化中,实际操作中电场方向难以调节和控制。总之,早期的脉冲电泳装置,电场多数情况下是非均质的,从而导致DNA分子的泳道歪曲,分离结果不理想(边银丙等, 1996)。随后又研制出了“等高锁状均质电场电泳”(contour-clamped homogeneous electric field),简称CHEF(Chu等, 1986)。CHEF系统中将24个电极均匀排列在等边六边形周围,产生一个等强度的均质电场,两电极间呈120°夹角。由于CHEF电泳具有分离的DNA带较直、分辨率高、凝胶板可用于分子杂交等特点,各种CHEF电泳装置在真菌核型分析中应用最多。

脉冲电泳应用的时间并不长,从研制成功到现在也不过仅仅10多年的时间,除酵母菌以外,已有30属以上的丝状真菌进行了研究。而且测定出来的染色体数目和常规显微技术测定数目是相同的,或者纠正了常规显微技术测定的不确切数目。当然脉冲电泳本身还存在一些技术问题,分子质量相近的染色体DNA难以有效地分离开来,只能借助于溴化乙锭染色的荧光强度和DNA探讨杂交结果来判断。另一方面,电泳条件的选择比较复杂,分子质量大于3.5Mb的DNA分子极难分离成带,常严重拖尾。随着技术的进步,这些问题都将不断得到解决。最有效的方法是对真菌进行核型分析时将CHEF技术、常规的显微技术和电子显微镜技术结合使用,测定的染色体数目将更加准确。

二、染色体数目和大小

用常规的显微技术检测出的一些真菌单倍体的染色体最少的为阿州粪壳(*Sordaria arizonensis*),其单倍体只有2个;裂褶菌和禾冠柄锈菌黑麦变种(*Puccinia coronata socalis*)