

## 絲核菌之細胞核螢光染色

王子政 謝式埤鈺

台中市 國立中興大學植物病理學研究所

接受日期：中華民國 82 年 5 月 9 日

### 摘 要

王子政、謝式埤鈺，1993。絲核菌之細胞核螢光染色。植病會刊 2:98-102。

切取絲核菌生長在馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (PDA) 菌絲圓盤，倒置在載玻片上讓菌絲長出，再以 4',6'-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI)(pH 7) 或 Acridine orange (pH 10) 染色，可以使細胞核清楚的顯現。用 DAPI 染色時，可再用 Fluorescent brightener 28 複染，以增強細胞壁及隔膜之染色效果。本染色技術簡便快速，並能成功地把絲核菌的細胞核染色。

關鍵詞：絲核菌、細胞核螢光染色。

### 緒 言

鑑定絲核菌 (*Rhizoctonia* spp.) 時，確定菌絲細胞的核數是一項重要的工作 (3,8)。一般可藉用 aniline blue (4,10)，safranin O (2) 和 HCl-Geimsa (5,9) 等染劑染色，在光學顯微鏡下直接觀察。螢光染色法，則可用 4',6'-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI)(8)，acridine orange (11) 和 Hoechst (6) 等螢光染劑染色後，於螢光顯微鏡下觀察。但這些方法不是很難染色成功，就是染色過程太複雜。我們曾使用 Hoechst 螢光染劑染色本省草皮分離之絲核菌 (1)，但常常要花許多時間染很多片，才能得到滿意結果。此外大多數染色方法是將培養之菌絲挑至載玻片上，再滴加染液觀察，這往往造成菌絲糾結，難以觀察。亦有將菌絲培養於水瓊脂或馬鈴薯葡萄糖培養基 (PDA) 上，或者將 PDA 塗佈於載玻片上再接種培養菌絲，而後染色觀察，此法在操作手續上較麻煩，且培養基易吸附染液，不易用緩衝溶液洗去多餘染劑，亦影響觀察。因此本實驗之研究目的在尋求改良的螢光染色技術，以利 *Rhizoctonia* spp. 之鑑定。

### 材料與方法

#### 螢光染劑之製備

將 Hoechst Dye 33258 400 mg，DAPI 10 mg，Acridine orange 25 mg，Ethidium bromide 10 mg，

Chromomycin A 10 mg，Quinacrine-2HCl 500 mg 和 Fluorescent brightener 28 (calcofluor white M2R) 10 mg (以上染劑均為 SIGMA) 分別溶於 100 ml 去離子水中製成母液，並於 4 C 中保存。

以 0.1 M 醋酸和 0.1 M 醋酸鈉配製 pH 4 之醋酸鹽緩衝液。以 0.1 M 磷酸二氫鈉和 0.1 M 磷酸氫鈉配製 pH 7 之磷酸鹽緩衝液。以 0.1 M 甘氨酸和 0.1 M 氫氧化鈉配製 pH 10 之甘氨酸氫氧化鈉緩衝液 (glycine NaOH buffer)。各種染劑取 1 ml 母液，分別加入 9 ml 緩衝液，製成 pH 4，7，10 等三種染液。

#### 菌絲培養和染色過程

供染色 *Rhizoctonia* spp. 有 152 菌株，其中標準多核菌絲融合群有 12 菌株 (AG-1-AG-9、BI、WAG-O 和 WAG-Z)，標準雙核菌絲融合群有 15 菌株 (AG-A、Ba、Bb、C、D、E、F、G、H、I、K、L、O、P、和 Q)，以及由草皮分離所得 125 菌株 (1)。其中 AG-1 至 AG-5，8，9 承台灣省農業試驗所贈送，AG-6，7，BI 及 WAG-O，WAG-Z 和雙核菌株 AG-A 至 AG-Q，則由北海道大學，生越明 (Akira Ogoshi) 博士贈送。這些菌株均培養於 PDA 平板上，28 C 黑暗二至三天後，以直徑 0.9 cm 之鑽孔器切取菌落邊緣，即為含菌絲之 PDA 圓盤 (disc)。

載玻片以 75% 酒精擦拭乾淨，置入含濾紙之 9 cm 培養皿之玻璃環上，經 160 C 三小時乾熱滅菌。冷卻後，將含菌絲之馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (PDA) 圓盤，以菌絲生長面貼於載玻片上，加無菌水濕潤濾紙，於

28 C 黑暗放置 36~48 hr, 讓菌絲由 PDA 圓盤長出, 而貼於載玻片上 (6)。

取出載玻片, 移去菌絲圓盤, 滴一滴染液在菌絲上並蓋上蓋玻片, 以相同酸鹼值之緩衝液洗去染液, 於螢光顯微鏡 (Nikon, fluorescence microscope) 下, 以 100 W 高壓汞燈為光源, 經組合濾光器濾光後觀察 (表一)。

表一、本研究使用之螢光濾光組合器

TABLE 1. Epi-fluorescence filter combinations used in this study<sup>1</sup>

Combination name	Dichroic mirror (nm)	Excitation filter (nm)	Barrier filter (nm)
UV-1A	400	365/10	400
BV-1A	455	435/10	460
B-2A	510	450-490	520
G-2A	580	510-560	590

<sup>1</sup> These are appropriate combinations for fluorescent microscopes.

表二、螢光染液不同酸鹼值對絲核菌細胞核及隔膜之染色效果

TABLE 2. Efficiency of nucleus and septum staining of *Rhizoctonia* spp. by various fluorescent dyes with different pH values

Dye solution	Specific for	Filter set	pH	TCCH (AG-4)		NP18 (WAG-O)		TKS (AG-F) <sup>1</sup>	
				Nuclei	Septa	Nuclei	Septa	Nuclei	Septa
Hoechst	A-T base of DNA	UV-1A	7	+++	+	+	+	++	++ <sup>2</sup>
DAPI	A-T base of DNA	UV-1A	4	+++	+	++	++	+++	++
			7	+++	++	++	+	+++	++
			10	+	+++	++	+	++	+
Acridine Orange	double-stranded nucleic acid	B-2A	4	+	+	+	+	+	+
			7	++	++	++	+	++	+
			10	+++	++	+++	++	+++	++
Ethidium Bromide	DNA-double stranded	G-2A	4	+	-	++	-	+++	++
			7	+	-	-	-	+++	++
			10	-	-	-	-	++	+
Quinacrine-2HCl	A-T base of DNA; chromosomes bands	BV-1A	4	-	+	-	+	-	+
			7	-	++	-	++	-	++
			10	-	++	-	++	-	++
Chromomycin A3	G-C base of DNA	BV-1A	4	-	+	-	+	-	+
			7	-	+++	-	+++	-	+++
			10	-	++	-	++	-	++

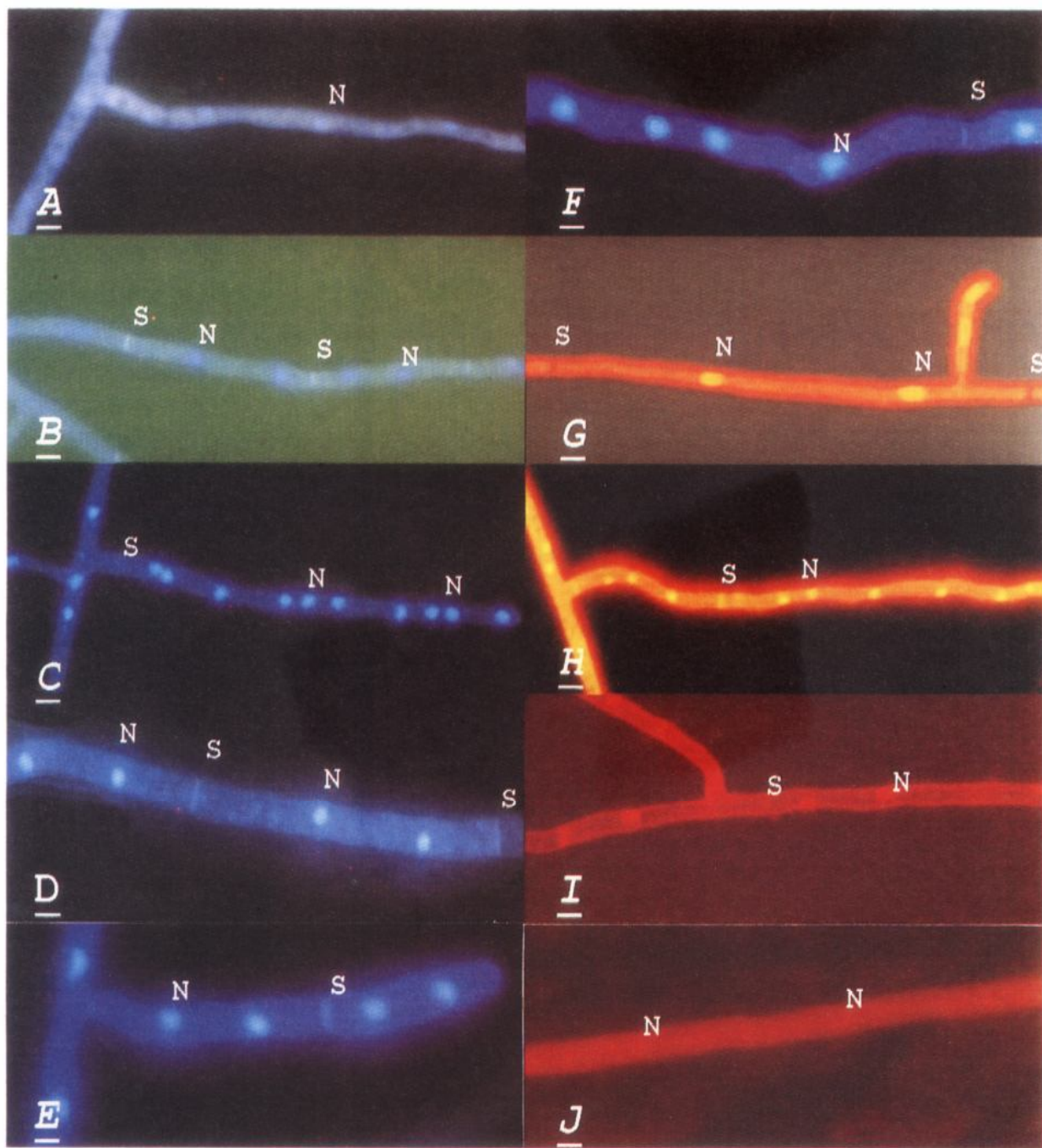
<sup>1</sup> The mycelial plug was placed on slide and incubated at 28 C in darkness for 36-48 hr and then stained.

<sup>2</sup> +++: the nuclei or septa were stained clearly; ++: the nuclei or septa were stained fairly clear; +: the nuclei or septa could be partly stained; -: the nuclei or septa could not be stained.

隨後使用 1 ppm 螢光增輝劑 (Fluorescent brightener 28, M2R) 複染, 再用相同酸鹼值之緩衝液洗去多餘染液, 以觀是否可以增強染色效果。

## 結 果

最先測試六種螢光染劑在三種酸鹼值 (pH 4, 7, 10) 下, 對絲核菌三菌株, TCCH (AG-4)、NP18 (WAG-O) 和 TKS (AG-F) 之細胞核及隔膜染色效果, 結果 (表二) 發現 DAPI 在 pH 4 與 pH 7, 和 Acridine orange 在 pH 10 之核染效果最好, 可以非常清楚地看出所有供試菌株之細胞核和隔膜, 細胞核呈亮色螢光, 和其它部位有明顯之對比。DAPI 染色後細胞核及隔膜呈具螢光之亮藍色, 細胞質呈不具螢光之藍色 (圖一 C & D), DAPI 在 pH 4 和 pH 7 效果相似, 但在 pH 10 則較差, 對細胞核的染色效果常出現不穩定現象。Acridine orange 染色後細胞核呈亮黃色, 細胞質呈橘黃色 (圖一 G & H), Acridine orange 在 pH 4 的染色效果最差, 只隱約可辨出隔膜和細胞核, 在 pH 7 時染色效果提高不少, 但對隔膜的染色仍不佳,



圖一、絲核菌之細胞核和隔膜之螢光染色。

**Fig. 1.** Nuclei and septa of *Rhizoctonia* spp. stained with: A. pH 7 Hoechst dye, WAG-O (NP-18)  $\times$  500; B. pH 7 Hoechst dye, AG-F (TKS)  $\times$  650; C. pH 7 DAPI, WAG-O (NP-18)  $\times$  500; D. pH 7 DAPI, AG-F (TKS)  $\times$  1,000; E. pH 7 DAPI and M2R, AG-F (TKS)  $\times$  1,000; F. pH 7 DAPI AND M2R, WAG-O (NP-18)  $\times$  800; G. pH 10 Acridine orange, WAG-O (NP-18)  $\times$  650; H. pH 10 Acridine orange, AG-F (TKS)  $\times$  500; I. pH 4 Ethidium bromide, WAG-O (NP-18)  $\times$  650; J. pH 4 Ethidium bromide, AG-F (TKS)  $\times$  800.  
N = Nuclei, S = Septa.

由此可見 pH 值對 Acridine orange 的染色效果影響最大。Hoechst 在 pH 7 染色效果不穩定，對多核隔膜染色不佳 (圖一 A)，而對雙核染色效果尚可 (圖一 B)。Ethidium bromide 在 pH 4 和 pH 7 對雙核絲核菌染色效果較佳，細胞核和隔膜呈螢光紅色，細胞質呈暗

紅色 (圖一 I)，對多核絲核菌染色效果較差，隔膜不清楚，但經 UV-1A 濾光器濾光下觀察，仍可明顯看見細胞核。而 Quinacrine-2HCl 及 Chromomycin A 不論其 pH 值多少對細胞核染色效果最差，幾乎染不到細胞核，但在 pH 7 和 pH 10 時對隔膜染色效果良好。

利用螢光增輝劑 (M2R) 複染可以增加細胞壁及隔膜之染色效果，但只適用在 DAPI 染色後之複染，複染後整個菌絲輪廓更清楚 (圖一 E & F)，其它染劑則不能再 M2R 複染。

兩種效果最佳之染色 DAPI 在 pH 7 和 Acridine orange 在 pH 10，進一步測試其它供試一百多菌株發現，這兩種染劑皆可成功地染出所有供試菌株之細胞核和隔膜。

## 討 論

往昔應用在 *Rhizoctonia* spp. 細胞核染色之螢光染劑有 DAPI, Acridine orange 和 Hoechst 等，其中 DAPI 和 Acridine orange 之核染最適酸鹼值並無人從事深入的探討，因此本研究以三種酸鹼值 pH 4, pH 7 和 pH 10 進行核染，發現 DAPI 在 pH 7 時，Acridine orange 在 pH 10 時，染色效果最佳，且同時可染出細胞核與隔膜。而 Hoechst 染劑雖已知在 pH 7.8 可染出細胞核，在 pH 10.5 可染出隔膜 (10)，然對於 *Rhizoctonia oryzae* 和 *R. zae*，則染色效果比 DAPI 和 Acridine orange 差，因此適用範圍便相對減小。Ethidium bromide 對多核 *Rhizoctonia* 之染色效果很差，但對雙核之染色效果則很佳。

在進行核染的過程中，若用相同酸鹼值之緩衝溶液洗去多餘染液，更可增加觀察效果。假若染色後細胞隔膜不很明顯則可用 1 ppm 之 fluorescent brightener 28, chromomycin A 或 50 ppm 之 Quinacrine-HCl 複染，增加隔膜之染色效果。過去之研究在進行菌絲培養時，將菌絲接種在塗有 PDA 之載玻片上，固然可得新生菌絲進行染色，但培養基易吸附染劑，緩衝液不易將其洗去，故染色背景易影響觀察。本研究改用將含菌絲之 PDA 圓盤，直接貼於載玻片上，經 36-48 hr 之培養，讓其菌絲利用 PDA 圓盤之營養，在玻片表面生長，亦可得新生菌絲，容易染色觀察，同時又有利於緩衝液將多餘染劑洗去。

## 謝 辭

本研究承臺灣省政府農林廳水土保持局資助經費。臺灣省農業試驗所與北海道大學生越明 (Akira Ogoshi) 博士贈送已鑑定立枯絲核菌菌絲融合群。

## 引用文獻

1. 王子政、謝式埤鈺. 1993. 臺灣立枯絲核菌引起之草皮病害及其菌絲融合群. 植病會刊 2:(已投稿)。
2. Bandoni, R. J. 1979. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* 71:873-874.
3. Burpee, L. L., and Martin, B. 1992. Biology of *Rhizoctonia* species associated with turfgrasses. *Plant Dis.* 76:112-117.
4. Burpee, L. L., Sanders, P. L., and Cole, H. 1978. A staining technique for nuclei of *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia* 70:1281-1283.
5. Herr, L. J. 1979. Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia* like fungi. *Phytopathology* 69:958-961.
6. Hua'an, Y., Sivasithamparam, K., and Brien, P. A. 1991. An improved technique for fluorescence of fungal nuclei and septa. *Aust. Plant Pathol.* 20:119-121.
7. Kronland, W. C., and Stanghellini, M. E. 1988. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 78:820-822.
8. Martin, S. B. 1987. Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. *Plant Dis.* 71:47-49.
9. Saksena, H. K. 1961. Nuclear phenomena in the basidium of *Ceratobasidium praticolum* (Kotila) Olive. *Can. J. Bot.* 39:717-725.
10. Tu, C. C., and Kimbrough, J. W. 1973. A rapid staining technique for *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia* 65:941-944.
11. Yamamoto, D. T., and Uchida, J. Y. 1982. Rapid nuclear staining of *Rhizoctonia solani* and related fungi with acridine orange and with safranin. *Mycologia* 74:145-149.

## ABSTRACT

Wang, T. C., and Hsieh, S. P. Y. 1993. Nuclear Staining of *Rhizoctonia* spp. with Fluorescence dyes. *Plant Pathol. Bull.* 2:98-102. (Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

Young hyphae of *Rhizoctonia* spp. grown from potato dextrose agar plug on glass slides were used to stain with fluorescent dyes for nuclei and septa. Nuclei and septa were stained very

clearly and easily observable with 4',6'-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) in pH 7 buffer and Acridine orange in pH 10 buffer. When stained with DAPI, Fluorescent brightener 28 could be used for double staining, which increased the efficiency of cell wall and septa staining. This technique was very simple, and could finish staining within a short period of time.

Key words: *Rhizoctonia* spp., Nuclear fluorescent staining.