

研究报告

大头网柄菌的个体发育

张金阳 邹月 刘朴 李玉*

(吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心 吉林 长春 130118)

摘要:【背景】网柄细胞状黏菌是生物学、细胞学及发生生物学研究中一类重要的模式生物,至今已报道了百余种,但每个种的个体发育过程不是很明晰。【目的】了解网柄细胞状黏菌的个体发育。【方法】对采自云南苍山的土壤样品进行网柄菌的分离、培养和鉴定,并详细记录其个体发育全阶段特征。在传统形态学方法基础上,对样品进行基因组 18S 测序,并将获得序列在 GenBank 注册。通过双凹载玻片及水琼脂培养基添加大肠杆菌的培养方法,显微观察样品的发育过程,包括孢子、黏变形体、集群、假原质团、拔顶、孢堆果的发育特征。【结果】分离得到大头网柄菌 *Dictyostelium macrocephalum*; 该种温度适应范围较广,是亚热带和热带的广布种;其完成一个生活循环历时 3 d,接种 20 h 后孢子开始萌发释放黏变形体,第 50 h 形成集群,第 56 h 假原质团形成,第 58 h 孢堆原形成,第 71 h 孢堆果完全成熟。【结论】研究分离的大头网柄菌为云南省新记录种,增加了其在我国亚热带的新分布区;明确了该种的个体发育过程。

关键词: 网柄细胞状黏菌, 孢子, 集群, 孢堆果

Ontogeny of Dictyostelium macrocephalum

ZHANG Jin-Yang ZOU Yue LIU Pu LI Yu*

(Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: [Background] Dictyostelids cellular slime molds are model organisms for biology, cytology and developmental biology. Although more than one hundred species of dictyostelids have been reported up to now, the developmental process of each species is still unclear. [Objective] To understand the ontogenetic characteristics of this group. [Methods] Dictyostelids were isolated and identified from soil samples collected from Cang Mountain in Yunnan Province. The ontogeny of isolated dictyostelid species were investigated. The 18S sequences of this species were sequenced. The morphological features and 18S sequence were used to identify the taxonomic status. Furthermore, the development from spore to spore including characteristics of spore, myxamoeba,

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31300016, 31093440, 31493010, 31493011); Science and Technology Development Program of Jilin Province (20180101273JC); The Program of Creation and Utilization of Germplasm of Mushroom Crop of the “111” Project (D17014)

*Corresponding author: E-mail: yuli966@126.com

Received: June 23, 2017; **Accepted:** January 24, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 19, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31300016, 31093440, 31493010, 31493011); 吉林省科技发展计划(20180101273JC); 菌类作物优质高产抗病种质资源的挖掘创制及应用学科创新引智基地(D17014)

*通信作者: E-mail: yuli966@126.com

收稿日期: 2017-06-23; **接受日期:** 2018-01-24; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-19

aggregation, pseudoplasmodia, ascent, and sorocarp were microbiologically observed on bi-concavity slide and water agar in this paper. **[Results]** *Dictyostelium macrocephalum* was obtained and identified. It adapt a wide range of temperatures, which suggested that this dictyostelid species is common species distributing in subtropical and tropical area. The whole life cycle of *D. macrocephalum* extends of a period of less than 3 d (71 h). The spores germinated and released myxomoebae 20 h after inoculation. The aggregations formed 50 h after the inoculation, whereas the pseudoplasmodia formation needed 56 h. After that, the sorogen formed needed 56 h, and finally form fruiting sorocarps after 71 h. **[Conclusion]** This new record of Yunnan Province, *D. macrocephalum*, extended our understanding on the distribution of this species in subtropical areas of China. The developmental process of *D. macrocephalum* was clarified.

Keywords: Dictyostelid cellular slime molds, Spore, Aggregation, Sorocarp

网柄细胞状黏菌(Dictyostelid cellular slime molds, 即网柄菌)是归属于原生动物界(protozoa kingdom)下的一类特殊生物^[1]。多生长在土壤表层、动物粪便及枯枝落叶层上, 主要以细菌为食^[2]。由于其可移动并摄食细菌, 因此网柄菌对森林生态系统中土壤微生物群落平衡的维持扮演着重要角色。

在我国, 白容霖 1981 年首次报道和描述了 2 属 5 种网柄菌^[3-4]的形态特征。随后, 崔俊涛^[5]、何晓兰等^[6-9]、刘朴等^[10-17]、孙金月等^[18-19]、袁海燕等^[20-21]、任玉卓等^[22-23]、赵明君等^[24-25]先后进行了相关的研究工作。这些研究多集中于形态分类学方面, 而我国关于网柄菌个体发育的研究也是仅对大网柄菌 *Dictyostelium magnum*^[19]有过生活史全阶段特征的描述。目前, 中国云南地区已知网柄菌为 2 属 12 种^[20-21]。

大头网柄菌 *D. macrocephalum* 最早在我国台湾被发现^[26], 后来在贵州也有报道^[21]。本研究从采自云南苍山的土壤样品中分离得到大头网柄菌 *D. macrocephalum*, 为云南省新记录种, 利用双凹载玻片以及水琼脂培养基添加大肠杆菌的培养方法, 观察该菌的生活循环全阶段特征, 并对其生长条件的特征进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品(S5220)

由刘朴于 2016 年 10 月采自云南省苍山清碧溪阔叶林。

1.1.2 培养基

干草琼脂培养基: 称取 50 g 干草, 加入 1 000 mL 蒸馏水中, 煮沸 40–60 min, 过滤, 向滤液中加入 15–20 g 琼脂粉, 定容至 1 000 mL, 0.1 MPa 高压灭菌 30 min。在超净工作台中倒平板备用。

水琼脂培养基: 称量 15–20 g 琼脂粉, 加入到蒸馏水中, 充分溶解后定容至 1 000 mL, 0.1 MPa 高压灭菌 30 min。在超净工作台中倒平板备用。

LB 液体(固体)培养基: 称取 LB 粉末 20 g, 加入蒸馏水中, 加热煮沸使之充分溶解, 定容至 1 000 mL, 0.1 MPa 高压灭菌 15 min。在超净工作台中倒平板备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

NuClean Plant Genomic DNA Kit 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒, 康维世纪生物科技有限公司。

电子分析天平, 诸暨市超泽衡器设备有限公司; 高压灭菌锅, 微(厦门)仪器有限公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 摇床, 江苏省金坛市医疗仪器厂; 实验室纯水系统, 上海和泰仪器有限公司; 光照培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; 恒温振荡培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; 实体解剖镜, 蔡司公司; 光学显微镜, Leica 公司; PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 制备大肠杆菌 *Escherichia coli* 悬液

挑取大肠杆菌单菌落接至 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养约 24 h。

1.2.2 制备土壤悬液

将土壤样品和蒸馏水以 1:10 的比例混合, 25 °C、180–200 r/min 振荡培养 1 h 后再静置 1 h。

1.2.3 分离

无菌条件下在干草琼脂培养基平板上加入 0.5 mL 大肠杆菌悬液, 再加入 0.5 mL 土壤基物悬液。每个样本重复 5 次。17 °C 恒温培养, 每天观察培养皿中是否有网柄菌长出、发育情况, 以及是否有杂菌菌落生成。

1.2.4 纯化

无菌条件下在水琼脂培养基平板上加入 0.5 mL 大肠杆菌悬液, 再将分离得到的网柄菌孢子转接至水琼脂培养基上, 于 17 °C 恒温培养箱中培养。

1.2.5 鉴定

将纯化的菌株在实体解剖镜和光学显微镜下观察并记录孢子、黏变形体、集群、孢堆果柄、孢子团的特征, 以及有无大孢囊和小孢囊。

1.2.6 生活史观察

(1) 孢子萌发及黏变形体的观察: 先向双凹载玻片中加入适量无菌水, 然后挑取纯化的大头网柄菌 *D. macrocephalum* 孢子团加入无菌水中, 盖上盖玻片, 用凡士林封口, 将双凹载玻片放入 17 °C 恒温培养箱中培养。培养 8 h 后于光学显微镜下观察孢子的萌发情况, 并及时做好拍摄记录工作。

(2) 宏观形态发育的观察: 观察到孢子萌发并释放黏变形体的过程后, 向水琼脂培养基平板上添加 0.5 mL 大肠杆菌, 接入大头网柄菌 *D. macrocephalum* 孢子悬液, 于 17 °C 恒温培养。10 h 后开始观察集群、假原质团、假原质团迁移、拔顶、孢堆原最终形成孢堆果等发育过程并记录。

1.2.7 DNA 提取

用无菌针挑取一定量的大头网柄菌 *D. macrocephalum* 孢堆果, 采用 NuClean Plant Genomic DNA Kit 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 的提取。

1.2.8 PCR 扩增及序列分析

所用 PCR 扩增引物为 18S-FA (5'-AACCTGG TTGATCCTGCCAG-3') 和 18S-RB (5'-TGATCCTTC

TGCAGGTTTCAC-3')^[27], 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系: *Taq* (TaKaRa *Taq*TM Version 2.0 plus dye) 10 μL, 引物(10 μmol/L) 各 0.5 μL (表 1), DNA 模板(30 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 补足至总体积 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 25 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 冷却。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。使用 BLAST 程序对 PCR 扩增得到序列进行同源性搜索及相似度比对。

2 结果与分析

2.1 大头网柄菌 *Dictyostelium macrocephalum* 的形态特征

研究标本: HMJAU MR 214, 由云南省苍山清碧溪阔叶林下土分离得到, 海拔 2 370 m (标本保存于吉林农业大学菌物标本馆)。

孢堆果(图 1L)单生或聚生, 有时簇生, 不分枝或有时不规则分枝, 有缠绕现象, 具有向光性。孢堆果柄纤细, 基部棒状膨大, 宽 19.3 μm–21.1 μm, 顶部略宽, 宽 3.9 μm–6.1 μm。孢子团白色, 球圆形, 少数柠檬形, 直径 34 μm–55 μm。孢子(图 1A)透明、椭圆形, 无极粒, (2.3–4.2) μm×(4.3–8.0) μm。细胞集群(图 1E)辐射状, 假原质团(图 1H)带柄迁移。未见大孢囊和小孢囊。

将标本 HMJAU MR 214 测序得到的 18S 序列在 GenBank 上注册, 序列号为 MH160450, BLAST 比对发现该序列与 NCBI 上的大头网柄菌 *D. macrocephalum* 序列(GenBank 登录号 AM168049)的相似性为 98%, 进一步证明标本 HMJAU MR 214 为大头网柄菌。

本研究通过改变培养温度(网柄菌的常规培养温度为 20–23 °C), 在低温 17 °C 的条件下, 从采自云南苍山的阔叶林(海拔 2 370 m)的土壤样品中分离得到大头网柄菌 *D. macrocephalum*, 拓宽了适宜该菌生长的温度范围, 即 17–23 °C。此前, 该菌仅在我国台湾和贵州有分布记录, 本文的记录拓宽了该菌在我国分布区。该种在日本、泰国、尼泊尔

尔和新几内亚岛也有分布^[21,26]。

2.2 大头网柄菌 *Dictyostelium macrocephalum* 的生活循环特征

大头网柄菌 *Dictyostelium macrocephalum* 孢子(图 1A)于接种后 20 h 开始萌发,孢子壁开裂释放出透明、形状不规则的黏变形体(图 1B)。接种 50 h 后,在水琼脂培养基上出现肉眼可见的黏变形体集群,初期较小,之后群流逐渐增多,形成集群中心,群流呈辐射状(图 1E)。接种 52 h 后,细胞流数量逐渐减少,黏变形体群流向上聚集形成突起(图 1F)进入拔顶期。接种 53 h 后,突起逐渐向上拔起,顶部较尖,细胞流数量继续减少,开始形成蛞蝓体的前

孢子细胞,初期基部圆润,顶部尖锐(图 1G)。接种 56 h 后假原质团形成(图 1H),分为两个部分,即前孢子细胞(蛞蝓体)和前柄细胞。假原质团开始带柄迁移。

假原质团迁移 2 h 后,即接种 58 h 后,孢堆原形成,并渐渐向上拔顶,为形成孢堆果做准备(图 1I)。接种 62 h,已经形成孢子团和孢堆果柄结构,但孢堆果未完全成熟,孢子团球圆形,顶部有乳头状突起,孢堆果柄逐渐变长变细(图 1J)。在孢堆果柄发育的过程中,部分孢堆果有少量黏变形体聚集在孢堆果柄上,呈圆形,从孢堆果柄近基部迁移至 1/2 处。接种 65 h,孢堆果逐渐成熟,但尚未发育

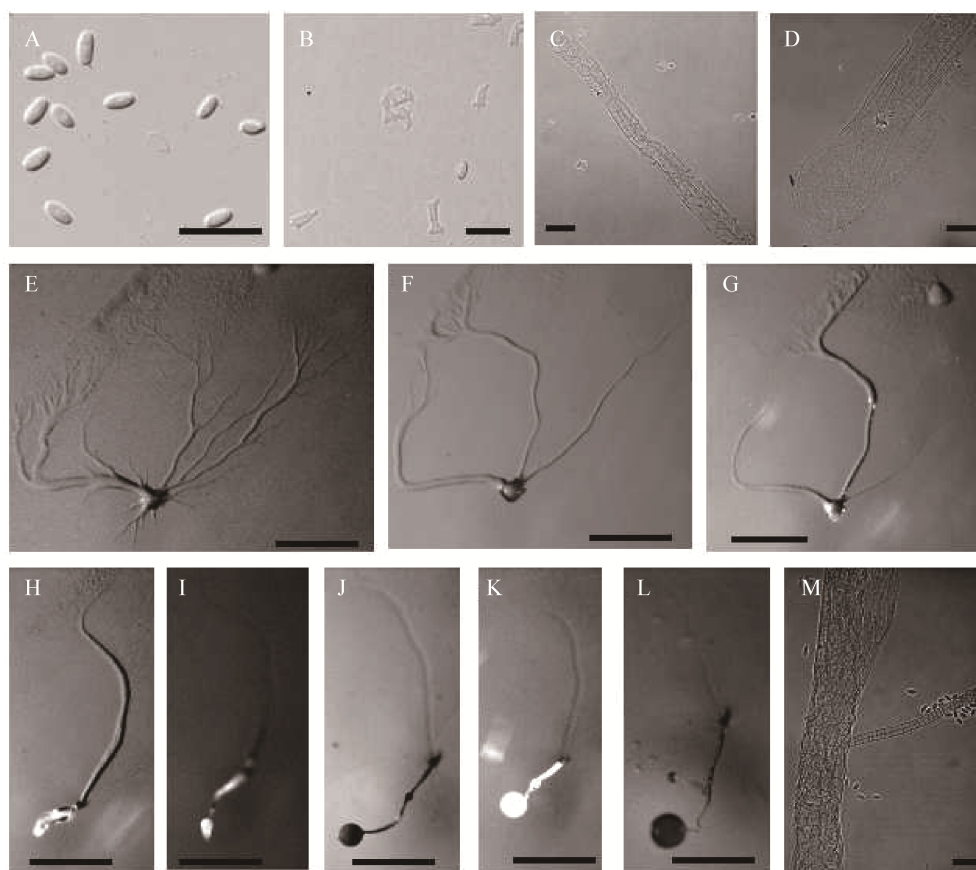


图 1 大头网柄菌 *Dictyostelium macrocephalum* 生活循环图

Figure 1 The life cycle of *Dictyostelium macrocephalum*

注: A: 孢子; B: 黏变形体; C: 孢堆果柄顶部; D: 孢堆果柄基部; E-G: 集群; H: 假原质团; I: 孢堆原; J-K: 幼孢堆果; L: 成熟的孢堆果; M: 孢堆果柄及分枝。标尺: A-D, M=20 μ m; E-L=1.5 mm.

Note: A: Spores; B: Myxamoebae; C: Tip of sorophore; D: Base of sorophore; E-G: Aggregation; H: Pseudoplasmodium; I: Sorogen; J-K: Immature sorocarps; L: Fruit sorocarps; M: Sorophore and its branch. Bars: A-D, M=20 μ m; E-L=1.5 mm.

完全, 此时孢子团成熟, 为球圆形, 孢堆果柄 1/2 处的圆形结构逐渐变大(图 1K)。接种 71 h, 孢堆果完全成熟, 大多数单生, 部分有缠绕现象发生, 具有向光性, 孢子团白色, 球圆形, 少数柠檬形, 孢堆果柄无分枝, 或部分孢堆果柄 1/2 处的圆形结构形成一个具有孢子团的分枝(图 1L, M)。

因此, 大头网柄菌 *Dictyostelium macrocephalum* 完成一个完整生活循环所需时间大约为 3 d, 接种 20 h 后孢子开始萌发释放黏变形体, 第 50 h 形成集群, 第 56 h 假原质团形成, 第 58 h 孢堆原形成, 第 71 h 孢堆果完全成熟。

3 讨论与结论

大头网柄菌 *Dictyostelium macrocephalum* 首次发现时的培养温度为 20 °C, 生境为我国台湾的常绿阔叶林和竹林下土壤^[26]; 后来在 23 °C 的条件下, 从采自贵州的阔叶林下表土层的土壤样品中被再次分离得到^[21]。本研究是从云南苍山的阔叶林下土, 17 °C 的培养温度条件下获得该菌, 拓宽了该菌的低温分布范围, 说明该菌对温度适应范围较广, 喜阔叶林下土。Hagiwara 等^[26]曾推测大头网柄菌 *D. macrocephalum* 可能为东南亚亚热带和热带地区的常见种, 本研究从云南苍山再次分离得到大头网柄菌 *D. macrocephalum*, 进一步说明该菌可能是亚热带地区的常见种。

从贵州分离得到的大头网柄菌 *Dictyostelium macrocephalum* 的孢堆果柄无分枝, 集群呈土堆状^[21]。而本研究在形态学研究的基础上, 完善了大头网柄菌 *D. macrocephalum* 全部生活史阶段的发育特征, 其中集群具有辐射状群流, 与 Hagiwara 等^[26]报道一致。本研究还观察到了少数孢堆果具有分枝及分枝的发育过程, 为少量黏变形体先聚集在孢堆果柄基部, 呈圆形, 之后迁移至孢堆果柄的 1/2 处, 先形成分枝再发育出分枝孢子团, 这一过程需要历时 9 h, 这一特征此前未见报道。

大头网柄菌 *D. macrocephalum* 的孢子团较大, 与孢堆果柄长度不成比例, 因此极易倒伏在培养基

上。孢子大小不均匀, 柄细长, 集群初期突起明显, 细胞群流呈辐射状且宽厚, 从集群到形成假原质团的过程较慢, 但之后阶段较迅速。大头网柄菌 *D. macrocephalum* 对光照的敏感性比较明显, 导致孢堆原向孢堆果发育过程较长, 一些假原质团在拔顶的过程中发育缓慢, 其中有些发育畸形甚至停止发育, 但去除光照的因素仍能继续完成其完整的生活史。

REFERENCES

- [1] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, et al. Dictionary of the Fungi[M]. 10th ed. Wallingford, UK: CAB International, 2008
- [2] Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Introductory Mycology[M]. Yao YJ, Li Y, Trans. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 759-769 (in Chinese)
Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 菌物学概论[M]. 姚一建, 李玉, 译. 北京: 中国农业出版社, 1996: 759-769
- [3] Bai RL. A study on some species of acrasiomycetes[J]. Acta Mycologica Sinica, 1983, 2(3): 173-178 (in Chinese)
白容霖. 集胞菌的初步研究[J]. 真菌学报, 1983, 2(3): 173-178
- [4] Bai RL. A study on some species of acrasiomycetes[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 1983: 1-41 (in Chinese)
白容霖. 集胞菌的初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 1983: 1-41
- [5] Cui JT. Taxonomy of D in northeast China[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 1994: 1-35 (in Chinese)
崔俊涛. 中国东北林区网柄菌属分类研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 1994: 1-35
- [6] He XL. Preliminary taxonomic studies on Dictyosteliaceae in China[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2008: 1-44 (in Chinese)
何晓兰. 中国网柄菌科分类学初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2008: 1-44
- [7] He XL, Li Y. Three new records of dictyostelids in China[J]. Mycosystema, 2008, 27(4): 532-537
- [8] He XL, Li Y. A new species of *Dictyostelium*[J]. Mycotaxon, 2008, 106: 379-383
- [9] He XL, Li Y. A new species of *Dictyostelium* from Tibet, China[J]. Mycotaxon, 2010, 111: 287-290
- [10] Liu P. Studies on taxonomy and molecular phylogeny of dictyostelid cellular slime molds[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin Agricultural University, 2010: 1-59 (in Chinese)
刘朴. 网柄细胞状黏菌的分类学与分子系统学研究[D]. 长春: 吉林农业大学博士学位论文, 2010: 1-59
- [11] Liu P, Li Y. Dictyostelids from Ukraine 1: two new records of

- Dictyostelium*[J]. Mycotaxon, 2010, 111: 275-278
- [12] Liu P, Li Y. Dictyostelids from Ukraine 2: two new records of *Dictyostelium*[J]. Mycotaxon, 2010, 112: 367-370
- [13] Liu P, Wang Q, Li Y. Spore-to-spore agar culture of the myxomycete *Physarum globuliferum*[J]. Archives Microbiology, 2010, 192(2): 97-101
- [14] Liu P, Li Y. New species and new records of dictyostelids from Ukraine[J]. Mycologia, 2011, 103(3): 641-645
- [15] Liu P, Li Y. Dictyostelids from Heilongjiang Province, China[J]. Nova Hedwigia, 2012, 94(1/2): 265-270
- [16] Liu P, Li Y. New records of dictyostelids from China[J]. Nova Hedwigia, 2012, 94(3/4): 429-436
- [17] Liu P, Li Y. Dictyostelids from Jilin Province, China I[J]. Phytotaxa, 2014, 183(4): 279-283
- [18] Sun JY. Study on the life cycle of important taxa in Dictyosteliaceae[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2011: 1-40 (in Chinese)
孙金月. 网柄菌科重要分类单元生活循环的研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2011: 1-40
- [19] Sun JY, Liu P, Li Y. The life cycle of *Dictyostelium magnum*[J]. Mycosystema, 2011, 30(3): 497-500 (in Chinese)
孙金月, 刘朴, 李玉. 大网柄菌 *Dictyostelium magnum* 生活史的研究[J]. 菌物学报, 2011, 30(3): 497-500
- [20] Yuan HY. Studies on taxonomy of dictyostelid cellular slime molds in the southwest of China[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2012: 1-55 (in Chinese)
袁海燕. 中国西南部分地区网柄菌的分类学研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2012: 1-55
- [21] Yuan HY, Liu P, Li Y. Two new records of *Dictyostelium* for china and two new records of *Dictyostelium* for Mainland China[J]. Journal of Fungal Research, 2012, 10(2): 66-71 (in Chinese)
袁海燕, 刘朴, 李玉. 网柄菌属的2个中国新记录种和2个中国大陆新记录种[J]. 菌物研究, 2012, 10(2): 66-71
- [22] Ren YZ. Studies on distribution of dictyostelid cellular slime molds in the tropic and frigid zone of China[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2013: 1-33 (in Chinese)
任玉卓. 中国热带与寒温带部分地区网柄菌的分布研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2013: 1-33
- [23] Ren YZ, Liu P, Li Y. New records of dictyostelids from China[J]. Nova Hedwigia, 2014, 99(1/2): 233-237
- [24] Zhao MJ. Studies on taxonomy of dictyostelid cellular slime molds of eastern China[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2014 (in Chinese)
赵明君. 中国华东部分地区网柄菌的分类学研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2014
- [25] Zhao MJ, Liu P, An Y, et al. *Dictyostelium annularibasimum* (Dictyosteliaceae, Dictyostelida), a new purple species from China[J]. Nova Hedwigia, 2017, 104(1/3): 351-358
- [26] Hagiwara H, Yeh ZY, Chien CY. *Dictyostelium macrocephalum*, a new dictyostelid cellular slime mold from Taiwan[J]. Bulletin of the National Science Museum Tokyo, 1985, 11(3): 103-108
- [27] Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, et al. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions[J]. Gene, 1988, 71(2): 491-499