

参赛队员姓名： 孟祥非

中学： 东北师范大学附属中学

省份： 吉林省

国家/地区： 中国

指导教师姓名： 李玉

论文题目： 一种新模式生物的生物学研究
——迷你网柄菌的分类、个体发育及分子系
统学的研究

一种新模式生物的生物学研究

——迷你网柄菌的分类、个体发育及分子系统学的研究

孟祥非

摘要: 网柄细胞状黏菌 (dictyostelid cellular slime molds) 生长于土壤、枯枝落叶层及动物粪便上, 主要以细菌为食的一类特殊生物。这类肉眼难以观察到的生物, 野外很难被采集到, 据我个人所知, 大部分都是在实验室培养获得, 因其独特的外观特征和简单的生活循环过程, 是遗传学、细胞学及发生生物学研究中较为理想的实验材料之一。另外, 我查阅资料发现网柄细胞状黏菌是研究吞噬作用、反吞噬 (细菌毒素) 作用、人类疾病的致病机理及治疗和细胞凋亡的重要模型生物。网柄细胞状黏菌还可以作为田地土壤环境变化的“指示剂”, 通过网柄菌种群及数量的改变, 得知土壤理化性质的变化, 以便监督土地的质量及健康状况, 进而促进农作物产业健康发展。因此, 对网柄细胞状黏菌物种的深入认识, 明晰其生活史特征及分子系统学关系, 无论对其进行科学研究还是实际应用都具有重大意义。

自 1869 年德国真菌学家 Oskar Brefeld 发现第一种网柄菌毛霉状网柄菌 *Dictyostelium mucoroides* 以来, 现在已报道百余种网柄菌, 而我国网柄菌的研究尚属起步阶段。目前, 我国共报道网柄菌 57 种, 其中网柄菌属 *Dictyostelium* 46 种, 轮柄菌属 *Polysphondylium* 10 种, 管柄菌属 *Acytostelium* 1 种 (仅台湾有报道)。

本研究培养得到一种个体较小、孢子球圆形且无极粒的网柄细胞状黏菌新种迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum*, 对其进行详细的形态特征描述和讨论; 同时对它进行个体发育研究, 通过悬滴培养法和水琼脂培养基-大肠杆菌培养法, 获得了从孢子到孢子的生活史全阶段特征; 为了更好地确认其分类地位及其在网柄菌中所处的系统位置, 对其进行基于 ITS 和 SSU 的分子系统学研究, 并与网柄菌其他种的序列一起构建系统发育树, 综合分析两个系统发育树, 结果表明迷你网柄菌 *D. minimum* 在 Group4 中, 与大量传统意义上网柄菌属 *Dictyostelium* 的种聚类在同一个组中。

关键词: 网柄菌属, 分类, 生活史, 系统发育

目 录

摘要	2
第一章 前言	4
1.1 网柄细胞状黏菌的分类学及个体发育研究	4
1.2 网柄细胞状黏菌的分子系统学研究	5
1.3 网柄细胞状黏菌的应用	5
1.4 本研究目的及意义	6
第二章 形态分类学研究	6
2.1 材料与方法	6
2.1.1 主要器材	6
2.1.2 培养基	7
2.1.3 网柄菌分离	7
2.2 迷你网柄菌 <i>Dictyostelium minimum</i> 的形态学特征	8
2.3 讨论	8
第三章 个体发育研究	10
3.1 材料与方法	10
3.2 迷你网柄菌的生活史特征	10
3.3 讨论	11
第四章 分子系统学研究	12
4.1 材料	12
4.1.1 主要仪器及设备	12
4.1.2 所需试剂	12
4.2 方法	12
4.2.1 实验所用试剂配制	12
4.2.2 DNA 的提取	12
4.2.3 基因组 DNA 的检测	13
4.2.4 PCR 扩增	13
4.2.5 序列测定	14
4.2.6 DNA 序列分析	14
4.3 结果与讨论	14
4.3.1 DNA 的提取	14
4.3.2 PCR 扩增结果	14
4.3.3 DNA 序列分析	15
第五章 结论	15
参考文献	18
致谢	21
论文指导老师简历	21
学术诚信声明	24

第一章 前言

网柄细胞状黏菌 (dictyostelid cellular slime molds), 隶属于原生生物界 (Kingdom Protista), 多生长在森林土壤及腐叶、粪便、农田土、草原、沙漠、洞穴、高山、极地、苔原上, 也可生长于树冠层生长的附生植物的腐殖质中。它既不是动物, 也不是植物, 更不是真菌, 是真核生物的一个独立分支。除了具有伸缩泡 (contractile vacuole) 外, 它的细胞与动物细胞类似, 也无细胞壁。网柄细胞状黏菌名称的由来则和它的营养体及子实体的形态特征有关, 在它的营养体时期, 因其能够形成与真黏菌的原生质团相似的假原生质团 (pseudoplasmodium), 被归类在黏菌门 (Myxomycota) 下, 共同被称为黏菌; 又因其子实体柄特有的细胞状结构, 被称为网柄细胞状黏菌 (简称网柄菌 dictyostelids)。网柄菌的子实体和营养体都十分微小, 肉眼很难直接观察到, 主要以细菌为食, 由于这种取食方式, 它能够使土壤中的细菌群落发生变化, 因此是森林生态系统中的重要成员之一。也因其具有特殊的生活史循环, 它还是遗传学、细胞学及发生生物学研究中较为理想的实验材料。但是, 我通过实验发现网柄菌生存时间短暂, 它的子实体和营养体都十分微小, 肉眼很难直接观察到, 这给网柄菌生活史特征的观察带来诸多困难 (也是目前遇到的主要困难)。

1.1 网柄细胞状黏菌的分类学及个体发育研究

我查阅资料发现对网柄菌研究的记载最早始于 1869 年德国真菌学家 Oskar Brefeld 对毛霉状网柄菌 *Dictyostelium mucoroides* 的描述, 从那时算起到现在还不到 150 年的历史, 其实早在 1863 年, Coemans 就已经发现毛霉状网柄菌 *D. mucoroides*, 但当时由于知识体系构建不全误将其鉴定为黑色根霉菌 *Rhizopus nigricans* 的无分生孢子器阶段。1884 年 van Tieghem 第一个清楚的认识黏变形体集合之后个体间并不融合的特性。1880 年, 他还首次描述了红网柄菌 *D. roseum* van Tieghem 和乳白网柄菌 *D. lacteum*, 并详细描述了毛霉状网柄菌 *D. mucoroides* 的生活史。

E. W. Olive (1902) 出版了第一本专著“Monograph of the Acrasidae”。Potts (1902) 在玉米琼脂培养基与合成培养基上研究了细菌与网柄菌的关系, 得出网柄菌是以细菌为食物, 而且培养基的改变对网柄菌的生长具有影响。1903 年, Vuillemin 再次证明网柄菌只有在细菌存在的时候才会生长发育。

随着网柄菌相关专著的出版, 生物学家们的认识才有所改变, 网柄菌的研究也得到了巨大的促进和推动。日本学者 Hagiwara 从上个世纪 70 年代至今发现并报道了大量新种, 同时, James C Cavender, Steven L. Stephenson, John C. Landolt,

Eduardo M. Vadell 等学者也一直活跃在网柄菌研究领域并发表了大量的新种, 还对美国、新西兰、阿根廷、德国、泰国及危地马拉等国网柄菌的生态分布方面进行了大量的研究。

中国关于网柄细胞状黏菌的研究始于 20 世纪 80 年代初期, 最早由白容霖对我国部分地区的网柄菌进行初步研究, 报道了五个中国新记录种。崔俊涛在李玉和日本学者 Hagiwara 的指导下, 1991 年对我国东北三省林区网柄菌属细胞状黏菌进行了较为详细的研究, 共分离得到 10 种网柄菌。1999 年, 李惠中和李玉在沈韞芬主编的《原生动生物学》一书中撰写了细胞状黏菌的基本知识, 第一次详细地总结了细胞状黏菌的特征, 也是我国首次对细胞状黏菌描述的书籍。2005 年, 李玉与日本学者 Hagiwara 合作研究了来自中国、日本、韩国和巴基斯坦的紫网柄菌 *Dictyostelium purpureum* 共 19 个菌株的配型及大孢囊特征。近年来, 吉林农业大学李玉教授团队对国内外网柄菌进行系统研究, 在传统分类学研究的基础上开始分子系统学研究, 已经对我国部分省区进行网柄菌的资源调查, 目前共报道网柄菌属 *Dictyostelium* 46 种, 轮柄菌属 *Polysphondylium* 10 种。

1.2 网柄细胞状黏菌的分子系统学研究

随着生物学、细胞学、遗传学、生物化学, 尤其是分子生物学技术的发展, 关于网柄菌学的研究也随之进入分子时代。在传统分类学中网柄菌包括三个主要属, 即网柄菌属 *Dictyostelium*、轮柄菌属 *Polysphondylium* 和管柄菌属 *Acytostelium*, 根据分子系统学研究发现这三个属均不是单系群。在网柄菌第一个基于多基因片段的系统发育研究中, 传统的分类体系被打破, 网柄菌被重新分成了 4 个 Group。在进一步的研究中, 将原来的 4 个 Group 又划分成 8 个 Group, 原来的 Group2 分成了 Group2A 和 Group2B, 及 3 个复合群 (polycarpum-complex, polycephalum-complex 和 violaceum-complex)。

1.3 网柄细胞状黏菌的应用

认识到网柄细胞状黏菌的应用价值是我在实验研究之后, 进一步确定的事情之一。因为网柄细胞状黏菌本身也可看做是一种原始的巨噬细胞, 它与动物免疫系统的吞噬细胞极为相似: 两者都能够在基质上爬行, 且都能依靠吞噬作用来吞噬微生物, 因此可通过网柄菌对细菌的捕食作为模型来研究吞噬作用。同时, 因为假原生质团前柄细胞的一部分 (约 1%), 能够将所遇到的有毒物质吞噬到细胞内并以细胞鞘的形式排出体外, 这种简单的内在免疫细胞和高等动物的免疫细胞功能相似, 具有解毒和免疫活性, 可以作为研究免疫系统在生物体内的发展与发展的理论基础, 也能够进一步应用于细菌如何对吞噬细胞的反吞噬 (细菌毒素) 作用。

网柄菌也是一些人类疾病的机理及治疗研究的模型生物。盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 细胞与哺乳动物细胞在行为、结构和细胞内的信号通路有许多相同或相似的地方, 可用于研究人类致病机理、寻找新药方向, 如可用于引起儿童神经退化性疾病神经元蜡样脂褐质沉积症 (NCL) 的致病机理的认识; 从盘基网柄菌 *D. discoideum* 中分离出来具有抗癌活性的分化诱导因子 DIF-1、DIF-2 和 DIF-3, 而 DIF 衍生物 DIF-3 (+ 2) 和 Bu-DIF-3 具有显著抑制一种常见的转移性骨癌——骨肉瘤的细胞增殖、迁移和转移的作用。盘基网柄菌 *D. discoideum* 是研究发育、致病机理和细胞凋亡的重要模型。很多疾病的发生与细胞凋亡调控异常有关, 盘基网柄菌 *D. discoideum* 的多细胞发育阶段的柄细胞失去再度萌发的能力, 它的形成既是细胞分化过程又是细胞凋亡过程, 并且在已有对盘基网柄菌细胞凋亡的研究中发现其与高等生物的细胞凋亡存在着一些相似的地方, 却又有自己鲜明的特点。对盘基网柄菌细胞凋亡进行深入研究, 阐明其与高等动物细胞凋亡过程产生差异的原因, 对于研究生物进化具有重要意义。

而在农业方面, 网柄菌也同样发挥着作用。众所周知, 近些年环保是当今世界特别是我国一大重要问题, 而农业生产制造出来的废弃物则是环境污染的一个主要内容: 废弃物上产生的细菌及其代谢产物, 不仅污染环境, 更会造成病害; 而网柄菌可以有效清除废弃物中的细菌, 又能最大限度地保留其中营养成分。同样, 土壤对农作物的生长有重大影响, 因网柄菌能够“感知”外部环境中的细菌, 可以作为田地土壤环境变化的“指示剂”。通过网柄菌种群及数量的改变, 可以得知土壤理化性质的变化, 以便监督土地的质量及健康状况, 进而促进农作物产业健康发展。

1.4 本研究目的及意义

为了深入认识网柄细胞状黏菌, 寻找网柄细胞状黏菌新资源, 探讨其生活史特征及分子系统学关系, 无论对其进行科学研究还是实际应用都具有重大意义。

第二章 形态分类学研究

2.1 材料与方法

2.1.1 主要器材

接种针

90 mm 培养皿

一次性无菌注射器

超净工作台 (SANYO, MCV-131BNS(T))

医用蒸汽灭菌锅 (SELECTA 4001136, PRESOCLAVE 75L)

人工气候箱 (上海新苗医疗器械有限公司, SPX-250, BS- II 生化培养箱)

电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)

莱卡 M165C 实体解剖镜及 DFC450C 成像系统

莱卡 DM 2000 光学显微镜及 DFC450C 成像系统

日立电子扫描显微镜 SU8010

摇床 (江苏金坛医疗仪器厂)

2.1.2 培养基

(1) LB 液体培养基 (培养大肠杆菌)

NaCl 1g

蛋白胨 (Tryptone) 1g

酵母提取物 (Yeast extract) 0.5g

加水定容到 100mL。分装后高压灭菌 20 min。

(2) 干草汁琼脂培养基 (分离网柄菌)

先将干草洗净, 再向 1L 蒸馏水中加入 5%~10% 的干草, 煮沸 40 min~1 h 后, 过滤; 向滤液中加入 10~20 g 琼脂粉, 分装灭菌 20 min, 倒平板备用。

(3) 水琼脂培养基 (纯化, 观察网柄菌)

向 1L 蒸馏水中加入 15% 琼脂粉, 然后高压灭菌 20 min。

2.1.3 网柄菌分离

(1) 预先准备好分离用的干草汁琼脂培养基和纯化、观察用的水琼脂培养基。

(2) 制备大肠杆菌悬液

将大肠杆菌接种于 LB 液体培养基中, 在 37 °C, 200 rpm/min 的条件下, 摇床培养 24~36 h 后备用。

(3) 制备基物悬液

称取 5 g 基物置于 150 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 蒸馏水, 于 200 rpm/min, 25°C 的条件下震荡 1~2 h, 然后静止 1 h。

(4) 分离

在无菌条件下, 将每个干草汁琼脂平板加入 0.4 mL 大肠杆菌悬液, 使其充分布满整个平板上, 然后加入 0.5 mL 基物悬液, 并使其与大肠杆菌悬液充分混合。每个基物至少设五个重复。

随后, 将标记好的平板置于 17 °C 培养箱中于自然光照培养, 三天后开始观察网柄菌分离情况, 每天至少观察一次并记录, 观察一般持续到第十天。

(5) 纯化

将分离得到的无污染的菌株转移至水琼脂平板上, 置于培养箱中 17°C 培养, 24 h 后观察生长情况。

(6) 观察与鉴定

在实体解剖镜下观察孢堆果的外观形态, 如孢子团和柄的颜色, 孢堆果柄分支情况, 细胞集合的特征, 假原质团的特征, 孢堆原的特征等, 照相并记录。

在显微镜、电镜下测量孢堆果, 柄, 及孢子团的大小, 并记录; 将一个完整的孢堆果挑出, 置于显微镜下, 观察其柄, 孢子及粘变形体的显微形态, 并测量大小, 照相并记录。

最后, 将所记录的外观形态特征和显微形态特征与 INDEX FUNGORUM 中收录和引用的网柄菌进行比较, 进行准确的鉴定与分类。

2.2 迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 的形态学特征

孢堆果(图 1-1,2)白色, 直立, 略弯, 坚实, 长度 95-720 μm (平均 324.2 μm), 无向光性, 单生。孢堆果柄(图 1-3,4,5)结实, 顶部(图 1-3)单列细胞, 直径 5.079-6.743 μm (平均 5.837 μm); 基部(图 1-4)棒形或细尖型, 有附属结构, 双列或多列细胞, 直径 10.538-21.989 μm (平均 15.444 μm)。孢子团圆球形或柠檬形, 乳白色、白色或半透明, 直径 33-148 μm (平均 72 μm)。孢子团(1-6)圆形, 无极粒, 直径 3.7-5.4 μm 。集群(图 1-7)土堆状分布, 大小 39-73 x 29-57 μm (平均 52 x 42 μm)。假原质团带柄迁移, 透明。

区别于其它网柄菌的特征:

除了此种外, 网柄菌中孢子圆形的还有 5 种, 分别为 *D. rosarium*, *D. ibericum*, *D. globosporum*, *D. lacteum* var. *papilloideum* 和 *D. lacteum*。其中 *D. lacteum*, *D. ibericum* 和 *D. globosporum* 都有极粒; *D. rosarium* 极粒虽不明显, 但孢堆果簇生, 且集群辐射状。*D. lacteum* var. *papilloideum* 虽然无极粒, 但个体较大, 为 0.6-1.4 mm, 其柄也细(基部 7-10 μm , 向上渐细, 顶部 2.5-3 μm), 假原质团无柄。

2.3 讨论

经我观察研究, 得到如下结论: 迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 是与其它网柄细胞状黏菌形态特征都不同的新种, 由于网柄细胞状黏菌具有特殊的生物学属性, 在它的生活史中由类似于动物的可爬行的粘变形体、假原质团阶段发展到类似于真菌的子实体阶段, 而最终成熟, 仅依靠成熟孢堆果的形态特征对其进行分类并不充分。因此, 本项目还将对迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 进行个体发育研究, 以期明确其生活史各阶段的形态特征。

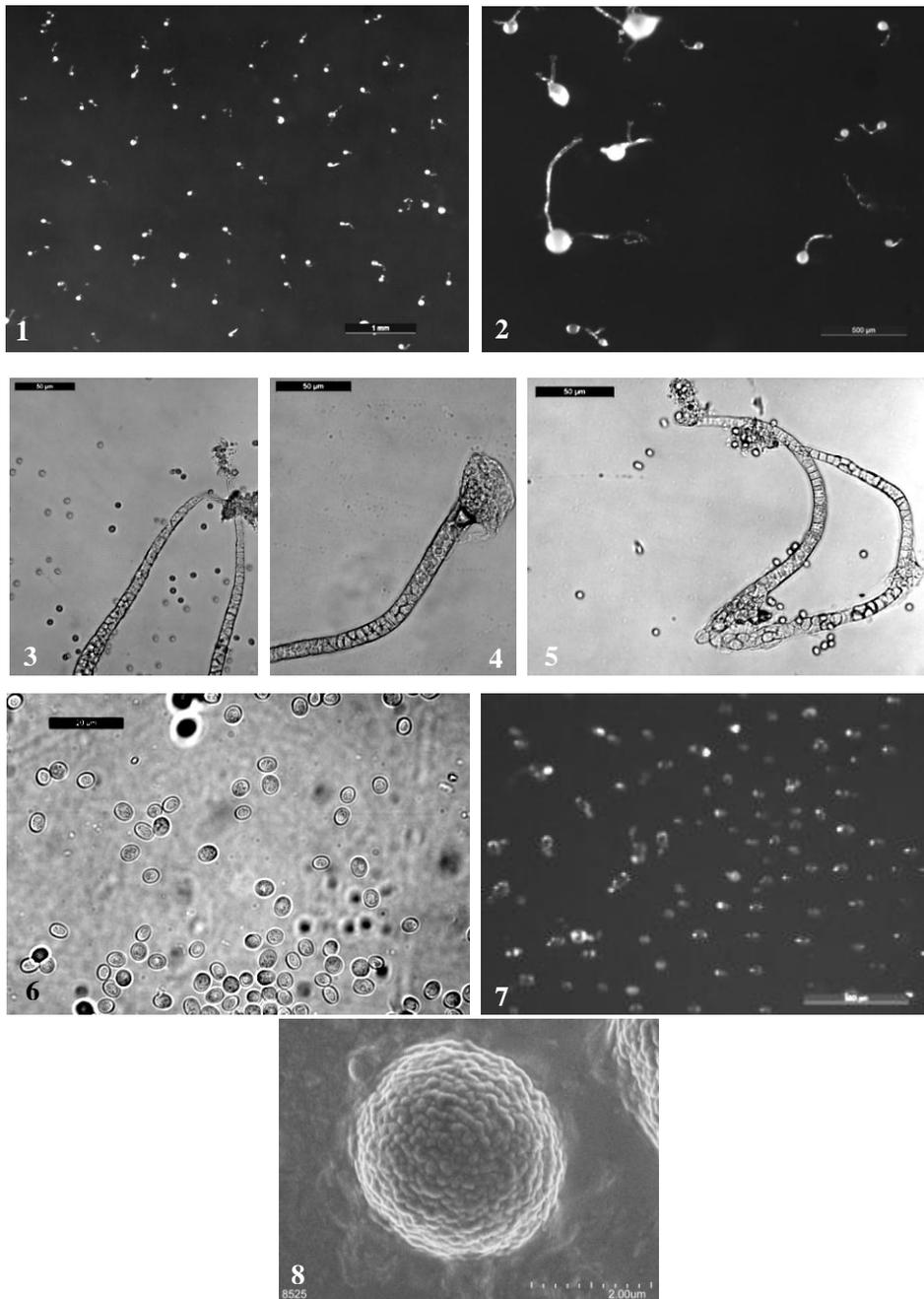


图 1 迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 的形态特征

1, 2: 孢堆果; 3: 孢堆果柄顶部; 4: 孢堆果柄基部; 5: 孢堆果柄; 6: 孢子;
7: 集群; 8: 孢子 (电镜拍摄)

Fig. 1 The morphological characteristics of *Dictyostelium minimum*

1, 2: Sorocarps; 3: Tips of sorophore; 4: Bases of sorophore; 5: Sorophore; 6: Spores;
7: Aggregations; 8: Spore (SEM)

第三章 个体发育研究

3.1 材料与方法

悬滴培养法: 将双凹载玻片滴入适量的无菌水, 接入无污染的网柄细胞状黏菌的孢子团后盖上盖玻片, 置于 17 °C 培养箱中培养, 8 h 后在蔡司 (AXI0) 生物显微镜下显微观察孢子萌发情况。

水琼脂培养基-大肠杆菌培养法: 在超净工作台中, 将来自于吉林农业大学食用菌教育部工程研究中心的迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 菌株接种至新的水琼脂培养基中, 同时接入 0.4 mL 大肠杆菌悬液, 封口, 置于 17 °C 恒温恒湿培养箱中培养, 8 h 后取出于蔡司 (AXI0) 生物显微镜、蔡司 (Stemi2000-c) 实体解剖镜、蔡司激光共聚焦显微镜 (LSM 710) 下观察并记录其个体发育状况。

3.2 迷你网柄菌的生活史特征

孢子萌发: 迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 孢子呈圆形或近圆形, 无极粒, 直径约为 3.7-5.4 μm (图 2-1), 第 15 h 孢子开始萌发, 萌发时孢子壁呈“孔出式”开裂, 随后从小孔中释放出多个形状不规则、透明、微小的黏变形体 (图 2-2)。

集群: 在水琼脂培养基上, 接种 36 h 后, 开始形成集群。集群呈土堆状, 隆起不明显, 无明显的细胞流 (图 2-3)。之后, 集群隆起突出, 逐渐加厚, 变大。第 39 h 集群中心形成 (图 2-4)。第 41 h 集群中心向上突起进入拔顶期 (图 2-5)。

假原生质团形成: 接种 42 h 后, 假原生质团形成。初期蛞蝓体向上拔顶, 尾部不明显 (图 2-6)。第 45 h 尾部出现并拉长 (图 2-7)。第 47 h 顶部变尖为圆柱体, 最终发育成蛞蝓体 (图 2-8, 9)。此种蛞蝓体假原生质团未观察到明显的迁移过程, 便逐渐变长, 其顶部形成孢子团。

孢堆原形成: 接种 50 h 后孢堆原形成, 孢堆果进入成熟阶段, 初期平伏于培养基上, 柄几乎消失 (图 2-10)。

孢堆果成熟: 接种 51 h 时, 顶部略尖, 逐渐变圆, 柄渐渐变长, 且弯曲竖立于培养基上 (图 2-11)。后期 (第 56 h) 完全成熟, 孢堆果微小, 单生, 无分支, 无向光性 (图 2-12)。

因此, 迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 完成一个生活史需 3 d, 接种 15 h 后孢子萌发并且释放出黏变形体, 第 36 h 开始形成集群, 第 42 h 形成假原生质团, 第 50 h 形成孢堆原, 第 56 h 孢堆果成熟。

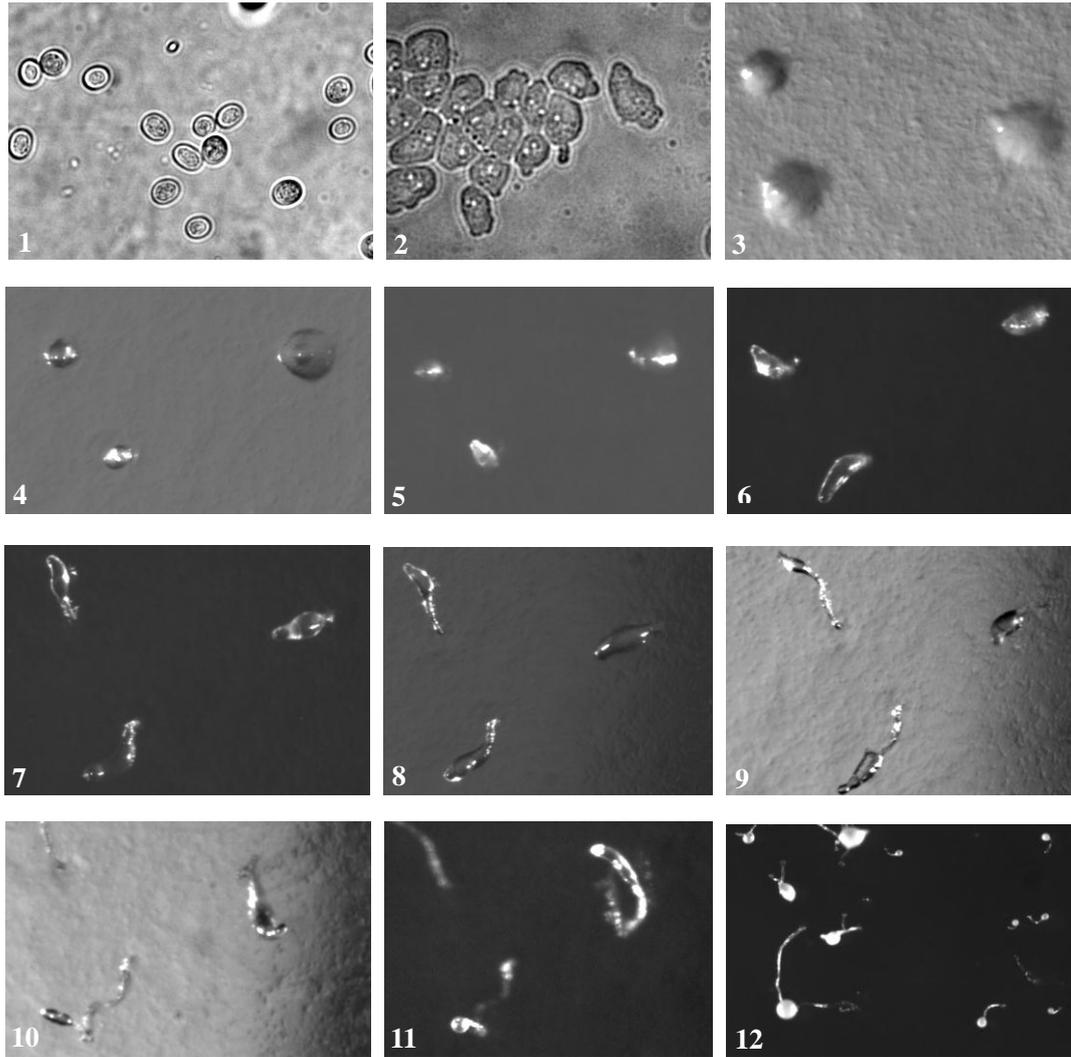


图 2 迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 的生活史循环

1: 孢子; 2: 黏变形体; 3-5: 集群; 6-9 假原生质团; 10, 11: 孢堆原拔顶; 12: 孢堆果.

Fig. 2 The life cycle of *Dictyostelium minimum*

1: Spores; 2: Myxamoebae; 3-5: Aggregations; 6-9: Pseudoplasmodia; 10, 11: Sorogen ascent; 12: Sorocarps.

3.3 讨论

通过个体发育研究这部分实验, 我发现迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 完成一个生活史需 3 d, 还明确了其孢子萌发、集群、假原生质团形成及孢堆果成熟的各阶段特征, 这对形态分类学部分提供重要补充。为了在深层次地认识并挖掘迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 与网柄细胞状黏菌其它物种之间的系统关系, 并明确其在系统发育树中所处的位置, 本项目还将对其进行基于 ITS 和 SSU 的分子系统学研究。

第四章 分子系统学研究

4.1 材料

4.1.1 主要仪器及设备

PCR 扩增仪 (杭州博日科技有限公司)

台式高速离心机 (TGL-16G) (江苏金坛市中大仪器厂)

FR-200 紫外与可见电泳分析装置 (上海复日科技有限公司)

UV-140 型紫外透射仪 (大连竞迈生物科技有限公司)

HM-I 型水平式电泳槽 (大连竞迈生物科技有限公司)

电泳仪 (DYY-6C) (北京市六一仪器厂)

移液器 (eppendorf)

4.1.2 所需试剂

Tris 三羟甲基氨基甲烷 (北京鼎国生物技术有限公司)

NaCl (北京化工厂)

HCl (北京化工厂)

EB (溴化乙锭) 替代染料 (美国 QUANGEN 公司)

琼脂粉 (日本)

NuClean Plant Genomic DNA Kit 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (康维世纪)

Premix Taq (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye) 试剂盒

4.2 方法

4.2.1 实验所用试剂配制

(1) 0.5mol/L EDTA 乙二胺四乙酸 (pH 8.0)

186.1 g EDTA-Na₂H₂O 二水乙二胺四乙酸二钠

20 g NaOH

加水定容至 1000 mL (分装后高压灭菌备用)

(2) 5×TBE 电泳缓冲液贮液

54 g Tris 碱

27.5 g 硼酸

20 mL 0.5 mol/L EDTA 乙二胺四乙酸 (pH 8.0)

加水定容至 1000 mL

4.2.2 DNA 的提取

采用 NuClean Plant Genomic DNA Kit 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (康维世纪), 具体步骤:

- (1) 取迷你网柄菌孢堆果到离心管中, 加入 400 μL Buffer LP1 和 6 μL RNase A (10 mg/mL), 涡旋振荡 1 分钟, 室温放置 10 分钟, 使其充分裂解。
- (2) 请勿在使用前将 Buffer LP1 与 RNase A 混合。
- (3) 加入 130 μL Buffer LP2, 混匀, 涡旋震荡 1 分钟。
- (4) 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 5 分钟, 将上清移至新的离心管 (自备) 中。
- (5) 加入 1.5 倍体积的 Buffer LP3 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 充分混匀 (如 500 μL 滤液加入 750 μL Buffer LP3)。
- (6) 将上步所得溶液和沉淀全部加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
- (7) 向吸附柱中加入 500 μl Buffer GW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
- (8) 重复步骤 7。
- (9) 12,000 rpm 离心 2 分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。
- (10) 将吸附柱放到一个新离心管 (自备) 中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 20 μl Buffer GE 或灭菌水, 室温放置 2-5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 DNA。

4.2.3 基因组 DNA 的检测

使用琼脂糖凝胶电泳, 进行 DNA 检测, 琼脂糖浓度约为 1.0%, 加入 EB 替代染料进行染色, 电泳缓冲液为 0.5 \times TAE, DNA 电泳上样量为 2 μL , 与 0.5 μL 6 \times loading buffer 混合, 130 V 电泳 30 min。以 DNA Marker DL2000 作为标尺, 紫外下观察电泳条带并照相。

4.2.4 PCR 扩增

(1) PCR 反应所用引物

本研究所用 PCR 扩增引物详见表 1 配对, 由上海生工生物技术有限责任公司合成。

表 1 引物序列

引物名称	序列	参考文献
18S-FA	5' AACCTGGTTGATCCTGCCAG3'	Medlin et al. 1988
18S-RB	5' TGATCCTTCTGCAGGTTTCAC3'	Medlin et al. 1988
ITS1	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3'	White et al. 1990
ITS4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	White et al. 1990

(2) PCR 扩增反应体系

Taq (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye) 10 μ L, 引物各 0.5 μ L (表 1), DNA 模板 1 μ L, 最后以 ddH₂O 水补足至总体积 20 μ L。

(3) PCR 反应条件

SSU: 95°C 预变性 5min (95°C 变性 30s, 56°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min) x25, 最后 72°C 延伸 10min, 4°C 冷却。

ITS: 95°C 预变性 5min (94°C 变性 1min, 50°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min) x25, 最后 72°C 延伸 10min, 4°C 冷却。PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳检测。

4.2.5 序列测定

PCR 产物送上海生工生物技术有限公司进行测序。

4.2.6 DNA 序列分析

使用 BLAST 程序对 PCR 扩增得到序列进行同源性搜索, 再采用 MEGA 6.0 中的 Muscle 程序对序列进行比对, 并进行人工检查校对。采用 jmodeltest 0.1 进行替代模型分析, MEGA 6.0 构建最大似然系统发育树。使用分析模型为 GTR, ML 系统树采用自展值分析进行检验, 随机重复抽样 1000 次。BI 分析中 lset 设置替代模型 nst=6 (GTR 模型), 位点速率变异模型设置为 rates=invgamma, 并使用 Markov Chain Monte Carlo 数据进行估算分析。

4.3 结果与讨论

4.3.1 DNA 的提取 见图 3。

4.3.2 PCR 扩增结果 见图 4。

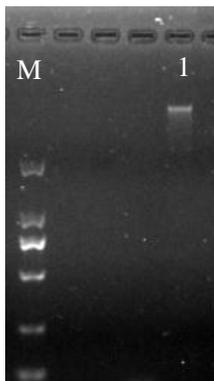


图 3 DNA 电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis of DNA

M: Marker; 1: DNA

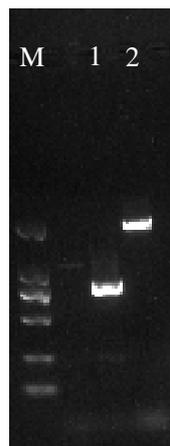


图 4 PCR 电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis of PCR

M: Marker; 1: ITS 扩增条带; 2: SSU 扩增条带

4.3.3 DNA 序列分析

本研究基于 ITS 和 SSU 全序列片段分别构建系统发育树 (图 5,6), 深入探讨迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 的分子系统学关系。在这两个系统发育树中, 每个种在每个 Group 的分布与文献 Schaap et al. 2006 和 Romeralo et al., 2010, 2011 报道均一致。其中, Group1 为小孢网柄菌组“Parvisporids”, 因为这组网柄菌的孢子都较小; Group2 为异网柄菌组“Heterostelids”, 这组网柄菌孢堆果和孢堆果柄形态多样, 因此在后续的研究中, Romeralo et al. (2010, 2011) 根据聚类的情况将 Group2 又分成了 Group2A 和 Group2B; Group3 为根状网柄菌组“Rhizostelids”, 这组网柄菌孢堆果柄基部为根状; Group4 为网柄菌组“Dictyostelid”, 因为这个组包括了大量传统意义上网柄菌属 *Dictyostelium* 的网柄菌, 如模式生物盘基网柄菌 *D. Discoideum*; 除此之外, 在 Romeralo et al., 2010, 2011 的研究中, 根据系统树的聚类情况, 又建立了 3 个复合群, 分别为 polycarpum-complex, polycephalum-complex 和 violaceum-complex。在本研究构建的 ITS 和 SSU 的系统发育树中, 新种迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 均分布在 Group4 中, 与大量传统意义上网柄菌属 *Dictyostelium* 的种聚类在了一起。

第五章 结论

本研究的主要创新点在于: 通过我的研究, 对新种迷你网柄菌 *Dictyostelium minimum* 进行形态学特征的描述, 在国内外首次对此种进行个体发育全阶段的研究, 记录其从孢子到孢子的各阶段发育特征。通过分子系统学研究, 确认迷你网柄菌 *D. minimum* 分布在系统树的 Group4。本项目基于多角度的“整合分类学”理念, 根据形态学特征、生物学特征和分子系统学特征, 综合评价新种迷你网柄菌 *D. minimum* 的分类关系, 同时也为其后续应用打下基础。

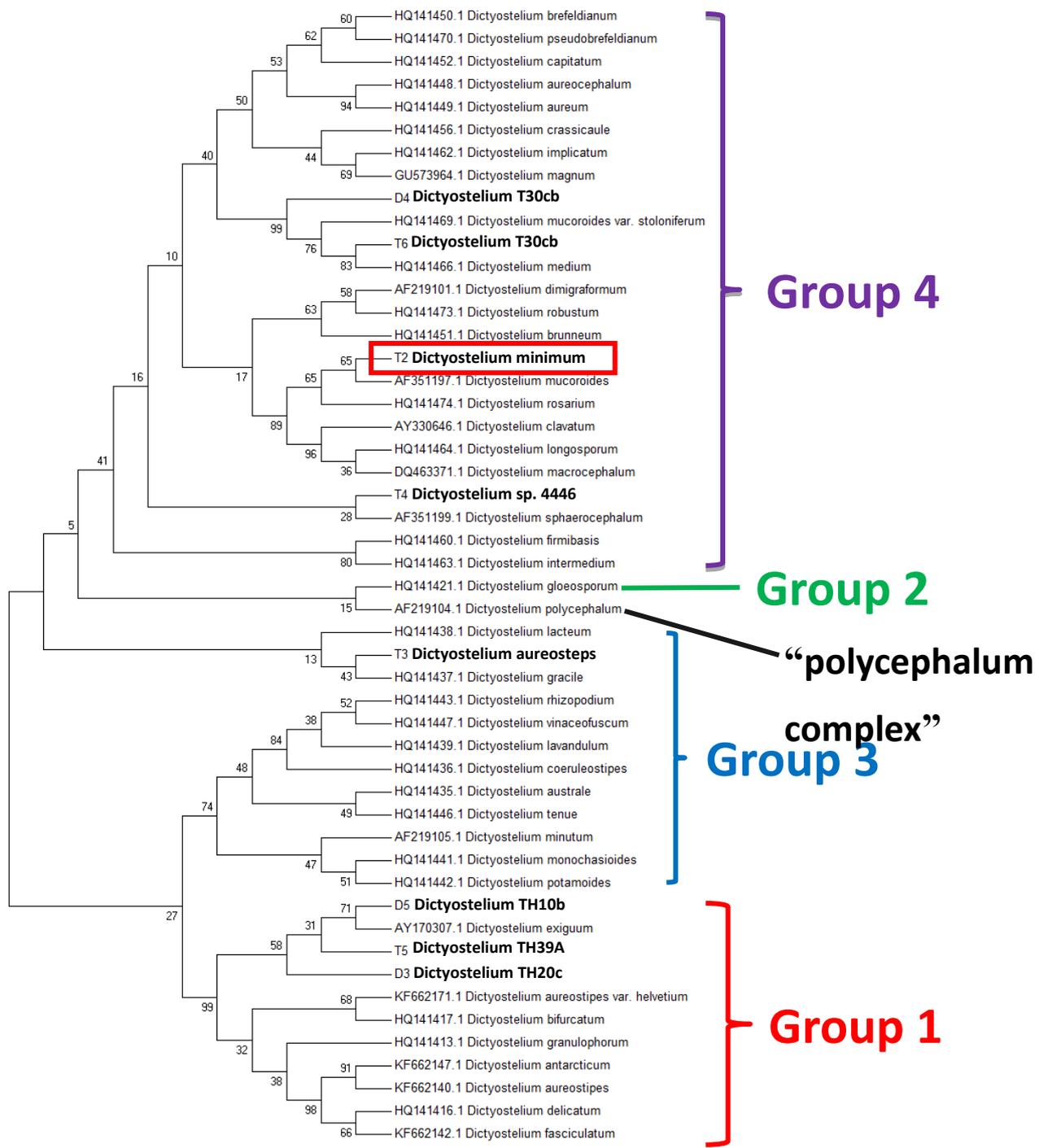


图 5 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogeny of dictyostelids based on ITS sequences

(MEGA6.0 构建最大似然系统发育树。使用分析模型为 GTR, ML 系统树采用自展值分析进行检验, 随机重复抽样 1000 次。)

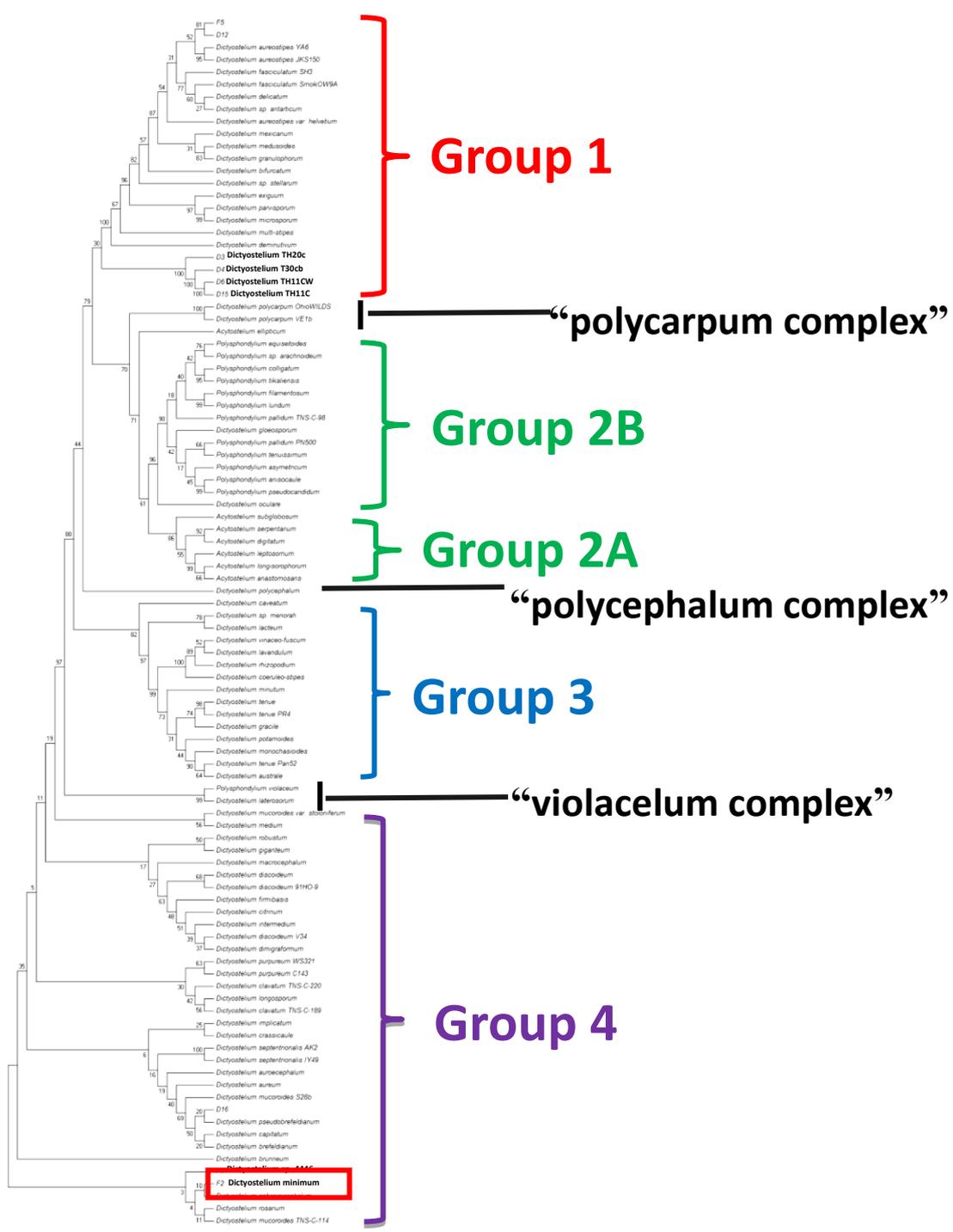


图 6 基于 SSU 序列构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogeny of dictyostelids based on SSU sequences

(MEGA6.0 构建最大似然系统发育树。使用分析模型为 GTR, ML 系统树采用自展值分析进行检验, 随机重复抽样 1000 次。)

参考文献:

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M, 1996. Introductory mycology. Yao YJ, Li Y(Translate). China Agriculture Press, Beijing. 759-769.
- Bai RL. 1983. A study on some species of Acrasiomycetes. *Acta Mycologica Sinica*. 2: 173–178.
- Brefeld O. 1884. *Polysphondylium violaceum* and *Dictyostelium mucoroides* nebst Bemerkungen zur Systematik der Schleimpilze. *Unters. Gesammtgeb. Mykol*, 6: 1~34.
- Cavender JC & Raper KB. 1965. The *Acrasieae* in nature. I. Isolation. *American Journal Botany* 52: 294–296.
- Cocucci SM Sussman M. 1970. RNA in cytoplasmic and nuclear fractions of cellular slime mold amebas. *The Journal of Cell Biology* 45: 399–407.
- Fets L, Kay R, Velazquez F. 2010. *Dictyostelium*. *Current Biology* 20(23): R1008–R1010.
- Hagiwara H. 1983. Four new species of dictyostelid cellular slime molds from Nepal. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B* 9(4):149–158.
- Hagiwara H, Yeh ZY, Chien CY, 1985. *D. macrocephalum*, a new dictyostelid cellular slime mold from Taiwan.. *Bullion National Science Museum Tokyo Server Barbara*, 11(3): 103-108.
- Hagiwara H. 1989. The taxonomic study of Japanese dictyostelid cellular slime molds. National Science Museum, Tokyo.
- He, X.L. & Li, Y. 2008a. Three new records of dictyostelids in China. *Mycosystema* 27: 532–537.
- He, X.L. & Li, Y. 2008b. A new species of *Dictyostelium*. *Mycotaxon* 106: 379–383.
- He, X.L. & Li, Y, 2010. A new species of *Dictyostelium* from Tibet, China. *Mycotaxon*, 111: 287–290.
- Liu P, Li Y, 2010a. Dictyostelids from Ukraine 1: two new records of *Dictyostelium*. *Mycotaxon*, 111: 275~278.
- Liu P, Li Y, 2010b. Dictyostelids from Ukraine 2: two new records of *Dictyostelium*. *Mycotaxon*, 112: 367~370.
- Liu P, Li Y, 2011. New species and new records of dictyostelids from Ukraine. *Mycologia*, 103 (3): 641~645.
- Liu P, Li Y, 2012a. Dictyostelids from Heilongjiang Province, China. *Nova Hedwigia*,

94 (1-2): 265~270.

Liu P, Li Y, 2012b. New records of dictyostelids from China. *Nova Hedwigia*, 94 (3-4): 429~436

Liu P, Li Y. 2014. Dictyostelids from Jilin Province, China. I. *Phytotaxa* 183 (4): 279–283.

Raper K.B. 1973. Acrasiomycetes. p. 9-36. In “*The Fungi*, vol. IV B” (Ainsworth G.C., Sparrow F.K., Sussman A.S., ed), Academic Press, Inc. New York.

Raper K.B. 1984. *The Dictyostelids*. Princeton University Press, Princeton.

Ren Y.Z., Liu P, Li Y. 2014. New records of dictyostelids from China. *Nova Hedwigia* 1–2: 233–237.

Vadell E.M., Cavender JC, Romeralo M., Edwards SM, Stephenson SL, Baldauf SL. 2011. New species of dictyostelids from Patagonia and Tierra del Fuego, Argentina, *Mycologia* 103(1): 101–117.

Zhao MJ, Liu P, An Y, Yao YJ, Li Y, 2017. *Dictyostelium annularibasimum* (Dictyosteliaceae, Dictyostelida), a new purple species from China. *Nova Hedwigia*, 104 (1-3): 351~358.

安颖. 基于多基因片段及脂肪酸生物标记的网柄细胞状黏菌代表属的分类学研究[D]. 吉林农业大学博士学位论文, 2016.

白容霖. 集胞菌的初步研究[J]. 真菌学报, 1983, 2(3): 173~178.

白容霖. 集胞菌的初步研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 1983.

崔俊涛. 东北地区网柄菌属分类研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 1991.

范岷. 盘基网柄菌野生型细胞 KAx-3 和突变型细胞 RNAi-allC mRNA 差异显示分析[D]. 华东师范大学硕士学位论文, 2013.

郭晓慧, 赵敏, 王晓燕, 赵三军, 高润池, 高晶, 施利民. 饥饿对盘基网柄菌细胞迁移特征及伪足性状的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(4): 494–501.

何晓兰. 中国网柄菌科分类学初步研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2008

李超. 河南省和湖南省区网柄菌的分类学研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2013.

李丽. 盘基网柄菌发育期间蛞蝓体的形态学以及类免疫细胞的研究[D]. 华东师范大学, 2010.

刘晶晶. 网柄菌对农田土壤环境变化的指示作用研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2011.

刘朴.网柄细胞状黏菌的分类学与分子系统学研究.吉林农业大学博士学位论文[D], 2010.

孙金月. 网柄菌科代表种生活循环的研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2011.

谭宁. 盘基网柄菌柄细胞分化和凋亡的形态特征和酶细胞化学研究[D]. 华东师范大学, 2016.

王一挣. 盘基网柄菌 KA_x - 3 细胞和 AKI27 细胞 mRNA 差异显示分析[D]. 华东师范大学研究生硕士学位论文, 2007.

魏晓静. 盘基网柄菌尿囊酸酶基因表达产物的纯化及多克隆抗体制备[D]. 华东师范大学硕士学位论文, 2008.

薛德明, 刘丹丹. 盘基网柄菌发育机制研究进展.生物技术 Biotechnology, 25(5):500.

姚达. 网柄菌对鸡粪中大肠菌群的去作用研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2015.

姚一建, 李玉 (主译). 菌物学概论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.

杨春霞. 盘基网柄菌发育过程中细胞粘附分子 lagC/gp150 和 cadA/DdCAD-1 的功能研究[D]. 华东师范大学博士学位论文, 2013.

叶平. 细胞色素 c 在盘基网柄菌细胞凋亡中表达情况的研究[D]. 华东师范大学研究生硕士学位论文, 2011.

袁海燕. 中国西南部分地区网柄菌的分类研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2012.

赵明君.中国华东部分地区网柄菌的分类学研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2014.

周子康. 盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)突变型细胞 *allC* 细胞周期异常的研究[D]. 华东师范大学硕士学位论文, 2013.

致谢

本论文是在尊敬的导师李玉院士的悉心指导下完成的。在学习期间,无论在文献收集、论文选题、实验设计、实验实施,还是论文的写作与最后定稿,都得到了李老师大量帮助和指导,能够有机会得到先生的谆谆教诲,是我人生中的一大幸事。先生广博的学识、严谨的治学态度、敏锐的科研洞察力、忘我的工作作风及丰硕的科研成果已然成为菌物学家的典范。先生对学生的期望和要求虽然很高,但又给予我们极大的自由空间,鼓励学生创新思路,不断拓展新的研究领域。同时,先生高尚的人格魅力对我影响深远,他常教导我们做人要遵从“上善若水,厚德载物”、“但做善事,莫问前程”,让我明白了许多为人处世的道理,使我受益匪浅,终身难忘。“经师易得,人师难求”,在此谨向李老师表示衷心的感谢和崇高的敬意,感谢您辛苦的指导 and 帮助。

论文指导老师简历

李玉,男,1944年出生,山东济南人,汉族,中共党员,中科院理学硕士,日本筑波大学农学博士,中国工程院院士,俄罗斯科学院外籍院士。吉林农业大学教授、博士生导师,国际药用菌学会主席,国务院学位委员会第四届、第五届学科评议组成员,《菌物研究》主编,《菌物学报》(至2009年)和《International Medicinal Mushroom》编委,国家级有突出贡献的中青年科技(管理)专家、全国优秀教育工作者和科技工作者、国家教学名师,国家食用菌产业技术体系岗位专家。

30余年来,在菌物科学与食用菌工程技术研究中,挖掘了大量菌物资源,构建了全新的菌物系统分类体系,将基础理论与应用技术相结合,创立了“菌类作物学”。以创新成果为依托,研究解决食用菌工程技术难题,先后主持并带领团队完成国家和省部级菌类工程研究项目如国家科技部、农业部、“973”、“863”、“948”以及国家自然科学基金国际合作重点及面上项目等国家和省部级项目50余项,累计科研经费过亿元,促进了菌物科学的发展及食用菌产业化升级。自20世纪70年代以来,深入全国各省区开展菌类资源调查,获2万余份标本与菌

株, 完成了《中国真菌志(香菇—侧耳类真菌)》等三部志书及《中国大型菌物资源图鉴》的编研, 使标本及菌种保藏量居于国内前列, 成为我国这一领域重要的资源库, 这些基础研究不仅保护了种质资源, 挽救了一批濒危物种, 更为进一步评价、利用、开发奠定了坚实基础。成果“菌物多样性保护创新体系的构建及其在藏区的应用”获得 2016 年度教育部高等学校科学研究优秀成果奖(科学技术)科技进步奖一等奖, “药用菌物资源及其开发利用”获得 2015 年度吉林省科技进步一等奖。仅黏菌就报道了 400 余种, 占世界已知种的 2/3。出版了《中国真菌志》黏菌卷一、二及两部目一级专著。发表新种 55 个, 为近年国际上发表新种总数的 1/17, 此前尚无中国人命名新种。对黏菌进行了系统研究, 提出全新的系统学观点, 使我国黏菌的研究居世界前列。成果“黏菌代表类群系统研究”获得 2007 年度国家自然科学奖二等奖, “重要黏菌类群系统分类学研究”获得 2002 年吉林省科技进步奖一等奖。

在食用菌领域筛选培育出 50 余个品种, 6 个通过国审; 创新改进了全日光栽培黑木耳等 8 项关键技术, 改变了传统栽培模式; 创新集成了无公害黑木耳、香菇、灵芝等栽培上的 6 个标准技术体系, 两棚制花菇生产等 3 种生产工艺, 米菇间作等 6 项生产模式; 建立生产示范基地 28 个, 以“五位一体”模式进行推广示范, 指导培训技术骨干 8000 多人, 带动 3 万农户, 累计推广 50 多亿袋(菌包), 创造直接经济效益近 60 亿元; 成果“食用菌新品种选育、配套丰产技术研发及产业化创新体系建设”获得 2008 年度吉林省科技进步奖一等奖, “北方食用菌高产、高效栽培新模式”获得 2001 年度吉林省科技进步二等奖。中国食用菌协会高度评价李玉在食用菌产业化上作出的贡献, 被认为在理论上率先提出了食用菌产业是“循环经济”发展模式中的重要产业环, 创新出的适宜北方地区栽培的优良品种及集成的标准化栽培技术, 改变了食用菌产业低水平徘徊的局面, 显著提高了食用菌产量、品质、生产效率, 对我国食用菌产业化升级起到了重要作用。

创建了食用菌专科专业和应用生物科学(食药菌方向)本科专业, 在国内率先形成了专科、本科、硕士、博士、博士后较完整的菌物科学与食用菌工程人才培养体系。相关的博士点和博士后流动站已成为省部级重点学科、国家重点实验室(培育基地)。建立了农业部北方食用菌资源利用重点实验室、教育部食药菌工程研究中心、中俄及中国白俄罗斯菌物资源保育中心和吉林省经济菌物创新平台及食用菌创新中心, 创办了《菌物研究》学术期刊, 形成技术平台、人才培养与学术期刊相结合的完整学科体系。于 2011 年被评为国家级教学名师, 所带领的团队被评为国家级优秀教学团队及教育部创新团队, 成果获得国家级教学成果二等奖。

将菌物学科与国际接轨, 代表这一学科出席国际会议 20 余次并在大会发言,

分别主持了第八届海峡两岸菌物学学术研讨会、中日及泛亚太地区菌物学论坛、第七届国际药用菌大会、第八届黏菌系统学及生态学国际会议、国际经济菌物大会，并担任大会主席。现任国际药用菌学会理事长。为提高我国菌类产品在国际市场上的核心竞争力，推动中国食用菌产业及菌物学科快速发展作出了贡献。国内外对李玉在菌物学的研究上均给予了高度评价。

在学术刊物上发表论文 600 余篇，其中 100 篇被“SCI”收录或引用，出版著作 25 部。获得国家已授权发明专利 17 项，国家自然科学二等奖 1 项、教育部高等学校科学研究优秀成果奖（科学技术）科技进步奖一等奖 1 项、何梁何利基金科学与技术进步奖 1 项、戴芳澜终身成就奖 1 项、国家教学成果二等奖 1 项、吉林省科技进步一等奖 3 项、二等奖 2 项、三等奖 10 余项、吉林省自然科学学术成果奖特别奖 1 项、吉林省教学成果一等奖 3 项，对我国的菌物事业做出了突出贡献。

李玉治学严谨、学风正派，取得的成绩得到了社会和政府的认可，被授予“全国优秀科技工作者”、“全国优秀教育工作者”、“全国优秀科普工作者”、“国家级教学名师”、“国家有突出贡献的中青年专家”等荣誉称号。

学术诚信声明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员： 孟祥非 指导老师： 李玉

2017年 10月 19日