

暗色丝孢真菌属种多样性研究方法概述

柏斌斌¹ 张凯²

1. 山东英才学院 山东 济南 250000; 2. 山东农业工程学院 山东 济南 250000

【摘要】以土壤为活动场所进行全部或者部分的生活史的真菌称为土壤真菌系。具有丰富的多样性, 而半知菌种类最多, 其中暗色丝孢真菌占半知菌的主要部分。暗色丝孢真菌 (Dematiaceous Hyphomycetes) 是菌丝、分生孢子梗和孢子从暗色到黑色的丝孢纲真菌。中国的气候、地形和土壤类型多种多样, 其中蕴含着丰富多样的土壤真菌资源, 本文主要通过从研究方法层面对暗色丝孢真菌研究进行论述, 以期为后来进行各地区的暗色丝孢真菌多样性研究提供借鉴。

【关键词】土壤; 暗色丝孢真菌; 研究方法

土壤是真菌在自然界主要生存和繁殖的主要环境之一。土壤的真菌种类、物种构成和分布趋向都受生态环境、土壤的类型、植物、气候温度和人为因素的影响。中国幅员辽阔, 地形复杂多样, 温度差异较大, 土壤类型丰富多样, 且土壤中含有丰富的真菌种类, 通过对我国东北地区的暗色丝孢真菌进行研究, 探究我国的真菌资源。

1 土壤真菌的研究情况

1.1 土壤真菌 (暗色丝孢真菌) 的概念

土壤中有丰富多样的微生物资源, 暗色丝孢真菌是土壤微生物的基础组成成分, 与其他微生物共同存在, 促进陆地生态系统的循环和发展, 维持生态的平衡运作。土壤系真菌通过腐烂生长和脱离寄主的兼性寄生真菌存在于土壤中, 生存时间或长或短, 其营养来源主要是有机质。土壤系真菌是土壤生态系统循环的基础部分, 其中包含了土壤习居菌和寄居真菌, 土壤中存在大量的真菌物种, 暗色丝孢真菌是指将分生孢子和孢子梗的样子呈暗色, 或者是其中存在一种暗色, 并且通过有丝分裂产生分生孢子, 是土壤真菌的最主要的菌群。

2 暗色丝孢真菌研究方法

2.1 暗色丝孢真菌分离方法

对土壤进行分离的方法有很多, 主要有稀释法、土壤平板法、植物残渣提取法、捕捉采取法、直接分离法和间接分离法等多种多样的方法, 这些方法可以一定程度的对土壤真菌进行分离提取, 每种方法都存在一定的优劣之分。

2.1.1 分离: 通过分别采用自来水琼脂+麦秆培养

基(TWA+W)、孟加拉红琼脂、Czapek琼脂、和 Czapek-Doox 琼脂培养基; 分别加入 25% 乳酸, 以抑制细菌生长, 或加 30 μg / ml 链霉素或氯霉素抑制细菌和放线菌。通过土壤平板法和稀释平板法, 分别对土样进行分离。

2.2 稀释法

2.2.1 把采样的土样进行充分混合, 提取 10g 土样, 将其放入三角瓶中, 放入 90ml 的灭菌水, 将三角瓶放置在每分钟 130 转的摇床上进行均匀摇晃, 持续 20 分钟, 使土壤颗粒均匀分布在蒸馏水中, 得到稀释倍数 10 的土壤悬浮液;

2.2.2 100 倍的土壤悬浮液操作为: 把稀释倍数为 10 的悬浮液提取 1ml 放置在试管中, 试管中含有 9ml 的灭菌水,

2.2.3 将灭菌的培养基温度冷却至 45℃ 时, 加入 30 μg / ml 链霉素或氯霉素, 将其倒入培养皿, 待其凝固冷却后, 把稀释倍数为 100 的土壤悬浮液, 进行摇匀, 每次提取 1ml, 每个培养皿滴入 4 ~ 6 滴, 采用灭菌后的弯玻棒进行均匀涂抹, 放置于 25℃ 生化培养箱内进行培养, 10 天左右过后在体视镜下进行观察, 提取真菌单个孢子放置在培养基上进行培养, 进行纯化后, 并鉴定观察, 且要制作干制培养标本和玻璃片, 同时要保存菌株。

2.3 土壤平板法

采用灭菌的扁勺上提取土样约 0.005g, 将其均匀的分撒在凝固的培养基上, 或者将约 0.005g 的土样放置于培养皿上中, 加入一定含量的无菌水, 将上述材料混合均匀, 倒入混合 45℃ 的培养基中, 将培养皿放置于 25℃ 的生化培养箱内进行培养, 3 ~ 4 天后进行查看,

在培养皿中长出一定的菌群后,通过调取单个菌落后放置另一培养皿上,产生孢后提取少量的菌落制成显微镜玻片进行观察,如果是暗色丝孢菌则提取单个孢子,放置在培养基上进行培养,在纯化后进行鉴定观察,制干制培养物和玻璃片同时要保存菌株。

根据参照各种真菌的原始文献和资料,选取不同的培养基进行规范性的培养;在25℃下培养。再进行1~2次的纯化,之后再进行分类的鉴定观察。且要制作干制培养物标本,保存活性菌种。

3 暗色丝孢真菌培养方法

3.1 马铃薯、葡萄糖和琼脂和马铃薯、胡萝卜和琼脂培养所需物品:马铃薯200g,琼脂16~20g,蒸馏水1000ml;将葡萄糖替换成胡萝卜200g。

3.2 玉米粉和琼脂培养所需物品:玉米粉100g,琼脂16~20g,蒸馏水1000ml。

3.3 自来水琼脂和麦秆培养方式所需物品配方:琼脂16~20g,蒸馏水1000ml,在灭菌后加入已灭菌的4~6cm的小麦秸秆的培养基中。

3.4 孟加拉红和琼脂培养基所需物品配方:KH₂PO₄1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 葡萄糖10g, 琼脂16~20g, 蒸馏水1000ml, 蛋白胨5g, 孟加拉红0.033g。在灭菌后冷却至45℃再加入链霉素30μg/ml,用来抑制细菌的繁殖生长。

4 暗色丝孢真菌分类方法

4.1 形态学分类

现阶段对于暗色丝孢真菌的鉴定方式主要是采用形态学的方式。主要根据种菌的菌落、分生孢子梗、产孢细胞以及分生孢子的形态特征和产孢方式进行鉴定。利运用透射电镜技术研究不同种属的真菌菌丝隔膜显微结构,并将这种技术作为分类研究的重要依据。

4.2 数值分类法

数值分类是电子计算机,由于等权原则,应用分类学的软件、自动化图像进行分析匹配。将真菌的分为不同的表现群,我国将23种链格孢特征进行记录分类编码,区分其属种。数值分类技术运用多种科学技术,对其量化处理,但是在操作方法中比较复杂。

4.3 生物化学分类法

化学分类法采用对真菌的化学特征进行分类,将化学成分的种类、结构和性质等方面作为依据,查看生物物种之间的联系和亲属关系。

4.3.1 可溶性蛋白质凝胶电泳技术。

不同种类的真菌其同功酶存在一定的差异,其主要是对酶谱的表达基因存在不同,是遗传特征的直接表现,

同时其结构中的氨基酸序列和组成有差异,电泳迁移率就不同,就能反应其亲属关系的远近。这些化学特征在种、属、科级水平上具有分类学价值。

4.3.2 次生代谢物分析

次生代谢产物是真菌在一定的生长时期。对初级代谢的产物为主要前体合成一部分对生命活动没有功能的物质。主要代谢的产物有类固醇、萜、生物碱、环肽、香豆素等,部分真菌还会分泌出真菌毒素。次生代谢物是比较极端的方法,这种分析方法比较复杂。

4.3.3 胞壁组分分析。

不同真菌的细胞壁结构和成分存在差异,对真菌的细胞壁进行分析,可以进行分类。可以发现几丁质、木糖、鼠李糖、岩藻糖等作为真菌的分类标准,但是这种方法必须要得到真菌的纯培养,很多情况下暗色丝孢真菌不易进行人工培养,难度较大。

4.4 分子生物学分类方法

对真菌的研究,慢慢演变成了以形态结构为主要部分,生物、化学分析等特征分类为辅助的分类方式。形态结构的分析是传统分类法的基础部分,但是现阶段为了更好的对真菌的形态结构进行分析,采用了分子生物学鉴定方法,其操作方法方便且准确可靠。

4.4.1 真菌DNA碱基组成

真菌DNA碱基组成研究已经广泛运用于真菌的分类中,一般情况下,同一种相同株的含量相差在2%以内;同一种类但不同株的含量差别在同4%~5%;同属但不同种差别在10%~15%;不同属或者不同科别的真菌差别在20%~30%。所有真菌(G+C)含量通常为20%~60%,以此为基础对真菌DNA碱基组成进行分子生物学鉴定。

4.4.2 真菌核型的PFGE分析

脉冲电场凝胶电泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)分析技术是20世纪80年代中期发展起来的大分子DNA分离技术,其分离范围可达10mb。用PFGE分析真菌的核型,一方面可以获得染色体的数目及大小、基因组结构方面的基本数据,构建出大尺度的物理图谱;另一方面无需DNA分子杂交和限制性内切酶就可以通过电泳核型的差异进行分类和鉴定,同时因为脉冲电泳图型中的一条带即是一个完整的染色体,因此,可以快速地寻找和定位基因。

4.4.3 核酸序列分析方法

核算序列分析技术是对菌种分子的进化和发育状况最有效的方法。通过对真菌的多核苷酸进行分析检测,其中共有的多核苷酸相同序列越多,则说明其同源性可能越高。可以从属、种、变种等菌株的水平来对暗色丝孢真菌进行鉴定。对于从油茶叶上分离得到的菌株,

根据其真菌形态和 DNA 的转录间隔区序列进行检测和 GenBank 中同源性较高的菌株建立系统发育树, 鉴定其菌株的属种, 不属于暗色丝孢真菌。对从大豆上分离得到的疫霉真菌的菌株进行分离, 通过对其的形态等方面进行鉴定, 确定其寄主范围后对其进行核酸序列分析, 分离检测后的菌株与序列差异较小, 但同源性较大, 接近百分之百, 将其病原菌鉴定为 *Phytophthora sojae*。因此, 核酸序列分析有一定的局限性, 可以对其同源性进行检测, 对于检测范围有限制, 要根据研究的目的、对象等方面进行综合考虑在确定选择研究方法。

5 结束语

真菌的分类可以随着其他学科进步而更新分类技术。从刚开始的形态分类到现阶段的分子生物学方法, 对于检测的结果也越来越趋近自然, 其鉴定结果也符合生物发展的形态。东北地区森林覆盖面大, 土壤中的有机物丰富多样, 能够促进真菌的繁殖培养; 充分挖掘其属、种资源, 探索其分类标准。对与现有的属、种进行

分类, 改善之前分类的错误。给开展暗色丝孢真菌的分类提供经验和方法, 扩大对真菌的认识和范围, 丰富我国的真菌资源, 对真菌属种的多样性进行研究, 促进真菌的分类和其在生态系统中的作用, 具有一定的研究价值。

【参考文献】

- [1] 夏吉文, 李浩桦, 张修国. 中国南方地区暗色丝孢真菌两个新种 [J]. 菌物学报, 2017, 36(11): 1483-1486. DOI:10.13346/j.mycosystema.170140.
- [2] 李香玉, 夏吉文, 刘淑艳等. 中国南方地区暗色丝孢真菌三个新记录种 [J]. 菌物学报, 2016, 35(8): 1018-1021.
- [3] 冯进蓉. 天河潭景区土壤暗色丝孢真菌多样性研究 [D]. 贵州: 贵州大学, 2018.

第一作者: 柏斌斌, 1987 年, 女, 山东英才学院, 中级工程师, 植物遗传育种与病虫害, baibinbin121@163.com

课题来源: 国家自然科学基金, 课题编号 318700