

· 论著 ·

# 裂褶菌培养基形态学观察和 DNA 序列分析

万力<sup>1</sup> 任强强<sup>1</sup> 王启明<sup>2</sup> 林元珠<sup>1</sup> 白逢彦<sup>2</sup>

(1. 河北医科大学第四医院皮肤科, 石家庄 050011; 2. 中国医学科学院微生物研究所, 北京 100101)

**【摘要】 目的** 通过观察裂褶菌在 5 种培养基上的生长状态、扫描电镜及 DNA 序列分析, 了解该菌形态学及分子生物学等方面的特征。**方法** 菌落转种于沙氏培养基 (SDA), 麦芽浸膏琼脂 (MEA), 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA), 玉米粉琼脂 (CMA) 和察氏琼脂 (CZA) 平皿培养基, 27℃ 和 37℃ 培养 2 周, 观察菌落生长情况, 进行扫描电镜检测及 DNA 序列分析。**结果** 菌落在 SDA, MEA 和 PDA 上生长状态较好, 呈蓬松白色羊毛状; 尿素酶试验阳性, 放线菌酮耐受试验阴性。光镜下见分支分隔菌丝、侧生的钉状突起及类水母体变异子实体。扫描电镜见菌丝分隔处闭锁联合、侧生钉状突起和泪滴状球形分泌物。经 26S rDNA D1/D2 区序列分析证实该菌株为裂褶菌。**结论** 裂褶菌只有丝状型一种菌落形态; 分支分隔菌丝及分隔处闭锁联合, 侧生钉状突起和泪滴状球形分泌物为其形态学特征; 孢子由类水母状子实体产生。

**【关键词】** 裂褶菌; 形态学; 分子生物学; 扫描电镜

**【中图分类号】** R 379.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2010)06-0327-05

## Morphology and sequence DNA analysis of *Schizophyllum commune*

WAN Li<sup>1</sup> REN Qiang-qiang<sup>1</sup> WANG Qi-ming<sup>2</sup> LIN Ynan-zhu<sup>1</sup> BAI Feng-yan<sup>2</sup>

(1. Department of Dermatology, The fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011; 2. China Institute of Microbiology in Academia Sinica, Beijing 100101)

**【Abstract】 Objective** To observe morphological characteristics of *Schizophyllum commune* on five kind of culture media. **Methods** *Schizophyllum commune* was cultured on Sabouraud's Agar (SDA), Malt Extract Agar (MEA), Potato Glucose Agar (PDA), Corn Meal Agar (CMA) and Czapek's Agar (CZA) respectively at 37℃ and 27℃ for two weeks. Scanning electron microscopy and DNA sequence analysis were performed after one-week culture. **Results** White and woolly colonies grew better on SDA, MEA and PDA with positive result of urease test and negative result of cycloheximide tolerance test. Septate mycelium with branches were found under light microscope, and branched hyphae with clamp connections, short and curved lateral pegs and waterdrop-shape excretion were detected under scanning electron microscope. *Schizophyllum commune* was identified by sequence analysis of 26S rDNA D1/D2. **Conclusions** *Schizophyllum commune* had a unique colonial morphology of hyphomycete with characteristic clamp connections, short lateral spicules and waterdrop-like excretion.

**【Key words】** *Schizophyllum commune*; morphology; molecular biology; scanning electron microscope

[Chin J Mycol, 2010, 5(6): 327-331]

裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 多寄生于腐木上, 广泛分布于世界各地, 是林木常见的致病性真菌。在致人类疾病方面, 临床多见吸入其孢子引起的过敏反应, 但由该菌引起人体深部组织感染的病例较为罕见。我们通过观察该菌在 5 种培养基上的生长状况、光镜和扫描电镜下的形态特征, 并进行 DNA 序列分析, 了解该菌在形态学、产孢方

式和分子生物学等方面的特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

受试菌株 分离自我科门诊的 1 例冠状动脉搭桥术后患者的痰液, 于 -80℃ 冰箱冻存。

形态学观察培养基 沙氏琼脂培养基 (SDA)、麦芽浸膏琼脂培养基 (MEA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、玉米粉琼脂培养基

(CMA)<sup>[1]</sup>。察氏琼脂培养基 (CZA) 采用北京三药科技开发公司的成品试剂。

生理学实验培养基 尿素酶培养基 (Urea Agar)<sup>[1]</sup>; 含放线菌酮沙氏培养基采用法国生物梅里埃公司 (BioMérieux) 的成品试剂。

1.2 方法

培养基形态观察 菌种复苏与平皿培养: 菌株置常温下复苏, 3 d 后分别转种于 5 种培养基, 各 12 个平皿, 分别置于 27℃ 和 37℃ 温箱培养 2 周, 观察菌落的生长情况、测量菌落直径并绘制生长曲线。小培养 (方块法): 将受试菌株分别点种于 5 种培养基琼脂块四边中点上, 27℃ 和 37℃ 恒温培养 2 周, 光镜下观察菌丝生长及孢子产生情况。

生理学实验 分别进行尿素酶和放线菌酮耐受试验。

扫描电镜下观察 取 27℃ 和 37℃ 两个温度培养 1 周生长良好的菌落标本置于 4% 的戊二醛液中固定, 常规制片后在日立 S-3500N 扫描电镜下观察。

DNA 序列分析 挑取生长良好的菌丝, 经 DNA 微量提取 (CTAB 法), 用引物: NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'), NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') 扩增 26S rDNA D1/D2 区域, 用 DNA 自动测序仪 (ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer) 得到菌株 PCR 扩增片段的原始序列, 在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索 (BLAST search)。实验菌株 26S rDNA D1/D2 区序列分析结果如下。

ACTCACACTTATGCAGCATCCTAAGCACGAACGGT  
GACGAATCCCGGCCTTGCGGCGTGCTGAGTTCCCTC  
AGTCCCAACCGCAGCATATGACAGGAGGCTATAA  
CACACCCGAAGGTGCCACATTCCTCCAGCCTTTCA  
ACTGCGGTCAAACTGATGCTGACCCATCCACCGG  
GAAATACGCCAAGCAAAAGCAAGGTTGATCCCCG  
GCGGACGCGACTGACTGCAACCGTTTTCCCTTTCGA  
CAATTTACGTAAGTTTAACTCTCTTTCCAAAGTT  
CTTTTCATCTTTCCCTCAGGTTACTTGTTCGCTATC  
GGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGCATTTA  
CCACCCATTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGA  
CTCGTCGAGAGCGCATCACAATGCACTGGTAGTCC  
GTGTCAAAGACGGGATTTCTCACCCCTCTATGACGCT  
CCATTCCAGGAGACTTATACACGGTCCAGCACGGA  
TAACGCTTCTCTAAATTACAACCTCGGACGGCCGGA

GACCGCCAGATTTTAAATTTGAGCTTTTCCCGCTTC  
ACTCGCAGTTACTAGGGGAATCCTTGTTAGTTTCTT  
TTCCTCCGCTTTTGGATATGCA

SPSS 16.0 统计软件处理实验数据 在同种培养基上不同温度生长第 1、7、14 天比较菌落直径, 用两样本 *t* 检验 (Independent-Sample T test); 同种温度下不同培养基生长第 1、7、14 天菌落直径比较, 用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

2 结 果

2.1 菌落大体形态

SDA 菌落呈蓬松白色羊毛状, 中央形成同心状环纹区, 菌丝浓密厚重, 堆积高出培养基表面, 不向培养基内部生长 (见图 1)。培养基背面初为白色, 其后变为淡黄色。

MEA 菌落大体形态基本同 SDA。培养基背面亦为淡黄色。

PDA 菌落亦呈羊毛状。生长略缓慢, 亦见同心状环纹区, 但不及 SDA 和 MEA 明显。

CMA 菌落呈环状, 中央区菌丝稀疏周边菌丝较为浓密, 培养基背面始终为白色。

CZA 菌落生长较差, 菌丝稀疏。未见同心状环纹区, 培养基背面始终为白色 (见图 2)。

2.2 生长曲线

菌落于 5 种培养基上第 1 周生长较快, 此阶段生长速度与时间呈正比, 两种温度下 5 种培养基上, 37℃ 均较 27℃ 生长快。

2.3 菌落直径

在同种温度不同培养基上生长第 1、7、14 天菌落直径比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 见表 1、2); 菌落在两种温度同种培养基上生长, 除第 3 天直径比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 第 7、14 天直径比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ , 见表 3)。

2.4 小培养光镜下形态

SDA、MEA 和 PDA 上菌丝生长状况较好, 结构直径差别较大且分支分隔明显, 菌丝表面可见侧生的钉状突起 (见图 3)。SDA 上菌丝生长状况最佳, 且可见类水母体变形体 (见图 4), 大小差别较大, 破裂后可释出大量孢子; 孢子散在呈长圆形, 大小不一。CMA 和 CZA 上菌落生长较差, 菌丝稀疏且纤细, 未见子实体及孢子产生。

2.5 扫描电镜观察

菌丝结构差别较大, 直径约 1.5 ~ 6 μm, 分隔

处产生闭锁联合(见图 5),菌丝表面可见短且弯曲的侧生钉状突起和泪滴状球形分泌物(见图 6),未见子实体及孢子结构。

## 2.6 生理学实验

尿素酶试验为阳性;放线菌酮耐受试验为阴性。

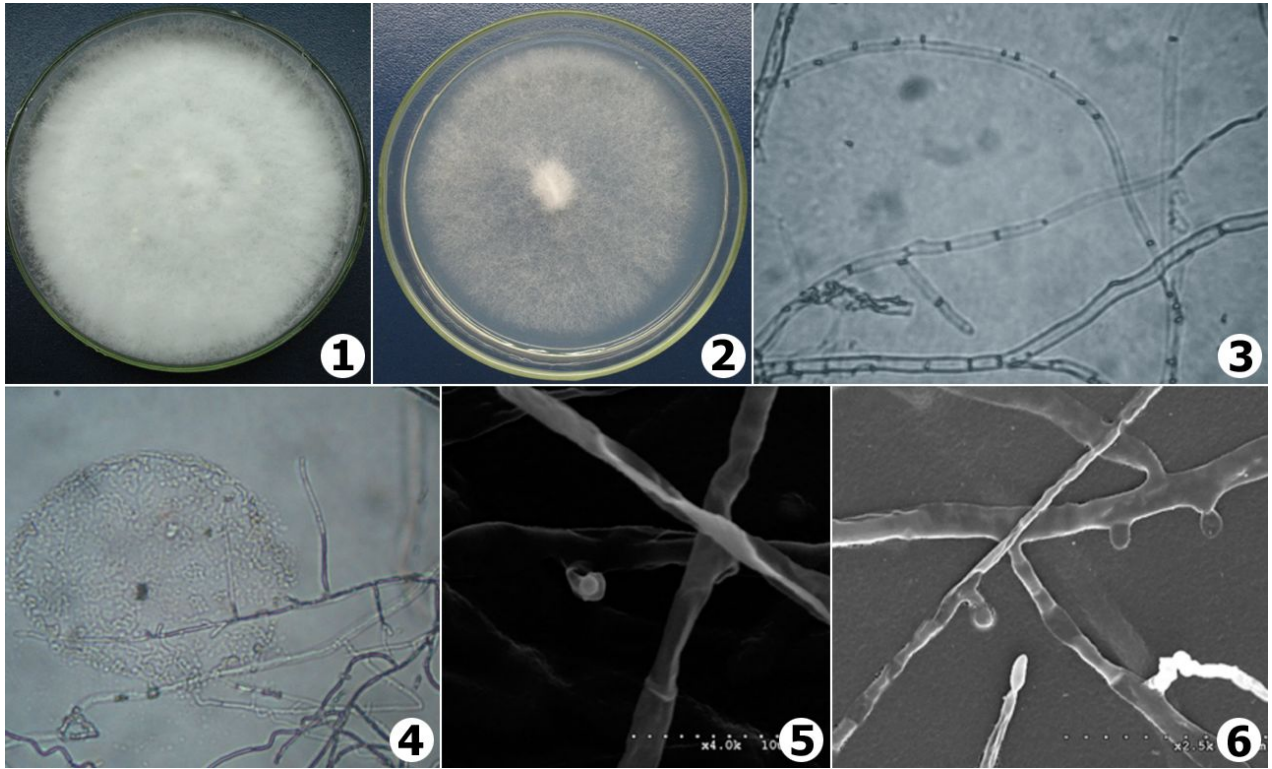


图 1 SDA 培养基上菌落呈白色羊毛状,中央形成同心圆环纹区 图 2 CZA 培养基上菌落生长状况不佳,菌丝稀疏,未见同心圆环纹区  
图 3 透明的分枝分隔菌丝,菌丝表面可见钉状体(酚棉兰染色,×400) 图 4 类水母体变异体(酚棉兰染色,×100) 图 5 分隔处产生闭锁联合,在菌丝表面上可见短且弯曲的侧生钉状突起 图 6 菌丝表面的侧生钉状突起和泪滴状分泌物

Fig. 1 Colony on SDA: anterior view of white, woolly colony, forming concentric zones in the center of the colonies Fig. 2 Colony on CZA: sparse hyphae without concentric zones Fig. 3 Clear septate hyphae with clamp connections and curved lateral spicules (×400) Fig. 4 Medusoid fruit body (×100) Fig. 5 Septate hyphae, with clamp connections and short, curved lateral spicules (SEM, ×4 000) Fig. 6 Branched septate hyphae, with curved spicules and waterdrop-shape excretion (SEM, ×2 500)

## 2.7 DNA 序列分析

基于 26S rDNA D1/D2 区序列分析的系统发育树,结果显示受试菌株与数据库中 *Schizophyllum commune* 具有 100% 同源性。

## 3 讨 论

裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 属担子菌亚门,层菌纲,伞菌目,裂褶菌科,裂褶菌属<sup>[2]</sup>,多寄生于阔叶树及针叶树腐木上,是一种食药兼用的真菌,国内外有关该菌的研究主要集中在其生物学特性、食用和药用价值、人工栽培驯化和多糖结构分析等领域<sup>[3]</sup>。1950 年 Kligman 从甲癣患者中分离

出该菌,此后世界各地陆续有该菌致病的报道。本研究中受试菌株分离自 1 例接受冠状动脉搭桥术后肺部感染患者的痰液,3 次不同时间采集标本进行培养,均分离出该菌。

形态学鉴定仍是目前菌种鉴定最主要的方法。菌种在不同的培养基上,或同一种培养基但温度条件不同,也会形成不同的菌落形态。本实验中,裂褶菌在 5 种培养基上生长状态的差异,可能与各种培养基中所含的营养成分不同有关。很多培养基碳源由葡萄糖提供,几乎所有的真菌都可以利用这种碳源;氮源主要是由硝酸盐、亚硝酸盐、氨、尿素、氨基酸和其他化合物提供。其他成分如纤维素、矿

表 1 27℃ 条件下在 5 种培养基上生长第 3、7、14 天菌落直径比较 (cm)

Tab.1 Colony diameter on different medium at 27℃ on the third day, the seventh day and the fourteen day (cm)

组别	第 3 天菌落直径		第 7 天菌落直径		第 14 天菌落直径	
	例数	平均直径	例数	平均直径	例数	平均直径
SDA	6	0.41 ± 0.14	6	4.05 ± 0.46	6	5.66 ± 0.49
MEA	6	0.39 ± 0.16	6	3.77 ± 0.26	6	5.50 ± 0.39
PDA	6	0.31 ± 0.16	6	3.50 ± 0.33	6	4.77 ± 0.37
CMA	6	0.40 ± 0.09	6	3.45 ± 0.40	6	5.40 ± 0.50
CZA	6	0.37 ± 0.07	6	3.80 ± 0.66	6	5.70 ± 0.59
	<i>F</i>	0.62	<i>F</i>	1.99	<i>F</i>	4.24
	<i>P</i>	0.65	<i>P</i>	0.13	<i>P</i>	0.09

Notes: comparison between random two media ( *P* > 0.05)

表 2 37℃ 条件下在 5 种培养基上生长第 3、7、14 天菌落直径比较 (cm)

Tab.2 Colony diameter on different medium at 37℃ on the third day, the seventh day and the fourteen day (cm)

组别	第 3 天菌落直径		第 7 天菌落直径		第 14 天菌落直径	
	例数	平均直径	例数	平均直径	例数	平均直径
SDA	6	0.48 ± 0.12	6	6.42 ± 0.63	6	8.90 ± 0.02
MEA	6	0.33 ± 0.11	6	6.25 ± 0.57	6	8.40 ± 0.45
PDA	6	0.36 ± 0.05	6	5.43 ± 0.44	6	8.17 ± 0.20
CMA	6	0.39 ± 0.15	6	6.28 ± 0.40	6	8.38 ± 0.30
CZA	6	0.40 ± 0.09	6	6.48 ± 0.48	6	8.70 ± 0.59
	<i>F</i>	1.87	<i>F</i>	4.54	<i>F</i>	2.34
	<i>P</i>	0.15	<i>P</i>	0.07	<i>P</i>	0.08

Notes: comparison between random two media ( *P* > 0.05)

表 3 27℃ 和 37℃ 条件下, 在同种培养基上生长第 1、7、14 天菌落直径比较 (cm)

Tab.3 Colony diameter on the same medium at 27℃ and 37℃ on the third, seventh and fourteen day (cm)

组别	例数	第 3 天菌落直径				第 7 天菌落直径				第 14 天菌落直径			
		27℃		<i>t</i>	<i>P</i>	27℃		<i>t</i>	<i>P</i>	27℃		<i>t</i>	<i>P</i>
		27℃	37℃			27℃	37℃			27℃	37℃		
SDA	6	0.42	0.48	-1.03	0.33	4.05	6.42	-7.80	0.00	5.63	8.90	-9.63	0.00
MEA	6	0.39	0.33	0.88	0.40	3.77	6.25	-10.11	0.00	5.50	8.40	-12.63	0.00
PDA	6	0.31	0.36	-0.79	0.45	3.50	5.43	-8.97	0.00	4.77	8.77	-21.00	0.00
CMA	6	0.40	0.39	0.12	0.91	3.45	6.28	-12.83	0.00	5.40	8.38	-13.22	0.00
CZA	6	0.30	0.40	-2.21	0.05	3.80	6.48	-8.47	0.00	5.70	8.70	-9.30	0.00

物质、氨基酸、维生素等在培养基中的蛋白胨中已含有<sup>[4]</sup>。文献报道裂褶菌菌丝生长的最适碳、氮源分别为葡萄糖和蛋白胨,不同 C/N 比对裂褶菌菌丝生长有明显影响,在 10 : 1 ~ 100 : 1 范围内均可生长,其中最佳 C/N 比为 40 : 1,研究发现裂褶菌利用单糖的能力要高于双糖和多糖<sup>[5]</sup>;有机氮作为氮源的裂褶菌菌丝生长明显优于无机氮源<sup>[6]</sup>。SDA 培养基中富含葡萄糖和蛋白胨,因此裂褶菌在 SDA 上生长状况最佳。MEA 培养基属于天然培养基,营养成分比较全面,含有多种糖类(葡萄糖、蔗糖和麦芽糖等);PDA 培养基亦属天然培养基,主要含有较多的淀粉和多种糖类<sup>[7]</sup>,故该菌在此两种培养基上亦可较好的生长。CMA 培养基中糖类和蛋白胨含量均较低;CZA 的主要成分为多种无机盐,以蔗糖为主要碳源,且两者缺乏必要有机氮源。以上结果表明:裂褶菌对培养基中营养成分要求较高,培养基中碳、氮的来源不同及其比例的差异对裂褶菌生长均有较明显影响;该菌利用无机盐的能力可能较差。本研究裂褶菌的放线菌酮耐受试验为阴性,表明放线菌酮可抑制其生长;尿素酶试验呈阳性。

扫描电镜在观察真菌细胞表面微细结构方面起着不可替代的作用,本实验扫描电镜发现:裂褶菌菌丝直径结构差别较大,分隔处具有闭锁联合、弯曲的侧生钉状突起及泪滴状球形分泌等特征性表现,以上结构特点与文献报道相同,但未发现孢子及子实体等结构。

近年来分子生物学在病原真菌学研究领域的十分活跃,广泛应用于病原真菌的分型、鉴定和亲缘关系研究,揭示种内不同菌株间的细微差异,从而弥补了表型分型的不足。本实验通过对受试菌株大亚基 rRNA 基因(26S rDNA)中 D1/D2 区域的碱基序列分析及其系统发育树亲缘关系的分析,证实此菌株为裂褶菌。目前该方法多处于实验室研究阶段,尚不能完全代替传统的真菌镜检和培养,形态学鉴定仍然是分类、分型的基础。因此将形态学与分子生物学鉴定相结合,可使真菌鉴定更加准确。

培养观察过程中,该分离菌株仅在 37℃ 条件

下 SDA 培养基上见类水母体变异体及孢子产生,但均未见担子菌典型的有性繁殖结构--担孢子的产生。裂褶菌是植物常见的腐生菌,在自然界中生长的最适温度为 22 ~ 25℃,子实体形成温度为 14 ~ 20℃,孢子萌发最适温度为 21 ~ 26℃<sup>[8]</sup>,主要以有性繁殖方式进行增殖。而本实验受试菌株在 5 种培养基上 37℃ 条件下生长状态均较 27℃ 为好,文献报道<sup>[9]</sup>大多数条件致病性真菌不能在 37℃ 生长,能够使之在这个温度下生存的耐热特性对于真菌在人体内生长变得尤为重要。因此最适生长条件及增殖方式的变化亦可能是由于生存微环境改变使裂褶菌细胞内调控增殖的基因表达改变所致,这种改变可能使其获得对人体侵袭性的基本条件之一。这说明裂褶菌增殖形式的多样性及菌丝发育的复杂性,对不同生长条件下裂褶菌的形态和产孢方式的了解,有助于临床上对裂褶菌感染的鉴定,也为进一步的生理、生化、营养、免疫学和分子生物学等方面的鉴定工作提供了实验室依据。

#### 参 考 文 献

- [1] 吴绍熙. 现代医学检验手册[M]. 第二版. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,2005:331-363,65-66.
- [2] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000:79.
- [3] 郭孟璧,田茂军,李聪,等. 人工培养裂褶菌营养成分分析研究[J]. 现代仪器,2006(1):22-23.
- [4] 王端礼,李若瑜,王爱平,等. 医学真菌学--实验室检验指南[M]. 第 1 版. 人民卫生出版社,2005:29-30.
- [5] 陈文强,邓百万,彭浩. 碳源和氮源对裂褶菌菌丝生长的影响[J]. 中国食用菌,2004,23(6):16-17.
- [6] 冀颐之,迟文鹤,杜连祥. 裂褶菌胞外多糖发酵条件的研究[J]. 药物生物技术,2003,10(1):17-21.
- [7] W. 亥克尔(牛胜田译). 食品化学与营养学[M]. 北京:人民卫生出版社,1985:11.
- [8] 赵琪,袁理春,李荣春. 裂褶菌研究进展[J]. 食用菌学报,2004,11(1):59-63.
- [9] 吴绍熙,郭宁如. 中国的机会性真菌感染[J]. 中国人兽共患病杂志,2005,21(9):812-814.

[收稿日期] 2010-08-12

[本文编辑] 卫凤莲