



## 李玉

中国工程院院士，俄罗斯科学院外籍院士。现任国际药用菌学会主席，中国菌物学会名誉理事长，中国食用菌协会名誉会长等职。从事菌物科学与食用菌工程技术和产业化研究，建成了位居国内前列水平的菌类种质资源库。获得国家自然科学奖二等奖 1 项、何梁何利基金科学与技术进步奖 1 项、吉林省科技进步奖一等奖 3 项、二等奖 1 项。在学术刊物上发表论文 500 余篇，其中 70 篇被“SCI”收录或引用，著作 20 余部，获得国家已授权发明专利 20 项。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，为我国的菌物事业做出突出贡献。

## 灰绒泡菌生活史及其子实体发育过程的显微观察

戴丹<sup>1,2</sup> 徐晓琪<sup>1</sup> 王赛禹<sup>1</sup> 李玉<sup>1,2✉</sup> 张波<sup>1✉</sup>

① 吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心 吉林 长春 130118

② 沈阳农业大学植物保护学院 辽宁 沈阳 110866

**摘要：**为明确灰绒泡菌 *Physarum cinereum* 的个体发育特征，本研究在实验室条件下完成了该菌的生活史，并对其子实体发育过程进行显微观察。灰绒泡菌 *P. cinereum* 孢子萌发方式为裂式，显型原质团水白色；子实体形态建成可分为孢囊形成期和孢囊成熟期，孢囊成熟期幼孢囊颜色随着孢子的形成呈现白色-红棕色-黑褐色逐渐加深的变化；子实体在发育过程中孢丝形成后原生质割裂形成孢子。

**关键词：**真黏菌，绒泡菌属，显型原质团，个体发育，石灰结

[引用本文] 戴丹，徐晓琪，王赛禹，李玉，张波，2021. 灰绒泡菌生活史及其子实体发育过程的显微观察. 菌物学报, 40(2): 379-386

Dai D, Xu XQ, Wang SY, Li Y, Zhang B, 2021. Life cycle and microstructure formation during sporulation of *Physarum cinereum*. Mycosystema, 40(2): 379-386

基金项目：国家自然科学基金（31970020，31400011）

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970020, 31400011).

✉ Corresponding authors. E-mail: yuli966@126.com, zhangbofungi@126.com

ORCID: DAI Dan (0000-0002-9642-2480)

Received: 2019-09-23, accepted: 2019-11-20

# Life cycle and microstructure formation during sporulation of *Physarum cinereum*

DAI Dan<sup>1, 2</sup> XU Xiao-Qi<sup>1</sup> WANG Sai-Yu<sup>1</sup> LI Yu<sup>1, 2</sup> ZHANG Bo<sup>1</sup>

①Engineering Research Center of Edible and Medicinal Fungi, Chinese Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China

②College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

**Abstract:** The life cycle of *Physarum cinereum* was investigated in water agar medium and microscopic structure formation at five different stages during sporulation was observed. Spores of *P. cinereum* germinated by a V-shaped split method then produced watery white plasmodium of phaneroplasmodial type. The sporulation includes two periods, sporocarp formation and sporocarp maturity. The color of sporocarp changed from white to red-brown and finally black as spores developed during sporocarp maturity. Spores formed after capillitium formation during sporulation.

**Key words:** true slime molds, *Physarum*, phaneroplasmodium, ontogeny, lime knot

真黏菌是隶属于原生动物界的一类真核生物 (Adl *et al.* 2012), 在其孢子到孢子的生活史中, 经历两个不同的营养生长阶段——单核的游动胞或黏变形体和多核可迁移的原质团, 进入繁殖阶段则产生静止的子实体。生活史中各阶段的个体发育特征, 如孢子萌发方式、原质团类型以及子实体发育方式等是现阶段澄清真黏菌系统发育的重要依据 (陈双林和李玉 1997; 陶伟等 2016)。

目前, 约 100 种真黏菌在实验室条件下完成生活史 (Clark 1995; 戴丹等 2019; Dai *et al.* 2019), 其中绒泡菌目 Physarales 下共有 63 种真黏菌完成生活史, 包括绒泡菌科下的 6 属 38 种和钙皮菌科下的 5 属 25 种。绒泡菌属 *Physarum* 包含 146 种真黏菌 (Lado 2019), 是真黏菌中物种数量最多的属, 但该属下仅 26 种已有生活史报道。灰绒泡菌 *Physarum cinereum* (Batsch) Pers. 是一个世界广泛分布的物种, 常大片生于枯叶、草茎和活植物体上 (李玉等 2008)。von Stosch (1935)

曾简要描述过灰绒泡菌 *P. cinereum* 的生活史, Shen (1964) 则较为详细地补充描述了该种的孢子萌发及原质团发育过程。

本研究在实验室条件下完成了灰绒泡菌 *P. cinereum* 的生活循环, 尤其关注了子实体形态建成的发育过程, 对子实体发育过程中 5 个不同阶段幼孢囊内孢子、孢丝等结构的形成顺序进行了详细观察, 从而描绘了该种生活史的全貌。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌种: 2018 年 7 月 23 日在长白山采集获得, 鉴定为灰绒泡菌 *Physarum cinereum*, 保存在吉林农业大学菌物标本馆 (HMJAU-M1558)。

### 1.2 方法

**1.2.1 孢子萌发观察:** 以水琼脂上培养获得的灰绒泡菌 *P. cinereum* 子实体 (成熟 20d 的子实体) 为材料, 取 10 个灰绒泡菌 *P. cinereum*

无柄孢囊置于离心管中,加入 250 $\mu$ L 无菌水,以无菌的研磨棒轻轻研磨释放孢子。每隔 20min 取 20 $\mu$ L 孢子悬浮液观察孢子萌发情况。使用正置显微镜 Axio Imager A2 (Carl Zeiss AG, Germany) 观察游动胞、黏变形体和小孢囊,并在 100 $\times$ 油镜下测量其大小,至少测量 20 个。

**1.2.2 原质团形成观察:** 孢子经 24h 充分萌发后,各取灰绒孢菌 *P. cinereum* 孢子悬液 50 $\mu$ L 分别转移至 3 个新鲜的 2%水琼脂培养基上,不添加无菌燕麦粉;24 $^{\circ}$ C 下暗培养,每天观察原质团形成情况。待原质团形成后将成熟的原质团转移至新的水琼脂培养基上,添加少量的无菌燕麦粉以及少许无菌水,于 24 $^{\circ}$ C 下继续暗培养。

**1.2.3 子实体形成观察:** 采用 LEICA M165 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 连续变倍实体显微镜观察原生质团及其发育形成子实体的发育过程。

**1.2.4 子实体形成的显微观察:** 在子实体发育的不同时期,取正在发育的子实体,以无菌水为浮载剂制片观察孢囊内的结构形成情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 孢子萌发

灰绒孢菌 *P. cinereum* 孢子在无菌水中仅 2h 便开始观察到 V 型开口的孢子,可见 V 形开口逐渐变大(图 1A-1F),释放孢子内的原生质,但此时还未见游动胞和黏变形体。此后 4h 可见梭形的游动胞(图 1G-1K),在水中,大部分的游动胞为长梭形,具一根明显的长鞭毛,旋转运动。萌发 16h 后,在水琼脂培养基表面可见形状不规则的黏变形体(图 1L-1N)和圆球形的小孢囊(图 1O-1Q)。圆球形小孢囊直径 4.5-8 $\mu$ m。

### 2.2 原质团形成

接种第 9 天在 2%水琼脂培养基上观察到灰绒孢菌 *P. cinereum* 幼原质团,水白色,偏透明,肉眼可见,属于显型原质团。继续培养 3-4d 后,幼原质团发育形成面积较大的扇面,原质团前缘肥厚(图 2A, 2B)。原质团喜食燕麦,在以燕麦粉为食的水琼脂培养基上生长迅速。同时,原质团在 2%的琼脂培养基上迁移速度较快,能够较快从真菌污染的培养基中纯化。该种原质团黏质鞘较薄,暴露在干燥的空气中快速失水死亡。

### 2.3 子实体形态建成

灰绒孢菌 *P. cinereum* 原质团在光照和黑暗的条件下均可形成子实体。在实验室条件下,通过适度干燥可以诱导子实体形成。逐渐干燥的条件还可以诱导该种菌核的形成,灰绒孢菌 *P. cinereum* 菌核白色偏黄(图 2C)。

灰绒孢菌 *P. cinereum* 子实体形态建成可明显分为两个时期:(1)孢囊形成期:主要表现在原质团在其前缘和主要菌脉上割裂再聚集成形状不规则的原质团团块(图 2D),此时团块表面凹凸不平(图 2E),随后团块发育形成表面光滑发亮的白色幼孢囊,此时可见幼孢囊内质地均匀(图 2F)。(2)孢囊成熟期:质地均匀的幼孢囊内逐渐出现白色颗粒,白色颗粒为正在形成的石灰结(图 2H),从表面光滑的幼孢囊到幼孢囊内出现白色颗粒约 1.5h,约 3h 后幼孢囊颜色,呈现白色-米黄色-粉色-棕色-褐色-黑色的变化(图 2H-2N),此过程持续约 4h;将带有黑色幼孢囊的琼脂块转移至 4%的水琼脂培养基上,合上培养皿盖但不密封,随着环境湿度的逐渐降低最后可见囊被的形成,囊被上出现疣粒状白色石灰质(图 2L-2N),最后囊被成熟开裂释放孢子(图 2O)。

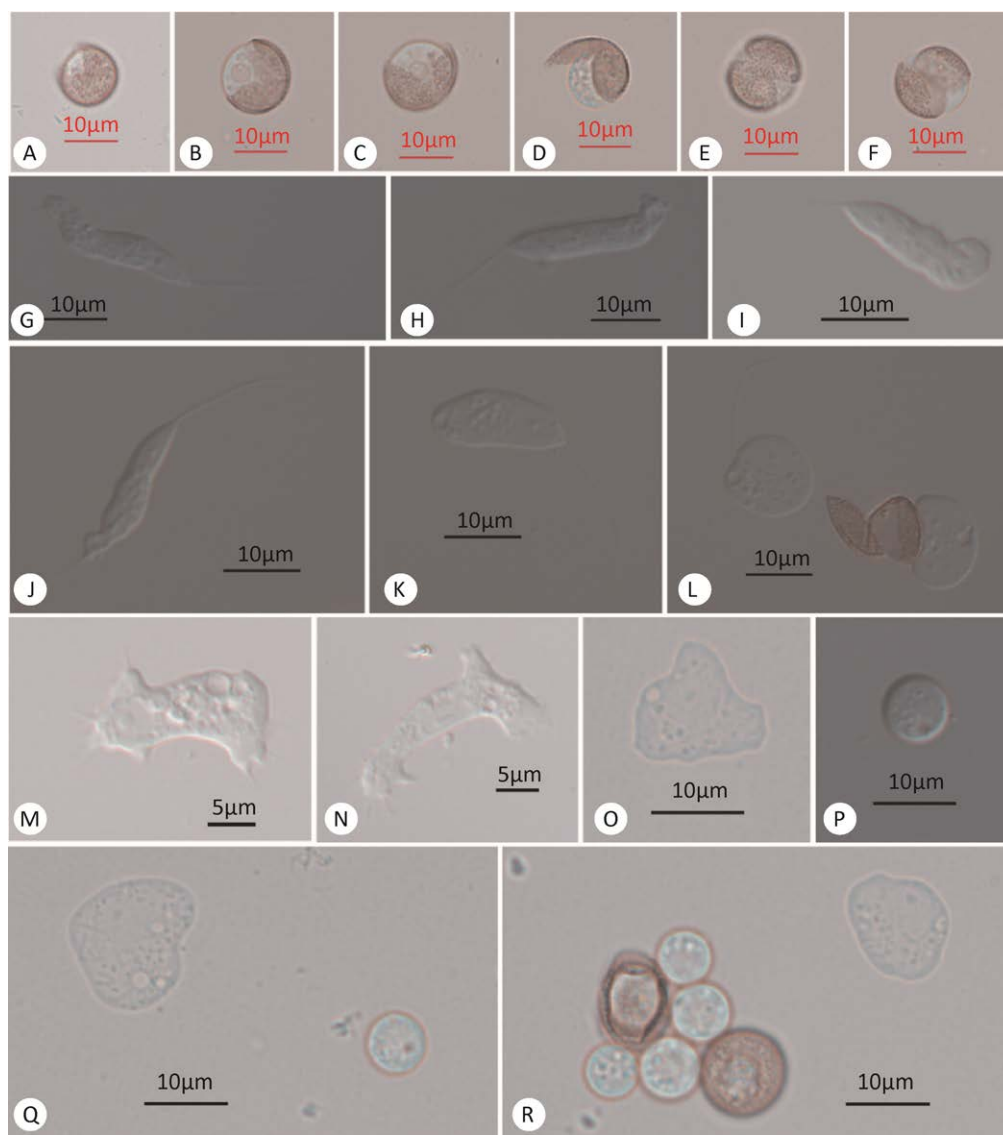


图 1 灰绒泡菌的萌发 A–F: V 字形开裂的孢子; G–K: 100×油镜下的游动胞; L–O: 100×油镜下的黏变形体; P–R: 100×油镜下的小胞囊

Fig. 1 Spore germination of *Physarum cinereum*. A–F: Germinating spores with a V-shape split in the spore wall; G–K: Swarm cell with one long flagellum under 100×; L–O: Myxamebae under 100×; P–R: Microcyt under 100×.

## 2.4 子实体不同发育阶段的显微结构

灰绒泡菌 *P. cinereum* 子实体发育形成过程首先为白色幼孢囊时期, 幼孢囊内出现的白色颗粒为正在形成的石灰结 (图 3A, 3B), 此时幼孢囊内的原生质并未开始割裂 (图 3C); 当幼孢囊转变为浅淡黄色时 (图 3D), 石灰结布满整个幼孢囊 (图 3E), 此

时可见幼孢囊内原生质开始割裂 (图 3F), 出现圆球状的幼孢子雏形, 幼孢子颜色在透射光下与原生质一致; 当幼孢囊转变为淡红棕色时 (图 3G), 幼孢囊内幼孢子割裂完成 (图 3H), 成堆幼孢子在透射光下呈浅红棕色, 说明孢子壁开始形成, 此时幼孢子形状不规则 (图 3I); 当幼孢囊转变为红褐色时

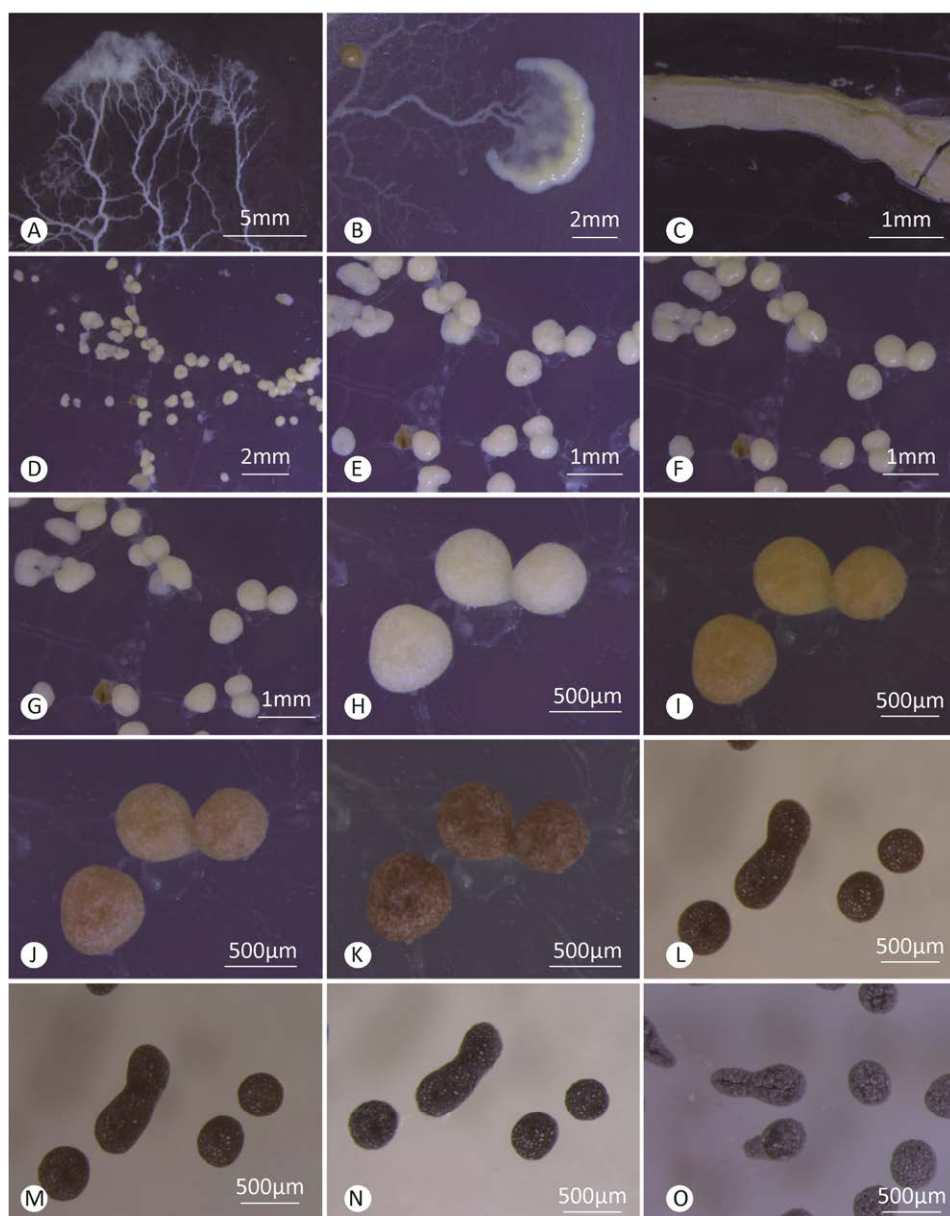


图 2 灰绒泡菌的原质团、菌核及其子实体形态建成 A, B: 原质团; C: 菌核; D-F: 孢囊形成期; G-O: 孢囊成熟期

Fig. 2 Plasmodium, sclerotium and sporulation of *Physarum cinereum*. A, B: Plasmodium; C: Sclerotium; D-F: Period of sporocarp formation; G-O: Period of sporocarp maturity.

(图 3J), 幼孢子呈规则圆球形, 幼孢子壁颜色加深 (图 3K, 3L); 当幼孢囊转变为深褐色时 (图 3M), 幼孢子呈现浅红褐色 (图 3N), 但此时幼孢子壁不坚固, 孢子轻压易破裂 (图 3O); 最后, 子实体完全成熟, 囊被开裂 (图 3P), 可见成熟的圆球形的孢子

和石灰结 (图 3Q, 3R)。在孢囊发育过程中, 幼孢囊内石灰结在原生质割裂形成孢子前已形成; 随着原生质割裂形成幼孢子以及幼孢子成熟, 幼孢囊颜色随之呈现由白色-浅淡黄色-浅红棕色-红褐色-深褐色的变化。

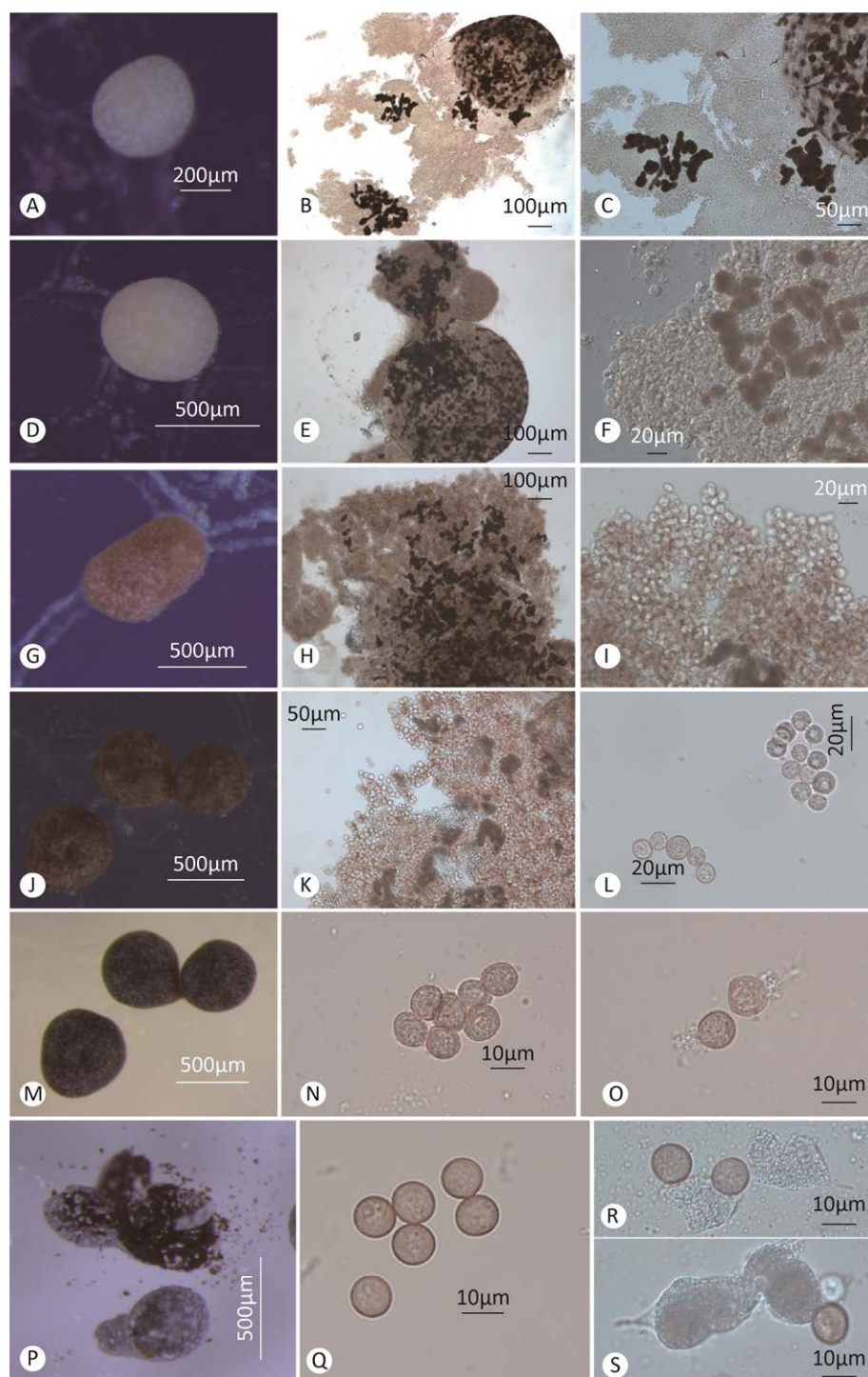


图 3 灰绒泡菌子实体发育不同阶段的显微结构 A—C: 白色幼孢囊及其显微结构; D—F: 淡黄白色幼孢囊及其显微结构; G—I: 浅红棕色幼孢囊及其显微结构; J—L: 红褐色幼孢囊及其显微结构; M: 黑褐色幼孢囊; N—O: 幼孢子; P: 成熟孢囊; Q: 孢子; R—S: 石灰结

Fig. 3 Microscopic structure formation at five developmental stages of *Physarum cinereum* during sporulation. A—C: White young sporocarp and its microstructure; D—F: Yellowish white young sporocarp and its microstructure; G—I: Reddish brown young sporocarp and its microstructure; J—L: Rufous young sporocarp and its microstructure; M: Black brown young sporocarp; N—O: Young spores; P: Mature sporocarp; Q: Spores; R—S: Lime knots.

### 3 讨论

Shen (1964) 描述灰绒泡菌 *P. cinereum* 的游动胞具有两根等长的鞭毛, 并且两鞭毛间呈现大于 90° 的角度。而在本研究中, 该种游动胞具一根明显的长鞭毛 (图 1G–1K), 鞭毛的数量与具体类型可能需要应用透射电镜进行详细的观察。Shen (1964) 采用半固体的玉米琼脂培养基来培养游动胞及黏变形体, 仅 3d 便观察到原质团。本研究在不添加无菌燕麦粉以及其他食物的水琼脂培养基上, 9d 后观察到原质团, 表明营养丰富的培养基有利于该种原质团的形成。

本研究观察到灰绒泡菌 *P. cinereum* 孢囊在发育过程中, 石灰结形成后原生质才开始割裂形成幼孢子, 这与李艳双等 (2011) 在扁绒泡菌 *Physarum compressum* 中观察到孢丝与孢子同时形成的结果不一致, 而与 Charles (1973) 发现小发网菌 *Stemonitis virginensis* 子实体发育过程中幼孢囊内原生质割裂在柄、囊轴和孢丝完全形成后才开始的结果以及徐晓琪等 (2021) 在小绒泡菌 *Physarum pusillum* 中观察到石灰结和孢丝先于孢子形成的结果相似。

在实验室条件下, 灰绒泡菌 *P. cinereum* 在 14–16d 便可完成生活史。在已报道生活史的绒泡菌属 *Physarum* 真黏菌中, 小绒泡菌 *P. pusillum* (Berk. & M.A. Curtis) G. Lister 生活史周期为 44d (Chen *et al.* 2013), 全白绒泡菌 *P. globuliferum* (Bull.) Pers. 为 40–96d (Liu *et al.* 2010), 黄头绒泡菌 *P. flavicomum* Berk. 为 40–45d, 淡黄绒泡菌 *P. melleum* (Berk. & Broome) Masee 为 25–30d (陶伟等 2017), 垂头绒泡菌 *P. album* (Bull.) Chevall. 为 40–45d (Gao *et al.* 2017), *P. atacamense* D. Wrigley, Lado & Estrada 为 36d (Wrigley de

Basanta *et al.* 2012), 扁绒泡菌 *P. compressum* 为 25d (史立平和李玉 2008), 圈绒泡菌 *P. gyrosum* Rostaf. 为 25d (史立平和李玉 2005), 多头绒泡菌 *P. polycephalum* 为 15d (史立平和李玉 2010), 细弱绒泡菌 *P. tenerum* Rex 为 25d (史立平和李玉 2007), 相比之下灰绒泡菌 *P. cinereum* 与多头绒泡菌 *P. polycephalum* 相似, 生活周期较短。

### [REFERENCES]

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Gall LL, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Muzky-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW, 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5): 429-514
- Charles WM, 1973. A light and electron microscopic study of sporulation in the myxomycete *Stemonitis virginensis*. *Protoplasma*, 77(1): 35-54
- Chen SL, Li Y, 1997. Review of culture and ontogenesis of myxomycetes. *Journal of Jilin Agricultural University*, 19(1): 105-111 (in Chinese)
- Chen X, Gu S, Zhu H, Li Z, Wang Q, Li Y, 2013. Life cycle and morphology of *Physarum pusillum* (Myxomycetes) on agar culture. *Mycoscience*, 54(2): 95-99
- Clark J, 1995. Myxomycete reproductive systems: additional information. *Mycologia*, 87(6): 779-786
- Dai D, Okorley BA, Li Y, Zhang B, 2019. Life cycles of *Myxogastria Stemonitopsis typhina* and *Stemonitis fusca* on agar culture. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 67: 66-75
- Dai D, Xu XQ, Wang SY, Liang Y, Li Y, Zhang B, 2019. The life cycle of *Myxogastria*. *Journal of Fungal Research*, 17(2): 116-124 (in Chinese)
- Gao Y, Tao W, Yan SZ, Chen SL, 2017. The life cycle of *Didymium laxifilum* and *Physarum album* on oat

- agar culture. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 64(4): 457-463
- Lado C, 2019. An online nomenclatural information system of Eumycetozoa. <http://www.nomen.eumycetozoa.com>
- Li Y, Li HZ, Wang Q, Chen SL, 2008. Flora fungorum sinicorum. Myxomycetes II. Science Press, Beijing. 33-34 (in Chinese)
- Li YS, Yu L, Wang XL, Li Y, 2011. Ultrastructural studies on sporulation of *Physarum compressum*. Mycosystema, 30(1): 138-141 (in Chinese)
- Liu P, Wang Q, Li Y, 2010. Spore-to-spore agar culture of the myxomycete *Physarum globuliferum*. Archives of Microbiology, 192(2): 97-101
- Shen YF, 1964. A study on the life cycle of *Physarum cinereum* grown in culture. Taiwan, 10(1): 63-71
- Shi LP, Li Y, 2005. Life cycle of *Physarum gyrosum*. Mycosystema, 24(2): 292-296 (in Chinese)
- Shi LP, Li Y, 2007. Life cycle of *Physarum tenerum*. Mycosystema, 26(2): 211-216 (in Chinese)
- Shi LP, Li Y, 2008. Life cycle of *Physarum compressum*. Mycosystema, 27(6): 894-900 (in Chinese)
- Shi LP, Li Y, 2010. Life cycle of *Physarum polycephalum*. Journal of Northeast Normal University (Natural Science Edition), 42(4): 106-110 (in Chinese)
- Tao W, Wang N, Yan SZ, Chen SL, 2016. A comparative study on ontogeny of four physaraceous species in laboratory culture. Mycosystema, 35(2): 138-146 (in Chinese)
- von Stosch HA, 1935. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Myxomyceten. Sexualität und Apogamie bei Didymiaceen. Planta, 23(5): 623-656
- Wrigley de Basanta D, Lado C, Estrada-Torres A, 2012. Description and life cycle of a new *Physarum* (Myxomycetes) from the Atacama Desert in Chile. Mycologia, 104(5): 1206-1212
- Xu XQ, Dai D, Wang SY, Li Y, Zhang B, 2021. Observation on the life cycle and microstructure during morphogenesis of the myxomycete *Physarum pusillum*. Mycosystema, 40(2): 387-394 (in Chinese)

### [附中文参考文献]

- 陈双林, 李玉, 1997. 粘菌的培养和个体发育研究评价. 吉林农业大学学报, 19(1): 105-111
- 戴丹, 徐晓琪, 王赛禹, 梁逸, 李玉, 张波, 2019. 真黏菌生活史研究概述. 菌物研究, 17(2): 116-124
- 李艳双, 于玲, 王晓丽, 李玉, 2011. 扁绒泡菌孢子形成过程超微结构. 菌物学报, 30(1): 138-141
- 李玉, 李慧中, 王琦, 陈双林, 2008. 中国真菌志黏菌卷二. 北京: 科学出版社. 33-34
- 陶伟, 王娜, 闫淑珍, 陈双林, 2016. 实验室培养条件下绒泡菌科四种黏菌个体发育比较研究. 菌物学报, 35(2): 138-146
- 史立平, 李玉, 2005. 圈绒泡菌的生活史. 菌物学报, 26(2): 292-296
- 史立平, 李玉, 2007. 细弱绒泡菌的生活史. 菌物学报, 24(2): 211-216
- 史立平, 李玉, 2008. 扁绒泡菌的生活史. 菌物学报, 27(6): 894-900
- 史立平, 李玉, 2010. 多头绒泡菌的生活史. 东北师大学报(自然科学版), 42(4): 106-110
- 徐晓琪, 戴丹, 王赛禹, 李玉, 张波, 2021. 小绒泡菌生活史及其形态建成期显微结构的观察. 菌物学报, 40(2): 387-394

(本文责编: 韩丽)