



普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

真菌生物学实验教程

李颖 李明春 主编 邢来君 主审

FUNGAL BIOLOGY
EXPERIMENTATION



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
微生物学实验教程系列

真菌生物学实验教程

李 颖 李明春 主编



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本教材由中国农业大学组织编写,汇集了各位参编教师多年教学积累的素材,并根据当前教学实际需要编写而成。本教材选择了代表性真菌的形态、生理、遗传学研究的特点,向读者展示了真菌(包括卵菌、黏菌)的多样性,以及当前对于它们形态、生态、生理生化、遗传学研究的技术,包括菌株的分离、纯化和鉴定,细胞的生长与发育,细胞自噬现象的检测,细胞 DNA 和 RNA 的快速提取及检测,真菌突变体构建的策略,外源基因在真菌中的表达及目的蛋白的分析等。同时收集了中国农业大学在真菌学实验教学中积累的与本实验教程密切相关的示范图例、录像和学名发音带录音等配套的资料,见科学出版社教学服务网站。

本书可供理、工、农、医学及师范类院校生物专业本科生、研究生使用,也可作为微生物学及相关领域研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

真菌生物学实验教程 / 李颖, 李明春主编. —北京: 科学出版社, 2014.6

微生物学实验教程系列 普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-041112-9

I. ①真… II. ①李… ②李… III. ①真菌-生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q949.32-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 129188 号

责任编辑: 刘 畅 / 责任校对: 邹慧卿
责任印制: 阎 磊 / 封面设计: 迷底书装

科 学 出 版 社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014 年 6 月第 一 版 开本: 720 × 1000 B5

2014 年 6 月第一次印刷 印张: 12 1/4 彩插: 4

字数: 251 000

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

微生物学实验教程系列编委会

主 委	任	李季伦	中国农业大学
	员	李季伦	中国农业大学
		陈文新	中国农业大学
		邢来君	南开大学
		陈冠军	山东大学
		赵良启	山西大学
		顾桂芬	中国农业大学
		楼慧强	中国农业大学
		何 群	中国农业大学
		李 颖	中国农业大学
		李大伟	中国农业大学
		王贺祥	中国农业大学
		封文海	中国农业大学
		宋 渊	中国农业大学
		袁红莉	中国农业大学
		文 莹	中国农业大学

《真菌生物学实验教程》编委会

主 编 李 颖 李明春

主 审 邢来君

参编名单（按姓氏汉语拼音排序）

胡启文 第三军医大学

李 颖 中国农业大学

李明春 南开大学

梁连铭 云南大学

田杰生 中国农业大学

王 瑜 中国农业大学

张国珍 中国农业大学

张金祥 吉林大学

总 序

中国农业大学生物学院微生物学科创建于 1958 年, 由原北京农业大学植保系和土化系的微生物学教研组合并组建而成, 是我国高等院校第一个农业微生物学专业。1981 年被国务院学位委员会列为第一批博士点, 1993 年被评为农业部重点学科, 2001 年被评为国家级重点学科。

本学科特色是研究、挖掘和利用丰富的微生物资源, 为农业生产服务。研究方向包括根瘤菌资源调查和系统发育学、固氮酶的生化机制及遗传调控、真菌生理及遗传学、药用及食用真菌学、微生物发酵工程、土壤和环境微生物学, 并在此基础上, 加强了微生物分子遗传, 增加了病毒学、免疫学和生物质能源等研究方向。1985 年, 原在植保系的微生物专业参与了中国农业大学生物学院的组建, 建立了微生物系, 于 2003 年更名为“微生物及免疫学系”。目前本系开设的本科生课程包括: 微生物生物学, 原核生物进化与系统分类学, 真菌生物学, 微生物生理学, 微生物遗传学, 微生物发酵工程, 食用菌学, 资源与环境微生物学, 病毒学及免疫学, 每门课程均有理论课和实验课。

本系俞大绂教授等老一代学者及多位已经退休的老师在微生物学教学思想、课程设置及团队建设等方面, 为学科发展做出了巨大的贡献, 也为后人的工作奠定了良好的基础。在教学中突出的特色是理论课程与实验课程的紧密结合, 特别是对于本专业入门的实验课程, 积极推进将“死标本”的观察转变为学生自行分离和观察活体标本, 使学生们从被动地接受知识转变为主动地参与学习, 有利于促进学生们掌握实验技能, 并锻炼思考和分析能力。这种教学理念和模式一直沿用至今。目前本系担任教学工作的是一支中、青年教师结合的队伍, 他们责任心强、思想活跃、虚心进取, 不断进行教学改革, 积极探讨在新的形势下, 如何正确解决“基础与创新”、“理论与实践”、“教学与科研”的关系, 认真履行着教师的职责。

本套实验教程的基本资料均来自教师们多年的积累。本系历来坚持教学与科研并重的原则, 在多年的发展过程中, 逐步规划将教师的科研方向与所承担的课程内容紧密相关, 保证教学内容中基础知识与前沿知识相结合, 很多实验设计出自任课教师的科研积累。大家齐心协力, 勇于创新, 不断更新实验教学内容, 使各门实验课程的教学工作一直受到学生的好评。

本系承担的 9 门本科生微生物学实验课程一直没有编写正式出版的教材。最近,

在大家的努力和领导的支持下，各位主编在近年完成实验课教学大纲修订的前提下，汇集了来自其他兄弟院校教师们的智慧，终于完成 9 本实验教程的编写，这是大家共同努力的结果。

衷心感谢南开大学邢来君教授、山东大学陈冠军教授、山西大学赵良启教授欣然接受我们的邀请，不仅为本套教材的审稿付出辛勤劳动，同时作为本套实验教程编委会成员，为保证教材的质量献计献策。感谢中国农业大学生物学院领导的支持和“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助，感谢来自兄弟院校全体参编教师们的认真合作。感谢科学出版社为编辑和出版本套教材所付出的努力。希望这套实验教程的出版，为本学科和相关学科读者的学习和工作带来有益的参考，也希望广大读者提出批评和建议，以便我们今后做出修改。



2014 年 1 月

前 言

真菌是地球生物圈中仅次于动物和植物的第三大类真核生物。无论是在人类探索生命的奥秘中还是在解决人类可持续发展的重大问题中,真菌像动植物一样是不可或缺的极为宝贵的自然资源。当今世界生物信息技术高速发展,学科之间的交叉已成为必然的发展趋势,由此而产生的新技术的问世为生物学家揭示生命本质的研究提供了良好的机遇。1996年,在欧洲、美国、加拿大和日本共96个实验室的633位科学家通力协作下,第一个真核生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的基因组测序完成,由此开创了生物基因组学的新纪元,也为深入研究真菌的生物学特性及促进医疗卫生、工业、农业、环境保护及能源开发等多个领域的发展带来了不竭动力。真菌作为真核生物的原始代表被推向生物技术的前沿,面对这种挑战,我国的真菌学科需要追赶国际先进水平,培养高层次创造型人才和产生高水平科研成果是真菌学科发展的关键。

为改变当前各院校真菌实验教学的松散状况,中国农业大学与南开大学等5所高校教师合作,本着宽口径、厚基础、着力培养人才的创新意识,提高创新思维能力,共同编写了《真菌生物学实验教程》一书。为我国真菌学科的教学发展做出了应有的努力,为培养我国真菌学科的优秀人才打下了坚实的实验技术基础,为通往真菌的神秘世界架起一座桥梁是本书编写者的共同心愿。

本书采用现代真菌研究的技术原理和方法,以真菌的形态分类、生理代谢及遗传变异的典型实验作为选材的指导思想,既强调了不同研究方法的理论意义,又详细描述了操作步骤,并对关键步骤做了重点提示,对主要设备原理及使用方法进行了简要说明。每个实验都提出问题供读者思考和讨论。本书还提供了目前公认并常用的真菌分类体系。中国高等真菌学科的开拓者和中国黏菌研究的奠基人、著名植物病理学家、教育家周宗瑛教授生前无偿赠予的黏菌子实体标本,我们已珍藏多年,借这次编写实验教程的机会,将部分黏菌拍摄成图片展现给读者。

本书选图有些由本课程教师和学生自行拍摄,除特殊说明外,还引用了《菌物学概论》(2002)、《半知菌图谱》(1980)等书的图例,已在书中说明。本教程实验一~实验六由李颖、田杰生编写,实验七由张国珍编写,实验八、实验十二、实验十五~实验十七由李颖编写,实验九~实验十一由李明春编写,实验十三、实验十四由张金祥编写,实验十八由王瑜编写,实验十九由梁连铭编写;实验二十由胡启文编写;一些模式真菌切片图和黏菌照片由田杰生和中国农业大学生物学院本科生李凝箫、孙媛等拍摄,全书由李颖和李明春统筹整理,由邢来君教授主审。此外,

本书配备的附加文件中还收集了本科生邓斯文、吴家曦、李妍、刘建新、张倩和韩宇明等同学自行分离和鉴定所得到的菌株信息、图片，有张一语同学自行培养及拍摄的水霉游动孢子录像，有典型真菌学名发音带读录音（见科学出版社教学服务网站 www.sciencep.com）。

本书的撰写得到了中国农业大学生物学院“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助；感谢现在法国工作的 Morris Cindy 博士、Philippe Nicot 博士和中国农业大学生物学院微生物及免疫学系王贺祥教授以标准纯正的英语和中文发音带读真菌学名；感谢中国农业大学电子显微镜室贾君镇老师和光学显微镜室周海鹰老师、梁丽萍老师分别提供了扫描电镜和冷冻切片样品的制备方法及图片；感谢科学出版社给予的全力支持与帮助。在此也向为本书编写提供实验材料和参加预试的中国农业大学生物学院博士研究生关菲菲、王贵利、黄金金、王旭及南开大学博士研究生喻其林和硕士研究生丁晓慧表示衷心感谢！

我们希望把教学中所用的资料信息提供给指导教师和学生，然而限于作者水平，仍然存在不足之处，望广大读者提出批评和建议，以便本书再版时做出修订。

编 者

2014 年 3 月

目 录

总序

前言

实验一 壶菌纲、卵菌纲代表菌形态特征观察	1
一、实验目的	1
二、实验原理	1
三、实验材料	1
四、实验内容及步骤	2
五、实验报告（作业）	11
六、思考题	11
七、参考文献	11
附：半永久装片的制作方法	11
实验二 接合菌门真菌的鉴定	12
一、实验目的	12
二、实验原理	12
三、实验材料	12
四、实验内容及步骤	12
五、实验报告（作业）	17
六、思考题	17
七、参考文献	18
附：培养水玉霉图示	18
实验三 子囊菌门代表菌形态特征观察	19
一、实验目的	19
二、实验原理	19
三、实验材料	19
四、实验内容及步骤	20
五、实验报告（作业）	28
六、思考题	28
七、参考文献	28
附：真菌的石蜡制片技术流程	29

实验四 担子菌门代表菌的形态特征观察	31
一、实验目的	31
二、实验原理	31
三、实验材料	31
四、实验内容及步骤	31
五、实验报告（作业）	38
六、思考题	38
七、参考文献	39
附：冷冻切片实验流程及注意事项	39
实验五 半知菌类代表菌形态特征观察	42
一、实验目的	42
二、实验原理	42
三、实验材料	42
四、实验内容及步骤	43
五、实验报告（作业）	48
六、思考题	48
七、参考文献	49
附：扫描电子显微镜样品制作及观察丝状真菌	49
实验六 黏菌基本形态特征的观察	51
一、实验目的	51
二、实验原理	51
三、实验材料	51
四、实验步骤	52
五、实验报告（作业）	53
六、思考题	54
七、参考文献	54
附：几种黏菌属种描述，请在体视显微镜下观察所提供的标本	54
黏菌子实体图例	55
实验七 丝状真菌细胞核的 DAPI 染色及观察	57
一、实验目的	57
二、实验原理	57
三、实验材料	57
四、实验步骤	58
五、实验报告（作业）	58
六、思考题	59
七、参考文献	59

附：荧光显微镜简介及使用步骤	59
实验八 酿酒酵母原生质体制备与再生	62
一、实验目的	62
二、实验原理	62
三、实验材料	62
四、实验步骤	63
五、实验报告（作业）	64
六、思考题	64
附：几种细菌过滤器及其使用	65
实验九 稻巨座壳菌自噬体的显微观察	66
一、实验目的	66
二、实验原理	66
三、实验材料	68
四、实验步骤	70
五、实验报告（作业）	71
六、思考题	71
七、参考文献	71
实验十 氧化胁迫诱导白假丝酵母细胞凋亡的荧光检测	72
一、实验目的	72
二、实验原理	72
三、实验材料	74
四、实验步骤	75
五、实验报告（作业）	76
六、思考题	76
七、参考文献	76
实验十一 丝状真菌疏水蛋白的分离提取和检测	77
一、实验目的	77
二、实验原理	77
三、实验材料	80
四、实验步骤	80
五、实验报告（作业）	83
六、思考题	83
七、参考文献	83
实验十二 丝状真菌 DNA 快速提取及其 18S rDNA 序列测定	84
一、实验目的	84
二、实验原理	84

三、实验材料	85
四、实验步骤	86
五、实验报告(作业)	88
六、思考题	88
七、参考文献	88
实验十三 丝状真菌总 RNA 及 mRNA 的提取与检测	89
一、实验目的	89
二、实验原理	89
三、实验材料	92
四、实验步骤	94
五、实验报告(作业)	96
六、思考题	96
七、参考文献	96
实验十四 细菌源耐热木聚糖酶基因在黑曲霉中的表达	98
一、实验目的	98
二、实验原理	98
三、实验材料	101
四、实验步骤	105
五、实验报告(作业)	107
六、思考题	107
七、参考文献	107
实验十五 脂肪酶基因在毕赤酵母中的表达与目的蛋白检测	108
一、实验目的	108
二、实验原理	108
三、实验材料	110
四、实验步骤	110
五、实验报告(作业)	113
六、思考题	113
七、参考文献	113
实验十六 真核细胞表达异源蛋白的糖基化修饰及检测	114
一、实验目的	114
二、实验原理	114
三、实验材料及试剂	116
四、实验步骤	116
五、实验报告(作业)	118
六、思考题	118

七、参考文献	118
实验十七 多拷贝异源基因重组表达体系的构建及其 qPCR 检测	119
一、实验目的	119
二、实验原理	119
三、实验材料	120
四、实验步骤	121
五、实验报告 (作业)	125
六、思考题	125
七、参考文献	126
附: 实时荧光定量 PCR 仪图示及其基本技术原理详解	126
实验十八 采用重叠 PCR 技术敲除粟酒裂殖酵母 <i>Clr4</i> 基因	128
一、实验目的	128
二、实验原理	128
三、实验材料	130
四、实验步骤	132
五、实验报告 (作业)	135
六、思考题	135
七、参考文献	135
实验十九 利用细菌 CRISPR/Cas 系统敲除酿酒酵母目的基因	136
一、实验目的	136
二、实验原理	136
三、实验材料	138
四、实验步骤	139
五、实验报告 (作业)	140
六、思考题	141
七、参考文献	141
实验二十 粗糙脉孢菌双基因缺失突变体的构建及双基因的遗传互作分析	142
一、实验目的	142
二、实验原理	142
三、实验材料	144
四、实验步骤	147
五、实验报告 (作业)	148
六、思考题	149
七、参考文献	149
附录 1 常用培养基配方及染色液	150

附录 2	安斯沃思 (Ainsworth, 1973) 的分类系统	159
附录 3	真菌词典第八版 (1995 年) 的分类体系	160
附录 4	真菌词典第九版 (2001 年) 的分类体系	161
附录 5	真菌词典第十版 (2008 年) 的分类体系	163
附录 6	互动实验室设备使用原则及方法 (学生端的使用)	165
附录 7	真菌常用网站	167
附录 8	常用真菌学名列表	169
附录 9	真菌图例	179
附录 10	黏菌子实体图例	185
附录 11	实验七和实验十彩图	186

实验一 壶菌纲、卵菌纲代表菌形态特征观察

一、实验目的

1. 学习培养低等卵菌纲真菌的技术。
2. 学习低等真菌的制片技术。
3. 观察所提供的真菌标本、示范片及自行培养的菌体特征，学会描述各种结构特征。

二、实验原理

壶菌门壶菌纲真菌和管毛生物界（Stramenopila，又称假菌界），卵菌纲真菌是一些形态结构由简单到复杂的低等真菌，目前虽然它们在分类地位上已经有较大区别，但在形态特征上有一些共同的特点。它们的营养体有多种类型，无性繁殖全部产生具有鞭毛的游动孢子，有性生殖产生合子或卵孢子。绝大多数水生，少数两栖、腐生、寄生和专性寄生。在早期的分类中，壶菌门属于鞭毛菌亚门，目前分类体系已经取消了这个亚门，因此，壶菌纲提升为壶菌门。

原来属于鞭毛菌亚门的卵菌纲真菌目前归属于原生生物（Protista）的管毛生物界。它们的主要特点是：①细胞壁主要为 β -葡聚糖和纤维素，而不是其他真菌特有的几丁质；②营养体通常为二倍体，而不是单倍体；③赖氨酸合成途径与植物类似，是二氨基庚二酸途径，而其他真菌为氨基己二酸途径；④有性生殖为雄器和藏卵器直接交配的卵配生殖，这在其他真菌中很少见；⑤卵菌 25S rRNA 分子质量、线粒体、高尔基体、细胞核膜及细胞壁超微结构均与其他真菌有较大差异，而与藻类更为相似。因此，在《真菌词典》第八版（1995 年）中首先将卵菌归属为藻物界（Chromista），目前已划归于管毛生物界的卵菌门（Oomycota），卵菌门只有一个纲——卵菌纲（Oomycetes）。

本实验选取几种典型的低等真菌为材料，使学生从分离培养、形态特征、无性生殖和有性生殖特点等方面对它们有所了解，特别是对于一些农作物的致病菌，需要明确它们在自然界的生活史。

三、实验材料

1. 示范片

蚕豆油壶菌（*Olpidium viciae*，油壶菌属）：半永久装片。

玉米节壶菌（*Physoderma zeae-maydis* 或 *Physoderma maydis*，又称玉米褐斑病菌，节壶菌属）：永久石蜡切片。

黄瓜拟霜霉（*Pseudoperonospora cubensis*，拟霜霉属）：半永久装片。

莴苣盘梗霉 (*Bremia lactucae*, 盘梗霉属): 半永久装片。

葡萄生单轴霉 (*Plasmopara viticola*, 又称葡萄霜霉病菌, 单轴霉属): 半永久装片。

狗尾草霜霉 (*Basidiophora* sp., 圆梗霉属): 半永久装片。

禾生指梗霉 (*Sclerospora graminicola*, 又称谷子白发病菌, 指梗霉属): 半永久装片。

致病疫霉 (*Phytophthora infestans*, 又称马铃薯晚疫病病菌, 疫霉属): 半永久装片。

白锈菌 (*Albugo candida*, 又称十字花科白锈菌, 白锈菌属): 永久切片。

2. 自行分离的活体培养物

自行分离的活体培养物分离和培养方法见下文, 自行制作水压片, 观察。

水霉 (*Saprolegnia* sp.) 及绵霉 (*Achlya* sp.)。

瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*)。

四、实验内容及步骤

请按下列顺序逐一观察、绘制或显微拍照, 记录并掌握每种真菌的形态特点。实验观察内容如下。

1. 壶菌纲 (Chytridiomycetes)

壶菌营养体形态变化较大, 较高等的开始有原始的丝状体, 无性繁殖产生后端具有单根尾鞭的游动孢子; 有性生殖最主要的方式是两个同型的游动配子交配形成合子, 本纲只有壶菌目 (Chytridiales) 中的少数成员寄生于高等植物而引起病害, 重要的有油壶菌属 (*Olpidium*) 和节壶菌属 (*Physoderma*)。

(1) 油壶菌属 (*Olpidium*)

蚕豆油壶菌 (*Olpidium viciae*): 观察从蚕豆病叶处挑取病斑制作的示范片, 该片为蚕豆油壶菌侵染后期的休眠孢子囊堆, 菌体内生, 没有菌丝, 整体产果形成孢囊。其生活史见图 1-1。

(2) 节壶菌属 (*Physoderma*)

玉米节壶菌 (*Physoderma maydis*): 此菌危害玉米叶鞘及叶片基部主脉, 使其呈紫褐色疮状隆起的病斑, 用针挑开病部表皮时, 可见大量黄褐色粉状物, 即病菌休眠孢子囊堆, 因此又称玉米褐斑病菌 (*Physoderma zeae-maydis*)。观察实验提供的切片, 仔细观察单个休眠孢子囊形态, 可以看到个别囊盖打开的情况, 区分与蚕豆油壶菌的差异。

如果从田间采集到感病的玉米病叶, 可按如下方法自行制片观察: 在载玻片上滴加一滴乳酸酚 (又称乳酚油), 用接种针挑取休眠孢子囊于乳酸酚液滴上, 盖上盖玻片镜检, 可见到扁球形金黄色休眠孢子囊, 有褐色的厚外壁, 在扁平的一面隐约可见裂纹。孢子囊萌发时, 自裂纹处开裂成盖, 释放游动孢子 (图 1-2)。