

# 一株野生食用菌的种类鉴定研究

刘贵巧<sup>1</sup>, 何华奇<sup>2</sup>, 王建明<sup>3</sup>

(1. 河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 063000; 2. 安徽科技学院 生命科学学院, 安徽 凤阳 233100;

3. 邢台现代职业技术学校, 河北 邢台 054000)

**摘要:**以 1 株来源承德的野生食用菌为试材, 研究了其生态环境、形态结构, 并从形态学角度对其进行了种类鉴定; 同时, 提取了其 DNA, 对其 ITS 序列进行了扩增、测序, 得到其分子鉴定的结果; 综合常规形态鉴定和基因序列鉴定, 对其进行了种类鉴定。结果表明, 该野生菌株为血红铆钉菇(*Chroogomphus rutilus*), 该研究结果为进一步开发其应用价值奠定了基础。

**关键词:**野生菌; 形态鉴定; 分子鉴定

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0118-04

我国是野生食用菌资源最丰富的国家之一, 据统计, 全世界已知的食用菌有 2 000 多种, 我国有近 1 000 种已被鉴定, 其中有 100 多种被驯化, 用于商业栽培的有 60 多种。近年来, 野生食用菌以其丰富的营养物质, 独特的风味特征和特殊的食药价值受到人们的喜爱和关注, 逐渐成为现代社会天然健康食品的主流<sup>[1]</sup>。河北省承德市是野生食用菌的主要产地之一, 据调查, 当地每年生产大量的野生食用菌, 主要种类有杏黄蘑、羊肚蘑、榛蘑、松蘑、草蘑、白草蘑、喇嘛张、黏窝头等, 还有许多不知名字的种类。但随着人们对野生食用菌过度地大量采集, 野生食用菌的种类及数量逐渐减少, 尤其是课题组发现的这种菌类, 数量极少。为了更好的了解、

保护、开发野生食用菌资源, 进行了这种野生菌的鉴定试验。目前野生菌的鉴定方法主要有 2 种, 第 1 种是常规的形态鉴定, 第 2 种是利用真菌的内转录间隔区 ITS (internal transcribed spacer) 基因序列鉴定<sup>[2-7]</sup>, 但 2 种方法均有一定的局限性, 基于此课题组用以上 2 种方法对其进行了种类鉴定, 以期为进一步研究其应用价值奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试野生食用菌(L-2011)采集于河北省承德市平泉县茅兰沟乡五家村。

供试试剂: 天根公司 DNA 提取试剂盒, 真菌通用引物由上海生工生物工程有限公司合成。

供试仪器: DYY-2C 型电泳仪(北京六一仪器厂); 凝胶成像系统(意大利 BIO-RAD 公司)。

**第一作者简介:**刘贵巧(1969-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为微生物与食用菌资源利用。E-mail: keli1966@sina.com.

**收稿日期:**2014-03-19

## Research on the Key Technology of Drying Process of *Punica granatum* L. Leaf Tea

AN Yu-hong<sup>1</sup>, REN Ting-yuan<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>2</sup>, HUANG Yan<sup>1</sup>, WU Yong<sup>1</sup>

(1. Agricultural Engineering Department, Bijie Vocational and Technical College, Bijie, Guizhou 551700; 2. Food College, Southwest University, Chongqing 400716)

**Abstract:** Taking *Punica granatum* L. leaf as material, referencing to modern green tea production and processing technology, the key technology in the manufacturing process of pomegranate leaf tea was studied. The results showed that, the influence of drying process on the quality of primary and secondary order of roasted *Punica granatum* L. leaf tea was twice baking green temperature > twice baking green time > pan firing temperature > thrice baking green time > thrice baking green temperature > pan firing time; the best drying of roasted *Punica granatum* L. leaf tea was: twice baking green temperature 85°C, twice baking green time 15 min, thrice baking green temperature 60°C, thrice baking green time 30 min, pan firing temperature 50°C, pan firing time 2.5 h.

**Key words:** *Punica granatum* L. leaf tea; drying process; weight grade method

## 1.2 试验方法

1.2.1 野生食用菌的生态环境调查 调查野生食用菌生长的地理位置,海拔高度,野生菌生长的时间、温度、温差、生长地的植被情况等<sup>[8-9]</sup>。

1.2.2 野生食用菌的采集及处理 2010年7月26日上午,在河北省承德市平泉县茅兰沟乡五家村南山阴面松林里采集到野生食用菌菌株 L-2011,用塑料袋包好带回放入冰箱冷藏室保存。

1.2.3 野生食用菌的形态鉴定 观察野生菌菌盖的形状、颜色、大小,菌柄的形状、颜色、粗细,菌柄内部的结构、质地,内菌幕、外菌幕的有无,菌托、菌环的有无,菌褶的颜色、形状等结构,显微观察菌褶的结构,然后参照文献<sup>[10]</sup>和<sup>[11]</sup>进行初步种类鉴定。

1.2.4 野生食用菌的分子鉴定 野生菌 DNA 提取:采用天根公司的试剂盒。将研钵洗净,用滤纸擦干,同时放入擦净的钢勺,然后放入酒精,点燃酒精灼烧,待火焰熄灭后,将其放入冰箱冷冻室预冷。取 700  $\mu\text{L}$  缓冲液 GP1 放入灭菌的 1.5 mL 的离心管中 65℃ 水浴加热(试验前在 GP1 中加入巯基乙醇,使其最终浓度为 0.1%)。将野生食用菌组织从冰箱冷冻室取出,于无菌区剥去菌盖表面菌皮,然后称取菌肉内部组织 0.2 g,放入灭菌冷却的研钵中,再加入预热的 700  $\mu\text{L}$  缓冲液 GP1 研磨,待其呈现粥状后,将混合物放入离心管,放在 65℃ 水浴锅中水浴 20 min,水浴过程中颠倒混匀 5~6 次。将水浴后的样品中加入 700  $\mu\text{L}$  氯仿,充分混匀,室温 12 000 r/min 离心 5 min。将所得上层水相装入吸附柱,加入 700  $\mu\text{L}$  缓冲液 GP2,充分混匀,室温放置 2 min。室温 12 000 r/min 离心 30 s,弃掉废液。加入 500  $\mu\text{L}$  缓冲液 GD,室温 12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液。加入 700  $\mu\text{L}$  缓冲液 PW,室温 12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液。加入 500  $\mu\text{L}$  缓冲液 PW,室温 12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液。然后加入洗脱缓冲液 TE 50  $\mu\text{L}$ ,室温放置 10 min,将吸附柱的柱体放入新的灭菌离心管的上面,12 000 r/min 离心 2 min,离心后收集到的液体即为 DNA 液体。野生菌 DNA 检测:琼脂糖采用 1% 浓度,电泳过程设定电压

124 V,电流 134 mA,功率 20 W,野生菌 DNA 样品加样量为 5  $\mu\text{L}$ ,电泳时间为 30 min,电泳结束,将胶片放到凝胶成像仪上观察结果。野生菌 ITS 序列扩增:用检测后的 DNA 样品在 PCR 仪上进行 ITS 序列扩增,采用真菌通用引物 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(引物由上海生工生物工程有限公司合成)。PCR 的扩增体系为:PCRmix 25  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  引物各 1  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 4  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu\text{L}$ ,反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为:94℃ 预变性 30 min;92℃ 变性 30 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;最后于 72℃ 补平 10 min,终止温度为 4℃<sup>[2-7]</sup>。野生菌 ITS 序列扩增结果检测:电泳过程中扩增样品加样量为 5  $\mu\text{L}$ ,重复 2 次,以 Marker 为对照,设定电压 124 V,电流 134 mA,功率 20 W,电泳 30 min 后,将胶片放到凝胶成像仪上观察结果。野生菌 ITS 序列扩增结果测序:将得到的野生菌扩增产物 50  $\mu\text{L}$  送往上海生工测序部测序

野生菌 ITS 序列分子鉴定:将获得的野生菌 ITS 序列,用 Blast 软件在 NCBI 上比对,通过相似系数确定鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生食用菌的生态环境调查结果

承德平泉县茅兰沟乡五家村位于河北省东北部。东经 118°21'03"~119°15'34",北纬 40°24'0"~40°40'17",该株野生食用菌经常于 7 月左右雨后出现,生长地一般为山高 500 m 左右的半山腰,常出现在山的阴坡、松树林,地面的植被常为羊胡子草、灌木丛(豆青)、蕨类,出菇温度为 20~30℃,温差 10~15℃,雨后 2~3 d 出菇,菇体长速较快,3~4 d 后成熟,5 d 后开始腐烂,遇到夏季高温季节容易生虫。

### 2.2 野生食用菌的形态鉴定结果

菌盖红色,斗笠状,直径 1.1~2.5 cm,菌肉肉红色,含大量红色素,菌褶红色,幼小菌体有内菌幕,子实体无明显菌环。菌柄直径 0.8~1.5 cm,长 3~14 cm,稍弯

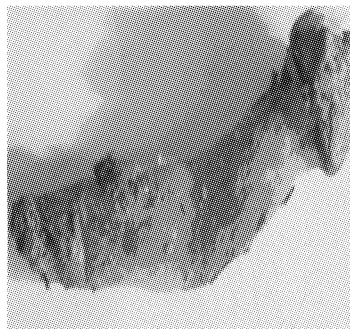


图 1 幼小完整野生菌

Fig. 1 The young wild mushroom





图2 幼小野生菌纵切面

Fig. 2 The slitting diagram of the young wild mushroom



图3 成熟野生菌菌柄横切面

Fig. 3 The cross-section diagram of the mature wild mushroom in stipe

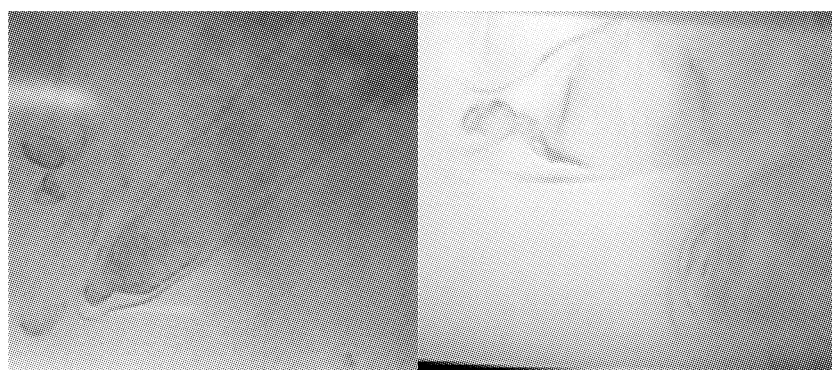


图4 显微镜下的野生菌孢子形成过程

Fig. 4 The formation process of wild mushroom spores under the microscope

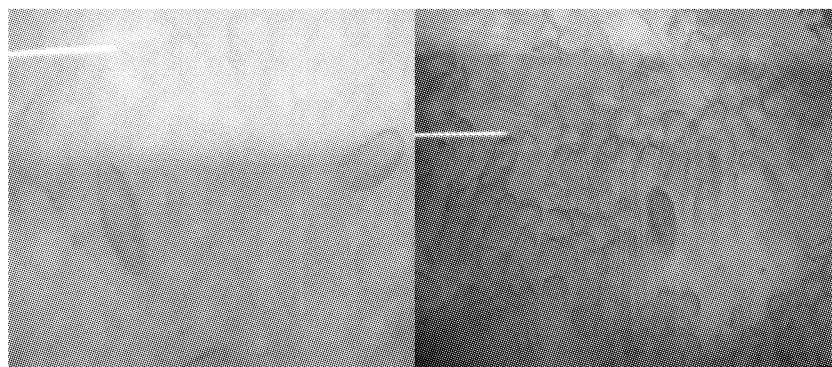


图5 显微镜下野生菌的孢子

Fig. 5 The wild mushroom spores under microscope

曲,下部淡黄色,上部黄褐色,肉质,内部松软,易内生白色小虫,孢子梭状,红褐色。查阅真菌鉴定相关文献、图片<sup>[10-11]</sup>,初步鉴定其可能为伞菌目、铆钉菇科、红铆钉菇属真菌(图1~5)。

### 2.3 野生食用菌 DNA 提取物电泳检测结果

提取的野生菌 DNA 带在凝胶成像仪器上出现明亮整齐的条带,表明所提取的 DNA 质量较好,可用于下一步试验。

### 2.4 野生食用菌 ITS 序列扩增结果

从图6可以看出,扩增产物电泳后在凝胶成像仪器上出现明亮整齐的单一条带,分子量大约在 700 bp 左右,基本符合 ITS 序列大小,可以进一步用于测序。

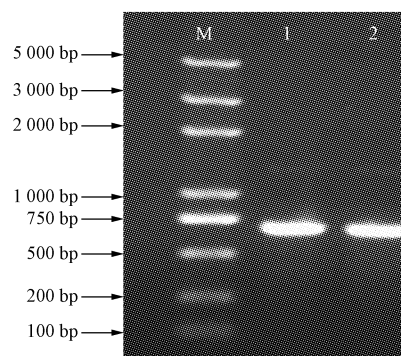


图6 野生菌 ITS 区段 PCR 产物电泳结果

注:M 为 DNA marker,1 和 2 为野生菌扩增产物。

Fig. 6 Electrophoresis of PCR amplification of ITS gene region from wild mushroom

## 2.5 测序结果及其序列分析

测序获得的野生菌 ITS 区域核酸序列如下:

```
GGGCAAGGATATTCGGTTCGACAGGAGGAGGGA
GCTGTCGCTGGCCTGCGTGGCATGTGCACGCTC
TCTTTGGATCGTCGATTGTCTTTTCATATCTTCAC
CAGTGCACCTAATGTAGGATGCCTCTCCTCCGG
GAGGGGGGACCTATGTCTTTTTTAGACACCTGC
AGTTTAGAAAGTCTCTGAATGTTTACTATCGTC
GAGCCACGACGTGGGTTCGGCGAGATAAAAGT
TATTACAACCTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTC
TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGAT
ATGTAATGTGAATTGCAGATCTACAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCCTCGGT
GTTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAGTA
AATTCTCAACCCCTCTCGATTAGCTTCGAGGGG
GAGCTTGGATAGTGGGGGCTGCCAGAGACCTG
GACCTTTGCGTCTGGGACTTGGGCTCTCCTGAA
ATGCATCGGCTTTCGATCGACTTTCGACTTTCG
GCGACAAGGCTTTCGGCGTGATAATGATCGCC
GTCTTCTGAAGCGCATGACAGAAGGTCTCGTGC
CTCCAACACGTCGACATCGCCTTCGATGTCTTC
CTTCTTTAAGGTTGAACCTCAATCCAGGAAGAA
TACCCCGTGAACCTAAACCATAACCATAACCGGG
AGAGA, 694 bp。
```

将获得的核酸序列输入 NCBI 网页,用 Blast 进行比对,在 98%相似系数中有 1 株核酸序列与其相似,查阅资料得知此为铆钉菇中的一个种类,学名为血红铆钉菇(*Chroogomphus rutilus*),编号是 HM049563,与形态鉴定结果相吻合。因此,鉴定该株野生菌为 *Chroogomphus rutilus*。

## 3 结论

野生菌如果单独利用形态鉴定存在一定的局限性,因为子实体形态、颜色会由于环境条件的变化而变化,如野生菌生长地二氧化碳浓度过高,野生菌菌柄就会长,菌盖变小,光照不足,野生菌颜色变浅;湿度过大野

生菌菌盖表面湿润粘滑,湿度过小野生菌出现鳞片、破裂等特征。因此鉴定野生菌最好的方法就是将形态鉴别与分子鉴别 2 种方法有机的结合。对于采于承德的野生食用菌的鉴定,其试验结论与文献报道基本一致<sup>[12-15]</sup>。

## 参考文献

- [1] 贺沛芳,杨怀民,张治家,等. 五台山野生食用菌资源营养价值及展望[J]. 中国食用菌,2010,29(3):7-9.
- [2] 付立忠,李海波,魏海龙,等. 四个红菇科菌株的 rDNA ITS 序列分析和系统发育研究[J]. 食用菌学报,2007,14(2):23-28.
- [3] 刘如翎,魏涛,何培新,等. 裸盖菇属的真菌鉴定及分子系统学初探[J]. 微生物学通报,2006,33(2):44-45.
- [4] O'Donnell K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusariumsambucinum* (Gibberellapulicaris)[J]. CurrGenet,1992,22:213-220.
- [5] Bruns T D, White T J, Taylor J W. Fungal molecular systematics[J]. Annu Rev Ecol System,1991,22:525-564.
- [6] Manian S, Sreenivasaprasad S, Bending G D, et al. Genetic diversity and interrelationships among common European *Suillus* species based on ribosomal DNA sequences[J]. FEMS Microbiology Letters,2001,204(1):117-121.
- [7] 刘芳,朱兵,于景丽,等. 分子标记对草原野生食用菌蒙古口蘑的鉴别分析[J]. 生物技术通报,2010(6):124-125.
- [8] 董化研,郝册,牛玉蓉,等. 血红铆钉菇生态学初步研究[J]. 中国农业通报,2010,26(7):191-194.
- [9] 陈青君,牛玉蓉,郝册,等. 北京山区油松林地菌根性食用菌发生规律[J]. 中国农业科学,2011,44(16):3377-3385.
- [10] 张光亚. 中国常见食用菌图谱[M]. 昆明:云南科技出版社,1999:71.
- [11] 刘旭东. 中国野生大型真菌彩色图鉴[M]. 北京:中国林业出版社,2004.
- [12] 张雪倩,孙红,王立安,等. 色钉菇粗多糖对小鼠 DA 能神经元 MPTP 损伤的保护作用[J]. 菌物学报,2011,30(1):77-84.
- [13] 李华,卫敏,薛龙龙,等. 血红铆钉菇子实体中化学成分类型及多糖含量[J]. 食用菌学报,2011,18(4):67-68.
- [14] 栾庆书,金若忠,云丽丽,等. 血红铆钉菇对土传病原菌抑菌性研究[J]. 辽宁林业科技,2005(6):13-14.
- [15] 黄艺,黄志基,范玲,等. 铆钉菇对重金属的耐性及其对油松分泌 TOC 的影响[J]. 农业环境科学报,2006,25(4):875-879.

## Research on Species Identification of a Wild Edible Mushroom

LIU Gui-qiao<sup>1</sup>, HE Hua-qi<sup>2</sup>, WANG Jian-ming<sup>3</sup>

(1. Agricultural College, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 063000; 2. School of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100; 3. Xingtai Modern Vocational Technical School, Xingtai, Hebei 054000)

**Abstract:** Taking a wild edible mushroom from Chengde as test material, the ecological environment and the morphological structure of it were studied in this experiment; meanwhile the species was determined from the perspective of morphology, molecular identification was done by extracting DNA and amplifying, sequencing ITS. Comprehensive regular morphology identification and sequencing ITS, species identification was conducted. The results showed that, it was *Chroogomphus rutilus* by the above two results. The results laid the foundation for developing its value of application.

**Key words:** wild edible mushroom; morphological identification; molecular identification