北方园艺 2016(22):152～156

DOI:10.11937/bfyy.201622038

# 两株野生紫色香蘑菌株的鉴定

姜　雪，庞惟俏，杨　洋，郭德军

（黑龙江八一农垦大学 食品学院，黑龙江 大庆 163319）

**摘　要**：以采自黑龙江省的2株野生紫色食用菌B5和BF8菌株为试材，采用形态学和分子标记方法，研究了不同香蘑的遗传多样性，以期为香蘑在分子水平鉴定和品种亲缘关系的分析提供依据。结果表明：B5和BF8子实体、菌丝的形态特征存在明显差异；2株菌株的28S rDNA高保守区序列和ITS序列的同源性分别为97.93%和89.84%。B5菌株鉴定为花脸香蘑（*Lepista sordida*）；BF8鉴定为紫丁香蘑（*Lepista nuda*），它们为同属不同种的2种食用菌。

**关键词**：香蘑；形态特征；分子鉴定

**中图分类号**：S 646.1+2　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2016)22－0152－05

我国食用菌资源较为丰富，普遍存在同物异名、异物同名的现象，造成了食用菌资源管理的混乱等一系列问题。传统鉴定方法主要通过子实体的宏观形态特征和微观结构来分类和鉴定，不易对一些未知种属食用菌进行分类鉴定。随着分子生物学的发展，很多学者利用分子技术对其遗传多样性加以补充进行综合鉴定[1]。如张京良等[2]利用ITS和5.8S系统分析鉴定了一株采自青岛崂山的真菌LS7为花脸香蘑。李晶等[3]通过菌丝体、子实体的形态学特征对一株大型野生食用菌进行了鉴定，又结合现代分子标记的方法对其ITS序列进行测定，最后在基因组数据库中进行比对确定其亲缘关系。

香蘑俗称花脸蘑。香蘑属由花脸香蘑、粉紫香蘑、紫丁香蘑的3个种组成。虽然这3种香蘑的形态有所差异，但是也有很多相同的形态特征。香蘑B5和BF8菌株的子实体在黑龙江当地都被称作“紫花脸蘑”，经常引起混淆，该研究通过传统鉴定方法及ITS和28S rDNA系统对2株野生香蘑进行了鉴定，并在NCBI中进行同源性检索和系统发育树构建，以期为基因水平上探讨野生香蘑食用菌的遗传多样性、亲缘性提供一定的依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　试验材料

1.1.1　供试菌株　2015年8月末，在齐齐哈尔市双河农场草原上和龙江县龙兴镇的一个小山阴面的柞树林里采集到2株菌种的子实体，在实验室进行组织分离、培养、获得菌种，分别编号为B5和BF8。用无菌接菌针将香蘑的组织块(4 mm×5 mm)接种到加有青霉素和链霉素(100 IU·mL$^{-1}$)双抗的PDA固体培养基上，25～27 ℃的培养箱中，避光培养，待菌丝长满整个斜面，4 ℃的冰箱中保存备用[4-7]。

1.1.2　供试培养基　PDA培养基：将配好的培养基试管分装，每管10 mL，置于115 ℃下灭菌20 min。

### 1.2　试验方法

1.2.1　形态学鉴定　观察2株野生香蘑B5和BF8子实体的大小，菌盖的形状、颜色、大小，菌柄的形状、颜色、长度、内部结构，菌褶的形状、颜色，用显微镜观察菌丝和孢子的结构，然后参照文献[8]和[9]初步鉴别分类。

1.2.2　分子鉴定　采用DNA提取试剂盒(柱式法)提取DNA，Thermo公司的Nanodrop仪器测定DNA浓度。采用真菌通用引物进行扩增，ITS1：5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′和ITS4：5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′为引物。扩增体系：总体积20 μL，成分10×PCR缓冲液2.5 μL，dNTPs 10 mmol·L$^{-1}$ 2.5 μL，引物5 μmol·L$^{-1}$ 0.5 μL，*Taq* 5 U·μL$^{-1}$ 0.15 μL，模板5 ng·μL$^{-1}$ 1.5 μL，ddH$_2$O 12.85 μL。PCR扩增反应程序是94 ℃预变性5 min，94 ℃变性30 s 10个循环，62 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s或者45 s，72 ℃反应5 min，4 ℃保存。将扩增好的DNA装好送往上海生物工程有限公司测定28S rDNA和ITS序列。

**第一作者简介**：姜雪(1991-)，女，硕士研究生，研究方向为食品微生物。E-mail:1455765089@qq.com.

**责任作者**：郭德军(1968-)，男，博士，教授，研究方向为食品微生物。E-mail:guodejun356@126.com.

**基金项目**：黑龙江八一农垦大学研究生创新科研资助项目(YJSCX2014-Y45)。

**收稿日期**：2016－08－04

利用 DNAMAN 软件，将已测得的 28S rDNA 和 ITS 序列在 NCBI 中通过 BLAST 检索比较，并构建其系统发育树[10-13]。

## 2 结果与分析

### 2.1 传统鉴定方法

2.1.1 子实体的形态 B5(图 1a)子实体较小，菌盖直径 2～4 cm，半球形至平展，中部有时稍下凹，湿润时呈淡紫色半透明状；边缘内卷，具有不明显的条纹，常呈波状，初采时浅丁香色，后褪为污白色；菌柄长 3～5 cm，粗 0.2～0.6 cm，圆柱形，与菌盖同色，靠近基部常弯曲、中实。菌褶(图 1b)直生至弯生，稀延生，不等长，淡紫色少稀。菌肉带灰白色、浅紫色。BF8(图 1c)子实体较大，菌盖直径 3.5～13.0 cm，半球形至平展，有时中部下凹，菌盖表面光滑，湿润，亮紫色至褐紫色，边缘内卷，无条纹。菌柄(图 1d)长 4～9 cm，粗 0.5～2.0 cm，圆柱形，初期上部有絮状粉末，下部具纵条纹，内部中空，基部稍膨大，不等长，同盖色。菌褶边缘小锯齿状，密，浅紫色。菌肉淡紫色，较厚。

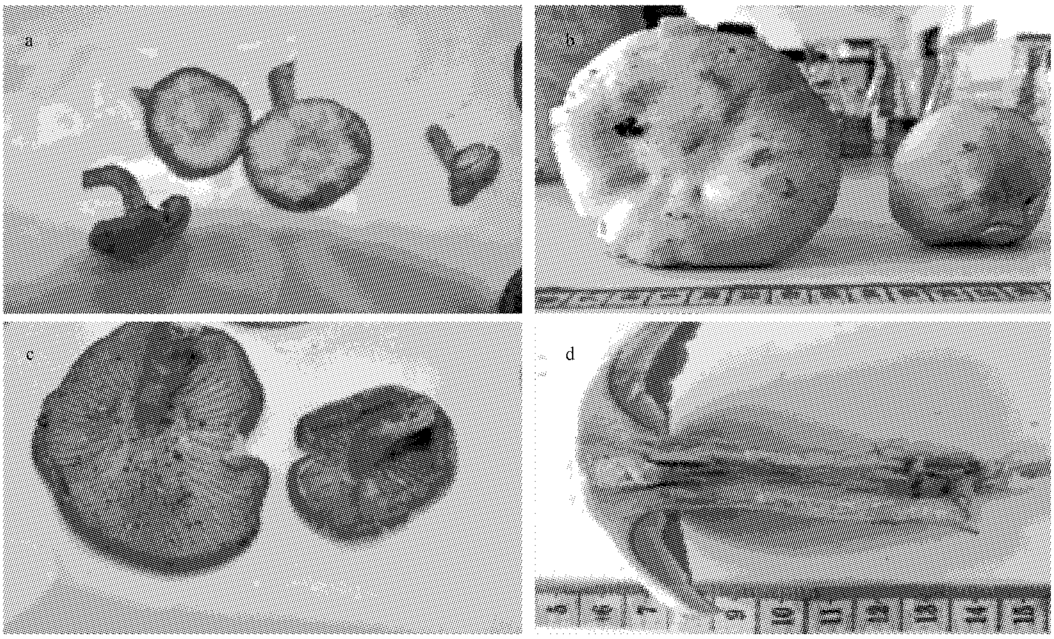

**图 1 2 株野生菌子实体**

Fig. 1 Fruit bodies of tow wild fruiting

2.1.2 菌丝的形态 B5 菌丝在 PDA 培养基上长势旺盛。菌丝较粗，分支多且茂密，爬壁能力较强；初为白色，培养 3～5 d 后菌丝内会产生色素，培养基转变成浅紫色，直至满斜面，绒毛状。在光学显微镜(40×10 倍)下观察发现，菌丝有隔和锁状联合(图 2a)。BF8 菌丝相对较细，分支少且稀疏，爬壁能力较弱；菌丝颜色为白色且不变色；显微观察菌丝有隔(图 2b)，有锁状联合。

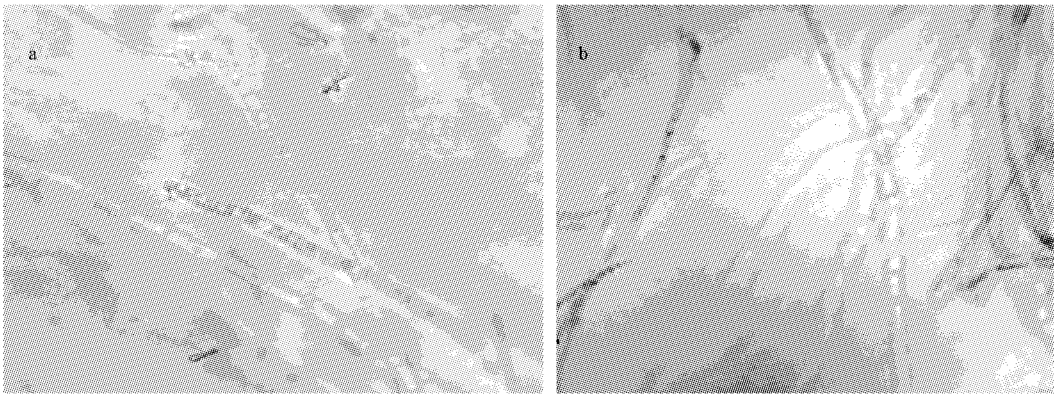

**图 2 2 株菌株的菌丝体形态**

Fig. 2 Mycelium forms of two strains

2.1.3　孢子的形态　2 株野生菌孢子印浅粉色，孢子为淡粉色，B5 的孢子近光滑，BF8 的孢子粗糙，均为椭圆或球形；孢子大小没有太大区别，分别为(5.0～9.8)μm×(3.2～5.0)μm，(6.1～10.8)μm×(3.5～5.3)μm，番红染色后均呈现浅红色。将 B5 和 BF8 菌株的子实体、菌丝和孢子的宏观及微观结构观察结果参照《中国野生大型真菌彩色图鉴》等相关图片[8-9]，参考查阅的食用菌鉴定相关文献[14-16]，初步鉴定 B5 可能为伞菌目、白蘑科、香蘑属的花脸香蘑；BF8 可能为伞菌目、白蘑科、香蘑属的紫丁香蘑。

2.2　分子鉴定

2.2.1　28S rDNA 扩增和 ITS 序列分析　28S rDNA 序列扩增的是 D1/D2 区域，图 3 测定结果表明，序列长度分别为 625 bp 和 627 bp，同源性高达 97.93%，该结果表明，B5 和 BF8 的亲缘关系比较接近，为同一属内的食用菌，也可能为同一种内的食用菌。ITS 序列扩增的是 ITS1 和 ITS2 区域，图 4 测定结果表明，序列长度分别为 647 bp 和 672 bp，同缘性达到 89.84%，表明 B5 和 BF8 的亲缘关系相对较远，为同属不同种的 2 种食用菌。

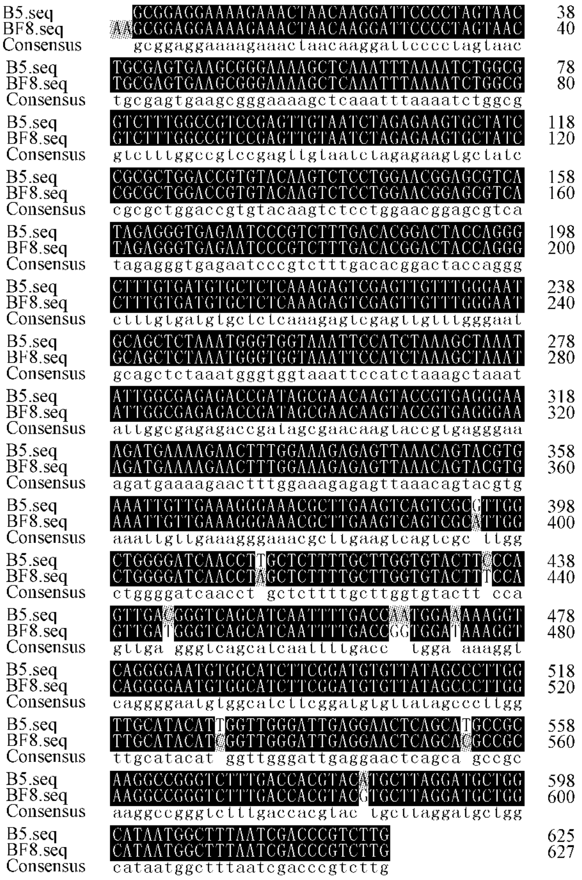

图 3　2 株菌的 28S rDNA 区碱基序列

Fig. 3　28S rDNA region nucleotide sequence of 2 strains

2.2.2　系统发育分析　分别利用 2 株野生香蘑菌株所测序列和 NCBI 数据库中 11 个最相近物种的 28S rDNA 和 ITS 序列构建系统发育树，并进行分析。28S rDNA 序列系统发育树显示(图 5)，与 B5 和 BF8 最相近的香蘑属(*Lepista*)内的 11 个菌株均聚在香蘑属内，分成一个类群。在这个类群中，B5 与花脸香蘑(*Lepista sordida*，JN649350.1)28S rDNA 序列同源性为 100%，BF8 与紫丁香蘑(*Lepista nuda*，FJ755225.1)28S rDNA 序列同源

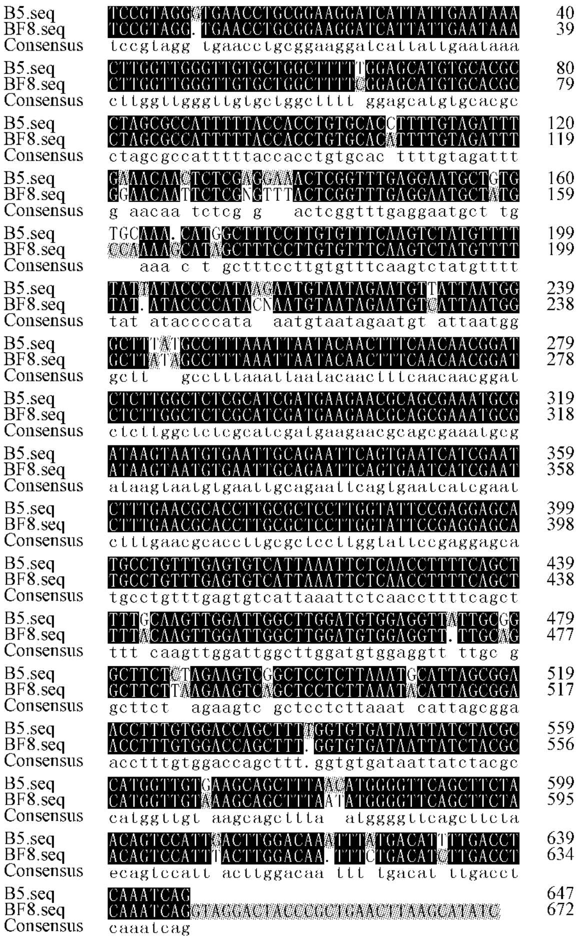

图 4　2 株菌的 ITS 区碱基序列

Fig. 4　ITS region nucleotide sequence of 2 strains

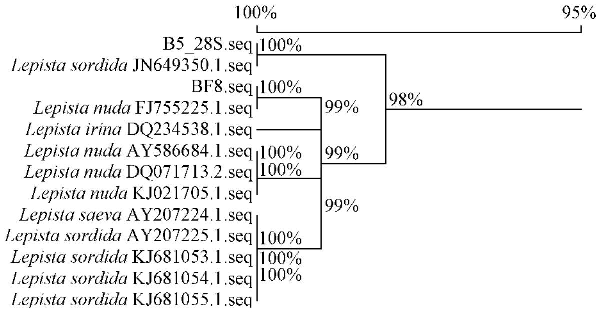


图 5　2 株菌的 28S rDNA 扩增序列构建的系统发育树

Fig. 5　Phylogenetic tree constructed with the nucleotide sequence of 28S rDNA regions of 2 fungi

性为 100%。图 6 ITS 序列系统发育树显示,与 B5 和 BF8 最相近的香蘑属(*Lepista*)内的 11 个菌株聚在其属内,分成 2 个种间的小类群。B5 菌株与花脸香蘑(*Lepista sordida* ) AF241523.1、AY534114.1、FJ428582.1、FJ501562.1 和 FJ770939.1 ITS 序列同源性为 100%;BF8 菌株与紫丁香蘑(*Lepista nuda*)FJ810154.1 ITS 序列同源性为 100%。通过对 B5 和 BF8 菌株 28S rDNA 扩增序列和 ITS 序列分析及系统发育分析,将结果与食用菌分子鉴定相关文献[17-18]进行比对,初步鉴定 B5 为伞菌目、白蘑科、香蘑属的花脸香蘑;BF8 为伞菌目、白蘑科、香蘑属的紫丁香蘑。分子鉴定结果与传统鉴定结果一致,其鉴定结果得到了相互佐证。

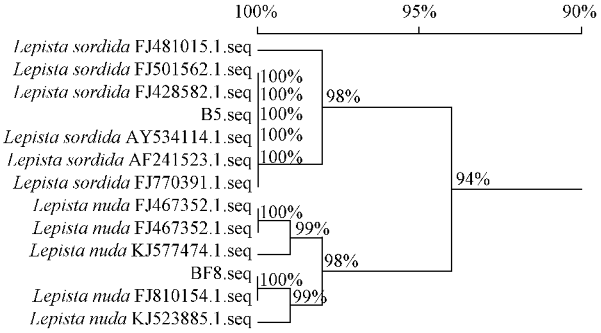


**图 6 2 株菌的 ITS 序列构建的系统发育树**

Fig. 6 Phylogenetic tree constructed with the nucleotide sequence of ITS regions of 2 fungi

## 3 讨论

食用菌形态学鉴定的优势主要是形态特征易于观察和比较,只要有子实体就可以进行;但也存在一些劣势,因为实验室保藏的菌种常以菌丝体形态存在,难以通过菌丝进行分类鉴定;还因为经验、子实体的相似性、自然条件等各种因素的影响,使得菌物分类者对它们的种属及亲缘关系进行鉴定时存在了一定差异,非常容易形成菌株同物异名、异物同名的现象,分子生物学技术却可以从基因水平上提供亲缘关系的佐证,近年来越来越多地被应用到食用菌分类中。

28S rDNA 高保守区序列一般可作为在真菌系统发育中种以上阶元的良好标记,不太适合在属内种间进行系统发育分析。如菌株 B5 和 BF8 的 28S rDNA 序列的同源性高达 97.93%,可能是同一种蘑菇,但最后鉴定的结果表明,它们是属于同属不同种的 2 种蘑菇。ITS 序列非常适合真菌同属内物种间或种内差异水平比较明显的菌群间的系统发育分析,具有对大型真菌菌种进行分子标记、基因鉴定的显著优势;如对野生香蘑属菌株(*Lepista*)[19]和点柄粘盖牛肝菌 (*Suillus granulatus*)[20]等外生菌根菌鉴定的应用。目前,从基因水平上对菌种进行 ITS 序列分析鉴定非常有意义,但是仅以 ITS 序列分析作为分类鉴定的标准尚不能完全被认可。对于大型真菌菌种进行分类鉴定,一般先通过孢子、菌丝和子实体的形态特征等传统鉴别方法来鉴别和分类,也再结合 ITS 序列分析鉴定,结果将会更加科学、可靠。

## 参考文献

[1] 刘贵巧,何华奇,王建明.一株野生食用菌株的种类鉴定研究[J].北方园艺,2014(12):118-121.

[2] 张京良,李蓉,江晓路.花脸香蘑 *Lepista sordida* LS7 的鉴定及其发酵液抗菌活性分析[J].食品与生物技术学报,2010,29(6):948-951.

[3] 李晶,林冬梅,林占熺,等.一种野生食用菌的分子及形态学鉴定[J].现代农业科技,2012(8):110-112.

[4] CHOI J H,ABE N,TANAKA H,et al. Plant-growth regulator,imidazole-4-carboxamide,produced by the fairy ring forming fungus *Lepista sordida*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58:9956-9959.

[5] 周峰,王瑞娟,李玉.珍稀食药用菌紫丁香蘑的研究进展[J].食用菌学报,2010,17(4):79-83.

[6] XIE F Q,LIN Y C,JIANG C J,et al. A preliminary cultivation study on valuable wild *Lepista sordida* by controling the artificial environmental factors in chamber room[J]. Journal of Fungal Research,2007(2):89-92.

[7] DENG G C,WANG J,ZHAO H,et al. Optimization of fermentation conditions of *Lepista sordida* mycelium[J]. Agricultural Biotechnology,2012,1(4):54-57.

[8] 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,2002:80-82.

[9] 戴玉成,图力古尔.中国东北野生食药用真菌图志[M].北京:科学出版社,2007.

[10] LEE Y S,KIM N W,KIM J B. Genetic variation based on random amplified polymorphic DNA(RAPD) and transcribed spacer (ITS) region sequences *Lepista nuda*[J]. Mycoscience,2012,22(11):1470-1476.

[11] LI D J,LIU Y,WANG P,MA Y W,et al. Development of SCAR markers to determine the mating types of *Lepista nuda* protoplast monokaryons [J]. Current Microbiology,2014,68:536-542.

[12] 唐庆明,邹莉,孙少辉,等.灰紫香蘑的分离纯化及 ITS 序列鉴定[J].安徽农业科学,2014,42(12):4192-4193,4201.

[13] HARTLEY A J,MATTOS-SHIPLEY K D,COLLINS C M,et al. Investigating pleuromutilin-producing *Clitopilus* species and related basidiomycetes[J]. Fems Microbiology Letters,2009,297:24-30.

[14] 卯晓岚.中国大型真菌[M].郑州:河南科学技术出版社,2000.

[15] GRAF L V,RUTH J G,DORLY F B. Morphological and cytochemical characterization of spores and gills of *Lepista sordida*(fungi:basidiomycota)[J]. Brazilian Journal of Microbiology,2008,39:599-601.

[16] JUNG W S,JONG B K. A study of morphological characteristics and hybridization on *Lepista nuda*[J]. Journal of Mushroom Science and Production,2013,11(1):1-8.

[17] 魏海莲,刘志曦,张婉,等.云南昭通野生紫丁香蘑群体的遗传多样性分析[J].北方园艺,2015(17):132-136.

[18] 邹莉,杨苑艺,孙婷婷,等.野生花脸香蘑的分离纯化及 ITS 序列鉴定[J].浙江农业学报,2016,28(2):264-268.

[19] 贾定洪,郭勇,郑林用,等.野生香蘑属菌株的 ITS 序列分析[J].食用菌,2010,32(1):21-23.

[20] 牛玉荣,王明花,张国庆,等.点柄粘盖牛肝菌菌种分子鉴定与最适培养条件研究[J].食用菌学报,2013,40(20):6-10.

DOI:10.11937/bfyy.201622039

# 不同来源黄芩种子比较及相关性分析

王峰伟，毛祝新，陈智坤，马延康，房丽君

(陕西省西安植物园 陕西省植物研究所，陕西 西安 710061)

**摘　要**：以从山西、甘肃、山东、河北、陕西收集的18份黄芩种子为试材，对其净度、千粒质量、发芽率、发芽势指标进行了对比研究，确定了黄芩种子的质量分级标准。结果表明：Ⅰ级黄芩种子的发芽率不低于80%，千粒质量不低于1.700 g，净度不低于95%；Ⅱ级黄芩种子的发芽率不低于70%，千粒质量不低于1.600 g；Ⅲ级种子的发芽率不低于60%，千粒质量不低于1.500 g，净度不低于80%。

**关键词**：黄芩；种子；质量分级标准

**中图分类号**：S 567.5⁺3　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2016)22－0156－04

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)属唇形科唇形属植物的干燥根，为我国著名中药材，味苦，性寒，具有清热燥湿、解毒、止血、安胎等功效[1-2]，广布于中国东北、华北、西北等地。其化学成分为黄酮类，包括黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等，具有抑菌、抗炎、抗肿瘤、提高免疫力等药理作用[3]。近年来，国内外市场对黄芩药材的需求量日增，各地的栽培面积迅速增大，其中河北、甘肃、山东、陕西等均有大面积栽培，但由于各地生态环境不同和药农引种时存在盲目性，导致栽培黄芩个体间性状差异较大、易形成变异类型、种质退化严重以及不同产地黄芩的有效成分具有显著差异。因此选择优良种子是栽培的关键[3]。该研究对收集的18份种子的净度、千粒质量和发芽势、发芽率进行了测定，制定了黄芩种子的质量分级标准。

**第一作者简介**：王峰伟(1975)，男，本科，助理研究员，现主要从事植物的引种栽培及病虫害防治等研究工作。E-mail:971519001@qq.com.

**基金项目**：陕西省科学院社会发展资助项目(2014K-18)。

**收稿日期**：2016－07－27

## 1　材料与方法

### 1.1　试验材料

18份黄芩种子分别收集于甘肃、山西、河北、陕西、山东等地，每份种子收集量约为1 kg。种子具体来源见表1。

### 1.2　项目测定

对黄芩种子的净度、千粒质量、发芽率进行测定。

1.2.1　净度分析　净度分析采用“徒手减半法”抽取试验样品[4]。黄芩种子送检样品的质量应超过90 g，净度分析试验中送检样品的最小质量为9 g(至少含有2 500粒种子单位)。由于黄芩2 500粒种子的质量约为4.5 g，所以净度分析时应从每份黄芩试样中分取2份全

## Identification of Two Wild *Lepista* Strains

JIANG Xue，PANG Weiqiao，YANG Yang，GUO Dejun

(School of Food Science，Heilongjiang Bayi Agricultural University，Daqing，Heilongjiang 163319)

**Abstract**：In order to provide an evidence at the molecular level about resources identification and genetic relationship analysis of *Lepista* mushroom. The study which used the method of the morphological features of culture and molecular markers were made to analyze the genetic diversity of different *Lepista* mushroom. The 2 *Lepista* mushrooms of B5 and BF8 collected from the Heilongjiang were used as experimental materials. The results showed that B5 and BF8 were significantly different in the fruiting bodies and mycelial characteristics. The homology of 2 the strains of 28S rDNA in highly conserved sequence and of ITS in moderately conserved region was 97.93% and 89.84%，respectively. In conclusion，B5 was *Lepista sordida* and BF8 was *Lepista nuda*，which belonged to different species in the same genera.

**Keywords**：*Lepista*；morphological features of culture；molecular identification