

doi:10.11937/bfyy.20165005

贺兰山紫蘑的分离、鉴定与培养条件

李 敏^{1,2}, 姚庆智^{2,3}, 魏 杰^{2,4}, 刘 洋^{2,3}, 李奕稹², 张 旋²

(1. 内蒙古师范大学 生命科学与技术学院, 内蒙古 呼和浩特 010022; 2. 内蒙古和盛生态科技研究院有限公司, 内蒙古 呼和浩特 011517; 3. 内蒙古农业大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 4. 内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘 要:从采集自内蒙古贺兰山青海云杉林下的紫蘑子实体中分离获得纯培养菌丝体, 结合形态学特征与 ITS 序列分析鉴定其分类学地位, 研究了菌丝生长的最适培养基、温度和 pH, 并结合其菌根菌特性, 进一步考察了宿主植物青海云杉根、枝、针叶浸提物对菌丝生长的影响。结果表明: *Cortinarius* sp. 菌株的 ITS 序列与 GenBank 中报道的采集于加拿大的 *Cortinarius rufoolivaceus* (GenBank 登录号为 FJ039645) 的 ITS 序列同源性最高, 为 98%, 结合其形态学特征, 确定该菌株为丝膜菌属(*Cortinarius* sp.) 真菌; 菌丝体生长的最适温度为 15~20 ℃, 最适 pH 为 5.5~6.0; 合适浓度的青海云杉枝及针叶浸提物对菌丝生长有显著的促进作用, 菌丝干质量最大分别达到(8.62±0.27)mg 和(6.93±0.27)mg, 分别比对照提高了 45.85% 和 17.26%。

关键词:贺兰山紫蘑; 分离; 鉴定; 培养条件

中图分类号: S 646.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2017)14-0169-06

丝膜菌属(*Cortinarius*)真菌广泛分布于世界各地^[1-2], 是一类重要的菌根菌资源, 该属真菌中 90% 的种能与云杉、冷杉、板栗、高山松等形成外生菌根, 在森林生态系统中发挥着重要的作用^[3-5]。

贺兰山紫蘑(以下简称紫蘑)是对青海云杉林下的数种丝膜菌的统称, 属于菌根菌, 主要包括以下 4 种: 紫红丝膜菌(*Cortinarius rufo-olivaceus*)、蓝丝膜菌(*C. caerulescens*)、白丝膜菌(*C. albidus*)和朱红丝膜菌(*C. cinnabarinus*)。贺兰

山当地共有 200 余种大型真菌^[6], 而紫蘑是其中最具有营养价值、口感最好的蘑菇, 生长在海拔 2 000~3 000 m 的青海云杉林带。紫蘑是贺兰山特有的一种名贵野生大型食用真菌资源, 味道鲜美、营养丰富。近年来, 由于生态环境的破坏及过度采集, 紫蘑野生资源逐渐枯竭, 而市场需求逐年增加, 其野生资源已无法满足需要, 紫蘑的人工驯化栽培势在必行。目前对其研究报道主要集中在子实体化学成分的研究^[7-8]、紫蘑多糖的分离纯化^[9]及其抗氧化活性^[10-12]和抗肿瘤活性^[13]等方面, 这些研究都是以野生子实体为材料开展的。由于子实体的野生产量极其有限, 价格昂贵, 如果不能实现该菌菌丝或子实体的人工培养, 则开展这些研究工作的意义也不大。如果能以人工培养的菌丝体为材料进行研究及开发应用, 最终实现紫蘑的人工栽培, 可以有效减缓紫蘑野生资源供不应求的局面。而目前几乎没有关于贺兰山紫蘑菌丝体的纯培养条件的报道, 对菌丝液体发酵培养的研究更是空白, 因此对紫蘑优良菌株的筛选和纯培养条

第一作者简介:李敏(1979-), 女, 博士, 讲师, 现主要从事菌根食用菌及应用微生物等研究工作。E-mail: limin_8123@126.com.

责任作者:姚庆智(1974-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事菌根真菌等研究工作。E-mail: yaoqingzhi@163.com.

基金项目:内蒙古自治区高等学校科学研究资助项目(NJZY16043); 呼和浩特市科技计划资助项目(2015-重社-1)。

收稿日期:2017-02-22

件的深入研究具有重要的理论与实践意义。

该研究从贺兰山自然保护区青海云杉林下采集野生紫蘑,通过组织分离法获得紫蘑菌丝体纯培养物,通过分子鉴定的手段并结合形态学鉴定确定其分类学地位;从基本培养基的筛选、最适温度、最适 pH 以及结合其菌根菌特性,研究其共生宿主植物青海云杉根、枝及针叶浸提物对菌丝生长的影响,以期对紫蘑的进一步深度开发利用奠定理论和试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫蘑(*Cortinarius* sp.)子实体于 2013 年 8 月采集自内蒙古贺兰山国家级自然保护区青海云杉林下,由内蒙古师范大学生命科学与技术学院分离、鉴定并保藏。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,pH 7.0~7.2,蒸馏水 1 000 mL。

Pach 培养基:葡萄糖 20 g,酒石酸铵 2.5 g,硫酸镁 0.5 g,磷酸二氢钾 1 g,麦芽汁 15 mL,柠檬酸铁 3 mL,微量元素 1 mL,0.4%维生素 B₁ 1 mL,琼脂 18 g,pH 6.0,蒸馏水 1 000 mL。

SRG 培养基:马铃薯 100 g,葡萄糖 15 g,红糖 5 g,麦芽汁 20 mL,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.5 g,蛋白胨 1 g,氯化铵 1 g,维生素 B₁ 0.15 g,琼脂 18 g,pH 6.0,蒸馏水 1 000 mL。

PTT 培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 2 g,磷酸氢二钾 1 g,磷酸二氢钾 0.5 g,维生素 B₁ 0.15 g,硫酸镁 0.5 g,琼脂 18 g,pH 6.0,蒸馏水 1 000 mL。

MF 培养基:20%麦麸煮汁 1 000 mL,葡萄糖 20 g,磷酸二氢钾 3 g,硫酸镁 1.5 g,pH 6.0,蒸馏水 1 000 mL。

MMN 培养基配方如下:葡萄糖 10 g,麦芽汁 10 mL,蛋白胨 2 g,磷酸氢二铵 0.25 g,磷酸二氢钾 0.5 g,硫酸镁 0.15 g,柠檬酸 0.2 g,氯化钙 0.5 g,氯化钠 0.025 g,氯化铁 0.012 g,维生素 B₁ 0.001 g,pH 6.0,蒸馏水 1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的分离与培养

采用组织分离法,将子实体表面用 75%酒精消毒,于超净工作台内沿菌柄处撕开,以手术刀从

菌柄和菌盖交界部位挑取 0.2 cm² 大小的组织块,接种于 PDA 培养基平板中央,置于 20 ℃恒温培养箱中培养。待菌丝萌发后在 PDA 培养基上连续转接 2~3 次,最后将获得的菌丝体纯培养物转入 PDA 斜面中保藏备用。

1.2.2 ITS 序列分析

菌丝体总 DNA 提取采用 CTAB 法^[14]。ITS 序列扩增参考 WANG 等^[15]的方法。引物 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应体系采用 25 μL 体系。PCR 产物利用 0.8%琼脂糖凝胶检测与回收后,由上海生物工程有限公司测序。将所测得的 ITS 序列提交到 GenBank 核酸序列数据库,并通过 NCBI 在线 BLAST N 检索,与 GenBank 中的 IST 基因序列进行同源性比较。利用 ClustalX 软件对所得序列进行多序列联配分析,通过 MEGA 5.1 软件采用相邻连接法(Neighbor-Joining,NJ)构建系统发育树,对构建的系统发育树进行自检(Bootstrap),重复设定为 1 000 次。

1.2.3 基本培养基的筛选及测定方法

分别以 PDA、Pach、SRG、PTT、MF、MMN 作为基本培养基,在各平板中央接种大小一致的菌落一块,20 ℃恒温培养箱中避光培养 15 d 后,测量菌落直径,计算菌丝体日均生长速度。同时采用干质量法测量菌丝生物量,将单菌落从培养基中取出,在沸水中将残留的培养基溶化、洗去,蒸馏水冲洗数次后,在 80 ℃恒温条件下烘干至恒重。每处理 3 次重复。

1.2.4 温度对菌丝生长的影响

以 SRG 为基本培养基,调节 pH 5.5,接种平板后分别置于 10、15、20、25、30、35 ℃条件下培养,15 d 后测量菌落直径和菌丝干质量,每处理 3 次重复。

1.2.5 pH 对菌丝生长的影响

以 SRG 为基本培养基,分别调节培养基 pH 至 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,接种平板后置于 20 ℃条件下培养,15 d 后测量菌落直径和菌丝干质量,每处理 3 次重复。

1.2.6 青海云杉根、枝及针叶浸提物对菌丝生长的影响

分别取 6.5 g 青海云杉的根、枝及针叶,切碎

后煮沸 30 min,所得滤液定容至 100 mL,与 SRG 培养基按不同比例混合(表 4)后分装、灭菌、倒平板,置于 20 ℃条件下培养。以 SRG 培养基(1 : 0.0)作为对照。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 16.0 统计软件分析处理。

2 结果与分析

2.1 基于 ITS 序列的菌株鉴定

经 PCR 扩增和序列测定, *Cortinarius* sp. 菌株的 ITS 序列长度 660 bp。该序列与 GenBank 中报道的采集于加拿大的 *Cortinarius rufoolivaceus* (GenBank 登录号为 FJ039645) 的 ITS 序列

同源性最高,为 98%,见图 1。结合其形态学特征,确定该菌株为丝膜菌属(*Cortinarius* sp.)真菌,命名为 *Cortinarius* sp. LM-1。

2.2 不同培养基对菌丝生长的影响

由表 1 可知,不同培养基对菌丝的生长有显著影响,菌丝在供试的 6 种培养基中均能生长。SRG 培养基中,菌丝生长速度与菌丝干质量均最大,为菌株 *Cortinarius* sp. LM-1 的最适培养基;菌株在 PDA 培养基中生长也较好,菌丝干质量与 SRG 培养基无显著性差异;在 MF 培养基中生长最差,菌丝生长速度与菌丝干质量均最小。因此,后续试验均以 SRG 培养基作为基本培养基。

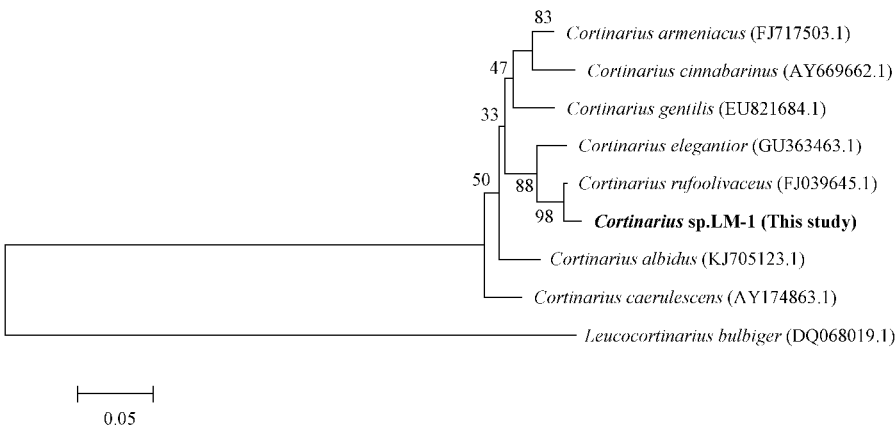


图 1 基于 ITS 序列基础上的 *Cortinarius* sp. LM-1 与其它丝膜菌的系统发育分析

Fig. 1 Polymeric analysis of *Cortinarius* sp. LM-1 and other Cortinariaceae species based on their ITS sequences

表 1 不同培养基对菌丝生长的影响

Table 1 Effect of different medias on mycelial growth

培养基 Medium	菌丝生长速度 Mycelial growth rate /(mm · d ⁻¹)	菌丝干质量 Dry weight of mycelia/mg
SRG	1.65±0.02a	5.8±0.26a
PDA	1.53±0.07b	5.3±0.36ab
PTT	1.42±0.05c	5.2±0.45b
MMN	1.39±0.03c	4.6±0.10b
Pach	1.23±0.03d	3.9±0.26c
MF	1.02±0.07e	3.8±0.40c

注:不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同。

Note; Different lowercase letters mean significant differences (P<0.05). The same below.

2.3 温度对菌丝生长的影响

由表 2 可知,温度对菌株 *Cortinarius* sp.

LM-1 菌丝生长有显著的影响。菌丝在 10~25 ℃条件下均能生长,30 ℃以上时无生长迹象。在 15~20 ℃范围内菌丝生长速度与菌丝干质量均较大,并且在这 2 个温度培养时无显著性差异,

表 2 温度对菌丝生长的影响

Table 2 Effect of different temperatures on mycelial growth

温度 Temperature /℃	菌丝生长速度 Mycelial growth rate /(mm · d ⁻¹)	菌丝干质量 Dry weight of mycelia/mg
10	1.04±0.02b	3.5±0.43b
15	1.70±0.07a	5.9±0.62a
20	1.68±0.04a	5.9±0.17a
25	0.52±0.08c	1.9±0.45c
30	0.00±0.00d	0.0±0.00d
35	0.00±0.00d	0.0±0.00d

因此,菌株 *Cortinarius* sp. LM-1 菌丝培养的最适温度范围为 15~20 ℃。在温度低于 15 ℃和高于 20 ℃时菌丝生长均较差。考虑到培养条件控制的难易程度及从经济角度出发,后续试验的培养温度均设为 20 ℃。

2.4 pH 对菌丝生长的影响

由表 3 可知,pH 对菌株 *Cortinarius* sp. LM-1 菌丝生长有显著的影响。菌丝在 pH 4.5~7.0 条件下均能生长,在偏酸性范围内时生长更好。在 pH 5.5~6.0 范围内,菌丝生长速度与菌丝干质量均较大,且二者间无显著性差异,但与其它 pH 存在显著性差异,因此菌株 *Cortinarius* sp. LM-1 菌丝培养的最适 pH 范围为 5.5~6.0。

表 3 pH 对菌丝生长的影响

Table 3 Effect of different pH on mycelial growth

pH	菌丝生长速度 Mycelial growth rate /(mm·d ⁻¹)	菌丝干质量 Dry weight of mycelia/mg
4.5	1.07±0.04d	3.5±0.26d
5.0	1.43±0.07bc	5.1±0.26b
5.5	1.60±0.11ab	5.5±0.36ab
6.0	1.69±0.11a	5.9±0.26a
6.5	1.35±0.11c	4.3±0.10c
7.0	0.81±0.10e	2.6±0.45e

表 4

不同浸提物对菌丝生长的影响

Table 4 Effect of different extraction on dry weight of mycelia

浸提物浓度 Extraction concentration	枝浸提物 Branch extraction	菌丝干质量 Dry weight of mycelia/mg 针叶浸提物 Coniferous extraction	根浸提物 Root extraction
1:0.0	5.91±0.13d	5.91±0.13b	5.91±0.13ab
1:0.5	6.54±0.20c	6.11±0.17b	6.08±0.12a
1:1.0	7.70±0.23b	6.21±0.06b	6.02±0.14a
1:1.5	8.53±0.26a	6.93±0.27a	5.57±0.33b
1:2.0	8.62±0.27a	6.85±0.37a	5.15±0.16c
1:2.5	6.86±0.33c	5.13±0.13c	4.34±0.24d
1:3.0	6.61±0.25c	4.32±0.11d	4.15±0.14d

3 讨论

对微生物的鉴定除采用传统的形态学方法外,利用 ITS 区段的 DNA 序列进行鉴定也是一种比较精确的鉴定方法,近年来该方法已成熟地应用于对外生菌根真菌的鉴定及亲缘关系的研究

2.5 不同浸提物对菌丝生长的影响

由表 4 可知,不同浓度的青海云杉枝浸提物对菌株 *Cortinarius* sp. LM-1 菌丝生长有显著的影响。不同浓度的青海云杉枝浸提物对菌丝的生长均有显著的促进作用,当浸提物浓度在 1:1.5~1:2.0 浓度范围内时,对菌丝生长的促进作用最大,菌丝干质量分别达(8.53±0.26)mg 和(8.62±0.27)mg,比对照分别提高了 44.33% 和 45.85%。当添加浸提物浓度<1:1.5 和>1:2.0 时,与对照相比(为 1:0.0 组,即 SRG 培养基)对菌丝生长也有显著的促进作用,但促进作用显著低于在 1:1.5~1:2.0 浓度范围内。

由表 4 还可知,不同浓度的青海云杉针叶浸提物对菌丝的生长也有显著的影响,当浸提物浓度在 1:1.5~1:2.0 浓度范围内时,对菌丝生长有显著的促进作用,菌丝干质量分别达到(6.93±0.27)mg 和(6.85±0.37)mg,比对照提高了 17.26% 和 15.91%;而浸提物添加浓度≥1:2.5 时,对菌丝生长有显著的抑制作用;浸提物添加浓度≤1:1.0 时,对菌丝生长没有显著的影响。

由表 4 进一步看出,不同浓度的青海云杉根浸提物对菌丝的生长也有显著的影响,当浸提物浓度在 1:0.5~1:1.0 浓度范围内时,对菌丝生长没有显著的影响,而当添加浸提物浓度≥1:2.0 时,对菌丝生长有显著的抑制作用。

中^[16-17]。根据该菌株的 ITS 序列分析与比对结果,GenBank 中报道的该种与来源于加拿大的 *Cortinarius rufoolivaceus* (GenBank 登录号为 FJ039645)的 ITS 序列同源性最高,为 98%;同时结合其形态学特征,鉴定该菌株为丝膜菌属(*Cortinarius*)真菌,命名为 *Cortinarius* sp. LM-1。

菌根食用菌菌丝体的纯培养是目前公认的一个难题,很多菌根食用菌至今无法实现纯培养,部分可以纯培养的菌根食用菌也面临着菌丝生长缓慢的现状。而实现菌丝的纯培养是开发应用菌根菌的前提条件,因此目前对于菌根菌的培养条件的探索开展的工作很多,如李敏等^[18]对菌根食用菌褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus*)的液体发酵条件进行了系统的研究,最终菌丝体的液体发酵产量达到 $12.56 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (干质量),突破了该菌在液体培养条件下生长缓慢甚至不能生长的瓶颈问题。牛玉蓉等^[19]对菌根食用菌点柄粘盖牛肝菌(*Suillus granulatus*)的营养条件进行了研究,确定了其最适 C、N 源和培养温度及 pH。冀瑞卿等^[20]对 3 种菌根食用菌红汁乳菇(*Lactarius hatsudake*)、点柄乳牛肝菌(*Suillus granulatus*)和美味牛肝菌(*Boletus edulis*)的培养条件进行了优化,确定了最优培养基及培养条件。而对贺兰山紫蘑(*Cortinarius* sp.)的菌丝体的纯培养及液体发酵方面目前尚鲜见报道,这可能也和该属真菌的纯培养难度较大有关,也是目前制约其进一步开发利用的瓶颈问题。该研究也对菌丝体的液体培养技术进行了研究,菌丝在液体摇瓶中培养生长较好,结果另文报道。对菌丝平板培养的研究结果表明,菌株 *Cortinarius* sp. LM-1 菌丝体生长的最适温度为 $15 \sim 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。而大多数菌根菌的最适生长温度在 $25 \sim 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[8],显然比大多数菌根菌的最适生长温度略低。这也与该菌的出菇实际情况相符,贺兰山地区昼夜温差大,在 9—10 月仍可出菇,而此时平均气温已接近 $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。菌株 *Cortinarius* sp. LM-1 菌丝体生长的最适 pH 为 $5.5 \sim 6.0$ 。适宜于在酸性环境中生长,这与大多数的菌根菌的培养 pH 范围相似。考虑到菌根真菌的侵染有助于促进宿主植物的生长及提高其抗逆性,因此,在受损生态系统的恢复过程中,除了考虑植物本身的特点外,也需要结合地下微生态环境考虑,在了解菌根菌的生态习性的基础上,为菌根菌及根际微生物的生长繁殖创造良好的环境条件,从而有利于宿主植物的健康生长,这也是该研究的意义之一。

研究表明植物根系分泌物可以促进土壤真菌的繁殖^[21-22]。赵慧英等^[23]将外生菌根真菌土生空团菌(*Cenococcum geophilum*)与虎榛子愈伤组

织共培养后发现,虎榛子愈伤组织细胞可以明显促进菌丝的萌发和生长,但究竟有哪些物质在起作用还在进一步的研究中。曹凤娟等^[24]的研究表明,土生空团菌与萝卜种子共培养,或将萝卜根系分泌物和幼苗提取物加入到培养基中,均促进了该菌菌丝的生长。另外,培养基中加入与菌根真菌共生的宿主植物的根系或针叶提取物等对外生菌根真菌的生长也有显著的促进作用,如周国英^[25]在松乳菇(*Lactarius deliciosus*)的培养基中加入松针煮出汁,明显促进了松乳菇菌丝的生长。王冉^[26]研究组对印度块菌(*Tuber indicum*)的纯培养条件进行的研究结果表明,在培养基中加入利于孢子萌发的物质,如松针浸出液、松根浸出液等对菌丝体的生长有一定的促进作用。该研究也表明,青海云杉枝及针叶提取物对紫蘑(*Cortinarius* sp. LM-1)菌丝生长有显著的促进作用,但具体是哪些物质起作用有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] MOSER M, AMMIRATI J F. Studies in North American *Cortinarii* V. New and interesting *Phlegmacia* from Wyoming and the Pacific North West[J]. Mycotaxon, 1999, 72: 289-321.
- [2] 李彦军, 图力古尔. 采自内蒙古大兴安岭的丝膜菌属新记录种[J]. 菌物学报, 2016, 35(2): 229-233.
- [3] LILLESKOV E A, HOBBI E A, HORTON T R. Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition[J]. Fungal Ecology, 2011, 4(2): 174-183.
- [4] HAY T N, PHILLIPS L A, NICHOLSON B A, et al. Ectomycorrhizal community structure and function in interior spruce forests of British Columbia under long term fertilization[J]. Forest Ecology and Management, 2015, 350(15): 87-95.
- [5] 柴迪迪, 郭素娟, 孙小兵, 等. 燕山地区 7 种板栗外生菌根真菌培养条件的优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(4): 109-116.
- [6] 孙丽华, 云兴福, 宋刚, 等. 宁夏贺兰山大型真菌新纪录种[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2012, 43(2): 154-159.
- [7] 管立峰, 图力古尔, 包海鹰, 等. 紫红丝膜菌子实体的化学成分研究[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 284-288.
- [8] 鲍吉飞, 应姗姗, 王璐瑶, 等. 贺兰山紫蘑菇化学成分的分离鉴定[J]. 广州化工, 2015, 43(12): 53-55.
- [9] 杨振华, 张靠稳, 马爱瑛. 贺兰山紫蘑菇多糖的分离与纯化[J]. 北方园艺, 2011(4): 187-189.
- [10] BAI M S, WANG C, ZONG S H, et al. Antioxidant polyketide phenolic metabolites from the edible mushroom *Cortinarius purpurascens*[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3424-3427.

- [11] 刘继婷,鲁晓丽,张自萍.不同处理方法对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响[J].食品科学,2015,36(4):6-10.
- [12] 刘自军,马茜.贺兰山紫蘑菇多糖联合 5-Fu 对 H22 荷瘤小鼠体内抗氧化酶系统的影响[J].宁夏医学杂志,2015,37(3):193-196.
- [13] 方学原,鲍吉飞,苗艳霞,等.贺兰山紫蘑菇萃取物抗肿瘤活性研究[J].广州化工,2015,43(12):50-52.
- [14] 吴发红,黄东益,黄小龙,等.几种真菌 DNA 提取方法的比较[J].中国农学通报,2009,25(8):62-64.
- [15] WANG P, LIU Y, YIN Y, et al. Diversity of microorganisms isolated from the soil sample surround *Chroogomphus rutilus* in the Beijing region[J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(2):209-220.
- [16] FERNANDEZ V, MARCHELLI P, GHERGHEL F, et al. Ectomycorrhizal fungal communities in *Nothofagus nervosa* (Rauli): A comparison between domesticated and naturally established specimens in a native forest of Patagonia, Argentina[J]. Fungal Ecology, 2015, 18:36-47.
- [17] OBASE K, DOUHAN G W, MATSUDA Y, et al. *Cladophialophora floridana* and *Cladophialophora tortuosa*, new species isolated from sclerotia of *Cenococcum geophilum* in forest soils of Florida, USA[J]. Mycoscience, 2016, 57(1):26-34.
- [18] 李敏,闫伟.褐环乳牛肝菌发酵条件的优化[J].食品与生物技术学报,2009,28(3):390-396.
- [19] 牛玉蓉,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,2013,20(4):6-10.
- [20] 冀瑞卿,马世玉,王月杰,等.3种菌根食用菌室内培养营养与环境条件的优化[J].东北林业大学学报,2013,41(12):99-101.
- [21] ZENG R S, MALLIK A U, SETLIFF E. Growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by root exudates of Brassicaceae plants: Role of degraded compounds of indole glucosinolates[J]. Journal of Chemical Ecology, 2003, 29(6):1337-1355.
- [22] 赵小亮,刘新虎,贺江舟,等.棉花根系分泌物对土壤速效养分和酶活性及微生物数量的影响[J].西北植物学报,2009,29(7):1426-1431.
- [23] 赵慧英,薛丽宁,姚庆智,等.虎榛子愈伤组织对土生空团菌菌丝生长的影响[J].中国农学通报,2012,28(13):92-96.
- [24] 曹凤娟,姚庆智,闫伟.萝卜对土生空团菌菌丝生长的影响[J].微生物学通报,2011,38(7):1000-1006.
- [25] 周国英.松乳菇菌丝纯培养及其分离物的 DNA 指纹研究[D].长沙:中南林学院,2002.
- [26] 王冉.印度块菌(*Tuber indicum*)的分离纯化培养及其菌根促生细菌的研究[D].重庆:西南大学,2013.

Seperation, Identification and Culture Conditions of *Cortinarius* sp.

LI Min^{1,2}, YAO Qingzhi^{2,3}, WEI Jie^{2,4}, LIU Yang^{2,3}, LI Yizhen², ZHANG Xuan²

(1. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Huhhot, Inner Mongolia 010022; 2. Inner Mongolia Hesheng Institute of Ecological Sciences & Technology, Huhhot, Inner Mongolia 011517; 3. College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018; 4. Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract: A strain of *Cortinarius* sp. was isolated from a wild mushroom fruiting body under *Picea crassifolia* forest, from Helan Mountain, and was identified based on its morphology and ITS sequence analysis. The optimum culture conditions, i. e. medium, temperature, pH and the effects of extraction from the coniferous, branches and roots of *Picea crassifolia* on the mycelium growth were investigated. The results showed that the strain manifested relatively high sequence similarity with *Cortinarius rufoolivaceus* (Canada) samples based on polymeric analysis of ITS sequences, with similarity of 98%. Combined with its morphological characteristics, it was therefore identified as *Cortinarius* sp. LM-1. Culture conditions showed that the optimum temperature was 15—20 °C, and the optimum pH was 5.5—6.0. The branch and needle extraction of the host plant *Picea crassifolia* had significant roles in promoting the mycelium growth, enhanced the mycelial dry weight ((8.62±0.27) mg and (6.93±0.27) mg) with the value of 45.85% and 17.26% comparing with the control group.

Keywords: *Cortinarius* sp.; separation; identification; culture conditions