

doi:10.11937/bfyy.20170461

一株白桩菇属野生食用菌 菌种分离鉴定与培养

刘晓婷¹, 孙国琴², 李亚娇², 王淑妍¹, 郭九峰¹

(1. 内蒙古大学 物理科学与技术学院, 离子束生物工程自治区重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021;

2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010031)

摘要:以内蒙古锡林郭勒草原一株野生蘑菇为试材, 采用形态特征和生态习性鉴定及分子鉴定的方法, 对该蘑菇的菌丝体基因组 DNA 进行 18S 和 ITS 片段的扩增、测序, 测序结果经 Blast 比对, 从而对该蘑菇进行分离鉴定。结果表明: 该野生真菌属于白桩菇属 *Leucopaxillus*。另外, 通过优化的 MS 平板培养基避光培养, 在 MS 平板培养基上有原基形成, 为日后对该菌种的驯化与栽培提供材料, 为其开发与利用奠定基础。其 ITS 序列已上传 GenBank, 登录号为 KY173356。

关键词:野生真菌; 形态特征; ITS 序列; 分子鉴定方法; 原基

中图分类号:S 646.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)18-0161-06

许多野生蘑菇风味独特、营养均衡, 具有很高的营养价值和医疗保健功能^[1-2]。随着现代科技的进步和人们生活水平的提高, 人们对野生菌的认识逐步加深, 对野生菌的需求也越来越大, 野生菌资源的价值越来越受到人们的关注, 表现出良好的应用开发前景。我国野生菌物种资源十分丰富, 据不完全统计, 我国野生食药食用菌约逾 2 000 种, 其中已驯化成功的逾 50 种, 主栽品种逾 20 种, 支撑了我国食用菌产业的发展^[3-4]。然而, 绝大多数仍都处于自然生长状态, 其中不乏质地优良, 具有极高食、药用价值的种类。由于草场退化、森林资源减少等生态环境的日趋恶化和人们乱采乱挖现象严重, 许多野生珍稀菌种濒临灭绝。因此, 迫切需要开展野生菌的驯化保育工作^[5-7], 从中选育出高产、优质的菌株, 以满足消费者需

求, 促进我国食药食用菌产业发展, 同时为野生菌种质资源保护贡献力量^[8-10]。

野生菌分类鉴定是涉及资源保护利用及产业发展的一项基础性研究工作^[11-12]。目前, 野生食用菌的鉴定主要以形态特征鉴别为主。随着科技进步, 采用分子生物学方法, 在分子水平上鉴别其属种已开始应用, 并显示出快速、准确的优越性^[13-14]。野生菌核糖体 rDNA-ITS 区是中度保守序列, 其保守性主要表现为种内相对一致, 种间差异比较明显。这种特点使得 ITS 可以应用于野生菌属内种间或者种内差异明显的菌群间的鉴定工作。ITS 技术由于准确、快速、简便, 越来越受到人们的重视和利用^[15-16]。

于 2016 年夏季, 在内蒙古自治区锡林郭勒多伦淖尔县海拔约 1 500 m 的草原上采集了一株野生蘑菇, 并通过孢子收集和培养获得了其纯菌种。为了验证该蘑菇种属, 课题组通过 18S 序列及 ITS 序列对双核菌丝体的基因组 DNA 进行了 PCR 验证, 并将测定结果输入到 NCBI 中进行 Blast 比对, 根据 ITS 序列相近度, 再结合该野生蘑菇的形态特征, 分析该野生蘑菇的分类地位, 从

第一作者简介:刘晓婷(1991), 女, 内蒙古乌海人, 硕士研究生, 研究方向为环境生物物理学。E-mail: liuxiaoting0522@sina.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(51267014)。

收稿日期:2017-04-11

而进一步讨论鉴别大型野生真菌的方法,为日后完善大型真菌的种属分类提供依据。另外,培养并观察该野生蘑菇双核菌丝的生长情况,以期日后该菌种的驯化出菇提供材料基础,为该食用菌的开发与利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蘑菇子实体采自内蒙古自治区锡林郭勒多伦淖尔县海拔约 1 500 m 的草原。

供试 MS 优化培养基:26.42 g · L⁻¹ MS 基本培养基,附加 1.5 g · L⁻¹ 酵母粉、1.5 g · L⁻¹ 水解酪蛋白、15 g · L⁻¹ 蔗糖、10 g · L⁻¹ 琼脂粉,加蒸馏水定容至 1 L。于高压灭菌锅 121 °C 灭菌 25 min 备用。

供试化学试剂均为分析纯(天津市光复科技发展有限公司);分子生物学试剂(Thermo Fisher Scientific 公司和天根生化科技(北京)有限公司);真菌鉴别通用引物 18S, ITS1, ITS4, 由上海生工生物工程技术有限公司完成;序列测定由上海立菲生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 担孢子收集及形态的观察

采用钟罩法收集担孢子:挑取少许担孢子至无菌试管中,加无菌水进行梯度稀释,在显微镜下用血球计数板挑选稀释至 100 μL 含 40~60 个担孢子,作为该试验的担孢子悬液。采用悬滴法制片,用齐氏(Ziehl)石炭酸复红染液对担孢子进行染色,置于光学显微镜油镜下(1 000×),观察担孢子形态,测定其大小,并拍照^[17]。

1.2.2 担孢子萌发、初生菌丝的培养

吸取 100 μL 担孢子悬液滴加于添加适量抗生素的平板培养基上,涂布均匀,5 次重复,25 °C 下避光培养,3 d 后定时对比观察,并拍照保存。待担孢子萌发后菌落长至肉眼可见时,挑取单个菌落,分别移至新的平板培养基上培养,25 °C 下避光培养。培养一段时间后,待菌落直径长至 3~4 cm 时进行镜检,采用直接涂片法对菌丝体进行观察,通过有无锁状联合的情况,判断菌丝是否为初生菌丝。

1.2.3 次生菌丝的获得

用 0.6 cm 打孔器分别对初生菌丝平板培养

基打孔,将 2 株单核体培养块间隔约 2 cm 接种在同一平板培养基上,随机两两交配,约 15 d 2 个单核菌丝体接触后,继续培养 3~5 d,观察交接区菌丝体生长情况及菌落形态,并挑取此处菌丝体制片镜检,以锁状联合为主要标记,有锁状联合且 2 个菌丝体生长交接区有明显亲和反应的则为双核体,挑出培养供试。

1.2.4 DNA 提取与 rDNA-ITS 分子鉴定

用镊子从培养皿中刮取少量菌丝,在液氮中研磨,采用优化的 DNA 提取试剂盒的方法提取菌丝体 DNA,并用微量紫外分光光度计检测所提 DNA 的纯度及含量。用已建立的 18S-PCR 反应条件和 ITS-PCR 反应条件^[18],分别扩增目的 DNA 片段,经 PCR 产物测序,于 NCBI 中进行 Blast 比对。

1.2.5 原基显微结构的观察

用镊子将培养基上形成的类似于原基的组织取出,在装有无菌水的空培养皿中进行组织纵向切片,制作临时玻片,用齐氏(Ziehl)石炭酸复红染液染色 1 min,置于光学显微镜油镜下(1 000×),观察并拍照。

1.3 数据分析

将供试蘑菇与 NCBI 数据库中相关的 ITS 序列用 DNAMAN 软件进行多序列比对。

2 结果与分析

2.1 供试野生蘑菇形态特征

子实体大型。菌盖直径 18~22 cm,扁半球形至近平展,中部下凹,乳白色,光滑,边缘内卷。菌肉白色,较薄。菌褶浅黄至浅棕褐色,延生,稠密,窄,不等长。菌柄较粗壮,长 8~12 cm,粗 3~5 cm,青白色,光滑,肉质,基部膨大可达 6 cm。孢子印白色。孢子无色,光滑,椭圆形,(8~10) μm × (4~6) μm。有特殊的蘑菇香味(图 1)。从形态特征上可以确定此株野生菌属于白蘑科(Tricholomataceae)。子实体大型,菌盖中部下凹,菌褶延生稠密不等长,菌柄较粗壮,夏秋季于草原上群生形成蘑菇圈,分布地区等明显特征与草原上常见的“口蘑”之一大白桩菇 *Leucopaxillus giganteus* (Sowerby) Singer^[19-22] 相近,当地俗称“天花板”,故鉴定为白桩菇属 *Leucopaxillus*。

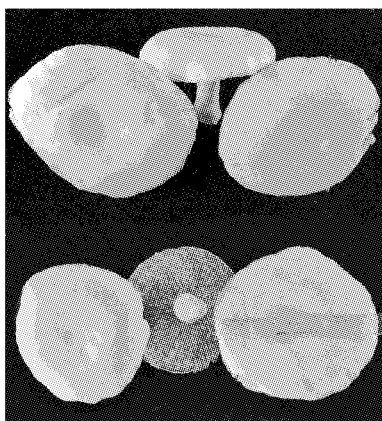


图 1 野生蘑菇子实体

Fig. 1 Fruiting bodies of the wild mushroom

2.2 担孢子萌发

平板培养基上涂布供试蘑菇担孢子悬液后, 3~5 d 肉眼可见培养皿中出现 1 mm 左右的微小菌落, 即个别担孢子已萌动。5~7 d 大部分孢子萌发, 形成菌落, 菌落菌丝体平铺, 中间突出, 周边稀疏, 成放射状向外周延伸。7 d 后培养皿中有更多担孢子萌发, 1 个月后拍照观察(图 2), 可以发现, 该蘑菇菌落形态特殊, 菌落中央菌丝体凝聚, 明显形成一个致密的“小白点”, 每一个菌落以此为中心, 以绒毛状菌丝体向周围延展长开。

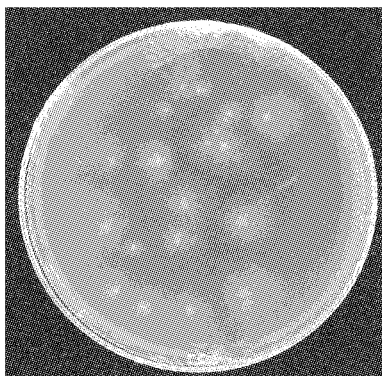


图 2 野生蘑菇担孢子萌发情况

Fig. 2 Germination situation of basidiospores

2.3 分子鉴定结果

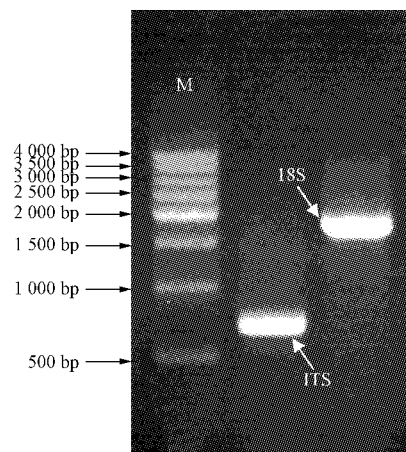
由 18S、ITS 序列 PCR 结果得到的琼脂糖凝胶电泳图显示(图 3), 供试野生蘑菇双核菌丝 rDNA-ITS 扩增产物条带清晰, 片段长度约为 700 bp, rDNA-18S 扩增产物条带清晰, 片段长度

约为 1 600 bp。

测序结果通过 NCBI 进行 Blast 比对, 结果表明试验材料属白蘑科(Tricholomataceae), ITS 序列(GenBank 登录号 KY173356)比对结果显示, 试验材料与假杯伞属(*Pseudoclitocybe*)的灰假杯伞 *Pseudoclitocybe cyathiformis* (Bull.) Singer 同源性最高。

另外, 将供试蘑菇与 NCBI 数据库中已发布的灰假杯伞和大白桩菇的 ITS 序列用 DNAMAN 软件进行多序列比对(图 4), 结果显示, 相对于大白桩菇, 供试蘑菇在 rDNA-ITS 序列与灰假杯伞同源性更高。

尽管如此, 灰假杯伞在形态特征上^[21-22]与供试蘑菇相差甚远, 故此分子鉴定结果只能说明目前分子鉴定方法存在一些问题, 不足以更多地贡献于该供试蘑菇的种属鉴定。



注: M. 分子标记, 500 bp DNA Ladder.

Note: M. Molecular Markers, DL 500.

图 3 供试蘑菇双核菌丝 18S 及 ITS 序列 PCR 结果

Fig. 3 PCR Result of 18S and ITS of dikaryotic hyphae

2.4 次生菌丝培养及原基形成

次生菌丝在优化的 MS 平板培养基上培养, 一段时间后发现有明显菌丝体凝聚现象, 并伴有菌索产生, 1 个月后, 凝聚的菌丝体在生长方向端部明显长大, 成为块状的凸起, 类似于原基的组织, 空间上不断长大, 顶到培养皿上盖, 有的甚至像一个“小蘑菇”(图 5-A、B)。

观察上述组织纵切面, 可发现菌丝排列整齐,

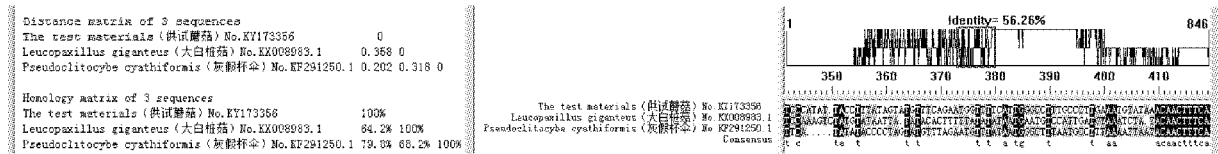


图4 多序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment

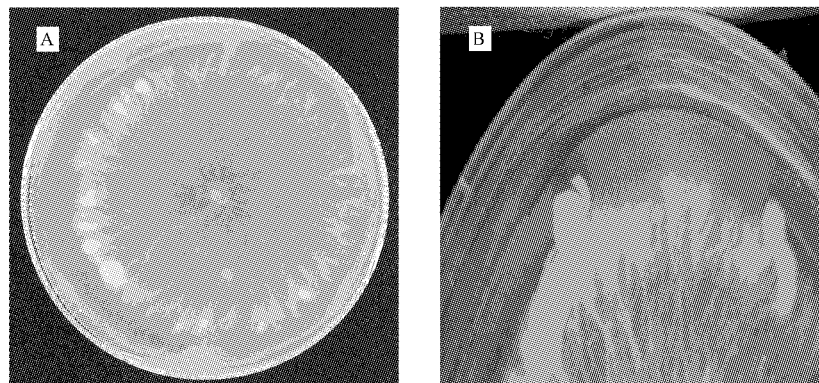


图5 供试蘑菇次生菌丝的生长情况(A和B)

Fig. 5 Growth situation of secondary hyphae(A and B)

形态有别于带有锁状联合的次生菌丝,是明显的三级菌丝(图6),根据食用菌生长发育规律,次级菌丝形成的菌丝体生长到一定阶段达到生理上成熟后,就会有些菌丝在基质的表面上扭结形成原基,由原基再发育成子实体。由此确定该蘑菇菌丝体在供试培养基上形成的“小蘑菇”为原基。

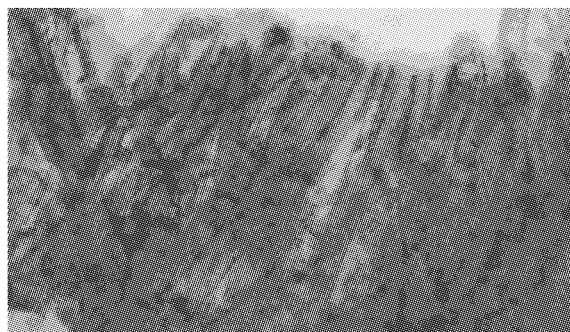


图6 三级菌丝

Fig. 6 Tertiary mycelium observation

3 结论与讨论

该试验结果表明,通过担孢子培养获得了一株野生蘑菇的初生菌丝和次生菌丝,次生菌丝仅

在MS平板培养基上发生凝聚,形成了菌索和原基,初步将该野生菌鉴定为白桩菇属 *Leucopaxillus*。

3.1 供试野生蘑菇的种属分类

上述鉴定结果表明,从形态特征上初步将该野生菌鉴定为白桩菇属。进一步地,供试野生蘑菇与大白桩菇相近。但常见的大白桩菇菌盖污白色,青白色或稍带灰黄色,菌褶白色至污白色,老后青褐色,而供试野生蘑菇菌盖乳白色,菌褶浅黄至浅棕褐色,在此类颜色上有明显差异。而从rDNA-ITS分子鉴定结果表明,该野生蘑菇ITS序列更接近于假杯伞属,其中与灰假杯伞(*Pseudoclitocybe cyathiiformis* (Bull.) Singer)的比对度更高,但从灰假杯伞的形态特征上来看,其子实体中等大,菌盖直径3~7 cm,初期半球形,后渐平展至杯状或浅漏斗状,灰色至棕灰色,菌褶较盖色浅,菌柄细长,内部松软;生态习性多为夏秋季在林中地上或腐朽后的倒木上分散、近丛生或成群生长。而课题组采集的此株野生蘑菇,子实体明显大型,菌盖直径在20 cm以上,且为乳白色,菌褶较盖色深,菌柄较整个子实体来说

呈短粗壮,且内部致密,生态习性明显为草原环境生长,与假杯伞属形态特征和生态习性相差甚远。因此,课题组将该野生蘑菇鉴定为白桩菇属。

该试验也表明仅仅通过 ITS 序列进行 Blast 比对得出的结果也并不完全可信,不能盲目下结论,虽然 rDNA-ITS 分子鉴定方法简便、客观、快速,但目前也存在一定的应用限制,比如受基因库的完善程度、高度同源性序列的多少以及具体物种 ITS 区的可变程度等影响,这与燕勇等^[23]得出的 rDNA-ITS 分子鉴定方法并不能鉴定出所有真菌的结论不谋而合,认为在野生大型真菌(尤其是野生食、药用菌)的分类鉴别中,宜在传统的形态学表型分析方法上结合更多的分子鉴定方法,综合加以鉴定。

3.2 供试野生蘑菇原基形成

该试验发现,课题组采集的该野生蘑菇产孢量相对较大,且菌丝体易培养,在优化的 MS 平板培养基上避光培养,无需改变其生长条件便可直接形成菌索和原基,这为后期对该野生蘑菇的驯化和栽培提供了宝贵的阶段性成果,也为食用菌驯化与栽培提供新的思路与方法。若在课题组接下来的试验中确定该蘑菇种属,且驯化成功,这极有可能为食用菌的开发与利用提供新的研究材料。

综上,该试验通过对一株未知野生蘑菇的种属鉴定,思考并讨论了目前常用的 rDNA-ITS 分子鉴定结合形态特征鉴定种属的方法;通过对该野生蘑菇的孢子收集与菌丝体培养,初步得到了该野生蘑菇的原基,为日后对该菌种的驯化与栽培提供材料,为其开发与利用奠定基础。

参考文献

- [1] FEENEY M J, DWYER J, HASLER-LEWIS C M, et al. Mushrooms and health summit proceedings[J]. J Nutr, 2014, 144(7):1128-1136.
- [2] BENJAMIN D R. Mushrooms: Poisons and panaceas[M]. New York: WH Freeman and Co, 1995.
- [3] 张金霞, 陈强, 黄晨阳, 等. 食用菌产业发展历史、现状与趋势[J]. 菌物学报, 2015(4):524-540.
- [4] 孔雷, 张良, 胡文洪, 等. 中国食用菌产业现状及预测[J]. 食用菌学报, 2016(2):104-109.
- [5] 段福文, 闫尔葵, 楚雄地区 4 种野生菌子实体生长过程调查报告[J]. 中国食用菌, 2015(1):34-36.
- [6] 王建瑞, 刘宇, 图力古尔. 山东省大型真菌物种濒危程度与优先保育评价[J]. 生态学报, 2015(3):837-848.
- [7] 张压宝. 马龙县食用菌产业科技创新的现状与对策研究[J]. 中国食用菌, 2015(3):78-81.
- [8] 庄海宁, 张劲松, 冯涛, 等. 我国食用菌保健食品的发展现状与政策建议[J]. 食用菌学报, 2015(3):85-91.
- [9] 修翠娟. 野生口蘑菌种分离及人工驯化[J]. 微生物学杂志, 2012(3):98-100.
- [10] 张浩, 张焕仕, 王猛, 等. 我国食用菌栽培技术研究进展[J]. 北方园艺, 2014(5):175-179.
- [11] 李玉. 野生食用菌菌种分离与鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
- [12] 许峰, 刘宇, 王守现, 等. 一株野生大型真菌的分离与鉴定[J]. 中国农学通报, 2012(13):176-179.
- [13] RAJARATNAM S, THIAGARAJAN T. Molecular characterization of wild mushroom[J]. European Journal of Experimental Biology, 2012, 2(2):369-373.
- [14] DAS S K, MANDAL A, DATTA A K, et al. Nucleotide sequencing and identification of some wild mushrooms[J]. Sci World J, 2013(11):403191.
- [15] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHN DORF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi[J]. PNAS, 2012, 109(16):6241-6246.
- [16] AVIN F A, BHASSU S, TAN Y S, et al. Molecular divergence and species delimitation of the cultivated oyster mushrooms: Integration of IGS1 and ITS [J]. Sci World J, 2014:793414.
- [17] 刘晓婷, 郭九峰, 王淑妍, 等. 蒙古口蘑担孢子萌发及初生菌丝生物学特性研究[J]. 北方园艺, 2016(16):136-141.
- [18] 刘晓婷, 郭九峰, 王淑妍, 等. 用 rDNA-ITS 方法鉴别内蒙古多种野生食用菌[J]. 食药菌, 2015(5):301-306.
- [19] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [20] 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 等. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报, 2010, 29(1):1-21.
- [21] 大自然博物馆编委会. 大自然博物馆·百科珍藏图鉴系列: 蘑菇[M]. 北京: 化学工业出版社, 2014.
- [22] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- [23] 燕勇, 李卫平, 高雯洁, 等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008(10):1958-1960.

doi:10.11937/bfyy.20164516

玉米秸秆基质栽培黑木耳配方筛选试验

李 超, 李 红

(辽宁省农业科学院 食用菌研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以“辽黑木耳3号”为试材,采用全日光露地栽培方法,研究了主料中不同玉米秸秆添加量(0%、22%、32%、42%、52%)对黑木耳菌丝长速、长势、产量和转化率的影响,并分析了经济效益。结果表明:玉米秸秆替代木屑,当添加量达到32%时,袋均干木耳产量50.41 g,纯收益1.380元,经济效益高于木屑栽培。

关键词:玉米秸秆;黑木耳;配方

中图分类号:S 646.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)18-0166-04

黑木耳(*Auricularia auricula*)属担子菌纲,木耳目,木耳科,又名木蛾、树耳、树蕈、黑耳,生长于栎、杨、榕、槐等120多种阔叶树的腐木上,单生或群生,主要生长在中国和日本,中国大部分是东北木耳和秦岭木耳。黑木耳味道独特,营养丰富,

食药兼备,被现代营养学家誉为“素中之荤”,世界上称之为“中餐中的黑色瑰宝”。随着生活水平的提高,人们越来越注重饮食文化,黑木耳可食、可药、可补,既可以满足人们对美食的需求,又可预防和治疗多种疾病,因此,黑木耳需求量越来越大。

辽宁省是全国食用菌栽培量较多的地区,随着黑木耳栽培量的增加和栽培区域的扩大,以木屑为主的栽培原料严重短缺,菌林矛盾日渐突出。发展秸秆代料栽培,对于发展黑木耳产业和实施

第一作者简介:李超(1976-),男,硕士,副研究员,研究方向为食用菌育种及栽培。E-mail:lnnkylxy@163.com.

收稿日期:2017-03-20

Isolation, Identification and Training for a Wild Fungus of Genus *Leucopaxillus*

LIU Xiaoting¹, SUN Guoqin², LI Yajiao², WANG Shuyan¹, GUO Jiufeng¹

(1. Key Laboratory of Ion Beam Biotechnology/College of Physical Science and Technology, Inner Mongolia University, Huhhot, Inner Mongolia 010021; 2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Livestock Sciences, Hohhot, Inner Mongolia 010031)

Abstract: A wild mushroom from Inner Mongolia's Xilingol grassland was identified by methods of morphological characteristics and ecological habits of identification and molecular identification. Genomic DNA was extracted from mycelium then used as template for the 18S and ITS gene PCR amplification and sequencing. The 18S and ITS gene sequences were submitted to NCBI and aligned by Blast. The results showed that the fungi belonged to the genus *Leucopaxillus*. In addition, it had been found experimentally that the mycelium could be formed primordium in MS plate culture medium in dark. The ITS sequence was uploaded into NCBI, and GenBank accession number was KY173356.

Keywords: wild fungi; morphological characteristics; ITS gene sequence; molecular identification methods; primordium