

# 承德两种野生食用菌的分子鉴定及系统发育分析

张 剑<sup>1</sup>, 付亚娟<sup>2</sup>

(1. 廊坊职业技术学院, 河北 廊坊 065000; 2. 廊坊师范学院 生命科学学院, 河北省高校食药食用菌应用技术研发中心, 廊坊市食用菌技术重点实验室, 河北 廊坊 065000)

**摘 要:**以承德红蘑和白蘑子实体为试材, 采用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4, 对其基因组 rDNA 基因的 ITS 区段进行 PCR 扩增、克隆测序, 而后与 GenBank 数据库信息比对, 并利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 从分子水平上鉴定其种属地位及系统进化关系。结果表明:承德红蘑与血红铆钉菇(*Chroogomphus rutilus*, Accession No.: KR082876)、白蘑与 *Hygrophorus queletii* (Accession No.: JF908069) 的相似性均达到 99%。承德红蘑与血红铆钉菇 *C. rutilus* (Accession No.: KR082876), 承德白蘑与 *H. queletii* (Accession No.: JF908069) 的遗传关系最近, 遗传距离为 0.002。因此, 承德红蘑和白蘑经分子鉴定为 *C. rutilus* 和 *H. queletii*, 其分类地位的解析, 对今后野生红蘑和白蘑种质资源鉴定、生物学特性研究及开发利用奠定了基础。

**关键词:**红蘑; 白蘑; ITS; 分子鉴定; 系统发育

**中图分类号:**Q 939.5; S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0172-06

承德位于河北省东北部(北纬 40°12'~42°37', 东经 115°54'~119°15'), 地处内蒙古与冀北山地的过渡地带。承德不仅是华北地区最大的食用菌生产基地, 也是全球野生食用菌种类较多, 数量和自然产量均较高的地区之一<sup>[1]</sup>。很多野生食用菌具有丰富的营养和独特的风味, 备受当地人们的喜爱。

承德红蘑, 俗称肉蘑、松树伞蘑, 主要分布在

平泉、隆化县等深山的松林地带。红蘑具有较高的营养和药用价值, 其人工栽培一直是国内外研究的热点。研究发现, 可以通过组织分离法获得红蘑菌丝纯培养物<sup>[2]</sup>, 但人工栽培形成子实体目前尚鲜见报道。血红铆钉菇(*Chroogomphus rutilus*)的生态研究表明, *C. rutilus* 总是与牛肝菌相伴生长在油松林内, 降水、土壤含水量是影响其子实体形成与发育的主要因素<sup>[3]</sup>。WANG 等<sup>[4]</sup>对 *C. rutilus* 子实体周围土壤微生物群落进行研究, 发现其生长环境存在大量的微生物, 如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌和青霉属(*Penicillium*)、木霉属(*Trichoderma*)、被孢霉属(*Mortierella*)、生赤壳属(*Bionectria*)真菌等。田慧敏等<sup>[5]</sup>发现内蒙古红蘑(*C. rutilus*)与分布在我国西南部的东方色钉菇(*Chroogomphus orientirutilus*)、变色色钉菇(*Chroogomphus vinicolor*)、易混色钉菇(*Chroogomphus confuses*)和生于东北部紫色钉菇

**第一作者简介:**张剑(1981-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为微生物学。E-mail: zhangjian810916@163.com.

**责任作者:**付亚娟(1981-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为分子微生物学。E-mail: fuyajuan501@163.com.

**基金项目:**2015 年度河北省社会科学发研究课题民生调研专项资助项目(201501519); 河北省高校食药食用菌应用技术研发中心资助项目(YF201411-321); 廊坊师范学院人才引进科研启动资助项目(0140102001); 廊坊师范学院微生物学重点学科资助项目(2015001)。

**收稿日期:**2017-04-05

(*Chroogomphis purpurascens*) 亲缘关系较近。冯建等<sup>[6]</sup>从采自河北省平泉县的 *C. rutilus* 子实体中分离纯化出 11 种化合物,其中 2-甲氧基腺嘌呤核苷和顺式-3-己烯醇表现出较强的 DPPH 自由基清除能力,而 5-羟基尿嘧啶核苷对人胃癌细胞株 BGC 的体外增殖具有较强的抑制作用。除了 6 种已知的化合物,LUO 等<sup>[7]</sup>还从 *C. rutilus* 子实体中分离并鉴定出一种新的化合物。而深受承德百姓青睐,营养价值极高,被外国专家推荐为十大健康食品之一的野生坝上白蘑的相关研究至今尚鲜见报道。

尽管野生红蘑和白蘑具有较高的营养和药用价值,但野生资源产量较低,加上生态环境的破坏和无序的采摘,野生量远不能满足市场的需求,使

得野生食用菌的人工驯化栽培成为亟待解决的问题。因此,该研究以购自承德的红蘑和白蘑子实体为研究对象,通过 ITS 序列对其进行分子鉴定和构建系统发育树,解析其遗传分类地位,以期为具有极高营养及药用价值的这 2 种野生菌的人工驯化栽培和生物活性物质的开发利用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试承德红蘑和白蘑购自承德农贸市场(图 1);大肠杆菌(*Escherichia coli*)TOP10 由廊坊师范学院生命科学院微生物实验室保存。



红蘑 Red mushroom



白蘑 White mushroom

图 1 承德红蘑和白蘑干子实体

Fig. 1 Dry fruiting bodies of red and white mushrooms in Chengde

供试试剂:真菌基因组 DNA 提取试剂盒(OMEGA)购自北京鸿跃科技有限公司;PCR 扩增试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、pGM-T 连接试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA Marker、LB broth、LB broth agar、琼脂糖、IPTG、X-Gal、50×TAE 缓冲液和氨苄青霉素等购自上海生工生物有限公司。

主要供试仪器:PCR 仪(Mastecycler gradient, Eppendorf, 德国);凝胶成像系统(Bio-Rad, USA);高速冷冻离心机(TGL-16 型,湘仪离心机仪器有限公司,中国);细菌振荡培养箱(DHZB-500 型,郑州南北仪器设备有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 真菌基因组 DNA 的抽提

采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(OME-

GA, USA)分离红蘑和白蘑子实体 DNA,其操作按照试剂盒说明书进行。真菌 DNA 的完整性采用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

#### 1.2.2 真菌 ITS 序列的 PCR 扩增、克隆和测序

以真菌基因组 DNA 为模板,ITS1: 5'-TC-CGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4: 5'-TC-CTCCGCTTATTGATATGC-3' 为引物,PCR 扩增其核糖体 rDNA 的 ITS 区。PCR 扩增体系: 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, ITS1 和 ITS4 各 1 μL, 真菌 DNA 1 μL, 补足灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s 共 30 个循环; 72 °C 最后延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,采用 PCR 产物纯化试剂盒(天根,北京)对 PCR 产物进行纯化。纯化后的 PCR 产物

连接至 pGM-T 载体(天根,北京),通过  $\text{CaCl}_2$  法转化 *E. coli* TOP10,通过蓝白斑筛选含有 ITS 片段插入的阳性克隆子。随机挑选 3~5 个白色克隆子,接种至 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃振荡培养 12 h。经菌液 PCR 扩增鉴定为阳性的菌液交送生工生物工程(上海)有限公司测序。

### 1.2.3 系统发育分析

采用 DNASTar 软件去除载体序列后,将承德红蘑和白蘑的 ITS 序列通过 BLAST 与 GenBank 数据库进行比对,分别获得与其具有较高同源性的同属不同种的 ITS 序列;而后通过 Clustal X<sup>[8]</sup> 对多序列进行比对;最后采用 MEGA 5.0 软件<sup>[9]</sup> 构建系统发育树(Neighbor-joining method, Kimura 2-parameter model, Bootstrap 1 000 次重复检验各分支的置信度),以确定承德红蘑和白蘑的系统发育及分类地位。设置香菇(*Lentinus edodes*)为外类群。

## 2 结果与分析

### 2.1 真菌基因组 DNA 的提取

由图 2 可知,所提取的基因组 DNA 基本集中在 23 kb,且 DNA 条带较清晰明亮,表明 DNA 基本没有降解,具有较好的完整性。采用 Nano-Drop 2 000 超微量分光光度计对基因组 DNA 的浓度和纯度进行检测,白菇和红菇 DNA 的  $A_{260/280}$  值分别为 1.85 和 1.90,表明所提取的 DNA 纯度较高,可用于后续试验。

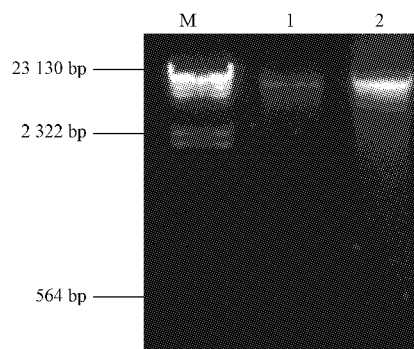
### 2.2 真菌 ITS-PCR 扩增结果

以 2 种真菌 DNA 为模板,ITS1 和 ITS4 为引物,PCR 扩增真菌核糖体 rRNA 基因的 ITS 区的部分序列,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 3。PCR 扩增产物均出现了清晰明亮的单一条带,其大小介于 500~700 bp,与预期结果基本相符。

### 2.3 系统进化树的构建与分析

#### 2.3.1 承德红蘑的系统进化分析

承德红蘑的 ITS 序列长度为 696 bp,通过 BLAST 程序对 GenBank 数据库进行该序列的同源性搜索,结果显示红蘑菌株与 GenBank 中血红铆钉菇(*C. rutilus*, Accession No. :KR082876)的

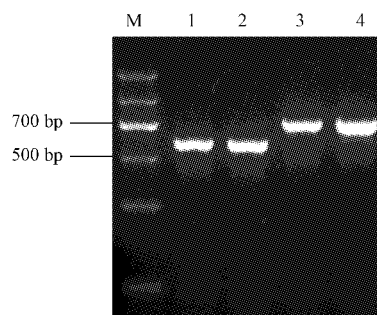


注: M,  $\lambda$ -Hind III DNA Marker; 1, 承德白蘑基因组 DNA; 2, 承德红蘑基因组 DNA。

Note: M,  $\lambda$ -Hind III DNA Marker; 1, genomic DNA of wild mushroom called Chengde white mushroom; 2, genomic DNA of wild mushroom called Chengde red mushroom.

图 2 野生大型真菌基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig 2 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA isolated from two wild mushrooms



注: M, Marker II; 1, 2, 承德白蘑的 ITS-PCR 产物; 3, 4, 承德红蘑的 ITS-PCR 产物。

Note: M, Marker II; 1, 2, ITS-PCR product of wild mushroom called Chengde white mushroom; 3, 4, ITS-PCR product of wild mushroom called Chengde red mushroom.

图 3 真菌 ITS-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR product of fungi ITS region

相似性最高(Score 1280; Expect 0.0; Identities 99%)。由进化树可以看出,承德红蘑与 *C. rutilus* 聚为一大枝,支持率为 80%;相比 *C. rutilus* (HM049562, KM488533) 而言,承德红蘑与内蒙古赛罕乌拉自然保护区的 *C. rutilus* (KR082876) 亲缘关系更近(图 4)。因此结合 BLAST 及进化树分析结果基本可以确定,承德红蘑为血红铆钉菇(*C. rutilus*)。

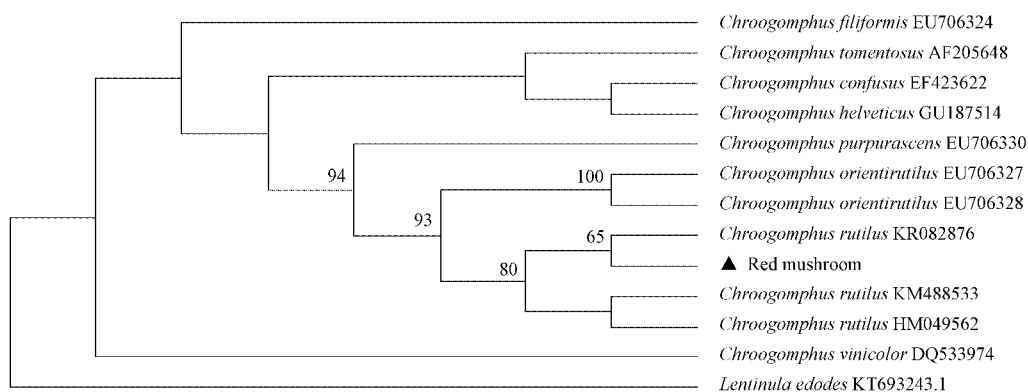


图 4 承德红蘑系统进化树(NJ 树)

Fig. 4 Neighbor-joining tree of Chengde red mushroom

### 2.3.2 承德白蘑的系统进化分析

承德白蘑的 ITS 序列长度为 564 bp, BLAST 序列相似性检索结果显示白蘑菌株与 GenBank 中 *H. queletii* (Accession No. : JF908069) 的相似性最高 (Score 1031; Expect 0.0; Identities 99%)。由进化树可以看出, 承德白蘑与 *H. que-*

*letii*、*Hygrophorus korhonenii*、*Hygrophorus olivaceoalbus* 聚为一大枝, 支持率为 97%; 相比 *H. korhonenii*、*H. olivaceoalbus* 而言, 承德白蘑与 *H. queletii* 亲缘关系更近(图 5)。因此承德白蘑的分子鉴定结果为 *H. queletii*。

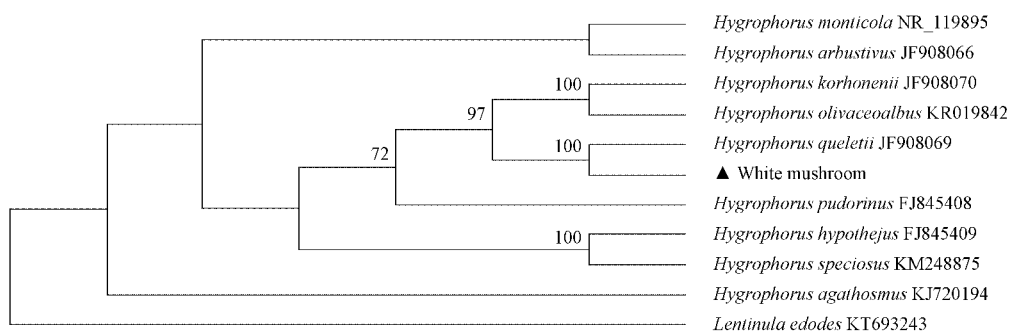


图 5 承德白蘑系统进化树(NJ 树)

Fig. 5 Neighbor-joining tree of Chengde white mushroom

## 3 讨论

承德蕴藏着丰富的具有较高营养保健及经济价值的野生食用菌资源, 少数种类仅局限于简单的采摘和加工, 而大多数种类未能得到有效的开发和利用<sup>[1]</sup>。因此, 野生食用菌的种质资源收集鉴定、驯化、育种及栽培已成野生食用菌研究的重要课题。菌种的鉴定多依赖于易于观察和比较的形态学特征, 但有时仅依靠形态学方法很难实现

对种内变种或近缘物种的鉴定。为了弥补传统鉴定方法的不足, 基于 DNA 条形码的分子鉴定方法, 更能较真实反映菌种间的差别, 使鉴定结果更加准确可信。

真菌核糖体 rDNA 内部转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS) 受外界环境影响较小, 进化速度快, 表现为种内相对保守、种间差异较为明显<sup>[10]</sup>。rDNA ITS 序列作为一种遗传分子标记, 已被广泛应用于对色钉菇<sup>[5]</sup>、松茸<sup>[11]</sup>、羊肚

菌<sup>[12]</sup>、松乳菇<sup>[13]</sup>、蒙古口蘑<sup>[14]</sup>、杏鲍菇<sup>[15]</sup>、双孢菇<sup>[16]</sup>和灵芝<sup>[17]</sup>等食药菌的菌种鉴定。因此,该研究从分子水平上,基于 ITS 序列对承德野生红蘑和白蘑进行物种鉴定。依据序列相似性 $<95\%$ 可鉴别为相同科; $95\% \sim 99\%$ 可鉴别为相同属; $>99\%$ 可鉴别为相同种<sup>[18]</sup>,承德红蘑和白蘑鉴定为 *C. rutilus* 和 *H. queletii*。它们遗传分类地位的解析,对将来这 2 种野生菌的人工驯化栽培和生物活性物质的开发利用具有一定的指导意义。

### 参考文献

- [1] 张根伟,张丽萍,李书生.承德坝上松林野生食用菌资源[J].中国农学通报,2012,28(28):286-289.
- [2] 孙军德,丛日辉.血红铆钉菇不同部位组织分离的研血红铆钉菇 SN 菌株生物学特性研究[J].菌物研究,2011,9(2):105-109.
- [3] 董化研,郝册,牛玉蓉,等.血红铆钉菇生态学初步研究[J].中国农学通报,2010,26(7):191-194.
- [4] WANG P, LIU Y, YIN Y G, 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.
- [5] 田慧敏,文静,任芳.色钉菇(*Chroogomphus rutilus*)形态学和 ITS 测序鉴定[J].江苏农业科学,2016,44(5):261-263.
- [6] 冯建,秦淑亮,胡兵,等.色钉菇子实体化学成分及其生物活性初探[J].菌物学报,2014,33(2):355-364.
- [7] LUO J, ZHANG C, ZHU H, et al. A new chromene from the fruiting bodies of *Chroogomphus rutilus*[J]. Natural Product Research, 2015, 29(8):698-702.
- [8] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The clustal\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acid Research, 1997(25):4876-4882.
- [9] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011(28):2731-2739.
- [10] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHNDOERF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16):6241-6246.
- [11] 张微思,罗孝坤,张丽英,等.松茸菌丝体的纯培养及其鉴定[J].中国食用菌,2010,29(3):34-36.
- [12] 戴璐,李峻志,李安利,等.基于 ITS 序列分析对秦岭冷水沟羊肚菌的鉴定[J].中国食用菌,2010,29(6):45-46.
- [13] 王瑞,何艳华,管海华,等.对 4 个不同产地松乳菇子实体的分子鉴定[J].江苏农业科学,2010(2):37-39.
- [14] 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,2015,23(5):301-306.
- [15] RO H S, KIM S S, RYU J S, et al. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting, and physiological characteristics[J]. Mycological Research, 2007, 111:710-715.
- [16] 王波,郭勇,鲜灵.一种野生蘑菇的鉴定[J].西南农业学报,2013,26(2):672-675.
- [17] 黄龙花,杨小兵,张智,等.基于 ITS 序列分析鉴定灵芝属菌种[J].中国食用菌,2010,29(1):55-57.
- [18] 樊永军,赵艳玲,闫伟.贺兰山两株大型真菌物种分子鉴定与系统地位分析[J].广东农业科学,2014(2):155-156.

## Molecular Identification and Phylogenetic Analysis of Two Wild Edible Mushrooms in Chengde Area

ZHANG Jian<sup>1</sup>, FU Yajuan<sup>2</sup>

(1. Langfang Polytechnic Institute, Langfang, Heibei 065000; 2. College of Life Science, Langfang Normal University/Edible and Medicinal Fungi Research and Development Center of Hebei Universities/Langfang Key Laboratory of Edible Fungi Technology, Langfang, Heibei 065000)

**Abstract:** In order to elucidate taxonomic status and phylogenetic relationship of wild red mushroom and white mushroom in Chengde area, the ITS regions of rDNA genes were amplified using ITS1 and ITS4 as primers, cloned and sequenced; ITS sequences were then analyzed via NCBI blast program, meanwhile phylogenetic tree were constructed using MEGA 5.0 software, respectively. The results indicated that the similarity of between red mushroom from Chengde area and *Chroogomphus rutilus* (Accession No. : KR082876) was up to 99%, and genetic distance was 0.002. White mushroom,

## 不同品种灵芝主要活性成分与营养物质比较分析

郭金英<sup>1</sup>, 朱优优<sup>2</sup>, 刘贵巧<sup>2</sup>, 郑素月<sup>1</sup>

(1. 河北工程大学 园林与生态工程学院, 河北 邯郸 056021; 2. 河北工程大学 生命科学与食品工程学院, 河北 邯郸 056021)

**摘要:**以 14 种不同品种灵芝为试材, 比较了灵芝多糖、三萜类化合物、粗蛋白质、灰分、粗纤维、粗脂肪等主要活性成分与营养成分的含量, 以期为灵芝产品的进一步开发提供依据。结果表明: 不同品种灵芝多糖的含量在 0.53%~3.05%, 含量高的品种依次为易县采集的“野生白灵芝”“野生云芝”“泰山 3 号”; 野生灵芝和人工栽培灵芝的三萜类化合物含量在 0.47%~1.47%, 野生灵芝三萜含量多数高于人工栽培灵芝; 人工栽培的灵芝粗蛋白质含量多数高于野生灵芝, “美芝”粗蛋白质含量高达 32.05%, 易县“野生赤芝”粗蛋白质含量仅为 7.52%; 野生灵芝的灰分显著高于人工栽培灵芝的灰分; 人工栽培灵芝和野生灵芝根据品种不同, 所含粗纤维、粗脂肪含量有所差异。

**关键词:**灵芝; 活性成分; 营养价值

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0177-04

灵芝是一种珍贵的药用真菌, 现代医学研究发现, 从灵芝中提取出来的有效物质可以制成多种药剂, 能有效抑制肿瘤、调节心脑血管、改善

肝功能等。灵芝还可以与多种药物配合, 治疗神经衰弱夜不安枕、白细胞减少、糖尿病、冠心病、胃溃疡、肾炎、肝炎和“三高”等多种疾病<sup>[1-2]</sup>。灵芝中含有多种有效营养成分, 邢增涛等<sup>[3]</sup>研究表明不同品种的灵芝中三萜类化合物的种类和含量存在差异。郑林用等<sup>[4]</sup>研究发现不同灵芝含有的多糖和三萜类化合物是不相同的。张舒峰等<sup>[5]</sup>研究发现林下灵芝中的灵芝酸和多糖含量均显著高于普通栽培灵芝, 但又显著低于野生灵芝。周选伟等<sup>[6]</sup>研究表明蛋白质也是灵芝的重要营养成分。同时, 人们还对灵芝所含的其它重要营养成分进行了研究。该研究对不同品种灵芝的营养物质和

**第一作者简介:**郭金英(1976-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食用菌新品种选育与菌种生产技术。E-mail: 15933880643@163.com.

**责任作者:**郑素月(1969-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事食用菌新品种选育与菌种生产技术等研究工作。E-mail: zhengsuyue@sina.com.

**基金项目:**河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队建设专项资金资助项目(HBCT2013060205)。

**收稿日期:**2017-04-06

which was another kind of precious wild edible fungi in Chengde area, also had 99% similarity with *Hygrophorus queletii* (Accession No.: JF908069), and their genetic distance reached to 0.002. Therefore, red mushroom and white mushroom in Chengde area were at the molecular level identified as *C. rutilus* and *H. queletii*, respectively. The elucidation of their taxonomic status would be beneficial for identification, biological characteristics, and development and utilization of wild red mushroom and white mushroom.

**Keywords:** red mushroom; white mushroom; ITS; molecular identification; phylogenetic analysis