

DOI:10.11937/bfyy.201704023

# 血红栓菌的分离鉴定及对牛筋草种子萌发的影响

刘贵巧<sup>1</sup>, 王建书<sup>1</sup>, 王秋敏<sup>2</sup>, 杨庆彬<sup>2</sup>

(1. 河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 063000; 2. 临城县农业局, 河北 邢台 054300)

**摘要:**以一株采自邢台的野生菌为试材, 采用分子及形态鉴定等方法进行种类鉴定, 并研究了其菌丝体发酵液、菌丝体及发酵液混合物对牛筋草种子萌发的影响, 以期为进一步开辟新的杂草生防菌奠定基础。结果表明: 该菌为血红栓菌 *Trametes sanguinea*, 对照处理的牛筋草种子萌发率为 44.12%, 该菌菌丝体发酵液处理的牛筋草种子萌发率为 36.40%, 并表现出强烈的对根生长的抑制作用, 其发酵液与菌丝体混合物处理的牛筋草种子的萌发率为 0。

**关键词:**野生菌; 分子鉴定; 牛筋草; 防治

**中图分类号:**S 451.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)04-0102-04

牛筋草(*Eleusine indica*)属禾本科一年生草本植物, 多生于较湿润的农田或路旁, 广布全国各地。由于牛筋草比其它植物具有更深的根系, 且光合器官发达, 在有利水肥条件下, 可抑制其它杂草生长, 因此, 牛筋草对棉花、豆类、薯类、蔬菜、果树等作物危害较重, 为近年来较难防除的恶性杂草之一<sup>[1]</sup>, 人工除草费工费时, 而化学除草不仅污染环境, 还容易使杂草产生抗药性, 因此, 生物性除草剂的筛选尤为必要。生物除草剂的种类常见的有 2 种: 一种为植物提取物制剂<sup>[2]</sup>, 另一种为病原微生物制剂, 从杂草中分离病原菌用于杂草防治是常用的一种方法<sup>[1]</sup>, 河北大型真菌资源丰富, 有的寄生性种类含有生物素等活性成分, 对其它植物有抑制作用, 这些真菌中是否含有抑制牛筋草种子萌发的生物成分, 能否将其用于杂草的生物防治, 目前尚鲜见文献报道<sup>[3-6]</sup>。为了开发新型除草真菌制剂, 课题组将在邢台县发现的野生菌带回实验室, 进行了分离鉴定, 并研究了其菌丝体液体培养物对牛筋草种子萌发的影响, 以期为进一步研究该菌对牛筋草的生物防治提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试野生食用菌(L-2013-1)采自河北省邢台县

路罗镇路罗村, 牛筋草种子由河北省农林科学院粮油作物研究所杂草组提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 野生食用菌的采集及处理 2013 年 9 月 16 日上午, 在河北省邢台县路罗镇路罗村东面距离山底约 50 m 的坡地板栗树下, 采集到野生菌(L-2013-1), 用塑料袋包好, 带回实验室, 放入冰箱冷藏室保存。

1.2.2 野生食用菌的形态鉴定 观察野生菌子实体及菌盖的形状、颜色、大小, 菌柄的有无、菌管的颜色、形状等特征, 然后参照文献<sup>[7-9]</sup>进行野生菌种类鉴定。

1.2.3 野生食用菌的分离培养 采用马铃薯选择性培养基, 具体配方为马铃薯浸粉 3 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g、氯霉素 0.1 g、水 1 000 mL, 采用常规方法制作培养基, 分装入三角瓶灭菌、倒平板, 然后用灭菌镊子, 无菌操作接入野生菌内部组织, 于 25 °C 恒温箱培养, 待组织萌发出菌丝体后, 选择长势较好的菌丝转接到新的 PDA 培养基上。

1.2.4 野生菌 DNA 提取与检测 将分离纯化后的野生菌菌丝体接种到 PDA 液体培养基中, 25 °C 静置培养 7 d, 取菌膜上面的菌丝体, 采用索来宝公司的真菌 DNA 提取试剂盒, 提取其 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取效果。

1.2.5 野生菌 ITS 序列扩增及结果检测 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'; PCR 的扩增体系为 PCR Mix 25 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 引物各

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

**基金项目:**公益性行业(农业)科研专项资助项目(201303022)。

**收稿日期:**2016-09-29

1  $\mu\text{L}$ , DNA 样品 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  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 92  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后于 72  $^{\circ}\text{C}$  补平 10 min, 终止温度为 4  $^{\circ}\text{C}$  [10]。电泳过程中扩增样品加样量为 5  $\mu\text{L}$ , 设定电压 124 V, 电流 134 mA, 功率 20 W, 电泳时间为 30 min, 电泳结束, 将胶片放到凝胶成像仪上观察电泳结果。

1.2.6 野生菌 ITS 序列测序 将得到的野生菌 PCR 扩增产物 50  $\mu\text{L}$  送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序部测序。

1.2.7 野生菌 ITS 序列分子鉴定及进化树的构建

将获得的野生菌 ITS 序列, 用 Bioedit 软件打开, 首先将序列前后信号不好的碱基去掉; 然后用 Blast 软件在 NCBI 基因库比对, 通过相似系数确定其最可能是的物种, 结合形态鉴定结果确定其种类, 然后将获得的 99% 相似度的 3 个物种, 以鸡腿菇为外群种, 利用 MEGA 6 软件采用邻比法构建系统发育树, 并分析序列结果。

1.2.8 野生菌对牛筋草种子萌发的影响 制备 PDA 液体培养基, 冷却后接种野生菌菌丝体纯培养, 分别于 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱振荡培养 1 周, 备用; 然后, 将直径 9 cm 的培养皿, 内铺 2 层滤纸于热灭菌, 冷却后

放置饱满、大小一致的牛筋草种子(种子使用前用 3% 的次氯酸钠溶液消毒 5 min, 蒸馏水冲洗 3 次, 滤干水分), 每皿放 20 粒, 然后向培养皿中分别加入菌丝体悬液、菌丝体发酵液各 5 mL, 以无菌蒸馏水作为对照, 各处理重复 5 次, 每皿用封口膜密封后, 置于 25  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养,

每日观察并及时补充适量对应的液体(对照补充蒸馏水), 让滤纸保持湿润, 7 d 后计算各处理牛筋草种子的萌发率, 同时用游标卡尺测定牛筋草种子根、芽的长度 [11], 与对照比较后计算抑制率, 数据用 SPSS 软件进行方差分析。种子萌发抑制率(%) = (对照种子萌发率 - 处理种子萌发率) / 对照种子萌发率  $\times 100$ ; 根生长抑制率(%) = (对照种子根长度 - 处理种子根长度) / 对照种子根长度  $\times 100$ ; 芽生长抑制率(%) = (对照种子芽长度 - 处理种子芽长度) / 对照种子芽长度  $\times 100$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生菌的形态鉴定结果

野生菌菌盖半圆形至扇形, 菌盖直径达 3~5 cm, 厚 3 mm, 表面平滑, 橘红色, 无菌柄, 菌管与菌肉同色, 管口细小, 圆形, 暗红色(图 1), 根据其形态特征, 鉴定其种类为红栓菌 [7-9]。



图 1 幼小完整野生菌

Fig. 1 Young wild mushroom



图 2 野生菌菌丝体培养特征

Fig. 2 Colony characteristics of wild mushroom mycelium

### 2.2 野生菌的分离培养结果

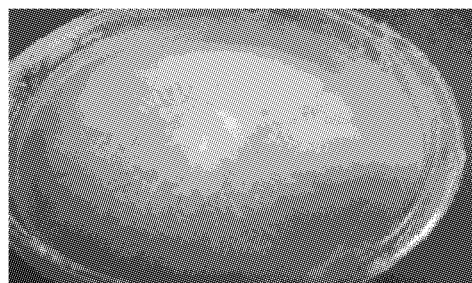
野生菌在马铃薯选择性培养基及马铃薯培养基上生长良好, 长速较快, 菌丝初期为白色绒毛状, 生长后期, 呈现橘红色 [12], 在光照环境下更有利于菌丝着色(图 2)。

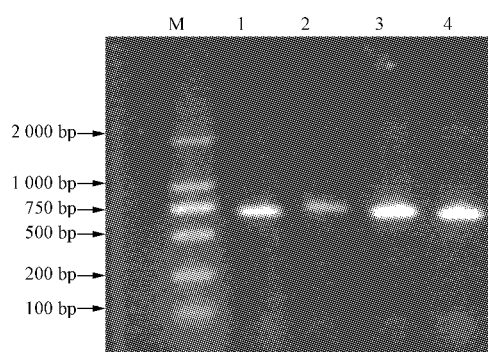
### 2.3 野生菌 DNA 提取物电泳检测结果

提取的野生菌 DNA 电泳检测效果较好, 可用于下一步试验。

### 2.4 野生菌 ITS 序列扩增结果

由图 3 可知, 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, 片段长度介于 500~750 bp, 基本符合 ITS 序列大小, 可以进一步用于测序。





注: M, DNA Marker; 1~2. 菌丝体 PCR 扩增产物; 3~4. 野生菌子实体 PCR 扩增产物。

Note: M, DNA Marker; 1~2. PCR amplification production of ITS gene region from mycelium; 3~4. PCR amplification production of ITS gene region from wild mushroom.

图3 野生菌 ITS 区段 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification result 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:

AAGGAACGCTCCGCCAAACGCTTCACGGTCAC  
AGCGTAGACAATTATCAGACTGAGAGCCGATC  
CGCACGGAATCAAGCTAATGCATTCAAGAGG  
AGCCGACCGACGAGGGCCAGCAAGCCTCCAA  
GTCCAAGCCCACAGCATCACAAGGACGTGTGG  
GTTGAGAATTCCATGACACTCAAACAGGCATG  
CTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCG  
TTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCA  
ATTACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTC  
TTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTG  
CTGAAAGTTGTATTTAGATGCGTTAGACGCT  
AATACATTCTGTTACTTTATGTGTTTGTAGTG  
ATACATAGGCCGGCAGAATGCCTCAAAGACC  
CGGAGGCCCCGAAGCCCACGCCAAACCTACA  
GTAAGTGCACAGGTGTAGAGTGGAGAGCAGG  
GTGTGCACATGCCCCGAAGGCCAGCTACAA  
CCCCTTTCAGAACTCGTTAATGATCCTTCCGC  
AGGTC。将获得的核酸序列在 NCBI 网页, 用 Blast 软件进行比对, 在 99% 相似系数中主要有 3 种菌株核酸序列与其相似度最大, 以鸡腿菇为外群构建的进化树见图 4, 可知野生菌 L-2013-1 与菌株 *Trametes sanguinea* 亲缘关系最近, 其登陆号为 KJ850206.1, 查阅资料得知此菌为血红栓菌 *Trametes sanguinea*, 与形态鉴定结果相吻合。因此, 该株野生菌为血红栓菌 *Trametes sanguinea*。

## 2.6 野生菌处理对牛筋草种子萌发的影响

由表 1 可知, 用血红栓菌菌丝体发酵液处理的

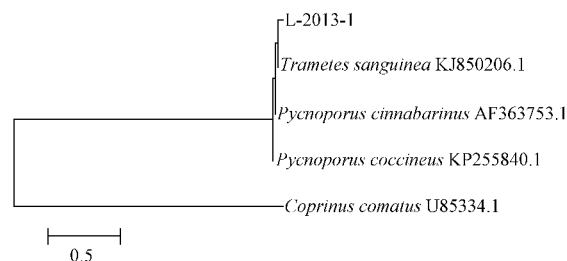


图4 基于 ITS 序列的野生菌系统发育进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis based on wild mushroom ITS sequence

牛筋草种子萌发率为 36.40%, 比对照低 7.72 个百分点, 种子萌发抑制率为 17.49%; 芽长 17.90 mm, 比对照短 0.03 mm, 芽生长抑制率为 0.17%; 根长 9.62 mm, 比对照短 2.46 mm, 根生长抑制率为 20.36%, 由此可以看出, 血红栓菌菌丝体发酵液中存在抑制牛筋草种子萌发的物质, 这种物质明显抑制牛筋草根的生长, 对芽的生长抑制作用不明显。用血红栓菌菌丝体与发酵液混合物处理的牛筋草种子萌发率为 0, 血红栓菌菌丝体与发酵液混合物对牛

表1 野生菌对牛筋草种子萌发的影响

Table 1 Effect of wild mushroom on goosegrass seed germination

| 处理<br>Treatment                             | 萌发率<br>Germination rate<br>/% | 芽长<br>Shoot length<br>/mm | 根长<br>Root length<br>/mm |
|---|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 对照(CK)                                      | 44.12±0.40                    | 17.93±0.03                | 12.08±0.03               |
| 菌丝体发酵液 Mycelium broth                       | 36.40±0.35 **                 | 17.90±0.10                | 9.62±0.04 **             |
| 菌丝体与发酵液混合物<br>Mixture of mycelium and broth | 0 **                          | 0 **                      | 0 **                     |

注: \*\* 表示差异显著 ( $P < 0.01$ )。

Note: \*\* represents significant difference at 0.01 level.

筋草种子萌发表现出强烈的抑制作用。

### 3 结论与讨论

通过形态鉴定与分子鉴定,确定该野生菌株为血红栓菌 *Trametes sanguinea*,该菌菌丝体与发酵液混合物对牛筋草种子萌发表现出强烈的抑制作用,牛筋草种子萌发率为 0,但菌丝体发酵液对牛筋草种子萌发虽然有抑制作用,但并未达到 100%,发酵液的抑制作用主要表现为抑制根的生长,对芽生长的抑制作用不明显,说明血红栓菌菌丝体发酵液中可能含有抑制种子萌发的成分。血红栓菌为一种大型药用真菌,中医研究显示其具有生肌、行气血、止湿痰、祛风湿、止痒、顺气、止血、抗肿瘤的作用<sup>[6]</sup>,马刚<sup>[13]</sup>研究表明,血红栓菌发酵液中的多糖表现出体外抗肿瘤作用,WANG 等<sup>[14]</sup>报道栓菌可以产生漆酶,用于染料的脱色,血红栓菌发酵液中抑制牛筋草种子萌发成分以及其抑制机理有待进一步研究。其菌丝体的抑制作用,可能是大量菌丝缠绕,隔绝氧气,导致种子不能萌发所致,因此,血红栓菌作为一种比较安全的生防潜力菌株,有望应用于牛筋草的生物防治。

#### 参考文献

- [1] 赵杏利,邓晖,牛永春.一种狗尾草病原真菌的鉴定及菌株致病性研究[J].菌物学报,2010,29(2):172-177.
- [2] 邹晓锦,孙占祥,于涛,等.仁用杏叶片提取物对 8 种杂草种子

萌发和幼苗生长的化感效果[J].农药,2013,52(6):454-456.

- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 李海蛟.中国栓孔菌属及近缘属的分类与系统发育研究[D].北京:北京林业大学,2013.
- [8] 戴玉成,杨祝良.中国药用真菌名录及部分名称的修订[J].菌物学报,2008(4):801-824.
- [9] 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,2004:8.
- [10] 李央央,袁林顺,吉袁芦宇,等.福建栓菌多样性及分子系统学研究[J].广东农业科学,2014(10):149-151.
- [11] 刘小民,边全乐,李秉华,等.小麦秸秆不同部位水浸液对牛筋草的化感作用研究[J].中国农学通报,2013(27):58-63.
- [12] 鲁铁,图力古尔.血红栓菌培养特性[J].东北林业大学学报,2013,41(7):124-128.
- [13] 马刚.血红栓菌培养基的筛选及发酵液多糖体外抗肿瘤作用的研究[D].青岛:青岛农业大学,2011.
- [14] WANG Z X,CAI Y J,LIAO X R, et al. Production and characterization of a novel laccase with cold adaptation and high thermal stability from an isolated fungus[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010,162(1):280-294.

## Isolation and Identification of *Trametes sanguinea* and Its Effect on Seed Germination of *Eleusine indica*

LIU Guiqiao<sup>1</sup>, WANG Jianshu<sup>1</sup>, WANG Qiumin<sup>2</sup>, YANG Qingbin<sup>2</sup>

(1. Agricultural College, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 063000; 2. Agriculture Bureau of Lincheng County, Xingtai, Hebei 054300)

**Abstract:** A wild edible mushroom strain from Xingtai was used as test material. It was identified with morphological and molecular methods, the effects of the broth, the mixture of liquid culture mycelium and broth of the wild edible mushroom on *Eleusine indica* seeds germination were studied, in order to lay the foundation for opening up new weed biocontrol. The results showed that the wild edible mushroom was *Trametes sanguinea*, while the germination rate of *Eleusine indica* seed which were treated by water was 44.12%, the germination rate of *Eleusine indica* seed which were treated by the broth of the wild edible mushroom was 36.40%. It showed strong inhibition on root growth. The germination rate of *Eleusine indica* seed which were treated by the mixture of liquid culture mycelium and broth of the wild edible mushroom was 0.

**Keywords:** wild edible mushroom; molecular identification; *Eleusine indica*; prevention