

doi:10.11937/bfyy.20170834

一株野生食用菌的形态及分子鉴定

王锋尖, 周向宇, 甘露

(汉江师范学院 生物化学与环境工程系, 湖北 十堰 442000)

摘要:以采自湖北赛武当自然保护区内的一株野生食用菌的子实体为试材,研究了其生态环境、形态结构,并从形态学角度对其进行了鉴定;对其 ITS 序列进行了扩增、测序,并在基因组数据库中比对确定其亲缘关系。结果表明:该野生菌为金盖褐环柄菇(*Phaeolepiota aurea*),属湖北省新记录种。该研究结果为进一步开发其应用价值奠定了基础。

关键词:野生菌;ITS 序列;形态学鉴定;湖北新记录种;赛武当自然保护区

中图分类号:S 567.3⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)21-0159-04

全世界野生食用菌资源非常丰富,大约有 2 000 种,我国已经确认的野生食用菌有 966 种^[1]。食用菌的传统分类及鉴定主要是基于子实体的宏观形态特征和微观结构,由于食用菌形态特征易受到环境条件的影响,且许多菌株的子实体经常难以获得,因而传统的分类方法已无法满足一些未知种属的食用菌的分类及鉴定要求。随着分子生物学的发展,很多学者利用分子生物学技术对其遗传多样性加以补充并进行了综合鉴

定^[2-7]。rDNA 内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)位于核糖体 rDNA 中,包括 18S 和 28S 基因之间的区域片段^[8],它的长度一般为 650~750 bp。由于 ITS 序列在种间具有高度特异性,且含有大量的通用引物等^[9],ITS 序列分析技术在真菌分类和鉴定的研究中应用越来越广泛。

该试验对采自赛武当自然保护区的一株野生食用菌进行了形态和 ITS 分子鉴定,确定了其分类地位,以期为进一步开发其应用价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试野生食用菌的子实体采自湖北省赛武当国家级自然保护区。新鲜子实体经 40℃烘干 12 h 以上,制成干燥标本供保藏,同时取一小块新鲜子实体用硅胶干燥剂干燥制作分子材料。

第一作者简介:王锋尖(1976-),男,硕士,副教授,研究方向为野生食用菌资源调查与多样性。E-mail:wnfnjn@126.com.

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究资助项目(B2017220);汉江师范学院重点科研资助项目(2012A07)。

收稿日期:2017-04-06

Abstract: The excellent varieties have been screened through cultivated in factory and compared the yield, time of primordia and flush, weight of single mushroom, shape of sporophores between the ten different varieties of *Agaricus bisporus*. The results showed that M10 could be used to breed the short cycle and mechanical harvesting strains. M5, M6, M8 were suited to produce in farm, whereas M2, M3, M7, M10 just opposite, they were suited to factory which could be used to breed the strains which were suited to cultivation in farm and factory respectively. Six varieties had a high yield. M2, M3, M6, M7, M9, M11 could be used to breed high yield strains. M2, M3, M9 could be used to breed good shape strains. M1, M5, M6, M8 could be used to breed excellent quality strains.

Keywords: *Agaricus bisporus*; cultivation; screen; variety; hybridization

高速离心机 5424 型(德国艾本德公司),PCR 仪(美国伯乐公司),DYY-12D 型电泳仪(北京六一仪器厂),WD-9413A 型凝胶成像分析系统(北京六一仪器厂)。DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,真菌通用引物 ITS1、ITS4 由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 生态环境的调查

采用 GPS 定位仪确定野生菌生长地的地理位置、海拔高度;查阅当地气象资料确定野生菌生长期间的生长温度;现场记录野生菌周边植被等生态环境。

1.2.2 子实体的形态鉴定

肉眼观察野生菌株的子实体形态菌盖与菌柄的形状和颜色、菌褶的颜色及其与菌柄的连接方式;用直尺测量菌盖大小、菌柄长度与宽度、菌褶的宽度;用显微镜观察菌丝和孢子的结构,然后参照卯晓岚^[10]和林晓民等^[11]的方法初步鉴别分类。

1.2.3 菌株的 ITS 分子鉴定

采用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,方法参照试剂盒说明书。采用真菌通用引物(ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行扩增。扩增体系:总体积 25 μL ,其中 ddH₂O 12.25 μL , 10 \times PCR 缓冲液(含 MgCl₂) 5 μL , 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 0.5 μL , 10 pmol \cdot L⁻¹ 引物各 1 μL , 模板 DNA 5 μL , 5 U \cdot μL^{-1} Taq 酶 0.25 μL 。PCR 扩增反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 54.3 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环;最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 补平 10 min, 终止温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 。将扩增好的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统中观察,将扩增后的 PCR 产物送交生工生物工程(上海)有限公司进行测序,测序得到的 ITS 序列在 NCBI 进行核酸序列 BLAST 比对,找出同源性最大的序列。

2 结果与分析

2.1 野生菌株的生态环境调查结果

赛武当国家级自然保护区位于湖北省十堰市茅箭区南部。该菌株采集于 2016 年 11 月 19 日,生长的地理位置为东经 110 $^{\circ}$ 44' 20.4", 北纬

32 $^{\circ}$ 26' 11.1", 群生于海拔 900 m 左右的山坡。查阅出菇期间的当地气象资料,该菌株的出菇温度为 10~20 $^{\circ}\text{C}$, 温差 5~10 $^{\circ}\text{C}$ 。生长地主要为由杨树、构树、竹子等构成的比较稀疏的混合林,地面植被有蕨类、蒿属、悬钩子属等植物。

2.2 野生菌株的形态学鉴定

子实体(图 1)中等至大型,黄色。菌盖直径 9.1~12.2 cm,初期半球形、扁半球形,后期稍平展,中部凸起或有皱,老后边缘开裂。菌肉白色带黄色,厚。菌褶初期白色带黄色,后变黄褐色,直生,不等长,密,褶片宽 0.4~0.8 cm。菌柄细长,圆柱形,实心至空心,基部膨大,有白色绒毛,环以上部位光滑,环以下部位有桔黄至黄褐色纵向排列的颗粒状鳞片,长 11.2~20.1 cm,粗 1.3~1.8 cm。菌环上位,单层、膜质、大,上表面光滑近白色,下面有颗粒并同菌柄连系在一起,不易脱落。孢子印黄褐色。担子棍棒状,其上着生担孢子,孢子长纺锤形(图 2),表面光滑或有疣,(9.9~14.4) $\mu\text{m} \times$ (4.6~7.4) μm ;菌髓菌丝交织排列,有锁状联合存在。



图 1 野生菌株子实体

Fig. 1 Fruiting bodies of wild strains

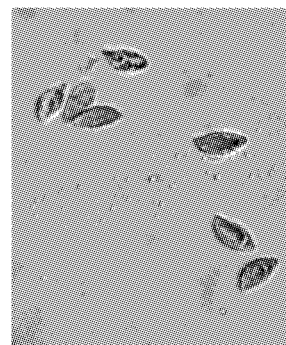


图 2 野生菌株的孢子

Fig. 2 Spores of wild strains

查阅文献并结合以上宏观与微观特征,初步鉴定该菌株为蘑菇科(Agaricaceae)褐环柄菇属(*Phaeolepiota*)的金盖褐环柄菇(*Phaeolepiota aurea*)^[1,10-11]。

2.3 野生菌株的 ITS 序列分析

测序获得野生菌株的 ITS 区域核酸序列,共 673 bp,见图 3。

将测序获得的野生菌株的 rDNA ITS 序列在 GenBank 核酸数据库进行 BLAST 比对后,发现供试菌株与登录号为 AM946522 的 *Phaeolepiota aurea* 物种的同源性为 98%(图 4)。综合考虑形态学鉴定与分子鉴定的结果,最终确定该野生菌株为金盖褐环柄菇(*Phaeolepiota aurea*)。

```
GGGTATCAGATACTTGGTGGGTTGCTGCTGGCTCTTAGGAGCATTGTGCACACTCCCAAC 60
TTTACTTCTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTGTGAAATCTCGAGTTTCCAACTT 120
GGTTTGGAGGAATTGCCGTGCACAAGCCGGCTATCCTTTTATATCTCCAAGGCTACGTT 180
TTTCATATACCCATAGTATGTTACAGAATGCAATCAATGGGCTTTATTGCCATATAAAC 240
AAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT 300
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGC 360
GCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCTTAAATTTCTCAACCTTTCCA 420
AGTTTTATACCTGGTCAGGCTTGGATTGGGGGTTGCAGGCTTCTTTCATGAAGTCAGC 480
TCTTCTTAAACACATTAGCGGAACCTTTTGTGGATCATCAATGGTGTGATAATTATCTA 540
TGCTATTGTATGCTGCAATTTATAGGGCTTCAGCTTCTAACTGTCCATTGACTTGGACA 600
ATTCTTGACCATTTGACCTCAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATA 660
AGCCGGAGAGAAA 673
```

图 3 野生菌株的 ITS 区域碱基序列

Fig. 3 ITS region nucleotide sequence of wild strains

```
Query 38 GGAGCATTGTGCACACTCCCAACTTACTTCTCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGT 97
Sbjct 1 GGAGCATTGTGCACACCCCAACTTACTTCTCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGT 60
Query 98 GAAATCTCGAGTTTCCAACTTGGTTTGGAGGAATTGCCGTGCACAAGCCGGCTATCCT 157
Sbjct 61 GAAATCTCGGGTTTCCAACTTGGTTTGGAGGAATGCCGTGCGCAAGCCGGCTATCCT 120
Query 158 TTTTATATCTCCAAGGCTACGTTTTCATATACCCATAGTATGTTACAGAATGCAATCA 217
Sbjct 121 TTTTATCTCTCCAAGGCTACGTTTTCATATACCCATAGTATGTTACAGAATGCAATCA 180
Query 218 ATGGGCTTTATTGCCTATAAAACAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGC 277
Sbjct 181 ATGGGCTTTATTGCCTATAAAACAAATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGC 240
Query 278 ATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA 337
Sbjct 241 ATCGATGAAGAAGCGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA 300
Query 338 TCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTG 397
Sbjct 301 TCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTG 360
Query 398 TCATTAAATTTCTCAACCTTTCCAAGTTTATTACCTGGTCAGGCTTGGATTGGGGGTTG 457
Sbjct 361 TCATTAAATTTCTCAACCTTTCCAAGTTTATTACCTGGTCAGGCTTGGATTGGGGGTTG 420
Query 458 CAGGCTTCTTTCATGAAGTCAGCTCTTCTTAAACACATTAGCGGAACCTTTTGTGGATC 517
Sbjct 421 CAGGTTTCTTTCATGAAGTCAGCTCTTCTTAAACACATTAGCGGAACCTTTTGTGGACC 480
Query 518 ATCAATGGTGTGATAATTATCTATGCTATTGTATGCTGCAATTTATAGGGCTTCAGCT 577
Sbjct 481 GTCAATGGTGTGATAATTATCTACGCTATTGTATGCTACAATCTTATAGGGCTTCAGCT 540
Query 578 CTAAGTGTCCATTGACTTGGACAATTCTTGACCATTTGACCTCAAAAT 624
Sbjct 541 CTAAGTGTCCATTGACTTGGACAATTCTTGACCATTTGACCTCAAAAT 587
```

图 4 供试菌株与 AM946522 ITS 序列的比对结果

Fig. 4 Results of ITS sequences comparison between wild strains and AM946522

3 结论与讨论

传统分类法主要基于形态学特征,其优势是易于观察与比较,但也存在诸多不足,由于外界环境条件、基因变异、地域分割等的原因造成了种内形态多样性较高的现象,使得分类学家对亲缘种的鉴定难免存在一定分歧。当遇到形态学方法不能有效区分疑难种时,采用分子生物学技术作为重要补充就显得尤为必要了。该研究将传统形态学鉴定与现代分子生物学鉴定结合进行综合鉴定,提高了野生菌株鉴定的准确率,也为以后的菌种资源鉴定提供了参考和借鉴的依据。

对于金盖褐环柄菇的生态环境,卯晓岚^[10]和陈康林等^[12]认为夏秋季生于针叶林或针阔混交林,还有的认为其与松树形成菌根^[11],而该研究采集于湖北的标本其生境中并无针叶树,这可能也是其生态多样性的一种体现。另外,经查阅文献,尚鲜见关于金盖褐环柄菇在湖北省分布的报道,因此,*Phaeolepiota aurea* 属于湖北省新记录种,该研究丰富了湖北省大型真菌的多样性。

该研究对金盖褐环柄菇进行了鉴定,初步了解了其生态环境和生长温度,以后应对分离的菌种进行下一步的研究,为开发其应用价值奠定更坚实的基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 姜雪,庞惟俏,杨洋,等. 两株野生紫色香蘑菌株的鉴定[J]. 北方园艺,2016(22):152-156.
- [3] 李晶,林冬梅,林占熿,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):110-111,115.
- [4] 张健,康曼,韩建荣. 一株野生蘑菇的鉴定[J]. 山西农业科学,2015,43(11):1421-1423,1446.
- [5] 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.
- [6] 张国广,邹金美,郑琳,等. 一株野生大型真菌的 ITS 分析及生物学特征研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2010,19(6):395-399.
- [7] 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,2012,28(13):176-179.
- [8] WHITE T J, BURNS T, LEE S. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[C]//INNIS M A, ed. PCR protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic, 1990:15-22.
- [9] WHITE T J, BURNS T, LEE S. PCR Protocols: A guide to methods and applications[M]. New York: Academic Press Inc, 1990:315-322.
- [10] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000:204.
- [11] 林晓民,夏彦飞,王少先,等. 河南菌物志(卷二)[M]. 北京:中国林业出版社,2012:26-27.
- [12] 陈康林,卯晓岚,黄明达. 中国抗肿瘤大型药用真菌图鉴[M]. 北京:科学出版社,2013:52.

Identification of a Wild Mushroom Based on Its Morphology and ITS Sequence

WANG Fengjian, ZHOU Xiangyu, GAN Lu

(Department of Biochemistry and Environment Engineering, Hanjiang Normal University, Shiyan, Hubei 442000)

Abstract: The ecological environment and the morphological structure of a wild mushroom picked from Saiwudang Nature Reserve were studied in this experiment. Meanwhile, the species was identified based on its morphological characteristics. Molecular identification was done by extracting its DNA, amplifying and sequencing its ITS sequence, and comparing the result with GenBank to determine the genetic relationship. The results showed that the wild strain was identified finally as the *Phaeolepiota aurea*, a new record species in Hubei Province. The result laid a foundation for the further development of its application value.

Keywords: wild mushroom; ITS sequence; identification of morphology; newly recorded species of Hubei; Saiwudang Nature Reserve