

基于 ITS 区序列的疑似野生“南华”草菇菌株的分子鉴定

刘 主¹, 蔡爱群¹, 刘静华¹, 何智丹², 孟晓东¹

(1. 韶关学院 英东生命科学院, 广东 韶关 512005; 华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510640)

摘 要:以在广东省韶关市“南华寺”周边山岭采得的 1 株疑似野生“南华”草菇菌株 VNH 为试材, 采用 ITS 序列克隆和分析, 并结合传统形态学研究对其进行分子鉴定。结果表明: 菌株 VNH 为野生“南华”草菇; 为进一步研究该野生菌株的生物学特性及驯化栽培研究提供了重要依据; 同时, 对丰富草菇菌种资源, 促进韶关文化和旅游发展具有积极意义。

关键词:草菇; 野生菌株; ITS; BLAST; 分子鉴定

中图分类号:S 646.1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0126-05

草菇(*Volvariella volvacea*)属担子菌门(Basidiomycotina)层菌纲(Hymenomycetes)伞菌目(Agaricales)光柄菇科(Pluteaceae)小苞脚菇属(*Volvariella*)^[1], 是一种典型的高温型食用菌, 是腐生性真菌。草菇肉质脆嫩、味道鲜美、营养丰富(富含氨基酸等)深受人们欢迎, 已成为经济效益高、发展前途广的菇类^[2]。

韶关“南华寺”是草菇栽培的起源地, 距今已有 300 多年的历史, 其韶关特产——“南华”草菇美味可口, 鲜嫩无比, 营养丰富; 在清朝同治年间, 已盛名遐迩, 并年有岁贡^[3]。但因种种原因, 目前韶关市的草菇市场已被外来菌种所取代, 当地“南华”草菇栽培菌种失传消失。

该项目组从“南华寺”周边山岭旁, 采得 1 株疑似野生“南华”草菇菌株, 且已通过组织分离获得该菌株的菌丝纯培养物——菌株 VNH。该试验以该疑似野生菌株 VNH 为材料, 通过 ITS 序列克隆和分析, 对其进行了分子鉴定, 旨在开发利用该菌株, 从而丰富草菇菌种资源; 同时, 也对韶关文化和旅游具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 VNH, 疑似野生“南华”草菇菌株, 采

于广东省韶关市曲江区“南华寺”周边山岭; V23、V5 为韶关市曾经及现在栽培的草菇菌株。

1.1.2 试验试剂 液体培养基(PDSB): 新鲜土豆 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 磷酸二氢钾 3 g/L, 硫酸镁 1.5 g/L。固体培养基(PDA): 液体培养基中加入琼脂 20 g/L。FDEB (Fungal DNA Extract Buffer): 50 mmol/L Tris HCl (pH 7.5), 100 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 0.3 mol/L NaAc (pH 5.2)。EDTA、NaAc、Tris、SDS、酚、氯仿、异戊醇等均为国产分析纯; DNA maker、*Taq* 酶、dNTPs、EB 染色剂等购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 引物设计与选择 草菇 ITS 序列 PCR 扩增采用真菌 ITS 通用引物: ITS1, 5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3'; ITS4, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 将草菇菌种接种于 PDSB 中, 32℃ 培养 7 d 后, 收集菌丝 1~2 g。草菇基因组 DNA 的提取采用 FDEB 法^[4], DNA 最终浓度调整为 50 ng/μL。

1.2.2 ITS 区序列 PCR 扩增 ITS 区序列 PCR 扩增主要参考 AHLAWAT 等^[5]的方法。以疑似野生“南华”草菇的 DNA 为模板, 以真菌 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增: 10×buffer(Mg²⁺ free) 5 μL; MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μL; ddH₂O 33 μL; Primer(ITS1, 4) 4 μL; dNTPs(各 2.5 mmol/L) 2 μL; DNA 模板 3 μL; *Taq* 酶(5 U/μL) 1 μL; 总体积 50.0 μL。PCR 扩增程序: 预变性 94℃ 5 min, 变性 94℃ 45 s, 退火 56℃ 1 min; 延伸 72℃ 1 min; 以上共 32 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

第一作者简介:刘主(1977-), 男, 湖南宁远人, 博士, 副教授, 现主要从事食用菌和分子生物学的教学与科研等工作。E-mail: liuzhu77@126.com

基金项目:韶关市科技计划资助项目(2013CX/K); 韶关学院大学生创新创业训练计划资助项目(Sycxcy2014-028)。

收稿日期:2015-07-27

1.2.3 PCR 扩增产物序列测定和 ITS 序列分析 将 PCR 产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行正反序列测定。将该序列在 GenBank 核酸数据库中进行 BLAST 比对^[6],在 DNA 序列数据库中搜索同源性高的序列比对分析,通过软件 DNAMAN 对该菌株与其它草菇菌株的 ITS 序列进行比对分析^[7]。

1.2.4 拮抗试验 用直径为 5 mm 的无菌打孔器分别从菌株 VNH、V5、V23 的 PDA 平板中取其菌丝块,菌株 VNH 和 V5 接种于同一 PDA 培养皿,菌株 VNH 和 V23 接种于同一 PDA 培养皿。2 块接种块间距 30 mm,分别位于距平板中心点 15 mm 处。接种后均置于 32℃ 恒温箱培养,观察拮抗反应。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

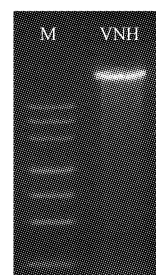
采用 FDEB 方法提取疑似野生“南华”草菇菌株 VNH 基因组 DNA,用分光光度计检测 OD_{260}/OD_{280} 的比值在 1.8~2.0,其琼脂糖电泳结果如图 1。结果显示 DNA 纯度较高,结构完整,无明显降解。

2.2 ITS 区序列 PCR 扩增

由图 2 可知,所得的产物片段大小在 500~750 bp,与预期结果一致,表明该方法提取获得的野生菌基因组 DNA 质量较好,能满足基于后续分子生物学试验。

2.3 PCR 扩增产物序列测定和 ITS 序列分析

PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行正反序列测定。将正反测序的结果用生物软件

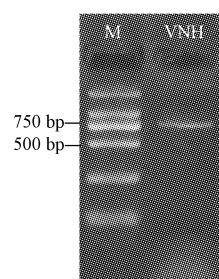


注:M 为 DNA Marker 3。

Note:M,DNA Marker 3.

图 1 草菇基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA of *Volvariella voluacea*



注:M 为 DL 2 000 DNA Marker。

Note:M,DL 2 000 DNA Marker.

图 2 ITS 序列 PCR 扩增结果

Fig. 2 Result of ITS PCR amplification

Contig Express 进行拼接,之后输入 DNAMAN 软件中进行查询,查询结果显示,疑似野生“南华”草菇的 ITS 序列为 730 bp:

```
5'CTTCCGTAGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGAATCGCACGCGGGTCGGG
CTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCAT
TCTCCACGTCCCCACCTGTGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCTCGTT
CGGCTCCCTCGGCTCTACGAGATCTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGT
TGCAGAGTGTTCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGCCCCATAGACATA
CCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCCTGTTT
GAGTGTGATCGAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTTGGG
GGCTTGGAGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCGGCTCTCC
TCAAAGGCATCAGCAGGGCCAGTCGCAGTCGGCCTCGTGGCGTTGATAGT
CCATCTACGCCCCCGCGCGCCACTCAGCGTGGCTCGGCTTCGAACCGT
CCGGCCCCCTCGAGCCGACAGGCCGACACCCCGGCTCAACCCCTTGAC
ACCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
AAGCCGGAGGAA'3
```

疑似野生“南华”草菇菌株 VNH 的 ITS 序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行 BLAST 比对。由表 1 可以看出,菌株 VNH 与部分其它草菇菌株的同源性很高。截至 2015 年 7 月 1 日,在 GenBank 数据库中登录的有 37 个菌株与菌株 VNH 的 ITS 序列相似度 $\geq 99\%$ 。

菌株 VNH 菌丝呈分枝状,透明,无锁状联合,有横

隔,互相交织形成疏松网状菌丝体,能形成红褐色厚垣孢子。子实体(图 3)由菌盖、菌柄和菌托组成。菌盖丰厚、钟形、灰黑色,菌褶呈放射状排列,与菌柄离生,初为白色,成熟转为红褐色。菌柄圆柱形,中实松软,上细下粗,白色。

通过软件 DNAMAN 比对菌株 VNH 与其它草菇菌株的 ITS 序列,由图 4 可以看出,菌株 VNH 在同源序

表 1 通过 ITS 序列分析在 GenBank 上
37 位相似品种(2015-07-01)

Table 1 The top 37 similar genres in GenBank by
ITS sequence analysis (2015-07-01)

登录编号 Accession	物种 Species	最大评分 Max score	总评分 Total score	覆盖率 Query cover/%	最大同源性 Maximum homology/%
FJ545242.1	ATCC 56903	1 190	1 190	88	100
KC142107.1	GVv-1	1 040	1 119	82	100
AY636049.1	OE-12	1 090	1 090	80	100
FJ545239.1	ATCC 62892	1 033	1 033	76	100
JN086667.1	OE-12	1 327	1 327	100	99
FJ379274.1	Vv-34	1 323	1 323	99	99
FJ379272.1	V5-1	1 315	1 315	99	99
KC142118.1	OE-273	1 304	1 304	97	99
JN086668.1	1206	1 293	1 293	96	99
JN086669.1	OE-1222	1 297	1 297	96	99
KC142108.1	OSM-1	1 290	1 290	96	99
KC142117.1	OSM-6	1 254	1 254	96	99
FJ379273.1	V23	1 304	1 304	96	99
JN086670.2	OE-210	1 242	1 242	95	99
KC142109.1	OSM-2	1 286	1 286	95	99
KC142110.1	OSM-3	1 286	1 286	95	99
KC142111.1	OSM-4	1 280	1 280	95	99
KC142114.1	OSM-8	1 245	1 245	95	99
JN086660.1	Vv-2(V)	1 245	1 245	95	99
JN086664.1	BBH-05	1 271	1 271	94	99
JN086662.1	OE-272	1 273	1 273	94	99
JN086665.1	OE-305	1 238	1 238	94	99
JN086661.1	Vv-4(V)	1 232	1 232	94	99
HQ99973.1	ATCC MYA-4696	1 232	1 232	94	99
JN086673.1	Vv-01	1 234	1 234	93	99
KC142116.1	OSM-10	1 206	1 206	91	99
JN086666.1	OE-156	1 192	1 192	90	99
JN086678.1	OE-55-08	1 212	1 212	90	99
KC142119.1	OE-55	1 118	1 200	89	99
JN086680.1	WW-08	1 103	1 195	88	99
HM367073.1	NIH1001	1 144	1 144	87	99
KC142115.1	OSM-9	1 146	1 146	87	99
KC142112.1	OSM-5	1 144	1 144	86	99
AY636050.1	OE-140	1 131	1 131	85	99
AY636051.1	OE-139	1 040	1 100	82	99
AY632077.1	OE-55	1 038	1 095	81	99
KJ170366.1	CN 8	660	660	49	99

注:物种名称前面都有 *Volvariella volvacea* strain(如 *Volvariella volvacea* strain OE-273)。

列的差异不明显。rDNA ITS 区序列相似性 $\geq 99\%$,鉴别为相同种;序列相似性大于 95% 且小于 99% ,鉴别为相同属;序列相似性 $\leq 95\%$,鉴别为相同科^[8]。根据此分析准则,结合菌株 VNH 菌丝和子实体的形态特征,确定



图 3 疑似野生“南华”草菇菌株
VNH 子实体

Fig. 3 The fruiting body of suspected wild
'Nanhua *V. volvacea*' strain VNH

该疑似野生“南华”草菇菌株 VNH 为草菇菌株。

2.4 拮抗试验

拮抗反应是鉴定草菇菌株间差异的传统方法,菌丝之间的拮抗反应是草菇菌株间不同遗传特性的重要表现。由图 5 拮抗试验结果表明,菌株 VNH 与菌株 V5 之间、菌株 VNH 与菌株 V23 之间均具有明显的拮抗线,存在拮抗反应。说明菌株 VNH 与菌株 V23、V5 间均有较大的遗传差异,不是相同品种。另外,相比栽培菌株,菌株 VNH 具有子实体大、颜色黝黑、外包被特薄、容易开伞、菌盖丰厚等特点(图 3),故初步确定该疑似野生“南华”草菇菌株 VNH 为野生草菇菌株。

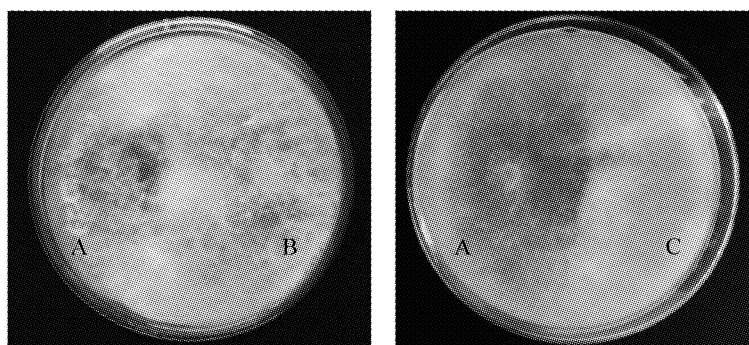
3 结论与讨论

该试验通过 ITS 序列克隆和分析,对疑似野生“南华”草菇菌株 VNH 进行分子鉴定,结合传统形态学研究,初步确定菌株 VNH 为野生草菇菌株,为进一步研究该野生菌株的生物学特性及驯化栽培研究提供了重要依据,具有一定的研究价值。同时,对丰富草菇菌种资源,促进韶关文化和旅游发展具有积极意义。

野生生物资源为生物资源的有效利用和开发奠定了基础,对野生大型真菌种质资源的收集、驯化,已成为当前科研工作的一个重点。然而,过去对于野生大型真菌的鉴定多依据形态学的分类,由于这些依据指标存在一定的主观性,且这些特征会随着生长条件的改变而发生变化,这给依据形态特征的传统分类带来了困难,特别是对于那些形态特征非常相近的种,更难准确区分。

1 026	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	113	1 026	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	153
ATCC 56903	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	72	ATCC 56903	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	152
ATCC MYA-469	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	118	ATCC MYA-469	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	158
ATCC 62892	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	54	ATCC 62892	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	94
BBH-05	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	97	BBH-05	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	137
CN 8	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	89	CN 8	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	129
GVv-1	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	57	GVv-1	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	97
NIH1001	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	83	NIH1001	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	123
OE-12	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	114	OE-12	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	154
OE-12(100)	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	40	OE-12(100)	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	80
OE-55(81)	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	60	OE-55(81)	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	100
OE-55	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	102	OE-55	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	142
OE-55-08	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	89	OE-55-08	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	129
OE-139	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	60	OE-139	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	100
OE-140	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	59	OE-140	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	99
OE-156	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	67	OE-156	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	107
OE-210	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	97	OE-210	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	137
OE-272	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	98	OE-272	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	138
OE-273	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	111	OE-273	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	151
OE-305	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	98	OE-305	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	138
OE-1222	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	100	OE-1222	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	140
OSM-1	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	99	OSM-1	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	139
OSM-2	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	98	OSM-2	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	138
OSM-3	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	97	OSM-3	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	137
OSM-4	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	97	OSM-4	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	137
OSM-5	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	69	OSM-5	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	109
OSM-6	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	101	OSM-6	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	141
OSM-8	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	97	OSM-8	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	137
OSM-9	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	71	OSM-9	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	111
OSM-10	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	69	OSM-10	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	109
V5-1	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	119	V5-1	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	159
V23	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	117	V23	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	157
Vv-01	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	99	Vv-01	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	323
Vv-2(v)	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	99	Vv-2(v)	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	139
Vv-4(v)	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	99	Vv-4(v)	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	139
Vv-34	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	118	Vv-34	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	158
Ww-08	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	94	Ww-08	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	134
VNH	CAGGTGACGCCCC	TCCCGGACGCGCTTCCATTCTCCACGT	113	VNH	CCCCACCTGTGCACTTCTGTAGGCGGTGAAGCCGCGCTCG	153
Consensus	caagtgacgcccc	tcccgacgcgcttccattctccacgt		Consensus	ccccacctgtgcaacttctgtaggcggtgaagccgcgctcg	
1 026	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	233	1 026	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	433	
ATCC 56903	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	192	ATCC 56903	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	392	
ATCC MYA-469	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	237	ATCC MYA-469	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	437	
ATCC 62892	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	174	ATCC 62892	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	374	
BBH-05	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	209	BBH-05	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	417	
CN 8	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	177	CN 8	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	377	
GVv-1	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	202	GVv-1	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	402	
NIH1001	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	234	NIH1001	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	434	
OE-12	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	160	OE-12	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	360	
OE-12(100)	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	180	OE-12(100)	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	382	
OE-55(81)	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	220	OE-55(81)	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	420	
OE-55	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	206	OE-55	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	380	
OE-55-08	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	180	OE-55-08	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	409	
OE-139	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	186	OE-139	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	379	
OE-140	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	216	OE-140	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	386	
OE-156	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	218	OE-156	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	416	
OE-210	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	231	OE-210	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	418	
OE-272	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	217	OE-272	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	431	
OE-273	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	220	OE-273	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	417	
OE-305	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	220	OE-305	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	420	
OE-1222	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	218	OE-1222	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	410	
OSM-1	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	218	OSM-1	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	418	
OSM-2	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	217	OSM-2	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	417	
OSM-3	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	188	OSM-3	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	388	
OSM-4	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	220	OSM-4	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	420	
OSM-5	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	216	OSM-5	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	416	
OSM-6	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	190	OSM-6	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	390	
OSM-8	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	188	OSM-8	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	388	
OSM-9	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	237	OSM-9	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	437	
OSM-10	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	233	OSM-10	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	433	
V5-1	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	218	V5-1	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	418	
V23	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	218	V23	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	418	
Vv-01	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	238	Vv-01	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	438	
Vv-2(v)	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	214	Vv-2(v)	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	414	
Vv-4(v)	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA	233	Vv-4(v)	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC	433	
Vv-34	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA		Vv-34	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC		
Ww-08	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA		Ww-08	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC		
VNH	GAGAAAAACGCTGTTGACAGAGTGTCTTGTACGACCGGGGA		VNH	GGAAGAGCATGCGCTGTTGAGTGTGATCGAATCTCTCAAGC		
Consensus	gagaaaaacgctgttgacagagtgtcttgtacgacgggga		Consensus	ggaagagcatgctgtttgagtgatcgaaatctctcaagc		
1 026	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	473	1 026	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	593	
ATCC 56903	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	432	ATCC 56903	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	552	
ATCC MYA-469	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	477	ATCC MYA-469	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	596	
ATCC 62892	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	414	ATCC 62892	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	534	
BBH-05	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	457	BBH-05	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	577	
CN 8	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	417	CN 8	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	537	
GVv-1	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	442	GVv-1	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	561	
NIH1001	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	474	NIH1001	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	594	
OE-12	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	400	OE-12	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	520	
OE-12(100)	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	420	OE-12(100)	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	540	
OE-55(81)	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	462	OE-55(81)	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	582	
OE-55	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	420	OE-55	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	569	
OE-55-08	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	420	OE-55-08	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	540	
OE-139	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	419	OE-139	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	539	
OE-140	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	426	OE-140	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	545	
OE-156	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	456	OE-156	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	575	
OE-210	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	458	OE-210	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	578	
OE-272	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	471	OE-272	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	591	
OE-273	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	457	OE-273	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	576	
OE-305	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	460	OE-305	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	580	
OE-1222	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	458	OE-1222	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	579	
OSM-1	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	437	OSM-1	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	578	
OSM-2	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	458	OSM-2	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	577	
OSM-3	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	457	OSM-3	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	577	
OSM-4	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	428	OSM-4	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	547	
OSM-5	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	460	OSM-5	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	579	
OSM-6	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	456	OSM-6	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	575	
OSM-8	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	430	OSM-8	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	549	
OSM-9	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	428	OSM-9	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	547	
OSM-10	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	479	OSM-10	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	599	
V5-1	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	477	V5-1	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	593	
V23	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	458	V23	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	577	
Vv-01	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	458	Vv-01	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	577	
Vv-2(v)	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	478	Vv-2(v)	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	598	
Vv-4(v)	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	454	Vv-4(v)	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	574	
Vv-34	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT	473	Vv-34	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA	593	
Ww-08	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT		Ww-08	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA		
VNH	CACGCGCGCGCTTCTCCCGGCGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT		VNH	CGCTTGATAGTCCATCTACGCCCCCCCCCGGCGCGCACTCA		
Consensus	cacgcgcgcgcttctcccgcgcttttgggggcttggagtt		Consensus	cgcttgatagtcctatctacgccccccccggcgcgcaactca		

图4 疑似野生“南华”草菇菌株 VNH 与已登录的相近 *V. voluacea* ITS 的序列差异Fig. 4 Difference of ITS sequence between suspected wild ‘Nanhua’ *V. voluacea* strain VNH and registered similar *V. voluacea* strains



注:A为菌株 VNH,B为菌株 V23,C为菌株 V5.

Note:A, strain VNH; B, strain V23; C, strain V5.

图 5 拮抗反应

Fig. 5 Antagonistic reaction

分子生物学的快速发展为大型野生真菌的鉴定提供了准确而又便捷的方法。其中,rDNA 的 ITS 区同时具有保守区和多变区。18S、5.8S 和 28S 的序列在进化中趋于保守,种间变化小;然而,内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 作为非编码区,最终不加入成熟核糖体,受到的选择压力较小,进化速度快且变异速度存在着较大的种间差异,适合种及种以下水平的分类研究^[9]。在真菌的分子鉴定中,依据 RENSKE 等^[8]的观点:如被鉴定菌种的 rDNA ITS 序列相似性达到或超过 99%,即可认为它们是相同种。课题组认为,必须从分子生物学的角度结合传统形态学研究进行真菌鉴定。

参考文献

- [1] 张树庭,游中骥. 草菇及其栽培[M]. 香港:香港艺美图公司出版,1978.
- [2] 龚明,鲍大鹏,汪虹,等. 草菇的系统分类地位及分化时间[J]. 食用菌学报,2013,20(2):8-11.

- [3] 韩继刚. 草菇生产全书[M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [4] WANG J, GUO L Q, ZHANG K, et al. Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Volvariella volvacea* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 8524-8527.
- [5] AHLAWAT O P, GUPTA P, KAMAL S, et al. Variability in intra-specific and monosporous isolates of *Volvariella volvacea* based on enzyme activity, ITS and RAPD [J]. Indian Journal of Microbiology, 2010, 50(2): 192-204.
- [6] 侯军,林晓民,江芸,等. 基于 ITS 序列分析对疑似白羊肚菌株的分子鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 141-144.
- [7] 高磊,徐彪,何刚,等. 基于 ITS 区序列的疑似野生双孢菇菌株的分子鉴定[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 31-33.
- [8] RENSKE L, PAULA L, THOM W K, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 327-333.
- [9] 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.

Molecular Identification of Suspected Wild 'Nanhua' *Volvariella volvacea* Strain Based on Internal Transcribed Spacer Sequence

LIU Zhu¹, CAI Aiqun¹, LIU Jinghua¹, HE Zhidan², MENG Xiaodong¹

(1. Yindong College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005; 2. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640)

Abstract: A suspected wild 'Nanhua' *Volvariella volvacea* was picked beside the mountains next to Nanhua temple in Shaoguan city of Guangdong Province. The pure culture was obtained by tissue isolation and was named strain VNH. The strain was identified by molecular identification with ITS sequence cloning and analyzing and combine with the traditional morphological. The results showed that, VHN strain was wild 'Nanhua' *V. volvacea*. It provided an important basis on the studies of biological characteristics and domestication cultivation for the wild strain. Meanwhile, it had a positive significance to enrich *V. volvacea* species resources and to promote the development of Shaoguan culture and tourism.

Keywords: *Volvariella volvacea*; wild strain; ITS sequence; BLAST; molecular identification