

柳蘑生物学特性及 ITS 序列分析

张 薇, 谢凤颖, 王占斌

(东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:对柳蘑生物学特性进行比较研究,结果表明:柳蘑菌丝生长适宜温度为 20~30℃,最适温度为 25℃;生长的最适光照条件是全黑暗;生长的 pH 为 5~11,最适生长 pH 为 6;最适碳源为蔗糖,葡萄糖次之;最适氮源为硝酸钾,谷氨酸次之。核糖体转录间隔区(Internal Transcribed Spacer)PCR 扩增结果表明,其属担子菌与已知大型真菌 *Pholiota adiposa* 序列同源性达 99%。

关键词:柳蘑;生物学特性;核糖体转录间隔区

中图分类号:S646.1⁺9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)03-0018-03

柳蘑 [*Pholiota adiposa* (Fr.) Quel.] 属担子菌门(Basidiomycota),伞菌目(Agaricales),球盖菇科(Strophariaceae),鳞伞属(*Pholiota*),别称多脂鳞伞、黄蘑、黄柳菇等。柳蘑属低温型野生菌,常见于 8~10 月份的柳树树干或枯枝基部,主要分布黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、浙江、甘肃、青海、河南、广西、四川等地^[1]。该菇富含蛋白质、碳水化合物、维生素及多种矿物质元素,食之黏滑爽口,味道鲜美,风味独特,对人体精力、脑力的恢复有良好效果,并且具有抗癌作用^[2-3]。

虽然柳蘑营养保健价值高,但国内对柳蘑的开发起步较晚,有关柳蘑的研究 20 世纪末至 21 世纪初才逐渐开始。近年来,我国和日本已对柳蘑的人工驯化栽培进行了研究,但由于对柳蘑的生物学特性了解不够完善,人工栽培产量比较低、因而未得到全面开发,但柳蘑在日本和我国非常畅销,而且价格昂贵。随着人们对柳蘑食(药)用价值认识的逐步深入,其在食品及药品行业的需求也将越来越大^[4-6]。

核糖体基因 ITS 区段属于保守的区段,其保守性基本上表现为种内相对一致,种间差异较为明显,这种特点使 ITS 区段的 DNA 序列非常适合作为从分子水平上鉴定物种的靶序列。现对柳蘑生物学特性进行比较研究,并进行核糖体基因 ITS 区段的特异性扩增,从而为更科学地划分物种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种 柳蘑(黄伞)(*Pholita adiposa*)从吉林敦化石门子林场分离得到。

1.1.2 培养基及药品 PDA 培养基:马铃薯、琼脂、葡萄糖(蔗糖)和水;查氏培养基:NaNO₃、K₂HPO₄、KCl、MgSO₄、FeSO₄、蔗糖(C₁₂H₂₂O₁₁)、琼脂和水;其它药品:淀粉(C₆H₁₀O₅)、KNO₃和谷氨酸(C₁₉H₁₉N₇O₆)^[7]。

1.2 方法

1.2.1 不同温度对菌丝生长的影响 采用 PDA 培养基,每处理 3 次重复,培养皿接种后分别在 5、10、20、25、30、35℃下培养,观察记录菌丝生长情况并定期测量菌落直径。

1.2.2 不同光照条件对菌丝生长的影响 采用 PDA 培养基,每处理 3 次重复,接种后分别在全黑暗、全光照和光暗交替(各 12 h)3 种不同的光照条件下培养,观察菌丝生长情况并记录。

1.2.3 不同酸碱度对柳蘑菌丝生长的影响 采用 PDA 培养基,将 pH 调至 5、6、7、8、9、10、11、12,每处理 3 次重复,接种后置于 25℃培养箱中培养,观察菌丝生长情况并记录。

1.2.4 不同碳源对柳蘑菌丝生长的影响 以查氏培养基作为碳源试验基本培养基,分别用葡萄糖、淀粉和无碳源代替蔗糖,pH 自然。每种培养基设 3 次重复,25℃下培养观察菌丝生长情况并记录。

1.2.5 不同氮源对柳蘑菌丝生长的影响 以查氏培养基作为氮源试验基本培养基,分别用谷氨酸、尿素及无氮源代替硝酸钠,每种培养基设 3 次重复,25℃下培养观察菌丝生长情况并记录。

1.3 柳蘑 ITS 分子鉴定

通过合成通用引物 ITS1 和 ITS4,提取柳蘑菌丝基因组 DNA 后,对其进行核糖体基因 ITS

收稿日期:2011-01-12

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(DL09EAQ02);东北林业大学本科生基金资助项目

第一作者简介:张薇(1984-),女,河北省巨鹿县人,硕士,从事森林病理学研究。E-mail:zhangweianan@163.com。

通讯作者:王占斌(1969-),男,宁夏回族自治区彭阳市人,副教授,从事森林病理学研究。E-mail:wangzbchina@yahoo.com.cn。

区段的特异性扩增^[8-10]。扩增反应的条件为: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 1 min, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 39 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。对 PCR 扩增结果连接到测序载体后送至上海生物工程技术服务有限公司测序并对结果进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 温度对柳蘑菌丝生长的影响

柳蘑属于中温型食用菌, 在 10~30℃ 均能生长(见图 1), 其适宜生长的温度是 20~30℃, 在此温度范围内菌丝生长速度较快。最适生长温度是 25℃, 在此温度下菌丝生长速率最快, 菌丝浓密粗壮, 生命力强。5℃ 时, 菌丝生长受抑制, 生长极其缓慢; 35℃ 时, 菌丝受高温烧伤, 几乎不生长^[11]。

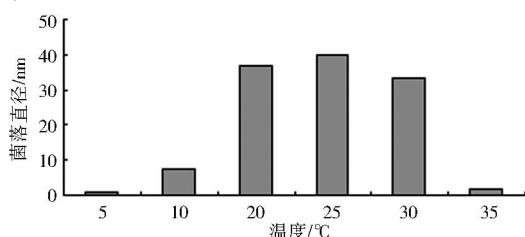


图 1 不同温度条件下菌丝生长情况

2.2 光照对柳蘑菌丝生长的影响

光照对柳蘑菌丝体生长的影响差异性呈极显著水平(见图 2)。在全黑暗条件下, 柳蘑菌丝生长迅速, 且菌丝浓密粗壮; 全光照条件下, 菌丝生长缓慢, 颜色黄色。由于全黑暗培养有助于菌丝生长, 并能延缓菌丝老化, 所以在栽培中, 应尽量在全黑暗条件下培养, 以避免菌丝老化而降低其商业价值。而光暗交替菌丝生长最慢。全光照条件下, 柳蘑菌丝体很早从营养生长进入生殖生长, 这在菌种选育上有着重要意义。

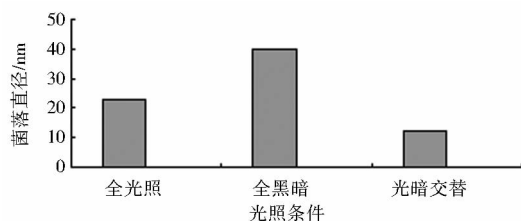


图 2 不同光照条件下菌丝生长情况

2.3 酸碱度对柳蘑菌丝生长的影响

适宜柳蘑菌丝体生长的 pH 为 5~11, 菌丝的最适宜 pH 为 6(见图 3), 在这个 pH 的培养基中菌丝生长最旺盛且粗壮; 当 pH 为 12 时, 菌丝生长缓慢, 生长势很弱。

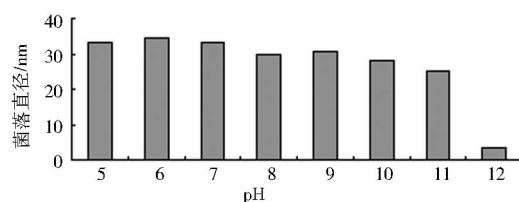


图 3 不同 pH 条件下菌丝生长情况

2.4 碳源对柳蘑菌丝生长的影响

碳源是菌丝体生长最重要的营养来源和能量来源之一。在含蔗糖培养基中柳蘑菌丝生长速度最快, 无碳培养基次之, 葡萄糖和淀粉培养基比较慢(见图 4)。在培养过程中观察到含蔗糖和葡萄糖培养基菌丝生长健壮, 浓密。无碳培养基中的菌丝生长虽快, 但菌丝较散且细弱, 生命力不强。因此, 柳蘑菌丝生长最适宜的碳源为蔗糖。

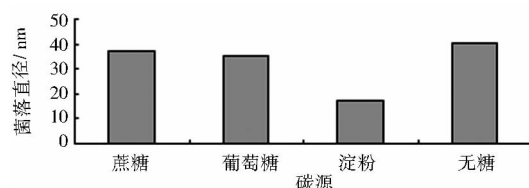


图 4 不同碳源条件下菌丝生长情况

2.5 氮源对柳蘑菌丝生长的影响

柳蘑菌丝在无氮的条件下生长最迅速, 硝酸钾次之, 谷氨酸其次, 尿素生长速度最慢。无氮条件下, 菌丝生长速度虽然最快, 但菌丝散且细弱, 因此氮源对于柳蘑菌丝生长不可缺少。在含硝酸钾的培养基中, 菌丝体生长速度快、健壮和浓密, 长势良好, 是柳蘑菌丝生长的最适宜氮源(见图 5)。

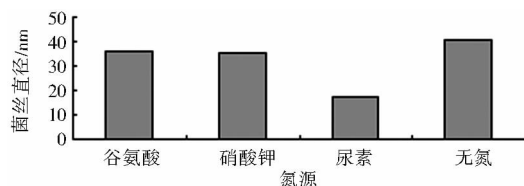


图 5 不同氮源条件下菌丝生长情况

2.6 柳蘑 ITS 区段扩增结果分析

对柳蘑的测序结果递交到 NCBI 基因库(序列号为: EU652950)。该片段共有 644 个碱基, 对得到的序列与同类 18 个已知序列利用 DNA-MAN 和 PrimerPremier5.0 软件进行分析(见图 6), 结果表明, 有 2 种大型真菌 *Pholiota adiposa* 和 *Basidiomycete* sp 与被比较的 ITS 区段 DNA 序列非常相似, 同源性达 99%。*Pholiota adiposa* 和 *Pholiota aurivella* 菌同源性达到 98%。因此可以断定该试验分离得到的菌种属于担子菌的 *Pholiota adiposa*。

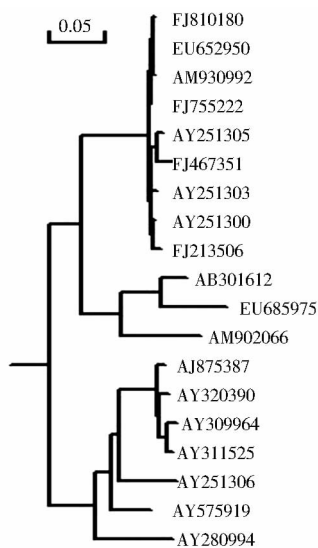


图 6 ITS 序列系统发育树

3 讨论

我国菌物资源丰富,但食用菌资源大都处于野生状态,并没有得到有效的利用与开发。另外,食用菌栽培投入少,见效快,是农民增加收入的一项产业,柳蘑含有丰富的蛋白质、碳水化合物、维生素及多种矿物质元素,并且有多种药用价值,是市场价值甚高的新兴食用菌。因此,驯化野生食用菌,开发食用菌新产品,具有深远的意义^[12-14]。

该试验核糖体 ITS 区段的特异性扩增结果与传统形态学鉴定结果相吻合,说明该分子鉴定方法是切实可行的。新测出的 DNA 序列登录到互联网上的 DNA 序列数据库中,可帮助人们更加深入地认识 ITS 区段 DNA 序列在物种内的变异范围,有助于更科学地划分物种。

参考文献:

[1] 崔颂英,杨玉娜.野生黄伞Ph-1的生物学特性和栽培

技术[J].食用菌,2003,25(1):13-14.

[2] 刘前进.黄伞的特性及人工驯化栽培[J].食用菌,1994,16(6):9-10.

[3] 侯军,杜爱玲,石立三.黄伞园艺一号生物学特性研究[J].食用菌,2006(2):15-17.

[4] 黄年来.中国食用菌百科[M].北京:中国农业出版社,1993.

[5] Kinugawa K, Komatsu S. Commercial cultivation of *Pholiota adiposa* on a sawdust-rice bran substrate[J]. Environment Control in Biology, 1979, 17: 123-126.

[6] 卯晓岚.中国大型真菌[M].郑州:河南科学技术出版社,2000.

[7] 潘保华,李彩萍,朱生伟,等.黄伞培养料配方的筛选及出菇技术的优化试验[J].食用菌,2004(2):22-23.

[8] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]// Michael A. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990, 282-287.

[9] Wen J, Zimmer Z A. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the Ginseng Genus, Araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal RNA[J]. Molec phylogen and Evol., 1996, 6(2): 167.

[10] Kita Y, Ito M. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Aconitum* Subgenus *Aconitum* (*Ranunculaceae*), with special reference to extensive polymorphism in individual plants[J]. Plant Systematics and Evolution, 2000, 225: 1-13.

[11] 李荣春,付子艳,李信.黄伞菌丝营养特性研究[J].食用菌学报,2001,8(1):19-23.

[12] 向敏.我国食用菌产业发展的现状问题和对策[J].中国蔬菜,2003(6):1-3.

[13] Hennon P E. Are heart rot fungi major factors of disturbance in Gap-Dynamic forests [J]. Northwest Science, 1995, 64(4): 284-293.

[14] Lynn M P, Susan V D, Thomas C M, et al. Comparison of general fungal and basidiomycete-specific ITS primers for identification of wood decay fungi [J]. Forest products journal, 2008, 58(4): 66-71.

Biological Characteristics and ITS Sequence Analysis of *Pholiota adiposa*

ZHANG Wei, XIE Feng-ying, WANG Zhan-bin

(Forestry College of Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: The biological characteristics of *Pholiota adiposa* were compared. The results showed that the temperatures appropriate to its mycelia growth was 20~30℃, the best one was 25℃. The best illumination condition was entire darkness. The pH appropriate to its mycelia growth was 5~9, the best one was 6. The best carbon source was sucrose, the second was glucose. The internal transcribed spacer region(ITS) was sequenced to determine whether the DNA sequence data supported the experimental result. The phylogenetic tree for the 19 pieces of homologous sequences were analyzed with the highest homology reaching 99%.

Key words: *Pholiota adiposa*; biological characteristics; ITS