

刘月廉,黄佳棋,林晓玲,等.一株野生热带小奥德蘑菌株的鉴定及出菇试验[J].黑龙江农业科学,2019(12):102-105.

一株野生热带小奥德蘑菌株的鉴定及出菇试验

刘月廉,黄佳棋,林晓玲,周禹含,汤健蓉
(广东海洋大学农学院,广东湛江 524088)

摘要:为选育适合高温期生产的食用菌品种,对采自雷州半岛高温期发生的野生蘑菇子实体进行组织分离,得到菌株 YYY。通过对野生子实体的形态特征和分离菌株 YYY 的 ITS 序列分析,鉴定该野生蘑菇为热带小奥德蘑或淡褐奥德蘑 [*Oudemansiella canarii* (Jungh.)]。通过菌种的制备及培养,在 28~34 ℃ 条件下成功栽培出菌株 YYY 的子实体,其前二潮菇的生物学效率为 76.8%。

关键词:热带小奥德蘑;高温菌株;形态学;ITS 分析;栽培

目前我国食用菌品种很多,但多数属于中低温型,高温型品种稀缺^[1]。而适合工厂化栽培的菌种一直是外国菌种占主导地位,日韩垄断的是木腐菌、欧美垄断的是草腐菌,属于“中国造”的菌种少,我国自主品种缺乏^[2]。当前我国夏季鲜菇市场品种稀缺,品种结构单一,季节对于栽培的效率仍旧是决定性因素^[3]。因此,选育具有自主产权、适合高温期生产的食用菌品种迫在眉睫。

雷州半岛,地处中国大陆最南端,与海南岛隔海相望,全年气温偏高,在这种气候条件下的大多数生物种类表现为适高温生长的生物学特性。已有报道,在雷州半岛发现的许多蘑菇种类多数为耐高温的品种^[4-6],这对丰富我国食用菌耐高温品种资源具有重大意义。2018 年 6 月 15 日,在雷州半岛的鹰峰岭进行蘑菇资源调查(当日当地气温为 31.3 ℃,该月平均气温为 31.5 ℃),发现了一株野生蘑菇子实体,生长于一株枯死的红刺露兜 (*Pandanus utilis* Bory) 树茎干上,采回进行组织分离并鉴定,结果如下。

2 材料与方 法

2.1 材 料

2.1.1 菌株来源 野生子实体采集自广东省雷州市英利镇鹰峰岭(海拔高度 247 m)一株枯死的红刺露兜 (*P. utilis*) 树茎干上,保存于广东海洋大

学农学院微生物实验室;采集人:刘月廉;采集时间:2018 年 6 月 15 日;采集地植被保护良好。

1.1.2 供试试剂及培养基 供试试剂主要有 75% 酒精、TaKaRa 公司供应的真菌 DNA 提取试剂盒、MightyAmp DNA Polymerase Ver. 2 试剂盒配制 50 μL PCR 反应体系,含 1×MightyAmp Buffer 和 ITS5 和 ITS4 合成引物。

母种分离纯化及培养的 PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,水 1 000 mL。原种及栽培种培养基:考虑到野生子实体生长基质木质化程度不高,参考木腐菌常用培养基配方及相关文献^[7],设置木屑 50%,棉籽壳 29%,麸皮 20%,碳酸钙 1% 的培养基。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的分离及纯化 采用组织分离法在 PDA 平板上培养(28 ℃,5 d)及纯化于 PDA 试管中培养获得纯菌株(28 ℃,12 d),置于室温保藏箱中备用。

1.2.2 菌株的鉴定 子实体形态学观察:子实体形态特征观察,包括子实体形状、大小、颜色等;显微形态观察,在 Nikon 生物显微镜下观测担子、担子和担孢子等形态和大小;参考相关文献进行形态学初步鉴定。

菌株的 18S rDNA ITS 序列分析:用无菌牙签挑取 PDA 上的菌丝体,按照 DNA 提取试剂盒的流程提取 DNA。用 70% 乙醇清洗 DNA 并晾干。将风干的 DNA 溶于 100 μL TE 溶液中,4 ℃ 备用。用引物 ITS5 和 ITS4^[5] 扩增菌株 18S rDNA 的 ITS 区。引物序列为 ITS4:5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3'; ITS5:5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG-3'。PCR 反应体

收稿日期:2019-07-30

基金项目:广东省科技计划项目(2014A020208119);广东省自然科学基金项目(2016A030313746);湛江市科技项目(2016B01038)。

第一作者简介:刘月廉(1965-),女,博士,教授,从事食用菌资源与利用研究。E-mail:mushwoman@126.com。

通讯作者:刘月廉(1965-),女,博士,教授,从事食用菌资源与利用研究。E-mail:mushwoman@126.com。

系(25 μL):10 \times 缓冲液 2.5 μL ,dNTPs(2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μL ,引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)各 1 μL ,Taq 酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.25 μL ,模板 DNA 2 μL ,ddH₂O 18.25 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,15 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 4 μL PCR 产物,用 1% 琼脂糖凝胶(TAE 缓冲液)电泳,EB 染色,凝胶成像仪拍照。纯化的 PCR 产物送至北京华大生物技术有限公司(深圳)测序。将 ITS 序列提交至 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) GenBank 并与 NCBI 数据库 GenBank 的序列进行比对(Blast),找出与之相似性最大的序列,用 MEGA7.0 建立系统进化树。

1.2.3 出菇方法 母种制备:将纯化菌株扩大于 PDA 试管中培养(28 $^{\circ}\text{C}$,12 d),菌丝长满斜面,得母种。

原种和栽培种的制备:按上述原种培养料配方及常规方法拌料,总干料重 2.5 kg,装入 500 mL 的原种瓶中(约 2/3 瓶),共 20 瓶。清洁及封口后在 121 $^{\circ}\text{C}$,0.11 MPa 下灭菌 90 min。待冷却后将母种接种培养(28 $^{\circ}\text{C}$,20 d),菌丝长满瓶子,得原种。共 20 瓶。

按上述栽培种培养料配方及常规方法拌料,总干料重 10 kg,装入 17 cm \times 35 cm 聚丙烯袋中,共 20 袋。清洁及封口后在 121 $^{\circ}\text{C}$,0.11 MPa 下灭菌 90 min。待冷却将原种接种培养(28 $^{\circ}\text{C}$,40 d),菌丝长满袋子,得栽培种。

出菇管理:菌丝长满袋,并且表层菌丝开始变褐时打开菌包袋子封口,将菌包竖排放置,在 28~34 $^{\circ}\text{C}$ 、遮光、空气相对湿度 85%~90% 条件下培养。当菇长至菌盖开始平展时,采收。统计前二潮菇产量,并计算生物学效率。

生物学效率(%)=新鲜菇重/ \times 100。

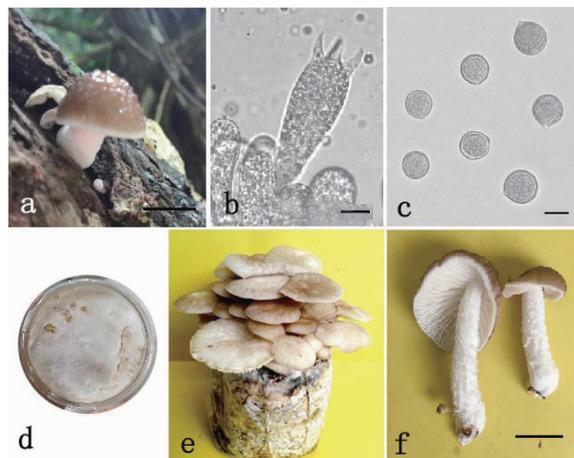
2 结果与分析

2.1 菌种分离纯化

通过对野生子实体的组织分离,获得纯的菌丝培养物,菌株编号为 YYY。

2.2.1 菌株的鉴定 子实体形态学观察:野生子实体呈现伞状,较小,菌盖直径 1.6 cm,表面褐色不平。菌肉白色。菌褶白色较稀,不等长,直生。菌柄长 1.7 cm,基部稍弯,白色,表面有白色纤毛,内部较松,实心(图 1-a)。担子无隔,产 4 个担

孢子(图 1-b)。担孢子卵圆形至近球形,13.73~15.64 $\mu\text{m}\times$ 10.91~12.73 μm (图 1-c)。分离菌株在 PDA 平板上的菌落呈白色,菌丝粗壮,培养后期变褐老化(图 1-d)。人工培养的子实体形态与野生的子实体相一致,只是菌盖较大,直径达 2~5 cm(图 1-e 和 f)。形态特征与文献报道的热带小奥德蘑^[8-10],别名淡褐奥德蘑[*Oudemansiel-la canarii*(Jungh.) Hohne]相近^[11]。



a:野生子实体形态;b:担子;c:担孢子;d:菌株 YYY 在 PDA 中的菌落特征;e:栽培出菇状态;f:人工栽培子实体个体;a,f 中的标尺为 10 mm;b,c 中的标尺为 10 μm

a: The wild fruit body; b: Basidium; c: Basidiospore; d: Colony of the strain YYY on PDA; e: Cultivated mushroom; f: Individual by cultivation; a, f: Scale=10 mm; b, c: Scale=10 μm

图 1 野生菌株 YYY 形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the wild strain YYY

菌株的 18S rDNA ITS 序列分析:研究结果表明,扩增得到菌株 YYY 的 ITS 序列片段的长度为 786 bp,经正反双向测序验证表明,双向测序结果基本一致。测序片段向 GenBank 提交,获得登录号为 MK336783.1。

将菌株 YYY 的 ITS 序列在 NCBI 上进行 Blast 比对,结果表明与登录号为 KU647631.1 和 KR265132.1 的同源性最高,达到 99.87%~100.00%。进一步采用 MEUA V7.0 软件的邻近相邻法,选择形态及 ITS 序列相近种,并以遗传距离较远的二孢拟奥德蘑(*Hymenopellis raphanipes*)为外群与之构建系统发育树。根据 NJ 法构建的 ITS(786 bp)系统发育树可得出,本研究菌株 MK336783.1 与 *O. canarii*(KU647631.1 和 KR265132.1)形成 1 个单系群(自举值为 99%),但与其他种有较大的遗传距离(图 2)。

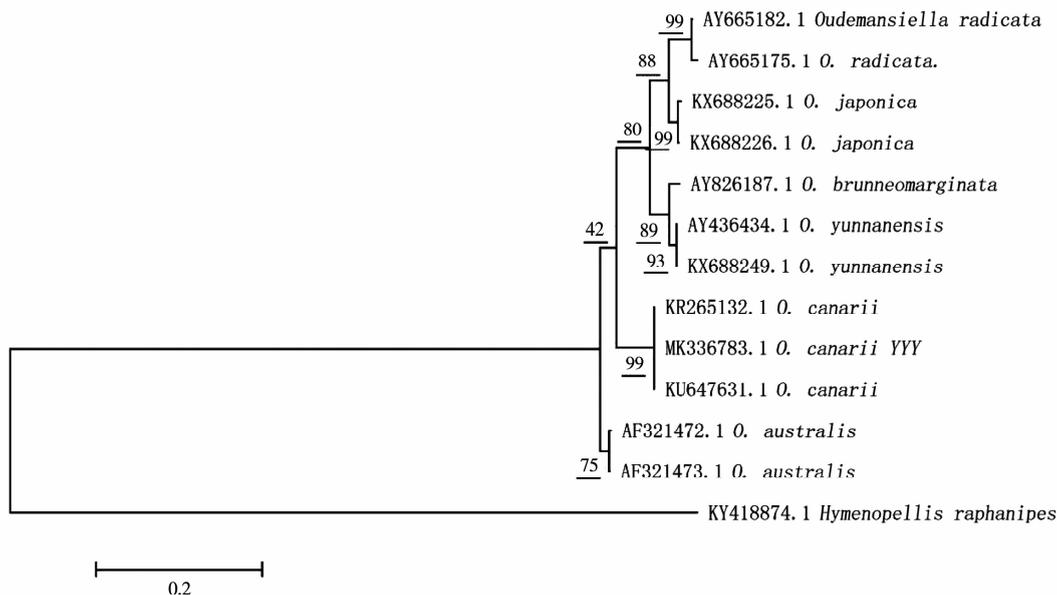


图2 菌株 YYY 与奥德蘑相近种 ITS 序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of isolate YYY and other relative species of *Oudemansiella* based on sequences of ITS region

综合形态学和 18S rDNA ITS 序列分析结果,鉴定 YYY 菌株为 *O. canarii* (热带小奥德蘑或淡褐奥德蘑)。

2.2.2 出菇试验 用 PDA 培养的试管母种 12 d 即可长满,菌丝粗壮浓白;母种接种于原种培养基中第 2 天萌发,第 4 天开始吃料,随后菌丝向下生长趋势稳定良好,14/20 瓶 20 d 长满;原种接种于栽培培养基中培养,生长状况与原种相近,17/20 袋 40 d 长满。通过上述方法的出菇管理,开袋 7 d 后开始出现原基,5 d 后开始有菌盖展开,即采收(图 1-e 和 f)。前二潮菇分别采得 5.03 和 2.65 kg,共计 7.68 kg,生物学效率为 76.8%。

3 讨论与结论

奥德蘑属中大部分种类是食用菌。例如长根奥德蘑(*O. radicata*),又名长根菇,其肉质细腻、香味浓郁,是不可多得的珍稀品种。另外鳞柄小奥德蘑(*O. furfuracea*),营养丰富,味道鲜美,也是著名的食用菌^[12]。中国已报道有双孢奥德蘑(*O. bispora*)^[13]、褐褶边小奥德蘑(*O. brunneomarginata*)^[14]、热带小奥德蘑(*O. canarii*)^[15]、毛柄长奥德蘑[*O. caussiei*]^[16]、鳞柄小奥德蘑(*O. furfuracea*)^[17]、粘小奥德蘑(*O. mucida*)^[18]、长根奥德蘑(*O. radicata*)^[19]、卵孢小奥德蘑(*O. raphanipes*)^[20]、拟粘小奥德蘑(*O. submucida*)^[21]

等。其中最著名的长根奥德蘑已在国内广泛栽培,其他个别种类也已实现人工栽培^[14,17]。除了作为美味食用菌外,奥德蘑属的许多种也有较高的药用功能^[12]。

热带小奥德蘑与淡褐奥德蘑同物异名,近年来受到研究者的追捧,在驯化栽培^[7,22-25]和活性物质应用^[25]等方面取得了突破,但许多菌株的子实体生长发育最适温度 20~28 °C^[12],都不是耐高温的类型,如采自云南的热带小奥德蘑菌株 JZB2115055,其子实体培养温度为 20~26 °C^[7,23];来自巴西的菌株 CCB 179,出菇温度为 25 °C^[22]。总体上,奥德蘑的人工栽培在中国虽然从 20 世纪 80 年代初期已经成功,但多数停留在长根奥德蘑的覆土栽培上,且品种单一,未实现规模化生产,奥德蘑的产品远远不能满足广大人民群众的需要。其主要原因是奥德蘑品种较为单一且缺乏高产稳产的菌种。现阶段栽培的种类多数为长根奥德蘑,且产量不高,没有可供规模化生产使用的菌种^[12]。本研究从热带高温季节采摘的野生蘑菇子实体,分离获得的热带小奥德蘑菌株 YYY,适宜出菇温度为 28~34 °C,具有较典型的耐高温特性。因此,菌株 YYY 的发现丰富了奥德蘑品种资源,增加了高温菌株种类;同时该菌株栽培工艺流程简单,不需要覆土出菇,适合作为规模化生产用菌种。这些对食用菌产业的发展

都具有积极的推动作用。该菌株在未来应用方面将进行更详尽的研究。

参考文献:

- [1] 张佰虎. 探究中国食用菌产业现状及未来发展[J]. 食品安全导刊, 2018(30):67.
- [2] 李玉. 中国食用菌产业发展现状、机遇和挑战——走中国特色菇业发展之路, 实现食用菌产业强国之梦[J]. 菌物研究, 2018, 16(3):125-131.
- [3] 王田妹. 我国食用菌新兴产业发展的战略分析与建议[J]. 中国战略新兴产业, 2018(44):171.
- [4] 刘月廉, 谭树明, 梁恩义, 等. 肺形侧耳 *P_(95418)* 菌株生物学特性的研究[J]. 食用菌学报, 2000(3):25-29.
- [5] 刘月廉, 谭树明, 温美英, 等. 野生洛巴伊口蘑菌株的分离与鉴定[J]. 食用菌学报, 2001(2):19-23.
- [6] Liu Y L, Lu Q F. Identification and cultivation of a wild mushroom from banana pseudo-stem sheath[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 129:922-925.
- [7] 王守现, 刘宇, 许峰, 等. 热带小奥德蘑培养与驯化[J]. 食用菌学报, 2013, 20(1):31-34, 111.
- [8] White T, Bruns S, Lee J, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. San Diego, USA: Academic Press, 1990:315-322.
- [9] 杨祝良, 臧穆. 我国西南小奥德蘑属的分类[J]. 真菌学报, 1993(1):16-27.
- [10] Jack L J K, Zhao R L, Hyde K D. Four species of *Oudemansiella* and *Xerula* newly recorded from Thailand[J]. Cryptogamie Mycologie, 2009, 30(4):341-353.
- [11] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- [12] 李传华, 尚晓冬, 曲明清, 等. 中国奥德蘑属栽培研究进展[J]. 食用菌学报, 2011, 18(4):95-98.
- [13] 孙晓琳, 商圆圆, 张恩奎, 等. 双孢奥德蘑的形态鉴定及 ITS 系统发育分析[J]. 资源开发与市场, 2013, 29(4):345-346, 449.
- [14] 祁亮亮, 安颖, 李玉. 褐褶边小奥德蘑生物学特性及驯化栽培[J]. 食用菌学报, 2011, 18(3):35-38, 111.
- [15] 李继东, 林跃鑫. 热带小奥德蘑深层发酵工艺研究[J]. 食用菌学报, 2003(1):46-51.
- [16] 黄韵婷, 苏孟秋, 赵琪, 等. 毛柄长奥德蘑生物学特性初步研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(6):1999-2002.
- [17] 于富强, 纪大千, 宋美金, 等. 鳞柄小奥德蘑两变种栽培比较[J]. 中国食用菌, 2002, 21(5):13-15.
- [18] 邓勋. 粘小奥德蘑发酵产物中活性成分的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [19] 高斌. 长根小奥德蘑驯化栽培研究[J]. 中国食用菌, 2000(2):5-6.
- [20] 欧胜平, 程显好, 高兴喜, 等. 卵孢小奥德蘑固体培养特性及营养成分分析[J]. 中国食用菌, 2017, 36(5):52-59.
- [21] 李传华, 章炉军, 张美彦, 等. 野生拟粘小奥德蘑驯化和栽培研究[J]. 食用菌学报, 2012, 19(3):45-48, 107.
- [22] Ruegger M J S, Tornisielo S M T, Bononi V L R. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jungh.) höhn. in lignocellulosic substrates[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2001, 32:211-214.
- [23] Xu F, Li Z, Liu Y, et al. Evaluation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* cultivation on different lignocellulosic substrates[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, 43(5):607-613.
- [24] 黄龙花, 刘远超, 胡惠萍, 等. 一种淡褐奥德蘑的专用培养基及其栽培方法[P]. 广东: CN104446822A, 2015-03-25.
- [25] 王守现, 陈杰, 牛玉蓉, 等. 一株淡褐奥德蘑及其应用[P]. 北京: CN105769938A, 2016-07-20.

Test on Identification and Production of a Wild *Oudemansiella canarii*

LIU Yue-lian, HUANG Jia-qi, LIN Xiao-ling, ZHOU Yu-han, TANG Jian-rong

(Agricultural College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to select a variety of edible fungus suitable for high temperature production, in this study, a wild mushroom collected from Leizhou Peninsula during high temperature season. It was isolated and an isolate YYY was obtained. Then the wild mushroom was identified as *Oudemansiella canarii* (Jungh.) by analyzing the morphological characteristics of the wild fruit-body and ITS sequence of isolate YYY. Further, the mushroom bodies of the isolate YYY were successfully fruited at 28-34 °C through the spawn preparation and cultivation. Their biological efficiency was 76.8% from the prior two upsurges. The discovery and the successful cultivation of isolate YYY will play an important role in enriching the high-temperature variety resources and promoting the industry of edible fungi.

Keywords: *Oudemansiella canarii*; high temperature strain; morphology; ITS analysis; cultivation