

一株野生紫丁香蘑的分离纯化与鉴定

吉建成, 赵 林, 王同海, 史志超, 徐丽丽

(青岛农业大学农业应用真菌实验室, 山东青岛 266109)

摘 要:本试验对采自青岛崂山景区的紫丁香蘑(*Lepista nuda*)新鲜子实体进行组织分离、纯化与鉴定, 获得紫丁香蘑纯培养菌丝体。挑选无病虫害, 朵形正常紫丁香蘑子实体, 选取菌盖与菌柄交界处进行组织分离获得菌丝, 提取基因组扩增 ITS 序列, 根据 ITS 序列聚类分析进行菌株鉴定。经 ITS 序列聚类分析证实其为紫丁香蘑。紫丁香蘑菌丝生长最适培养基: 黄豆粉培养基, 在该培养基上菌丝生长速度快、淡紫色菌丝致密。该方法获得了紫丁香蘑的纯培养菌株, 为进一步开发和利用紫丁香蘑提供了科学依据。

关键词:紫丁香蘑; 分离纯化; ITS 序列分析; 菌丝培养基; 聚类分析图

中图分类号: S646

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1674-148X. 2019. 03. 005

Isolation Purification and Identification of One Wild *Lepista nuda*

JI Jiancheng, ZHAO Lin, WANG Tonghai, SHI Zhichao, XU Lili

(Agricultural applied Mycology Laboratory, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: In this study the tissue isolation, purification and identification of the fresh fruiting body of lilac tricholoma (*Lepista nuda*) collected from the Beijiushui scenic area of Qingdao Laoshan Mountain was conducted, and the mycelium of the trichosanthes syringae was obtained. To obtain the pure mycelium culture of *L. nuda*, the tissue was isolated from the *L. nuda* fruiting body and purified. The tissue was separated from the junction of the cap and the stalk. The ITS sequence was amplified with the genome extracted from mycelia, and the strain was identified as *L. nuda* according to the clustering analysis of ITS sequence. The mycelial growth medium of lilac mushroom was optimized. The mycelia grew fast and thick in this medium. This method obtained the pure culture of lilac and provided the scientific basis for the further development and utilization of lilac.

Key words: *Lepista nuda*; separation and purification; ITS sequence analysis; mycelium medium; cluster analysis chart

紫丁香蘑(*Lepista nuda* (Bull. :Fr) Cooke)又名紫晶蘑、裸口蘑^[1], 在真菌分类中隶属于担子菌亚门(Basidiomycotina), 伞菌目(Agaricales), 白蘑科(Tricholomataceae), 香蘑属(*Lepista*), 与松、榛、山杨形成外生菌根^[2]。紫丁香蘑是一种名贵的药食皆用的野生真菌, 黑龙江省分布范围较广, 但是数量稀少, 由于长期的、大量的采摘, 野生紫丁香蘑的数量连年下降, 为满足市场需求, 人工栽培已成为必然趋势。

紫丁香蘑, 口味鲜嫩甜美, 有浓郁、独特的菇香, 子实体中含有人体必须氨基酸、维生素及矿质元素, 具有较高的营养价值^[3], 是一种珍稀的野生食用菌。Wu^[4]等研究紫丁香蘑提取物有较好的抑制癌细胞生长的作用, 并具有潜在的天然抗氧化性。有研究表明, 紫丁香蘑提取物对小白鼠肉瘤 180 和艾氏癌的抑制率分别为 90% 和 100%, 具有较高的防癌、抗癌应用价值^[5], 使紫丁香蘑具有广泛的市场应用前景。但紫丁香蘑野生数量较少, 人工栽培困难, 未实

收稿日期: 2018-08-05

基金项目: 食用菌资源开发和高效加工关键技术研究(编号: 2018YFD0400200)

作者简介: 吉建成(1995-), 男, 山东济南人, 在读研究生, 研究方向: 食用菌资源开发与利用, E-mail: 1679403496@qq.com

通讯作者: 徐丽丽(1979-), 女, 山东诸城人, 硕士, 讲师, 研究方向: 微生物和应用真菌研究, E-mail: ellyxu@163.com

现规模化人工栽培,市场供不应求。本试验获得野生紫丁香蘑菌丝体纯培养,并通过 rDNA-ITS 序列分析确定为紫丁香蘑,确定青岛崂山地区存在野生紫丁香蘑,为今后紫丁香蘑的栽培驯化奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

2016 年 9 月采自崂山北九水的野生紫丁香蘑新鲜子实体,组织分离纯化获得的紫丁香蘑纯培养菌株作为供试菌株,命名为 LN-1。

1.1.2 培养基

(1)PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL, pH 自然

(2)黄豆粉培养基:黄豆粉 40 g,蔗糖 20 g,蛋白胨 2 g,酵母粉 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, MgSO_4 0.5 g, 琼脂 20 g,水 1 000 mL, pH 6.5

(3)玉米粉培养基:玉米粉 40 g,蔗糖 20 g,蛋白胨 10 g, KH_2PO_4 4 g, MgSO_4 2.5 g, 琼脂 20 g 水 1 000 mL, pH 自然

1.2 试验方法

1.2.1 组织分离与纯化

采用新鲜野生紫丁香蘑子实体进行组织分离,选取无病虫害,朵形正常,生长健壮的子实体。在超净工作台中,用 75%乙醇将子实体消毒 2~3 遍,无菌挑取菌柄菌盖连接处组织块,接种于 PDA 培养基、黄豆粉培养基和玉米粉培养基平板中。每个平板放 3 块组织块,于 25 °C 恒温培养,5 d 后进行菌种纯化获得紫丁香蘑菌株纯培养。

1.2.2 菌株形态学鉴定

测量紫丁香蘑野生子实体菌盖直径,菌柄长度等指标,依据野生子实体形态特征,参照《中国蕈菌》^[6]进行初步鉴定。

1.2.3 菌株 rDNA-ITS 序列分析

1.2.3.1 菌丝体 DNA 提取

采用 Ezup 柱式真菌 DNA 抽提试剂盒提取 DNA。

(1)从菌丝体固体平板上刮取约 100 mg 菌丝,在加有液氮的研钵中研磨至粉末状,迅速将粉末转移至已预冷的 1.5 mL 离心管中,并加入 600 μL 缓冲液 FG1,剧烈混匀。

(2)将样品 65 °C 温育 10 min,温育期间颠倒离心管两次使样品混匀。

(3)加入 140 μL 缓冲液 FG2,并剧烈混匀,10 000 r/min 离心 10 min。

(4)小心吸取澄清的裂解液于新的离心管中,切勿吸到杂质或任何碎片。加入 0.7 倍体积的异丙醇并旋涡使 DNA 沉淀。

(5)10 000 r/min 离心 2 min,使 DNA 形成块状沉淀。

(6)小心弃掉上清液,将离心管倒置于吸水纸上使残留液体流干。

(7)加入 300 μL 预热至 65 °C 的无菌水并旋涡以重悬沉淀,加入 4 μL RNase 并混匀。

(8)加入 150 μL 缓冲液 FG3 以调整样品的结合条件,然后加入 300 μL 无水乙醇并旋涡以获得均匀混合物。

(9)将全部样品(包括可能形成的沉淀)转移至 HiBind DNA 纯化柱中(HiBind DNA 柱提前置于 2 mL 收集管中),10 000 r/min 离心 1 min 以结合 DNA,弃掉收集液。

(10)向 HiBond DNA 纯化柱中加入 700 μL 已用无水乙醇稀释过的 DNA 洗脱缓冲液,10 000 r/min 离心 1 min,弃掉收集液。

(11)再加入 700 μL DNA 洗脱缓冲液重复洗脱步骤,弃掉收集液。

(12)将空柱 13 000 r/min 离心 2 min,以干燥 DNA。

(13)将 HiBind DNA 纯化柱放入新的 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL 已预热至 65 °C 的 Elution Buffer 室温温育 2~3 min,10 000 r/min 离心 1 min 洗脱 DNA。

(14)将洗脱液重新加入纯化柱中再洗脱一次,以获得 DNA 溶液,后置于 -20 °C/-80 °C 保存。

1.2.3.2 样品 rDNA ITS 区的 PCR 扩增

采用上海生工生物工程技术服务有限公司合成的真菌核糖体基因间隔区通用引物 ITS1(5'TCCG-TAGGTGAACCTGCGG3')和 ITS4(5'TCCTC-CGCTTATTGATATGC3')进行扩增。PCR 扩增反应体系为:2 \times Taq PCR MasterMix 15 μL ,通用引物 ITS1 和 ITS4 分别 1 μL ,模板 DNA 1 μL , ddH₂O 12 μL 。轻轻摇晃使其混合均匀,置于 PCR 仪中进行 rDNA ITS 区段的 PCR 扩增^[7]。

PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 90 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。

PCR 扩增完成后,产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶

电泳检测,电压为 100 V,产物和 Mark 上样量均为 5 μ L,电泳结果于 BioDoc-It UVP 凝胶成像系统成像。

1.2.3.3 ITS 扩增产物的序列测定

将 1.2.3.2 中得到的样品 ITS 扩增产物直接送至有关公司测序,测序引物为 PCR 引物。

1.2.3.4 ITS 扩增产物序列对比及分析

将测序得到的序列,通过 NCBI 在线 Blast,与 GenBank 中已被测序成功的羊肚菌序列进行同源性比对。将样品序列于比对相似性高的相关基因序列一起进行聚类分析。聚类分析采用 MEGA7.0 软件进行;采用 NJ 法(邻近遗传距离法)进行构建泊松检测聚类分析图,泊松值设定 1 000,种子选定

为“随机”,其他参数均为软件默认参数^[8]。

2 结果分析

2.1 组织分离结果

紫丁香蘑组织分离,在三种不同培养基上培养情况如表 1。在 PDA 培养基中紫丁香蘑菌株 LN-1 菌丝生长缓慢,菌丝较细,淡黄色。在黄豆粉培养基中菌丝粗壮,生长速度较快,菌丝淡紫色。在玉米粉培养基中,菌丝较细,生长速度缓慢。图 1 中,(a)(b)是紫丁香蘑在 PDA 平板的生长状态,(c)是在黄豆粉培养基的生长状态,在此培养基上菌丝密度最大,菌丝生长态势最好,菌丝边缘比较整齐,确定黄豆粉培养基为最适培养基。

表 1 紫丁香蘑 LN-1 在三种培养基中生长情况

Table 1 Growth of LN-1 in three medium

培养基 Medium	菌丝密度 Mycelium density	菌丝长势 Hyphae grow	颜色 Color	菌落边缘整齐度 Colony edge uniformity
PDA 培养基	++	+	淡黄色	++
黄豆粉培养基	+++	+++	淡紫色	+++
玉米粉培养基	+++	++	淡紫色	+

备注:1、菌丝密度:++ 较稀疏;+++ 稀疏;++++ 较密;+++++ 浓密。

2、菌丝长势:++ 较弱;+++ 弱;++++ 一般;+++++ 强。

3、整齐度:++ 不整齐;+++ 整齐;++++ 较整齐;+++++ 最整齐。

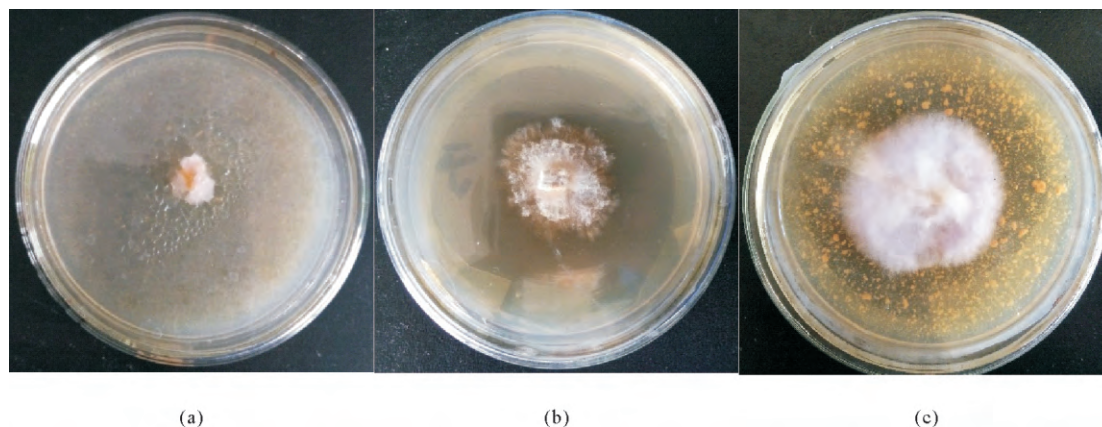


图 1 紫丁香蘑菌丝的生长情况

Fig. 1 Mycelial growth of the *L. nuda*

2.2 野生菌株鉴定结果

菌株 LN-1 野生子实体群生,菇菌盖直径 3.0~5.0 cm,扁半球形,菌盖大部分淡紫色,边缘内卷,无条纹。菌肉带淡紫色,薄菌柄与菌盖同色,内实,基部略有弯曲,长 2.0~7.0 cm,菌柄直径 0.5~2.0

cm。菌褶较稀,淡紫色,直生或弯生,不等长。孢子印带粉红色,孢子无色、表面具麻点至粗糙,椭圆形或近卵圆形,双核菌丝具有锁状联合结构。初步鉴定菌株 LN-1 为紫丁香蘑。



图 2 紫丁香蘑形态特征

Fig. 2 Morphology characteristics of the *L. nuda*

2.3 18s rDNA-ITS 序列分析结果

测序得到 18srDNA-ITS 区段的基因片段长度 663 bp,将获得的紫丁香蘑 ITS 序列与 NCBI 的 GenBank 数据库进行 BLAST 检索比对,得到结果见表 2,ITS 序列与基因库中的 *L. nuda* 的相似度最

高为 99%,确定该菌株为紫丁香蘑。

2.4 NJ 法构建聚类分析图

根据图 3 紫丁香蘑 LN-1 聚类分析结果,LN-1 与 *Lepista nuda* jhp2 亲缘关系比较近,确定 LN-1 为紫丁香蘑。

表 2 NCBI 的 GenBank 数据库进行 BLAST 结果

Table 2 BLAST results for NCBI's GenBank database

序号 Number	学名 Scientific name	相似度 Similarity	保藏号 Preservation
1	<i>Lepista nuda</i> strain dd08040	99%	FJ810154.1
2	<i>Lepista nuda</i>	99%	KT932709.1
3	<i>Lepista nuda</i> strain CZ516	99%	FJ755225.1
4	<i>Lepista nuda</i> strain jhp2	99%	KJ577474.1

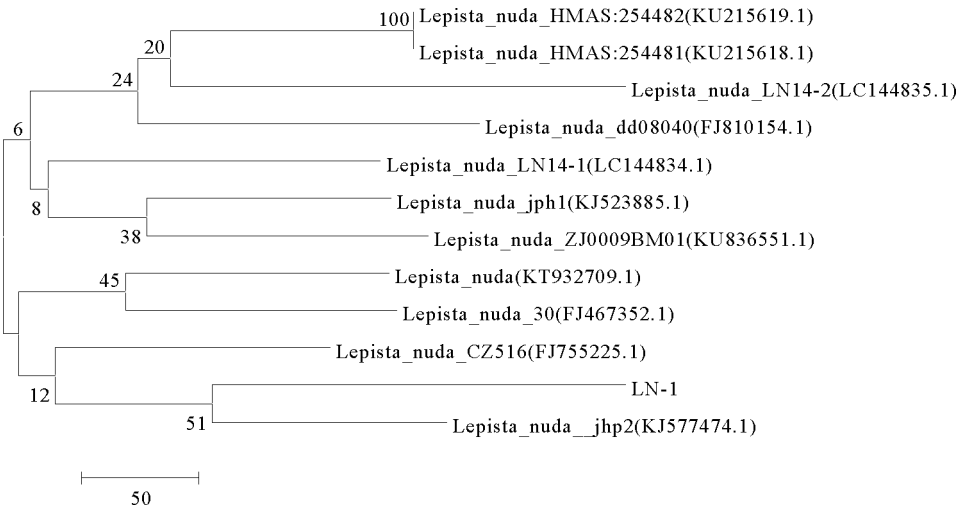


图 3 紫丁香蘑 LN-1 聚类分析结果

Fig. 3 LN-cluster analysis results of syringomyces

3 讨论

食用菌菌种的分离与纯化,对野生食用菌的驯化栽培意义重大。采用组织分离法进行野生紫丁香

蘑菌株的分离纯化,方法简单,成功率高,在生产实践中被广泛应用。本试验对采自崂山的一株野生紫丁香蘑 LN-1 进行了组织分离与菌种纯化获得了紫丁香蘑的母种,通过对紫丁香蘑分离组织在不同

培养基上的培养结果发现,黄豆粉培养基较适合该菌株的生长。紫丁香蘑菌丝在黄豆粉培养基中生长速度快,菌丝粗壮,淡紫色,是由于紫丁香蘑对氮源的需求量比较大,黄豆粉供给紫丁香蘑充足氮源,所以生长状况较好。

在真菌的分类中,传统的形态学分类造成该属内同名异物和同物异名现象严重,因此现多采用形态学分类和分子鉴定相结合的方式,确定菌株种类。其中 ITS 序列分析法因准确性高,简便易行而具有很大的实用价值^[9]。由于 ITS 区不加入成熟核糖体,所以 ITS 片段在进化过程中承受的自然选择压力非常小,因此能容忍更多的变异,在绝大多数的真核生物中表现出了极为广泛的序列多态性,即使是亲缘关系非常接近的 2 个种都能在 ITS 序列上表现出差异,显示最近的进化特征^[10]。香蘑属真菌的种间形态相似性较高,单靠传统的分类学手段难以鉴定。本研究对香蘑属子实体的分类鉴定是在形态学分类的基础上,再利用 ITS 序列分析法并构建聚类分析图,确定 LN-1 与 *Lepista nuda* strain jhp2 菌株相似度为 99%,且亲缘关系最近,从分子水平上反映香蘑属种内和种间的遗传亲缘关系,并最终确定了供试子实体 LN-1 的种属归类,所得结论与形态鉴定结果一致并可相互印证,确定其为紫丁香蘑。青岛崂山地区紫丁香蘑野生子实体的发现,丰富了对崂山野生真菌品种

的认识,为进一步研究崂山真菌种类奠定基础。

参考文献

- [1] 周峰,王瑞娟,李玉,等.珍稀食药菌紫丁香蘑的研究进展[J].食用菌学报,2010,17(4):79-83
- [2] 卯晓岚.中国大型真菌[M].郑州:河南科学技术出版社,2000:179-180
- [3] 魏海莲,刘志曦,张婉洁,等.紫丁香蘑的研究进展[J].安徽农业科学,2015(20):391-392
- [4] Wu YY, Wang HX, Ng TB. A novel metalloprotease from the wild basidiomycete mushroom *Lepista nuda* [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 21(3): 256
- [5] 赵婷.紫丁香蘑菌丝体培养特性及人工驯化栽培研究[D].延吉:延边大学,2010
- [6] 卯晓岚.中国蕈菌[M].北京:科学出版社,2009
- [7] 陈剑山,郑服丛.ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J].安徽农业科学,2007,35(13):3785-3786
- [8] Franek M, Kolar V, Granatova M, et al. Monoclonal ELISA for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid: characterization of antibodies and assay optimization. [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1994, 42(6): 1369-1374
- [9] 唐庆明,邹莉,孙少辉,等.灰紫香蘑的分离纯化及 ITS 序列鉴定[J].安徽农业科学,2014,42(14):4192-4193+4201
- [10] Du XH, Zhao Q, Yang ZL, et al. *Morchella* ITS rDNA phylogenetics—How well do ITS rDNA sequences differentiate species of true morels (*Morchella*) [J]. Mycologia, 2012, 104(6): 1351-1368
- [14] Zhang Y, Li YX, Yang W, et al. Stability of QTL across environments and QTL-by-environment interactions for plant and ear height in maize [J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(10): 1400-1412
- [15] Zhang ZM, Zhao MJ, Ding HP, et al. Quantitative trait loci analysis of plant height and ear height in maize (*Zea mays* L.) [J]. Russian Journal of Genetics, 2006, 42(3): 306-310
- [16] 王涛.玉米 IBM 群体抗倒伏相关性状的 QTL 分析[D].雅安:四川农业大学,2015:1-51
- [17] 房海悦,李毅丹,曲文丽,等.玉米倒伏影响因素及其 QTL 定位研究进展[J].东北农业科学,2016,41(05):42-45
- [18] 盖钧镒,章元明,王建康.植物数量性状遗传体系[M].北京:科学出版社,2003
- [19] 赵树琪,庞朝友,魏恒玲,等.陆地棉早熟性状多世代联合遗传分析[J].棉花学报,2017,29(02):119-127
- [20] 刘金波,徐波,李建红,等.水稻株高和每穗颖花数的 6 个世代联合遗传分析[J].华北农学报,2017,32(S1):88-94
- [21] 姜森,许向阳,姜景彬,等.番茄耐盐性的遗传分析[J].江苏农业科学,2017,45(12):88-91
- [22] 李英双,胡丹,聂蛟,等.甜芥株高和茎粗的遗传分析[J].作物学报,2018,44(08):1185-1195
- [23] 孙海艳,徐德林,蔡一林,等.玉米穗部性状的多世代联合遗传分析[J].植物遗传资源学报,2012,13(06):1005-1010
- [24] 赵刚,吴子恺,王兵伟.微胚乳超高油玉米株高和穗位高的主基因+多基因遗传模型[J].安徽农业科学,2007,35(17):5096-5098
- [25] 彭静,蔡一林,徐德林,等.玉米株型性状多世代联合遗传分析[J].生物数学学报,2009,24(01):149-156
- [26] 王铁固,马娟,张怀胜,等.玉米株高主基因+多基因遗传模型分析[J].玉米科学,2012,20(04):45-49
- [27] Gardner CO, Harvey PH, Comstock RE, et al. Dominance of genes controlling quantitative characters in maize [J]. Agronomy Journal, 1953, 45(05):186-191
- [28] 霍仕平,晏庆九,许明陆,等.玉米主要株型数量性状的基因效应分析[J].玉米科学,2001,9(01):12-15
- [29] 赵延明.玉米株高遗传效应及与环境互作效应分析[J].中国种业,2008,17(s1):53-55
- [30] 张体付,梁帅强,吕远大,等.基于三重测交群体解析玉米株高与穗位高杂种优势 QTL [J].核农学报,2017,31(05):837-843
- [31] 何文昭,王红武,胡小娇,等.玉米株高和穗位高在不同环境下的数量遗传分析[J].作物杂志,2017,(03):13-18

(上接 175 页)