

研究报告

Research Report

一株野生秀珍菇的鉴定及其生物学特性的分析

鲁欣¹ 郑秋霞¹ 叶丽云¹ 丁智权² 出怡汝³ 黄清雄¹ 吴小平^{1*}

1 福建农林大学菌物研究中心,福州,350002; 2 南平农科所,南平,354200; 3 厦门大学环境与生态学院植物分子生态学与分子生物学,厦门,361000

* 通讯作者, fjwpx@126.com

摘要 本研究以野外采集获得的1株野生侧耳属真菌为对象,对其进行rDNA-ITS序列扩增测序并分析后初步确定其为肺形侧耳(*Pleurotus pulmonarius*) ,并与本实验室中现有的秀珍菇菌株序列进行随机扩增多态性DNA (RAPD)、ISSR、相关序列扩增多态性(SRAP)的综合分析后进一步确定该野生菌株与其他菌株间具有一定的遗传距离,是一株新的秀珍菇菌株。以福建省认定的秀珍菇品种秀迪1号为对照菌株,对该菌株进行生物学特性进行研究,结果表明,其菌丝可在温度为5~45℃的范围内生长,最适生长温度为30℃,菌丝可生长的pH范围为pH 3~10,最适pH值为7。在含可溶性淀粉、酵母粉为碳氮源的培养基中,菌丝生长速度快,长势好。该野生菌株生长所需的最适碳、氮源及生长条件与对照菌株相似,这为其进一步的驯化栽培提供一定的理论基础。

关键词 肺形侧耳, 鉴定, 生物学特性

Identification and Biological Characteristics Analysis of a Wild *Pleurotus pulmonarius*

Lu Xin¹ Zheng Qiuxia¹ Ye Liyun¹ Ding Zhiquan² Chu Yiru³ Huang Qingxiong¹ Wu Xiaoping^{1*}

1 Mycological Research Center of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002; 2 Nanping Agricultural Science Research Institute, Nanping, 354200; 3 Plant Molecular Ecology and Molecular Biology Lab of Xiamen University, Xiamen, 361000

* Corresponding author, fjwpx@126.com

DOI: 10.13417/j.gab.036.001997

Abstract In this study, a wild pleurotus strain collected in the forest was selected as the research object. We sequenced its rDNA-ITS sequence and analyzed the result to preliminarily classified it as *Pleurotus pulmonarius*. Also, the comparison of the random amplified polymorphic DNA (RAPD), ISSR and sequence related amplified polymorphism (SRAP) with the strain sequence of other available *Pleurotus geesteranus* in our laboratory showed that this strain had certain genetic distance with other tested strains, which indicated that it was a new *Pleurotus geesteranus* strain. The *Pleurotus pulmonarius* No.1 approved by Fujian province was selected as control group, and its biological characteristics was analyzed, the result of which showed that its mycelium could grow at a temperature of 5~45℃, and the optimum growth temperature was 30℃. The pH range of the mycelium growth was 3 to 10, and the optimum pH value was 7. In the substrate containing soluble starch and yeast powder as carbon and nitrogen source, the mycelium grew fast and good. The most suitable carbon, nitrogen sources and growth conditions of this wild strain were similar to the control strain, which provided a theoretical basis for the further domestication and cultivation of this strain.

Keywords *Pleurotus pulmonarius*, Identification, Biological characteristics

引用格式 Lu X., Zheng Q.X., Ye L.Y., Ding Z.Q., Chu Y.R., Huang Q.X., and Wu X.P., 2017, Identification and biological characteristics analysis of a wild *Pleurotus pulmonarius*, Jiyinzhexue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 36 (5): 1997-2004 (鲁欣, 郑秋霞, 叶丽云, 丁智权, 出怡汝, 黄清雄, 吴小平, 2017, 一株野生秀珍菇的鉴定及其生物学特性的分析, 基因组学与应用生物学, 36(5): 1997-2004)

秀珍菇(*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél),学名为肺形侧耳,别名珊瑚菇、袖珍菇、迷你蚝菇、珍珠菇等,隶属于伞菌纲(Agaricomycetes),伞菌目(Agaricales),侧耳科(Pleurotaceae),侧耳属(*Pleurotus*),原产于印度罗氏大戟的树桩上,在20世纪末从台湾引进至大陆地区(卢政辉等,2007)。秀珍菇味道鲜美,营养丰富,是与人体所需的营养水平较为接近的优质蛋白源,深受广大消费者喜爱(黄毅,2008;陈巧玲等,2014,食用菌栽培学,北京高等教育出版社,pp.166)。现在,秀珍菇已在苏、浙、粤、豫等许多地区开展了生产,此外在东南亚、美国、加拿大及澳大利亚等地也有广泛的栽培。

由于秀珍菇品种繁多、来源不同等,造成异种同名或同种异名现象的普遍出现(黄良水等,2015,食药菌,23(6):340-343)。为了交流的方便,对于秀珍菇的鉴定分析必不可少。随机扩增多态性DNA(random amplification polymorphism DNA, RAPD)被广泛用于鉴定及分类丝状真菌的研究中,因其具有用量少、鉴定速度快的特点而主要应用于种内不同菌株的分类的研究当中(李敏慧等,2003,仲恺农业技术学院学报,16(1):61-67)。rDNA-ITS序列分析适于属内种间物种或种内差异明显的物种间的系统发育研究及其真菌物种的分子(燕勇等,2008)(和姚一建,2004,菌物学报,23(3):345-350)对侧耳属中18个分类单元的28S rDNA进行分析并构建系统发育树,较为系统地确定了侧耳属中各分类单元间的关系。

我国对秀珍菇的研究热点主要在其反季节栽培及高效栽培技术上,对于新品种的开发、鉴定及驯化等研究较少,本实验通过rDNA-ITS序列分析及种内遗传距离的分析鉴别一株野生肺形侧耳菌株,并对其生物学特性及栽培特性进行初步研究,为其进一步的驯化育种提供一定的技术参考。

1 结果与分析

1.1 子实体形态观察

对该野生菌株进行形态观察可知(图1),此菌株子实体丛生或单生,菌盖呈漏斗状,扇形、圆形、贝壳形,表面光滑无鳞片,菌盖边缘初时内卷,成熟时平展,成熟时上翘。菌肉为白色,菌褶延生,不等长,菌褶边缘平滑,菌柄为圆柱状,多为侧生,少数中生,表面光滑,无菌托或菌环等结构。这些特征与黄年来等(2010)描述的秀珍菇相似。菌落呈现规则圆形,菌丝洁白、厚实,边缘菌丝较为稀疏。高倍镜下

可观察到明显的锁状联合结构。弹射的孢子印白色,孢子形态为长椭圆形、光滑,油镜下观察,长为9~12 μm,宽为5~6 μm。

1.2 拮抗实验

为初步确定菌株间的亲缘关系可以采用拮抗试验来验证,拮抗试验中菌株产生了明显的拮抗线,说明了这两种菌株为不同的菌株。野生的秀珍菇菌株与供试菌株间均能产生十分明显的拮抗线(图2),由此可见该野生菌株是与供试菌株为不同的菌株。

1.3 系统进化树分析

在NCBI上的Nt中进行在线BLAST,结果显示供试菌株与侧耳属菌株同源性较高。从系统发育树上可以看出,侧耳属真菌根据其种间距离的不同,简单可分为肺形侧耳(*Pleurotus pulmonarius*)复合群和糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)复合群以及其他组(*Pleurotus* sp)复合群等3个复合群。系统发育树(图3)显示,供试菌株(wild *Pleurotus* sp)与肺形侧耳(*Pleurotus pulmonarius*) (GenBank登录号为AY696300.1, KC582638.1, EU424311.1, GQ249869.1, AB115052.1, GU722287.1, FJ379269.1, AY540328.1)间的置信度达到99而聚为同一分支。因此可以从ITS序列分析确定供试菌株(wild *Pleurotus* sp.)是肺形侧耳复合群中的一员。这符合(Taylor et al., 2000)概述的用来作为鉴定进化种的标准PSR (Phylogenetic Species Recognition)。

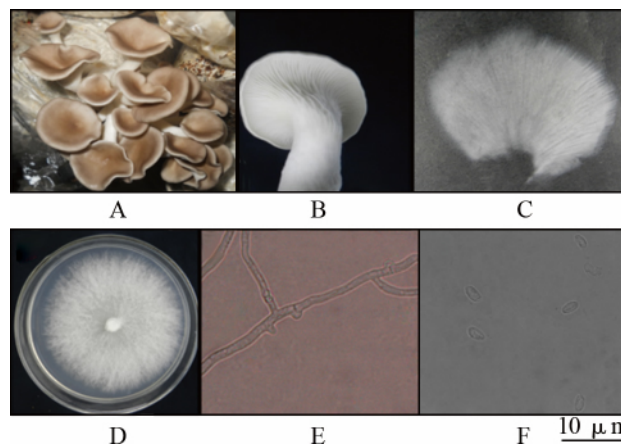


图1 野生秀珍菇的形态特征

注: A, B: 人工栽培下的形态特征; C: 孢子印; D: 菌落形态; E: 放大1 000倍的菌丝形态; F: 放大1 000倍的孢子形态

Figure 1 The morphological characteristics of the wild *P. pulmonarius*

Note: A, B: The morphological characteristics of artificial cultivation species; C: The spore print; D: Colonial morphology; E: The mycelium morphology in 1 000× oil lens; F: The spore morphology in 1 000× oil lens

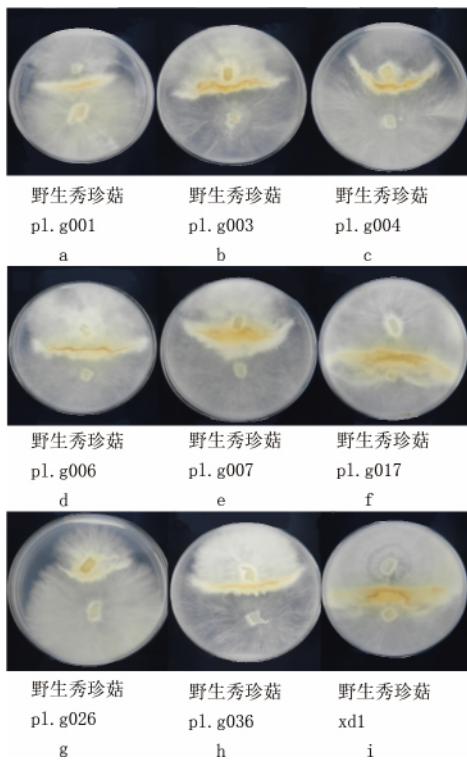


图 2 野生菌株与供试菌株间的拮抗结果
注: a~i 分别是野生菌株与供试菌株 pl.g001, pl.g003, pl.g004, pl.g006, pl.g007, pl.g017, pl.g026, pl.g036, xd1 产生明显拮抗线
Figure 2 The antagonistic results of the wild strain and tested strain
Note: a~i means that the wild strain can form the significant antagonistic lines with the tested strains pl.g001, pl.g003, pl.g004, pl.g006, pl.g007, pl.g017, pl.g026, pl.g036, xd1, respectively

1.4 遗传距离的综合分析

统计表明 RAPD 共扩增出 84 个较为清晰的 DNA 条带, 片段大小为 0.1~3.0 kb ;ISSR 共扩增出 13 个较为清晰的 DNA 条带, 条带大小为 0.25~3.0 kb ;SRAP 共扩增出 30 个较为清晰的条带, 条带大小为 0.25~3.0 kb。

对野生秀珍菇菌株与供试菌株的 RAPD、ISSR、SRAP 3 种分子标记条带采用 Jaccard 聚类距离中类平均法(UPGMA)进行聚类后, 菌株两两间的相异系数范围为 0~0.818 2 (图 4), 在 D=0.63 的相异系数水平上, 将野生菌株分为单一群体, 将其他供试菌株分为 2 个单一群体和 3 个复合群体。这说明了该野生秀珍菇菌株与其它秀珍菇菌株具有一定的遗传距离, 是为一新的秀珍菇菌株。

1.5 不同碳氮源对菌丝生长的影响

野生秀珍菇菌株对供试的碳源(表 1)均能利用, 长势好且生长速度快的是蔗糖、可溶性淀粉以及甘露醇, 这与对照菌株相似(图 5A)。对于供试的氮源

(表 1)中, 以酵母粉为氮源时, 供试菌株生长速度最快, 蛋白胨次之, 但以尿素为氮素来源时, 菌株均不

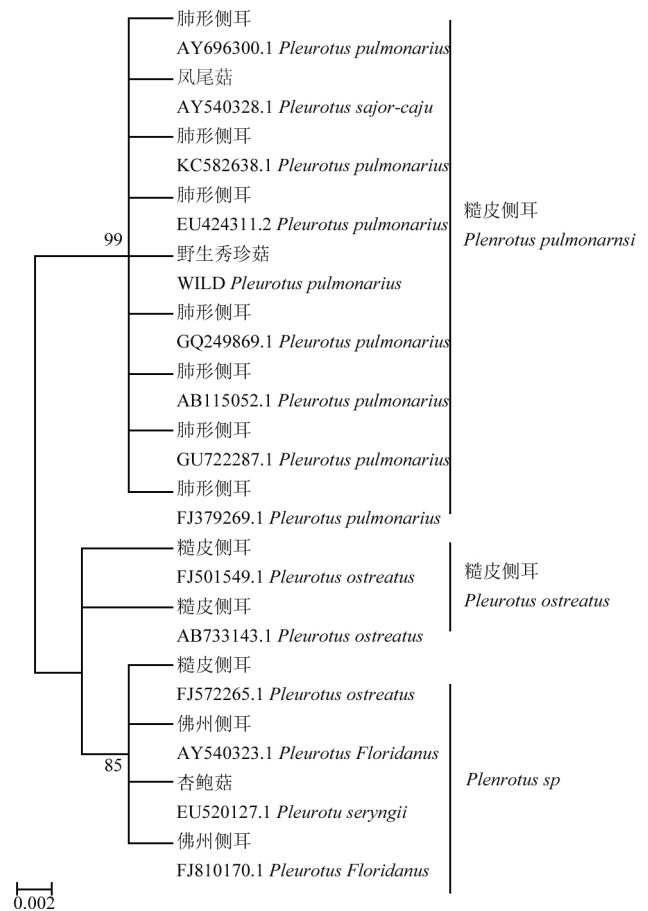


图 3 基于 rDNA-ITS 序列构建的野生秀珍菇系统发育树
注: 分支点上的数值为支持率; 标尺 0.02 为进化距离; 菌株名称前面为其登录号

Figure 3 The phylogenetic tree of wild *P. pulmonarius* based on rDNA-ITS sequence

Note: Branch point values represent approval rating; Scale 0.02 means evolutionary distance; The number before the strains' name are the GenBank accession No.

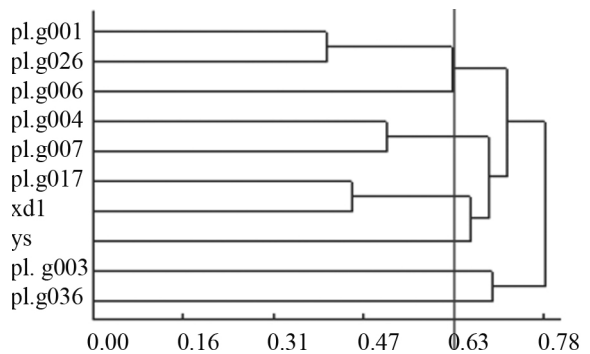


图 4 野生秀珍菇菌株与供试菌株的遗传距离综合分析聚类图
Figure 4 The clustering map about genetic distances in wild *P. pulmonarius* and tested strains by comprehensive analysis

萌发生长。氮源实验中(图 5B) ,该野生菌株对氮源的利用与对照菌株相似 ,但生长速度略低于对照。

1.6 不同温度对菌丝生长速度的影响

在供试的温度范围内 ,野生菌株与对照菌株的生长趋势(图 6A) ,随着温度的升高 ,菌丝的生长速度也升高 ,30℃时菌丝的生长速度达到最高 ,超过 30℃后 ,菌丝的生长速度有所降低。

1.7 不同 pH 对菌丝生长的影响

pH 实验结果(图 6B)中 ,野生秀珍菇对酸碱环境的适应性良好 ,在供试范围内均可生长 ,随着 pH 的

升高 ,生长速度有所增加 ,在超过 pH 8 后生长速度有所降低 ,对照菌株在此供试范围内生长速度的趋势较为平缓 ,但仍随着 pH 的升高而升高 ,超过 pH 9 后开始有所降低。

1.8 试栽培实验

该野生菌株可进行熟料袋栽 ,主料可采用杂木屑、棉籽壳、玉米芯、麦粒等 ,添加一定量的蔗糖可促进该菌株菌丝的生长 ,不添加蔗糖的配方中 ,该菌株的栽培种走菌时间为 42~45 d ,含有蔗糖的配方中 ,栽培种满袋减少 3~5 d。在空气相对湿度为 85%~90% ,在 20~25℃的温度范围内出菇。通过比较野生菌株与

表 1 不同碳氮源下野生秀珍菇菌丝的生长速度

Table 1 The growth rate of the wild *P. pulmonarius* mycelium under different carbon sources and nitrogen sources

碳源	生长速度(mm/d)	生长势	氮源	生长速度(mm/d)	生长势
Carbon source	Growth rate (mm/d)	Growth potential	Nitrogen sources	Growth rate (mm/d)	Growth potential
蔗糖	5.2±0.1aA	±±	酵母粉	4.1±0.3 aA	±±±
Sucrose			Yeast extract		
可溶性淀粉	4.8±1.9aAB	±±±	鱼蛋白胨	3.8±0.1 bA	±±
Soluble starch			Fish peptone		
甘露醇	4.8±0.1aABC	±	胰蛋白胨	2.9±0.5 cB	±±±
Mannitol			Tryptone		
麦芽糖	4.3±0.5bBCD	±±	甘氨酸	2.5±0.2 dC	±
Maltose			Glycine		
果糖	4.2±0.5bCD	±±	硝酸钾	1.6±0.0 eD	±
Fructose			Nitrate		
半乳糖	4.0±0.2bDE	±	尿素	0.0±0.0 fE	-
Galactose			Urea		
羧甲基纤维素钠	3.5±0.8cE	±			
Sodium carboxymethylcell-ulose					
葡萄糖	2.9±0.5dF	±±±			
Glucose					

注: a,b: $p < 0.05$; A,B: $p < 0.01$; ±: 菌落稀薄; ±±: 菌落洁白; ±±±: 菌落洁白浓密

Note: a,b: $p < 0.05$; A,B: $p < 0.01$; +: Sparse growth potential; ±±: Regular growth; ±±±: Dense growth potential

表 2 野生秀珍菇与秀迪 1 号的农艺性状比较

Table 2 The comparison of agronomic characters of wild *P. pulmonarius* and xd1

性状	走菌速度(mm/d)	产量(g)	首潮菇生物学效率(%)	子实体形态		
				柄长(mm)	柄粗(mm)	中心盖厚(mm)
Character	Growth rate (mm/d)	Yield (g)	The first fruit biologicalefficiency (%)	Stipe length (mm)	Stipe thickness (mm)	Center cap thickness (mm)
ys	5.0 aA	115.2 aA	29.9	48.3 aA	5.9 bB	4.4 bB
xd1	5.3 aA	103.0 bB	26.7	42.1 aA	16.3 aA	12.1 aA

注: “a”表示显著水平差异, “A”表示极显著水平差异; 出菇的菌袋平均每袋干料重 385 g, 生物学效率为采收的菇重与袋料干重之比

Note: “a” means significant difference, “A” means extremely significant difference; the dry weight about cultivation in every bag is about 385 g, the biological efficiency is the ratio of the weight of harvested mushroom in every bag and the dry weight of the cultivation

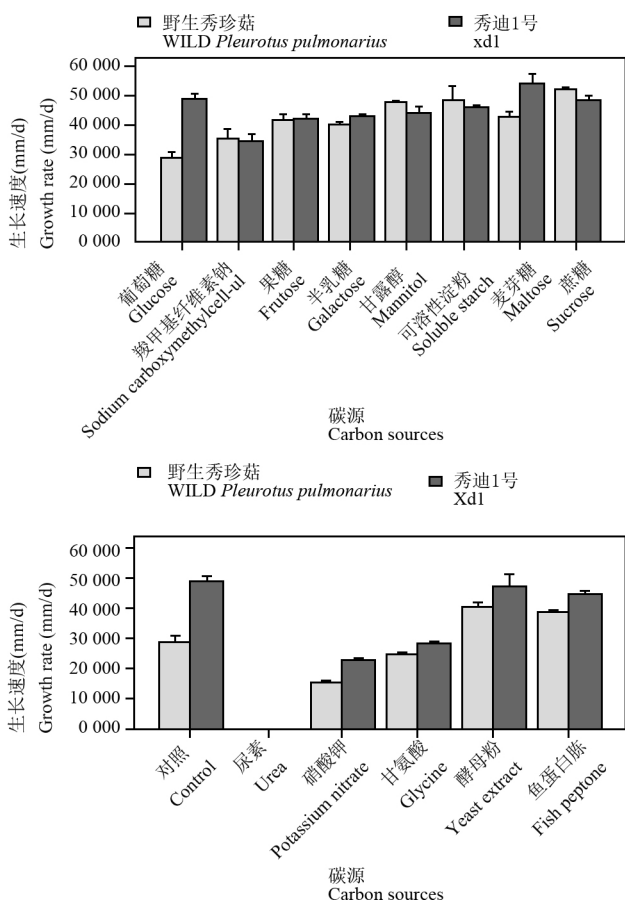


图5 不同碳、氮源下野生秀珍菇菌丝的生长速度
Figure 5 The growth rate of the wild *P. pulmonarius* mycelium under different carbon sources and nitrogen sources

秀迪1号的农艺性状(表2)可知,该野生菌株首潮菇的生物学效率较高,生长速度较快,而单朵子实体的农艺性状不如秀迪1号,即子实体较为单薄。

2 讨论

新鲜的秀珍菇中除了丰富的蛋白质外还含有大量的B族维生素及钾、钠、磷、钙、铁等矿物质元素,而且秀珍菇形美质嫩,秀珍菇多糖能够明显抑制人类的MCF-7细胞的生长,具有良好的抗肿瘤活性(Zhang et al., 2011) Xu等(2012)也证明了秀珍菇多糖-蛋白质复合物具有抗肝癌作用。近年来,秀珍菇的市场需求不断扩大,但对于新品的开发研究较少,同名同种现象十分普遍。对菌株的鉴定技术也随之不断发展。利用PCR扩增真菌核糖体ITS基因的方法在鉴定、检测及诊断真菌上具有方便快捷、简易准确的特点(白树猛和田黎,2009)。RAPD、ISSR和SRAP技术也被广泛应用于菌种鉴定、构建遗传图谱、基因标定等研究中(张婷等,2013)。在本研究中,我们对一株野外采集获得的大型真菌进行形态学水平以及分子水平上的鉴定,确定该真

菌为肺形侧耳(*Pleurotus pulmonarius*)。通过与本实验室的现有秀珍菇品种的验证,在RAPD、ISSR、SRAP的综合分析中,将该野生秀珍菇菌株与其他来源的供试菌株在D=0.63时区分开来。聚类结果表明该菌株与其他供试菌株间具有一定的遗传距离,是一株新的秀珍菇菌株,但未显示出各菌株间的遗传距离与不同的地理位置有相关性。

采用熟料袋栽的方式对该野生菌株进行试出菇实验后,确定常规的生产原料如木屑、棉籽壳、麸皮等按一定的比例配合可满足菌丝生长所需的要求,与黄年来等描述的秀珍菇生物学特性相同。野生的肺形侧耳菌株在首潮菇产量达到29.87%,略高于对照菌株,而菌盖偏薄,单朵子实体偏轻的缺点说明该菌株不能成为商业生产菌株,而应通过进一步的选育以获得更优质的秀珍菇生产菌株。而该野生菌株生长所需的最适碳、氮源及生长条件与对照菌株相似,这为其进一步的驯化栽培提供一定的理论基础。

3 材料与方法

3.1 供试菌株

供试菌株号及来源列于表3。

3.2 供试培养基

(1) PDA培养基:200g土豆,加入1L水煮沸15~20min后4层纱布过滤,加入20g琼脂,待琼脂

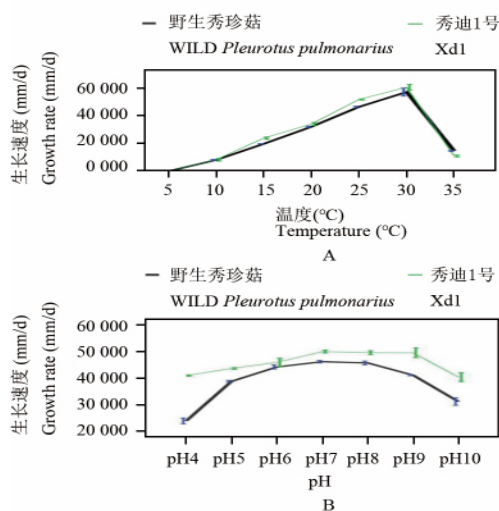


图6 不同的条件下对菌丝生长速度的影响
注: A:不同温度下的菌丝生长速度; B:不同pH下的菌丝生长速度
Figure 6 The effect of different conditions on the growth rate of *P. pulmonarius*
Note: A: The growth rate of mycelium under different temperature; B: The growth rate of mycelium under different pH

熔化后加入 20 g 葡萄糖, 搅拌均匀制备试管斜面或分装至三角瓶, 121℃ 高压灭菌 20 min, 备用。

(2) 液体 PDA 培养基: 200 g 土豆, 加入 1 L 水煮沸 15~20 min 后 4 层纱布过滤, 后加入 20 g 葡萄糖, 搅拌均匀分装至三角瓶, 121℃ 高压灭菌 20 min, 备用。

(3) LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水定容 1 L, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, LB 固体培养基中需添加 15 g 的琼脂, 121℃ 高压灭菌 20 min, 备用。

(4) 基础培养基: 葡萄糖 20 g、蛋白胨 3 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL、pH 自然。

(5) 原种配方: 麦粒 98%, 石膏 2%, 121℃ 高压灭菌 180 min。

(6) 栽培种配方: 棉籽壳 / 玉米芯 40%, 木屑 38%, 麸皮 20%, 蔗糖 1%, 轻质碳酸钙 1%, 含水量 65%~70%, 121℃ 高压灭菌 180 min。

3.3 方法

3.3.1 形态观察

(1) 子实体宏观形态观察: 参照传统形态分类学的方法观察野生菌株子实体的形态特征, 包括子实体的质地、形状、大小、颜色、菌褶的形态。

(2) 微观形态的观察: 选择朵形圆整, 菌褶整齐完整, 无病虫害的接近成熟种菇, 在体视显微镜下观察菌褶的形态。在超净台上按照无菌操作的要求, 将种菇置于铺纸的培养皿中, 培养皿上用烧杯倒扣, 静置 12~20 h 以观察其孢子印(张术丽等, 2013, 黑龙江农业科学, (11): 114-115), 并在光学显微镜下观察并测量其孢子的形态大小。

3.3.2 拮抗实验

超净工作台, 按照无菌操作的要求, 在平板上, 分别接种野生菌株与本实验室保藏的秀珍菇菌株(表 3), 两接种块间距离 1~1.5 cm, 封口后, 置于 25℃ 培养箱中培养, 观察两菌株菌丝接触后的现象。

3.3.3 rDNA-ITS 序列分析

参照改良的 CTAB 提取方法以提取野生真菌菌丝的总 DNA (傅俊生, 2007, 硕士学位论文, 福建农林大学, 导师: 谢宝贵, pp.29)。利用真菌 ITS 通用引物进行 ITS-PCR 扩增。真菌 ITS 引物序列(赵洪海等, 2014) ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATAGGC-3'。PCR 产物连接到 pMD18-T 载体(宝生物工程(大连)有限公司), 转至大肠杆菌(*E. coli*)菌株 DH5 α 感受态细胞

表 3 供试菌株编号及来源

Table 3 The number and source of the tested strains

菌株编号 Strain No.	原菌株编号 Original strain No.	菌株来源 Strain origin
ys	野生秀珍菇 Wild of <i>Pleurotus geesteranus</i>	福建省建阳市杂木林中 野外采集 Fujian Jianyang in Shaw Field Collect
pl.g001	台湾袖珍菇 Taiwan <i>Pleurotus geesteranus</i>	福建省轻工业研究所 Fujian institute of Light Industry
pl.g003	秀珍 62 <i>Pleurotus geesteranus</i> 62	贵州习酒食用菌研究所 Xijiu Edible Mushroom Research Center
pl.g004	秀珍菇 5 号 <i>Pleurotus geesteranus</i> 5	湖北省武汉市华中农业 大学菌种中心 Hubei Wuhan Strain of Huazhong Agricultural University Center
pl.g006	秀珍菇 1 号 <i>Pleurotus geesteranus</i>	山东省寿光市食用菌 研究所 Shandong Shouguang Mushroom Center
pl.g007	高温秀珍菇 <i>Pleurotus geesteranus</i> of heat resisting	山东省寿光市食用菌 研究所 Shandong Shouguang Mushroom Center
pl.g017	秀珍菇 -3 <i>Pleurotus geesteranus</i> 3	福建省漳州市龙海九湖 食用菌研究所 Fujian Zhangzhou Longhairjiuhu Mushroom Center
pl.g026	秀珍菇 -12 <i>Pleurotus geesteranus</i> 12	福建省漳州市龙海九湖 食用菌研究所
pl.g036	袖珍菇 <i>Pleurotus geesteranus</i>	Fujian Zhangzhou Longhairjiuhu Mushroom Center
xd1	秀迪 1 号(对照) Xiudi 1	福建省农业科学院植物 保护研究所 Fujian Academy of Agricultural Sciences Plant Protection Center 福建省农业科学院 食用菌研究所 Fujian Academy of Agricultural Sciences Mushroomcenter

(天根生化科技(北京)有限公司)中进行单克隆。培养过夜后, 通过菌液 PCR 和凝胶电泳检测阳性克隆。

最后阳性克隆子委托上海生物工程(生物)股份有限公司进行测序。测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>) 数据库中进行在线 BLAST 分析后, 选取比对到的序列(表 4), 经 CLUSTXAL 1.83 软件进行序列对比, 并用 MEGA 5.0 软件采用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构建系统发育树, Bootstrap 检验的重复次数为 1 000 次。

3.3.4 遗传距离的综合分析

通过查阅文献筛选得到在秀珍菇中重复性高, 稳定性好的 RAPD 分子标记引物、ISSR 分子标记引物、SRAP 分子标记引物, 将野生菌株与供试菌株一起进行 RAPD-PCR、ISSR-PCR、SRAP-PCR (表 5)。根

表 4 用于系统发育树分析的相关 *Pleurotus* 菌株及 ITS 序列登录号

Table 4 The related *P. pulmonarius* strains used for phylogenetic tree analysis and their ITS sequence accession number

菌株名称	产地	GenBank 登录号
Strain name	Origin	GenBank accession No.
肺形侧耳	中国	AY696300.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	China	
佛州侧耳	中国	AY540323.1
<i>Pleurotus floridanus</i>	China	
凤尾菇	中国	AY540328.1
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	China	
肺形侧耳	中国	EU424311.2
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	China	
肺形侧耳	中国	FJ379269.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	China	
糙皮侧耳	中国	FJ501549.1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	China	
白灵侧耳	中国	FJ572265.1
<i>Pleurotus nebrodensis</i>	China	
佛州侧耳	中国	AY540323.1
<i>Pleurotus floridanus</i>	China	
杏鲍菇	中国	EU520127.1
<i>Pleurotu seryngii</i>	China	
佛州侧耳	中国	FJ810170.1
<i>Pleurotus floridanus</i>	China	
肺形侧耳	墨西哥	GU722287.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Mexico	
肺形侧耳	马来西亚	KC582638.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Malaysia	
肺形侧耳	日本	AB115052.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Japan	
糙皮侧耳	日本	AB733143.1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Japan	

表 5 RAPD, ISSR 和 SRAP 引物的序列编号

Table 5 The primer No. about RAPD, ISSR and SRAP

分子标记技术	序列编号
Technology of DNA markers	Primer No.
RAPD	S6, S22, S23, S24, S26, S32, S38, S40, S47, S48, S56, S60, S83, S85, S88, S92, S370, S484, S485, S485, S1017, S1112, S1200, S1208
ISSR	ISSR1, ISSR4, ISSR12, ISSR13, ISSR15
SRAP	me2-em12, me3-em6, me5-em8, me6-em6

据电泳结果, 对引物的可用性及电泳条带的多态性进行记录。选择扩增条带清晰、多态性信息含量大且主带清晰的引物为主体引物, 并将主体引物按主带的有无分别标记为 1 和 0, 最后采用 DPS 数据处理软件 7.05 对所有材料计算相似系数以进行聚类, 并分析野生菌株与其他各秀珍菇菌株间的遗传距离。

3.3.5 同步菌丝的准备

在超净工作台上将母种转接至 PDA 培养基上, 置于培养箱中 25℃ 培养至菌丝将满皿时, 用打孔器(直径 7 mm)打菌丝块, 并保证后续实验菌龄相同(魏生龙等, 2006)。

3.3.6 生物学特性实验

(1)碳源实验: 用等量的羧甲基纤维素钠、可溶性淀粉、麦芽糖、果糖、蔗糖、甘露醇、半乳糖代替基础培养基中的葡萄糖, pH 自然, 每个处理作 5 次重复, 培养箱中 25℃ 避光培养, 采用十字交叉法测量不同碳源对菌丝生长速度的影响。

(2)氮源实验: 用等量的酵母膏、甘氨酸、鱼粉蛋白胨、尿素及硝酸钾代替基础培养基中的蛋白胨, pH 自然, 每个处理作 5 次重复, 培养箱中 25℃ 避光培养, 采用十字交叉法测量不同碳源对菌丝生长速度的影响。

(3)温度实验: 用 PDA 培养基分别在 5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃ 下恒温培养, 每个处理 5 个重复, 十字交叉法测量不同温度对菌丝生长的影响并观察不同温度下的菌丝生长情况。在超净台上按照无菌操作的要求, 用 7 mm 打孔器在 PDA 培养基的野生秀珍菇菌落打孔, 在每支 5 mL 无菌水管中装入 5 块菌块。将含有菌落块的无菌水管分别置于恒温水浴锅中, 温度设置成 40℃、45℃、50℃, 每个温

度分别处理 5 min、15 min、30 min, 迅速冷却后, 将菌落块接入含有 PDA 的板上, 每个处理作 3 个重复, 25℃ 避光培养 5 d, 观察菌丝生长情况。

(4) pH 实验: 采用 PDA 培养基, 用 1 mol/L NaOH 溶液和 1 mol/L HCl 溶液将 PDA 培养基分别调成 pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0、pH 10.0, 25℃ 恒温箱中避光培养, 十字交叉法测量不同 pH 对菌丝生长的影响并观察不同 pH 下的菌丝生长情况。

(5) 试栽培实验: 按照原种配方制备原种瓶, 待原种瓶冷却后, 按照无菌操作要求, 将野生秀珍菇菌株和对照菌株秀迪 1 号接入制备好的原种瓶中, 25℃ 恒温箱中避光培养。选用 17×33 聚丙烯菌袋, 按照栽培种配方制备栽培料, 每袋湿料 1.1 kg (干料 385 g)。待料温冷却至 30℃ 以下时进行接种。接种过程中应注意去除老菌皮及老菌块。接种完毕后将菌袋转入走菌室进行发菌管理。菌丝满袋后, 进行出菇管理。

作者贡献

鲁欣是本研究的主要执行人, 负责材料的收集和数据分析以及论文初稿的写作; 郑秋霞负责试验的实施, 叶丽云、丁智权、出怡汝和黄清雄参与部分实验的实施; 吴小平负责试验的设计和论文的修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由福州市农业科技项目《秀珍菇品种选育及安全高效生产关键技术研究》基金项目资助, 感谢福建农林大学菌物研究中心为本研究提供实验场所。

参考文献

- Bai S.M., and Tian L., 2009, Application of ITS sequences in classification and identification and molecular test of fungi, *Xvmu Yu Siliao Kexue* (Animal Husbandry and Feed Science), 30(1): 52-53 (白树猛, 田黎, 2009, ITS 序列分析在真菌分类鉴定和分子检测中的应用, *畜牧与饲料科学*, 30(1): 52-53)
- Chen Q.L., Li Z.H., and Chen S.Q., 2014, Analysis of amino acid composition and nutritional evaluation in five local edible fungus, *Shipin Yu Jixie* (Food and Machinery), 30(6): 43-46, 81 (陈巧玲, 李忠海, 陈素琼, 2014, 5 种地产食用菌氨基酸组成比较及营养评价, *食品与机械*, 30(6): 43-46, 81)
- Huang N.L., Lin Z.B., and Chen G.L., eds., 2010, Medicinal and

edible fungi, Shanghai Scientific & Technical Publishers, Shanghai, China, pp.1129-1238 (黄年来, 林志彬, 陈国良, 主编, 2010, 中国食药菌学, 上海科学技术文献出版社, 中国, 上海, pp.1129-1238)

Lu Z.H., Liao J.H., Chen M.Y., Guo Z.J., Li H.R., and Wang Z.S., 2007, High-production and good-quality cultivation technology of *Pleurotus pulmonarius*, *Junwu Xuebao* (Mycosystema), 26: 404-407 (卢政辉, 廖建华, 陈美元, 郭仲杰, 李洪荣, 王泽生, 2007, 秀珍菇高产优质栽培技术, *菌物学报*, 26: 404-407)

Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., and Fisher M.C., 2000, Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi, *Fungal Genetics and Biology*, 31(1): 21-32

Wei S.L., Wang Z.J., Yu H.P., and Chen Y., 2006, Biological characteristics of *Lyophyllum decastes*(Fr.:Fr.) Singer, *Junwu Xuebao* (Mycosystema), 25(1): 101-108 (魏生龙, 王治江, 于海萍, 陈叶, 2006, 荷叶离褶伞生物学特性研究, *菌物学报*, 25(1): 101-108)

Xu W.W., Huang J.J., and Cheung P.C.K., 2012, Extract of *Pleurotus pulmonarius* suppresses liver cancer development and progression through inhibition of VEGF-induced PI3K/AKT signaling pathway, *PLoS One*, 7(3): e34406

Yan Y., Li W.P., Gao W.J., Shen Z.Y., Wang H.H., and Chen L.X., 2008, Application of rDNA-ITS sequence analysis in fungus identification, *Zhongguo Weisheng Jianyan Zazhi* (Chinese Journal of Health Laboratory Technology), 18(10): 1958-1961 (燕勇, 李卫平, 高雯洁, 沈志英, 王恒辉, 陈黎霞, 2008, rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用, *中国卫生检验杂志*, 18(10): 1958-1961)

Zhang M., Zhu L., Cui S.W., Wang Q., Zhou T., and Shen H.S., 2011, Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide-protein complexes from *Pleurotusgeesteranus*., *International Journal of Biobigical Macromolecules*, 48(1): 5-12

Zhang T., Wang Y.Z., Zhang X.D., LI J.Q., and Liu H.G., 2013, Molecular markers in the studies of genetic diversity of edible and medicinal fungi, *Shengming Kexue* (Chinese Bulletin of Life Sciences), 25(10): 1001-1007 (张婷, 王元忠, 张晓东, 李杰庆, 刘鸿高, 2013, 分子标记在食(药)用真菌遗传多样性研究中的应用, *生命科学*, 25(10): 1001-1007)

Zhao H.H., Yue Q.H., and Liang C., 2014, The pathogen causing *Pestalotiopsis* twig dieback of blueberry, *Junwu Xuebao* (Mycosystema), 33(3): 577-583 (赵洪海, 岳清华, 梁晨, 2014, 蓝莓拟盘多毛孢枝枯病的病原菌, *菌物学报*, 33(3): 577-583)