

虞小燕,邓百万,陈文强,等. 基于形态学特征和 ITS 序列分析秦巴山区天麻萌发菌的亲缘关系[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):245-248.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.070

基于形态学特征和 ITS 序列分析秦巴山区天麻萌发菌的亲缘关系

虞小燕¹, 邓百万^{1,2}, 陈文强^{1,2}, 杨海旭¹, 解修超^{1,2}

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西汉中 723001)

摘要:利用拮抗试验,萌发试验和 ITS 序列分析技术对秦巴山区 12 个天麻萌发菌菌株进行了亲缘关系分析。结果表明:12 个萌发菌菌株分为两大类,其中 8103-4、8103-6、8103-7、8103-8 这 4 个菌株与其他菌株拮抗反应明显,并且 ITS 序列分析显示在同一个分支上,亲缘关系相近;萌-3、萌-7、萌 MD-2、萌发菌、石斛-1、石斛-2、萌-云南此 8 个菌株拮抗反应不明显,ITS 序列分析显示在同一个分支上,8103-3、萌发菌与标准菌株 *Mycena citrinomarginata* 亲缘关系相近,萌 MD-2、石斛小菇-1、萌-3、萌-7、石斛小菇-2、萌-云南与 *Mycena purpureofusca* 亲缘关系相近。

关键词:天麻萌发菌;拮抗;rDNA 序列;亲缘关系

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0245-04

萌发菌隶属于担子菌纲(Basidiomycetes)伞菌目(Agaricales)口蘑科(Trieholomataceae)小菇属(*Myeena*)^[1],主要包括紫萁小菇(*M. mosmundicola*)、石斛小菇(*M. mden-drobii*)和开唇小菇(*M. manoectochila*)三大类属。天麻萌发菌主要分布于我国陕西、云南、甘肃、河南、河北、湖南、湖北、

贵州、新疆、四川、安徽、黑龙江、吉林、广西、海南、福建、内蒙古、西藏及台湾等省区^[2],为天麻(*Gastrodia elata*)有性繁殖时的必要共生菌。天麻种子细小如粉尘,无胚乳及其营养储备,无外源营养供给,种子不能发芽。它的萌发靠小菇属(*Mycena*)一类真菌菌丝侵染种胚提供营养,促使其萌发^[3]。随着天麻药用需求不断增加,野生资源日益匮乏,且人工栽培中以无性繁殖来连续种植,天麻球茎明显退化,侧芽发芽率低等原因,经过有性繁殖培育 0 代天麻或 1 代天麻,再通过无性繁殖扩大种植已成为天麻稳产和高产的重要途径^[4-5]。目前,国内外对天麻萌发菌种质资源研究报道较少,且主要集中在地区优良栽培品种的筛选和生物学特性的研究,如冉孝琴

收稿日期:2015-10-08

基金项目:陕西省科技厅科技统筹创新计划(编号:2012HBGC-20);陕西理工学院人才引进启动项目。

作者简介:虞小燕(1990—),女,安徽安庆人,硕士研究生,从事微生物资源开发利用研究。E-mail:851770849@qq.com。

通信作者:邓百万,教授,主要从事微生物资源保护与开发利用研究。E-mail:2210309868@qq.com。

表 9 添加碳调节剂对小白菜幼苗根系特征参数的影响

处理	根尖数 (条/株)	根长 (cm)	根表面积 (cm ²)	根体积 (cm ³)	根直径 (mm)
CK	—	—	—	—	—
T1	—	—	—	—	—
T2	—	—	—	—	—
T3	32.50a	21.04b	1.78b	0.012ab	0.270a
T4	38.66a	24.07b	2.04b	0.013b	0.272a
T5	33.00a	15.62a	1.44a	0.010a	0.294ab
T6	32.85a	14.09a	1.38a	0.011ab	0.313b

[5]童有为,陈淡飞. 温室土壤次生盐渍化的形成和治理途径研究[J]. 园艺学报,1991,18(2):159-162.

[6]薛晓辉,郝明德. 小麦氮磷肥长期配施对土壤硝态氮淋溶的影响[J]. 中国农业科学,2009,42(3):918-925.

[7]熊严军. 我国土壤污染现状及治理措施[J]. 现代农业科技,2010(8):294-295,297.

[8]徐咏文,段 萍,罗志华. 浅析中国土壤分类的发生与现状[J]. 安徽农业科学,2005,33(10):2003-2004.

[9]褚冰倩,乔文峰. 土壤盐碱化成因及改良措施[J]. 现代农业科技,2011(14):309-311.

[10]杨劲松. 中国盐渍土研究的发展历程与展望[J]. 土壤学报,2008,45(5):837-845.

[11]周增辉,张 娜,韩承华,等. 江苏中南部设施蔬菜盐渍化土壤盐分离子含量及其垂直分布调查[J]. 中国蔬菜,2013(20):39-45.

[12]陈碧华,杨和连,李亚灵,等. 不同种植年限大棚菜田土壤水溶性盐分的变化特征[J]. 水土保持学报,2012,26(1):241-245.

[13]朱宏伟,夏 军,曹国栋,等. 盐渍化弃耕地土壤盐分动态及其影响因素[J]. 土壤,2013,45(2):339-345.

[14]黄凌云,张勇勇,王润屹. 设施土壤盐渍化调查与防治措施的研究[J]. 北方园艺,2011(11):157-159.

[15]黄克民. 菜田土壤存在的问题及改良措施[J]. 现代农业科技,2012(21):246-247.

[16]刘玉国,谭兰兰,卞 龙,等. 盐渍化土壤改良剂的筛选[J]. 农业科技与信息,2013(20):48-50.

[17]张 冈,周志宇,张彩萍. 利用方式对盐渍化土壤中有机质和盐分的影响[J]. 草业学报,2007,16(4):15-20.

[18]顾文婷,董喜存,李文建,等. 盐渍化土壤改良的研究进展[J]. 安徽农业科学,2014,42(6):1620-1623.

[19]王秀丽,张凤荣,王跃朋,等. 农田水利工程治理天津市土壤盐渍化的效果[J]. 农业工程学报,2013(20):82-88.

等对贵州天麻萌发菌优良菌株进行了筛选^[6];李方安等对紫萁小菇生物学特性进行了初步研究^[7]。

由于天麻萌发菌菌株市场上命名混杂,且物种间形态差异不大,通过形态鉴定较为困难。目前,秦巴山区天麻萌发菌菌种的亲缘关系尚无相关研究报道,萌发菌菌种的种源关系不明确,缺少适宜地域栽培生长的天麻萌发菌菌种,对于培育出适合秦巴山区栽培的优良高产菌种的难度较大。利用 rDNA ITS 序列分析技术^[8],可以直接提取蕴含于基因组内的遗传信息,检测和比较传统形态学无法区分的相似菌株种间或种内差别,具有快速、灵敏、准确的优点。笔者选取秦巴山区 8103-3、8103-4、8103-6、8103-7、8103-8、萌-3、萌-7、萌 MD-2、萌发菌、石斛-1、石斛-2、萌-云南共 12 个天麻萌发菌主要栽培菌株,对其形态特征及核糖体转录间隔区(ITS)进行序列分析,并进一步对 ITS 序列进行核酸序列数据库 GenBank 同源性检索比对,构建系统发育树,以期为基于传统形态特征对秦巴山区天麻萌发菌菌株之间的亲缘关系提供分子依据,为天麻萌发菌建立种质资源库及优良菌种的选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 8103-3、8103-4、8103-6、8103-7、8103-8、萌-3、萌-7、萌 MD-2、萌发菌、石斛-1、石斛-2、萌-云南共 12 株萌发菌菌株:由陕西省资源生物重点实验室食药用菌菌种保藏中心提供。

1.1.2 改良 CPDA 培养基 包括马铃薯 200.0 g,玉米粉 50.0 g,葡萄糖 20.0 g, KH_2PO_4 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0 g, NH_4NO_3 5.0 g,维生素 B_1 10 mg,琼脂 15.0 g,加水至 1 000 mL,pH 值自然。CPDA 液体培养基,根据上述改良 CPDA 培养基配制,但不加添琼脂。

1.2 方法

1.2.1 拮抗试验 制备试管斜面培养基,活化各菌株,每株 3 管;取试管活化菌株在同一培养皿上对称接种 2 个菌株,24 ℃ 恒温培养 7 d,观察菌丝间的拮抗反应情况。

1.2.2 萌发试验 青冈木树叶浸泡 24 h 后,平铺在培养皿表面,接种各萌发菌菌株,每株 3 个,24 ℃ 恒温培养 7 d,选取未开裂、颜色较深、富有弹性且大小相近的天麻果实,均匀播撒在培养皿中,24 ℃ 恒温培养 60 d,期间定期定量加水,观察萌发情况。

1.2.3 液体发酵 制备 CPDA 液体培养基,分装于 250 mL 三角瓶中,每瓶装液量 150 mL,于 1.034×10^5 Pa 灭菌 30 min,冷却后将活化的菌株接种至液体摇瓶中,静置 24 h 后,24 ℃、160 r/min 振荡培养 7~12 d。用 3 层无菌纱布过滤菌丝球,再用无菌水洗涤过滤 2~3 次,最后用无菌滤纸吸干水分收集菌丝体。4 ℃ 冰箱保存,备用。

1.2.4 DNA 的提取及扩增 采用 CTAB 法提取供试菌丝体的基因组 DNA^[10];PCR 扩增:ITS 引物:ITS 1(5'-3') TCCG-TAGGTGAA-CCTGGG,ITS 4(5'-3') TCCTCCGCTTATTGA-TATGC。PCR 反应体系:2 × Taq PCR Green Mix 15 μL,引物 ITS 1、ITS 4 各 2 μL,模板 DNA 2 μL,加灭菌双蒸水至 30 μL。PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退

火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。采用 1% 的琼脂糖凝胶进行 45 min 电泳。

1.2.5 测序及构建系统进化树 经琼脂糖凝胶电泳检测的上述 PCR 产物由上海生工生物技术有限公司进行双向测序。将所测的序列用 Clustal-W 软件进行对位排列,然后手工适当校正。随后将调整后的序列提交 GenBank 数据库并进行 Blast 检索,下载同源性较高的序列。利用 Mega 6 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 12 株天麻萌发菌的拮抗反应

12 株天麻萌发菌通过相互之间的两两接触性试验,结果见图 1、表 1,分析得出 8103-4、8103-6、8103-7、8203-8 之间无拮抗反应或反应不明显,与其他菌株之间拮抗反应明显,故此 4 株菌亲缘性相近;萌-3、萌-7、萌发菌、石斛-1、萌-云南之间无拮抗反应或反应不明显,与 8103-3、萌 MD-2、石斛-2 之间拮抗反应微弱,故可将此 8 株菌分成 2 组来进一步研究。

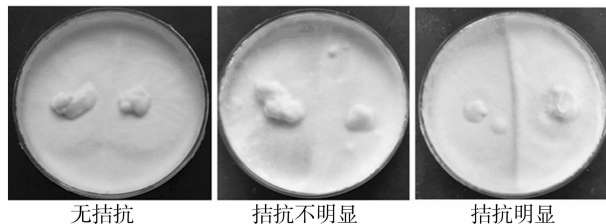


图1 不同菌株之间的拮抗情况

2.2 12 株萌发菌对天麻种子萌发研究

12 株天麻萌发菌与天麻种子伴栽后萌发情况见图 2、表 2。萌-3、萌-7、萌发菌、石斛-1、萌-云南 5 株菌中天麻种子萌发数量多,萌发均匀,天麻生长健壮,色泽鲜艳;8103-4、8103-6、8103-7、8203-8 这 4 株菌中天麻种子萌发数量稀少或没有,天麻瘦小萎蔫,色泽暗淡;8103-3、萌 MD-2、石斛-2 中天麻种子萌发数量较少,天麻种子萌发不均匀,天麻生长良好,色泽鲜艳。

2.3 供试菌株 ITS-PCR 扩增后电泳结果

取 5 μL PCR 产物,用 10 g/L 琼脂糖凝胶(TBE 缓冲液)电泳检测,于 Tanon 3500R 凝胶成像系统(中国 TANON 公司产品)拍照,电泳结果见图 3。

由图 3 可见,12 个天麻萌发菌菌株的基因组 DNA 经 PCR 扩增后获得了单一的条带,菌种的 rDNA ITS 区域的序列片段长度大小为 600 bp。将所获得的 12 个 ITS 序列提交给 NCBI 公共数据 GenBank 进行比对,分析得到 8103-3、8103-4、8103-6、8103-7、8103-8、萌-3、萌-7、萌 MD-2、萌发菌、石斛-1、石斛-2、萌-云南收录号依次为:KT149154、KT149155、KT149156、KT149157、KT149158、KT149159、KT149160、KT149161、KT149162、KT149163、KT149164、KT149165。

2.3 系统发育树分析

从 GenBank 上进行 Blast 检索,下载同源性较高的菌株序列,用 Clustal-W 软件对所有序列进行人工校正,再用 MEGA 6 采用临近相邻法聚类,经自举法检验(1 000 次重复)构建系统发育树。结果(图 4)显示,12 个菌株大致分为 2 类,其中

表 1 12 株天麻萌发菌之间拮抗分布

菌株	8103-3	8103-4	8103-6	8103-7	8103-8	萌-3	萌-7	萌 MD-2	萌发菌	石斛-1	石斛-2	萌-云南
8103-3	-											
8103-4	++	-										
8103-6	++	+	-									
8103-7	++	-	+	-								
8103-8	++	-	-	-	-							
萌-3	+	++	++	++	++	-						
萌-7	-	++	++	++	+	-	-					
萌 MD-2	+	++	++	++	+	+	+	+				
萌发菌	-	++	++	++	++	-	-	-	-			
石斛-1	+	++	++	++	++	-	-	-	+	-		
石斛-2	-	++	++	++	++	+	+	-	-	+	-	
萌-云南	-	++	++	++	+	-	-	+	-	-	+	-

注：“++”表示拮抗明显；“+”表示拮抗不明显；“-”表示无拮抗反应或反应极不明显。

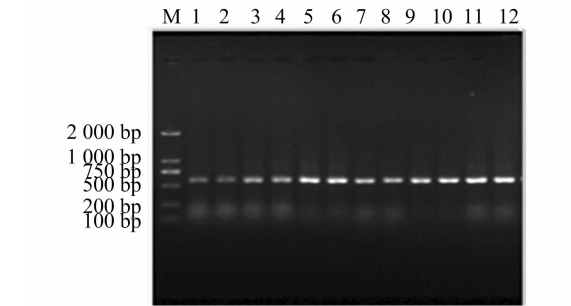


萌发数量多，萌发均匀 萌发数量少，萌发均匀 萌发数量少，萌发不均匀

图2 不同菌株之间的萌发情况

表 2 12 株天麻萌发菌之间萌发情况

菌株	菌丝特征	天麻长势特征	种子出芽快慢
8103-3	洁白，致密，绒毛状	分布不均匀，个体差异大，出现畸形，色泽鲜艳，分支多	缓慢
8103-4	洁白，稀疏，绒毛状	分布均匀，个体瘦小萎蔫，色泽暗淡	较快
8103-6	洁白，稀疏，绒毛状	分布均匀，个体瘦小萎蔫，色泽暗淡	较快
8103-7	洁白，稀疏，绒毛状	分布均匀，个体瘦小萎蔫，色泽暗淡	较快
8103-8	洁白，稀疏，绒毛状	分布均匀，个体瘦小萎蔫，色泽暗淡	较快
萌-3	洁白，致密，绒毛状	大小均一，生长健壮，色泽鲜艳，分支多，分布均匀	快
萌-7	洁白，稀疏，绒毛状	大小均一，生长健壮，色泽鲜艳，分支多，分布均匀	快
萌 MD-2	洁白，稀疏，绒毛状	分布不均匀，个体差异大，出现畸形，色泽鲜艳，分支多	缓慢
萌发菌	洁白，稀疏，绒毛状	大小均一，生长健壮，色泽鲜艳，分支多，分布均匀	快
石斛-1	洁白，致密，绒毛状	大小均一，生长健壮，色泽鲜艳，分支多，分布均匀	快
石斛-2	洁白，稀疏，绒毛状	分布不均匀，个体差异大，出现畸形，色泽鲜艳，分支多	缓慢
萌-云南	洁白，致密，绒毛状	大小均一，生长健壮，色泽鲜艳，分支多，分布均匀	快



泳道为PCR扩增产物；1—8103-3；2—8103-4；3—8103-6；4—8103-7；5—8103-8；6—萌-3；7—萌-7；8—萌MD-2；9—萌发菌；10—石斛-1；11—石斛-2；12—萌-云南

图3 样品rDNA ITS序列扩增电泳检验结果

8103-4、8103-6、8103-7、8103-8 这 4 个菌在同一个分支

上，亲缘关系密切，与已知序列相似度为 99%，但在进化树上形成了单独的分支，这可能是新的分类单元；8103-3、萌-3、萌-7、萌 MD-2、萌发菌、石斛-1、石斛-2、萌-云南这 8 个菌在同一个分支上，其中 8103-3、萌发菌与标准菌 *Mycena citrinomarginat* 亲缘关系比较近，萌 MD-2、石斛小菇-1 与标准菌种 *Mycena purpureofusca* 亲缘关系非常近。

3 讨论与结论

真菌的拮抗反应是体细胞不亲和的直接体现。在真菌界，体细胞不亲和现象普遍存在。此方法具有简单、快捷、直观等优点。是常用的真菌菌种鉴定方法；ITS rDNA 区进化速率较快，在绝大多数真核生物中表现出极为广泛的序列多态性，对高等植物和大型真菌鉴定有很好的准确性和灵敏性，适

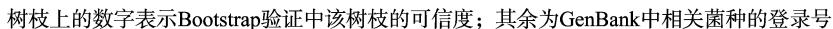


图4 基于 ITS 序列构建的系统发育树

本研究应用拮抗反应和萌发特性对萌发菌菌株进行研究, 对其中菌丝粗壮, 菌落致密, 生长速度快萌发效果好的菌种进行标记筛选, 通过对 12 株天麻萌发菌间的拮抗反应以及与天麻种子萌发试验的分析, 大致将 12 株萌发菌分为 3 类: 萌-3、萌-7、萌发菌、石斛-1、萌-云南, 此 5 株菌株长势相同, 萌发效果好, 株长势相同, 与其他菌株拮抗反应明显, 萌发效果不理想; 103-3、萌 MD-2、石斛-2 此 3 株菌与 8103-4、8103-6、8103-7、8103-8 拮抗反应明显与其他菌株拮抗反应不明显, 萌发效果较好。应用 ITS 序列分析技术, 对秦巴山区天麻萌发菌菌种进行了测序分析, 将其分为 2 类, 其中 8103-4、8103-6、8103-7、8103-8 这 4 个菌在同一个分支上, 相似度为 100%, 亲缘关系相近, 但在进化树上形成了单独的分支, 形成了新的分类单元; 萌-3、萌-7、萌 MD-2、萌发菌、石斛小菇-1、石斛小菇-2、萌-云南 8 个菌在同一个分支上, 其中 8103-3、萌发菌与标准菌 *Mycena citrinomarginata* 亲缘关系比较近, 萌 MD-2、石斛-1、萌-3、萌-7、石斛-2、萌-云南与标准菌株 *Mycena purpureofusca* 亲缘关系较近。这与拮抗试验及萌发试验得到的结论大致相同。由于在实际生产种存在突变、变异、进化的原因, 菌株间存在物种多样性的影响, 对秦巴山区 12 个天麻萌发菌供试菌株进行 RAPD 和酯酶同工酶指纹图谱的分析还有待进一步研究。

- [1] 徐锦堂. 中国天麻栽培学[M]. 北京:北京医科大学、中国医科大学联合出版社,1993,117-119
- [2] 谢果珍,申爱荣,谭著明,等. 天麻共生菌研究进展[J]. 湖南中医杂志,2015,31(4):206-208.
- [3] 冉孝琴,桂阳,张丽娜,等. 天麻种子自然萌发和生长特性[J]. 湖北农业科学,2014,53(10):2325-2329.
- [4] 高兴盛. 天麻有性繁殖的新方法[J]. 吕梁高等专科学校学报,2006,22(2):11-12.
- [5] 徐锦堂. 我国天麻栽培 50 年研究历史的回顾[J]. 食药应用,2013,21(1):58-63.
- [6] 冉孝琴. 贵州天麻萌发菌优良菌株的筛选[D]. 贵阳:贵州师范大学,2014:3-18.
- [7] 李方安,潘燕,秦芸. 紫萁小菇生物学特性的初步研究[J]. 中国农学通报,2013,29(25):142-145.
- [8] 刘华晶,许修宏,姜廷波,等. 基于 ITS 序列分析探讨大兴安岭地区野生黑木耳菌株的遗传多样性[J]. 四川农业大学学报,2011,29(1):40-44.
- [9] 张平,谢娜,赖腾强. 无孢灵芝菌丝生物学特性研究[J]. 河北北方学院学报:自然科学版,2014,30(5):36-40.
- [10] 刘丽,张永军,许长征,等. 一种改良的 CTAB 法提取产多糖真菌 DNA[J]. 中国生物工程杂志,2014,34(5):75-79.