

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.03.019

野生 *Paxillus ammoniavirescens* 菌的分子鉴定及生物学特性研究

杜 萍¹, 涂 慧¹, 蒋佳颖¹, 崔宝凯², 戴玉成^{2*}

(1. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100; 2. 北京林业大学微生物研究所, 北京 100083)

摘要: [目的] 对野生食用菌进行分子鉴定及生物学特性研究, 为其进一步液体深层发酵培养和开发利用奠定基础。[方法] 采用 rDNA ITS 序列分析方法对一野生菌进行分子鉴定, 通过单因素和正交试验确定了该菌株的生物学特性。[结果] 由新鲜子实体分离得到的纯菌株为 *Paxillus ammoniavirescens*, 其菌丝体生长的最适碳源和氮源分别为可溶性淀粉和蛋白胨, 最适培养温度为 25 ℃, 最适 pH 为 4.5。[结论] 卷边网褶菌菌丝体液体培养的最佳配方为: 可溶性淀粉 20 g, 蛋白胨 2 g, KH_2PO_4 3.0 g, MgSO_4 4.5 g, 水 1 L。按此配方培养, 可获得平均干质量为 80 mg 的菌丝体, 明显高于其他配方。

关键词: *Paxillus ammoniavirescens*; 菌种分离; 转录间隔区 (ITS); 系统发育学; 生物学特性

中图分类号: S759.81

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)03-0146-10

Paxillus ammoniavirescens (Contu & Dessi) 在分类学上属于担子菌门 (Basidiomycota)、伞菌纲 (Agaricomycetes)、牛肝菌目 (Boletales)、网褶菌科 (Paxillaceae)、网褶菌属 (*Paxillus*)。*Paxillus* Fr. 属在北半球分布广泛, 与多种寄主树木如杨、桦、栎、椴树、云杉、冷杉等形成外生菌根关系^[1-2]。

网褶菌属种类富含褐色色素, 受伤则变褐棕色, *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. 是“舒筋散”中药的重要成分之一, 有治腰腿疼痛、手足麻木、祛风散寒、舒筋活络等功效。该属很多种类在记载中有毒^[3]或生吃有毒^[4-5], 可出现胃肠道病症^[3], 但在我国北方一些地区却广泛采食^[6]。*P. involutus* 在前苏联时期曾被大量腌制后食用, 在中欧、德国等地均有食用, 但在德国和波兰等国曾发生食用者中毒现象^[7]。据报道, 摄入该菌后可造成免疫溶血甚至致命^[8-9]。肖冬来等人^[10]已在 *P. ammoniavirescens* 中检测出有溶血素蛋白。然而, 根据不同国家的观察

者的经验, 对该菌和其他近缘种是否有害的评估是不同的。“毒性”评估的差异可能取决于物种的差异鉴定。

P. involutus 是研究最广泛的外生菌根 (ECM) 真菌之一。该菌在北半球发生普遍, 与许多针叶树和落叶树形成外生菌根^[2]。该菌在形态学、生理学和生态学等有关表型性状上表现出明显的变异, 也是伞菌纲外生菌根菌生态学或生理学研究的一个重要模式种^[11]。在生物修复重金属污染方面, 植物和真菌形成的菌根共生体已显示出巨大的应用潜力^[12]。菌根真菌可提高宿主植物对重金属的耐受性, 在缓解植物受重金属毒害方面具有重要作用^[13-15]。*P. involutus* 不仅能与耐镉植物灰杨 (*Populus tremula* × *P. alba*) 形成外生菌根, 提高灰杨对 Cd^{2+} 的吸收和耐受能力^[16], 其本身也具有较强的 Cd^{2+} 富集能力^[17]。抗盐菌根菌 *Paxillus* 在盐胁迫下具有维持 K^+/Na^+ 平衡的能力, 可提高树木耐盐性^[18]。

Paxillus 属的特点是难以进行物种鉴定, 导致

收稿日期: 2019-05-21 修回日期: 2019-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31900019); 重庆市教育委员会项目 (KJQN201901427); 长江师范学院 2018 年人才引进项目 (0107/011160022)

* 通讯作者: daiyucheng2013@gmail.com

再生困难,因此,需要大量的菌种^[1]。为了更好地了解、保护、开发大型野生食用菌资源,有必要对该物种的分类问题进行深入研究。目前,内转录间隔区 ITS (internal transcribed spacer) 基因序列分析法广泛应用于野生真菌的鉴定和分类中,是一种非常可靠的方法。目前,国内缺少对网褶菌属的分子系统研究,已有资料多是关于其可食性和生态学特性方面^[19-20]。国外对网褶菌属研究较多,常将 *P. involutus* 作为外生菌根菌研究的模式种^[21]。目前,关于 *P. involutus* 和 *P. rubicundulus* P.D. Orton 的基因组已经完全测序^[22-23]。本研究从黑龙江农业经济职业学院校园内分离获得一株野生网褶菌属菌株,拟通过分子鉴定以及生物学特性研究,为进一步开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试样品

供试野生菌样品(图1)于2014年9月采自黑龙江省牡丹江市黑龙江农业经济职业学院校园内云杉(*Picea asperata* Mast.)树根部周围,菌样编号为DP20140901。



图1 野生蘑菇新鲜子实体

Fig. 1 Fresh fruiting bodies of the wild mushroom

1.2 子实体形态观察

取子实体完整部分,观察并描述其表面性状、结构、颜色、质地,进行形态学特征初步鉴定。

1.3 菌种分离

采用子实体组织分离法分离菌种,在PDA平板上培养8~10 d后,挑取菌落边缘菌丝体进行转接和纯化培养,于25℃恒温培养箱中培养2周,置于4℃冰箱保存备用。

1.4 样品 rDNA ITS 区段的 PCR 扩增、测序及分析

1.4.1 样品基因组 DNA 提取与检测 菌丝体培养、收集及 DNA 提取和检测方法详见文献^[24]。

1.4.2 样品 rDNA ITS 区段的 PCR 扩增与测序 采

用真菌通用引物 ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGT AACAAGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3', 由英骏生物技术有限公司(invitrogen)合成^[25]。PCR 扩增体系为: 10 × Buffer 5 μL, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 4 μL, 4 mmol dNTPs 3 μL, 5 U·μL⁻¹ Taq DNA polymerase 0.5 μL, 10 μmol·L⁻¹ 引物各 2 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH₂O 31.5 μL, 反应总体积为 50 μL。扩增条件: 94℃预变性 1 min; 94℃变性 30 s, 60℃退火 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 最后于 72℃延伸 8 min, 终止温度为 4℃。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 产物和 Marker 上样量均为 5 μL, 电泳结果于 Bio-Rad 凝胶成像系统成像。PCR 扩增产物送交华大基因(北京)公司测序。

1.4.3 ITS 序列分析与系统发育树构建 将测序获得的 ITS 序列通过 NCBI 进行 Blast 搜索, 分析同源性。选择与供试菌株 ITS 序列相似度 99% 以上的 23 条序列, 以黑木耳 *Auricularia heimuer* F. Wu, B.K. Cui, Y.C. Dai 的 ITS 序列^[26] 为外群构建系统发育树, 采用 Clustal X 1.83 程序进行多序列匹配排列, 然后通过 MEGA-X 程序中的 Neighbor-Joining (NJ) 方法、采用 Jukes-Cantor 计算模型构建系统发育树, 进行 1 000 次 Bootstrap 可信度分析, Kimura 2-parameter 法计算遗传距离, 空位作为完全缺失处理。

1.5 生物学特性分析

1.5.1 碳源对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响 试验碳源: 麦芽糖、甘露醇、可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖为分析纯。此外, 采用市售玉米粉作为碳源之一。

无碳基础培养基: KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, 蛋白胨 2 g, 琼脂 18 g, 水 1 L。分别以等量的(2%)麦芽糖、甘露醇、可溶性淀粉、玉米粉、蔗糖、葡萄糖加入到无碳基础培养基中。对 *P. ammoniavirescens* 母种培养基中碳源进行单因素筛选试验。各设 4 个重复。接种菌饼后置于 25℃下恒温培养。接种 2 d 后开始记录菌丝体生长速度, 观察记录菌落特征、生长势等。其中菌丝体生长速度=菌落半径(mm)/菌丝生长天数(d)。菌丝体日均生长速度差异显著性采用 SPSS 16.0 软件中 Duncan 式新复极差法进行分析。

1.5.2 氮源对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生

长的影响 试验氮源：牛肉膏、硫酸铵、酵母膏、蛋白胨为分析纯。此外，采用市售麦麸和黄豆粉作为有机氮源。

无氮基础培养基：葡萄糖 20 g， KH_2PO_4 1.0 g， MgSO_4 0.5 g，琼脂 18 g，水 1 L。分别以等量的（0.2%）牛肉膏、麦麸、硫酸铵、酵母膏、黄豆粉、蛋白胨加入到无氮基础培养基中。对卷边网褶菌母种培养基中氮源进行单因素筛选试验。其余方法同上。

1.5.3 温度对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响 将含有最适碳源和氮源的无菌培养基制成平板，接种菌饼后，分别置于 21、23、25、27、29、31 ℃ 的恒温培养箱中暗培养，其余方法同上。

1.5.4 pH 对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响 采用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 溶液，将含有最适碳源和氮源的液体培养基（可溶性淀粉 20 g，蛋白胨 2 g， KH_2PO_4 1.0 g， MgSO_4 0.5 g，水 1 L）调配为 pH 2.0~8.0 共 13 个处理（间隔 0.5），每 250 mL 三角瓶装液量为 30 mL，每个处理 4 次重复，于 25 ℃ 恒温培养箱中静止培养。培养两周测量菌丝体干质量，并记录菌丝体长势、菌丝体及发酵液颜色变化等。

1.5.5 碳源、氮源、无机盐对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响 从碳源（可溶性淀粉）、氮源（蛋白胨）和无机盐（ KH_2PO_4 和 MgSO_4 ）中各选出 3 个水平，进行四因素三水平的正交试验，以确定各组分的最佳使用量。250 mL 三角瓶的装液量为 50 mL，灭菌前用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 溶液调节培养液为 pH 4.5，接种菌饼后于 25 ℃ 恒温培养箱中静止培养 20 d，其余方法同 1.5.4。

2 结果与分析

2.1 子实体形态观察

菌盖半球形，平展或中央下凹近漏斗状，边缘内卷，直径 4~15 cm。幼菇菌盖表面微粘，成熟后干燥，中央多成龟裂状。菌盖多绒至平滑，黄至红褐色。菌肉厚，黄褐色，伤后变红变褐黑色。菌褶延生，黄褐色，伤后初转红再转黑褐色。菌柄圆柱状，上下同粗，长 4~8 cm，直径 1~2 cm，表面光滑，颜色同菌盖，实心。子实体有特异性气

味。经查阅图鉴，初步判定为网褶菌属种类^[20]。

2.2 ITS 序列及系统发育分析

经测序获得菌株 ITS 区域核苷酸序列总长为 746 bp，将样品 ITS 序列（序列号是 MG571758）输入 NCBI 系统，用 Blast 进行搜索比对，结果有 23 株核酸序列与其具有 99% 以上的相似度，分别来自英国、美国、德国、法国、加拿大、澳大利亚、爱尔兰、西班牙、意大利、波兰等国家，没有发现中国的报道；宿主及生长环境有椴树（*Tilia*）、栎树（*Quercus*）、桦树（*Betula*）、杨树（*Populus*）、公园、草原等地（表 1）。当物种的 rDNA ITS 区序列与比对序列同源性 $\geq 99\%$ 时，可认为相同种^[27]。因此，鉴定该株野生菌为 *Paxillus ammoniavirescens*。它的 5.8 S 和内转录间隔区 2（ITS 2）具有高度保守性，5.8 S 编码序列一般为 158 bp，ITS 2 一般为 229 bp；内转录间隔区 1（ITS 1）序列中度保守，在 275 bp 左右；18 S 和 28 S 基因序列变化幅度较大。ITS 序列在 655~746 bp 左右。

从图 2 系统发育树可以看出，所有分析菌株共分为 4 类，即 *P. ammoniavirescens*，*P. obscurisporus*，*P. involutus* 和 *P. cuprinus*，而实验菌株与 *P. ammoniavirescens* 种类聚为一枝，因此，被鉴定为 *P. ammoniavirescens*。

2.3 碳源对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响

由表 2、图 3 可见，*P. ammoniavirescens* 菌丝体在供试碳源培养基上均能生长，菌丝体颜色因碳源种类不同而呈浅黄至黄灰色（图 3）。在 0.05 水平上，菌丝体日均生长速度差异显著（表 2），其中在可溶性淀粉和葡萄糖培养基上日均生长速度最快，菌丝体浓密，长势强；其次是甘露醇、蔗糖为碳源的培养基，菌丝体较密，生长整齐，与玉米粉培养基上的菌丝体日均长速差异不显著；而在无碳基础培养基（CK）上生长速度最慢，菌丝体稀疏，颜色浅，长势弱。可见，*P. ammoniavirescens* 菌丝体生长对碳源的需求量较大，且来源广泛。此外，菌丝体颜色因碳源种类不同而呈浅黄至黄灰色，说明碳源种类不同影响 *P. ammoniavirescens* 菌丝体的颜色。

2.4 氮源对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响

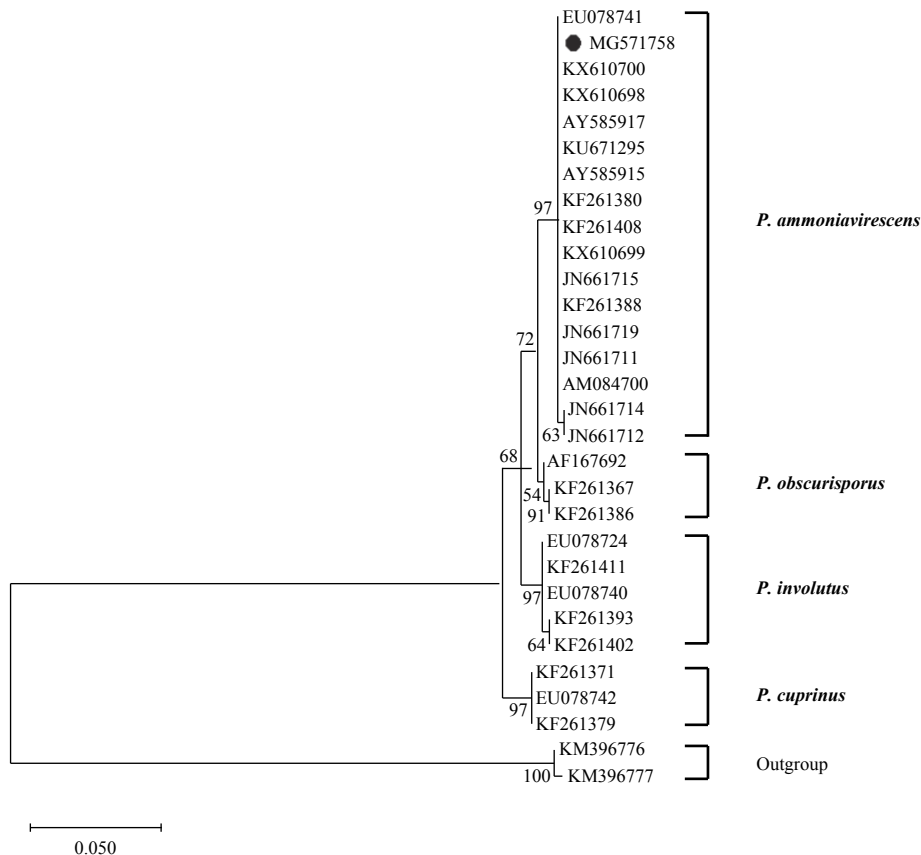
表 1 本研究中使用的物种来源和 ITS 区域的 GenBank 序列号信息

Table 1 A list of species, origin and GenBank accession number of ITS sequences used in this study

序号No.	登录号 Accession no.	种名 Species name	来源国 Country	生长宿主 Recorded trees
1	●MG571758	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	China	云杉 <i>Picea asperata</i>
2	AM084700	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	England	未知 Unknown ^a
3	AY585915	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	France	栎树 <i>Quercus</i> ^a
4	AY585917	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	France	杨树 <i>Populus</i> ^b
5	KX610700	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	Poland	未知 Unknown ^d
6	KX610698	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	Poland	未知 Unknown ^d
7	JN661712	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	England	栎树 <i>Quercus</i> ^e
8	JN661719	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	Italy	杨树 <i>Populus</i> ^e
9	JN661715	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	France	木本植物Woody plants ^e
10	JN661714	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	England	椴树 <i>Tilia</i> ^e
11	KU671295	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	Spain	木本植物 Woody plants ^c
12	JN661711	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	England	混合林 Mixed forest ^e
13	EU078741	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	Sweden	栎树、桦树 <i>Quercus, Betula</i> ^b
14	KX610699	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	Poland	未知 Unknown ^d
15	KF261380	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	France	桦树 <i>Betula</i> ^f
16	KF261408	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	France	冷杉 <i>Abies</i> ^f
17	KF261388	<i>Paxillus ammoniavirescens</i>	France	栎树 <i>Quercus</i> ^f
18	AF167692	<i>Paxillus obscurisporus</i> C. Hahn (1999)	Germany	栎树 <i>Quercus</i> ^f
19	KF261367	<i>Paxillus obscurisporus</i>	France	桦树 <i>Betula</i> ^f
20	KF261386	<i>Paxillus obscurisporus</i>	France	榛树 <i>Corylus</i> ^f
21	EU078724	<i>Paxillus involutus</i>	Sweden	云杉 <i>Picea</i> ^f
22	KF261411	<i>Paxillus involutus</i>	France	冷杉 <i>Abies</i> ^f
23	EU078740	<i>Paxillus involutus</i>	Sweden	未知 Unknown ^b
24	KF261393	<i>Paxillus involutus</i>	France	松树、桦树 <i>Pinus, Betula</i> ^f
25	KF261402	<i>Paxillus involutus</i>	France	冷杉 <i>Abies</i> ^f
26	KF261371	<i>Paxillus cuprinus</i> Jargeat, Gryta, J.P.	France	未知 Unknown ^f
27	EU078742	<i>Paxillus cuprinus</i>	Sweden	栎树、桦树 <i>Quercus, Betula</i> ^f
28	KF261379	<i>Paxillus cuprinus</i>	France	桦树 <i>Betula</i> ^f
29	KM396776	<i>Auricularia heimuer</i>	China	栎树 <i>Quercus</i> ^g
30	KM396777	<i>Auricularia heimuer</i>	China	栎树 <i>Quercus</i> ^g

注: a-f字母分别代表参考的文献。
Note: a According to Anderson & Parkin^[28]. b According to Hedh *et al.*^[12]. c According to Fernandez & Cagigal^[29]. d According to Kalucka *et al.*^[30]. e According to Vellinga *et al.*^[31]. f According to Jargeat *et al.*^[21]. g According to Wu *et al.*^[26].

试验菌株菌丝体在不同氮源培养基上均能生长, 颜色因培养基种类不同而呈浅黄至黄褐色, 并
有不同程度的褐色素分泌。在 0.05 水平上, 菌丝
体的日均生长速度差异显著 (表 3), 其中在蛋白
胨培养基上日均生长速度最快, 菌丝体浓密,
粗壮, 边缘生长整齐, 菌丝体日均生长速度为
0.857 mm·d⁻¹; 其次是麦麸和黄豆粉为氮源的培
养基, 但菌丝体生长较稀疏; 在酵母膏培养基上菌
丝体生长浓密, 但长速较慢。而在无氮基础培
养基 (CK) 中生长速度最慢, 菌丝体稀疏, 颜色
浅, 可见, *P. ammoniavirescens* 菌丝体生长对
氮源种类要求较严格。



注：图中加●标志为分离得到的菌株，聚类编号为 GenBank 登录号，树上的数值表示 Bootstrap 支持率，比例尺表示 0.5% 的序列差异。

Note: ● referring to the tested strain. Numbers in parenthesis representing GenBank accession number. Numbers at the branch points indicating the bootstrap values. The scale bar representing a 0.5% sequence divergence.

图 2 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on ITS sequences

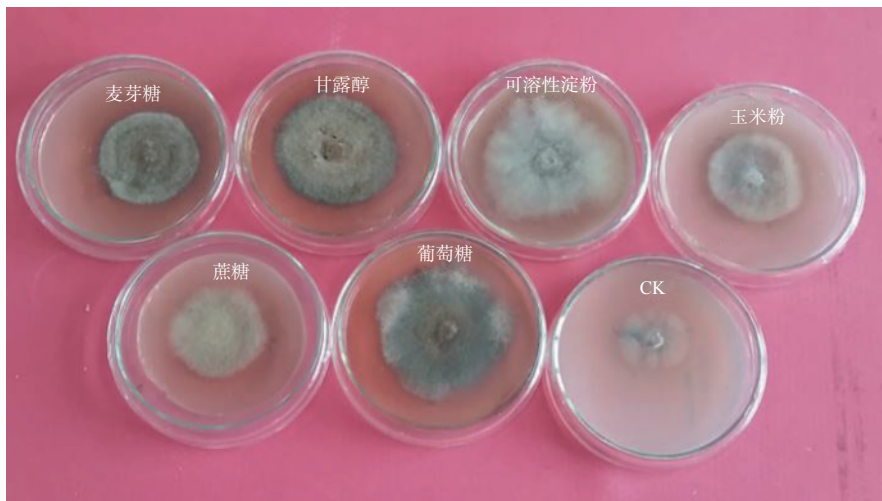


图 3 *Paxillus amoniavirescens* 菌丝体在不同碳源培养基上的生长情况

Fig. 3 *Paxillus amoniavirescens* growing on various carbon media

2.5 温度对 *Paxillus amoniavirescens* 菌丝体生长的影响

由表 4 可见，试验菌株通过不同温度试验表

明，试验菌株在 21 ~ 29 ℃ 范围内均能生长，其中 25 ℃ 时生长速度最快，长势最好，其次为 27 ℃，而 31 ℃ 时菌丝体不生长，表明 *P. amoniavirescens*

表 2 碳源对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响

Table 2 Effect of carbon sources on mycelial growth of <i>Paxillus ammoniavirescens</i>			
碳源 Carbon source	菌丝长势 Hyphal vigor	日均长速 Daily growth rate/(mm·d ⁻¹)	菌丝密度、整齐度 Hyphal density and uniformity
麦芽糖 Maltose	+++	0.653c*	浓密、整齐 Dense, tidy
甘露醇 Mannitol	+++	0.833b	浓密、整齐 Dense, tidy
可溶性淀粉 Soluble starch	+++	0.978a	浓密、不齐 Dense, untidy
玉米粉 Corn flour	++	0.713bc	较密、整齐 Relatively dense, tidy
蔗糖 Sucrose	++	0.798b	较密、整齐 Relatively dense, tidy
葡萄糖 Glucose	+++	0.968a	浓密、较整齐 Dense, relatively tidy
CK	+	0.469d	稀疏、不整齐 Sparse, untidy
注: +表示菌丝体稀疏、生长势较弱; ++表示菌丝体较密、生长势较强; +++表示菌丝体浓密、生长旺盛; *差异显著性(0.05)。 Note: + sparse mycelia, weaker growth vigor; ++ relatively dense mycelia and comparatively strong growth vigor; +++ dense mycelia and strong growth vigor. The lower case letters after daily growth rate indicating a significant difference at <i>p</i> 0.05.			

表 3 氮源对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响

Table 3 Effect of nitrogen sources on mycelial growth of <i>Paxillus ammoniavirescens</i>			
氮源 Nitrogen source	菌丝长势 Hyphal vigor	日均长速 Daily growth rate/(mm·d ⁻¹)	菌丝密度、整齐度 Hyphal density and uniformity
牛肉膏 Beef extract	++	0.644bc*	较密、整齐 Relatively dense, tidy
麦麸 Wheat bran	++	0.743b	较密、整齐 Relatively dense, tidy
硫酸铵 Ammonium sulfate	++	0.467de	较密、整齐 Relatively dense, tidy
酵母膏 Yeast extract	+++	0.563cd	浓密、较整齐 Dense, relatively tidy
黄豆粉 Soybean meal	+	0.668b	稀疏、整齐 Sparse, tidy
蛋白胨 Peptone	+++	0.857a	浓密、整齐 Dense, tidy
CK	+	0.429e	稀疏、不齐 Sparse, untidy

表注同表1; Foot notes as in Table 1

菌丝体生长对温度要求严格, 过高或过低均不利, 且适宜生长温度范围较窄。

2.6 pH 对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响

由表 5 可以看出, 试验菌株菌丝体在 pH 2.0~6.0 范围内均能生长, 其中在 pH 4.5 时长势最好, 菌丝体干质量均高于其他处理; 当 pH 大于 5.0 时菌丝体生长速度逐渐减慢, 菌丝体生物量减

表 4 温度对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响

Table 4 Effect of temperature on mycelial growth of <i>Paxillus ammoniavirescens</i>			
温度/℃ Temperature	菌丝体长势 Hyphal vigor	日均长速 Daily growth rate/(mm·d ⁻¹)	菌丝体密度、整齐度 Hyphal density and uniformity
21	++	0.514d*	较密、整齐 Relatively dense, tidy
23	++	0.696c	较密、较整齐 Relatively dense and tidy
25	+++	1.257a	浓密、较整齐 Dense, relatively tidy
27	+++	1.002b	浓密、整齐 Dense, tidy
29	+++	0.785c	较密、整齐 Relatively dense, tidy
31	+	0.214e	稀疏、不齐 Sparse, untidy
表注同表1; Foot notes as in Table 1			

表 5 酸碱度对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响

Table 5 Effect of pH on mycelial growth of <i>Paxillus ammoniavirescens</i>			
酸碱度 pH	菌丝体长势 Hyphal vigor	菌丝体干质量 Mycelial dry weight/mg	菌丝体颜色、发酵液颜色 Color of mycelia and fermentation broth
2.0	++	15bc*	黄色、淡黄 Yellow, light yellow
2.5	++	20bc	黄色、淡黄 Yellow, light yellow
3.0	+++	32.5ab	黄棕色、黄棕色 Yellowish brown, yellowish brown
3.5	+++	32.5ab	黄棕色、棕黄色 Yellowish brown, yellowish brown
4.0	+++	33ab	黄棕色、棕黄色 Yellowish brown, yellowish brown
4.5	+++	50a	黄色、黄色 Yellow, yellow
5.0	+++	33ab	黄色、黄色 Yellow, yellow
5.5	++	25bc	淡黄色、淡黄色 Light yellow, light yellow
6.0	+	20bc	淡黄色、黄白色 Light yellow, yellowish white
6.5	+	13bc	白色、白色 White, white
7.0	+	12.5bc	白色、黄白色 White, yellowish white
7.5	+	12.5bc	白色、黄白色 White, yellowish white
8.0	+	10c	白色、黄白色 White, yellowish white
表注同表1; Foot notes as in Table 1			

少, 当 pH≥6.5 时菌丝体几乎不生长, 说明 *P. ammoniavirescens* 喜欢偏酸性环境条件, 且适宜生长的酸碱度范围较窄。

表 6 不同碳源、氮源、无机盐用量对 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体生长的影响

Table 6 Effect of different amount of carbon, nitrogen and inorganic salt on mycelial growth of *Paxillus ammoniavirescens*

配方 Formula	可溶性淀粉 Soluble starch	蛋白胨 Peptone	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	菌丝体平均干质量 Average dry weight of mycelia/mg
1	15	2	1	0.5	42.5ab
2	15	4	3	1.5	42.5ab
3	15	6	5	4.5	37.5b
4	20	2	3	4.5	80a
5	20	4	5	0.5	52.5ab
6	20	6	1	1.5	52.5ab
7	25	2	5	1.5	32.5b
8	25	4	1	4.5	45ab
9	25	6	3	0.5	37.5b
K1	122.5	155	140	132.5	
K2	185	140	160	127.5	
K3	115	127.5	122.5	162.5	
R	70	27.5	37.5	35	



图 4 *Paxillus ammoniavirescens* 菌丝体在不同碳源、氮源和无机盐用量培养基中的生长情况

Fig. 4 The growth of *Paxillus ammoniavirescens* mycelia in liquid media with different amount of carbon, nitrogen and inorganic salt

2.7 菌丝体培养最适碳源、氮源及无机盐用量

由表 6 可以看出, *P. ammoniavirescens* 菌丝体在不同碳源、氮源、无机盐用量的培养基中长势良好, 菌丝体及发酵液颜色变化不明显 (图 4)。其中配方 4 的菌丝体干质量最大, 为 80 mg, 与配方

1、2、5、6 和 8 的菌丝体干质量差异不明显, 与配方 3、7 和 9 的菌丝体干质量差异显著。由正交试验优化的菌丝体培养的最佳组合为: A₂B₁C₂D₃, 即可溶性淀粉 20 g, 蛋白胨 2 g, KH₂PO₄ 3.0 g, MgSO₄ 4.5 g, 水 1 L, pH 4.5。由极差分析可知, 各营养因素对菌丝体干质量影响的大小顺序为: 可溶性淀粉>KH₂PO₄>MgSO₄>蛋白胨。

3 讨论

通过 rDNA ITS 序列测定和分析, 证明试验菌株为 *P. ammoniavirescens*。在欧洲, *Paxillus* 属可分为 *P. involutus* complex 和 *P. rubicundulus*, 后者主要发生在湿地生境中, 且只与桤木 (*Alnus* spp., Betulaceae) 有关^[32]。而 *P. involutus* complex 种类则分布在更多样的生境中, 并与多种树种有一定的联系。因此, 寄主特异性是鉴别 *P. rubicundulus* 的一种有效特征, 但在 *P. involutus* 复合种中进行种类鉴别仍然十分困难^[21]。Fries^[33]认为 *P. involutus* 存在着 3 个相互兼容的类群, 第一类子实体主要分布在针叶林和落叶林中 (森林组), 第二组和第三组主要分布在公园和花园区域 (公园组)。然而, 这些群体的子实体之间没有明显的形态学差异, 因此, 被称为 *P. involutus* 同形种 (隐藏种)。不同作者对 rDNA 的系统发育分析^[1,11,21,31]证实了 5 种不同的物种存在于 *P. involutus* complex 中: *P. involutus*, *P. ammoniavirescens*, *P. cuprinus*, *P. obscurusporus* 和 *P. vernalis* Watling (1969)。其中, 根据形态特征进行鉴别是极其困难的。

Hedh *et al.*^[11] 鉴定 EU078741, AY585915, AY585917 为 *P. validus*, 而 Jargeat *et al.*^[21] 则鉴定是 *P. ammoniavirescens*, Anderson & Parkin^[28] 鉴定 AM084700 为 *P. involutus*, 且与 AY585915 有 99.7% 的相似度, 在 NCBI 中比对 AY585915 也是 *P. involutus*, 即同一号菌株 AY585915 曾被鉴定为 3 个不同种, 进一步说明在 *P. involutus* 复合种中进行种类鉴别十分困难。

本研究发现, *P. ammoniavirescens* 在可溶性淀粉培养基上气生菌丝体生长旺盛, 在葡萄糖、麦芽糖、甘露醇培养基上分泌较多褐色素, 菌丝颜色较深, 而在蔗糖、可溶性淀粉和玉米粉培养基上分泌褐色素较少, 颜色浅。在氮源筛选中发现多数菌丝体在培养中后期有黄褐至黑褐色素形成, 尤其在牛

肉膏和硫酸铵培养基中分泌较多褐色素,说明培养基成分影响菌丝体的颜色和褐色素的形成。*P. ammoniavirescens* 菌丝体培养中后期气生菌丝旺盛,浓密、粗壮、分枝明显,初期灰褐色,随培养时间的延长而呈黄褐色,褐色素分泌严重,并有少许硬质颗粒(菌核)形成(图5)。*P. ammoniavirescens* 子实体受伤会变褐棕色,而菌丝体在固体培养基中分泌的褐色素可能与其有关,或许具有某种特殊的药用成分。



注: A=硬质颗粒(菌核); B=褐色液滴; C=气生菌丝。

Note: A=Sclerotia; B=Brown liquid droplets; C=Aerial mycelium

图5 *Paxillus ammoniavirescens* 培养中后期菌落特征
Fig. 5 Colony of *Paxillus ammoniavirescens* in the middle and late stage of culture

Jargeat 等^[21]采用完全固态 MP(麦芽浸粉、蛋白胨)培养基(C⁺, 含有 18 种无机盐和 6 种抗生素)和仅含 2.5 g·L⁻¹ 葡萄糖作为碳源的 MP 培养基(C⁻)于 24 ℃ 条件下培养 *P. involutus*、*P. ammoniavirescens* 和 *P. cuprinus* 的菌丝体 35 d, 发现在 C⁺培养基上 3 种菌丝体均产生棕色色素, 在基质中扩散, 并在菌丝上形成串珠(硬质颗粒)。*P. cuprinus* 气生菌丝灰褐色, 有褐色液滴, 菌丝体日均生长速度为 0.398 ~ 0.655 mm, 在富含高碳量的培养基(葡萄糖、麦芽提取物、酪蛋白)中菌丝体更致密, 由于色素产量高, 培养基会产生棕色染色。*P. involutus* 在加富培养基中, 色素生成少, 无褐色液滴, 菌丝日均生长速度为 0.463 ~ 0.773 mm。而绝大多数 *P. ammoniavirescens* 菌株

生长迅速, 在 3 ~ 4 周内可覆盖整个培养基, 在加富培养基和贫瘠培养基上均有浓密的棉絮状气生菌丝、褐色液滴和硬的颗粒(菌核)。菌丝体日均生长速度为 0.587 ~ 0.950 mm。本研究中菌丝体日均生长速度均快于这 3 个种, 但与 *P. ammoniavirescens* 更接近, 这与 ITS 序列比对和系统发育关系显示的该野生菌株为 *P. ammoniavirescens* 的分析结果相吻合。

4 结论

本研究通过 ITS 序列比对及系统发育关系分析, 证明该野生菌株为 *Paxillus ammoniavirescens*。利用单因子试验筛选出了 *P. ammoniavirescens* 菌丝体生长的适宜碳源为可溶性淀粉, 适宜氮源为蛋白胨, 最适培养温度为 25 ℃, 最适 pH 为 4.5。由正交试验优化的液体菌种培养的最佳配方为可溶性淀粉 20 g、蛋白胨 2 g、KH₂PO₄ 3.0 g、MgSO₄ 4.5 g、水 1 L。在此培养条件下可获得平均干质量为 80 mg 的菌丝体, 明显高于其他配方。菌丝体在固体和液体培养基中的颜色差异较大, 在固体培养基中的颜色因碳氮源种类不同而不同, 分泌褐色素的程度有差异; 在液体培养基中无褐色素分泌, 菌丝体和培养液均呈鲜黄色。该研究结果将为 *P. ammoniavirescens* 种的菌丝体液体深层发酵培养、人工驯化栽培及药用成分开发利用提供理论基础, 并可作为外生菌根菌在生物修复重金属污染、抗逆境胁迫等方面得以应用。

参考文献:

- [1] Cagigal E F M, Sánchez A C. Influence of the culture media and the organic matter in the growth of *Paxillus ammoniavirescens* (Contu & Dessi)[J]. Mycobiology, 2017, 45(3): 172-177.
- [2] Wallander H, Söderström B. *Paxillus*. [M]// Cairney J W G, Chambers S M (eds). Ectomycorrhizal Fungi: key genera in profile. Berlin: Springer-Verlag, 1999: 231-252.
- [3] 刘春光. 鞍山地区常见毒蘑菇分布及中毒情况分析[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(7): 632.
- [4] 马启明. 铁岭地区的食用蘑菇[J]. 中国食用菌, 1986, 3(14): 23-24, 49.
- [5] 马庭杰, 马文惠. 黄山和大别山区有毒大型真菌初探[J]. 食用菌, 1988, 9(1): 6.
- [6] 卯晓岚, 陈玉梅, 何 俭. 呼伦贝尔采菇行[J]. 食用菌, 1987, 8(3): 1-2.
- [7] 应建浙. 菌草拾零[J]. 食用菌, 1981, 2(2): 48-49.

- [8] Winkelmann M, Stangel W, Schedel I, *et al.* Severe hemolysis caused by antibodies against the mushroom *Paxillus involutus* and its therapy by plasma exchange[J]. *Klinische Wochenschrift*, 1986, 64(19): 935-938.
- [9] Anthrowiak R, Anthrowiak W Z, Banczyk I, *et al.* A new phenolic metabolite, involutone, isolated from the mushroom *Paxillus involutus*[J]. *Canadian Journal of Chemistry*, 2003, 81(1): 118-124.
- [10] 肖冬来, 马 璐, 应正河, 等. 广叶绣球菌溶血素基因的序列分析及表达动态[J]. *食用菌学报*, 2016, 23(4): 7-13.
- [11] Hedh J, Samson P, Erland S, *et al.* Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*[J]. *mycological research*, 2008, 112(8): 965-975.
- [12] 朱智梅, 张玉红, 撒 刚, 等. 外生菌根真菌 *Paxillus involutus* 吸收 Cd^{2+} 及 H_2O_2 对 Cd^{2+} 内流的调控作用[J]. *北京林业大学学报*, 2018, 40(4): 24-32.
- [13] Colpaert J V, Assche J A V. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L.[J]. *New Phytologist*, 1993, 123(2): 325-333.
- [14] Miransari M. Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals[J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 645-653.
- [15] Khullar S, Reddy M S. Ectomycorrhizal fungi and its role in metal homeostasis through metallothionein and glutathione mechanisms[J]. *Current Biotechnology*, 2016, 5(3): 1-11.
- [16] 马永禄. 外生菌根真菌 *Paxillus involutus* 提高灰杨(*Populus×canescens*) 对重金属Cd的吸收和耐受能力[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [17] Ott T, Fritz E, Polle A, *et al.* Characterization of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. and its reaction to cadmium[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(3): 359-366.
- [18] 李 静. 抗盐菌根菌 *Paxillus* 与吸水剂提高树木耐盐机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [19] 陈应山, 陈国卿, 李春燕. 沈阳地区主要食用菌的生态观察[J]. *食用菌*, 1988, 9(3): 5.
- [20] 托马斯·莱瑟斯. 蘑菇[M]. 北京: 中国友谊出版社, 2008: 35.
- [21] Jargeat P, Chaumeton J P, Navaud O, *et al.* The *Paxillus involutus* (Boletales, Paxillaceae) complex in Europe: Genetic diversity and morphological description of the new species *Paxillus cuprinus*, typification of *P. involutus* s.s., and synthesis of species boundaries[J]. *Fungal Biology*, 2014, 118(1): 12-31.
- [22] Martin F, Cullen D, Hibbett D, *et al.* Sequencing the fungal tree of life[J]. *New Phytologist*, 2011, 190(4): 818-821.
- [23] Martin F, Bonito G M. Ten years of genomics for ectomycorrhizal fungi: what have we achieved and where are we heading? In: Zambonelli A, Bonito GM (eds), *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012: 383-401.
- [24] 杜 萍. 中国野生毛木耳遗传多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- [25] 杜 萍, 曹天旭, 崔宝凯. 野生毛尖蘑菇菌株分子鉴定及碳氮源筛选试验[J]. *中国食用菌*, 2019, 38(9): 16-20.
- [26] Wu F, Yuan Y, Malysheva V F, *et al.* Species clarification of the most important and cultivated *Auricularia* mushroom “Heimuer”: evidence from morphological and molecular data[J]. *Phytotaxa*, 2014, 186(5): 241-253.
- [27] 雷 琼, 汪 俭, 范晓丹, 等. 1株野生大型食用菌的分子鉴定与同源性分析[J]. *长江大学学报: 自然科学版*, 2013, 10(35): 52-55, 68.
- [28] Anderson I C, Parkin P I. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(2): 248-253.
- [29] Fernandez M, Cagigal E. Ectomycorrhizal fungi of woody plants on degraded lands of Asturias by mining and industrial activities[C]. Spain: University of Oviedo, 2014.
- [30] Kalucka I L, Jagodzinski A M, Nowinski M. Biodiversity of ectomycorrhizal fungi in surface mine spoil restoration stands in Poland - first time recorded, rare, and red-listed species[J]. *Acta Mycologica*, 2016, 51(2): 1080.
- [31] Vellinga E C, Blanchard E P, Kelly S, *et al.* *Paxillus albidulus*, *P. ammoniavirescens*, and *P. validus* revisited[J]. *Mycotaxon*, 2012, 119(1): 351-359.
- [32] Orton PD. Notes on British agarics III[J]. *Notes from the Royal Botanical Garden Edinburgh*, 1969, 29: 75-127.
- [33] Fries N. Intersterility groups in *Paxillus involutus*[J]. *Mycotaxon*, 1985, 24: 403-409.

Molecular Identification and Biological Characteristics of Wild *Paxillus ammoniavirescens* Strain

DU Ping¹, TU Hui¹, JIANG Jia-ying¹, CUI Bao-kai², DAI Yu-cheng²

(1. School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China; 2. Institute of Microbiology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] To Understand the molecular identity and biological characteristics of wild edible fungi and lay foundation for their further culture, development and utilization. [Method] A wild strain of edible mushroom was examined by rDNA ITS sequence analysis and its biological characteristics were investigated by single factor and orthogonal test. [Result] The molecular feature of the mycelia generated from the fresh fruit body of the edible mushroom was proved to be *Paxillus ammoniavirescens*. The optimal carbon and nitrogen sources of its mycelial growth were found to be soluble starch and peptone with most favorable conditions of 25 °C and pH 4.5. [Conclusion] The best formula for mycelial liquid culture is 20 g soluble starch, 2 g peptone, 3.0 g KH₂PO₄, 4.5 g MgSO₄ and 1 liter of water. In average, 80 mg dry weight of mycelia can be generated, which is obviously higher than other culture formulas.

Keywords: *Paxillus ammoniavirescens*; strain separation; ITS; phylogeny; biological characteristics

(责任编辑: 崔 贝)