

# 鳞柄白鹅膏培养特性及其菌株的 rDNA ITS 序列测定

冀瑞卿<sup>1</sup>, 李 玉<sup>1</sup>, 宋瑞清<sup>2\*</sup>

(1. 吉林农业大学 食药菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118; 2. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** 鳞柄白鹅膏为外生菌根菌。为了确定试验菌株是否为鳞柄白鹅膏(*Amanita virosa*), 对其菌丝体进行了 ITS 序列测定和 GenBank 基因库比对, 并通过生长速率法研究其室内培养条件。结果显示, 试验菌株的 ITS 序列长度为 516 bp, 在 GenBank 核酸序列数据库中比对, 试验菌株与鳞柄白鹅膏的相似率为 95%, 可以确定此菌株为鳞柄白鹅膏, GenBank 登录号为 EF493032。pH 值对鳞柄白鹅膏培养菌丝生长的影响根据不同的培养基而不同, 其中在含马铃薯的培养基中, pH 值对菌丝生长的影响很小, pH 值在 5~10 时均生长良好, 可以作为后续试验的主要培养基。供试最适碳源为甘露醇, 最适氮源为酵母膏, 最适生长温度为 25 ℃。

**关键词:** 鳞柄白鹅膏; 培养特性; ITS 序列

**中图分类号:** S949.329 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)06-0112-04

## Cultural Characteristics and rDNA ITS Sequence Analysis of *Amanita virosa*

Ji Rui-qing<sup>1</sup>, Li Yu<sup>1</sup>, Song Rui-qing<sup>2\*</sup>

(1. Engineering Research Center of Edible and Medicinal Fungi, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** *Amanita virosa* is ectomycorrhizal fungi. ITS sequence determination and blast searching in Genbank databases were carried out for the test strain's identity to determine whether the test strain was *Amanita virosa*. The optimum nutritional and culture conditions were tested by studying the effects on mycelial growth of the test strain, which provided the materials for the further study. The mycelium of the tested strain was ITS sequenced, revealing the length of rDNA ITS sequence of 516 bp. After sequence alignment in GenBank database, the similarity of tested strain and *A. virosa* was 95% and the tested strain was identified as *A. virosa*. The GenBank accession number was EF493032. The effect of pH on the mycelial growth was different with the different media; in the medium containing potato, when pH was 5-10, the mycelial growth was well. So the three kinds of media containing potato could be used as the main medium for next researches. The optimum culture temperature was 25 ℃, the optimum carbon source was mannitol and nitrogen source was yeast extract.

**Key words:** *Amanita virosa*; cultural characteristics; ITS sequence

鹅膏菌一直以来是菌物学家和医学工作者们研究的热点, 从分类到资源调查、毒素研究等均不断有

文献报道<sup>[1-5]</sup>。但是其分布区域性和生长季节性的局限给研究带来了不便, 一些学者试图得到它的栽培

收稿日期: 2012-08-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271083); 中国博士后基金项目

作者简介: 冀瑞卿(1977-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 讲师, 博士, 主要从事食药菌应用研究。E-mail: jiruiqingjrj@126.com

\* 通讯作者: 宋瑞清(1964-), 女, 黑龙江延寿人, 教授, 博士生导师, 主要从事菌物开发利用及其植物病害等方面的研究。

E-mail: Songrq1964@163.com

种<sup>[6-8]</sup>,但均未成功,因为大部分的鹅膏菌属(*Amanita*)属于外生菌根菌,与植物根系形成共生关系,其生长环境还不能完全模拟,所以人工培养在目前来说还比较困难,而野生资源十分有限,为了得到更多试验或应用材料,菌丝体培养或发酵是主要途径。本研究以人工培养菌丝体为研究对象,首先确定人工接种菌种与采集的鳞柄白鹅膏(*Amanita virosa*)标本是否一致,基于形态特征鉴定后对其进行 rDNA ITS 序列测定,比对确认其菌种的准确性,然后筛选出有利于菌株生长的营养源及其生长环境,为进一步研究提供资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

试验菌株来自东北林业大学病理教研室。

### 1.2 rDNA ITS 序列测定

1.2.1 DNA 提取 称取 300 mg 菌丝体,按照 CTAB 法提取 DNA。

1.2.2 rDNA ITS 序列扩增 引物为 ITS1(5'-TC-CGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TC-CTCCGCTTATTGATATGC-3')由宝生物工程(大连)有限公司合成。混合液总体积 20  $\mu$ L,加 2  $\mu$ L 模板 DNA,反应体系中其他各种成分浓度如下:1 $\times$  Buffer, dNTP 浓度为 0.25 mmol/L,引物(ITS1 和 ITS4)浓度为 0.001 nmol/L, *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.075 U/ $\mu$ L。

混合后 PCR 扩增,产物用 1.0% 的琼脂糖(含 0.5  $\mu$ g/mL EB)电泳,在 UVP 凝胶成像系统下成像。

1.2.3 测序 根据 PCR 检测结果,取部分混合菌液,选择载体引物 T7:5'-TCCGTGGTGAACCTGCGG-3'和 SP6:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',由上海生工生物工程技术有限公司(测序部)双向测序。所用测序仪为 ABI PRISM 3730,测序试剂为 Big Dye terminator v3.1。

1.2.4 序列比对及系统发育学分析 试验选用正反向测序,用 BioEdit 的 Clustal W 分别进行序列对位排列分析,对有 N 值和计算机误读的个别剪辑进行人工校对,分析菌株 ITS 序列的长度及核苷酸 GC 含量。在 GenBank 核酸序列数据库中进行比对,获得相似率较高、亲源关系相近的物种,特别是鹅膏菌属内已知不同种的 ITS 序列,考察其系统发育关系。采用 UPGMA 法对 ITS 区域(ITS1 + 5.8S + ITS2)构建系统进化树。

### 1.3 培养条件对菌株生长的影响

1.3.1 培养基及 pH 值 供试培养基设 5 个处理:①马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、硫酸镁 1.5 g、磷酸二氢钠 3 g;②马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、硫酸镁 1.5 g、

磷酸二氢钠 3 g;③马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、酵母膏 2 g、蛋白胨 2 g、硫酸镁 0.5 g、磷酸二氢钾 1.5 g、维生素 B1 100 mg;④葡萄糖 30 g、牛肉膏 10 g、硫酸镁 5 g、磷酸二氢钾 5 g、氯化钠 5 g、维生素 B 1.25 mg;⑤蔗糖 20 g、硫酸铵 1 g、硫酸镁 0.5 g、磷酸氢二钾 0.4 g、硫酸钾 0.1 g、氯化钙 0.05 g、硝酸亚铁 0.02 g。以上培养基均添加琼脂 20 g、水 1 000 mL。

按照培养基配方配制好后,利用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L 的 HCl 分别调整培养基 pH 值为 5、6、7、8、9、10,灭菌后备用。

用直径为 10 mm 无菌打孔器切取已培养好的菌落,分别接种在培养基上,置于 25  $^{\circ}$ C 的人工气候箱中培养,7 d 后以十字交叉法测量菌落生长直径,重复 3 次。

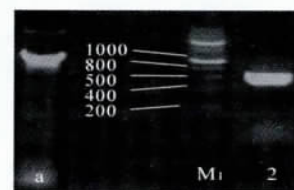
1.3.2 碳、氮源 因为培养基中的马铃薯除提供碳源外还有其他生长物质,所以在碳、氮源的筛选中为了避免马铃薯的影响,选用的基础培养基没有马铃薯成分。培养基配方如下:⑥碳源培养基:各种碳源 20 g、酵母膏 2 g、蛋白胨 2 g、硫酸镁 1.5 g、磷酸二氢钾 3 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL、pH 值为 6.0。供试碳源为甘露醇、乳酸、蔗糖、乳糖、柠檬酸、半乳糖、葡萄糖、淀粉、麦芽糖、草酸。⑦氮源培养基:各种氮源 2 g、葡萄糖 20 g、硫酸镁 1.5 g、磷酸二氢钾 3 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL、pH 值为 6.0。供试氮源为甘氨酸、硝酸钙、蛋白胨、天冬氨酸、酵母膏、硫酸铵、酒石酸铵、谷氨酸、氯化铵、硝酸铵。接种方法和测量方法参照 1.3.1。

1.3.3 培养温度 将菌落接种在培养基(马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、硫酸镁 1.5 g、磷酸二氢钠 3 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)上,分别置于温度为 5、10、15、20、25、30、35  $^{\circ}$ C 的人工气候箱中培养。接种方法和测量方法参照 1.3.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 系统发育分析

用引物 ITS1 和 ITS4 从试验菌株扩增出的目的片段为 516 bp(图 1)。序列分析结果表明,该序列 G+C 含量为 46%。



a. 提取的 DNA 电泳结果; 2. ITS 序列的 PCR 产物电泳结果; M<sub>1</sub>: 范围在 200~4 000 bp 的 Marker

图 1 菌株 DNA 和 PCR 产物电泳结果

将此序列上传至 GenBank, 登陆号 EF493032。从 GenBank 核酸序列数据库进行比对, 获得相似率较高、亲源关系相近的物种, 特别是 *Amanita* 属内已知不同种的 ITS 序列, 考察其中的系统发育关系。采用 UPGMA 法对 ITS 区域 (ITS1+5.8S+ITS2) 构建系统进化树 (图 2)。从图 2 可以看出, *Amanita* 属内存在一定的遗传分化, 分化为 3 个类群 (种)。类群 (种) 1 包括 *A. virosa*\_AY325829、*A. virosa*\_EF493032

和 *A. virosa*\_AB015676, 其中 *A. virosa*\_EF493032 和 *A. virosa*\_AY325829 相似率为 95%, 聚成一支, 为同属同种; 而 *A. virosa*\_EF493032 与 *A. virosa*\_AB015676 的相似率为 93%, 属于同一类群, 相似性也很高, 但遗传距离稍远, 所以属于同一类群的不同分支。*A. virosa*\_EF493032 与类群 (种) 2 和类群 (种) 3 相对遗传距离较远, 相似性均在 89%~91%, 为同属不同种。试验菌株被确认为 *A. virosa*。

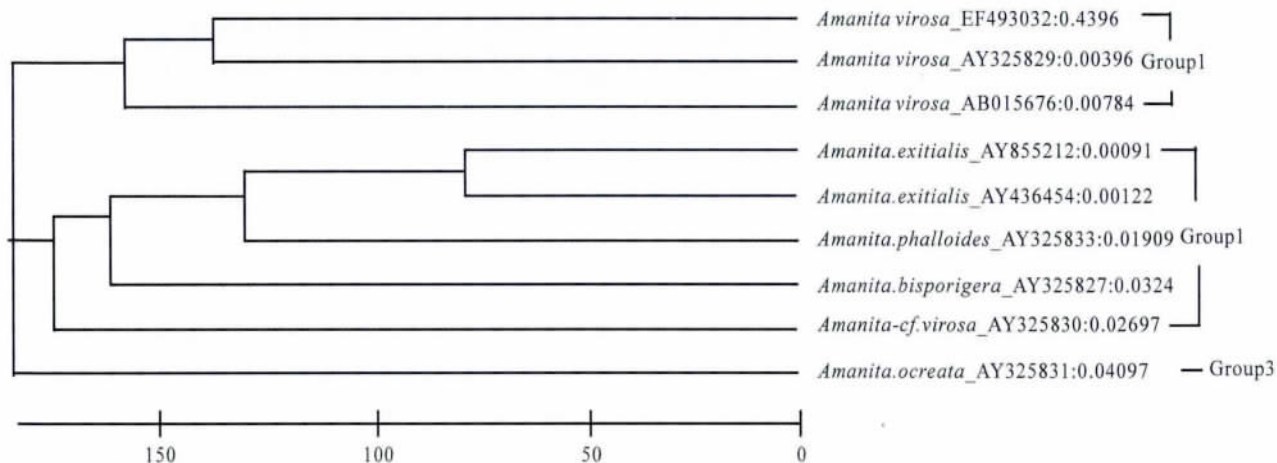
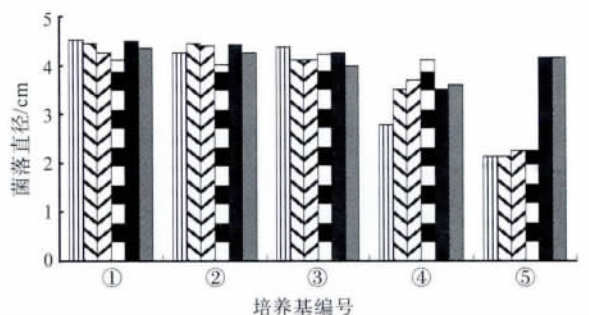


图 2 9 个鹅膏菌菌株的系统发育树

## 2.2 培养条件对菌株生长的影响

2.2.1 pH 值和培养基对菌株生长的影响 在不同培养基上, pH 值对鳞柄白鹅膏培养物的影响不同。在培养基①上, pH 值为 5 时, 鳞柄白鹅膏菌生长最好, 生长 7 d 菌落直径为 4.51 cm。在培养基①—③上, pH 值对菌丝生长的影响不大, 菌落都能较好生长。在培养基④上, pH 值为 8 时, 菌落生长最好; pH 值为 5 时, 菌落生长最差。在培养基⑤上, pH 值为 9~10 时菌落生长最好, pH 值为 5~8 时菌落生长缓慢 (图 3)。本试验将常用的培养基①作为以下试验的基础培养基。



每种培养基 pH 值由左向右分别为 5、6、7、8、9、10

图 3 各种培养基在不同 pH 值下的鳞柄白鹅膏菌落生长直径 (7 d)

2.2.2 碳源对菌株生长的影响 鳞柄白鹅膏菌能利用的碳源种类较为广泛 (图 4)。在供试碳源中, 除了对蔗糖、柠檬酸、乳酸的利用能力一般以外, 对其他碳源的利用均较好。利用最好的碳源是甘露醇, 鳞柄白鹅膏菌在以甘露醇为碳源的培养基上生长 7 d, 菌落直径为 4.48 cm。利用最差的碳源是乳酸, 生长 7 d 菌落直径为 3.23 cm。

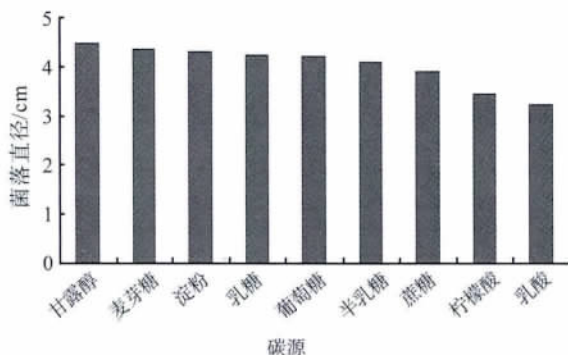


图 4 不同碳源培养基处理的菌落直径 (7 d)

2.2.3 氮源对菌株生长的影响 鳞柄白鹅膏菌能较好地利用各种有机氮源和无机氮源 (图 5)。在供试氮源中, 利用最佳的氮源是酵母膏, 在以酵母膏为氮源的培养基上生长 7 d, 菌落直径达到 4.45 cm, 利用最差的氮源为氯化铵, 生长 7 d 菌落直径为 2.31 cm。

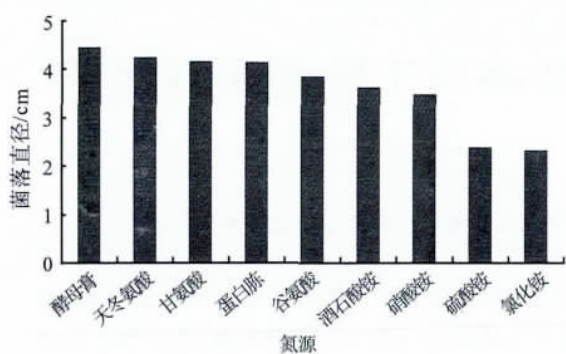


图5 不同氮源培养基处理的菌落直径(7 d)

2.2.4 温度对菌株生长的影响 鳞柄白鹅膏在 25℃下生长最好,生长 7 d 菌落直径为 4.55 cm(图 6);在 5、35℃时,由于温度过低或过高,菌落直径没有明显的扩大,仅菌片表面有菌丝长出。鳞柄白鹅膏生长温度为 5~30℃,最适温度为 20~25℃。

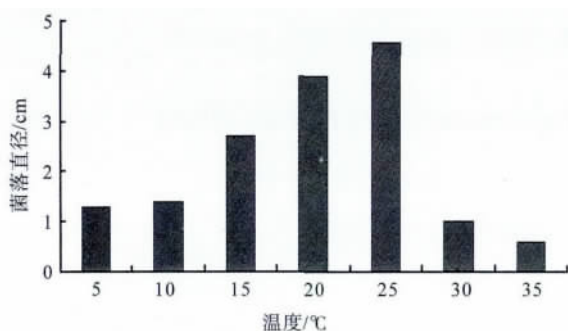


图6 不同培养温度处理的菌落直径(7 d)

### 3 结论与讨论

本试验结果表明,试验菌株的 ITS 序列长度为 516 bp。通过 GenBank 核酸序列数据库进行比对,试验菌株被确认为 *A. virosa*, GenBank 登录号是 EF493032。采用分子生物学的手段可以方便地鉴定菌丝体分类学地位,通过本试验进一步验证了此方法的可行性,这对于分类学研究有一定意义。但是此方法需要尽可能完善数据库,所以需要研究者们长期共同努力,保证其结论的准确性。

本试验结果表明,鳞柄白鹅膏生长的最适温度为 20~25℃,在 25℃生长最好;供试碳源中最适碳源为甘露醇,最适氮源为酵母膏。不同培养基最适 pH 值范围不同,总体来看,pH 值为 5~10 都适合鳞柄白鹅膏的生长,相互间差异不明显。鳞柄白鹅膏在培养基①—③中受 pH 值的影响很小,在 pH 值 5~10 时均生长良好,可以作为后续试验的主要培养基,本研究将培养基①作为试验的基础培养基,其配方为马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钠 3 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL。在培养基④和⑤中菌落直径受 pH 值的影响较大,这可能是因为培养基④和⑤没有马铃薯参与,而马铃薯在培养基中除了提供糖等成分外,还有多种营养元素,但无机化学成分提供的营养则比较单一,具体影响机制还需进一步地试验验证。

#### 参考文献:

- [1] 丁彦怀. 毒蘑菇毒素及其毒性机理[J]. 微生物学通报, 1994,21(1):62-63.
- [2] Bao H Y, Bao T, Li Y. HPLC analysis of peptide toxin in seven species of *Amanita*[J]. Journal of Fungi Research, 2005,3(1):13-16.
- [3] 杨祝良. 试谈我国鹅膏菌的分类研究[J]. 菌物系统, 2000,19(3):435-440.
- [4] 陈作红, 张志光, 张平. 几种鹅膏菌菌种分离培养及其 RAPD 鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 1998,20(S1):93.
- [5] Wieland T. Poisonous principles of mushrooms of the genus *Amanita*[J]. Science, 1968,159:946-952.
- [6] 陈珊, 张常钟, 刘东波. 氮源对毒蘑菇菌丝体生长的影响[J]. 农业技术, 1996,94(5):1-4.
- [7] 陈珊, 张常钟, 夏红梅. 碳源对毒蘑菇菌丝体生长的影响[J]. 农业技术, 1996,94(5):5-8.
- [8] 郭学武, 汪国轮, 龚建华, 等. 三种鹅膏菌培养条件及所产肽类毒素的比较研究[J]. 菌物学报 2008,27(5):745-756.