

## 一种马勃属野生真菌分离鉴定及生物学特性研究

张妍 (辽宁省杨树研究所, 辽宁盖州 115213)

**摘要** 采用形态鉴定与 ITS 分子序列鉴定相结合的方法, 对采集的一株马勃属野生真菌进行鉴定, 并对该菌种菌丝生物学特性进行研究。结果表明, 初步通过形态鉴定法鉴定为梨形马勃, 后进一步用 ITS 分子序列鉴定法鉴定, 分离株 rDNA ITS 片段长度为 697 bp, 测序结果登录 NCBI 与 GenBank 中已知菌种进行 BLAST 比对, 采用 MEGA 2.0 软件构建系统发育树, 鉴定分离菌种为网纹马勃, 结合形态特征, 最终鉴定该菌种为网纹马勃 (*Lycoperdon perlatum*)。生物学特性研究结果表明, 可溶性淀粉为该菌丝生长的最适碳源, 硝酸铵为最适氮源, 7.0 为最适 pH, 菌丝最适温度为 25 ℃。

**关键词** 网纹马勃; 分离; 鉴定; 生物学特性

**中图分类号** S646 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2021)13-0120-04

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.13.029



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Study on Identification and Biological Characteristics of a Wild *Lycoperdon perlatum*

ZHANG Yan (Liaoning Provincial Institute of Poplar, Gaizhou, Liaoning 115213)

**Abstract** A wild macrofungi fruiting body was isolated by tissue isolation method, identified by morphological identification and its molecular sequence identification, and the biological characteristics of the mycelium were studied. The results showed that the strain was identified as *Lycoperdon pyriforme* Schaeff. ; Pers by morphological identification and ITS molecular sequence identification. The length of ITS fragment of rDNA was 697 bp. The sequencing results were registered in NCBI and compared with the known strains in GenBank by blast, the ITS sequence with similar height was downloaded and compared with cluster W. Mega 2.0 software was used to construct the system tree, and the isolated strain was identified as *Lycoperdon perlatum*. The results showed that the suitable carbon source for mycelium growth was soluble starch, the suitable nitrogen source was ammonium nitrate, the suitable pH value was 7.0, and the optimum temperature was 25 ℃.

**Key words** *Lycoperdon perlatum*; Isolation; Identification; Biological characteristics

网纹马勃 (*Lycoperdon perlatum*), 马勃菌目马勃菌科马勃属。夏秋季林中常见, 幼时可食, 子实体有消肿、止血、解毒作用。可与松树、栎树、云杉等形成外生菌根, 具有良好的经济价值和生态价值, 有必要开展深入研究。笔者对该野生菌种进行了鉴定, 并初步研究其生物学特性, 旨在为其进一步开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 研究区概况** 该林场距哈尔滨市 108 km, 地处 127°30'~127°34'E, 45°20'~45°25'N, 年平均气温 2.6 ℃, 最低温度在 1 月, 为 -31.9 ℃, 最高温度在 7 月, 为 32 ℃。年均降水量 723.8 mm, 多集中在 7、8 月, 占全年总降水量的 54%, 蒸发量 1 093.3 mm, 无霜期 120~140 d, 年日照时数 2 471.3 h, 春季有很强的西南、西北气流侵入, 少雨干旱。该地区地带性土壤为暗棕壤, 有机质含量较为丰富。

## 1.2 试验材料

**1.2.1 子实体**。子实体采自东北林业大学帽儿山试验林场 (图 1)。

**1.2.2 培养基**。菌种分离及扩繁采用 PDA 加富培养基。

**1.2.3 主要试剂及引物**。选用 TIANGEN-DNA secure-新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司), 引物 ITS1/ITS4 (宝生物工程有限公司)<sup>[1]</sup>。

## 1.3 试验方法

**1.3.1 菌种分离**。将球状子实体表面用 75% 乙醇棉轻轻擦



图 1 子实体

Fig. 1 Fruiting body

拭干净, 放入超净工作台上, 在菇柄处用手术刀切开 0.5 cm 深, 用手轻轻掰开, 从露出的新鲜菌肉处切取米粒大小的菌肉接入培养基。然后于 25 ℃ 暗培养, 标记为 LXMB。记录分离成功率、菌丝块萌发时间、菌丝颜色、密度、长势<sup>[2]</sup>。

**1.3.2 菌种鉴定**。

**1.3.2.1 形态鉴定法**。对照图谱等工具书, 观察子实体的形状、颜色等形态特征, 进行初步鉴定。

**1.3.2.2 分子鉴定法**。刮取新鲜菌丝, 使用 DNasecure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 提取, 并将提取的 DNA 溶于 25 μL TE (pH 8.0) 中, 置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

以提取 DNA 为模板, 应用真菌通用引物对 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增, 采用张妍等<sup>[2]</sup> 的反应体系及反应程序进行。将 PCR 产物用凝胶成像系统检测拍照, 依据条带清晰情况,

**基金项目** 辽宁省自然科学基金资助计划 (2019-MS-205); 辽宁省农业科学院基本科研业务费 农业绿色高质量发展专项 (2021HQ1912)。

**作者简介** 张妍 (1985—), 女, 山西祁县人, 副高级工程师, 硕士, 从事杨树栽培生理研究。

**收稿日期** 2021-02-05; **修回日期** 2021-03-04

确定是否进行进一步测序。

将测得的序列输入 GenBank 进行 BLAST 比对, 比对出最为相似的已有序列, 节选比对出相似序列的 ITS 区域, 用 Clustalw (BioEdit 7.0 软件) 进行多序列比对。将比对结果输入 MEGA 5.2 软件, 采用 N-J 法构建测得序列的系统发育树, 进行系统发育分析<sup>[3]</sup>。

**1.3.3 生物学特性分析。**开展不同碳源、氮源、pH、温度 4 个单因素试验(表 1), 每处理 5 次重复, 培养 30 d 后, 测量菌丝直径, 同时观察菌丝长势、浓密度、色泽等生长指标。

表 1 生物学特性试验因素水平

Table 1 Factors and levels of biological characteristics test

水平 Level	碳源 Carbon source	氮源 Nitrogen source	pH	温度 Temperature ℃
1	不加碳源(C <sub>0</sub> )	不加氮源(N <sub>0</sub> )	5.5	15
2	蔗糖(C <sub>1</sub> )	酵母膏(N <sub>1</sub> )	6.0	20
3	葡萄糖(C <sub>2</sub> )	蛋白胨(N <sub>2</sub> )	6.5	25
4	果糖(C <sub>3</sub> )	硝酸铵(N <sub>3</sub> )	7.0	30
5	甘露醇(C <sub>4</sub> )	硫酸铵(N <sub>4</sub> )	7.5	
6	可溶性淀粉(C <sub>5</sub> )			

## 2 结果与分析

**2.1 分离结果** 分离第 2 天可见菌块上长出白色绒毛状菌丝, 菌丝生长初期颜色洁白、菌丝整齐, 待菌丝快要长满培养皿时, 菌丝较密, 边缘整齐, 有束状菌丝(图 2、3)。在分离过程中, 污染情况发生较少, 可见组织分离是该菌种适宜的分离方法。菌丝平均生长速度为 0.148 cm/d, 长速较慢。



图 2 菌丝生长初期

Fig. 2 Early growth stage of mycelium

### 2.2 菌种鉴定

**2.2.1 形态鉴定。**子实体小, 高 2.0~3.5 cm, 梨形至近球形, 不孕基部发达, 由白色菌丝束固定于基物上。初期包被色淡, 后呈茶褐色至浅烟色, 外包被形成微细颗粒状小疣, 内部橄榄色, 后变为褐色。孢子橄榄色, 平滑, 球形, 直径 3.5~4.5 μm。初步鉴定为梨形马勃 (*Lycoperdon pyriforme* Schaeff. ; Pers)<sup>[4-5]</sup>。

#### 2.2.2 分子鉴定。

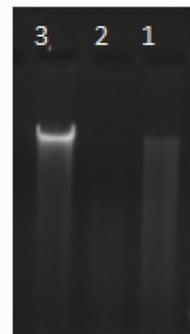
**2.2.2.1 菌丝总 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳检测。**提取的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测发现, DNA 样品条带有降



图 3 菌丝生长后期

Fig. 3 Late growth stage of mycelium

解现象(图 4), 尝试作为 PCR 反应模板进行 PCR 扩增。

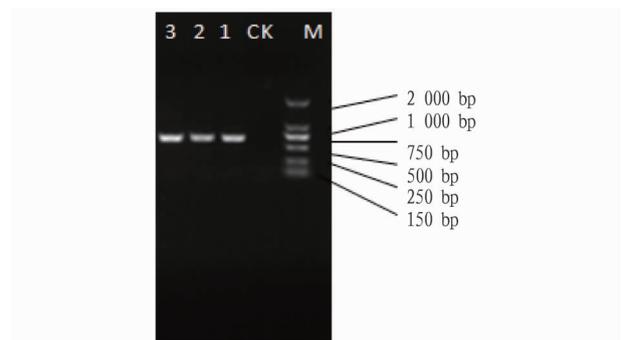


注: 1. LXMB

图 4 DNA 电泳结果

Fig. 4 Result of DNA electrophoresis

**2.2.2.2 PCR 扩增。**经凝胶成像检测扩增产物发现, 成功扩增出了目的条带, 且条带整齐明亮(图 5), 目的片段大小在 700 bp 左右, 可以进行测序。



注: M. Mark, CK. 空白对照, 1, 2, 3. LXMB

Note: M. Mark, CK. Blank control, 1, 2, 3. LXMB

图 5 PCR 检测电泳结果

Fig. 5 Result of electrophoresis of PCR detection

**2.2.2.3 内转录间隔区(ITS)序列。**序列测定结果显示, 其 PCR 扩增产物长度为碱基 697 bp, 登录 NCBI 经 Blast 比对测序, 结果表明, 与 LXMB 相似性最高的菌株序列号分别为 AB669511. 1、FM999681. 1、DQ112630. 1、DQ421095. 1、FM999608. 1, 菌种名称分别为 Uncultured ectomycorrhizal fungus(不能培养的外生菌根真菌)、Uncultured fungus, *Lycoper-*

*don perlatum* (网纹灰包)、Uncultured soil fungus、Uncultured fungus、Query cover 分别为 99%、100%、99%、99%、99%，ident 均为 99%。排名靠前的多为不能培养的外生菌根真菌，只有一个给出种名的为网纹灰包及网纹马勃，根据第 5 位往后的比对结果，菌种名绝大多数为 *Lycoperdon perlatum* (网纹灰包)，下载相似高的 29 个 ITS 序列，用 ClustalW 进行序列比

对，用 MEGA 5.2 软件构建系统树，分析序列采用 Ki mura 双参数模型。EU 780685.1 为外类群 (outgroup)，从中间生根 (The tree is midpoint rooted)。图 6 只显示用百分数表示的大于 50% 的 Bootstrap 值，从图 6 可看出，MB 与所有的 *Lycoperdon perlatum* 序列聚为一支，亲缘关系较近，因此将 MB 形态学鉴定的梨形马勃更正为网纹马勃。

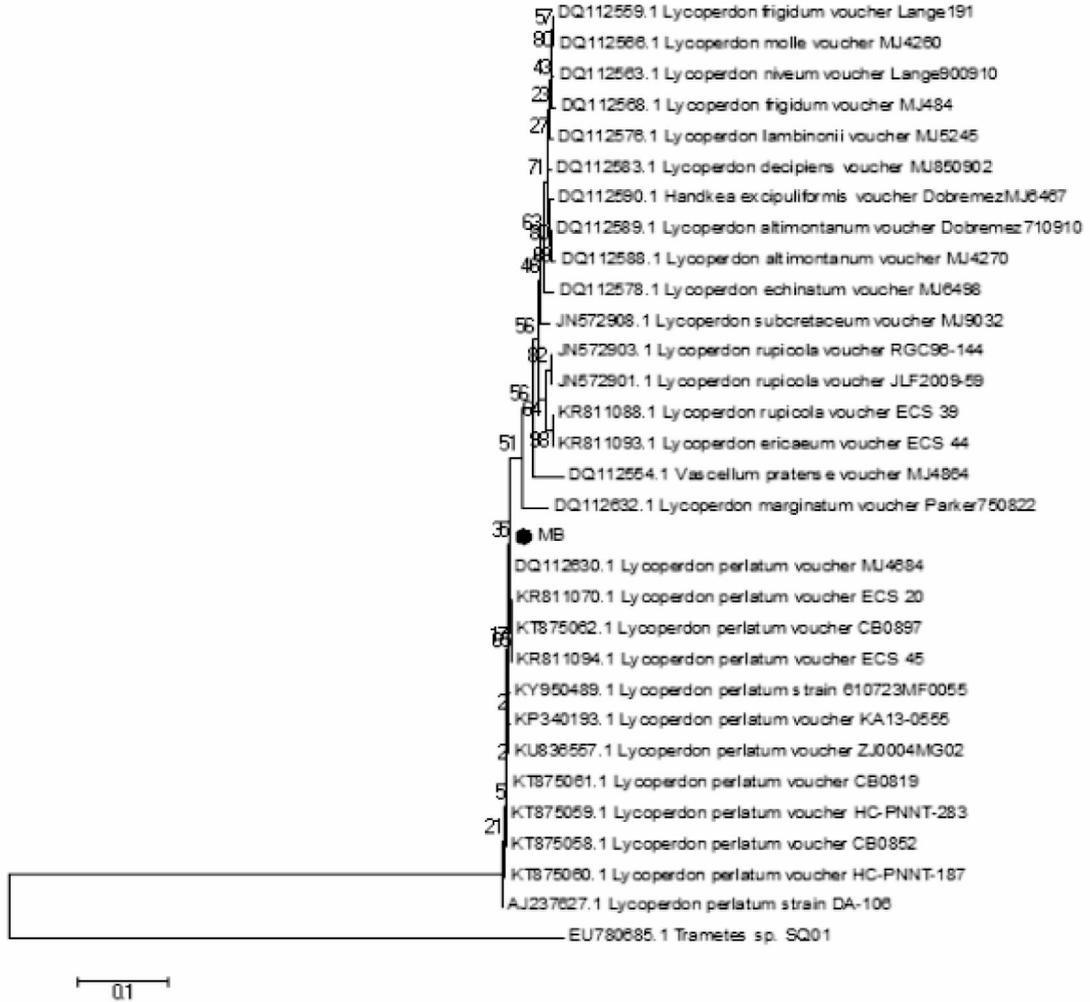


图 6 LXMB 系统发育树

Fig. 6 LXMB phylogenetic tree

经形态鉴定与分子鉴定综合分析，最终鉴定该菌种为网纹马勃 (*Lycoperdon perlatum*)，属担子菌亚门 (Basidiomycotina) 腹隔担子菌纲 (Gasteromycetes) 马勃目 (Lycoperdales) 马勃科 (Lycoperdaceae) 马勃属 (*Lycoperdon*)。

### 2.3 菌丝生物学特性

**2.3.1 不同碳源对网纹马勃菌丝生长的影响。**由表 2 可知，不同碳源对网纹马勃菌丝生长的影响差异极显著。可溶性淀粉作碳源时，菌丝生长速度最快，且较为健壮浓密。但加入果糖的菌丝长势最旺，在 6 个处理中最为浓密。可见，综合可溶性淀粉与果糖作为碳源最有利于网纹马勃菌丝生长。

**2.3.2 不同氮源对网纹马勃菌丝生长的影响。**由表 3 可知，4 种氮源处理间差异极显著。硝酸铵作为氮源时，菌丝生长速度最快、健壮、浓密，是网纹马勃菌丝生长的最佳氮源。

表 2 不同碳源对网纹马勃菌丝生长及长势的影响

Table 2 Effects of different carbon sources on mycelial growth and vigor of *Lycoperdon perlatum*

处理 Treatment	碳源 Carbon sources	菌丝长势 Mycelial growth	菌丝密度 Mycelial density	菌丝颜色 Hyphal color	30 d 生长直径 30 d growth diameter//cm
C <sub>0</sub>	CK	+	稀	白色	2.97±0.06 eD
C <sub>1</sub>	葡萄糖	++	较稀	白色	3.50±0.10 cdC
C <sub>2</sub>	蔗糖	++	较稀	白色	3.70±0.10 cC
C <sub>3</sub>	果糖	+++	浓密	白色	3.49±0.08 dC
C <sub>4</sub>	甘露醇	++	较密	白色	4.26±0.05 bB
C <sub>5</sub>	可溶性淀粉	++	较密	白色	4.66±0.05 aA

注：+++，菌丝健壮；++，菌丝长势一般；+，菌丝长势较弱；同列不同大小写字母分别表示在 0.01、0.05 差异显著

Note: + + +. The mycelium was robust; + +. The growth of hyphae was normal; +. The growth of mycelium was weak. Different capital and lowercase letters in the same column showed significant differences at the level of 0.01 and 0.05, respectively

表 3 不同氮源对网纹马勃菌丝生长及长势的影响

Table 3 Effects of different nitrogen sources on mycelial growth and vigor of *Lycoperdon perlatum*

处理 Treatment	氮源 Nitrogen sources	菌丝长势 Mycelial growth	菌丝密度 Mycelial density	菌丝颜色 Hyphal color	30 d 生长直径 30 d growth diameter//cm
N <sub>0</sub>	CK	+	较稀	白色	3.17±0.29 bB
N <sub>1</sub>	酵母膏	++	较密	白色	1.37±0.15 dC
N <sub>2</sub>	蛋白胨	++	较密	白色	1.93±0.12 cC
N <sub>3</sub>	硝酸铵	+++	浓密	白色	4.03±0.06 aA
N <sub>4</sub>	硫酸铵	+++	浓密	白色	1.87±0.15 cC

注:+++。菌丝健壮;++。菌丝长势一般;+。菌丝长势较弱;同列不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 差异显著

Note:+++。The mycelium was robust; ++。The growth of hyphae was normal; +。The growth of mycelium was weak. Different capital and lowercase letters in the same column showed significant differences at the level of 0.01 and 0.05, respectively

**2.3.3 不同 pH 对网纹马勃菌丝生长的影响。**由表 4 可知,不同 pH 对网纹马勃菌丝生长的影响差异极显著。当 pH 为 7.0 时,菌丝生长速度最快、最浓密;当 pH 为 6.0、6.5、7.5 时,菌丝生长速度及长势均为中等;当 pH 为 5.5 时,菌丝生长速度最慢,长势弱且稀。可见,pH 为 7.0 时最适合网纹马勃菌丝生长。

表 4 不同 pH 对网纹马勃菌丝生长及长势的影响

Table 4 Effects of different pH on mycelial growth and vigor of *Lycoperdon perlatum*

处理 Treatment	pH	菌丝长势 Mycelial growth	菌丝密度 Mycelial density	菌丝颜色 Hyphal color	30 d 生长直径 30 d growth diameter//cm
P <sub>1</sub>	5.5	+	较稀	白色	3.80±0.16 cC
P <sub>2</sub>	6.0	++	较密	白色	4.00±0.16 cC
P <sub>3</sub>	6.5	++	较密	白色	4.33±0.20 bcBC
P <sub>4</sub>	7.0	+++	浓密	白色	6.03±0.15 aA
P <sub>5</sub>	7.5	++	较密	白色	4.97±0.33 bB

注:+++。菌丝健壮;++。菌丝长势一般;+。菌丝长势较弱;同列不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 差异显著

Note:+++。The mycelium was robust; ++。The growth of hyphae was normal; +。The growth of mycelium was weak. Different capital and lowercase letters in the same column showed significant differences at the level of 0.01 and 0.05, respectively

**2.3.4 不同温度对网纹马勃菌丝生长的影响。**由表 5 可知,不同温度处理差异极显著,网纹马勃菌丝在 25 ℃ 时生长最快,30 ℃ 次之,15~30 ℃ 时均可生长。

### 3 结论与讨论

**3.1 菌种鉴定** 该研究最初采用形态鉴定法鉴定菌种为梨形马勃,但对于难以人工成功培养子实体的菌根菌,单纯的

表 5 不同温度对网纹马勃菌丝生长及长势的影响

Table 5 Effects of different temperature on mycelial growth and vigor of *Lycoperdon perlatum*

温度 Temperature ℃	菌丝长势 Mycelial growth	菌丝密度 Mycelial density	菌丝颜色 Hyphal color	30 d 生长直径 30 d growth diameter//cm
15	+	较稀	白色	1.14±0.72 dD
20	++	较密	白色	3.07±0.06 cC
25	+++	浓密	白色	4.15±0.15 aA
30	+++	浓密	白色	3.62±0.13 bB

注:+++。菌丝健壮;++。菌丝长势一般;+。菌丝长势较弱;同列不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 差异显著

Note:+++。The mycelium was robust; ++。The growth of hyphae was normal; +。The growth of mycelium was weak. Different capital and lowercase letters in the same column showed significant differences at the level of 0.01 and 0.05, respectively

形态鉴定法不够准确。近年来,形态鉴定辅以 ITS 序列分子鉴定,已被广大研究人员广泛应用于大型真菌鉴定<sup>[6-11]</sup>。因此,进一步采用 ITS 序列分子鉴定法,将菌种进一步修正为网纹马勃,可见 ITS 序列分子鉴定法结合形态鉴定对于鉴定难以人工培养成功子实体的菌根菌是非常有必要的。

**3.2 生物学特性** 该研究利用碳源、氮源、pH、温度单因素试验初步确定了网纹马勃菌丝生长最适宜生长条件。但总体来说,外生菌根真菌菌丝生长速度仍较慢,还需要在该试验的基础上,进一步探索影响菌丝生长的其他因素,以及各因素之间是否存在交互作用,进而优选出最优培养方式。

### 参考文献

- [1] 冯连荣,张妍,梁德军,等. 林地蘑菇 ITS 鉴定及生物学特性初步研究[J]. 林业科技,2016,41(4):20-23.
- [2] 张妍,冯连荣,王克瀚,等. 卷边桩菇组织分离与 ITS 序列分子鉴定[J]. 林业科技通讯,2016(5):8-11.
- [3] 张妍,冯连荣,赵丽曼,等. 野生花脸香蘑的分离鉴定及生物学特性初探[J]. 林业科技通讯,2020(7):30-33.
- [4] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000:220.
- [5] 袁明生,孙佩琼. 中国大型真菌彩色图谱[M]. 成都:四川出版集团,四川科学技术出版社,2013:474.
- [6] 高山,胡平,边银丙,等. 基于 ITS 序列对 3 个侧耳菌种的分子鉴定[J]. 湖北农业科学,2008,47(12):1390-1393.
- [7] 田慧敏,刘铁志,连静,等. 基于形态特征及 ITS 序列对内蒙古红菇的分类鉴定[J]. 食用菌学报,2014,21(4):15-19,91.
- [8] 王桂文,孙文波. 广西红菇子实体及分离株的 rDNA ITS 序列分析[J]. 广西科学,2004,11(3):261-265.
- [9] 熊涛,肖满,曾哲灵,等. 松乳菇组织分离菌株的 rDNA ITS 序列分子鉴定[J]. 微生物学通报,2006,33(4):1-4.
- [10] 李海波,吴学谦,魏海龙,等. 基于形态特征和 ITS 序列对 7 个鹅膏菌属菌株的分类鉴定[J]. 菌物研究,2007,5(1):14-19,50.
- [11] 宋立志,冯连荣,梁德军,等. 一株野生大型真菌的菌种分离及 ITS 序列鉴定[J]. 安徽农业科学,2018,46(11):113-115.