

裸盖菇和斑褶菇属真菌菌种的有效分离方法

马涛* 凌晓霏 杨慧

(中国林业科学研究院 资源昆虫研究所 云南 昆明 650224)

摘要: 【目的】探讨获取裸盖菇属及斑褶菇属真菌纯培养的有效分离方法。【方法】采用菌褶接种法和孢子弹射法进行分离,以形态鉴定为基础,通过 ITS 区测序并与 DNA 序列库中已知序列进行比对的分子鉴定方法鉴别分离培养物的真伪,以确定分离方法的可靠性。【结果】对采自云南的 28 个裸盖菇属和斑褶菇属菌株进行了分离,菌褶接种法有 24 个菌株分离纯化成功,成功率达 86%,而孢子弹射法仅有 7 个菌株分离成功,成功率为 25%。【结论】菌褶接种法对于裸盖菇属和斑褶菇属真菌是一种有效而简便易行的分离方法,该法利用菌褶为产孢组织的优势,无需对菌褶进行表面消毒,易于纯化成功,值得在其他类似的腐生小型薄盖伞菌类群的分离中尝试应用。

关键词: 裸盖菇属, 斑褶菇属, 菌褶接种法, 孢子弹射法

The effective method of fungal strain isolation for the genera *Psilocybe* and *Panaeolus*

MA Tao* LING Xiao-Fei YANG Hui

(Research Institute of Research Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: [Objective] To explore an effective method for accurately getting fungal strain isolates from the genus *Psilocybe* and *Panaeolus*. [Methods] Twenty-eight freshly collected fruit bodies were used as study materials. The cultures isolated from gill and basidiospores were identified based on morphology and sequence of ITS rDNA. [Results] Twenty-four isolates (86%) were purified successfully by gill inoculation method and seven (25%) by basidiospore

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(No. Riri200707M)

*通讯作者: Tel: 86-871-3861234; 邮箱: matao_1121@163.com

收稿日期: 2011-12-30; 接受日期: 2012-04-16

discharge. **[Conclusion]** Gill is the spore-bearing tissue of agarics, and easy to germinate. Furthermore it is no need to sterilize the surface of the gill for purification in culture medium. This isolation approach may be extended in other groups of the saprophytic fungi characterized by small fruiting body size and thin pileus, similar to these two genera.

Keywords: *Psilobybe*, *Panaeolus*, Gill inoculation, Basidiospore discharge

裸盖菇属和斑褶菇属真菌的多数种类属神经致幻型真菌, 这类真菌含有对人和动物的大脑神经具兴奋和致幻作用的神经毒素, 其主要活性成分为裸盖菇素 (Psilocybin) 和脱磷裸盖菇素 (Psilocin), 有的种类还含有裸盖菇素类似物: 一甲基裸盖菇素 (Baecocystin) 和脱甲基类似物 (Norbaecocystin), 该类毒素在研究和治疗精神病、治疗成瘾及镇痛方面具有潜在的应用价值^[1-2]。菌种是研究和应用真菌资源的基础, 如何获得纯菌种是后续研究的关键。裸盖菇属和斑褶菇属真菌大多为小型伞菌, 菌盖直径多不超过 6 cm, 菌盖很薄, 菌柄细而脆, 用常规的菌肉组织分离法极易污染且不易纯化, 而普通的菌褶分离法需采用有菌幕保护的幼嫩菌褶或经表面消毒的菌褶进行分离, 但不是所有伞菌的菌褶都有菌幕保护, 即使有, 在野外不易采到, 而表面消毒又极易对菌褶组织造成伤害而难以分离成功, 因此采用上述常规的组织分离法需要尽可能多的新鲜子实体, 通过大量的分离才能获得纯菌种^[3]。目前, 尚无此类真菌有效分离方法的报道, 为有效获取该类真菌的纯菌种, 本研究利用菌褶为产孢组织的优势, 采用了较特殊的分离方法, 即不进行表面灭菌, 由于实体上取任一健康、合适大小的菌褶组织直接接种于培养基上, 之后密切观察菌丝萌发生长和污染状况, 如发现污染, 则进行连续转接获得纯菌种。采用该法, 对采自云南的 28 个菌株进行了分离, 并与目前分离该类菌种常用的多孢分离法 (孢子弹射法) 进行了比较。为确保分离方法的可靠性, 在形态鉴别的基础上, 通过基于 rDNA ITS

包括 5.8S 序列测序并与互联网 DNA 序列库中已知序列比对的分子鉴定方法进行了确证。

1 材料与方法

1.1 样本

于子实体发生季(2009年8月)在云南省楚雄市、双柏县和香格里拉县3地采样, 选择新鲜、健康的子实体当日进行分离。根据子实体菌盖、菌褶、菌柄、是否伤变蓝等宏观形态特征和盖表皮、担子、担孢子及囊状体等显微结构特征鉴定子实体。样本信息详见表1。

1.2 供试培养基

PDA培养基(购自广东环凯微生物有限公司), 使用前每升加入3g琼脂粉(Japan, 购自云科生物工程公司)使其浓度至1.8%, pH自然, 灭菌后加入终浓度为100 U/mL (0.06 g/L)青霉素和200 U/mL (0.2 g/L)的庆大霉素。

1.3 分离方法

1.3.1 孢子弹射法: 利用担子菌孢子的弹射机制, 取一片菌褶贴于培养皿盖中央, 褶上的孢子在数小时内会自然弹射至培养基上, 为避免杂菌污染, 过夜后或观察到培养基上落有孢子时(肉眼可见些许孢子印), 用新的培养皿盖置换贴有菌褶的皿盖, 于24℃培养观察。

1.3.2 菌褶接种法: 取长度不小于6 mm的一块菌褶直接贴于培养基中央, 于24℃培养, 每天观察菌褶的萌发生长情况, 一旦发现菌褶边缘有杂菌(常为稀疏、细长、蛛网状的霉菌菌丝体, 生长速度较快, 可通过肉眼判断)生长, 立即将远离

表 1 裸盖菇和斑褶菇属子实体及其分离物来源
Table 1 Fruit bodies of *Psilocybe* and *Panaeolus*, and their isolates

子实体 Fruit body	分离物 Isolate	子实体来源 Source
<i>Panaeolus bisporus</i>	CX022	Chuxiong, Yunnan (云南省楚雄市)
	CX027	Chuxiong, Yunnan (云南省楚雄市)
<i>Panaeolus cyanescens</i>	SB128	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB130	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
<i>Panaeolus fimicola</i>	SB110	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
<i>Panaeolus semiovatus</i>	ZD001	Shangri-la County, Yunnan (云南省香格里拉县)
	ZD005	Shangri-la County, Yunnan (云南省香格里拉县)
	ZD039	Shangri-la County, Yunnan (云南省香格里拉县)
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	SB111	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB114	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB133	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB134	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB136	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB137	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB141	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB142	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	ZD029	Shangri-la County, Yunnan (云南省香格里拉县)
	ZD041	Shangri-la County, Yunnan (云南省香格里拉县)
<i>Panaeolus</i> sp.	CX003	Chuxiong, Yunnan (云南省楚雄市)
	CX004	Chuxiong, Yunnan (云南省楚雄市)
	ZD010	Shangri-la County, Yunnan (云南省香格里拉县)
<i>Psilocybe coprophila</i>	SB117	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
	SB118	Shuangbai County, Yunnan (云南省双柏县)
<i>Psilocybe</i> sp. 1	ZD037	Shangri-la County, Yunnan (云南省香格里拉县)
<i>Psilocybe</i> sp. 2	ZD040	Shangri-la County, Yunnan (云南省香格里拉县)
<i>Psilocybe</i> sp. 3	CX025	Chuxiong, Yunnan (云南省楚雄市)
<i>Psilocybe</i> sp. 4	CX026	Chuxiong, Yunnan (云南省楚雄市)

污染的另一侧切出转移至新培养基, 一般经 2-4 次可转纯。如发现细菌生长(菌落光滑、湿润), 则将污染部分切除丢弃或继续培养至先端菌丝长至超出污染部分, 转接即可。

1.4 鉴定

1.4.1 形态鉴别: 观察菌丝体是否由组织块(菌褶)萌发, 结合菌落形态、颜色、质地, 并通过种

内菌株间或同一菌株内菌落间形态特征是否具有-一致性, 以及生长速度较慢等特征进行判断。

1.4.2 分子鉴定: (1) 培养物的 DNA 提取。参照真菌 DNA 提取试剂盒(Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit, BIOER)说明书进行。(2) PCR 扩增及测序。利用真菌通用引物 ITS4 (5'-TCCTC CGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5 (5'-GGAAGTA

AAAGTCGTAACAAGG-3') 扩增转录间隔区 ITS1、ITS2 包括 5.8S rDNA^[4]。50 μ L 反应体系: 10 \times Buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 1 pmol/ μ L 引物 4 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.6 μ L, DNA 模板 1 μ L, 无菌去离子水补足 50 μ L, 扩增在 MJ 公司的 PTC-200 上进行。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色观察。纯化和测序工作由生工生物工程(上海)有限公司完成。(3) 序列比对(Alignment)和判断。将测得的 ITS 序列在 NCBI 上应用 BLAST 软件查询比对, 根据查询到的同源序列判断培养物所属物种。

2 结果与分析

2.1 孢子弹射法与菌褶接种法分离结果

表 2 显示由菌褶分离的 28 个菌株除 4 株污染

外, 均分离成功, 分离成功率达 86%, 而孢子弹射法仅有 7 株分离成功, 其余 21 个菌株终未萌发, 分离成功率仅为 25%。结果表明: 菌褶接种法是裸盖菇属和斑褶菇属真菌菌种分离的一种有效方法, 而孢子弹射法萌发率较低, 不易分离成功。

2.2 形态鉴别

由菌褶分离的菌株均由组织块萌发, 由孢子弹射法分离的菌株则由培养基的一个至数个位置萌发并逐渐形成形态特征一致的菌落, 实验菌株菌落形态特征见表 3, 分离菌株菌落颜色多为白色、乳白色或带淡黄色, 质地多为棉絮状、绒毛状或毡状, 有的菌株(SB110 和 CX026)具蓝色色素, 菌株生长速度相对其它杂菌(霉菌)较慢, 且各菌株不同菌落具有相对一致的特征。此外, 虽然有的菌种菌株间在菌落颜色、质地和长势上

表 2 孢子弹射法与菌褶接种法分离效果
Table 2 Effects of gill inoculation and basidiospore discharge isolation

序号 No.	分离物 Isolate	菌褶接种法 Gill inoculation	孢子弹射法 Basidiospore discharge isolation	序号 No.	分离物 Isolate	菌褶接种法 Gill inoculation	孢子弹射法 Basidiospore discharge isolation
1	SB110	污染	+	15	ZD001	+	-
2	SB111	+	-	16	ZD005	+	-
3	SB114	+	+	17	ZD010	+	-
4	SB117	+	+	18	ZD029	+	-
5	SB118	+	-	19	ZD037	+	-
6	SB126	+	-	20	ZD039	+	-
7	SB128	+	-	21	ZD040	+	-
8	SB130	+	-	22	ZD041	+	-
9	SB133	污染	+	23	CX003	+	-
10	SB134	+	-	24	CX004	污染	+
11	SB136	+	-	25	CX022	+	-
12	SB137	污染	+	26	CX025	+	+
13	SB141	+	-	27	CX026	+	-
14	SB142	+	-	28	CX027	+	-
分离成功菌株(株) Pure cultures (strain)		24	7	分离成功率 Pure cultures /Total isolates (%)		86	25

注: +: 分离或纯化成功; -: 分离后未萌发。

Note: +: Isolated and purified successfully; -: Fail to germinate after isolating.

表3 菌落形态特征与长势
Table 3 Colony characteristics and growth vigour of the isolates

菌株 Strain	菌种 Species	菌落形态特征 Colony characteristics	长势 Growth vigour
SB110	<i>Pa. fimicola</i>	米黄带浅褐色, 毡状, 少气生菌丝, 紧贴培养基生长, 具深蓝色色素	+
SB111	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色, 绒毛状, 菌丝浓密, 多气生菌丝和匍匐菌丝, 菌落边缘较整齐	++++
SB114	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色, 绒毛状和垫状, 菌丝浓密, 多匍匐菌丝	+++
SB117	<i>Ps. coprophila</i>	白色带淡黄色, 绒状、垫状或毡状, 呈垫状时菌丝致密, 菌落较厚, 少气生菌丝	++
SB118	<i>Ps. coprophila</i>	白色至淡黄色, 垫状, 短绒状, 或毡状, 呈垫状时菌丝致密, 菌落较厚, 少气生菌丝	++
SB126	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色至乳白色, 毡状或薄绒状, 有的具沟纹和皱褶	++
SB128	<i>Pa. cyanescens</i>	白色至乳白色, 薄绒状, 有时毡状和粒状, 常有皱褶和沟纹, 多匍匐放射状生长, 少气生菌丝	++
SB130	<i>Pa. cyanescens</i>	白色至乳白色, 毡状或短绒状, 具放射状沟纹和皱褶, 少气生菌丝	++
SB133	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色, 絮状, 菌丝较疏松, 多匍匐菌丝, 菌落边缘整齐	+++
SB134	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色, 绒毛状, 疏松, 多匍匐菌丝, 菌落边缘整齐	+++
SB136	<i>Pa. sphinctrinus</i>	乳白色, 毡状, 边缘呈现短绒状, 具放射状沟纹和皱褶, 少气生菌丝	++
SB137	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色, 绒状, 菌丝浓密, 多匍匐菌丝	+++
SB141	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色至乳白, 毡状, 紧贴培养基生长, 具沟纹和皱褶, 少气生菌丝	+
SB142	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色至乳白色, 毡状或短绒状, 紧贴培养基生长, 具沟纹和皱褶, 少气生菌丝	+
ZD001	<i>Pa. semiovatus</i>	白色带乳黄色, 絮状, 菌丝浓密, 多气生菌丝和匍匐菌丝, 有的具黄色透明液体分泌物	++++
ZD005	<i>Pa. semiovatus</i>	白色带乳黄色, 棉絮状, 菌丝浓密, 多气生菌丝和匍匐菌丝, 有的具黄色透明液体分泌物	++++
ZD010	<i>Panaeolus</i> sp.	白色至米黄色, 毡状或粒状, 部分呈短绒状, 少气生菌丝	+
ZD029	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色至乳白色, 毡状, 有时短绒状, 常有沟纹和皱褶, 少气生菌丝	++
ZD037	<i>Psilocybe</i> sp. 1	白色至乳白色, 毡状, 少匍匐菌丝和气生菌丝	+
ZD039	<i>Pa. semiovatus</i>	白色带淡黄色, 絮状, 菌丝浓密, 多气生菌丝和匍匐菌丝, 有的具黄色透明分泌物	++++
ZD040	<i>Psilocybe</i> sp. 2	米白色, 薄绒状, 疏松, 多以接种点为中心呈环带式匍匐生长, 菌落边缘整齐	++
ZD041	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色至乳白色, 棉絮状或短绒状, 少气生菌丝	++
CX003	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色, 短绒状, 少气生菌丝	++
CX004	<i>Pa. sphinctrinus</i>	白色, 绒状, 菌丝浓密, 多气生菌丝和匍匐菌丝	++++
CX022	<i>Pa. bisporus</i>	米黄至浅褐色, 毡状, 紧贴培养基生长, 具放射状或不规则沟纹和皱褶, 少气生菌丝	+
CX025	<i>Psilocybe</i> sp. 3	白色至乳白色, 老后浅褐色, 短绒状, 菌丝致密, 紧贴培养基生长, 具放射状沟纹和皱褶, 少气生菌丝	+
CX026	<i>Psilocybe</i> sp. 4	乳白色, 老后带黄色, 长绒状辐射生长, 多匍匐菌丝, 有时菌落中部突然变薄形成一圆形近无色的区域或环带, 有的具蓝色色素,	++++
CX027	<i>Pa. bisporus</i>	米黄至褐色, 毡状, 菌丝紧贴培养基生长, 少气生菌丝	+

注: +: 长势弱; ++: 长势较弱; +++: 长势较强; ++++: 长势强。

Note: +: Growth vigour weak; ++: Growth vigour relatively weak; +++: Growth vigour relatively strong; ++++: Growth vigour strong.

具有一定的变化,但相同菌种菌株间多呈现较为一致的特征,如紧缩斑褶菇(*Pa. sphinctrinus*)菌落颜色均为白色或乳白色,质地多为绒状、絮状或毡状;粪生裸盖菇(*Ps. coprophila*)为白色带淡黄色,除绒状和毡状外,还同时呈现垫状特征,气生菌丝少,长势较弱;变蓝灰斑褶菇(*Pa. cyanescens*)为白色至乳白色,绒状或毡状,常有皱褶和沟纹,气生菌丝较少,长势都较弱;半卵形斑褶菇(*Pa. semiovatus*)为白色带淡黄色,絮状,菌丝浓密,长势强,且均存在黄色透明液体分泌物;而双孢斑褶菇(*Pa. bisporus*)则都为米黄至褐色,毡状,气生菌丝少,长势弱。由形态特征初步判定分离菌株均来源于原子实体。

2.3 分子鉴定结果

经形态鉴定的菌株,对其中10个菌株进行了ITS包括5.8S rDNA片段测序,结果见表4,测序片段长度在598–660 bp之间,NCBI上BLAST结

果显示,各菌株 Score 值排列靠前的同源系列均为相应的裸盖菇属和斑褶菇属种类,且 E value 值均为0,以 Score 值最高的同源系列来分析,菌株 SB118、SB136、ZD029、ZD041、CX022 分子鉴定结果与形态鉴定结果一致,种内相似性为99%–100%,说明5个菌株均来源于相应子实体;菌株 ZD040、CX026、SB128、SB110 和 ZD005 与近缘种的相似性分别为 94% (*Ps. mexicana*)、97% (*Ps. cubensis*)、98% (*Pa. cambodginiensis*)、99% (*Pa. retirugis*)和 100% (*Pa. antillarum*),结合其所分离的子实体,也可判定这5个菌株为正确的分离物。ZD005、SB110 和 SB128 分子鉴定与形态鉴定结果有所差异,由于这几个菌株与其近缘种形态上较为相似,因此存在因形态鉴定引起的命名问题,也可能与单一基因反应的信息度不足有关,需在形态学基础上,结合多基因序列综合分析后进一步确定其种名。

表4 与系列库中得分最高的同源序列比对结果
Table 4 Sequence alignment of GenBank top hits for the ITS and 5.8S rDNA which agree

序号 No.	分离物 Isolate	子实体 Fruit body	ITS 和 5.8S 片段长度 ITS and 5.8S sequence length (bp)	同源物种 (GenBank 序列号) Species identification (GenBank accession No.)	匹配碱基数/比对序列长度 Number of ITS matches/ Number identified in GenBank	同源性 Identities (%)
1	SB110	<i>Pa. fimicola</i>	641	<i>Panaeolus retirugis</i> (FJ478119.1)	639/641	99
2	SB118	<i>Ps. coprophila</i>	601	<i>Psilocybe coprophila</i> (AJ519795.1)	593/595	99
3	SB128	<i>Pa. cyanescens</i>	598	<i>Panaeolus cambodginiensis</i> (AB158633.1)	589/599	98
4	SB136	<i>Pa. sphinctrinus</i>	610	<i>Panaeolus sphinctrinus</i> (DQ182503.1)	610/610	100
5	ZD005	<i>Pa. semiovatus</i>	617	<i>Panaeolus antillarum</i> (JF908515.1)	611/611	100
6	ZD029	<i>Pa. sphinctrinus</i>	618	<i>Panaeolus sphinctrinus</i> (DQ182503.1)	617/618	99
7	ZD040	<i>Psilocybe</i> sp. 2	624	<i>Psilocybe mexicana</i> (HM035077.1)	594/630	94
8	ZD041	<i>Pa. sphinctrinus</i>	617	<i>Panaeolus sphinctrinus</i> (DQ182503.1)	617/617	100
9	CX022	<i>Pa. bisporus</i>	646	<i>Panaeolus cyanescens</i> var. <i>bisporus</i> (EU834287.1)	643/647	99
10	CX026	<i>Psilocybe</i> sp. 4	660	<i>Psilocybe cubensis</i> (HM035074.1)	644/665	97

3 讨论

对裸盖菇属和斑褶菇属真菌 28 个菌株的分离结果表明, 菌褶接种法有 24 个菌株分离成功, 成功率达 86%, 是一种高效的分离方法。菌褶虽然是担子菌的产孢组织, 但由于成熟伞菌的菌褶始终暴露于空气之中, 易被杂菌污染, 常规方法较少采用菌褶直接接种于培养基的方法进行菌种分离, 即使采用菌褶进行分离也要经酒精或升汞进行表面消毒, 但这又极易对担孢子、担子和菌褶组织造成伤害而影响分离效果。本研究中, 裸盖菇属和斑褶菇属真菌为腐生真菌, 且产孢量较大, 菌褶及其上的大量孢子在培养基上较易萌发, 且菌丝长势较强, 其它杂菌不易与其竞争, 利用这一优势, 采用该法分离时无需对菌褶进行表面消毒, 即使有杂菌污染也多出现在组织块周围, 不易蔓延至组织块上, 因此较易纯化, 采用该法进行分离, 即使只有一个新鲜子实体也很容易分离成功, 菌种分离不受样本数量的限制, 只是所取菌褶不易太小, 否则不易纯化。采用孢子弹射法进行分离萌发率较低, 分离成功率仅为 25%, 不易分离成功, 实验中发现, 如果培养基上孢子较多的话, 较易萌发生长, 因此其萌发率可能与弹射至培养基的孢子量有关, 孢子的弹射由于受担孢子成熟度的影响, 所以使用该法也相应地受到限制而不易成功, 其原因有待进一步探讨。

担子菌分离培养物的形态鉴定主要通过菌落和菌丝体等表型特征或观察培养物是否能形成相应子实体来判断其真伪。在实际鉴定中, 形态特征易受客观条件影响而不稳定, 仅凭形态特征判定培养物纯度主观性较强, 难以令人信服; 而许多担子菌无法或较难在培养基上形成子实体, 即使能够形成, 也耗时较长。随着分子生物学的发展, 基于遗传物质 DNA 的分子鉴定方法对于

培养物的鉴定无疑是一种简便而可靠的方法。核糖体 DNA ITS 区是目前公认较好的分子标记, 被普遍用于真菌物种的分类鉴定和属内种间或种内群体的系统学研究^[5-6], 近年来, 在担子菌分离培养物的鉴定中也得到了广泛应用^[7-11], 并成功用于裸盖菇属和斑褶菇属真菌及其培养物的鉴定^[12-14]。以 ITS 序列相似度界定真菌属种尚无统一标准, Pounder 等以比对系列长度大于 400 bp, 相似度 $\geq 99\%$ 鉴别为同一种, 相似度 93%–99%鉴别为同一属^[15]。以此为参考, 本研究 10 个待测菌株 ITS 区与数据库中已知序列比对片段长度在 593–644 bp 之间, 比对结果中排列靠前的同源序列均为相应的裸盖菇属和斑褶菇属种类, 得分最高的同源序列属内种间相似度为 94%–100%, 种内相似度为 99%–100%, 表明 10 个菌株均来源于相应子实体, 证实了形态鉴定结果。

对于多数真菌来说, 通过 ITS 序列与 DNA 序列数据库中已知序列的比对结果分析通常可界定到属, 由于 DNA 序列库中尚有许多物种的序列尚未登录, 加之复杂的分类学问题(如同物异名、许多真菌名称的变换等)及不同的分类观点引起的命名问题, 还有登录序列信息的可靠性及单一基因反应的信息度不足等问题, 很多难以鉴定到种^[7,16], 如本研究中 ZD040、CX026、SB128、SB110 和 ZD005 的 5 个菌株均未能准确鉴定到种, 必须以形态学鉴定为基础, 并结合多基因序列分析进行综合鉴定。就分离培养物纯度鉴定而言, 通过待测序列与数据库中已知 ITS 区序列比对即使无法鉴定到种, 根据所出现的近缘种已足以判定其分类地位从而确定其真伪, 该法充分利用了数据库信息, 无需源子实体或标准菌株序列, 既简化了程序, 又节约了成本, 是一种简便、快速而可靠的方法, 为形态鉴定提供了科学依据。

本研究中,形态鉴别和分子鉴定结果同时证实菌褶接种法是裸盖菇属和斑褶菇属真菌菌种分离的有效方法。该法操作简单,技术常规,易于掌握且行之有效,值得应用到一些腐生类群中产孢量较大的小型薄盖伞菌,如鬼伞属(*Coprinus*)、脆柄菇属(*Psathyrella*)、粪锈伞属(*Bolbitius*)、田头菇属(*Agrocybe*)、锥盖伞属(*Conocybe*)和球盖菇属(*Stropharia*)等,我们将在今后的菌种分离工作中加以进一步验证。

参 考 文 献

- [1] 贺新生,张玲,康晓慧.神经致幻毒菌及其毒性[J].中国食用菌,2003,23(2):10-12.
- [2] 邓永坤,李辉,袁芳.赛洛西宾的毒性与应用[J].中国药物依赖性杂志,2007,16(6):410-414.
- [3] 贺新生,侯大斌,何培新,等.野生蕈菌生物学特性与栽培技术[M].北京:中国轻工业出版社,2007:72-91.
- [4] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315-321.
- [5] 赵国柱,张天宇,张猛.核糖体基因簇在真菌系统学研究中的意义[J].生命的化学,2002,22(1):13-15.
- [6] Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens[J]. Medical Mycology, 2002, 40(1): 87-109.
- [7] Romanelli AM, Sutton DA, Thompson EH, et al. Sequence-based identification of filamentous basidiomycetous fungi from clinical specimens: a cautionary note[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(3): 741-752.
- [8] Prewitt ML, Diehl SV, McElroy TC, et al. Comparison of general fungal and basidiomycete-specific ITS primers for identification of wood decay fungi[J]. Forest Products Journal, 2008, 58(4): 66-71.
- [9] 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.
- [10] 李海波,吴学谦,魏海龙,等.几种森林大型真菌纯培养菌种的RAPD及ITS分子标记鉴定[J].林业科学,2007,43(12):94-100.
- [11] 沙涛,丁骅孙,张汉波,等.利用松茸ITS特异性引物对松茸分离物进行鉴定[J].云南植物研究,2004,26(5):524-528.
- [12] Lee JC, Cole M, Linacre A. Identification of members of the genera *Panaeolus* and *Psilocybe* by a DNA test: a preliminary test for hallucinogenic fungi[J]. Forensic Science International, 2000, 112(2/3): 123-133.
- [13] 刘如烟,魏涛,何培新,等.裸盖菇属的真菌鉴定及分子系统学初探[J].微生物学通报,2006,33(2):44-47.
- [14] 曹颖,贺新生.用RAPD与ITS1标记鉴定斑褶菇属与裸盖伞属间疑难菌株[J].食用菌,2007(6):16-17.
- [15] Pounder JI, Simmon KE, Barton CA, et al. Discovering potential pathogens among fungi identified as nonsporulating molds[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(2): 568-571.
- [16] Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, et al. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: A fungal perspective. PloS One, 2006, 1(1): e59.