

瓦尼木层孔菌 WN-3 分类地位的分子生物学验证及生理学特性研究

胡伟^{1,2}, 张跃新², 邓勋³, 宋小双³, 尹大川¹, 宋瑞清^{1*} (1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省林特产研究所, 黑龙江牡丹江 157011; 3. 黑龙江省森林保护研究所, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的] 研究瓦尼木层孔菌 WN-3 分类地位的分子生物学验证及生理学特性。[方法] 采用分子生物学方法对瓦尼木层孔菌 WN-3 菌株进行分类地位验证, 通过生长速率法研究该菌株的生理学特性。[结果] 菌株 WN-3 的 ITS 序列长度为 756 bp, 在 Genbank 核酸序列数据库中比对, 试验菌株与瓦尼木层孔菌的相似率为 98%, 确定菌株 WN-3 为瓦尼木层孔菌, GenBank 登陆号为 HQ845057。瓦尼木层孔菌 WN-3 生长的最佳碳源为葡萄糖和甘露糖, 最佳氮源为麦麸和玉米; 菌株在 pH6.5 条件下生长最好, 适宜生长温度为 28 ℃。[结论] 该方法研究了瓦尼木层孔菌 WN-3 分类地位的分子生物学验证及生理学特性, 为进一步研究其人工栽培和规模化生产提供了理论基础。

关键词 瓦尼木层孔菌 (*Phellinus vaninii* Ljub.) WN-3; 生理学特性; ITS 序列测定

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)32-12551-03

Molecular Biological Verification of Taxonomic Status and Physiological Characteristics of *Phellinus vaninii* WN-3

HU Wei et al (Forestry School of Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] To study molecular biological verification of taxonomic status and physiological characteristics of *Phellinus vaninii* WN-3. [Method] The methods of molecular biology were used to verify the taxonomic status of strain WN-3. The physiological characteristics of WN-3 were researched by growth rate method. [Result] The results showed that: The length of rDNA ITS sequence of WN-3 is 756 bp. Sequence alignment in Genbank database showed the similarity of strain WN-3 and *P. vaninii* was more than 98%. So the strain WN-3 was verified as *P. vaninii*. The Genbank accession number of WN-3 is HQ845057. Strain WN-3 can grow well in the PDA media which pH were 6.5, the optimum carbon sources for WN-3 growing were glucose and mannose and the optimum nitrogen sources were corn and wheat bran. The optimum temperature for growing was 28 ℃. [Conclusion] Molecular biological verification of taxonomic status and physiological characteristics of *Phellinus vaninii* WN-3 were studied, which will lay a theoretical basis for further study its artificial cultivation and large scale production.

Key words *Phellinus vaninii* WN-3; Physiological characteristics; ITS sequence determination

瓦尼木层孔菌 (*Phellinus vaninii* Ljub.) 是一种生长在杨树上的具有较高经济价值的锈革孔菌科真菌, 也是近年才被业内关注的杨黄“新秀”。因此, 瓦尼木层孔菌人工培育及资源评价也由此受到业内的广泛关注^[1-2]。瓦尼木层孔菌最早发现于俄罗斯远东地区^[3], 后发现日本、朝鲜也有分布^[4]。戴玉成报道认为, 瓦尼木层孔菌作为一种新的药用真菌, 具有很好的市场前景, 但还缺乏真菌学角度认识^[5]。笔者以瓦尼木层孔菌黑龙江完达山菌株为对象, 在多年调研瓦尼木层孔菌的自然地理条件与野外发生环境, 实地观察其生活习性基础上, 通过形态学和分子生物学鉴定方法确定黑龙江完达山杨黄菌株的分类学地位, 同时采取真菌生物学培养及统计分析方法, 研究分析该菌株的生物学及生理学的特性, 以期对瓦尼木层孔菌的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 瓦尼木层孔菌 (*Phellinus vaninii* Ljub.) 黑龙江完达山菌株, 采自黑龙江省虎林县东方红林业局, 菌种采取组织分离方法获得^[6-7], 保存于黑龙江省林业科学院林特产研究所食用菌研究室。

1.2 方法

1.2.1 菌株 WN-3 分类地位的分子生物学验证。 采用 CTAB 法提取菌丝体 DNA^[8], 应用 ITS1 和 ITS4 引物^[7] 进行 PCR 扩增 (ITS1: 5'-TCCGTAGTGTAACCTGCCG-3', ITS4: 5'-

TCCTC CGCTTATTGATATGC-3'), 引物由上海生工生物公司合成。PCR 反应体系为: 10 × PCR buffer 5.00 μl, dNTPS 5.00 μl, ITS1 引物 5.00 μl, ITS4 引物 5.00 μl, Taq 酶 0.75 μl, DNA 模板 2.50 μl, ddH₂O 26.75 μl, 总体积 50 μl; PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 30 个循环, 72 ℃ 补平 10 min。将未纯化 PCR 产物直接测序, 对测序结果在 GenBank 中核酸数据库序列进行 Blast 分析, 确定其分类地位, 使用 MEGA4.0 软件, 采用 UPGMA 法对 ITS 区域 (ITS1 + 5.8S + ITS2) 构建系统进化树, 进行亲缘关系和系统发育分析^[9]。

1.2.2 碳源对菌丝生长的影响。 分别用供试碳源 (乳糖、可溶性淀粉、甘露糖、果糖、麦芽糖、蔗糖) 替代基础培养基中的葡萄糖 (CK), 制作平板培养基; 接种后置于 28 ℃ 下暗光培养, 培养 7 d, 用十字交叉法测量菌落直径, 每个处理设 5 个重复。

1.2.3 氮源对菌丝生长的影响。 分别用供试氮源 (麦麸、谷氨酸、硫酸铵、酵母、玉米、天门氨酸、甘氨酸、硝酸铵) 替代基础培养基中的马铃薯 (CK), 制作平板培养基; 接种后置于 28 ℃ 下暗光培养, 培养 7 d, 用十字交叉法测量菌落直径, 每个处理设 5 个重复。

1.2.4 不同温度对菌丝生长的影响。 以 PDA 改良培养基为供试培养基, 在 13 ~ 38 ℃ 范围内, 设 6 个温度梯度, 即 13、18、23、28、33 和 38 ℃; 接种后, 培养 7 d, 用十字交叉法测量菌落直径, 每个处理设 5 个重复。

1.2.5 pH 值对菌丝生长的影响。 用浓度 0.1 mol/L NaOH 溶液和浓度 0.1 mol/L HCl 溶液将 PDA 改良培养基分别

作者简介 胡伟 (1964 -), 男, 辽宁沈阳人, 研究员, 从事北方食用药用真菌资源研发。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事森林病理、大型真菌资源开发利用研究。

收稿日期 2013-10-16

调节到7个不同的pH梯度,即5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5和8.0;接种后,于28℃下培养7d,以平板培养基上菌落直径作为生长量指标。试验重复5次,取其菌落直径的平均值,比较菌株的生长情况。

1.2.6 不同含水量对菌丝生长的影响。制做3级菌种,菌袋规格为17 cm × 35 cm。培养料配方为:木屑80%、麦麸17%、豆粕粉2%、石灰0.3%、石膏0.7%。含水量设置4个梯度,分别为55%、60%、65%和70%,每个处理重复10次,于28℃暗光培养,观察并记录菌丝生长状态。

2 结果与分析

2.1 菌株分类的分子生物学验证

2.1.1 PCR扩增产物分析。用引物ITS1和ITS4从瓦尼木层孔菌菌株扩增出的目的片段为756 bp(图1),GenBank登陆号为HQ845057。

```

1  ggggagagc acggaggat catcattgtg tggatggag ggaagactgc tggcgggaag
61  gaattatttt cagcatctgg ccctccttgg tcaaaaaaac tatcaacccc cctgctcct
121 ccttatttta tgagtgaag taagtagtag taggtgttc ttgtagtaaa taattagaag
181 aaggaaggaa acgaagggtt gttggttgg tagccatcct taaaaaaagg aaaccggggg
241 ggggtcggg ggggaagggg tgggttggg gcaaccaacc ccctatatt ttgtgtgaat
301 gaaagtattg ttcttgggg aagaaaatcc atacatcatt aaacaatgta tttgttgct
361 cttgatgga ggaagcaggc aaagaatta gataagtaaa gtgacagaca gaattcagtg
421 attcattgaa tgttcgacc ctccgtgccc ccgtagtatt tgggaggggc atgcctgagt
481 gagtgtcatg tttctatcaa atcgtttgtc tttaattaa ggaagggagg gagggatgga
541 gggggaggtt tatggctgcc ctccgaagga agtgggttgg ttcttattac attcattgg
601 tgggtctgg ctggtgccc gggagtaata gttgatttgc ttaaccaacg agcgcctacc
661 gagcgagctt gtttcggctg gtcgtgttgg gtcggagcaa ggagtagtta cctccttttt
721 cttgacacct tgacctcaaa tcaggtagat gcccat
  
```

图1 菌株WN-3 rDNA ITS序列

2.1.2 系统发育学分析。从GenBank核酸序列数据库进行比对,获得相似率较高、亲缘关系近的物种,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)。

图2表明,在所选的序列中,木层孔菌属内存在一定的遗传分化,分化为2个类群(种),其中菌株WN-3位于类群(种)1中,与该类群中的*Phellinus vaninii* (JN169788、HQ845051和HQ845055)相似率最高,高于98%,聚成一支,验证为瓦尼木层孔菌(*P. vaninii*)。

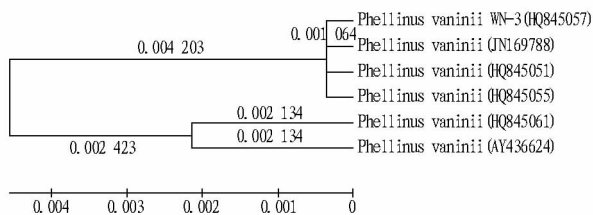


图2 木层孔菌属的系统进化树

2.2 菌株WN-3的生理学特性

2.2.1 碳源对菌丝生长的影响。图3表明,瓦尼木层孔菌WN-3在不同碳源培养基上的长速存在显著差异($P <$

0.05)。葡萄糖与甘露糖均为该菌株的适宜碳源。菌株在添加甘露糖的培养基上生长最快,但菌落不浓密;在添加葡萄糖的培养基上生长速度较快,菌落浓密,培养10d后,菌落直径可达75 mm。因此,该菌株菌丝体生长的最佳碳源是葡萄糖。

2.2.2 氮源对菌丝生长的影响。图4表明,菌株能较好的利用各种有机和无机氮源。供试氮源中,利用最好的氮源是麦麸和玉米,在以麦麸和玉米为供试氮源的培养基上培养10d的菌落直径达到68.5和67.9 mm。相对利用较差的氮源是硫酸铵和谷氨酸,菌落生长较为稀疏,培养3d的菌落直径是55.6和50.2 mm。

2.2.3 不同温度对菌丝生长的影响。瓦尼木层孔菌属于木材腐朽菌,对温度要求不严格,其在13~35℃范围内均可生长(图5),但生长的最佳温度范围是25~30℃,在28℃下菌株生长最快,菌丝生长致密,健壮;培养10d的菌落直径为67.5 mm,在33和23℃下菌丝生长速度较28℃条件下慢,在18℃下较前者更慢,在13和38℃下菌丝生长速度最慢。

2.2.4 pH对菌丝生长的影响。菌株在不同的pH值梯度范围均能生长(图6)。在pH为6.5的培养基上生长最为旺盛,菌丝生长速率最快,健壮且致密;培养10d菌落直径达到65.7 mm。随着培养基pH的增加,菌株生长呈下降趋势。

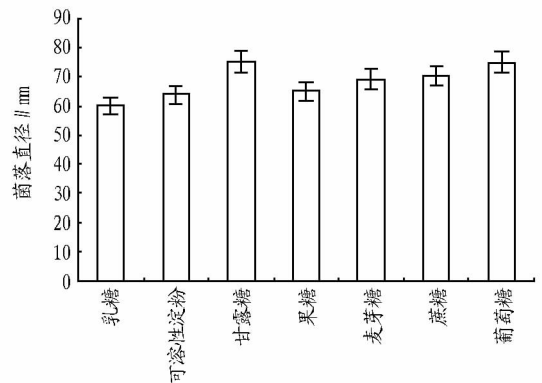


图3 不同碳源对菌株生长的影响

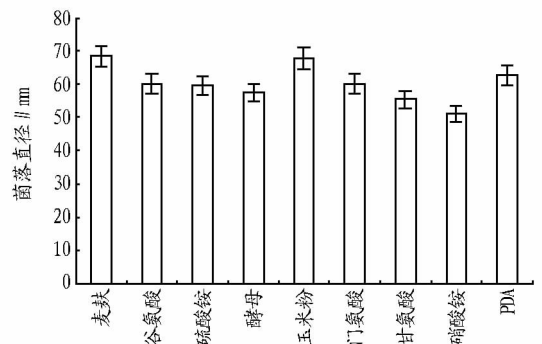


图4 不同氮源对菌株生长的影响

2.2.5 含水量对菌丝生长的影响。菌株在含水量50%~75%的培养基上均能生长,在不同含水量培养基上的生长差异显著($P < 0.05$)。该菌株在含水量为60%培养基上生长最快,菌丝长势旺盛,菌落边缘整齐。含水量在65%时,菌丝长势旺盛,菌落边缘整齐,生长速度较含水量60%条件下低,

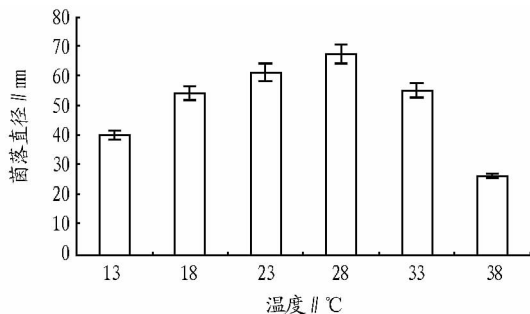


图5 不同温度对菌株生长的影响

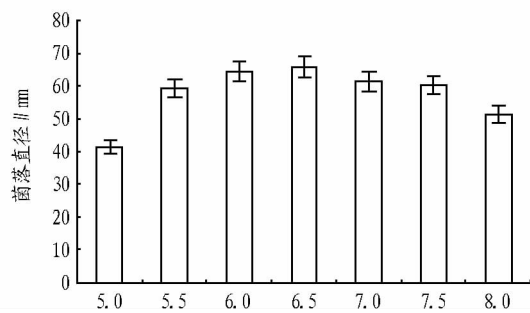


图6 不同 pH 值对菌株生长的影响

但是显著高于其他含水量下的生长。含水量在 55% 时,菌丝长势较好,菌落边缘较整齐,菌丝生长速度低于 65% 含水量下的生长,但是显著高于含水量为 50%、70% 和 75% 条件下的生长速度($P < 0.05$)。含水量在 70% 时,菌丝长势较弱,菌落边缘不整齐,菌丝生长速度低于含水量 55% 条件下的生长;此含水量下,菌丝具有前期生长速度较快,长到将近半袋时生长速度缓慢的特点。含水量在 50% 时,菌丝长势较弱,菌落边缘不整齐,生长速度低于含水量 70% 条件下的生长。含水量在 75% 时,菌丝长势最弱,生长后期菌袋底部污染率较高,原因可能是灭菌过程中由于含水量高,培养基灭菌不彻底。

表1 不同含水量对菌株生长的影响

含水量 %	菌丝	菌丝	菌落边缘	平均满袋 时间//d	显著水平	
	颜色	长势	整齐度		5%	1%
70	白色	+	不整齐	65	A	a
55	白色	++	较整齐	50	b	b
65	白色	+++	整齐	45	c	bc
60	白色	+++	整齐	40	d	c

注:“+”表示菌落长势较弱,“++”表示菌落长势较好,“+++”表示菌落长势旺盛。

3 结论与讨论

通过对瓦尼木层孔菌黑龙江完达山菌株分类地位的分子生物学验证和生理特性研究,结果表明,试验菌株 WN-3 为瓦尼木层孔菌,ITS 序列长度为 756 bp,GenBank 登陆号为 HQ845057。适宜菌株生长的碳源为葡萄糖和甘露糖,最佳氮源为麦麸和玉米;菌株在 pH6.5 条件下生长最好,适宜生长温度为 28 °C。3 级种培养基的含水量在 60% 时菌丝长势旺盛、菌落边缘整齐、生长速度最快。母种培养基最佳配方为:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 30 g/L,琼脂粉 20 g/L,麦麸 15 g/L,硫酸镁 2 g/L,磷酸二氢钾 3 g/L。

森林药用真菌开发是国内外生物制药与新药研发关注的重点资源领域,也是发展林下经济的特色种植产业。瓦尼木层孔菌,俗名杨黄,是生长在杨树上的一种珍贵药用真菌,也是近年才引起业内关注的桑黄“新秀”,主要分布在我国吉林长白山区和黑龙江小兴安岭,野生种群数量极为稀少,现已被相关区域研究列为药用真菌资源中的稀有种和 3 级保护种。桑黄菌是兼性寄生菌,以腐生为主,理论上人工培养可行。日本和韩国已有人工驯化栽培成功的资料报道,而我国桑黄菌的人工驯化栽培刚刚引起关注,现已有成功的范例,但是产量不高,目前尚未有关于人工栽培的详细报道^[10],通过对瓦尼木层孔菌黑龙江完达山菌株的生理学特性研究表明,该菌株生长的适宜温度、pH、碳源和氮源比较广泛,其生长对营养条件的要求并不是十分的严格,对进一步的研究其人工栽培和规模化生产提供了理论基础。

参考文献

- [1] 戴玉成. 对药用真菌杨黄种类的再认识[J]. 菌物学报,2007,26(S1):1-6.
- [2] 李彦生. 瓦尼木层孔菌菌丝体培养特性及多糖提取工艺研究[D]. 延吉:延边大学,2009.
- [3] BONDARSEV A. Polypori Novi ex oriente extremo[J]. Bot Mater Otd Spor Rast.,1962,15:99-103.
- [4] 范宇光,秦立武,吴秀玲,等. 瓦尼木层孔菌及其人工栽培技术[J]. 中国食用菌,2009,28(2):24-25.
- [5] 戴玉成. 一种新的药用真菌——瓦尼木层孔菌(杨黄)[J]. 中国食用菌,2003,22(5):7-8.
- [6] 张平,陈松,陈作红. 致命鹅膏菌的菌种分离及人工培养研究[J]. 中国食用菌,2005(2):1012.
- [7] 邢来君,李明春. 普通真菌学[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [8] 周玲玲,梁俊峰. 大型真菌 DNA 提取方法的改进[J]. 广东林业科技,2011,27(1):13-16.
- [9] 杨立宾,宋瑞清,邓勋,等. 致病疫霉生防木霉菌株筛选鉴定及生物学特性[J]. 东北林业大学学报,2013,41(7):118-122.
- [10] 郭佳,宋荣,包海鹰,等. 两种桑黄发酵产物的抗肿瘤活性对比[J]. 食用菌学报,2010,17(2):80-84.