

松口蘑菌丝体的分离和 RAPD-PCR 分析*

曾东方¹ 罗信昌¹ 傅伟杰²

(¹ 华中农业大学应用真菌室 武汉 430070)(² 延边大学农学院 龙井 133400)

摘 要:针对松口蘑 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.] 菌丝体分离培养困难和各种相关分离物目前难以用出菇试验鉴定的现实,采用 8 种培养基配方,对 9 个不同来源的松口蘑子实体的不同部位及菌根、菌土进行组织分离,计接种试管 810 多支,结果从菌褶部位获得 94 支慢生型的菌丝体分离菌株,从菌柄部位仅获得 1 支快生型的菌丝体分离菌株。以马铃薯葡萄糖土壤滤液培养基(PDAS)、马铃薯葡萄糖麦麸滤液培养基(PDAW)、BM 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)对菌褶进行组织分离,获慢生型菌丝体的成功率依次为 74.4%、35.5%、15.6% 和 8.9%。以各分离菌株的来源松口蘑子实体和中日两国松口蘑研究者提供的分离菌株作为 DNA 参照样品,对从供试子实体、菌根、菌土进行组织分离获得的各种相关纯培养物进行亲菌鉴定。采用筛选的 17 个随机引物介导 25 个供试松口蘑子实体及其分离菌体的 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR 反应,全部获得了清晰而稳定的 DNA 指纹图谱,结果一致表明:每个松口蘑子实体的菌盖(含菌褶)、菌柄与从自身菌褶分离的慢生型纯培养菌丝体都具有相同的 DNA 指纹图谱,其相似系数为 1.000,明确揭示松口蘑个体的 DNA 同质性,而不同来源的供试松口蘑之间的相似系数在 0.934~0.994 范围内,所用 17 个引物很好地揭示了来自我国东北与西南的松口蘑和分布在日本的松口蘑存在明显的总 DNA 多态性。分析表明:不同松口蘑子实体之间存在总 DNA 指纹图谱的个体特异性,每株从菌褶部位分离到的慢生型菌丝体与其来源子实体的总 DNA 指纹图谱相同,故而判断二者存在亲菌关系。供试松口蘑极高的 DNA 相似性聚类与采集地相对应,支持它们是一个形态学物种下的不同居群。试验没有发现被孢霉(*Mortierella* sp.)侵入松口蘑子实体的证据,讨论了松口蘑菌丝体分离中常出现的被孢霉、酵母菌与松口蘑的亲缘关系。

关键词:松口蘑,子实体,分离菌株,亲菌鉴定, RAPD-PCR 分析

中图分类号:Q949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 03-0278-09

松口蘑 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.] 又名松茸,是与松树共生的一种外生菌根真菌或蘑菇。松口蘑不仅味道鲜美,营养丰富,而且具有强身健脾,理气化痰的作用,其热水浸提物能够抑制小白鼠肉瘤 180 和艾氏腹水癌等^[1]。日本人嗜食松口蘑,本国的野生资源远不能满足市场需求,每年从中国、朝鲜、美国、加拿大等国进口松口蘑及其近缘种类,以至新鲜松口蘑在日本市场上零售价高达每千克 1275 美元^[2]。野生松口蘑因无节制的大量采集而濒临灭绝,人工驯化栽培松口蘑成为人们保护利用这种珍稀“蘑菇之王”的迫切愿望,但迄今尚无突破性进展。松口蘑的菌种分离培养比较困难,人们从子实体不同部位进行组织分离,重现性很高地得到了快生型、慢生型的菌丝体菌落以及酵母型菌

* 国家自然科学基金资助项目(39770025)和高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(970403)

作者简介:曾东方(1965-),男,湖北省人,博士,主要从事应用真菌学教学与研究。

收稿日期:2000-07-19, **修回日期:**2000-11-20

落,究竟分离物的那一种为松口蘑纯培养,相互之间有何关系,目前既无文献可查,也无法用出菇试验鉴定。用分离获得的菌株回接宿主植物赤松苗,有的出现病状死去^[3],有的观察到菌鞘与哈氏网^[4,5],但更多的是接种失败。总之,一百多年来一直未得到松口蘑纯培养出菇的试验结果。这就难以消除人们对用于松口蘑各项研究菌株的真伪产生的疑虑。在分离菌株真伪获得鉴定之前,研究松口蘑纯培养的营养方式、生态遗传与驯化栽培,无疑存在盲目性。寻求高新技术解决共生食用真菌分离物(菌株)真伪的鉴别,是科学家们多年梦寐以求的。本文首次采用 DNA 亲菌鉴定技术对各种松口蘑可疑分离物进行了研究。

1 材料和方法

1.1 松口蘑子实体的采集

1999 年,作者在吉林延边地区龙井市的天佛指山海拔 470m 处采得 2 个刚出土尚未开伞的子实体,记作 T1、T2;在海拔 450m 处采得 3 个刚出土尚未开伞的子实体,记作 T3、T4、T5。另外,吉林汪清县林业局科技人员即时送来刚采集的新鲜松茸子实体 2 个,记作 T6、T7。在龙井市内松口蘑收购站购得 2 个新鲜松口蘑子实体,记作 T8、T9。见表 1。

1.2 分离培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[6],马铃薯葡萄糖酵母膏培养基(PDAY),在 PDA 培养基中添加 0.5% 酵母浸膏。马铃薯葡萄糖土壤滤液培养基(PDAS),在 PDA 培养基中添加 20% 的松茸山土壤煮沸滤液。马铃薯葡萄糖麦麸培养基(PDAW),在 PDA 培养基中添加 20% 新鲜麦麸煮沸滤液。马铃薯葡萄糖松节油培养基(PDAO),在 PDA 培养基中添加 1% 松节油。浜田培养基^[7],BM 培养基^[8],马丁培养基^[6]。

1.3 子实体组织分离方法

把未开伞的新鲜松口蘑子实体 T1~T9,用 70% 酒精棉球擦去表面杂质,在超净工作台上剖开子实体,取米粒大小的菌褶或菌柄里层的菌组织移植斜面培养基。包括菌褶与菌柄的每部位组织,均使用上述 8 种培养基进行分离。每部位每种培养基分离 5~10 支,供分离了 810 支试管。

1.4 松口蘑菌根、带菌丝土壤的分离方法^[6]

1.5 移植培养与显微观察

将组织分离获得的纯培养分别用 8 种培养基转接,观察存活情况、培养特征,并在显微镜下观察培养物形态。

1.6 松口蘑子实体与分离菌株 RAPD-PCR 指纹比对分析

供试材料见表 1。总 DNA 提取和 RAPD-PCR 分析方法参考我们已发表的文献^[9]并改进:称取各供试子实体的菌盖(含菌褶)、菌柄各 100mg,刮取分离菌株斜面培养基上的菌丝体各 1 支试管,分别用液氮研磨并装入 1.5mL EP 管中。加入提取缓冲液(Tris-HCl, pH8.0, 50mmol/L; EDTA, pH8.0, 50mol/L; NaCl, 1.4mol/L; CTAB, 3%, α -巯基乙醇, 3%; PVP, 3%) 750 μ L,充分混匀,置 60℃ 水浴 20min。加入约 700 μ L 的氯仿/异戊醇(24/1),轻摇 30s。12 000r/min 室温离心 5min。收集上清液,再用氯仿/异戊醇萃取 1~2 次。接着在收集的上清液中加入 2 倍以上的无水乙醇,静置于 -20℃ 冰箱中 30min 以上。然后 3 000r/min 离

心 3min。倾去上清液,加入适量冰冷的 80% 乙醇淌洗,在卫生纸上沥干。最后在每支 EP 管中加入 TER 缓冲液(Tris-HCl, pH8.0, 10mmol/L; EDTA, pH8.0, 1mmol/L; RNase, 10μg/mL) 约 50μL,小心溶解,再置 60℃ 水浴 20min。即为各样品的总 DNA 溶液。取 DNA 溶液 5μL 进行 0.8% 琼脂糖水平电泳,检测总 DNA 的质量, DNA 分子完好的样品即可贮备于 4℃ 冰箱中。近期不用的总 DNA 溶液,放在 -20℃ 冰箱保存。

表 1 松口蘑 RAPD-PCR 试验材料

Table 1 Matsutake and its isolates tested in RAPD-PCR analysis

Origin	Basidiocarps	Tissues *	Isolates	Culture character**
Tianfuzhi	T1	T1B1	Tj (from mycorrhizae)	M/F
Moutain,		T1B3	Tt (from mycelial soil)	M/F
Long jing,	T2	T2B1	D2 (from gill of T2)	M/S
Jilin, China		T2B3	D21 (from stipe of T2)	M/F
	T3	T3B1	D3 (from gill of T3)	M/S
		T3B3		
	T4	T4B1	D4 (from gill of T4)	M/S
		T4B3		
	T5	T5B1	D5 (from gill of T5)	M/S
		T5B3		
Wangqin,	T6	T6B1	D6 (from gill of T6)	M/S
Jinlin, China		T6B3		
	T7	T7B1	D7 (from gill of T7)	M/S
		T7B3		
Market,	T8	T8B1	D8 (from gill of T8)	M/S
Longjing		T8B3		
Jinlin, China	T9	T9B1		
		T9B3		
Presented by Wang Bo from			D9	M/S
Sichuan, China				
Presented by Fu Weijie			D1	M/S
from Jinlin, China			Mor(<i>Mortierella</i> sp.)	M/F
Yunnan, China			5F(from pileus)	Y/S
Presented by Yamada A from			YA	M/S
Japan				

* B1: pileus(containing gills); B3: stipes; ** M: mycelia; Y: yeast; F: fast growth; S: slow growth.

RAPD-PCR 分析: 25μL RAPD-PCR 反应组分: PCR buffer 1 ×, MgCl₂ 2mmol/L, dNTPs 100μmol/L, Primer 0.4μmol/L, Taq DNA polymerase 1u, Template DNA 10ng(对照反应不加), P. H₂O(超纯水) 定容至 25μL, Mineral oil 覆盖 30μL。

PCR 循环参数: 在 Thinker Series II 型 PCR 基因体外扩增仪上, 本试验采用如下 PCR 循环参数: 预变性: 95℃, 2min; 变性: 94℃, 40s; 退火: 36℃, 60s; 延伸: 72℃, 80s; 补平: 72℃,

5min。共 45 个循环。

随机引物:试验经筛选后所用 17 个随机引物的编号与序列顺序(5'→3')是:S25:AGGGCTCTTG, S26:GGTCCCTGAC, S28:GTGACGTAGG, S64:CCGCATCTAC, S69:CTCAC-CGTCC, S74:TGCGTGCTTG, S75:GACGGATCAG, S76:CACACTCCAG, S78:TGAGTGGGTG, S79:GTTGCCAGCC, S80:ACTTCGCCAC, S121:ACGGATCCTG, S122:GAGGATCCCT, S124:GGTGATCAGG,S126:GGGAATTTCGG,S127:CCGATATCCC,S129:CCAAGCTTCC。

2 结果

2.1 松口蘑子实体组织分离的结果分析

从 9 个不同来源子实体中各取 2 个分离部位分别用 8 种培养基分离松口蘑菌丝体的结果见表 2。

表 2 培养基、分离部位对松口蘑组织分离的影响

Table 2 Effects of isolating tissues and media on mycelia isolation of *Tricholoma matsutake*

Media	Isolating position of basidiocarps and number	Matsutake isolates survival number	No survival number	Contamin- ation number *
PDA	lamellae,45	4	38	1(B) + 2(M)
	stipes,45	0	45	0
	lamellae,45	0	40	4(B) + 1(M)
PDAY	stipes,45	0	45	0
	lamellae,90	67	22	1(M)
	stipes,90	1	79	9(B) + 1(M)
PDAS	lamellae,45	16	23	4(B) + 2(M)
	stipes,45	0	35	10(B)
	lamellae,45	0	39	6(B)
PDAW	stipes,45	0	45	0
	lamellae,45	0	33	12(B)
	stipes,45	0	45	0
PDAO	lamellae,45	7	33	5(B)
	stipes,45	0	45	0
	lamellae,45	0	44	1(M)
Hamada's	stipes,45	0	45	0
	lamellae,45	0	45	0
	stipes,45	0	45	0
BM	lamellae,45	0	45	0
	stipes,45	0	45	0
	lamellae,45	0	45	0
Martin's	stipes,45	0	45	0
	lamellae,45	0	45	0
	stipes,45	0	45	0

* Contamination microbe: B:to bacteria;M:to mould.

从表 2 可以看到,松口蘑菌丝体组织分离的适宜部位是菌褶。在使用的 8 种分离培养基中,最适合菌褶萌发生长成菌丝的培养基是马铃薯葡萄糖土壤滤液培养基(PDAS),分离成功率为 $67/90 \times 100\% = 74.4\%$ 。其次是马铃薯葡萄糖麦麸滤液培养基(PDAW),分离成功率为 $16/45 \times 100\% = 35.5\%$,再次是 BM 培养基,分离成功率为 $7/45 \times 100\% = 15.6\%$ 。常规培养基 PDA 也有 4 支斜面试管萌发生长松茸菌丝体,分离成功率是 8.9%。在本试验中,其它 4 种培养基未能分离到松茸菌丝体。这说明松茸菌丝体分离对培养基有极大的选择性。表 1 中分离菌株 D2、D3、D4、D5、D6、D7 和 D8 分别是 T2、T3、T4、T5、T6、T7 和 T8 菌褶分离的。

以菌柄作分离部位,使用 8 种培养基移殖了 405 支试管,除少数污染(主要是细菌,仅有 1 支绿霉)外,仅有 1 支试管萌发白色致密型菌丝,生长较从菌褶上分离的菌丝要快。

该菌株是从 T2 菌柄上分离到的,在表 1 中标记为 D21。松茸的菌柄基部表面往往带有白色菌丝,我们于 1998 年把带白菌丝的菌柄基部表面组织经升汞消毒后移植,很容易在斜面上长出一种白色,快生型,平铺细密的菌丝体菌落。1999 年的这次菌柄分离,我们先用解剖刀削去带白色菌丝的表面组织,然后提取菌柄基部里面的菌组织移植,培养结果如表 2 所示,绝大多数的菌柄组织未萌发生长,一方面说明菌柄组织不适宜松口蘑菌丝体分离,另一方面说明较易分离培养的被孢霉(*Mortierella* sp.)没有在试验菌柄组织里面发现。

2.2 松口蘑慢生型组织分离菌丝体在培养基上的移植培养

在表 2 中,经松口蘑子实体组织分离培养,从菌褶萌发成菌丝体的试管 94 支,全部为慢生型的菌落。从菌柄基部分离仅长出 1 支快生型的菌落。初步判断慢生型的菌丝体是真正的松口蘑分离菌株。于是我们用上述 8 种分离培养基对这种慢生型菌株进行转接扩繁 40 支,结果表明除马铃薯葡萄糖松节油培养基(PDAO)与马丁氏培养基外,其余 6 种培养基均移植成活。不过,菌丝体在 4 种培养基即 PDA、PDAS、PDAW、BM 上生长较快,可见菌落直径扩大。在另外 2 种培养基即 PDAY、浜田上,菌丝体生长极其缓慢,转接六个月后都不见菌落扩大的趋势。

2.3 松口蘑菌根、菌丝土壤的分离

从 T1 子实体生长土壤里采集的松口蘑菌根截段用 3% H_2O_2 表面消毒 2min 后用无菌水换洗 3 次,把从土壤收集的白色菌丝球直接放在无菌水中换洗 5 次;分别移植在 PDAS、PDAW、马丁氏培养基上,各 10 支试管。经培养,发现均长成白色菌丝体菌落,在斜面上平伏生长,无气生菌丝,生长速度比从菌褶上分离的菌丝体要快,同从菌柄上分离的菌丝体菌落比较接近。在后面的 DNA 分析中,菌根、菌丝土壤分离的菌丝体各选用了 1 株,标记为 Tj(菌根分离)、Ti(土壤分离),参见表 1。

2.4 松口蘑子实体与相关分离物的 RAPD 指纹比对分析

利用本文筛选的 17 个引物,获得每个引物介导的清晰的 DNA 指纹图谱。作者对 RAPD-PCR 试验进行了 3 次重复,个别引物如 S26 进行了 5 次重复。这些批次的重复安排在 1999 年 11 月、2000 年 1 月、2000 年 3 月和 2000 年 4 月等不同时间进行,供试松口蘑各个样品每个引物的特征图谱都能重复再现,即使 Taq DNA 多聚酶在不同批次里使用不同公司的产品,PCR 循环参数的少许变动等,都未影响 RAPD 指纹图谱的重现性。由此,可以肯定 RAPD 技术的稳定与可重复性。随机引物 S74 与 S25 介导的两个指纹图谱如图 1、2 所示。其它 15 个引物介导的指数图谱各不相同,但子实体与分离物指纹比对分析获得的相似规律完全一致,一并进入下面的统计运算。根据各引物制备的 DNA 指纹图谱照片,获得了它们的数字矩阵,电脑运算获得各供试样品间的相似系数矩阵,以及根据相似系数绘制的类缘关系树状图,见图 3。

从图 1 看到,每个子实体的不同部位(菌盖、菌柄)组织之 DNA 指纹相同,说明同一个子实体内的 DNA 是同质性的,而且它们均与其菌褶组织分离物之 DNA 指纹相同,没有一个引物介导的 DNA 图谱出现不同的结果。经统计分析,它们的相似系数均为 1.000。

从图 1~3 可以看出:所有从菌褶分离的慢生型菌株如 D2、D3、D4、D5、D6、D7 和 D8 与其来源子实体 T2、T3、T4、T5、T6、T7 和 T8 拥有对应相同的 DNA 指纹图谱(即相似系数达 1.000),依此判断这些分离菌丝体与松口蘑具有极高的亲菌(缘)关系。

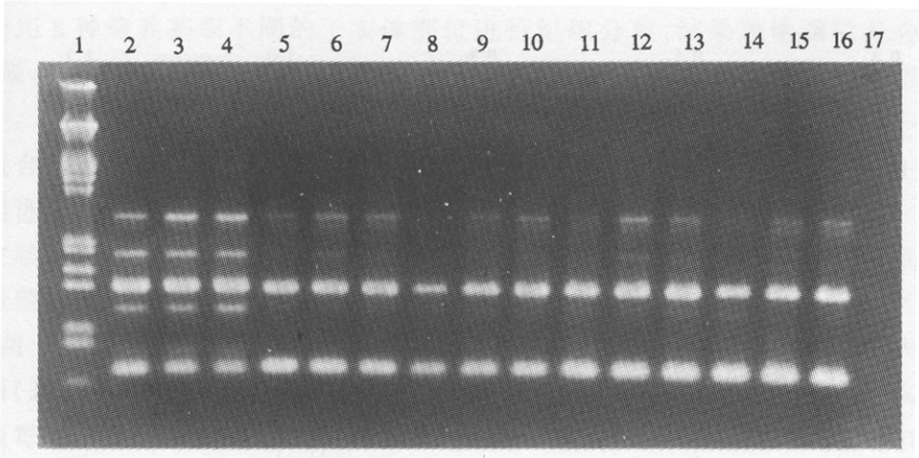


图 1 随机引物 S74 介导的松口蘑及分离菌株的 RAPD 谱

Fig.1 RAPD patterns of *Tricholoma matsutake* and isolates by primer S74

Lane 1 to 17: λ DNA/E + H、T2B1、D2、T2B3、D3、T3B3、T4B1、D4、
T4B3、T5B1、D5、T5B3、T6B1、D6、T6B3、Control without DNA template.

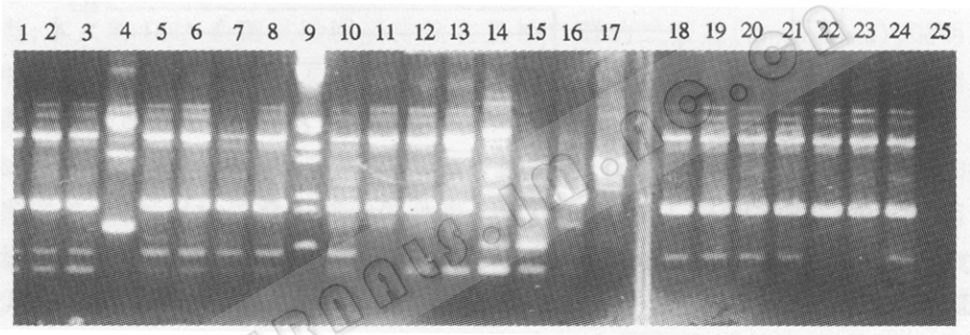


图 2 随机引物 S25 介导的松口蘑与相关分离物的 RAPD 谱

Fig.2 RAPD patterns of *Tricholoma matsutake* and related isolates by primer S25

Lane 1 to 25: T2B1、D2、T2B3、D21、T3、D3、T4、D4、 λ DNA/E + H、T9、D1、YA、
D9、Mor、Tt、Tj、5F、T5、D5、T6、D6、T7、D7、T8、Control without DNA template.

不同来源的松口蘑子实体个体间 DNA 相似系数很高,如 T3、T4 相似系数为 1.0,说明它们是一个蘑菇圈上的子实体,T3、T4 与附近采集的 T5 相似系数为 0.994。但它们与同一座山,海拔较高处采的 T2 相似系数则为 0.948。采自龙井市天佛指山的 T5 与来自汪清县的 T6 以及来自龙井市场的 T8 三者接近,相似系数为 0.963。吉林省专家傅伟杰教授赠送的参试菌株 D1 与龙井市场购的 T9 相似系数较高,为 0.981,同样被鉴定为松口蘑纯培养物。日本专家 Yamada 博士赠送的参试菌株 YA 与四川专家王波教授赠送的参试菌株 D9 接近,相似系数为 0.974。YA 与 D9 聚类后与吉林 T2 的相似系数为 0.948,而与 T5、T6、T8、T9、D1 类的相似系数为 0.945。来自吉林省汪清县的另一子实体 T7 与上述不同来源的松口蘑子实体关系稍远,相似系数仍有 0.934。总之,供试松口蘑子实体之间,以及与来自吉林、四川、日本的参试菌株之间的 DNA 相似系数在 0.934 ~ 0.994 之间,表明所有供试松口蘑子实体与参试菌株均为松口蘑 *Tricholoma matsutake*,它们是在一个相同物种内的不同居群(population)。

另外来自菌柄的分离菌株 D21、菌根的分离物 Tj、菌土的分离物 Tt、参试真菌被孢霉

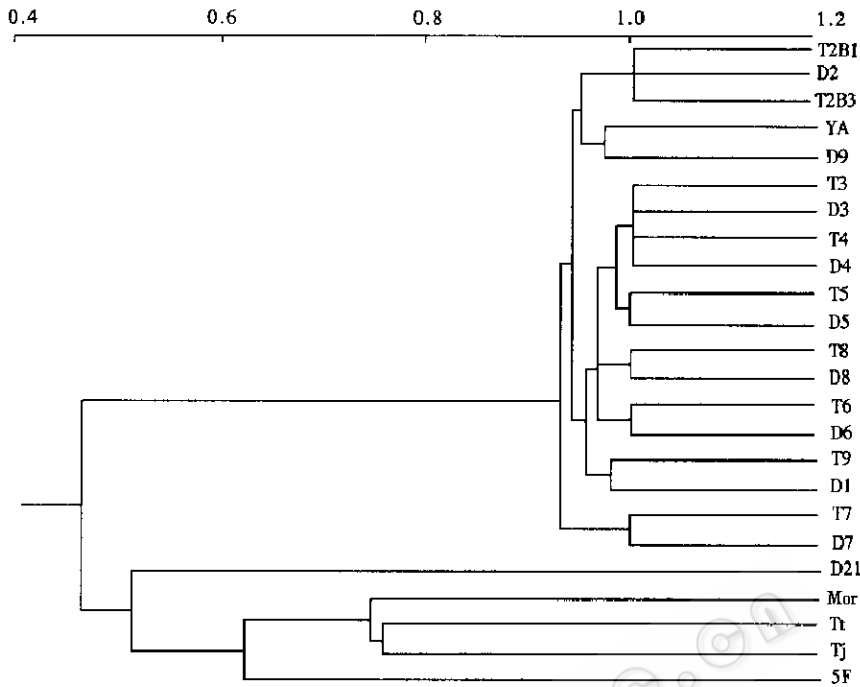


图 3 松口蘑与其分离菌株类缘关系

Fig.3 Relationships between matsutake and isolates

(*Mortierella* sp.)、以及一株酵母分离物 5F 相互之间的亲缘关系比较远,但 Tt、Tj 与 Mor 的相似系数在 0.750 ~ 0.760 之间,可以认为菌根、菌土的分离物均为被孢霉属的真菌。总的来说,这 4 种快生型的丝状真菌与 1 支酵母真菌一起,与松口蘑种的相似系数仅有 0.466,可以判定这 5 种分离物不是松口蘑。

3 讨论

相对腐生食用菌香菇、平菇等而言,共生食用菌松口蘑的菌丝体分离培养比较困难,研究者们采用不同的培养基不同的分离部位进行组织分离,报道了不同培养特征的纯培养物^[1,10,11]。由于它们的分离重现性都很高,都被分离者当作松口蘑保藏。按照柯赫法则,松口蘑分离菌丝体如果能够培养出菇,就可以鉴定其真伪,但国内外一直无法做到这一点。作者已用香菇栽培出菇试验前后的子实体及其分离菌株的 DNA 同质性,证实了食用菌子实体组织分离菌丝是一种无性繁殖过程,因此用 DNA 亲菌(“子”)鉴定技术探讨目前尚无法出菇的共生食用菌松口蘑分离菌株的真伪是有充分的遗传根据的。

本文的 RAPD-PCR 分析结果表明,每个供试松口蘑子实体的菌盖(含菌褶)、菌柄与其自身菌褶上分离的纯培养菌丝具有相吻合的 DNA 指纹图谱,供试的 17 个随机引物 RAPD 图谱一致揭示了松口蘑同一个体子实体与菌丝体的 DNA 同质性和 RAPD 图谱的个体特异性(图 3),依此鉴定从菌褶分离的慢生型菌丝体与其分离来源的对应子实体存在亲菌关系。为目前尚不能人工出菇试验的共生食用真菌分离物(菌株)真伪鉴定开辟了一条崭新的途径。

试验用 8 种培养基取不同的子实体部位进行组织分离,结果表明菌褶是合适的分离部位(结果与文献[5]报道一致,与文献[10,11]报道不同),且分离菌丝体对培养基有很强的选择性。菌柄里层组织用供试培养基没有分离到任何微生物(污染除外),一方面说明菌柄不适合作为松口蘑组织分离,另一方面说明在菌柄里面并没有其它微生物生长,从而进一步确证了松口蘑 DNA 的同质性。

有文献报道松口蘑向根际土壤分泌具挥发性的抗菌素,因而抑制了菌根周围大量细菌和放线菌的活动,只是在此区系内常常分离到被孢霉属(*Mortierella*)的真菌^[12]。本试验从菌根、菌土、菌柄表层各分离到一种平铺生长、扩展较快的白色菌丝体,它们与供试被孢霉属真菌(表 1 中的 Mor 参试菌株)的 DNA 相似系数较高(0.750 ~ 0.760),证实了土壤习居菌被孢霉真菌在供试松口蘑菌根根际的生长。一些研究者声称这种被孢霉真菌是松口蘑,或者认为这种土壤习居菌侵入到松口蘑子实体内“伴生”,而我们在本文中的组织分离结果、分离物培养特性的比较与松口蘑 DNA 同质性等试验结果,均证实这类快生型菌丝体不是松口蘑,它们也没有在松口蘑体内“伴生”。

松口蘑子实体组织分离中常常会分离到一种酵母型菌落,显微镜下可以清楚看到其芽殖形态,本文的 DNA 亲菌试验明确排除它是松口蘑的二型态(dimorphism),说明它是组织分离中的污染杂菌。由于松口蘑菌丝体萌发与生长极其缓慢,杂菌的污染更加抑制了松口蘑菌丝体的萌发与生长,这也许就是人工纯培养难以回接定殖成活的原因。

本试验在用子实体与分离菌株之 DNA 指纹比对技术鉴定松口蘑菌丝体的同时,引用了来自我国东北、西南松口蘑研究者的分离菌株(D1 和 D9),以及来自日本多年用于松口蘑菌根建成试验的菌株(YA),它们与供试松口蘑子实体之间的 DNA 相似系数在 0.934 ~ 0.994 之间,提示分布在中国的东北与西南的松口蘑和分布在日本的松口蘑为一个相同物种下的不同居群,再次证明了我们已经发表的结论^[9]。另外,本文参试的日本菌株(YA)在人工接种试验中已形成了与自然松口蘑相同的菌根^[5],展示了松口蘑分离菌株得到 DNA 亲菌鉴定后的驯化前景。

本文把从菌褶分离到的慢生型菌丝体鉴定为松口蘑分离菌株的理由如下:(1)菌丝体是从子实体分离,重视率高(表 2);(2)分离部位是菌褶,培养特性包括培养基、生长形态均与日本报道^[4,5,7,8]一致(表 1~2);(3)本文所有 RAPD 图谱既反映出了不同松口蘑个体的 DNA 多态性,也揭示了相同个体的 RAPD 图谱特异性(图 3);(4)相同个体子实体不同组织的 DNA 指纹相同,揭示个体 DNA 同质性(图 3);(5)从菌褶分离到的慢生型菌丝体与分离它的原子实体的总 DNA 之 RAPD 图谱相同,而与同种松口蘑的其它个体极其相似(图 3);(6)本文参试的日本菌丝体菌株(YA)已经人工合成了与天然松口蘑相同的菌根^[4,5]。

参 考 文 献

- [1] 傅伟杰,许广波,许周源,等. 山东农业大学学报,1999,30(增):230 ~ 233.
- [2] Wang Y, Hall I R, Evans L A. *Econ Bot*, 1997, 51:311 ~ 327.
- [3] Hall I R, Wang Y. Current research on the cultivation of edible ectomycorrhizal fungi in New Zealand. In: Proceedings of the international symposium of recent topics in genetics, physiology, and technology of the Basidiomycetes. Chiba, Japan, December 2 ~ 4, 1993. 7 ~ 14.

- [4] Yamada A, Kanekawa, S, Ohmasa M. *Mycoscience*, 1999, **40**: 193 ~ 198.
- [5] Yamada A, Maeda K, Ohmasa M. *Mycoscience*, 1999, **40**: 455 ~ 463.
- [6] 方中达. 植物研究方法. 北京: 农业出版社, 1979. 124.
- [7] Hamada M. Matsutake-Its fundamental studies and economic production of the fruitbody. Kyoto: Nakanishi Printing, 1964. 97 ~ 100.
- [8] Ohta A. *Trans Mycol Soc Japan*, 1990, **31**: 323 ~ 334.
- [9] 曾东方, 罗信昌, 陈升明. 园艺学报, 2000, **27**(3): 223 ~ 225.
- [10] 刘振钦, 高勇秀, 王子权. 吉林农业大学学报, 1989, **11**: 13 ~ 16.
- [11] 陈士瑜. 食用菌生产大全. 北京: 中国农业出版社, 1998. 435.
- [12] Ohara H, Hamada M. *Nature*, 1967, **213**: 528 ~ 529.

STUDIES ON THE ISOLATION, CULTURE AND DNA IDENTIFICATION OF MYCELIA OF *TRICHOLOMA MATSUTAKE* *

Zeng Dongfang¹ Luo Xinchang¹ Fu Weijie²

(¹ Institute of Applied Mycology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(² Yanbian Agricultural College, Longjing 133400, China)

Abstract: The tissue isolation for *Tricholoma matsutake* (S Ito et Imai) Sing were made with 8 media in 810 test tubes from different positions of 9 basidiocarps of different source and from mycorrhizae, and soil with the fungi in the studies. The results showed that 94 test tubes of slow-growing mycelia were isolated from lamellae and their success percentages of isolation with media PDAS, PDAW, BM, PDA were 74.4%, 35.5%, 15.6% and 8.9% respectively. The fast-growing mycelia were easily got from the mycorrhizae and soil related to matsutake. The isolates with different culture characteristics were appraised through DNA fingerprinting comparison with matsutake basidiocarps collected from Jilin province, China and reference isolates presented by matsutake research workers of China and Japan, in which RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR patterns were sharply prepared using 17 arbitrary decamer nucleotide primers screened. The statistical data indicated that all slow-growing mycelia isolated from lamellae had the same DNA fingerprinting patterns as their origin basidiocarps tissues such as pileus (containing lamellae) and stipe, whose similarity coefficients all were 1.000, and were therefore identified as true *Tricholoma matsutake*. However, the fast-growing mycelia or yeast colony were identified as not matsutake. The results suggested that matsutake and its own mycelia have DNA homogeneity, and there exists no any other microbe in the basidiocarps. The results also demonstrated that all matsutake from east China and reference isolates of matsutake from southwest China and Japan were one same species *Tricholoma matsutake*, whose DNA similarity coefficients varied from 0.934 to 0.994.

Key words: *Tricholoma matsutake*, Basidiocarps, Isolates, DNA identification, RAPD-PCR

* Project Granted by Chinese National Science Fund (No. 39770025) and The Research Fund for the Doctoral Program of High Education (970403)