

# 适宜贵州省安龙县夏季栽培香菇菌株的筛选

周 静<sup>1</sup>, 卓 琴<sup>1</sup>, 任 飞<sup>2</sup>, 杨 洪<sup>2</sup>, 罗珍情<sup>2</sup>

(1. 安龙县农业现代化发展促进中心 贵州安龙 562400; 2. 贵州黔山菌业开发有限责任公司 贵州安龙 562400)

**摘 要:** 为了筛选出安龙县夏季适合栽培的香菇菌株, 以安龙县各香菇种植企业收集的 6 株香菇菌株为试验材料, 比较 6 株香菇的菌丝生长速度、拮抗反应、基因序列、子实体单棒产量, 并构建系统发育树。结果表明, AL3 菌株的菌丝生长速度较快, 平均生长速度为  $4.51 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ , 显著高于其他菌株, 其次是 AL6 菌株, 平均生长速度为  $4.37 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ , AL1 和 AL6 菌株与其他菌株之间拮抗现象明显, 其余菌株拮抗不显著或无拮抗; ITS 序列比对及系统发育分析将 6 株香菇菌株聚为香菇属进化的 3 个大类, 2 个不同菌株及 4 个不同亚种; AL4 菌株单棒产量最高, 为  $0.58 \text{ kg}$ , 其次是 AL6 菌株, 单棒产量为  $0.47 \text{ kg}$ 。综合各试验结果分析得出, 6 株菌株中, AL4、AL6 和 AL3 菌株较适合在安龙县夏季栽培, 研究结果可为安龙县夏季适栽香菇种质资源的筛选提供理论依据。

**关键词:** 香菇; 夏季栽培; 种质资源筛选

中图分类号: S646.1<sup>2</sup> 文献标志码: A 文章编号: 1673-2871(2024)12-096-07

## Selection of suitable *Lentinula edodol* strains for summer cultivation in Anlong, Guizhou province

ZHOU Jing<sup>1</sup>, ZHUO Qin<sup>1</sup>, REN Fei<sup>2</sup>, YANG Hong<sup>2</sup>, LUO Zhenqing<sup>2</sup>

(1. Anlong County Agricultural Modernization Development Promotion Center, Anlong 562400, Guizhou, China; 2. Guizhou Qianshan Mushroom Industry Development Responsibility Company, Anlong 562400, Guizhou, China)

**Abstract:** In order to select suitable *Lentinula edodol* strains for summer cultivation in Anlong county, six *L. edodol* strains collected from various *L. edodol* strains growing enterprises in Anlong county were used as test materials, and the mycelial growth rate, antagonistic response, gene sequence, and single rod yield of the substrate of the six *L. edodol* strains were compared, and phylogenetic tree was constructed. The results showed that among the six *L. edodol* strains, the growth rate of the AL3 strain was faster, with an average growth rate of  $4.51 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ , which was significantly higher than that of the other strains, followed by that of the AL6 strain, with an average growth rate of  $4.37 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ; antagonism between the AL1 and AL6 strains and the other strains was obvious, and the rest of the strains had no antagonism that was not significant or antagonistic; ITS sequence alignment and phylogenetic analyses placed the six *L. edodol* strains into three major evolutionary categories of the *Lentinula*, the six strains were categorized into two homozygous strains and four different subspecies. AL4 strain had the highest single rod yield of  $0.58 \text{ kg}$ , followed by AL6 strain with single rod yield of  $0.47 \text{ kg}$ . The results of the experiments showed that among the six *L. edodol* strains, AL4, AL6 and AL3 strains were more suitable for summer cultivation in Anlong country, which provided theoretical support for the selection of suitable *L. edodol* strains germplasm resources for summer cultivation in Anlong county.

**Key words:** *Lentinula edodol*; Summer cultivation; Germplasm resource screening

香菇(*Lentinula edodol*)又名花菇、香蕈,是一种木腐性真菌,在分类上隶属于真菌界担子菌门伞菌纲伞菌目香菇属<sup>[1]</sup>。我国栽培的食用菌品种繁多,栽培历史悠久,在众多人工栽培品种中,香菇产量最高,也是最早走进我国饮食生活的食用菌种类之一<sup>[2]</sup>,香菇肉质肥厚鲜美,营养丰富,是一种药食同源的食物,含有多糖、蛋白质、嘌呤、人体必需氨基

酸等多种可改善人体营养性贫血、调节免疫系统、降低胆固醇等的营养成分<sup>[3]</sup>。随着国家相关精准扶贫政策的实施,香菇生长周期短、平、快的生长特性及较高的经济效益驱动<sup>[4]</sup>,我国的香菇产业进入了新层次的发展阶段,栽培面积逐步扩增,主要栽培区域有河南、浙江、湖北、河北、福建、吉林、辽宁、陕西等省份。安龙县位于贵州省西南部,属亚热带季

收稿日期:2024-04-01;修回日期:2024-10-20

基金项目:贵州省食用菌产业技术体系建设项目(GZMARS-SYJ-2024-2026);黔西南州科技计划项目(州科合支撑 2024-10)

作者简介:周 静,女,农艺师,主要从事食用菌种选育与栽培技术推广应用工作。E-mail:1846794394@qq.com

风湿润气候区,年平均气温 15.3 °C,最冷月平均气温 6.4 °C,最热月平均气温 21.9 °C;年平均降水量 1 195.4 mm;年平均无霜期 308 d;年日照时数 1545 h,气候特征非常适宜食用菌生长<sup>[5]</sup>。自“十三五”以来,安龙县凭借优越的自然生态气候、丰富的水土资源和市场区位优势,紧跟贵州省将食用菌作为全省重点农业特色优势产业的政策,将香菇产业作为推动乡村振兴的主导产业<sup>[6-7]</sup>。然而,走访安龙县本地香菇种植企业发现,近年来安龙县香菇菌种引种混乱,导致同种异名、同名异种现象频发,种植户因不清楚菌株的生理特性,无法充分发挥菌种优势,影响了适合当地栽培的香菇种质资源的筛选。因此,分类整理各菌株的差异性,避免种源混乱,对推动安龙县香菇产业的健康可持续发展具有重要意义。

以往的香菇菌种鉴定工作主要依赖传统的形态学鉴定方法,虽然经典的分类方法在一定程度上能对类群进行很好的划分,但是由于大部分食用菌形态特征复杂,近缘种子实体特征相似,以及子实体的形态容易受到外界环境的影响而出现不稳定,导致同一菌种生长环境不同而在形态上表现出较大的差异<sup>[8]</sup>。此外,对于进行人工栽培的食用菌品种来说,通过栽培试验获得子实体,然后再根据子实体的特征进行鉴定,这种鉴定方法虽然操作简单、鉴定结果直观,但是所花费的时间较长,一般都需要数月,甚至一年的时间。因此,单纯依靠经典形态学鉴定方法来对食用菌进行分类和鉴定存在较多困难。随着生物科学技术的快速发展,传统鉴定和分子生物学鉴定的结合能够较好地鉴定食用

菌种内种质资源的特异性<sup>[9]</sup>。笔者以安龙县各香菇栽培企业出菇基地收集的 6 株香菇菌株为试验材料,通过“菌丝生长特征测定+拮抗鉴定+ITS 序列分析+出菇品比试验”多种鉴定方法相结合,初步筛选适合安龙县夏季栽培的优良种质资源,以为安龙县香菇产业发展提供理论参考,进一步加快食用菌产业提质增效,提高企业和菇农的种植效益。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试菌种为安龙县各香菇栽培企业出菇基地通过组织分离收集的 6 株香菇菌株,具体信息见表 1。

母种培养基为 PDA 固体培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1000 mL, pH 自然;菌棒培养基配方为:硬杂木屑 79%,麦麸 20%,石膏 1%,含水量 55%~60%,pH 6~7。

rDNA ITS 分析所用的 ITS 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 菌丝生长速度测定 取直径为 5 mm 菌种块接种到 90 mm PDA 固体培养基平板中央,置于 24 °C 恒温暗培养,观察菌落生长情况,并采用十字交叉法测量菌落直径,每个菌株设置 3 次重复。计算 6 菌株菌丝生长速度,观察记录比较不同菌株长势。

1.2.2 拮抗鉴定 在 PDA 平板固体培养基上,将各参试菌株 3 组 1 个组合放置于 90 mm 培养皿内

表 1 供试香菇菌株信息表

Table 1 Information of tested *Lentinula edodes* strains

编号 Number	菌株名称 Strain name	来源地 Source	菌棒培养至成熟时长 Time of culture to maturity/d	菌龄分类 Age classification
AL1	普坪 18 Puping 18	贵州安龙仰金食用菌发展有限公司 Guizhou Anlong Yangjin Edible Fungus Development Co., Ltd	86	短菌龄 Short germ age
AL2	琳荣丽 9 号 Linrongli 9	贵州琳荣丽食用菌有限公司 Guizhou Linrongli Edible Fungus Co., Ltd	122	长菌龄 Long germ age
AL3	陇西 T2 Longxi T2	贵州福顺三友农业生物有限公司 Guizhou Fushun Sanyou Agricultural Biology Co., Ltd	122	长菌龄 Long germ age
AL4	陇西 0912 Longxi 0912	贵州福顺三友农业生物有限公司 Guizhou Fushun Sanyou Agricultural Biology Co., Ltd	86	短菌龄 Short germ age
AL5	景地 10 号 Jingdi 10	贵州景地生物科技有限公司 Guizhou Jingdi Biotechnology Co., Ltd	122	长菌龄 Long germ age
AL6	三明 0912 Sanming 0912	贵州冠达菌业科技有限公司 Guizhou Guanda Mushroom Technology Co., Ltd	86	短菌龄 Short germ age

注:按照菌棒培养时长对菌龄进行分类,长菌龄>120 d;中菌龄为 90~120 d;短菌龄<90 d<sup>[10-11]</sup>。

Note: Classification according to the culture time of the rod, long age > 120 days; medium age is 90-120 days; short age < 90 days<sup>[10-11]</sup>.

对峙培养,接种量为 5 mm 的打孔器打取各菌株种块,每个组合 3 次重复,置于 24 °C 培养箱内倒置培养,培养 10 d 后,观察记录 6 株菌株之间菌丝接触区有无拮抗反应。

**1.2.3 DNA 提取和 ITS 分子鉴定** 采用改良的 CTAB 法提取 DNA<sup>[11-12]</sup>。将供试 6 株菌株在 PDA 液体培养基中 24 °C 生长 7 d 后,提取 DNA,随后用两对引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增,反应总体积为 50 μL,包括 5 μL 10×PCR Buffer、4 μL dNTP、1 μL 10 μmol·L<sup>-1</sup> 上游引物、1 μL 10 μmol·L<sup>-1</sup> 下游引物、1 μL *Taq* DNA 聚合酶、2 μL DNA 模板,用水补至 50 μL。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 40 s,52 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 °C 保温 5 min,4 °C 保存,扩增完成以后,将 PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并送上海生工生物工程有限公司进行测序。测序获得的 rDNA ITS 序列经 DNAMAN 软件多序列比对重排后,提交到 NCBI 数据库获得 Genebank 登录号,并进行 BLAST 比对,得到与其最相似的物种名、登记号及序列相似性,同时应用 MEGA 7.0 软件以平菇(*Pleurotus ostreatus*)为外群,对 6 个样品的 ITS 序列进行系统发育构建分析,采用最大似然法(maximum likelihood method)构建系统发育树<sup>[13]</sup>,以 Bootstrap 法经 1000 次循环检验系统树的可靠性,使用最大复合似然法计算进化距离<sup>[14]</sup>。

**1.2.4 大棚出菇品比试验** 品比出菇试验于 2023 年 1—7 月在贵州省黔西南州安龙县春潭街道安龙县研发中心出菇试验基地进行。2023 年 1 月接种,2023 年 4 月上棒,2023 年 7 月采完第三茬菇后结束试验。选用 15 cm×55 cm×0.004 cm 的聚乙烯袋,按照常规菌棒制作和出菇管理等方法<sup>[15]</sup>,开展菌袋制作、接种、菌棒培养、转色管理、出菇期管理及香菇采收等各环节的管理工作。出菇品比试验共有 6 株供试菌株,分别设置为两个短菌龄试验组和长菌龄试验组,其中短菌龄试验组包括 AL1、AL4 和 AL6,长菌龄试验组包括 AL2、AL3 和 AL5,互为对照组。采用随机区组的试验设计方法,每个菌株接种 3000 袋,将培养好的每个菌株摆放于 3 个空置的出菇大棚进行出菇观察记录,每个大棚 1000 棒,共用 18 个出菇大棚,总试验数量为 18 000 袋,待 6 个菌株第三茬菇采收结束以后结束试验,利用电子台秤称质量,记录收集的每一茬香菇鲜质量总数,根据每一个品种的试验总数量进行单棒产量的统计分析。

**1.3 数据处理**

采用 SPSS 16.0 软件进行试验数据分析,应用邓肯氏新复极差法(Duncan)进行差异显著性分析。

**2 结果与分析**

**2.1 菌丝体生长测定结果分析**

菌丝生长快慢是菌株细胞分裂快慢的表现,从侧面反映了菌株间遗传的差异性。由表 2 和图 1 可知,6 株菌株的菌丝在平皿中的生长速度和长满时间都不一样,其中 AL3 菌株生长速度较快,平均生长速度为 4.51 mm·d<sup>-1</sup>,其次是 AL6 菌株,平均生长速度为 4.37 mm·d<sup>-1</sup>,二者无显著差异,但 AL3 菌株显著大于其他菌株,生长速度最慢的是 AL5 菌株,平均生长速度为 3.61 mm·d<sup>-1</sup>,而 AL4、AL2、AL1、AL5 的生长速度无显著差异。从长满平皿的时间来看,也是 AL3、AL6 菌株最先长至培养皿边缘。菌丝长满平皿后,依据菌丝生长的浓密程度,将对照菌株的菌丝密度用“+++”表示,“+”号越多,表明菌丝生长越浓密。对 6 株香菇比较发现,AL3 菌株的菌丝生长速度最快,菌丝洁白粗壮、稀疏,菌落均匀;AL5 菌株的菌丝生长速度最慢,菌丝洁白致密,菌落不均匀。

**2.2 拮抗鉴定结果分析**

由图 2 和表 3 可知,6 个香菇菌株共设计拮抗

**表 2 供试香菇菌株菌丝体生长测定结果**  
**Table 2 Results of the grow of *L. edodes* strains**

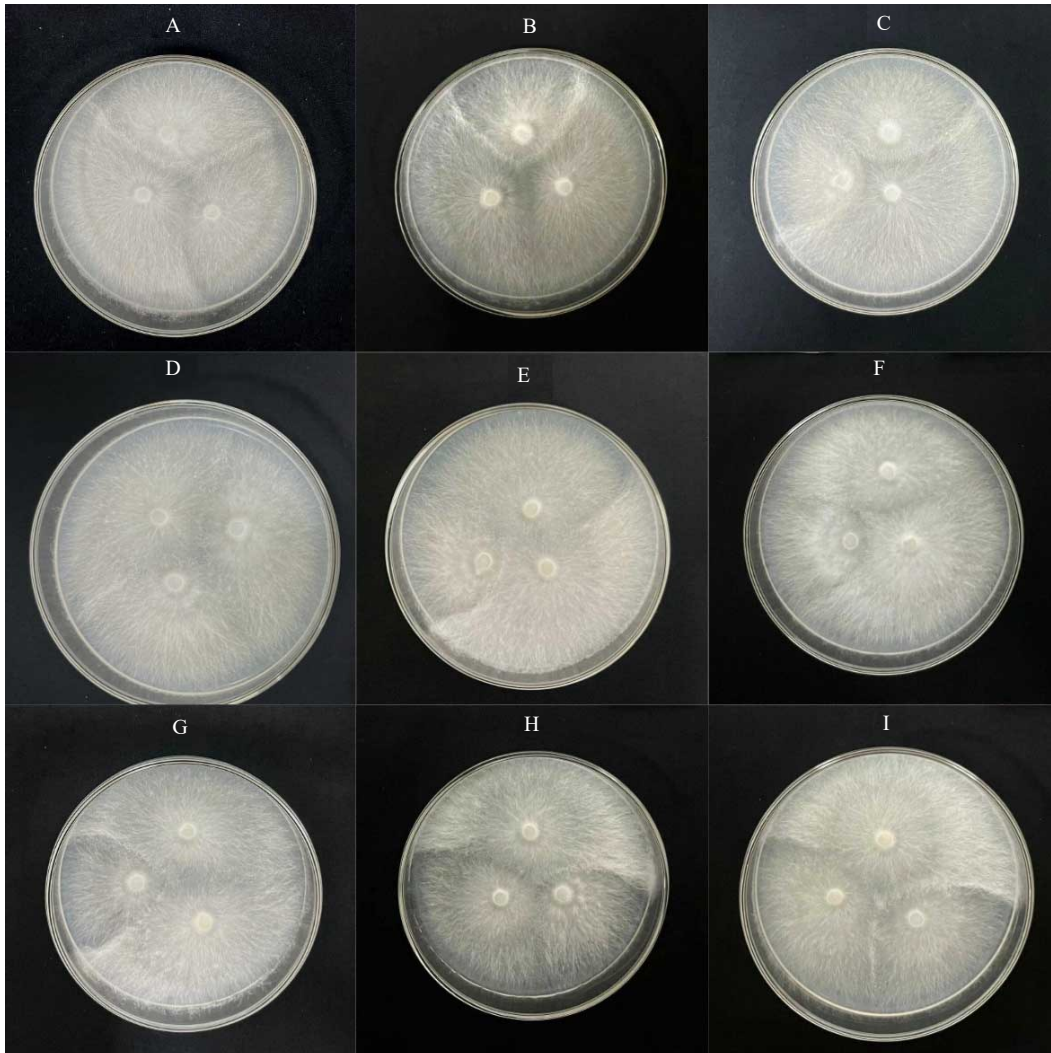
菌株 Strain	生长速度 Growth rate/(mm·d <sup>-1</sup> )	菌落颜色 Colony color	菌丝长势 Growth of mycelium	菌落特征 Colony characterization
AL1	3.76±0.12 bc	洁白致密 White and dense	+++	均匀 Even
AL2	3.78±0.28 bc	洁白粗壮 White and thick	++	较均匀 More even
AL3	4.51±0.06 a	洁白粗壮 White and thick	+	均匀 Even
AL4	3.86±0.33 bc	洁白粗壮 White and thick	+	较均匀 More even
AL5	3.61±0.07 c	洁白致密 White and dense	+++	不均匀 Uneven
AL6	4.37±0.04 ab	洁白粗壮 White and thick	++	不均匀 Uneven

注:“+”菌丝稀疏;“++”菌丝较浓密;“+++”菌丝致密。不同小写字母表示差异显著(p<0.05)。

Note: "+" represents mycelium is sparse; "++" represents mycelium is denser; "+++ " represents mycelium is dense. Different lower-case letters indicate significant difference(p<0.05).



图1 供试香菇菌株生长情况  
Fig. 1 Growth status of *L. edodol* strains for testing



注:从最上方菌株按顺时针顺序排列,A(AL1、AL2、AL3)、B(AL1、AL3、AL4)、C(AL1、AL4、AL5)、D(AL1、AL5、AL6)、E(AL2、AL4、AL5)、F(AL2、AL5、AL6)、G(AL3、AL4、AL5)、H(AL3、AL5、AL6)、I(AL4、AL5、AL6)。

Note: In clockwise order from the topmost strain, A(AL1, AL2, AL3), B(AL1, AL3, AL4), C(AL1, AL4, AL5), D(AL1, AL5, AL6), E(AL2, AL4, AL5), F(AL2, AL5, AL6), G(AL3, AL4, AL5), H(AL3, AL5, AL6), I(AL4, AL5, AL6).

图2 供试香菇菌株拮抗鉴定  
Fig. 2 Antagonistic identification of *L. edodol* strains for testing

组合15组,拮抗现象明显的有9组,占60.00%;拮抗现象不明显的有2组,占13.33%;无拮抗的有4组,占26.67%。其中AL2、AL3、AL4之间无拮抗,与其他各菌株之间拮抗明显,表明3株菌株亲缘关系较近,初步鉴定为同一菌株;AL1、AL6与其余各

菌株之间拮抗明显,表明AL1和AL6与其余各菌株亲缘关系较远,可独立为两株菌株;AL5菌株与AL2和AL3无拮抗或拮抗不明显,但同AL4产生明显拮抗反应,表明仅靠拮抗试验结果无法直接将AL5菌株进行分类,最后分类结果还应结合分子鉴

表3 供试香菇菌株拮抗鉴定结果分析

Table 3 Analysis of antagonistic identification results of *L. edodei* strains for testing

菌株 Strain	AL1	AL2	AL3	AL4	AL5	AL6
AL1						
AL2	++					
AL3	++	--				
AL4	++	--	--			
AL5	++	--	+-	++		
AL6	++	++	+-	++	++	

注：“++”表示两菌株间拮抗明显，“--”表示两菌株间无拮抗，“+-”表示两菌株间拮抗不明显。

Note: “++” indicates significant antagonism between the two strains, “--” indicates no antagonism between the two strains, and “+-” indicates insignificant antagonism between the two strains.

定结果进行综合分析。根据拮抗试验结果可将6个香菇菌株初步分为2个不同菌株及3个不同亚种。

### 2.3 分子序列测定结果分析

2.3.1 rDNA ITS 序列比对分析 将经测序的6株香菇菌株的ITS序列在DNAMAN软件中进一步进行比对分析,结果表明,AL1、AL2、AL3、AL4、AL5、AL6各菌株之间的序列相似性在98.24%~99.71%之间,可将6个菌株鉴别为香菇属。

2.3.2 rDNA ITS 在NCBI 比对结果分析 6株香菇菌株的rDNA ITS区段PCR扩增产物经电泳检测,均扩增到了目的条带且扩增条带在700~800 bp之间,符合测序要求。将测序正确的核酸序列提交到NCBI数据库进行BLAST比对,得到与其最相似的物种名、登记号及序列相似性。结果表明,6株菌株核酸序列在NCBI上的序列相似性在99.57%~100.00%(表4),均为香菇(*L. edodes*),AL1和AL6为不同菌株,AL2、AL3、AL4、AL5可鉴定为同一菌株。

表4 供试香菇菌株在NCBI数据库中比对结果

Table 4 Comparison result of *L. edodei* strains in NCBI database

编号 Number	登录号 Name	NCBI 比对结果 NCBI comparison result	序列相似性 Sequence similarity/%	备注 Remark
AL1	MH101906.1	<i>Lentinula edodes</i> strain 922	100.00	
AL2	MN622792.1	<i>Lentinula edodes</i> voucher JFRL114	99.72	与 <i>Lentinula edodes</i> voucher JFRL24 一样是 99.72%
AL3	MN622792.1	<i>Lentinula edodes</i> voucher JFRL114	99.57	与 <i>Lentinula edodes</i> voucher JFRL24 一样是 99.57%
AL4	MN622786.1	<i>Lentinula edodes</i> voucher JFRL24	99.71	与 <i>Lentinula edodes</i> voucher JFRL114 一样是 99.71%
AL5	MN622786.1	<i>Lentinula edodes</i> voucher JFRL24	100.00	与 <i>Lentinula edodes</i> voucher JFRL114 一样是 100.00%
AL6	MW021135.1	<i>Lentinula edodes</i> strain VM267	99.57	

2.3.3 基于rDNA ITS序列系统发育树分析 经测序获得的6株供试香菇菌株的ITS序列长度为701~707 bp。使用最大复合似然法计算进化距离,6株香菇的遗传距离在0.000 0~0.201 9之间。其中AL1遗传距离最远为0.201 9,AL6与其他株遗传距离为0.000 6~0.004 8,其他各菌株的遗传距离在0.000 0~0.005 2之间,在Genebank中下载平菇 *P. ostreatus* isolate P93 (KY962509) ITS序列,长度为687 bp,作为外类群,与6株香菇种质资源的ITS序列构建NJ系统进化树(图3),可以发现,6株香菇菌株可以聚为3个大类。其中AL1、AL6各自独立为一支;AL2、AL3、AL4和AL5聚为一支且组成姐妹群,其中AL2和AL4的自展支持强度为90,亲缘关系较近。

### 2.4 大棚出菇品比试验结果分析

出菇试验共持续约7个月,采收完第三茬菇后结束,6株菌株全部出菇,6株香菇菌种出菇情况以

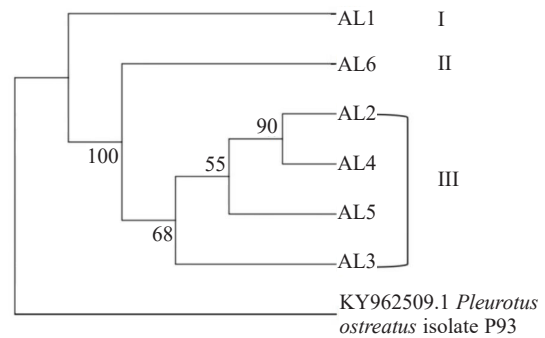
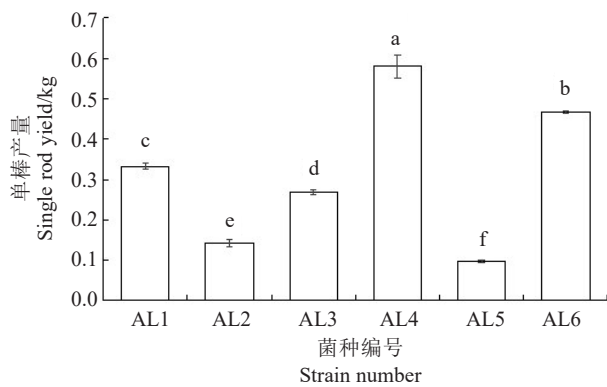


图3 供试香菇菌株ITS序列构建系统进化树  
Fig. 3 Phylogenetic tree of *L. edodei* strains ITS sequences

单棒产量(kg)进行统计分析。由图4可知,6株香菇菌株单棒产量之间差异显著,单棒产量从高到低排序为AL4>AL6>AL1>AL3>AL2>AL5,其中AL4单棒产量最高,为0.58 kg,超过0.30 kg以上的菌株为AL4、AL6、AL1,单棒产量较低的两个菌株为



注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Different small letters indicates significant difference at 0.05 level.

图 4 供试香菇菌株出菇单棒产量

Fig. 4 Single rod yield of *L. edodei* strains for testing

AL2 和 AL5。从菌龄分组上来看,在安龙夏季栽培香菇菌种出菇情况较好的菌株均为短菌龄菌株:AL4、AL6、AL1,单棒产量分别为 0.58、0.47、0.33 kg,3 株菌株平均单棒产量为 0.46 kg,而长菌龄 3 株菌株 AL2、AL3、AL5 单棒产量分别为 0.14、0.27、0.10 kg,3 株菌株平均单棒产量仅为 0.17 kg,仅为长菌龄菌株产量的 36.96%。

### 3 讨论与结论

在香菇生产中,菌种质量直接影响栽培的成败和产量的高低,同时关系到产业的可持续健康发展。然而,近年来由菌种质量问题引发的生产事故时有发生,给农民和当地经济造成重大损失。食用菌菌丝虽具有无限生长的特性,但细胞分裂次数越多,老化程度越高,变异也越严重<sup>[16]</sup>,这是导致香菇产量下降的重要原因之一,因此对香菇建立快速准确的鉴定方法是十分必要的。对食用菌进行分类和鉴定的传统方法主要是通过观察菌丝、孢子和子实体的形态学特征,并结合生理生长性状描述进行分类,传统分类法的优势在于形态特征易于观察和比较,并具有相对的稳定性<sup>[17]</sup>,在香菇育种选种时,可以将菌丝生长速度作为选择亲本指标<sup>[18]</sup>,对安龙县香菇主产区栽培的 6 株菌株进行菌丝体生长速度测定试验以及大棚出菇试验,结果表明,AL4 和 AL6 的菌丝生长速度快,菌丝洁白粗壮,而菌株 AL5 的菌丝生长速度最慢,结合菌株夏季出菇试验结果来看,菌株 AL4 和 AL6 出菇产量较高,且相对较耐高温,菌株 AL5 出菇产量较低,研究结果与庞媚等<sup>[19]</sup>对平菇菌株的结果相似。在出菇试验中,6 株供试香菇菌种中出菇情况较好的菌株为菌丝生

长速度快、菌丝洁白粗壮的短菌龄菌株,平均单棒产量是长菌龄菌株的 2.7 倍,表明短菌龄菌株比长菌龄菌株更适合在安龙县夏季栽培,短菌龄菌株的越夏能力强于长菌龄。

拮抗反应试验也可用于预测菌株间的亲缘关系,在真菌分类学上广泛应用,可对菌株进行初步的分类<sup>[20]</sup>。对安龙县香菇主产区栽培的 6 株菌株进行拮抗试验,结果表明,AL1 和 AL6 与其他菌株之间拮抗明显,可初步认定为独立菌株;AL2、AL3、AL4 之间无拮抗,与其他菌株之间拮抗明显,可初步认定为同一菌株,虽然菌株间命名不同,但可能为同一菌株。AL5 与 AL2 和 AL3 无拮抗或拮抗不明显,但与 AL4 产生明显拮抗反应,表明仅靠拮抗试验结果无法直接分类 AL5,还需结合分子鉴定的结果,与谢雪迎等<sup>[21]</sup>得出的拮抗试验只能用于菌株的初步分类的结论相似。与分子生物学鉴定结果相比,拮抗试验只能将有拮抗反应的菌株分为不同菌株,却不能将没有拮抗反应的菌株视为相同菌株,甚至很难说没有拮抗反应的菌株亲缘关系近,有的不同种或不同属之间的菌株也可能没有拮抗反应,因此,拮抗测定仅仅是菌种鉴定的一种辅助手段<sup>[22]</sup>。

ITS 序列被称为基因转录间隔区,又叫内转录间隔区<sup>[23]</sup>,存在种间变异大、种内保守性高、片段较短的特点,同时容易与单对引物结合,便于测序与扩增,在系统发育分析以及物种鉴定方面,ITS 序列一直作为一个有效鉴定真菌种类的分子标记。在香菇的遗传多样性研究中,崔筱等<sup>[24]</sup>利用 ITS 序列将 41 个香菇品种聚为独立进化的 4 个大类,即 3 个不同的菌株和 8 个不同的亚种。宋小亚<sup>[25]</sup>等利用 ITS 序列将丽水市某香菇产区 3 株混乱的菌株鉴别出来,避免了一场由于菌种混乱导致的生产事故。在菌种种质资源鉴定研究中,通过表型与 ITS 测序相结合的方法,将菌株间序列相似性 $\geq 99.9\%$ 的定义为同一菌株,序列相似性 99.0%~99.9%之间的定义为同一亚种,序列相似性为 99.4%~99.9%之间,可认为是同一菌株的不同亚种<sup>[26]</sup>,供试的 rDNA ITS 序列通过与 NCBI 的 GenBank 数据库进行 BLAST 检索比对,序列相似性为 95%~99%,鉴别为相同属,序列相似性 $\leq 95\%$ ,鉴别为相同科<sup>[27]</sup>,结合上述研究成果对本试验中 6 供试菌株进行 ITS 测序分析,结合拮抗试验结果,表明 6 个菌株均属于香菇属,又将 6 株香菇属菌株 AL1 和 AL6 分为独立菌株,AL2、AL3、AL4 和 AL5 为不同亚种,引用平菇

(*Pleurotus ostreatus*)作为外类群,与6株香菇种质资源的 ITS 序列使用 MEGA7.0 软件构建 NJ 系统进化树,可以发现,6株香菇菌株可以聚为3个大类,且不同菌种间亲缘关系较近。

综上所述,笔者通过“菌丝生长速度测定+拮抗鉴定+ITS 序列分析+出菇品比试验”多种鉴定方法相结合,确定了安龙县主栽的6株香菇菌株为3个不同类群;2个不同的菌株及4个不同亚种,该方法可以有效鉴定香菇菌株种类,基本能解决香菇菌种命名混乱的问题。在适栽菌种选择方面,6株菌株中短菌龄菌株 AL4 和 AL6 较长菌龄菌株来说产量更高,耐高温性更强,更适合夏季栽培。研究结果为进一步探索高效出菇管理技术提供了理论和数据支持,为食用菌产业健康发展提供了保障。

### 参考文献

- [1] PEGLER D N, YOUNG T W K, 姚一建. 香菇的学名及其在当代真菌分类中的位置[J]. 真菌学报, 1993(3): 226-231.
- [2] 徐玉妹, 张润清. 我国香菇产业现状及未来发展分析[J]. 中国食用菌, 2021, 40(10): 89-92.
- [3] 刘晓, 闫语婷. 香菇的营养价值及综合利用现状与前景[J]. 食品工业, 2017, 38(3): 207-210.
- [4] 李红梅. 袋料香菇安全越夏技术初探[J]. 食用菌, 2017, 39(1): 50-51.
- [5] 曾煜达. 安龙县食用菌的高产栽培技术[J]. 现代园艺, 2014(16): 33.
- [6] 陈雄, 李琴, 安海燕. 基于钻石模型的安龙县食用菌产业竞争力研究[J]. 高原农业, 2022, 6(3): 302-309.
- [7] 陈俎宇. 黔西南: 以菌破题乡村产业产销两旺[J]. 当代贵州, 2021(12): 70-71.
- [8] 苟凡铖, 侯怡铃, 宋波, 等. rDNA-ITS 序列分析法和传统分类法对真菌进行分类鉴定[J]. 西华师范大学学报(自然科学版), 2017, 38(4): 382-386.
- [9] 李玉. 野生食用菌菌种分离与鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
- [10] 肖扬. 几种新型分子标记技术在中国香菇种质资源遗传多样性研究中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [11] 沈秀芬. 香菇菌龄性状 BSA 定位及 InDel 标记开发研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
- [12] 王凡, 洪葵. CTAB 法提取野野村菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1211-1215.
- [13] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [14] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [15] 周静, 韦应敏, 李漫乾. 黔西南州大棚香菇层架式高产栽培技术要点[J]. 南方农业, 2022, 16(24): 46-48.
- [16] 李红, 肖千明, 刘娜, 等. 食用菌菌种退化原因分析及复壮方法的探讨[J]. 辽宁农业科学, 2010(5): 53-55.
- [17] 苏春丽, 唐传红, 张劲松. 基于 ITS 序列的灵芝分子鉴定[J]. 成都医学院学报, 2014, 9(2): 121-123.
- [18] 茅盛浩. 三明市野生香菇种质资源分离与鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [19] 庞媚, 陈家翔, 包雪冰. 北海平菇菌株夏季栽培比较试验[J]. 食用菌, 2020, 42(2): 38-39.
- [20] 唐传红, 苏春丽, 张劲松, 等. 灵芝属分类学研究进展[J]. 食用菌学报, 2007, 14(3): 86-90.
- [21] 谢雪迎, 任鹏飞, 朱常香, 等. 24 个香菇菌株的鉴定与分类研究[J]. 山东农业科学, 2009(12): 36-39.
- [22] 崔筱, 刘芹, 段亚魁, 等. 平菇种质资源的遗传多样性分析[J]. 河南农业科学, 2020, 49(3): 138-144.
- [23] 匡治州, 许杨. 核糖体 rDNAITS 序列在真菌学研究中的应用[J]. 生命的化学, 2004(2): 120-122.
- [24] 崔筱, 刘芹, 孔维丽, 等. 基于拮抗及 ITS 序列分析的河南香菇主产区种质资源鉴定及遗传多样性分析[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(7): 31-38.
- [25] 宋小亚, 刘昆, 曾凡清, 等. 一起香菇菌棒品种混杂事故的鉴定分析[J]. 食药菌, 2014, 22(1): 43-44.
- [26] 崔筱, 付晓雨, 胡素娟, 等. 基于 ITS 序列对河南省山区部分野生食药菌种质资源鉴定分析[J]. 天津农业科学, 2021, 27(7): 1-8.
- [27] LANDEWEERT R, LEEFLANG P, KUYPER T W, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. American and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 327-333.