

基于 ITS 序列对西天目山地区大型真菌的分 类鉴定

俞皓鸣 蔡毅鸣 王珂 程源九

(复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘要: 西天目山地区为低山丘陵, 具有明显的北亚热带气候特征, 森林覆盖率高, 具有良好的植物遮荫环境和枯枝落叶层, 气候环境和营养条件适宜大型真菌的生长繁衍, 大型真菌物种资源丰富。我们以在西天目山地区采集的 86 份大型野生真菌标本为研究对象, 对其进行 ITS (internal transcribed spacer) 序列测序鉴定。共鉴定出 38 种大型真菌, 分属于 22 个科、25 个属。

关键词: 西天目山, 大型真菌, ITS 序列, 鉴定

Identification of large-scale fungi in the west Tianmu mountain based on ITS sequence

Haoming Yu, Yiming Cai, Ke Wang, Yuanjiu Cheng

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433

Abstract West Tianmu mountain is a low hill, where is at the north subtropical zone. It has high forest coverage rate and has better plant sunshade surroundings and dead branches and leaves. The climate environment and nutritive condition is suitable for large-scale fungi to grow and breed. So the resource of large-scale fungi in West Tianmu mountain is rich. In order to identify the 86 large-scale fungi collected from West Tianmu mountain, we used the ITS (internal transcribed spacer) sequence identification method. According to the result of ITS sequence identification, 38 specimens were successfully identified, which were classified to 22 families and 25 genus.

Key words: West Tianmu mountain, large-scale fungi, ITS sequence, identification

天目山位于浙江省杭州市西北部临安市境内, 地理位置为 $30^{\circ}18'-30^{\circ}25'N$, $119^{\circ}23'-119^{\circ}29'E$, 地质构造独特、地貌特点神奇, 西天目山地区森林覆盖率达到 95% 以上, 环境条件复杂, 具有良好的植物遮荫环境和枯枝落叶层, 为大型真菌的生存繁衍提供了绝佳的环境条件和营养条件, 因此天目山地区的大型真菌物种资源十分丰富。

大型真菌又称蕈菌, 是指真菌中形态结构比较复杂, 子实体较大, 人们可以用肉眼直接看到和进行观察的种类。对大型真菌的研究具有重要的理论意义和经济、生态价值, 与工农

业生产、医药卫生、环境保护和生物学基本理论研究有着密切关系。一方面，大型真菌作为生态环境中分解者的重要组成部分，是物质和能量转换的重要中间对维系生态环境的平衡、促进整个生态学群落的繁荣、研究生态学相关课题等方面有着重要意义；另一方面，很多大型真菌具有很高的药用、食用价值，对促进工农业发展乃至某些地区的经济发展至关重要。因此，为了更好地了解 7 月份西天目山地区大型真菌的分类情况，我们小组对采集到的 86 份真菌标本进行了基于 ITS 序列的物种鉴定。

大型真菌的鉴定一般有形态学鉴定和基因分子鉴定两种方法。形态学鉴定是通过测量、观察子实体的形态结构以及孢子等的显微结构来判断大型真菌的种属，但由于大型真菌形态结构复杂多变，同属不同物种之间形态差异很大，生存条件对大型真菌的形态特征也有很大影响，因此大型真菌的形态学鉴定具有很大的不确定性。(朱炳根，2003)相比之下，通过基因测序手段对大型真菌的鉴定的准确性较高。rDNA 上的 18S,5.8S,28SrDNA 基因序列进化速率慢且相对保守，存在广泛的异种同源性。(仇萌和邹先彪，2011)内转录间隔区 ITS1(internal transcribed spacer 1)位于 18S、5.8S 之间，内转录间隔区 ITS2 位于 5.8S、28S 之间，ITS1 和 ITS2 合称为 ITS 序列。由于 ITS 序列不参与成熟核糖体的合成，所以受到的选择压力较小，进化速率较快，具有广泛的序列同源性，在保守性方面表现为种内不同菌株之间的高度保守，而在真菌种间差异明显，这些特点使得 ITS 适用于真菌物种的分子鉴定以及系统发生学分析。(张国广和邹金美，2010；Arun Kumar DUTTA et al,2015；田慧敏，2017)并且 ITS 序列相对较短(650~750bp)，很容易根据其保守区域合成相关引物进行 PCR 扩增，因此 ITS 序列分析是在大型真菌的分子鉴定时最为常用的一个手段。

1 材料和方法

1.1 实验材料及试剂：

- (1) 实验材料
- 研究小组于 2017 年 7 月 1 日至 2017 年 7 月 10 日于浙江天目山进行真菌样本采集。
- (2) 实验仪器
- 微量移液枪、水平电泳仪和电泳槽、凝胶成像仪、高温水浴锅、匀浆棒、刀片、吹风机、低温烘箱
- (3) 实验试剂：
- 1、真菌 DNA 提取试剂盒：北京全式金生物技术有限公司 TransDirect Plant Tissue PCR Kit
- 目录号：AD301
- 试剂盒组成：

成分	含量
PD1 Buffer	4 ml

PD2 Buffer	4 ml
2x <i>TransDirect</i> PCR SuperMix	1 ml
ddH ₂ O	5 ml

2、水平电泳试剂：

1%琼脂糖凝胶配制方法：

- 1) 称取 0.6 g 琼脂糖粉于锥形瓶中
- 2) 加入 60 ml 电泳缓冲液 TAE，摇晃均匀
- 3) 放入微波炉中加热煮沸
- 4) 稍凉、倒入电泳槽胶板中
- 5) 迅速加入 4 μ l 溴化乙锭 (EB) 混合均匀
- 6) 插上电泳梳子，赶走气泡，静置等待凝胶

电泳缓冲液 TAE 配制：

- 1) 称取 Tris 242g、Na₂ EDTA·2H₂O 37.2 g
- 2) 加入 600 mL ddH₂O 溶解
- 3) 加入 57.1 ml 冰醋酸，搅拌均匀
- 4) 用 ddH₂O 定容至 1 L 得到 50xTAE 母液
- 5) 取母液 20 ml，用 ddH₂O 定容至 1 L，得到 1x 使用浓度 TAE

1.2 研究方法

1.2.1 真菌样品 DNA 提取

(1) 样品的前期处理

将采集到的真菌样本放入低温烘箱中做烘干处理 24 小时，得到干燥样品。将干燥样品取出后用吹风机常温吹风，吹去表面泥土和杂物。用镊子除去甘草屑以防止 DNA 污染。

用刀片将样品切成小块，放入干燥信封并做好标记。注意刀片使用后及时清洗防止样品之间的 DNA 污染。

(2) 样品 DNA 的提取

- 1) 取 1-2 g 样品与 1.5 ml 离心管中，加入 150 μ l PD1 Buffer
- 2) 微热样品组织，用研磨棒将样本组织研磨成糊状
- 3) 沸水浴 10 min，期间不时打开离心管盖子以防止加热后盖子弹开液体溅出
- 4) 加入 150 μ l PD2 Buffer，4℃暂存。

1.2.2 样本 ITS 序列扩增

采用真菌 ITS 序列扩增通用引物：

1) ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'

2) ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

以提取的样本真菌 DNA 作为模板进行 PCR 扩增，50 μ l PCR 反应体系见下表：

成分	体积 (μ l)
2x <i>TransDirect</i> PCR SuperMix	25
DNA 模板	4
Primer ITS1 (10 μ M)	1
Primer ITS4 (10 μ M)	1
ddH ₂ O	19

PCR 扩增程序：

94℃预变性 5min，94℃变性 30 sec，55℃退火 1min，72℃延伸 1min，回到 94℃变性一共 30 个循环，72℃终延伸 10min，4℃保存

1.2.3 扩增产物电泳检测

- 1) 将凝胶放入电泳槽内，加入电泳缓冲液 TAE 至没过整块凝胶
- 2) 取扩增产物少量加入 5xloading buffer 混合后点样
- 3) 120V 电泳迁移 30 min
- 4) 电泳完毕后将凝胶取出，在凝胶成像仪下观察

1.2.4 样本 ITS 序列测序

PCR 产物及克隆样品由上海美吉生物公司承担测序工作。

1.2.5 序列分析

1.2.5.1 序列的挑选

本研究对所有用于形态观察的标本都进行了 DNA 的提取、PCR 的扩增以及测序。只有那些保存较好的标本测得了序列,若同一个分类单元得到的序列多于 5 条,则仅选择有代表性的 3-5 条用于分子系统学分析。部分标本由于被虫蛀、霉菌污染等原因未得到序列或得

到的序列明显为杂菌序列,未被本文引用。根据文献从 NCBI 上下载的序列,除明显鉴定错误的序列外,均被本文引用。

1.2.5.2 系统树的构建

用 Mega7 软件构建系统树所使用的方法为最大简约法(Maximum parsimony analysis)(Felsenstein J.,1985)。最大简约法分析采用启发式搜索(Heuristic searching)的方法搜索一最简约树,序列采用随机逐步加入(Addition stepwise sequence)方式,且所有碱基均视为等权的,空格处理为缺失。对搜索到的最优简约树进行严格合意(Strict consensus),获得各节点的支持率(Bootstrap 值)。测试的重复数(Number of replicates)选择 500 次,分支交换算法(Branch-swapping algorithm)选择树的二分与重接法,MaxTrees 设置为 1,000。最终根据分支处的 bootstrap 值的大小确定实验样品与标准样品的亲缘关系,确定最终的鉴定结果。

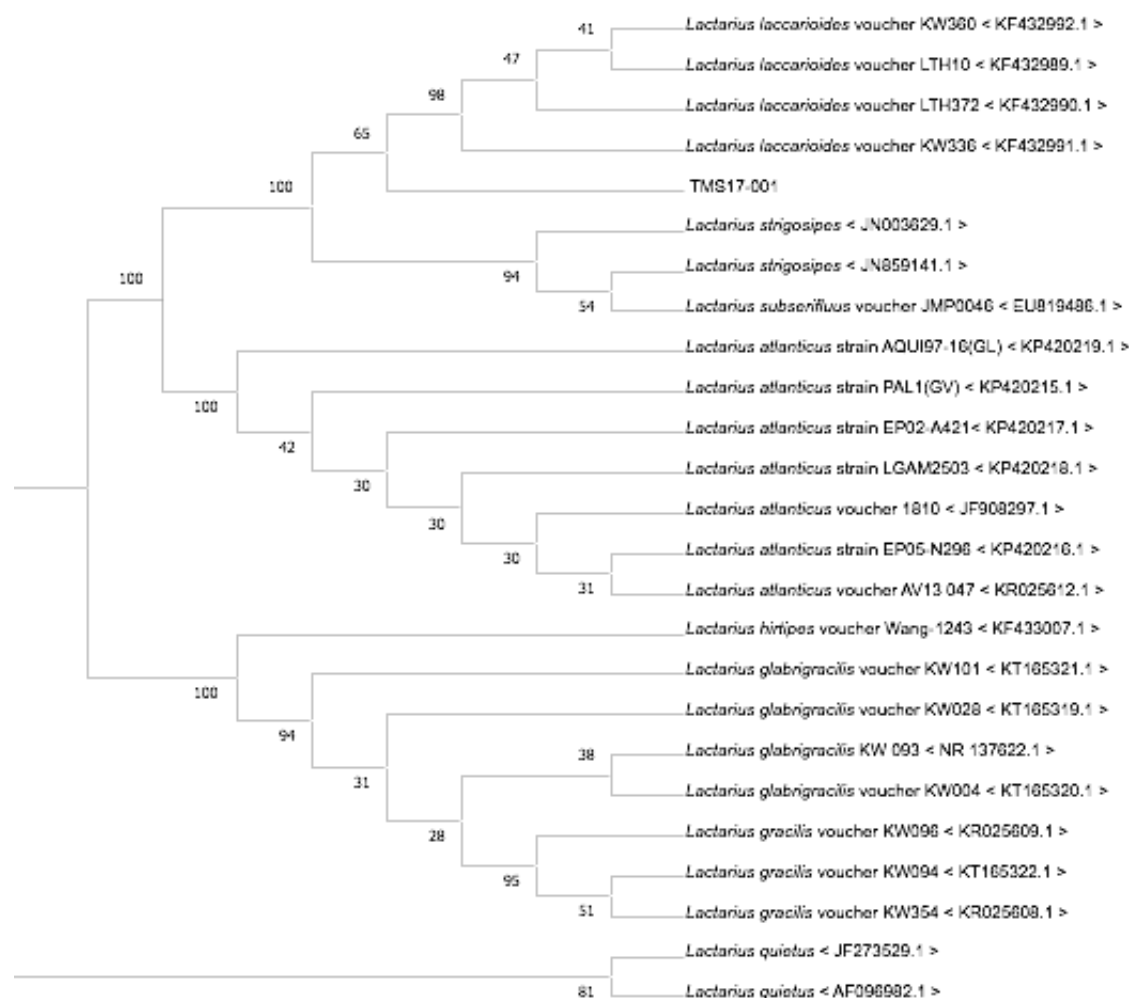
2 实验结果

采集到的 81 份样品中,共有 71 份得到了 PCR 扩增结果,其中的 51 份样品测序结果良好,可进行进一步的 ITS 序列分析。根据其序列比对,近源序列建树以及形态对比的结果,我们实现了以下样品的鉴定。

序号:TMS17-001 (Fig.1A)

鉴定结果:*Lactarius sp.*

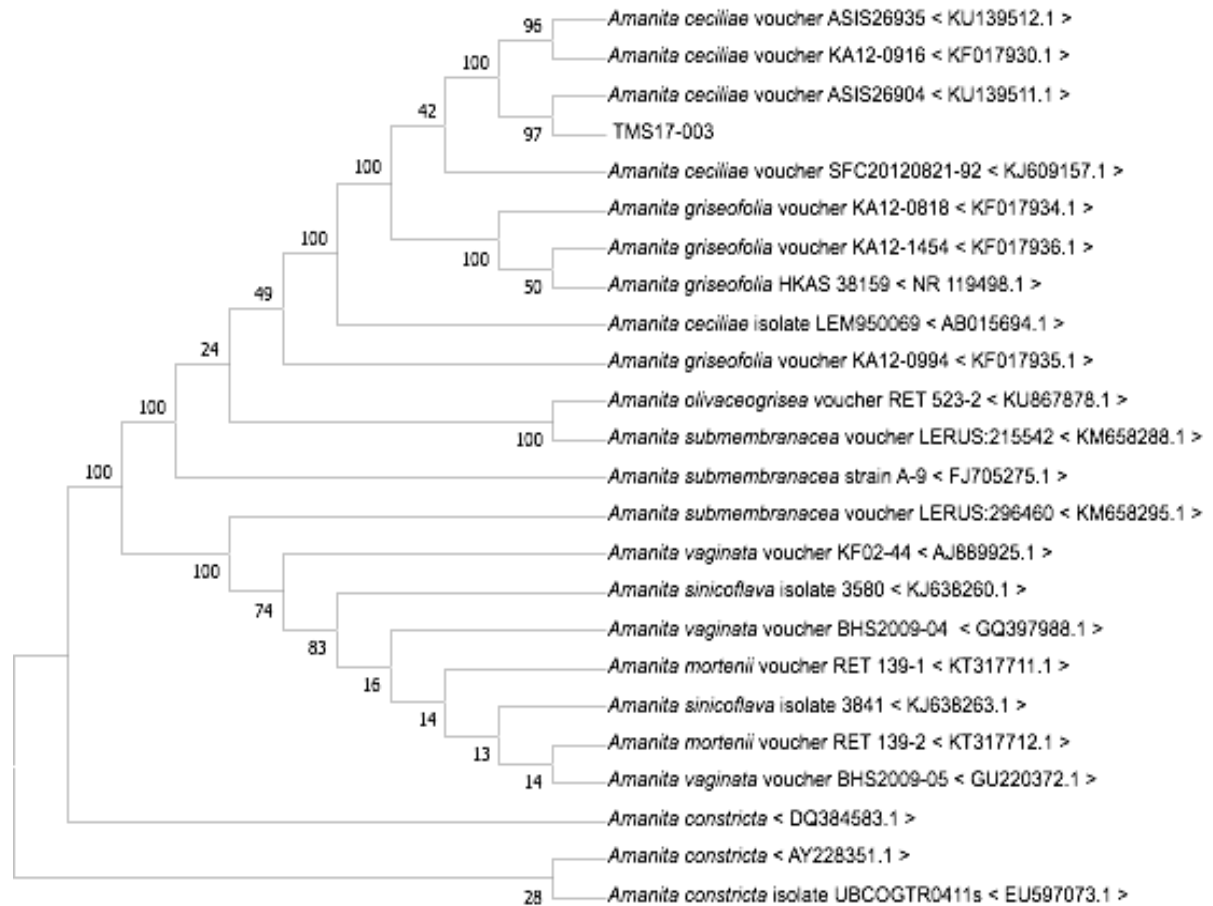
形态特征:子实体群生或散生。菌盖直径 4-10cm,扁半球形至扁平下凹,光滑,湿时粘、肉色、淡土黄色,有色泽较深的同心环带。菌肉土黄色,菌褶土黄色,稍密,延生,分叉。菌柄长 2.5-6cm,粗 1-3cm,中空,与菌盖同色,向下渐细并弯曲。



序号：TMS17-003(Fig.1B)

鉴定结果：*Amanita ceciliae* (Berk. & Broome) Bas

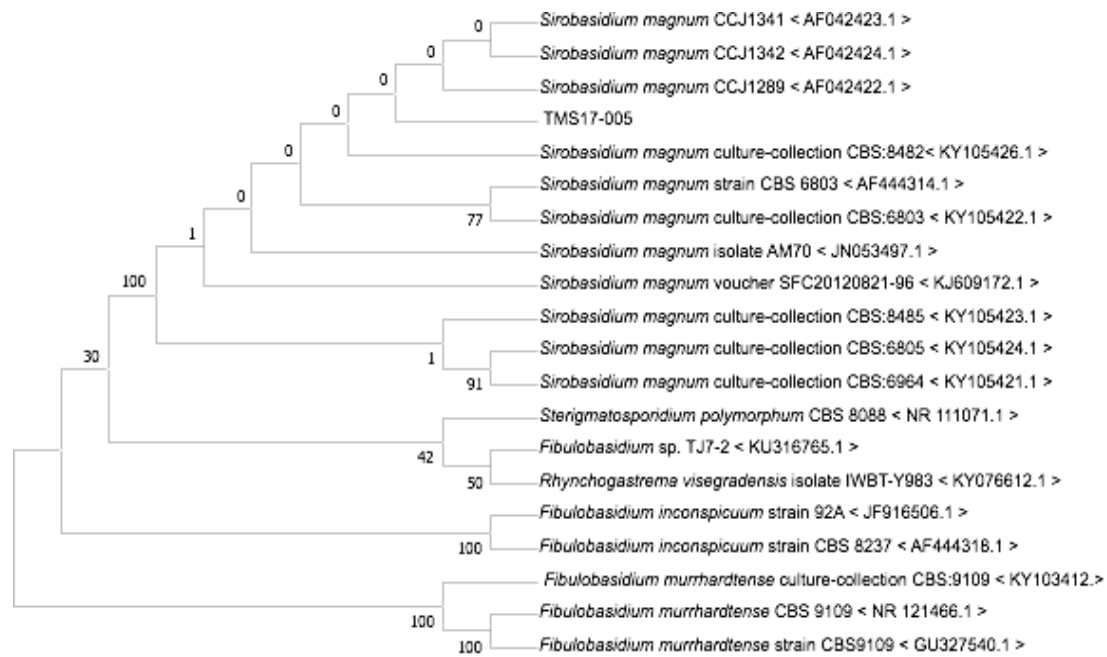
形态特征：子实体单生或散生。菌盖直径 4-13cm，初期钟形，后期半球形至平展，淡土黄色至灰褐色，具灰褐色至灰黑色易脱落的粉质颗粒，稍粘，边缘具明显条纹。菌肉白色，薄。菌褶白色或稍带灰色，较密，离生，不等长。菌柄细长，圆柱形，长 11-18cm，粗 1-2cm，上部白色，下部带灰色，具深色纤毛状小鳞片并常形成花纹，内部松软至空心，基部稍膨大。菌托由 2-3 圈深灰色粉质环带组成。



序号：TMS17-005(Fig.1C)

鉴定结果：*Sirobasidium magnum* Boedijn

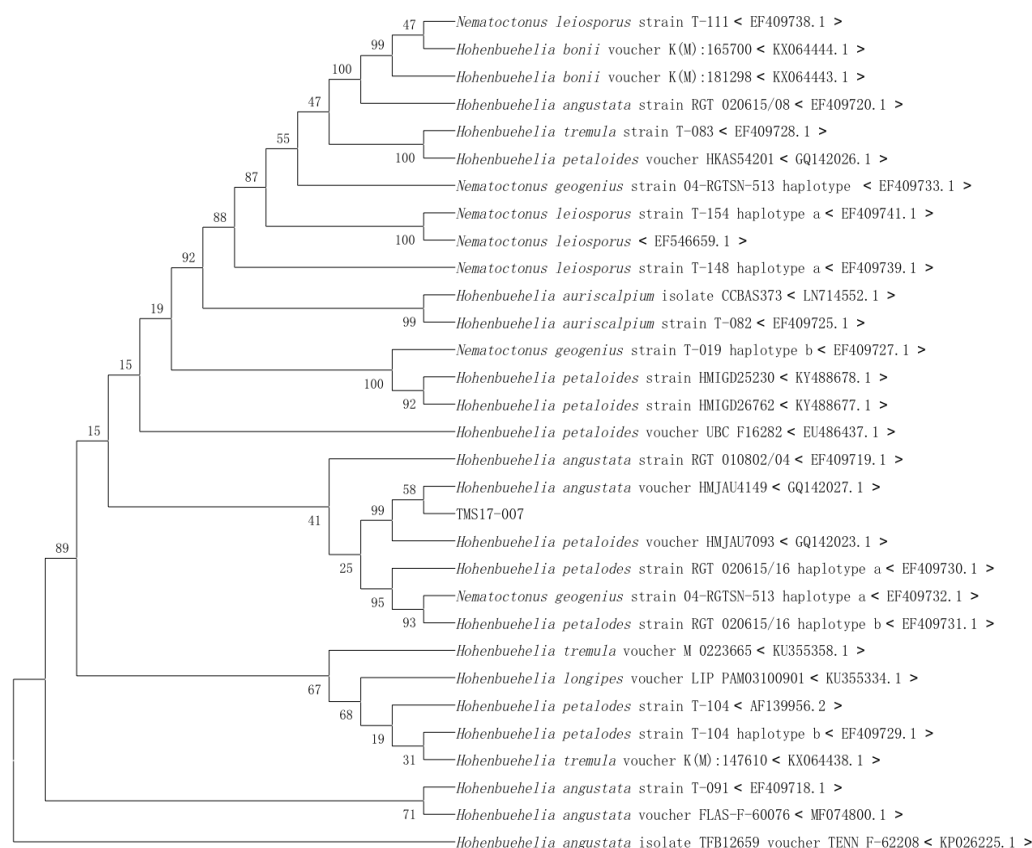
形态特征：担子果胶质，小的个体近脑状，表面多皱褶，较大的个体明显具丛生常泡囊状的叶状瓣片，长 1-8cm，宽 1-6cm，高 1-3.5cm，鲜时黄褐色至棕褐色或赤褐色；干后棕褐色至棕黑色。菌丝有锁状联合。子实层遍生外露表层，厚 50-75 μ m。



序号：TMS17-007(Fig.1D)

鉴定结果：*Hohenbuehelia* sp.

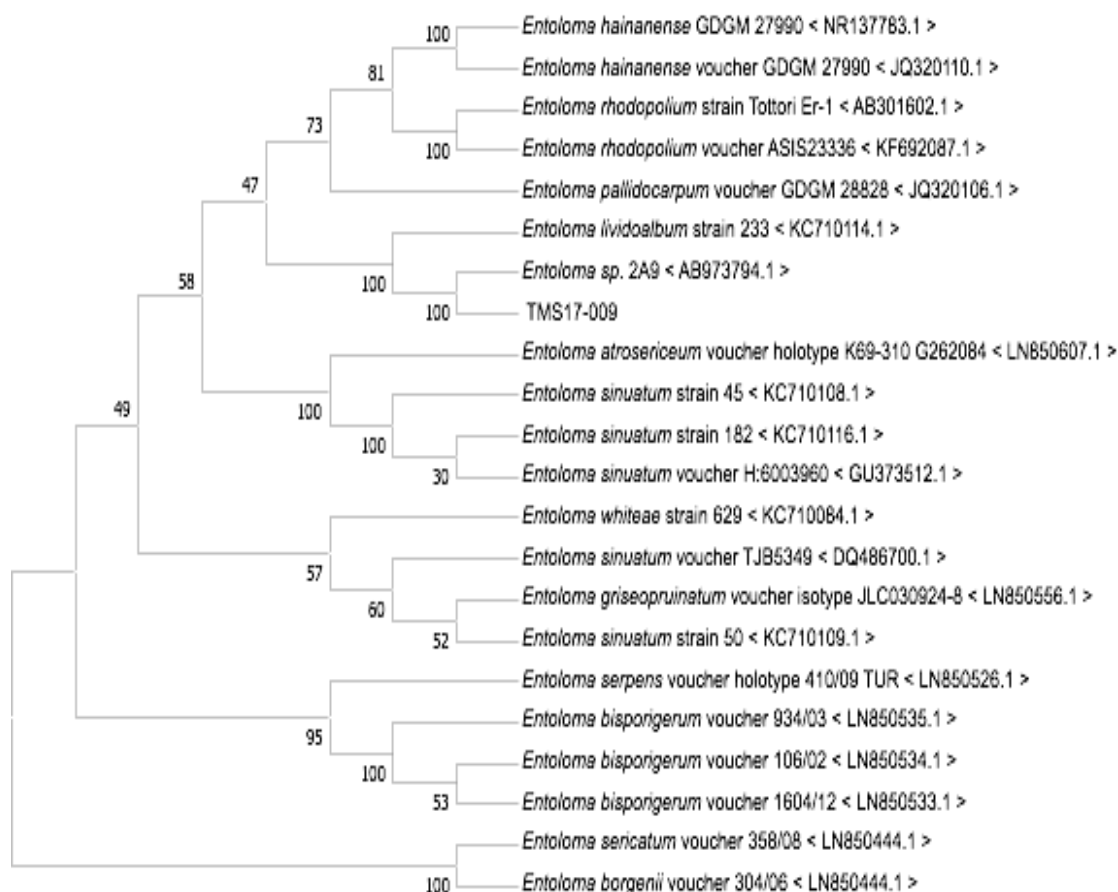
形态特征：菌盖宽 2~4cm，扇形，表面黄白色至黄褐色，中央颜色较深，稍粘，边缘有不明条纹，内卷。菌肉白色或黄白色。菌褶稠密延生，淡黄色。菌柄长 1~2cm，直径 0.5~1cm，圆柱形，上粗下细，侧生。夏季生长于腐木上。



序号：TMS17-009(Fig.1E)

鉴定结果：*Entoloma* sp.

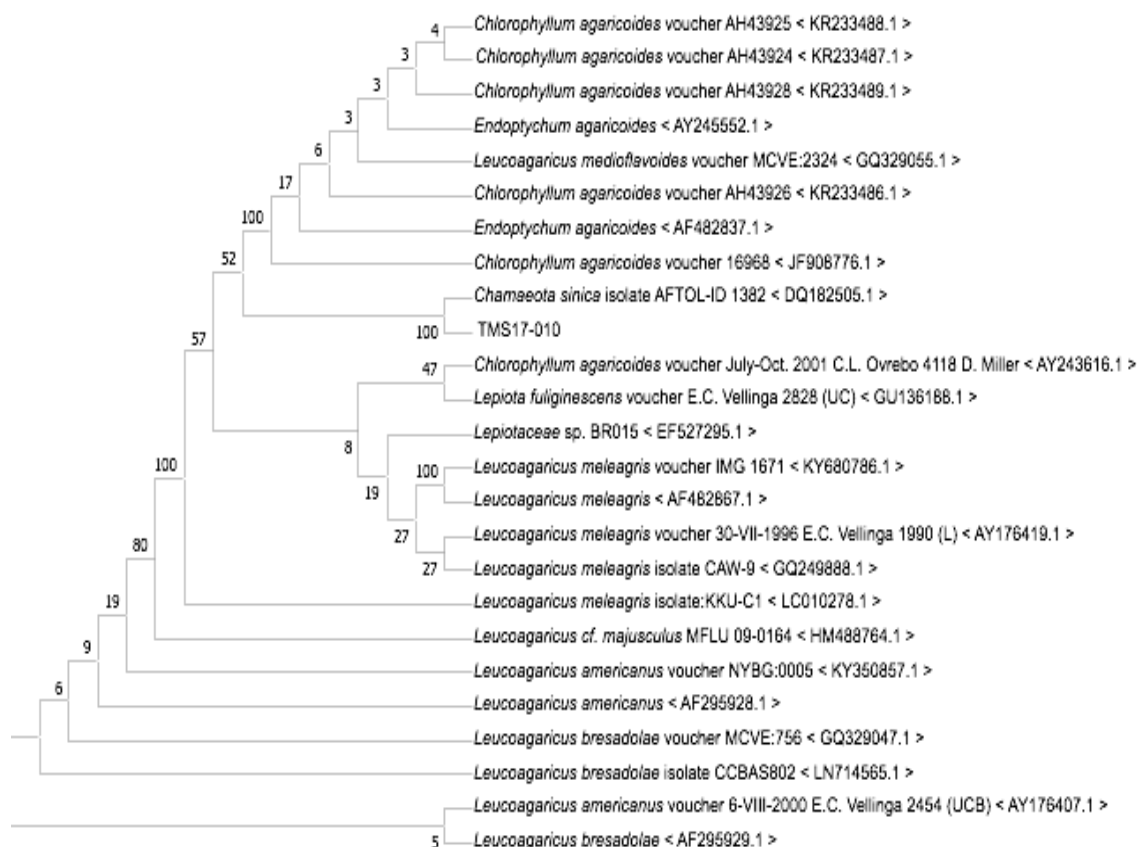
形态特征：菌盖直径 3~5cm，平展中部微突起，灰褐色至黑褐色，边缘无条纹。菌肉灰褐色或粉褐色。菌褶稍密，直生，边缘齿状，较厚，成熟时显粉褐色。菌柄长 4~6cm，直径 0.5cm，圆柱形白色。生长于阔叶落叶林地中。



序号：TMS17-010(Fig.1F)

鉴定结果：*Chamaeota sinica* J.Z. Ying

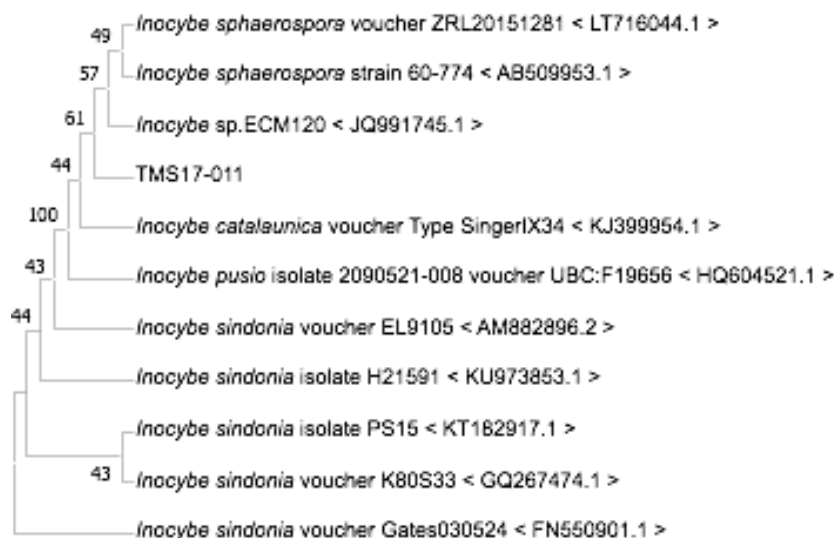
形态特征：子实体群生或散生。菌盖直径 5-11cm，初近半球形，渐平展，灰褐色至鼠灰色，有斑点，中央颜色较深。菌肉白色，菌褶白色，稍密，离生。菌柄长 7-9cm，粗 0.4-1cm，中空，灰褐色，向下颜色加深。



序号：TMS17-011(Fig.1G)

鉴定结果：*Inocybe* sp.

形态特征：子实体单生或群生。菌盖直径 2.5-3cm，开伞后中央高，边缘平，带褐黄至黄褐色，中央色深，纤维状，后边缘放射状开裂。菌肉黄色。菌褶离生，黄色，后污肉桂色。菌柄 2.5cm-3.5cm，基部球根状，表面淡黄白色。

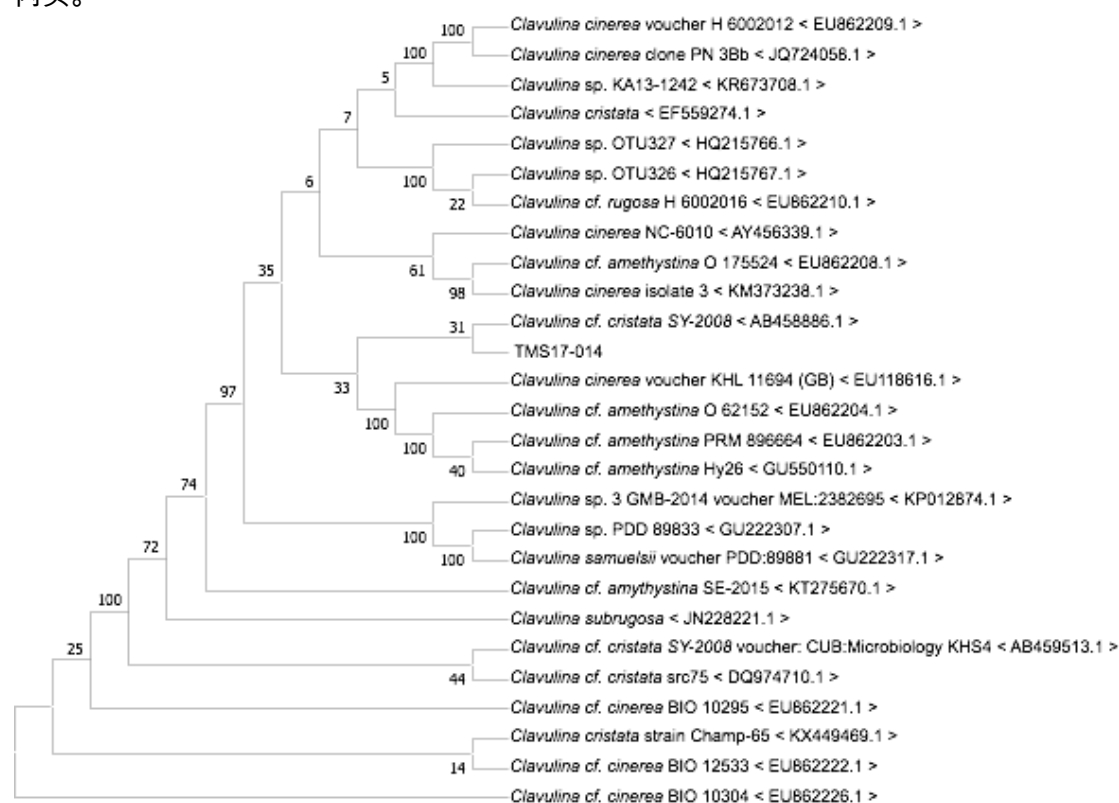


序号：TMS17-014(Fig.1H)

鉴定结果：*Clavulina* sp.

形态特征：子实体群生。多枝，高 3-5cm，黄白色，有柄，枝一端有密集的小枝。菌肉白色，

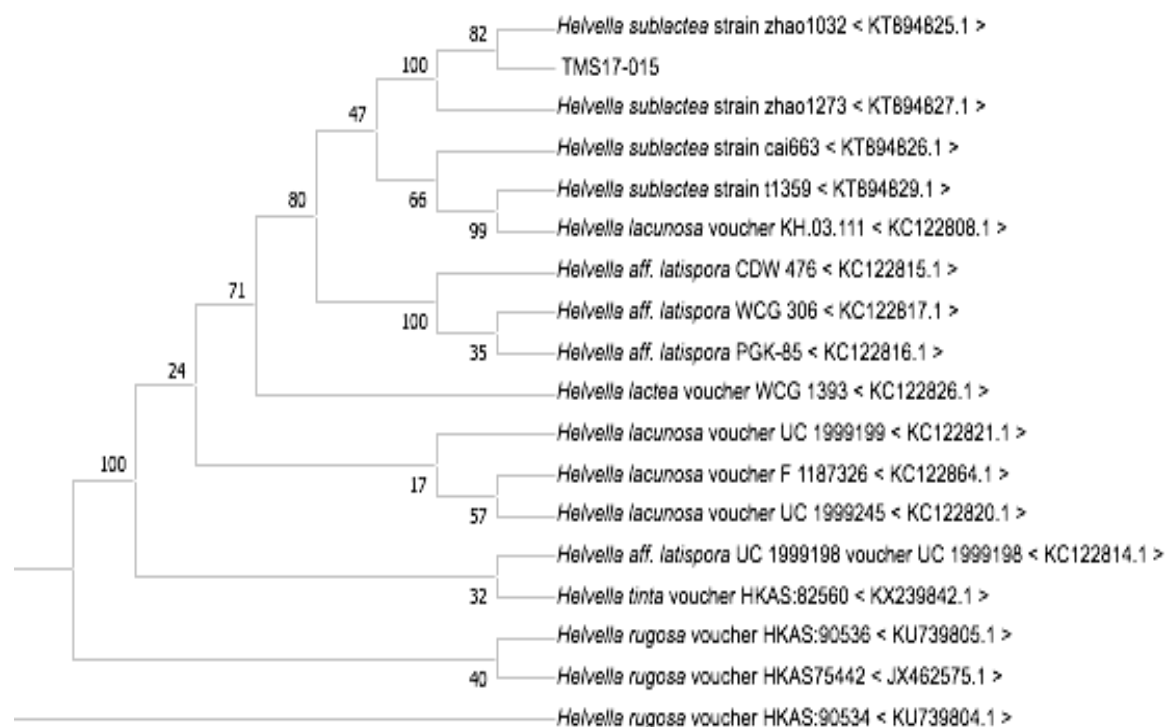
内实。



序号：TMS17-015(Fig.1I)

鉴定结果：*Helvella sublactea*

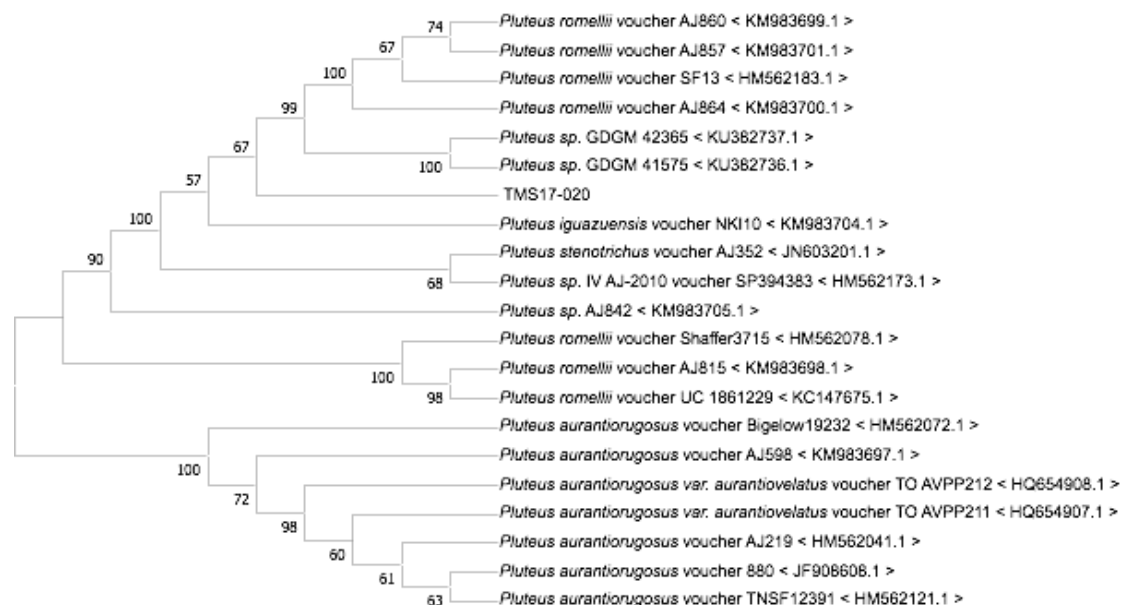
形态特征：子实体散生或群生。菌盖马鞍形，宽达 4cm，蛋壳色，褐色至近黑色，卷曲，边缘与菌柄分离。菌柄白色，有纵生深槽，形成纵棱，长 5cm，粗 2cm。



序号：TMS17-020(Fig.1J)

鉴定结果：*Pluteus iguazuensis* Singer

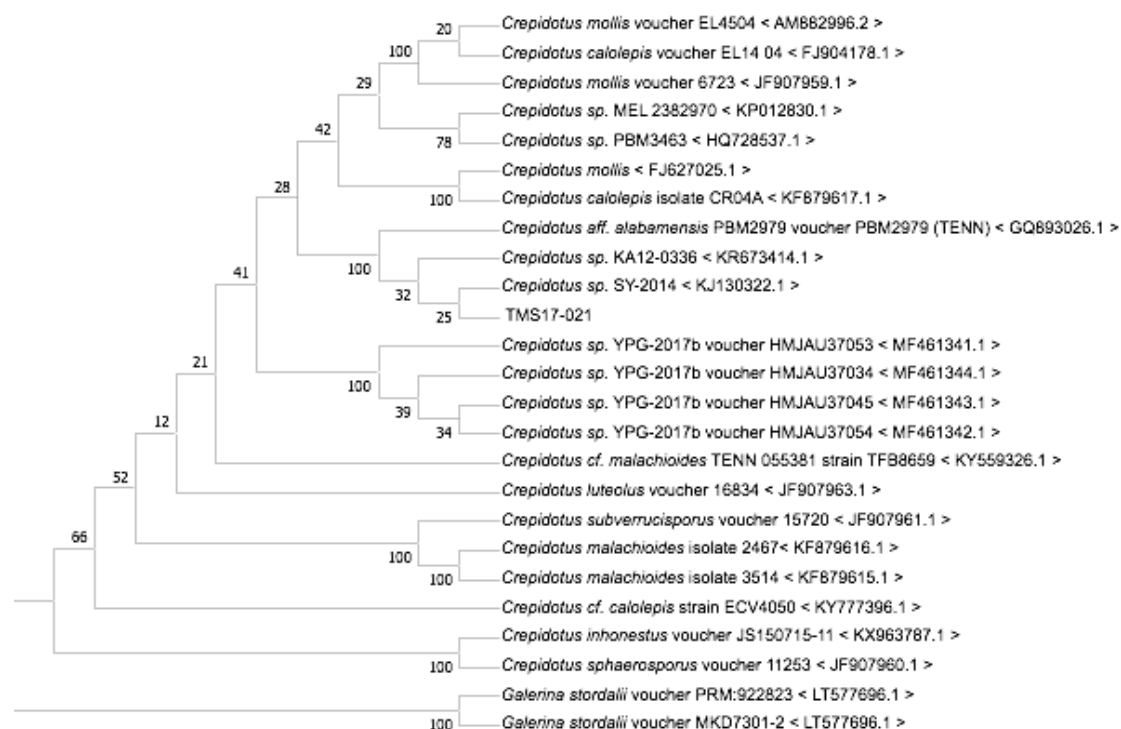
形态特征：子实体群生，菌盖直径 5-9cm，初钟形，后扁平球形，逐渐平展，中央隆起，表面灰褐色至鼠灰色，被纤维状花纹。菌肉白色。菌褶离生，密集，初白色，后肉红色。菌柄 6-12cm，直径 0.6-1.2cm，中实，表面白色，有纤维状花纹。



序号：TMS17-021(Fig.1K)

鉴定结果：*Crepidotus* sp.

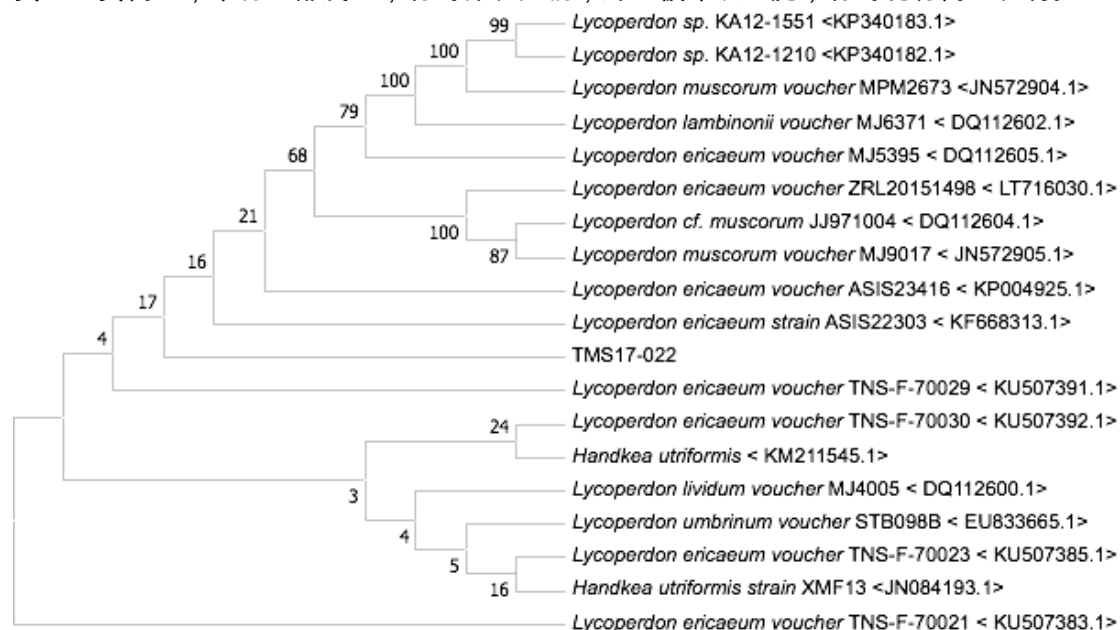
形态特征：子实体群生，菌盖直径 1-3cm，近扇形或半圆形。无柄，近平伏，菌肉薄，灰褐色，附有白色的斑纹。



序号：TMS17-022(Fig.1L)

鉴定结果：*Lycoperdon ericaeum* Bonord.

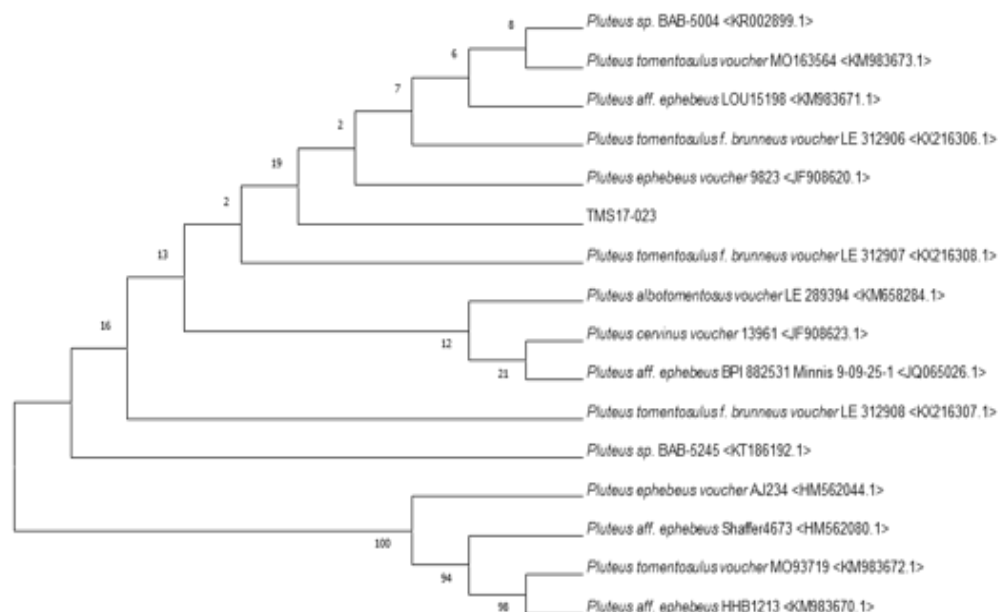
形态特征：子实体诞生或群生，近球形或倒卵形。高 2.5-7cm，宽 2-4cm，初白色，后为灰黄色至黄褐色，不育基部发达，有时伸长如柄，外包被布以小疣，有时混有褐色长刺。



序号：TMS17-023(Fig.2A)

鉴定结果：*Pluteus* sp.

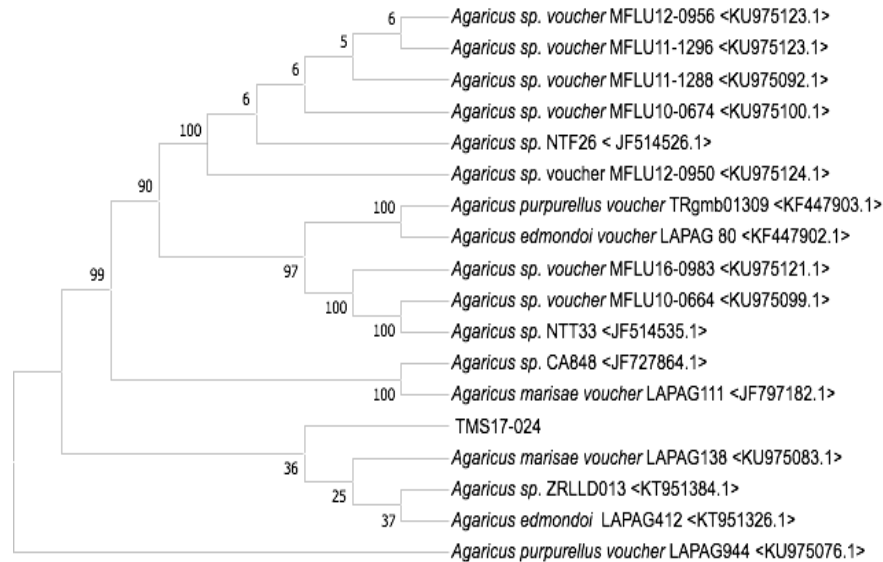
形态特征：子实体单生散生，有时群生，菌盖直径 5-11cm，初近半球形，渐平展，灰色至暗褐色，近光滑，有时见少部分纤毛或鳞片状附着物。菌肉白色，菌褶白色至灰色，离生、稍密，不等长，7-9cm，粗 0.4-1cm，与菌盖同色，有毛，内部充实至松软。



序号：TMS17-024(Fig.2B)

鉴定结果：*Agaricus sp.*

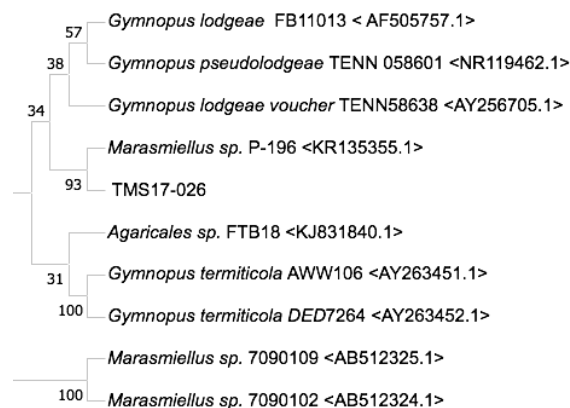
形态特征：菌盖直径 4cm，初期呈半球形，近白色，表面覆盖有淡褐色平伏鳞片，向边缘逐渐稀少。菌肉成白色，菌褶呈淡黄白色，离生，较密。菌柄长约 8cm,直径 1cm，淡黄白色，圆柱形，基部略膨大。菌环上位。夏季生长于林中地上。



序号：TMS17-026(Fig.2D)

鉴定结果：*Gymnopus sp.*

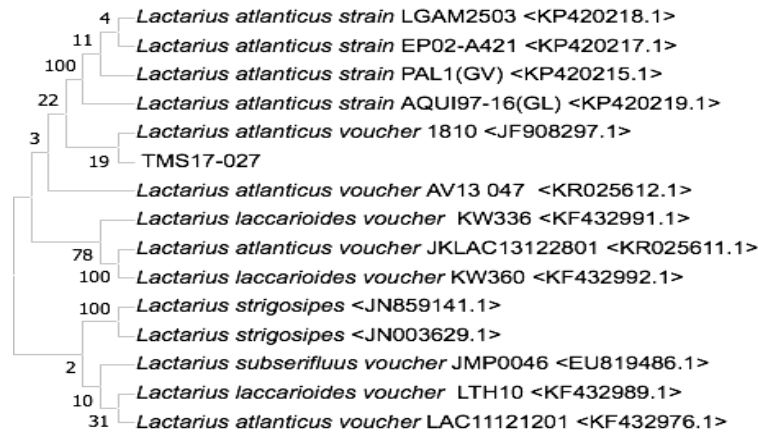
形态特征：菌盖直径 3~5cm,成熟时平展中央微突起，边缘反卷有时呈波状，表面光滑，有明显放射状条纹，近中央呈暗棕色，边缘浅粉棕色。菌肉薄黄白色。菌褶穹生或离生，稍密，薄，淡黄色。菌柄长 3~5cm，直径 2~5mm，表面白色。群生于针阔混交林中地上。



序号：TMS17-027(Fig.2E)

鉴定结果：*Lactarius atlanticus* Bon

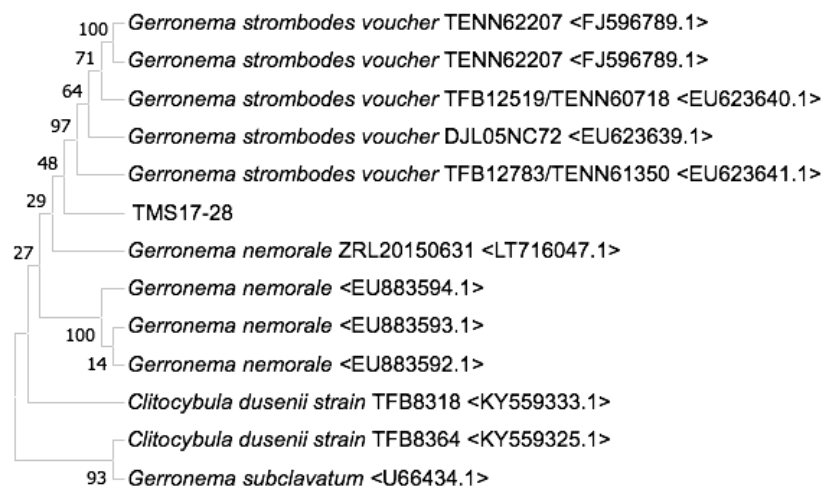
形态特征：菌盖直径 2~5cm，扁半球形后期平展，中部稍凹陷，中央有一小突起，橙褐色。菌褶直生至延生，乳汁丰富，白色，稍密。菌柄长约 4~6cm,圆柱形或上渐细，与菌盖同色或稍浅。夏季生长于阔叶林地中。



序号：TMS17-028(Fig.2F)

鉴定结果：*Gerronema strombodes* (Berk. & Mont.)

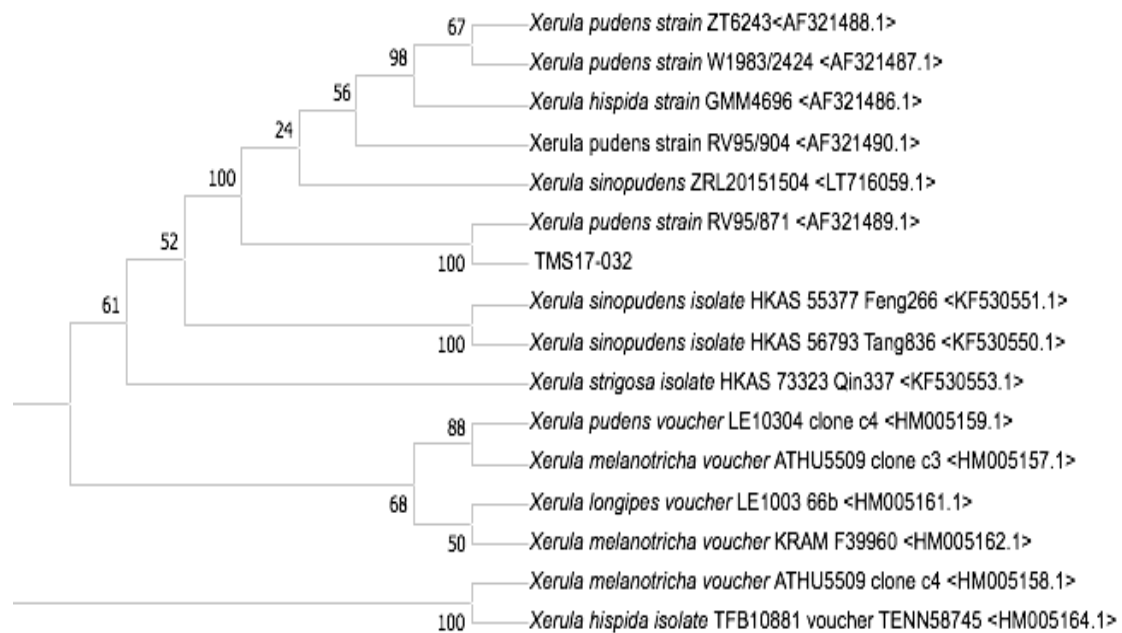
形态特征：菌盖直径 3~6cm，中央凹陷至漏斗状，边缘内卷，黄白色至淡黄色，有明显条纹。菌褶淡黄色，延生，较为稀疏，不等长，有明显分叉。菌肉黄白色，肉质。菌柄 2~6cm，上部与菌盖同色，下部白色，上部较粗，基部膨大。夏季生长于针阔混交林地中。



序号：TMS17-032(Fig.2G)

鉴定结果：*Xerula pudens* (Pers.) Singer

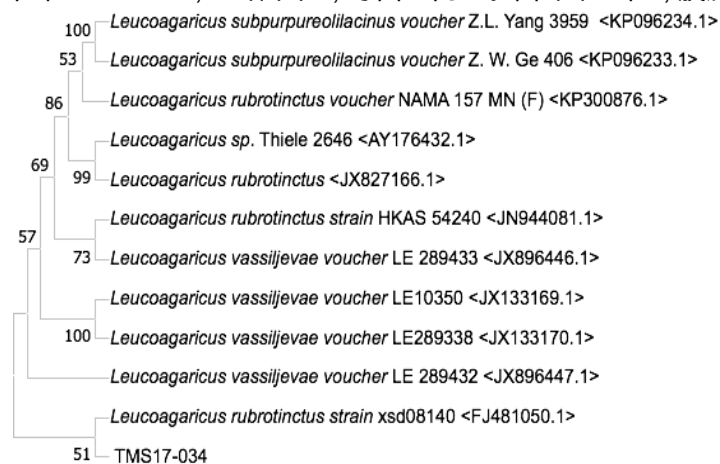
形态特征：菌盖直径 3cm，凸镜形，中央突起，菌盖表面灰褐色至黑褐色，密被灰褐色硬毛，菌肉较薄，白色。菌褶弯生至直生，白色，稍稀，不等长，边缘齿状。菌柄长 5~10cm，直径 3~6mm，圆柱形，密被黄褐色硬毛。夏季生于亚热带林中地上。



序号：TMS17-034(Fig.2H)

鉴定结果：*Leucoagaricus* sp.

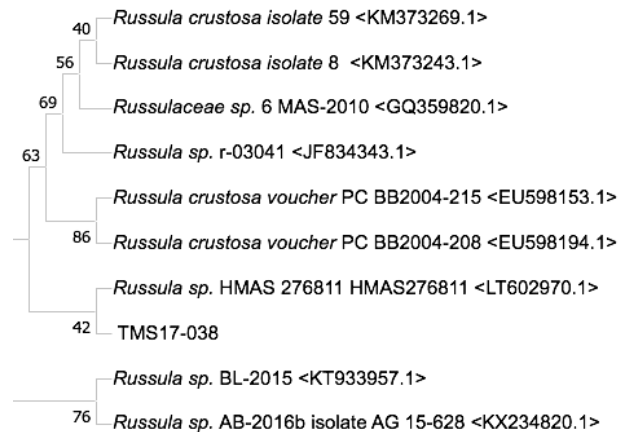
形态特征：菌盖直径 6~12cm，平展，白色或近白色，被黄褐色至灰褐色鳞片，中部颜色较深略有突起，边缘向上翻卷，菌肉白色或近白色。菌褶离生，白色至淡粉色。菌柄长 4~13cm，直径 0.5~1cm，上细下粗，与菌盖同色。菌环中上位，膜质，易脱落。夏季生长于林地中。



序号：TMS17-038(Fig.2I)

鉴定结果：*Russula* sp.

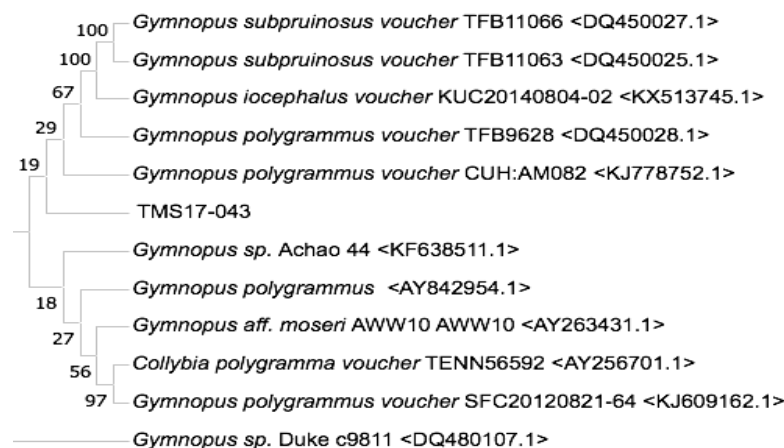
形态特征：菌盖直径约 6cm，白色至黄白色，中部稍凹陷颜色稍深，无明显条纹，表面光滑，粘；菌肉白色或灰白色，质脆；菌褶弯生，较为密集，白色，等长；菌柄长约 5cm，直径约 3cm，上下等粗，白色，成熟时中部空心；生长于阔叶林林地。



序号：TMS17-043/TMS17-065(Fig.2J)

鉴定结果：*Gymnopus polygrammus* (Mont.) J.L. Mata

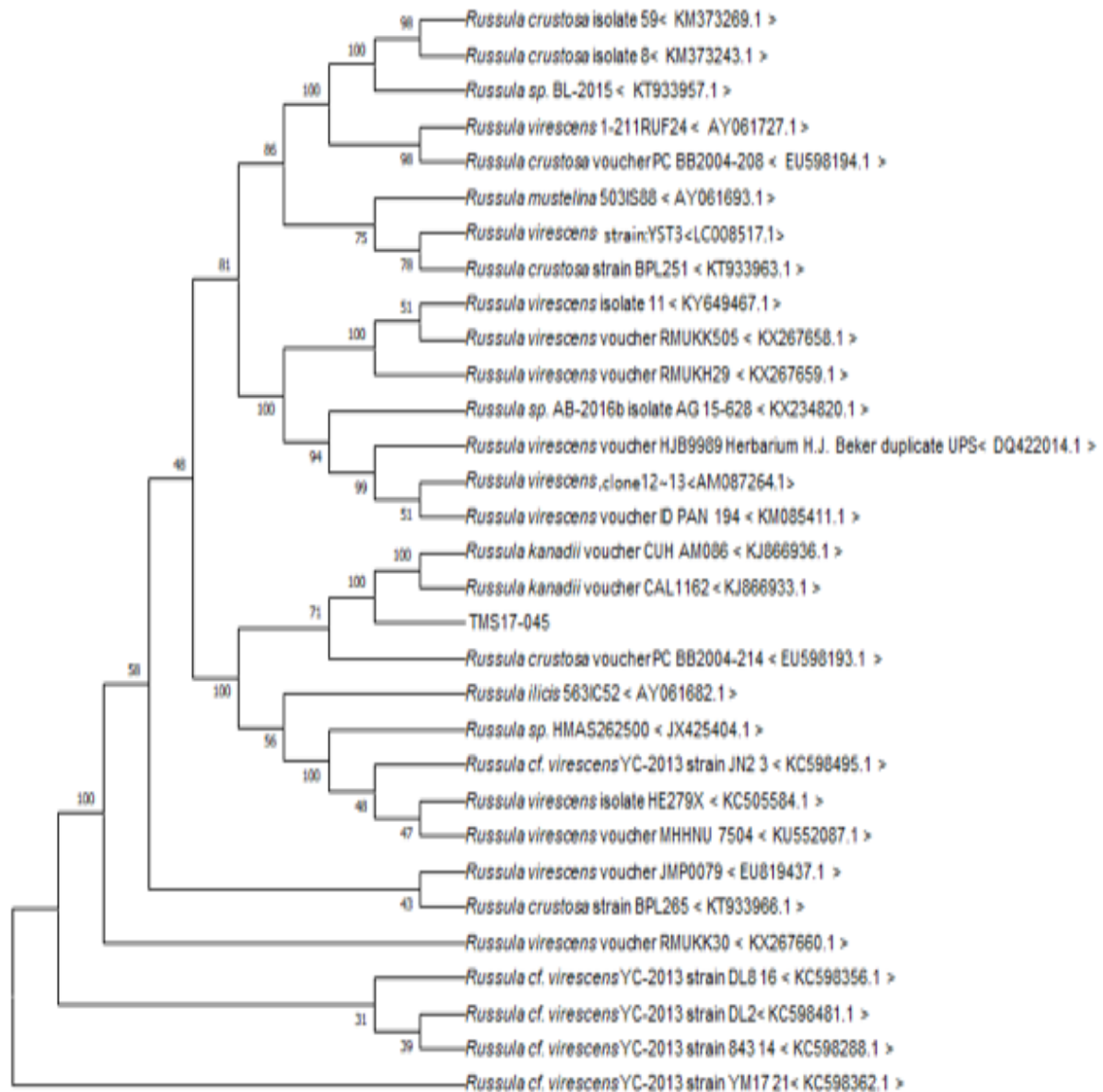
形态特征：菌盖直径 3~5cm,成熟时平展或中央稍有下凹，边缘反卷有时呈波状，表面光滑平坦，干，近中央呈暗棕色，边缘浅粉棕色。菌肉薄白色。菌褶直生至延生，密，薄，白色。菌柄长 3~5cm，直径 2~5mm，表面肉桂色至白色头酒红褐色。群生于针阔混交林中地上。



序号：TMS17-045(Fig.2K)

鉴定结果：*Russula kanadaii* A.K. Dutta & Acharya

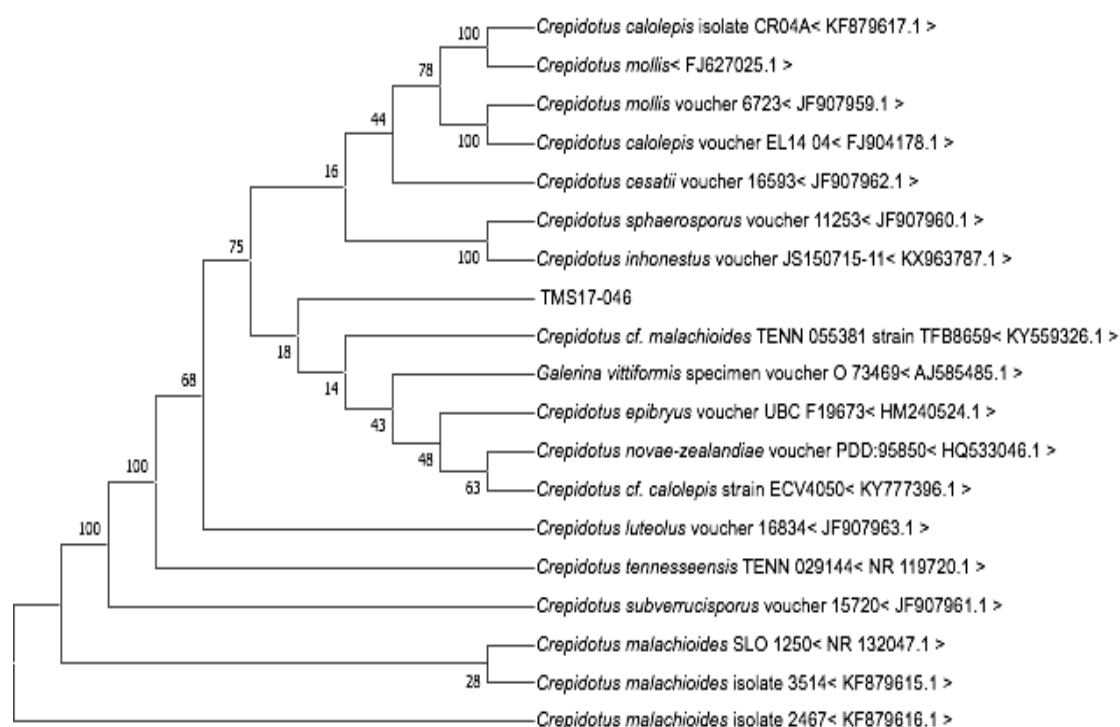
形态特征：菌盖直径约 6cm，黄白色，中部稍凹陷颜色稍深，边缘内卷有条纹，表面光滑，粘；菌肉白色或灰白色，质脆；菌褶弯生，较为密集，白色，等长；菌柄长约 5cm，直径约 3cm，上下等粗，白色，成熟时中部空心；生长于阔叶林林地。



序号：TMS17-046(Fig.2L)

鉴定结果：*Crepidotus* (Fr.) Staude

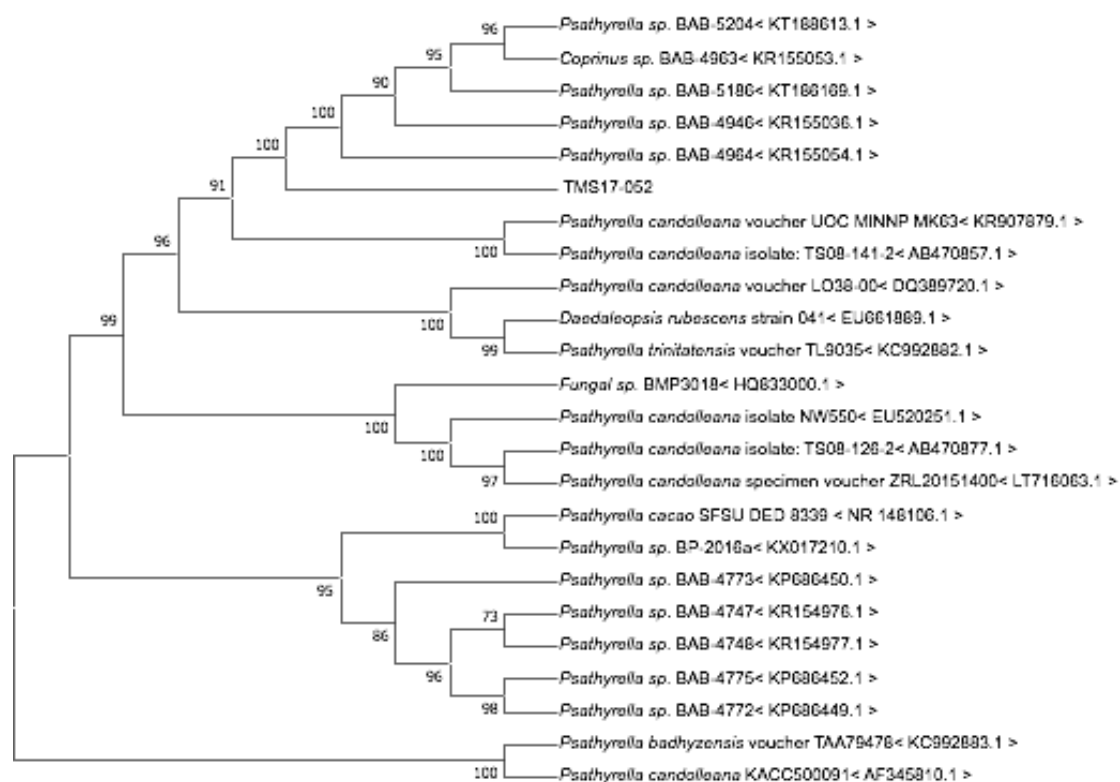
形态特征：菌盖较小，菌宽 0.5~1.2cm，扇形或是贝壳形，自然状态下白色或略带黄色肉质且菌肉较薄，干燥后全部为纯白色或灰白色，质地变硬；菌褶从基部延生而出，自然状态下为淡褐色，干燥后 则变为褐色；无菌柄，侧生，夏季生长于枯枝、腐木上。



序号：TMS17-052(Fig.3A)

鉴定结果：*Psathyrella*(Fr.) Quél. (1872)

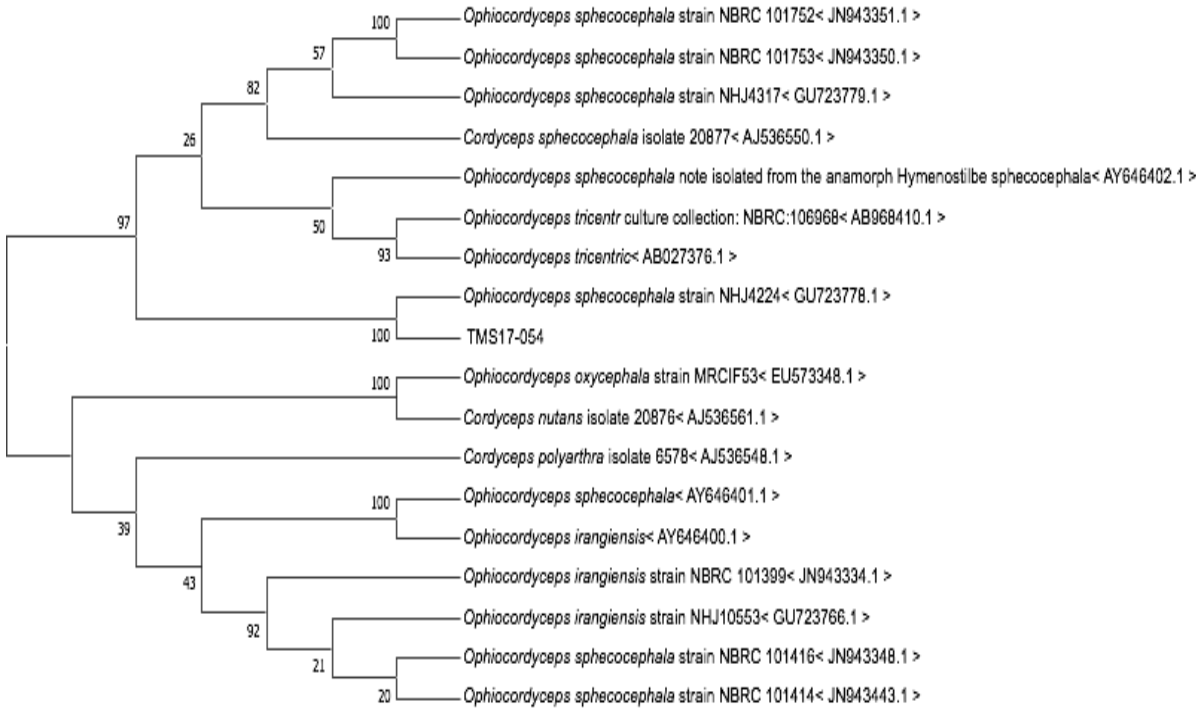
形态特征：菌盖直径 1~3cm,初期呈钟形，深褐色，菌盖边缘黄色；菌肉薄，脆，白色至灰褐色；菌褶密，直生，褐色，边缘齿状；菌柄长约 4cm，白色，直径约 8mm,圆柱形，丝光质，上下近等粗。



序号：TMS17-054(Fig.3B)

鉴定结果：*Ophiocordyceps sphecocephala* (Klotzsch ex Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora

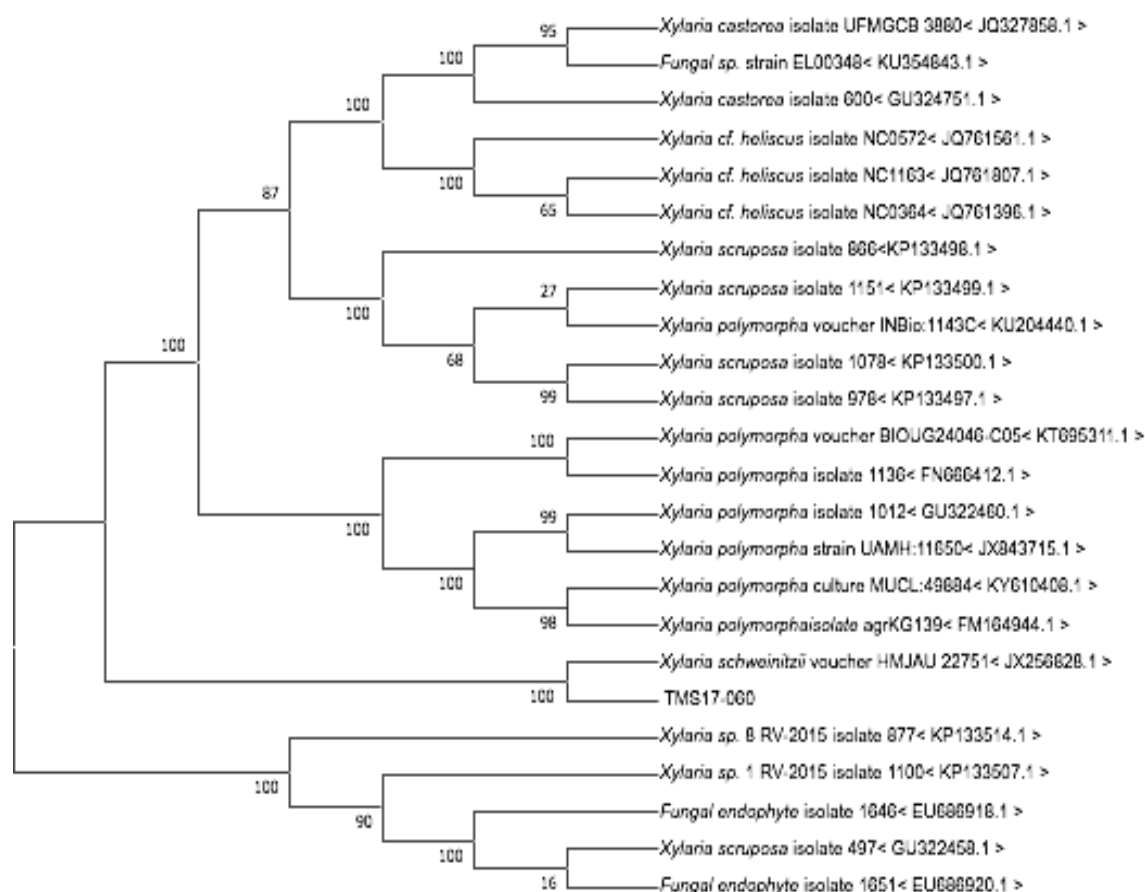
形态特征：子座由寄主胸部长出，偶尔可从同一虫体上长出 2 根子座。可育部分明显膨大，长 4~8mm，直径 1.5~2.5mm，卵形、椭圆形，黄色。不育菌柄长 5~12cm，常弯曲，淡黄色至橙黄色或黄褐色。单个寄生于黄蜂的成虫上。



序号：TMS17-060(Fig.3C)

鉴定结果：*Xylaria schweinitzii* Berk. & M.A. Curtis

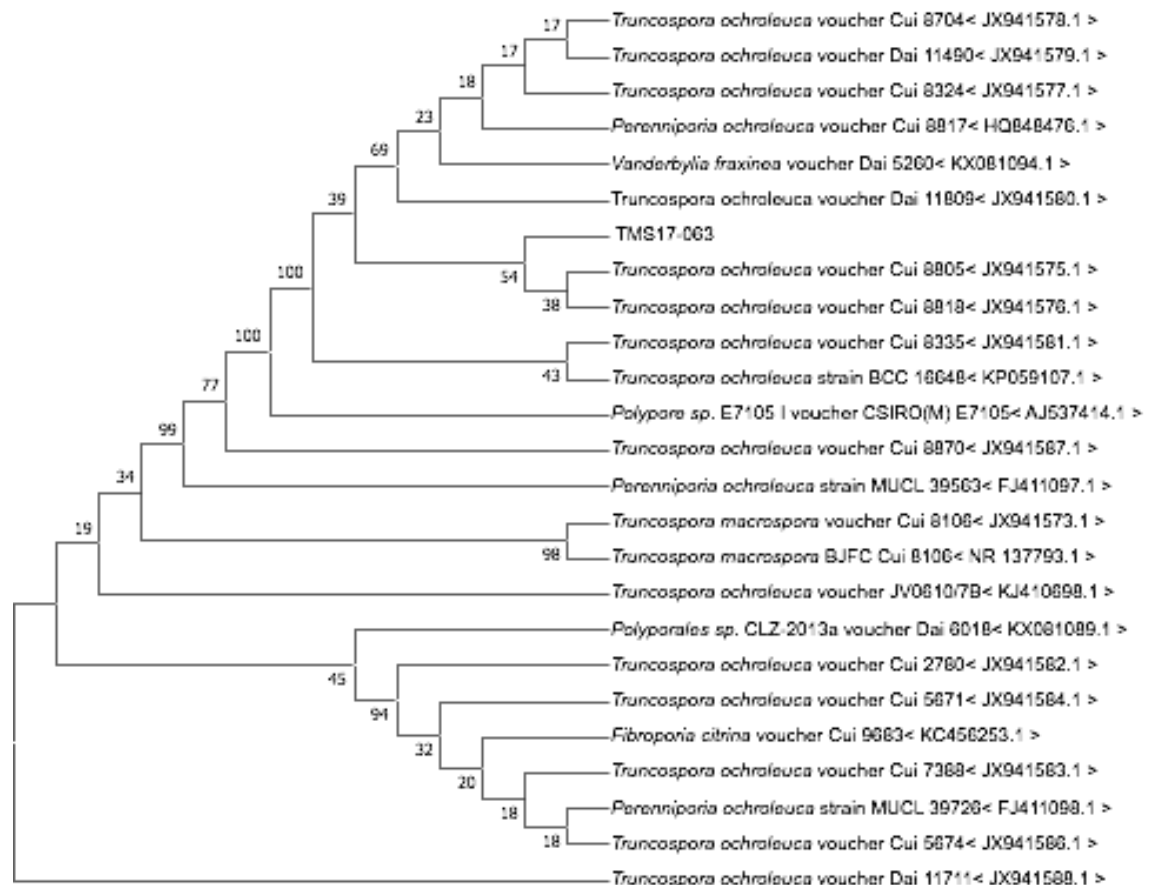
形态特征：子座高 2~6cm,直径 8~12mm，圆柱形或棒形，通常不分枝，可育顶端圆钝。子座表面黑褐色或黑色，内部白色，外表面粗糙、有皱。单生于阔叶腐木或枯树枝上。



序号：TMS17-063(Fig.3D)

鉴定结果：*Perenniporia ochroleuca* (Berk.) Ryvarden

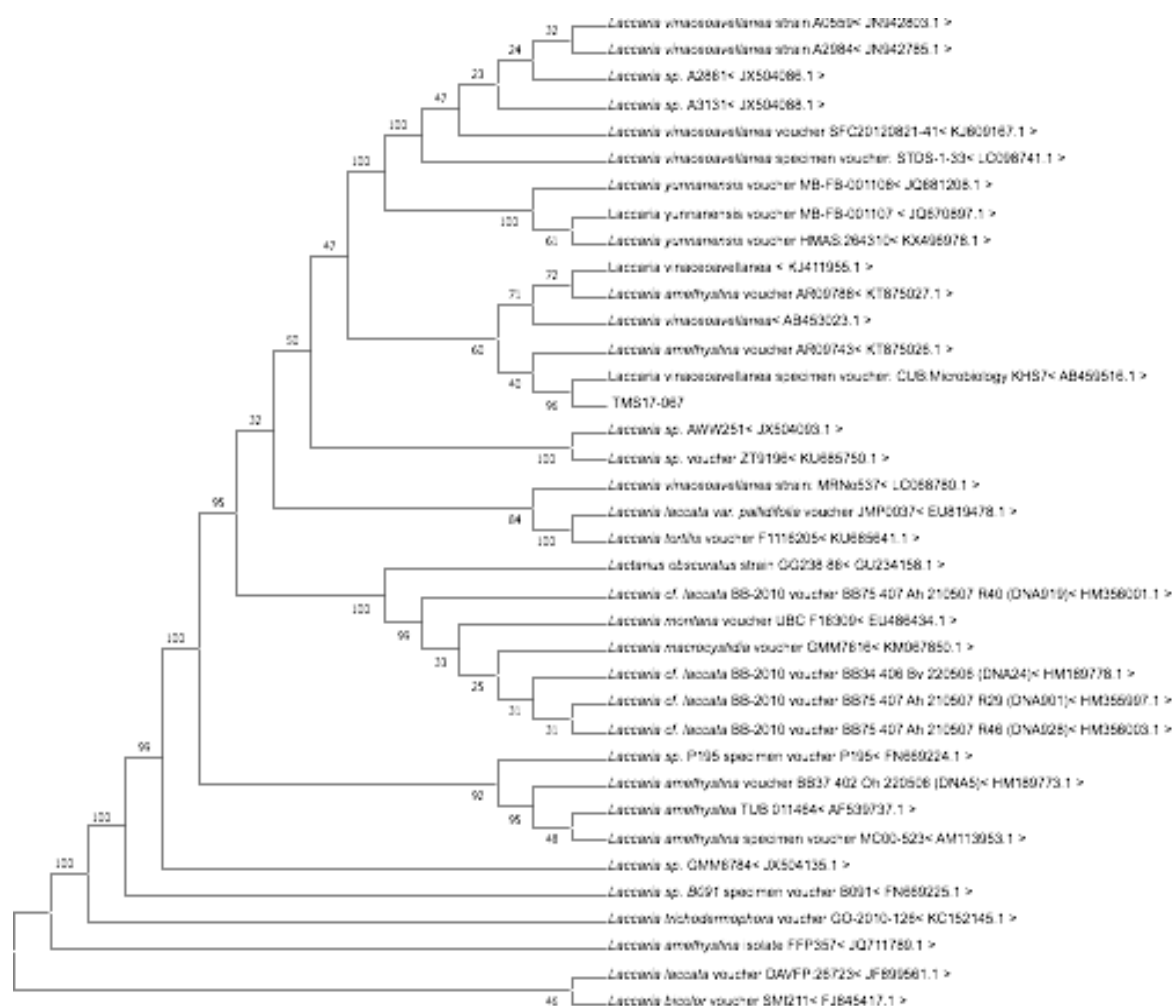
形态特征：子实体多年生，无柄，覆瓦状叠生，革质至木栓质。菌盖呈马蹄形，外伸约 1.5cm，厚约 10mm，表面奶油色至黄褐色，具明显的同心环带。孔口表面乳白色至土黄色，近圆形，每毫米 5~6 个。菌管与孔口同色，长可达 6mm。春季至秋季生于阔叶倒木上。



序号：TMS17-067(Fig.3F)

鉴定结果：*Laccaria vinaceoavellanea* Hongo

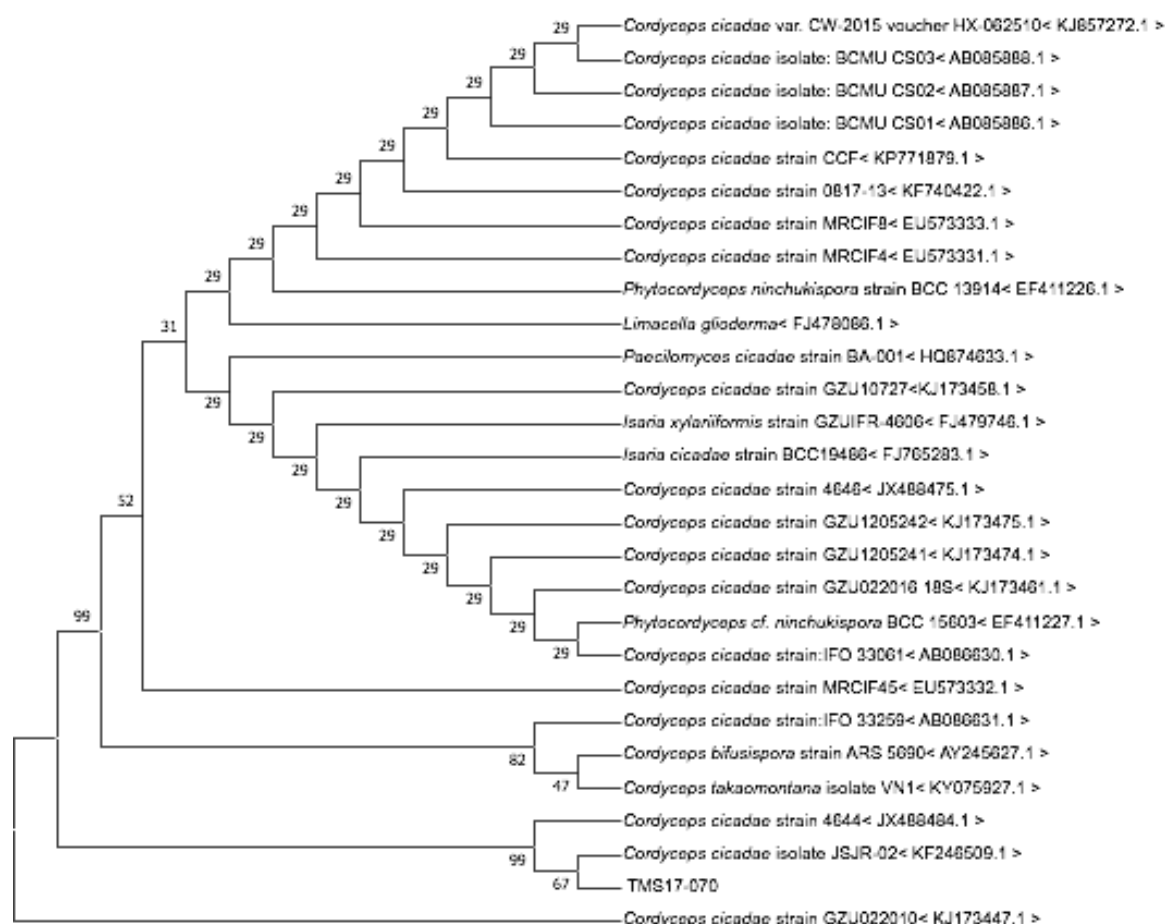
形态特征：子实体群生。肉红色至葡萄酒红色，干后褪为灰白色，菌盖直径3~9cm，中央下凹的馒头形，边缘有放射状沟纹。菌肉薄，与菌盖表面同色，无味无臭。菌柄5~8cm×0.6~0.8cm，上下等径，表面有线条，中实，坚韧。夏秋间生于林缘或林中枯枝落叶层中地上。



序号：TMS17-070(Fig.3G)

鉴定结果：*Isaria cicadae* Miq.

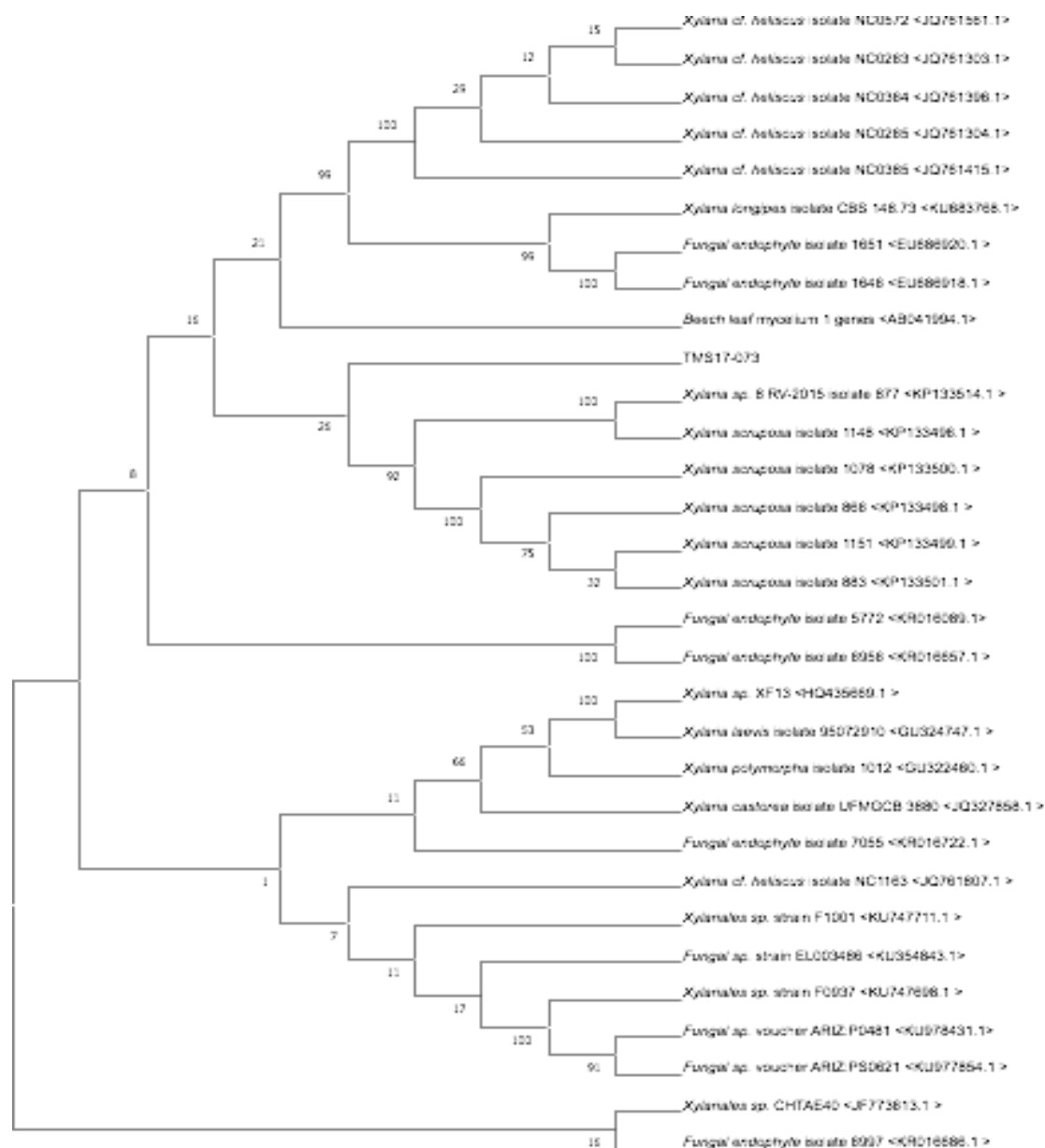
形态特征：分生孢子体由从蝉蛹头部长出的孢梗束组成，虫体表面棕黄色，为灰白色菌丝包被，孢梗束长约 1.6~6cm，分支或不分枝。上部可育部分长 5~8mm，直径 2~3mm，总体长椭圆形，长有大量白色粉末状分生孢子。不育菌柄长 1~5cm，直径 1~2mm，黄色至黄褐色。散生于疏松土壤中的蝉蛹上。



序号：TMS17-073(Fig.3H)

鉴定结果：*Xylaria scruposa* (Fr.) Fr.

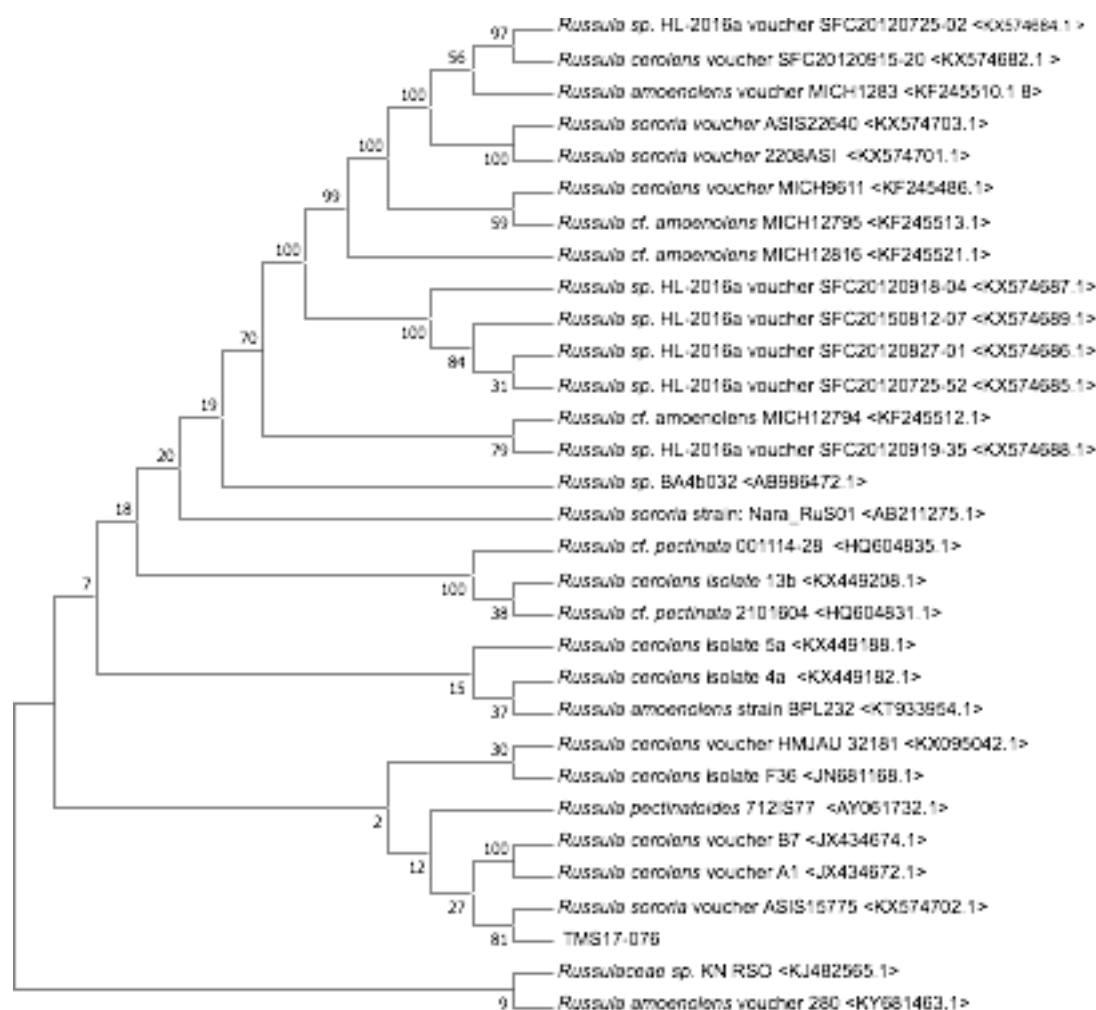
形态特征：子座较小，单根，高 2-8cm，头部长圆锥形或棒状，有时扁，顶部钝或渐尖，长 2-6.5cm，粗 0.5-1cm，扁者可达 2cm，表面暗褐色至黑色，多皱纹，内部白色，实心，后变空心。柄圆柱形，长 0.5-3.5cm，粗 0.1-0.6cm，多皱，有细绒毛，后变光滑。



序号：TMS17-076(Fig.3I)

鉴定结果：*Russula sororia* (Fr.) Romell

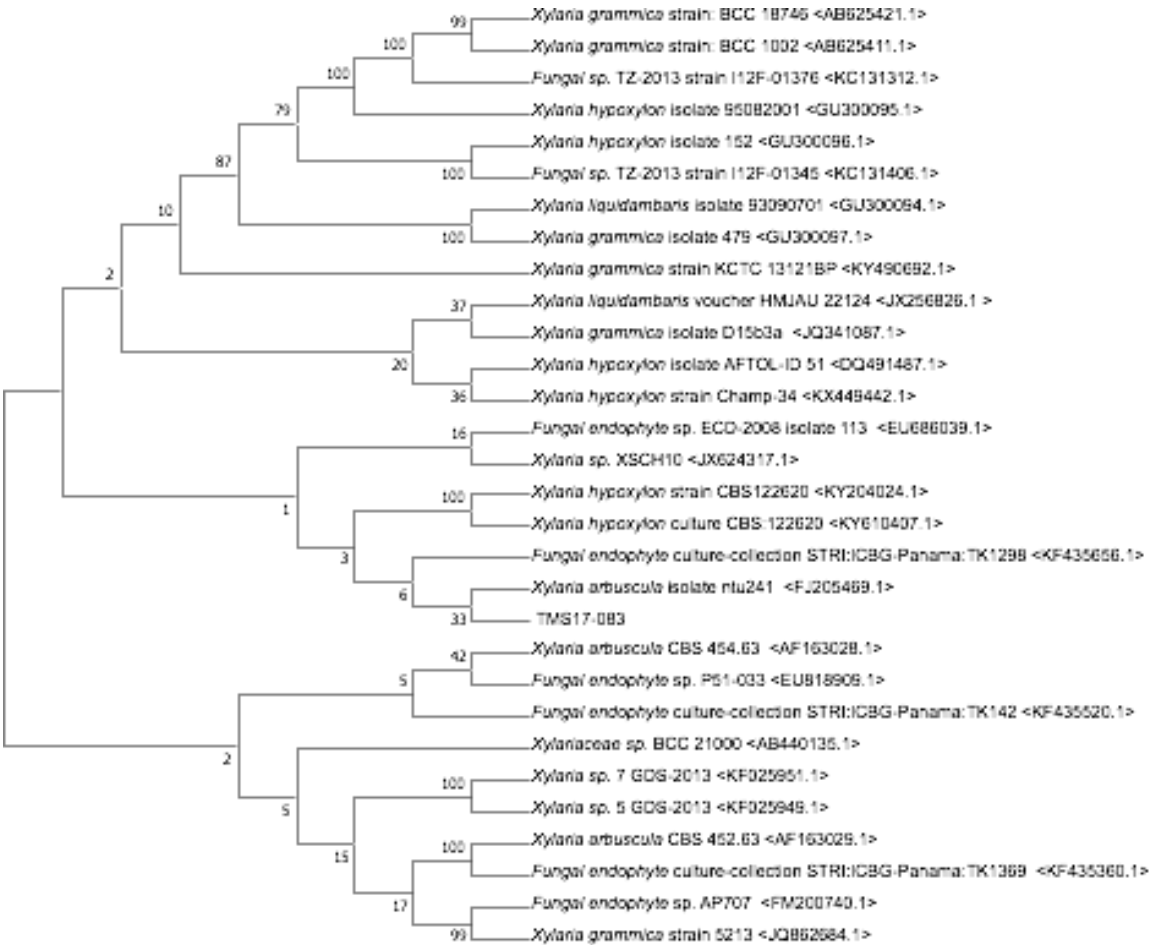
形态特征：子实体单生或群生。菌盖直径 3~10cm，初扁半球形，后平展中部下凹，土黄色或土茶褐色，中部色稍深，湿时粘，盖缘有小疣组成的棱纹，盖缘的表皮易剥离。菌肉白色，变淡灰色，味道辛辣，气味不明显。菌褶凹生或离生，密，中部宽，近缘处锐，有小褶片混生，褶间具横脉，白色，变为淡灰色。菌柄 2-8cm x 1-2.5cm，近等粗或向下渐细，白色，变淡灰色，稍被绒毛，内部松软或中空。



序号：TMS17-083(Fig.3J)

鉴定结果：*Xylaria arbuscula* Sacc.

形态特征：子座一个至数个从一果实长出，不分枝，内部白色，头部渐尖，长 5-30mm，粗 1.5-2mm，有纵向皱纹。柄长短不一，粗约 1mm，基部有绒毛。

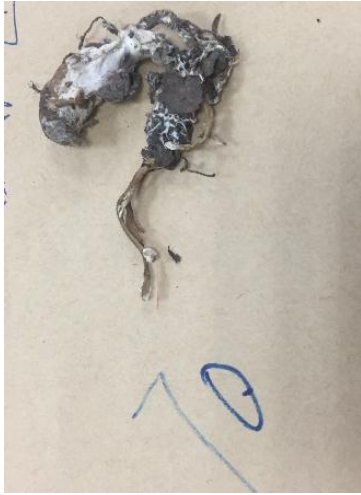
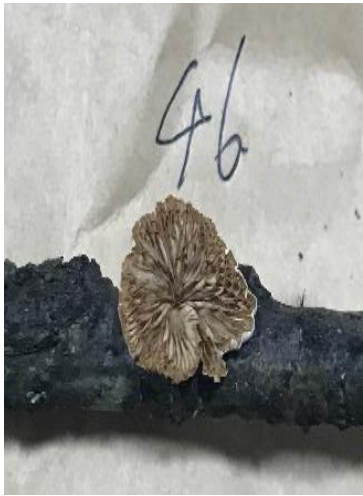


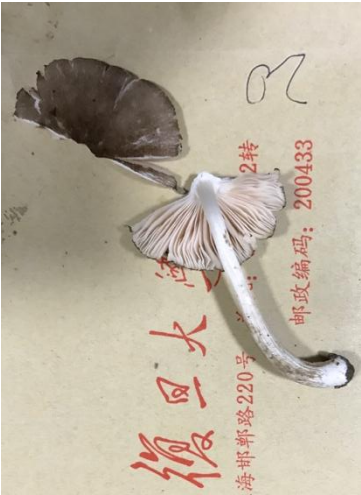
3 分析与讨论

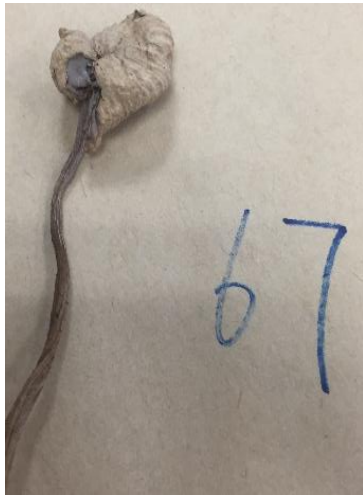
鉴定结果汇总表

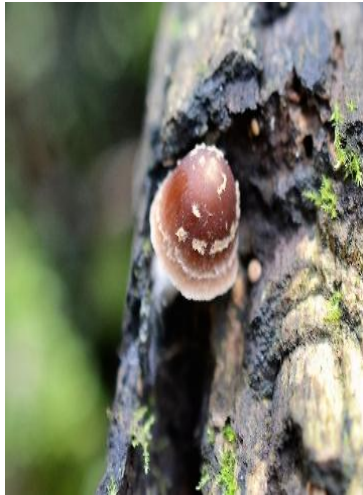
科	属	编号	鉴定结果	标本照片	自然照片
炭角菌科 <i>Xylariaceae</i>	炭角菌属 <i>Xylaria</i>	TMS17-060	<i>Xylaria</i> <i>schweinitzii</i> Berk. & M.A. Curtis		——

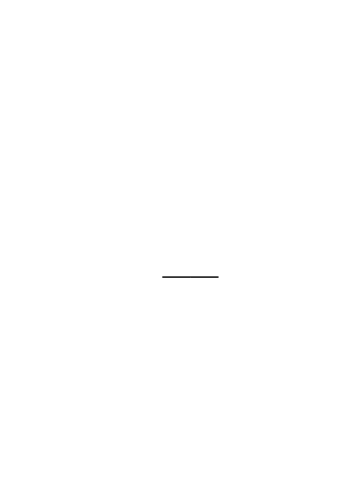
		TMS17-073	<i>Xylaria scruposa</i> (Fr.) Fr.		
		TMS17-083	<i>Xylaria arbuscula</i> Sacc.		
马鞍菌科 <i>Helvellaceae</i>	马鞍菌属 <i>Helvella</i>	TMS17-015	<i>Helvella sublactea</i>		

虫草科 <i>Cordycipitaceae</i>	棒束孢属 <i>Isaria</i>	TMS17-070	<i>Isaria cicadae</i> Miq.		
丝盖伞科 <i>Inocybaceae</i>	靴耳属 <i>Crepidotus</i>	TMS17-021	<i>Crepidotus sp.</i>		
		TMS17-046	<i>Crepidotus sp.</i>		

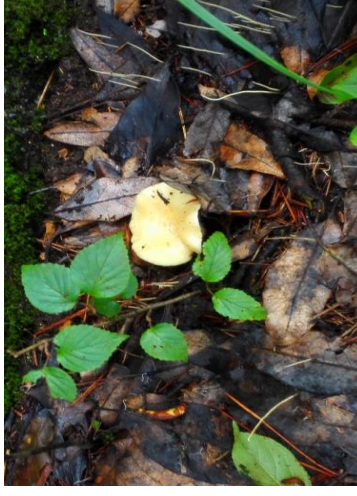
	丝盖伞属 <i>Inocybe</i>	TMS17-011	<i>Inocybe sp.</i>		
光柄菇科 <i>Pluteaceae</i>	光柄菇属 <i>Pluteus</i>	TMS17-020	<i>Pluteus iguazuensis</i> <i>Singer</i>		
		TMS17-023	<i>Pluteus sp.</i>		—

	<i>Chamaeota</i>	TMS17-010	<i>Chamaeota sinica</i> J.Z. Ying		
白蘑科 <i>Tricholomataceae</i>	蜡蘑属 <i>Laccaria</i>	TMS17-067	<i>Laccaria vinaceoavellanea</i> Hongo	 	
侧耳科 <i>Pleurotaceae</i>	亚侧耳属 <i>Hohenbuehelia</i>	TMS17-007	<i>Hohenbuehelia</i> <i>sp.</i>		

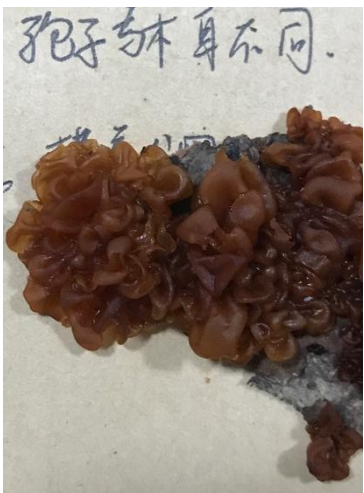
鹅膏科 Amanitaceae	鹅膏属 <i>Amanita</i>	TMS17-003	<i>Amanita ceciliae</i> (Berk. & Broome) Bas		
粉褶菌科 Entolomataceae	粉褶菌属 <i>Entoloma</i>	TMS17-009	<i>Entoloma sp.</i>		
鬼伞科 Psathyrellaceae	小脆柄菇属 <i>Psathyrella</i>	TMS17-052	<i>Psathyrella sp.</i>		

类脐菇科 <i>Omphalotaceae</i>	裸脚菇属 <i>Gymnopus</i>	TMS17-026	<i>Gymnopus sp.</i>		
		TMS17-043	<i>Gymnopus polygrammus</i> (Mont.) J.L. Mata		
马勃科 <i>Lycoperdaceae</i>	马勃属 <i>Lycoperdon</i>	TMS17-022	<i>Lycoperdon ericaeum</i> Bonord.		

蘑菇科 <i>Agaricaceae</i>	白环蘑属 <i>Leucoagaricus</i>	TMS17-034	<i>Leucoagaricus</i> <i>sp.</i>		
泡头菌科 <i>Physalacriaceae</i>	干蘑属 <i>Xerula</i>	TMS17-032	<i>Xerula pudens</i> (Pers.) Singer		
伞菌科 <i>Agaricaceae</i>	伞菌属 <i>Agaricus</i>	TMS17-024	<i>Agaricus</i> <i>sp.</i>		

小皮伞科 <i>Marasmiaceae</i>	老伞属 <i>Gerronema</i>	TMS17-028	<i>Gerronema strombodes</i> (Berk. & Mont.) Singer		
红菇科 <i>Russulaceae</i>	红菇属 <i>Russula</i>	TMS17-038	<i>Russula sp.</i>		
		TMS17-045	<i>Russula kanadii</i> A.K. Dutta & Acharya		

		TMS17-076	<i>Russula sororia</i> (Fr.) Romell		
乳菇属 <i>Lactarius</i>		TMS17-001	<i>Lactarius sp.</i>		
		TMS17-027	<i>Lactarius atlanticus</i> Bon		

锁瑚菌科 <i>Clavulinaceae</i>	锁瑚菌属 <i>Clavulina</i>	TMS17-014	<i>Clavulina</i> sp.		
多孔菌科 <i>Polyporaceae</i>	多孔菌属 <i>Polyporus</i>	TMS17-063	<i>Perenniporia ochroleuca</i> (Berk.) Ryvarden		
链担耳科 <i>Sirobasidiaceae</i>	链担耳属 <i>Sirobasidium</i>	TMS17-005	<i>Sirobasidium magnum</i> Boedijn		

3.1 鉴定过程中遇到的问题

对于在天目山采集的真菌样本,在进行必要的拍照记录后,为了实验材料的新鲜,我们基本上都是当天采集当天提取 DNA,以保证结果的真实性,而最后较高的成功率也显示了这一做法的实用性。

提取完 DNA 后剩余的材料,我们进行风干保存,带回实验室,根据 PCR 之后进行 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果是否为阴性,决定是否进行进一步的提取和 PCR。这样的做法也最大化的利用了这些样品的使用价值。

我们在得到测序结果后,对结果进行分析,对碱基干扰较大的样品重新进行反向测序,并且在最终进行建进化树的过程中,我们对于 blast 结果选取的要求较高,这些严谨的做法最后保证了我们结果的真实可靠。

在结合形态学对于结果进行分析时,我们发现,形态学的分类特征大多数还是可靠的,对于真菌的鉴定几乎可以确定到科的,但是往往进一步的鉴定上,现有的形态学特征就不是那么方便实用,为了建立更加实用完善的分类体系,需要真菌分类学届进一步的共同努力。

3.2 意义与展望

在这次实验中鉴定除了一些未在天目山发现过的大型真菌,这也无疑为进一步丰富天目山地区的真菌图鉴而做出了贡献,也可以给之后的学弟学妹们开展天目山实习工作提供一些帮助以及在小论文的实验方法上拓宽新的思路。

在进行结果整理的时候,我们发现有些真菌无法与数据库里任何一种真菌相匹配,但是根据结果和形态可以确定到属,因此推测可能是没有做过鉴定的已知种或者是新种,但是由于实验条件和信息资料的限制,我们无法对这些真菌进行进一步的确认,期待后人能将这些研究进行得更为彻底。

致谢:我们衷心地感谢王英明老师为我们小论文的命题以及工作开展给予的指导建议,为我们提供实验室资源以及相应的软硬件操作指导,感谢张文驹老师为我们提供路线指导,感谢陆凡老师为我们提供天目山的食宿交通安排。感谢复旦大学生命科学学院为我们提供这次宝贵的考察机会,感谢各位带队老师对我们的谆谆教导,也感谢所有组员和同学们。没有大家的帮助,也就没有实习工作与论文书写的圆满成功,谢谢大家。

参考文献

- [1]仇萌,邹先彪. rDNA-ITS 序列鉴定深部真菌菌种的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2011,6(2):122-125.
- [2] 田慧敏,刘铁志,文静,等. 基于形态学及 ITS 序列鉴定赤峰地区五个未知真菌[J]. 食用菌学报,2017,24(1):21~26.
- [3]张国广,邹金美,郑琳,等. 一株野生大型真菌的 ITS 分析及生物学特征研究[J]. 云南民族大学学报,2010,19(6):395~399.
- [4]朱炳根.南京紫金山大型真菌资源生态环境及分类鉴定[J]. 南京农专学报,2003,19(1):6~14
- [5] Arun Kumar DUTTA, Soumitra PALOI, Prakash PRADHAN, et al. A new species of Russula (Russulaceae) from India based on morphological and molecular (ITS sequence) data[J]. Turkish Journal of Botany, (2015) 39: 850-856.
- [6]袁生.天目山微生物学野外实习手册[M].高等教育出版社, 2010.
- [7]顾新伟,何伯伟.浙南山区大型真菌[M].浙江:浙江科学技术出版社, 2012.
- [8]李玉,李泰辉,杨祝良,等. 中国大型菌物种资源图鉴[M]. 中原农民出版社,2015.
- [9] Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.



Fig.1 A.TMS17-001 B.TMS17-003 C.TMS17-005 D.TMS17-007 E.TMS17-009
F.TMS17-010 G.TMS17-011 H.TMS17-014 I.TMS17-015 J.TMS17-020 K.TMS17-021
L.TMS17-022



Fig.2 A.TMS17-023 B.TMS17-024 C.TMS17-025 D.TMS17-026 E.TMS17-027
F.TMS17-028 G.TMS17-032 H.TMS17-034 I.TMS17-038 J.TMS17-043 K.TMS17-045
L.TMS17-046



Fig.3 A.TMS17-052 B.TMS17-054 C.TMS17-060 D.TMS17-063 E.TMS17-066
F.TMS17-067 G.TMS17-070 H.TMS17-073 I.TMS17-076 J.TMS17-083