

药用多孔菌 DNA 条形码鉴定研究

汤欢¹ 苏燕燕¹ 雷志勇² 李志明² 李西文¹

(1 中国中医科学院中药研究所, 中药鉴定与安全性检测评估北京市重点实验室, 北京, 100700; 2 北京千菌方菌物科学研究院, 北京, 100005)

摘要 目的: 筛选采用 DNA 条形码技术鉴定药用多孔菌的有效条形码及该方法的可行性。方法: 对 29 种药用多孔菌的 69 份样品进行 DNA 提取, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 ITS 序列并进行双向测序, 去除低质量区和引物区, 得到 ITS 序列, 通过 BLAST 比对及基于 K2P 遗传距离构建系统聚类 NJ 树开展 ITS 鉴定效率评价。结果: 经过优化的 DNA 提取方法, 可对所有样品成功提取到足量 DNA, PCR 扩增产物测序并经过序列拼接剪切后均能得到高质量 ITS 序列; 物种内 ITS 最大遗传距离均远小于物种间最小遗传距离; 基于 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 鉴定效率达到 100%; 基于 K2P 遗传距离构建 NJ 树, 结果显示相同物种均聚为一支。结论: DNA 条形码技术可以对多孔菌进行快速准确鉴定, ITS 序列可作为药用多孔菌有效候选 DNA 条形码。

关键词 药用多孔菌; DNA 条形码; 真菌; ITS

Identification of medicinal polypore using DNA barcoding

Tang Huan¹, Su Yanyan¹, Lei Zhiyong², Li Zhiming², Li Xiwen¹

(1 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2 Beijing Qianjunfang Mycological Research Institute, Beijing 100005, China)

Abstract Objective: To study the feasibility of applying DNA barcoding technique to identify medicinal polypore. **Methods:** The genomic DNAs were extracted from 69 samples, and the ITS sequences were amplified and bidirectionally sequenced. All the sequences were assembled. The genetic distances were computed by Kimura 2-parameter (K2P) model and Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was constructed. **Results:** The maximum intraspecific genetic distance of each species were all less than the minimum interspecific genetic distance. The ITS sequences were identified using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) method in the GenBank database. The ITS sequences of each species were clustered into one clade respectively using NJ tree method. **Conclusion:** The ITS sequence can be used as a candidate DNA barcode of medicinal polypore.

Key Words Medicinal polypore; DNA barcoding; Fungi; ITS sequence

中图分类号: R282.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.005

多孔菌是子实体呈孔状且质地革质至木质的一类大型担子菌, 属于寄生或腐生生物, 主要生长在木材上, 与高等绿色植物相比, 多不常见。多孔菌包括多种大型药用真菌, 《神农本草经》中就有以灵芝、茯苓、猪苓、雷丸等多孔菌药用的记载。人类认识和利用真菌的历史在西方已有 3 500 年以上, 我国则超过 6 000 年, 但真菌分类学的产生和发展却是在近 200 年左右。瑞典博物学家林奈在 *Species Plantarum*^[1] 中, 首次记载了 8 种多孔菌。Christiaan Hendrik Persoon^[2] 将多孔菌归入裸果纲 (Gymnocarpi) 褶体目 (Hymenothii) 菇型类 (Agaricoidei) 中。Elias Magnus Fries^[3] 在 Christiaan Hendrik Persoon 的分类系统基础上, 采用新的分类标准, 进行了新的科属划

分。我国的多孔菌研究起步较晚, 基础薄弱, 胡先骕先生将其最初采集的多孔菌送往国外进行物种鉴定^[4]。邓叔群^[5] 和戴芳澜^[6] 先后记载中国多孔菌有 50 个属。卯晓岚^[7]、赵继鼎、张小青^[8-9] 等对我国的灵芝科、多孔菌科真菌也做了大量深入的研究。与绿色植物以花和果实作为主要鉴定器官不同, 传统鉴定真菌的主要依据是菌丝和孢子的特征, 需要鉴定者有多年的经验积累, 主观性较强。同时多孔类真菌亲缘关系和进化趋向比较复杂, 用传统方法进行鉴定所需周期长, 鉴定方法重现性较差。因此, 急需寻求一种客观且快速高效的鉴定方法。

DNA 条形码技术摆脱了传统形态鉴定方法依

基金项目: 重大新药创制国家科技重大专项 (编号: 2014ZX09304307001-014; 2014ZX09301308-007); 国家科技支撑计划 (编号: 2015BAI05B02); 中央研究院所公益项目 (编号: ZXKT15029, ZZ2014029)

作者简介: 汤欢 (1986—), 男, 博士研究生, 研究方向: 经典植物分类及中药材分子鉴定

通信作者: 李西文 (1978—), 男, 博士, 副研究员, 电话/传真: (010) 84084107, E-mail: xwli@icmm.ac.cn

赖长期经验的束缚,鉴定快速准确,易于实现标准化,是传统生物鉴定方法的有效补充和重大突破^[10]。真菌是数量仅次于昆虫的第二大真核生物类群,与动、植物相比,真菌 DNA 条形码研究鲜有报道。为此,国际生命条形码组织专门为其设立了工作组,并成立了国际真菌条形码专业委员会以组织协调国际真菌 DNA 条形码相关研究工作。DNA 条形码技术可准确辨别形态分类难以区分的真菌,任何生长发育时期的真菌均可使用该技术进行鉴定,是传统鉴定方法所不能比拟的^[11]。因真菌多寄生或腐生,没有叶绿体,适用于植物叶绿体的 *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH* 序列不适用于真菌的鉴定,Conrad L Schoch 等^[12]经过大量研究,推荐使用细胞核中的 ITS 基因片断作为真菌的条形码序列。目前,该体系已广泛应用于各类植物及真菌的鉴定中,均表现出较强的鉴定能力^[13-32]。本研究运用 DNA 条形码技术对多种药用多孔菌进行鉴定研究,进一步评估 ITS 作为 DNA 条形码鉴定多孔类真菌的可行性,以期筛

选多孔真菌通用条形码,为实现多孔类真菌的快速准确鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究共涉及 29 种药用多孔菌的 69 份样品。其中,51 份来自北京陈康林野生药用真菌研究院,5 份来自大兴安岭漠河县,5 份来自西藏林芝,3 份来自四川康定,1 份来自四川攀枝花,4 份来自市场购买,以上样品经过大型真菌分类专家卯晓岚教授鉴定,详细信息见表 1。本研究中的 69 份样品均获得了 ITS 序列,其序列均已提交至 GenBank。另外,从 GenBank 下载了这 29 个物种的 ITS 序列。样品信息见表 1。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 提取、PCR 扩增和测序 样品 DNA 提取:用乙醇棉擦拭真菌后刮去真菌表面,取靠近里面的组织(木耳等不适宜刮的真菌仅用乙醇棉擦拭后即可取样),用刀片切成细块,称取样品约 40 mg。用高通量组织研磨仪(Sceintz Biotech Co. ,

表 1 实验所用样品信息表

基原物种	所属科	样品数	采集地	GenBank 登录号
香菇 <i>Lentinula edodes</i>	多孔菌科	6	云南	KU863030-35, * EU021463
桦褶孔菌 <i>Lenzites betulinus</i>	多孔菌科	7	海南	KU863036-42, * KP004982
漆柄小孔菌 <i>Microporus vernicipes</i>	多孔菌科	4	广东	KU863043-46, * KP715551
豹皮新香菇 <i>Neolentinus lepideus</i>	多孔菌科	1	黑龙江	KU863047, * KP004924
革耳 <i>Panus rudis</i>	多孔菌科	4	西藏	KU863048-51, * KP135329
漏斗多孔菌 <i>Polyporus arcularius</i>	多孔菌科	2	云南	KU863052-53, * KR183787
褐多孔菌 <i>Polyporus badius</i>	多孔菌科	1	四川	KU863054, * KC572006
猪苓 <i>Polyporus umbellatus</i>	多孔菌科	1	吉林	KU863055, * HQ225502
血红密孔菌 <i>Pycnoporus coccineus</i>	多孔菌科	3	吉林	KU863056-58, * KP255839
槐耳菌 <i>Trametes cubensis</i>	多孔菌科	1	吉林	KU863059, * JN164922
雅致栓菌 <i>Trametes elegans</i>	多孔菌科	1	吉林	KU863060, * KC848264
偏肿栓菌 <i>Trametes gibbosa</i>	多孔菌科	1	黑龙江	KU863061, * AY684176
槐栓菌 <i>Trametes robinioiphila</i>	多孔菌科	4	辽宁	KU863062-65, * HQ876608
香栓菌 <i>Trametes suaveolens</i>	多孔菌科	1	吉林	KU863066, * FJ810188
毛栓菌 <i>Trametes trogii</i>	多孔菌科	1	黑龙江	KU863067, * HM050415
云芝 <i>Trametes versicolor</i>	多孔菌科	1	吉林	KU863068, * HM008935
冷杉附毛孔菌 <i>Trichaptum abietinum</i>	多孔菌科	1	四川	KU863069, * AY781273
一色齿毛菌 <i>Cerrena unicolor</i>	多孔菌科	3	四川	KU863070-72, * KC176316
茶色拟迷孔菌 <i>Daedaleopsis confragosa</i>	多孔菌科	7	黑龙江	KU863073-79, * JX569731
宽鳞大孔菌 <i>Favolus squamosus</i>	多孔菌科	1	四川	KU863080, * FJ810128
木蹄层孔菌 <i>Fomes fomentarius</i>	多孔菌科	2	四川	KU863081-82, * JX183720
树舌灵芝 <i>Ganoderma applanatum</i>	灵芝科	1	安徽	KU863083, * KC581319
白肉灵芝 <i>Ganoderma leucocontextum</i>	灵芝科	5	西藏	KU863084-88, * KM396272
灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	灵芝科	1	海南	KU863089, * FJ940919
松杉灵芝 <i>Ganoderma tsugae</i>	灵芝科	5	黑龙江	KU863090-94, * JQ781853
粉肉拟层孔菌 <i>Fomitopsis cajanderi</i>	拟层孔菌科	1	四川	KU863095, * DQ491413
红缘拟层孔菌 <i>Fomitopsis pinicola</i>	拟层孔菌科	1	吉林	KU863096, * GU731552
皱皮孔菌 <i>Ischnoderma resinosum</i>	拟层孔菌科	1	吉林	KU863097, * KJ140539
硫磺菌 <i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>miniatus</i>	拟层孔菌科	1	吉林	KU863098, * AB308169

注:GenBank 登录号前面标有* 的 29 条序列均为从 GenBank 下载序列。

China), 在 50 Hz 频率下研磨 200 s, 加入核分离液 (100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.7 mmol/L NaCl, 2% PVP-40, 0.4% β -巯基乙醇)^[33] 清洗 2~4 次 (800 μ L/次) 至上清液无色, 用移液枪小心吸去上清液, 留沉淀, 加裂解液后, 置于 56 $^{\circ}$ C 水浴过夜 (水浴约 8 h), 再采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China) 提取样品总 DNA。详细操作步骤参见 2015 版中国药典“中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则”及试剂盒说明书。

PCR 扩增和测序: 采用 ITS 序列通用引物 ITS5F/4R 进行扩增, ITS 序列 PCR 扩增正向引物序列为 ITS5F: 5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3; 反向引物序列为 ITS4R: 5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3。PCR 反应体系: 以 25 μ L 为参照, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix (Aidlab Biotech Co., China) 12.5 μ L, 正向和反向引物各 1.0 μ L (2.5 μ mol/L), 模板 DNA 量为 50~100 ng (约 4.0 μ L 所提的 DNA 液), 再用 dd H₂O 补至 25 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 再进行 30 个循环 (每个循环均为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、50 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s); 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 情况, 对出现清晰目的条带的样品进行纯化后, 采用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co., USA) 进行双向测序。

1.2.2 数据处理 使用 CodonCode Aligner V3.7.1 (CodonCode Co., USA) 对测序序列进行质量分析和校对拼接, 去除低质量区, 导出序列。运用 MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, USA) 软件将 98 条 (包括实验的 69 条和下载的 29 条) ITS 序列进行序列分析, 并基于 Kimura 2-parameter model (K2P) 计算种内和种间遗传距离, 用邻接法 (Neighbor Joining, NJ) 构建系统聚类树, 并用自举检验法 Bootstrap 1 000 次检验各分支的支持率^[34]。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取及 PCR 扩增 样品 DNA 提取是开展 DNA 条形码研究的首要环节。药用多孔菌中普遍含有大量的次生代谢产物, 采用核分离液洗涤后, 可去除细胞核中大部分的多糖、多酚等物质, 提高 DNA 纯度。将 69 份样品用高通量组织研磨仪研磨后, 用核分离液洗涤 2~4 次 (800 μ L/次), 至上清液无色为止, 再按 DNA 提取试剂盒的操作步骤提取样品 DNA, 均能得到高质量的 DNA, 其 PCR 产物经

电泳后均能显示单一目的条带, 扩增效率 100%。

2.2 遗传距离分析 29 种药用多孔菌的 98 条 ITS 序列的种内和种间遗传距离见表 2。由表 2 可知: 各物种的种内最大遗传距离均远小于物种间最小遗传距离, 各物种在遗传距离上差异明显。

2.3 BLAST 分析 将实验获得的 69 条药用多孔菌的 ITS 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 结果见表 3: 在 29 种药用多孔菌中, 19 个物种的最大 BLAST 相似度为 100%, 10 个物种的最大 BLAST 相似度为 99%, 在 69 条序列中, 只有漆柄小孔菌的 1 条序列的最大 BLAST 相似度为 98%。BLAST 相似度不是 100% 的序列中, 其最大 BLAST 相似度对应的物种均为所鉴定的基原物种。

2.4 NJ 树分析 运用 K2P 模型, 选取实验获得的 69 条和从 GenBank 下载的 29 条 ITS 序列, 以邻接 (NJ) 法构建系统聚类树。见图 1。结果显示, 各物种的 ITS 序列均聚为一支。由此可知, 运用 ITS 序列能准确鉴定此类药用多孔菌, 具有较强的鉴定能力。

3 讨论

3.1 DNA 提取 药用多孔菌的子实体中含有较多的多酚、多糖类物质, 研磨时, 多酚极易氧化成醌类, 使提取出的 DNA 液带颜色, 在纯化过程中很难去除, 影响后续 PCR 反应。本研究通过多次反复实验发现, 对 DNA 提取试剂盒操作步骤进行优化后能获得高质量 DNA。具体优化步骤如下: 1) 取样: 刮去样品表皮, 称取子实体里面的组织; 2) 洗涤: 向每管研磨好的样品中加核分离液清洗 2~4 次 (800 μ L/次) 至上清液无色, 提高所提 DNA 的纯净度; 3) 水浴: 加裂解液后放入 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴约 8 h, 使样品细胞中的 DNA 充分溶出。

3.2 鉴定 药用多孔菌形态多种多样, 在不同发育时期的形态差异较大, 运用传统鉴定方法对其进行鉴定较困难。并且, 适用于植物叶绿体的 rbcL、matK、psbA-trnH 序列不适用于叶绿体已退化的真菌。因此, 本研究选用细胞核中的 ITS 序列作为 DNA 条形码, 鉴定药用多孔菌。本研究中, 从不同产地收集的 69 份样品均可稳定获得其 ITS 序列, 各样品种内最大遗传距离均远小于种间最小遗传距离, 所有样品在 GenBank 数据库中均能 BLAST 比对到正确的物种。同时, NJ 树结果显示各物种的 ITS 序列均聚为一支。由此可知, 运用 ITS 序列能准确鉴定此类药用多孔菌, 具有较强的鉴定能力。

表 2 药用多孔菌种内及种间遗传距离表

基原物种	种内 K2P 遗传距离(平均)	种间 K2P 遗传距离(平均)
香菇 <i>Lentinula edodes</i>	0 ~ 0.0105 (0.0039)	0.2956 ~ 0.4455 (0.3604)
桦褶孔菌 <i>Lenzites betulinus</i>	0 ~ 0.0071 (0.0034)	0.0496 ~ 0.3722 (0.2000)
漆柄小孔菌 <i>Microporus vernicipes</i>	0 ~ 0.0214 (0.0091)	0.1296 ~ 0.3904 (0.2158)
豹皮新香菇 <i>Neolentinus lepideus</i>	0.0018	0.2069 ~ 0.3847 (0.2632)
革耳 <i>Panus rudis</i>	0 ~ 0.0047 (0.0022)	0.1969 ~ 0.4171 (0.3047)
漏斗多孔菌 <i>Polyporus arcularius</i>	0.0099 ~ 0.0536 (0.0326)	0.1044 ~ 0.3833 (0.2013)
褐多孔菌 <i>Polyporus badius</i>	0.0156	0.1733 ~ 0.4105 (0.2423)
猪苓 <i>Polyporus umbellatus</i>	0.0050	0.2097 ~ 0.4235 (0.2716)
血红密孔菌 <i>Pycnoporus coccineus</i>	0 ~ 0.0053 (0.0018)	0.0621 ~ 0.3441 (0.1868)
槐耳菌 <i>Trametes cubensis</i>	0	0.0762 ~ 0.3595 (0.1858)
雅致栓菌 <i>Trametes elegans</i>	0	0.0621 ~ 0.3232 (0.1705)
偏肿栓菌 <i>Trametes gibbosa</i>	0	0.0496 ~ 0.3631 (0.1922)
槐栓菌 <i>Trametes robiniophila</i>	0 ~ 0.0058 (0.0034)	0.1020 ~ 0.3711 (0.1959)
香栓菌 <i>Trametes suaveolens</i>	0	0.0493 ~ 0.3345 (0.1736)
毛栓菌 <i>Trametes trogii</i>	0	0.1198 ~ 0.3484 (0.2004)
云芝 <i>Trametes versicolor</i>	0.0086	0.0493 ~ 0.3315 (0.1741)
冷杉附毛孔菌 <i>Trichaptum abietinum</i>	0	0.2828 ~ 0.4375 (0.3345)
一色齿毛菌 <i>Cerrena unicolor</i>	0	0.1969 ~ 0.3904 (0.3081)
茶色拟迷孔菌 <i>Daedaleopsis confragosa</i>	0 ~ 0.0091 (0.0040)	0.1035 ~ 0.3725 (0.1973)
宽鳞大孔菌 <i>Favolus squamosus</i>	0.0458	0.1703 ~ 0.4375 (0.2606)
木蹄层孔菌 <i>Fomes fomentarius</i>	0 ~ 0.0055 (0.0037)	0.1185 ~ 0.3291 (0.1972)
树舌灵芝 <i>Ganoderma applanatum</i>	0	0.0572 ~ 0.3508 (0.1838)
白肉灵芝 <i>Ganoderma leucocontextum</i>	0 ~ 0.0017 (0.0006)	0.0070 ~ 0.3747 (0.1842)
灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	0	0.0562 ~ 0.3859 (0.1823)
松杉灵芝 <i>Ganoderma tsugae</i>	0 ~ 0.0032 (0.0002)	0.0070 ~ 0.3781 (0.1815)
粉肉拟层孔菌 <i>Fomitopsis cajanderi</i>	0.0052	0.1167 ~ 0.3700 (0.2521)
红缘拟层孔菌 <i>Fomitopsis pinicola</i>	0.0018	0.1167 ~ 0.3905 (0.2518)
皱皮孔菌 <i>Ischnoderma resinosum</i>	0	0.2010 ~ 0.3823 (0.2695)
硫磺菌 <i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>miniatus</i>	0.0058	0.2519 ~ 0.4455 (0.3285)

表 3 BLAST 比对结果表

基原物种	BLAST 相似度	基原物种	BLAST 相似度
香菇 <i>Lentinula edodes</i>	99% ~ 100%	云芝 <i>Trametes versicolor</i>	99%
桦褶孔菌 <i>Lenzites betulinus</i>	99% ~ 100%	冷杉附毛孔菌 <i>Trichaptum abietinum</i>	100%
漆柄小孔菌 <i>Microporus vernicipes</i>	98% ~ 99%	一色齿毛菌 <i>Cerrena unicolor</i>	100%
豹皮新香菇 <i>Neolentinus lepideus</i>	99%	茶色拟迷孔菌 <i>Daedaleopsis confragosa</i>	99% ~ 100%
革耳 <i>Panus rudis</i>	99%	宽鳞大孔菌 <i>Favolus squamosus</i>	99%
漏斗多孔菌 <i>Polyporus arcularius</i>	99%	木蹄层孔菌 <i>Fomes fomentarius</i>	100%
褐多孔菌 <i>Polyporus badius</i>	99%	树舌灵芝 <i>Ganoderma applanatum</i>	100%
猪苓 <i>Polyporus umbellatus</i>	99%	白肉灵芝 <i>Ganoderma leucocontextum</i>	99%
血红密孔菌 <i>Pycnoporus coccineus</i>	99%	灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	100%
槐耳菌 <i>Trametes cubensis</i>	100%	松杉灵芝 <i>Ganoderma tsugae</i>	100%
雅致栓菌 <i>Trametes elegans</i>	100%	粉肉拟层孔菌 <i>Fomitopsis cajanderi</i>	100%
偏肿栓菌 <i>Trametes gibbosa</i>	100%	红缘拟层孔菌 <i>Fomitopsis pinicola</i>	100%
槐栓菌 <i>Trametes robiniophila</i>	99% ~ 100%	皱皮孔菌 <i>Ischnoderma resinosum</i>	100%
香栓菌 <i>Trametes suaveolens</i>	100%	硫磺菌 <i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>miniatus</i>	100%
毛栓菌 <i>Trametes trogii</i>	100%		

3.3 结论 依据真菌的形态特征、生长特性以及生理生化指标进行分类鉴定的传统方法,重复性差,由于受到许多主观因素影响,易于发生误判。并且,由于真菌的鉴定不同于维管植物,分类特征微小,进化

更为复杂,需要鉴定者有较丰富的鉴定经验,给真菌的传统分类鉴定带来了严峻挑战。DNA 条形码技术作为一种分子鉴定技术,不受物种外部形态的影响,对能提取出 DNA 的各类型样品均能进行鉴定。

DNA 条形码技术经过 10 余年的发展,已被用于中药鉴定学、系统分类学、生态学、发育进化、生物多样性保护等领域^[35]。Scott E. Miller 称 DNA 条形码技术推动了分类学的“文艺复兴”^[36],能够给日渐萎缩的传统形态分类学带来新的发展机遇。向丽等^[37]

使用 ITS 序列对冬虫夏草进行了准确鉴定,Conrad L Schoch 等推荐使用 ITS 基因片断作为真菌的有效 DNA 条形码序列。本研究对多种药用真菌的条形码鉴定研究结果表明 ITS 序列可作为潜在的多孔菌通用条形码序列。

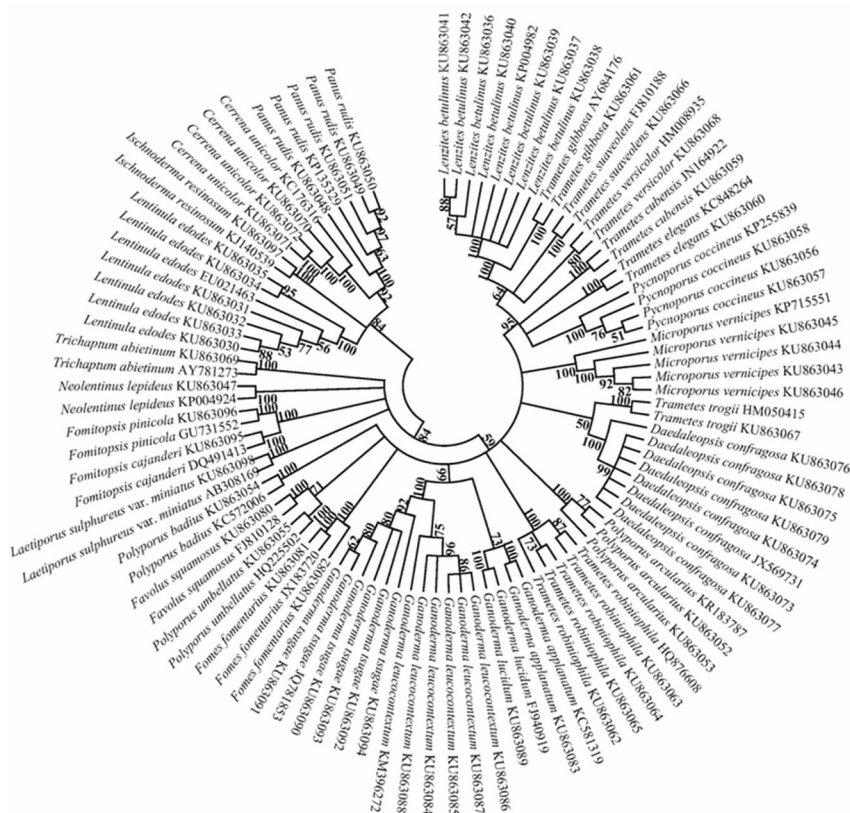


图 1 基于 ITS 序列构建的药用多孔菌邻接 (NJ) 树

注:Bootstrap 1 000 次重复,支上仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 的数值。

参考文献

- [1] Carl Linnaeus. Species Plantarum[M]. London: Ray Society, 1753.
- [2] Persoon CH. Synopsis Methodica Fungorum[M]. Göttingen: Henricus Dieterich, 1801.
- [3] Fries EM. Systema Mycologicum[M]. Lundae: Sweden, 1821.
- [4] 裴维蕃. 菌物学大全[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] 邓叔群. 中国的真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1963.
- [6] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [7] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- [8] 赵继鼎. 中国真菌志·第三卷多孔菌科[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] 赵继鼎, 张小青. 中国真菌志·第十八卷灵芝科[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [10] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定[J]. 世界科世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9 (3): 7-12.
- [11] Velmurugan S, Prasannakumar C, Manokaran S, et al. DNA barcodes for marine fungal identification and discovery[J]. Fungal Ecol, 2013, 6(5): 408-418.
- [12] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal

- transcribed spacer(ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109 (16): 6241-6246.
- [13] 宫诗林, 曹玉峰, 王淑敏. 吉林省食药药用真菌马勃的资源及鉴别研究[J]. 亚太传统医药, 2013, 9 (12): 49-52.
- [14] 刘春卉, 瞿伟菁, 张雯, 等. 药用真菌金耳的 rDNA ITS 序列分析与鉴别[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19 (2): 216-220.
- [15] 曹小迎, 蒋继宏, 孙勇, 等. 刺革菌科 4 种药用真菌的 ITS 区序列分析[J]. 中草药, 2007, 38 (2): 261-264.
- [16] Schwarz P, Bretagne S, Gantier JC, et al. Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44 (2): 340-349.
- [17] Nguyen HDT, Seifert KA. Description and DNA barcoding of three new species of Leohumicola from South Africa and the United States [J]. Persoonia, 2008, 21 (1): 57-69.
- [18] Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, et al. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers [J]. New Phytol, 2008, 180 (2): 479-490.
- [19] Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, et al. A polyphasic approach for studying Colletotrichum[J]. Fungal Divers, 2009, 39 (1): 183-204.
- [20] Sahadevan S, Pascoal C, Marvanová L, et al. DNA barcoding of fun-

- gi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species[J]. Fungal Divers, 2010, 44(1): 77-87.
- [21] Robideau GP, De Cock AW, Coffey MD, et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer[J]. Molecular ecology resources, 2011, 11(6): 1002-1011.
- [22] Li XW, Yang Y, Henry RJ, et al. Plant DNA barcoding: from gene to genome[J]. Biol Rev, 2015, 90(1): 157-166.
- [23] Xin TY, Li XJ, Yao H, et al. Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues[J]. Sci Rep, 2015, DOI:10. 1038/srep08337.
- [24] Wu L, Sun W, Wang B, et al. An integrated system for identifying the hidden assassins in traditional medicines containing aristolochic acids[J]. Sci Rep, 2015, DOI:10. 1038/srep11318.
- [25] Xin TY, Yao H, Gao HH, et al. Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode[J]. Food Res Int, 2013, 54(2): 1699-1704.
- [26] Hou DY, Song JY, Shi LC, et al. Stability and accuracy assessment of identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding: A case study on *Flos Lonicerae Japonicae*[J]. Biomed Res Int, 2013, DOI:10. 1155/2013/549037.
- [27] Luo K, Chen SL, Chen KL, et al. Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family[J]. Sci China Ser C, 2010, 53(6): 701-708.
- [28] 曾昭清, 赵鹏, 罗晶, 等. 从真菌全基因组中筛选丛赤壳科的

- DNA 条形码[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(1): 55-63.
- [29] 蔡箐, 唐丽萍, 杨祝良. 大型经济真菌的 DNA 条形码研究——以我国剧毒鹅膏为例[J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(6): 614-622.
- [30] 林惠娇, 蒋湘, 王新国, 等. DNA 条形码技术及其在真菌研究中的应用[J]. 植物检疫, 2013, 27(2): 11-18.
- [31] 张宇, 郭良栋. 真菌 DNA 条形码研究进展[J]. 菌物学报, 2012, 31(6): 809-820.
- [32] 刘娜, 李梦臻. DNA 条形码技术在病原真菌分类鉴定中的应用[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 10-12.
- [33] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 24.
- [34] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [35] 裴英才, 陈步峰. 生物 DNA 条形码: 十年发展历程、研究尺度和功能[J]. 生物多样性, 2013, 21(5): 616-627.
- [36] Miller SE. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(12): 4775-4776.
- [37] Xiang L, Song JY, Xin TY, et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus[J]. Fems Microbiol Lett, 2013, 347(2): 156-162.

(2016-04-12 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 770 页)

波长为 220 nm, 而腺苷的最大吸收波长则为 260 nm。天麻素和对羟基苯甲醇在 220 nm 处的吸光度分别为 260 nm 处吸光度的 14.41 倍和 12.46 倍, 而腺苷在 260 nm 处的吸光度为 220 nm 处吸光度的 1.69 倍(图 1, 图 2)。为了提高检测方法的灵敏度, 本研究选择天麻素和对羟基苯甲醇的检测波长为 220 nm, 腺苷的检测波长为 260 nm。

致谢: 本项目由四川省科技支撑计划项目(编号: 2011NZ0058)和成都中医药大学大学生科研实践创新课题(编号: ky2016-014)资助。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 54-55; 2015: 58-59.
- [2] 杜伟锋, 陈琳, 丛晓东, 等. 天麻化学成分及质量控制研究进展[J]. 中成药, 2011, 33(10): 1785-1787.
- [3] 周俊, 浦湘渝, 杨雁宾. 新鲜天麻的九种酚性成分[J]. 科学通报, 1981(18): 1118-1120.
- [4] 段小花, 李资磊, 杨大松, 等. 昭通产天麻化学成分研究[J]. 中药材, 2013, 36(10): 1608-1611.
- [5] 王亚男, 林生, 陈明华, 等. 天麻水提取物的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1775-1781.
- [6] 罗国刚, 樊文静, 袁兴运, 等. 天麻皂苷对三叉神经节离体培养后降钙素基因相关肽表达影响的机制研究[J]. 药学报, 2011, 46(12): 1451-1456.

- [7] 何芳雁, 吴盛友, 韩春妮, 等. 天麻催眠作用活性成分的研究[J]. 云南中医中药杂志, 2013, 34(9): 66-68.
- [8] Liu W, Su B L, Wang Z S, et al. Gastrodin improved baroreflex sensitivity and increased gamma-amino butyric acid content in brains without decreasing blood pressure in spontaneously hypertensive rats[J]. CNS Neurosci & Therap, 2012, 18(10): 873-875.
- [9] Wang Y, Wu Z, Liu X, et al. Gastrodin ameliorates Parkinson's disease by down regulating connexin 43[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2): 585-590.
- [10] 杨杰, 赵朝华, 宗长宏, 等. 短暂性 MCAO 大鼠注射天麻素具有神经保护作用[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(4): 295-297.
- [11] Hsieh M T, Wu C R, Chen C F. Gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition, oil the passive avoidance task in rats[J]. J Ethnopharmacol, 1997, 56(1): 45-54.
- [12] Wu C R, Hsieh M T, Liao J. p-Hydroxybenzyl alcohol attenuates learning deficits in the inhibitory avoidance task: involvement of serotonergic and dopaminergic systems[J]. Chin J Physiol, 1996, 39(4): 265-273.
- [13] Fredholm B B, Chen J F, Cunha R A, et al. Adenosine and brain function[J]. Int Rev Neurobiol, 2005, 63: 191-270.
- [14] 曲为敏, 孙宇, 许奇, 等. 腺苷和睡眠觉醒调节[J]. 生物物理学报, 2011, 27(1): 5-17.
- [15] Ferre S, Diamond I, Goldberg S R, et al. Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry implications for drug addiction, sleep and pain[J]. Prog Neurobiol, 2007, 83(5): 332-347.

(2016-04-12 收稿 责任编辑: 洪志强)