

基于 ITS 序列的伞菌类药用食用真菌的 DNA 条形码鉴定研究

刘悦¹ 汤欢¹ 李西文¹ 陈增华² 雷志勇² 向丽

(1 中国中医科学院中药研究所,北京,100700; 2 北京千菌方菌物科学研究院,北京,100005)

摘要 目的:伞菌类真菌物种繁多、生物多样性丰富,包括多种重要的药用、食用真菌以及有毒真菌。因此,对该类群的快速、准确鉴定,对于新的药用食用真菌资源的发现,以及对真菌毒素危害的防治都具有重要意义。方法:本研究以伞菌类 13 个科 23 个属 50 个物种,共计 84 份样本的真菌为研究对象,采用真菌通用引物 ITS5 和 ITS4,对其核糖体 DNA 的内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer,ITS)进行 PCR 扩增和测序。通过比较不同真菌的序列长度、碱基构成,同时利用 BLAST 比对法和建树法对其进行鉴定。结果:伞菌类真菌的序列长度在 463 ~ 751 bp 之间,平均 GC 含量在 37.1% ~ 59.4% 之间。通过与 GenBank 中序列的比对分析以及系统进化邻接(Neighbor-joining,NJ)树结果,可以在种级水平上鉴定各个真菌物种。结论:基于 ITS 序列的 DNA 条形码可以快速、准确鉴定伞菌类真菌,具有重要的应用价值。

关键词 药用真菌;食用真菌;伞菌类;DNA 条形码;ITS

Identification of Medicinal and Edible Fungi (Agaricales) Through Internal Transcribed Spacer Barcode

Liu Yue¹, Tang Huan¹, Li Xiwen¹, Chen Zenghua², Lei Zhiyong², Xiang Li¹

(1 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2 Beijing Qianjunfang Academy of Fungal Science, Beijing 100005, China)

Abstract Objective: With abundant fungi species and rich biodiversity, Agaricales comprises a variety of medicinal, edible and poisonous fungi. To identify these fungi have important significance for the discovery of new medicinal edible fungi resources, and the prevention of mycotoxin hazard. **Methods:** In this study, 50 species belong to 23 genus of 13 families in Agaricales were identified by DNA barcode. The internal transcribed spacer (ITS) were amplified and sequenced. Sequence lengths, base compositions were compared, and sequences results were analyzed using BLAST. A phylogenetic neighbor-joining (NJ) tree was also constructed for the identification of above-mentioned species. **Results:** The results indicated that the ITS sequence lengths of 50 fungi species ranged from 463 to 751 bp and the GC content intermediate between 37.1% and 59.4%. Finally, all 50 species were clearly identified by BLAST and NJ tree. It is concluded that the ITS region can rapidly and accurately identify Agaricales species. **Conclusion:** The proposed DNA barcode has great application value in fungi species identification.

Key Words Medicinal Fungi; Edible Fungi; Agaricales; DNA barcode; ITS

中图分类号:R282 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.009

伞菌目(Agaricales)又称蘑菇目,为担子菌一个大目,特点是具有菌盖和菌柄,呈蘑菇状。伞菌类真菌多成世界性分布,从北极至热带的多林地带有发现。目前,伞菌目已有 33 个科,413 个属,13 000 余个物种已被识别,我国已报道的物种约占全世界已知物种的 1/5^[1]。在伞菌类真菌中,包括有味道鲜美而具有较高营养价值的食用菌,如侧耳科侧耳属的刺芹侧耳、白灵侧耳等;有重要的药食两用真菌,如侧耳科侧耳属的金顶侧耳和光柄菇科小包脚菇属的草菇等;此外,伞菌类真菌还包括较多含有毒性的真菌,如球盖菇科垂幕菇属的簇生黄韧伞、白蘑

科杯伞属的白杯伞以及鹅膏菌科鹅膏属的致命鹅膏等^[2-5]。由此可见,伞菌类真菌具有丰富的物种多样性,实现对该类群的快速、准确鉴定,对于新的药用食用真菌资源的发现,以及对有毒真菌的预防等都具有重要意义。

DNA 条形码从基因角度解释了药用动植物物种鉴定的问题^[6]。近年来,随着该方法的深入研究与普及,该方法已经成为传统鉴定方法的有效补充,并成为药用动物、植物鉴定的重要方法^[6,8-12]。如, DNA 条形码技术对名贵真菌类药材冬虫夏草、灵芝及其混伪品等^[13-17]。传统的伞菌类真菌分类与鉴定

基金项目:中央科研院所公益项目(编号:ZXKT15029;ZZ2014029);重大新药创制国家科技重大专项(编号:2014ZX09304307001-014;2014ZX09301308-007)

通信作者:向丽,助理研究员,主要研究方向:中药资源栽培与药用真菌分子鉴定,Tel:(010)84084107,E-mail:lxia@icmm.ac.cn

多是根据子实体以及孢子等的形态特征,但有时会受到环境影响,真菌的形态差异会有较大差异,给鉴定带来一定困难^[18]。此外,一些真菌的培养物只有菌丝体,而不产生孢子,更加大了鉴定的难度^[19]。近年来,研究者们采用 DNA 条形码技术对真菌的分类与鉴定展开了大量的研究^[20-22]。在对菌物 DNA 条形码标准序列筛选的过程中发现,ITS 序列适宜的真菌类群范围较广,引物通用性强,PCR 扩增、测序以及鉴定成功率都相对较高。此外,在 GenBank 等数据库中存有大量的真菌 ITS 序列,更便于真菌序列的比对研究^[19]。在第四届国际生命条形码大会上正式推荐了 ITS 作为真菌的首选 DNA 条形码^[4,19]。本研究应用 ITS 序列,以伞菌类 13 个科 23 个属 50 个物种,共计 84 份样本为研究对象,探索 ITS 序列对伞菌类真菌鉴定的可行性与可靠性。

1 材料和方法

1.1 实验材料 本研究以本研究以伞菌类 13 个科 23 个属 50 个物种,共计 84 份样本的真菌为研究对象,进行 DNA 条形码鉴定研究,实验材料经中国科学院微生物研究所卯晓岚研究员鉴定。凭证标本存放于中国中医科学院中药研究所,详细研究材料见表 1。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序 用 75% 乙醇擦拭真菌后,刮去其表面,取其内部组织约 30 mg,用高通量组织研磨仪(宁波新芝,中国)研磨 200 s (50 Hz)后,利用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(BioTeke 公司,中国)提取总 DNA。扩增 ITS 序列正向引物 ITS5F:5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3,反向引物 ITS4R:5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3。PCR 反应体积 25 μ L,PCR 反应体系为 25 μ L,包括 2 $\times$ Tag PCR MasterMix 12.5 μ L,正反向引物各 1 μ L,DNA 模板 2 ~ 3 μ L,其余体积以 ddH₂O 补充。序列扩增及测序均依照中药材 DNA 条形码分子鉴定标准操作流程(DNA barcoding SOP)进行^[23-24]。

1.3 数据处理 测序峰图使用 CodonCode Aligner V 3.7.1(CodonCode Co., USA)进行质量校对与拼接,去除低质量序列及引物区,进行多序列比对并人工校验。将所有获得的 ITS 序列用 MEGA6.0(Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA)(MUSCLE option)进行序列分析比对。最后采用相似性搜索法(BLAST),以及构建系统进化邻接树(neighbor-joining method)的方法来考察 ITS 序列鉴定的成功率。

2 结果

2.1 伞菌类真菌 ITS 序列特征 实验结果表明,

ITS 序列在伞菌类真菌样本中显示出较好的通用性,PCR 扩增效率和测序成功率均为 100%。比较 84 条 ITS 序列后发现:各个物种的序列长度各有差异(表 1),其中蜡伞科(Hygrophoraceae)的 *Hygrophorusquercetorum* 序列长度最短,为 463 bp;膨瑚菌科(Physalacriaceae)科的假蜜环菌 *Armillariatabescens* 序列长度最长,为 751 bp。各物种的平均 GC 含量在 37.1% ~ 59.4% 之间,蜡伞科(Hygrophoraceae)科的 *Hygrophorusquercetorum* 最低,而光柄菇科(Pluteaceae)科的草菇 *Volvariellavolvacea* 平均 GC 含量最高。

2.2 相似性搜索结果 本文采用比对法(BLAST)对 84 条实验序列进行鉴定,结果表明在属水平上鉴定成功率为 100%;在物种水平上,鉴定成功率为 89%,有 9 个真菌样本在 GenBank 中未能搜索到相同序列,仅能比对到属,这些真菌包括芳香杯伞 *Clitocybefragrans*、大白桩菇 *Leucopaxillusgiganteus*、侧耳 *Pleurotostreatus*、*Hypholomadispersum*、*Hygrophorusquercetorum*、灰紫鳞丝盖伞 *Inocybebriseolilacina*、*Inocybejacobi* 以及 *Lycoperdoncaudatum*。

2.3 系统进化树鉴定结果 从基于 ITS 序列的系统进化 NJ 树看出(图 1),ITS 序列可以鉴定实验研究所用的伞菌类的 13 个科 23 个属 50 个物种。其中,在 BLAST 比对法中仅能比对到属水平的 9 个物种在 NJ 树中也都能够与其他同属物种分开,并各自为一支。此外,具有较高营养价值的真菌,如侧耳科(Pleurotaceae)侧耳属的刺芹侧耳(*Pleurotuseryngii*)、白灵侧耳(*Pleurotusnebrodensis*)等;重要的药食两用真菌,如侧耳科侧耳属的金顶侧耳(*Pleurotuscitrinopileatus*)和光柄菇科(Pluteaceae)小包脚菇属的草菇(*Volvariellavolvacea*)等,以及有毒的鹅膏菌科(Amanitaceae)科的鹅膏菌属(*Amanita*)真菌、球盖菇科(Strophariaceae)科垂幕菇属(*Hypholoma*)真菌以及丝盖伞科(Inocybaceae)科的丝盖伞属(*Inocybe*)真菌等均能够与其他的真菌区分开。由此可见,采用基于 ITS 序列的系统进化 NJ 树可以鉴定实验研究中的 50 种伞菌类真菌。

3 讨论

据统计,全世界的真菌物种多达 150 万余种,其数量和种类在生物界中仅次于昆虫而位列第二^[25]。真菌丰富的生物多样性、重要的生态作用以及巨大的药用、食用价值使其在生物中占有举足轻重的地位。传统的真菌鉴定方法主要以其形态特征、生理学特征以及生态学特征等作为判定依据。但是真菌

表 1 伞菌类实验材料信息

科名	拉丁名	样本数	GenBank 登录号	来源	序列长度 bp	平均 GC 含量%
Lyophyllaceae	<i>Hypsizygusmarmoreus</i>	6	KU836539 ~ KU836544	市场购买	606	45.7
	<i>Lyophyllumconnatum</i>	1	KU836558	西藏	575	47
	<i>Lyophylluminfumatum</i>	2	KU836559 ~ KU836560	四川康定	580	46
	<i>Lyophyllumshimeji</i>	1	KU836561	云南	591	46.2
Tricholomataceae	<i>Tricholomavirgatum</i>	1	KU836578	四川康定	597	42.5
	<i>Tricholomamatsutake</i>	4	KU836579	云南	595	44.3
			KU836580 ~ KU836581	西藏林芝		
			KU836582	西藏		
	<i>Tricholomapopulinum</i>	3	KU836583 ~ KU836585	内蒙古自治区	608	43.6
	<i>Tricholomasquarrulosum</i>	1	KU836586	四川康定	591	44
	<i>Tricholomapsammopus</i>	1	KU836587	四川康定	596	44.8
	<i>Clitocybefragrans</i>	1	KU836517	四川康定	609	43.3
	<i>Clitocybephyllophila</i>	2	KU836518 ~ KU836519	四川康定	608	43.5
	<i>Lepistanebularis</i>	2	KU836549	黑龙江	581	44.6
			KU836550	四川康定		
	<i>Lepistanuda</i>	1	KU836551	云南	591	40.9
	<i>Leucopaxillusgiganteus</i>	1	KU836592	黑龙江	642	37.9
	<i>Laccariaproxima</i>	1	KU836593	四川康定	605	42.5
Pleurotaceae	<i>Pleurotuscitrinopileatus</i>	5	KU836565 ~ KU836569	黑龙江	585	46.1
	<i>Pleurotuseryngii</i>	2	KU836570	福建	587	44.3
			KU836571	市场购买		
	<i>Pleurotusnebrodensis</i>	2	KU836572 ~ KU836573	市场购买	589	44.2
Strophariaceae	<i>Pleurotusstreatus</i>	1	KU836574	西藏	579	43.7
	<i>Strophariarugosoannulata</i>	1	KU836595	四川	590	40.7
	<i>Hypholomacapnoides</i>	1	KU836535	四川康定	610	40.8
	<i>Hypholomadispersum</i>	1	KU836536	四川康定	617	41.2
	<i>Hypholomafasciculare</i>	2	KU836537 ~ KU836538	西藏	611	40.1
	<i>Pholiotamicrospora</i>	1	KU836562	黑龙江	600	41
Schizophyllaceae	<i>Pholiotasquarrosa</i>	2	KU836563 ~ KU836564	西藏	610	40.4
	<i>Schizophyllum commune</i>	3	KU836575 ~ KU836577	吉林	569	47.3
Hygrophoraceae	<i>Hygrophorusquercetorum</i>	2	KU836529 ~ KU836530	四川康定	463	37.1
	<i>Hygrophorusrussula</i>	4	KU836531 ~ KU836533	四川	501	37.8
Marasmiaceae			KU836534	吉林长白山		
	<i>Gymnopusaquosus</i>	1	KU836527	四川康定	546	39.2
	<i>Gymnopusconfluens</i>	1	KU836528	四川康定	728	42.6
Amanitaceae	<i>Mycenapolygramma</i>	1	KU836591	云南	618	44.3
	<i>Amanita battarrae</i>	4	KU836513 ~ KU836516	四川康定	503	43.2
Physalacriaceae	<i>Armillariatabescens</i>	1	KU836590	吉林	751	44.9
	<i>Flammulinavelutipes</i>	1	KU836596	市场购买	642	50.2
Inocybaceae	<i>Inocybegriseoilacina</i>	1	KU836545	四川康定	621	45.2
	<i>Inocybejacobi</i>	1	KU836546	四川康定	642	41.1
	<i>Inocybemixtilis</i>	1	KU836547	四川康定	526	42.2
	<i>Inocybesalicis-herbaceae</i>	1	KU836548	四川康定	539	43
Cortinariaceae	<i>Cortinariusilluminus</i>	1	KU836520	四川	615	41.8
	<i>Cortinariusbadiolatus</i>	1	KU836521	四川康定	602	42.7
	<i>Cortinariuscaninus</i>	1	KU836522	四川康定	570	40.4
	<i>Cortinariusclaricolor</i>	2	KU836523 ~ KU836524	四川康定	608	42.3
	<i>Cortinariuspiceidisjungendus</i>	1	KU836525	四川康定	526	44.3
	<i>Cortinariussecaurus</i>	1	KU836526	四川康定	610	41.6
Pluteaceae	<i>Volvariellavolvacea</i>	2	KU836588 ~ KU836589	云南	633	59.4
Agaricaceae	<i>Calvatiagigantea</i>	1	KU836552	吉林	649	45.5
	<i>Handkeautriformis</i>	2	KU836553 ~ KU836554	内蒙	645	45
	<i>Lycoperdoncaudatum</i>	1	KU836555	四川康定	627	43.9
	<i>Lycoperdonperlatum</i>	2	KU836556 ~ KU836557	四川康定	642	44.4
	<i>Coprinuscomatus</i>	1	KU836594	云南	587	43.4

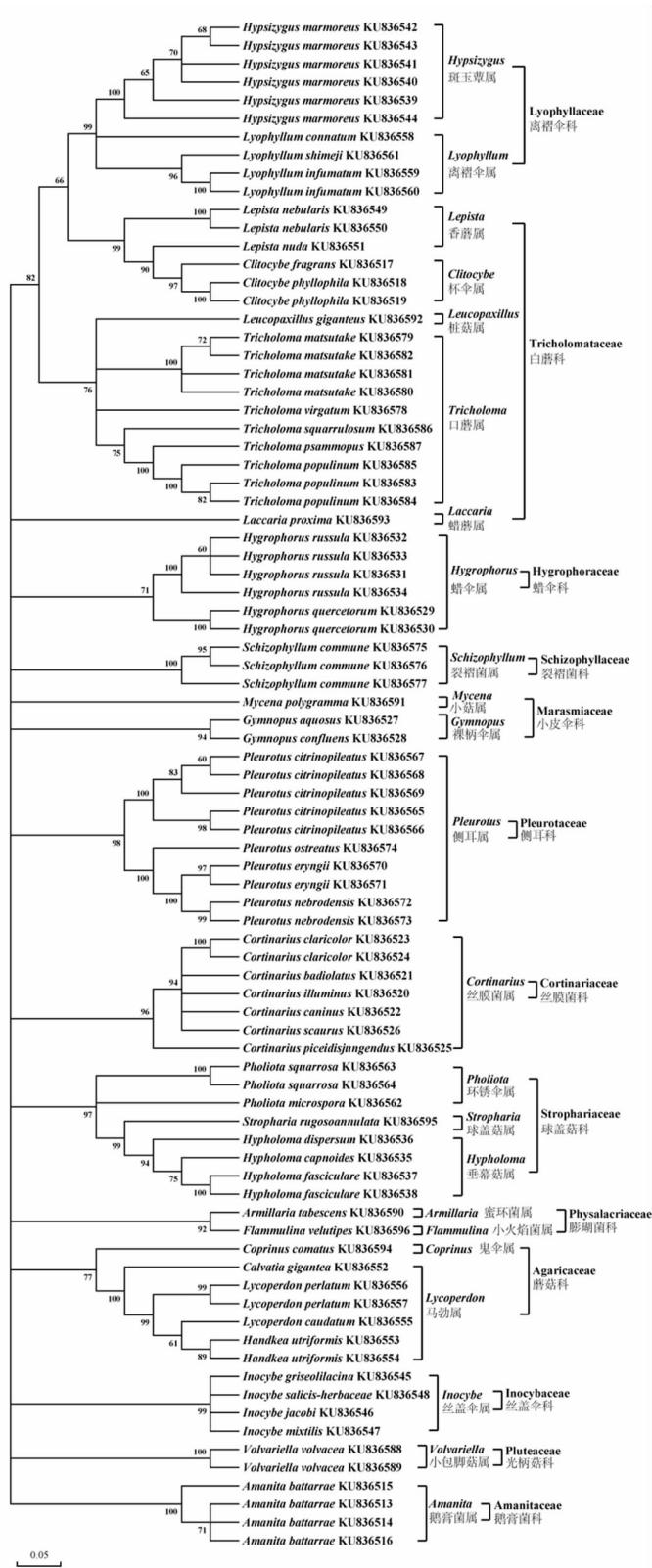


图 1 基于 IT 序列构建的伞菌类 50 个物种的系统进化邻接树

种类繁多,个体多态性显著或物种之间形态十分相似,易受培养条件等外界因素的影响,为真菌的鉴定带来了一定的困难。与传统分类鉴定方法不同,

DNA 条形码克服传统形态学表型相似或差异大、鉴定人员需具备较为扎实的专业知识等困难,从基因角度背景阐明物种来源,目前已成为物种快速鉴定

的重要途径。

由于真菌丰富的生物多样性,研究者们对真菌 DNA 条形码标准序列的选择也做了大量的研究工作。其中 COI 和 ITS 序列被证明是在真菌鉴定工作中成功率较高的两条序列^[26-27]。研究表明,COI 基因是内含子含量较多的序列,有时其片段长度超过 20 bp,会影响 PCR 扩增而不利于获取 DNA 序列^[28]。而 ITS 序列引物通用性强,扩增成功率较高,更便于高通量测序与分析,因此更适合作为真菌鉴定的首选条形码^[19]。

本研究采用 ITS 序列对伞菌类 13 个科 23 个属 50 种真菌进行鉴定研究。通过比较各个物种 ITS 序列发现,不同物种在序列长度以及碱基构成方面的差异。BLAST 比对结果表明,除个别物种外, DNA 条形码鉴定结果与前期形态鉴定结果基本一致。结合 NJ 树结果,则能将这 50 种伞菌类真菌物种鉴定到种级单元,并可确定同物异名的真菌。此外,侧耳属等重要药用、食用真菌以及鹅膏属、杯伞属等有毒真菌均可与其他真菌物种明显区分。因此,ITS 序列在伞菌类真菌中鉴定的可行性,对未来伞菌类真菌的鉴定、有毒真菌与无毒真菌鉴定区分,以及药用食用真菌的生产栽培以及开发利用都具有重要的意义。

参考文献

- [1] Kirk PM, Cannon PF, Stalpers JA. Dictionary of the Fungi (tenth edition) [M]. Wallingford: CABI, 2008: 12.
- [2] 李林玉, 金航, 张金渝, 等. 中国药用真菌概述 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27(2): 57-61.
- [3] 周均亮, 李杉, 苏胜宇, 等. 西藏林芝和昌都地区不同植被下大型真菌生态分布 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2014, 38(4): 91-96.
- [4] 蔡簪, 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.
- [5] 卯晓岚. 中国大型真菌 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- [6] 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.
- [7] 韩建萍, 宋经元, 姚辉, 等. 中药材 DNA 条形码鉴定的基因序列比较 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1056-1061.
- [8] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(5): 747-754.
- [9] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 Region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. Plos ONE, 2010, 5(1): e8613.
- [10] Xin TY, Yao H, Gao HH, et al. Super food Lycium barbarum (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode

- [J]. Food Research International, 2013, 54(2): 1699-1704.
- [11] Chen SL, Pang XH, Song JY, et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(7): 1237-1244.
- [12] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1-12.
- [13] Xiang L, Song JY, Xin TY, et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus [J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 347(2): 156-162.
- [14] Liao BS, Chen XC, Han JP, et al. Identification of commercial Ganoderma (Lingzhi) species by ITS2 sequences [J]. Chinese Medicine, 2015, 22(10): 1-9.
- [15] 赵鹏, 庄文颖. ITS 作为粒毛盘菌属 DNA 条形码的探索 [J]. 菌物学报, 2011, 30(6): 932-937.
- [16] 张文娟, 康帅, 魏峰, 等. 基于 ITS 序列分析鉴别冬虫夏草与古尼虫草 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1551-1555.
- [17] 郑方圆, 曹叔楠, 张涛, 等. 石耳属 ITS 条形码物种的快速鉴定 [J]. 菌物学报, 2011, 30(6): 938-943.
- [18] 曹杰, 张志国, 刘弟, 等. 滇藏地区 8 种鹅膏菌的 ITS 序列分析 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2009(1): 90-96.
- [19] 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.
- [20] Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, et al. Prospects for fungus identification using COI DNA barcodes, with Penicillium as a test case [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2007, 104(10): 3901-3906.
- [21] Dentinger BT, Didukh MY, Moncalvo JM. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina) [J]. PloS ONE, 2011, 6(9): 1767-1769.
- [22] Schoch CL, Consortium FB, Schoch CL, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [23] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [24] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 22.
- [25] Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation [J]. Mycological Research, 1991, 95(6): 641-655.
- [26] Blaxter ML. The promise of a DNA taxonomy [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences, 2004, 359(1444): 669-679.
- [27] Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Konoš M, et al. An oligonucleotide barcode for species identification in Trichoderma and Hypocrea [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(10): 813-828.
- [28] Santamaria M, Vicario S, Pappadà G, et al. Towards barcode markers in Fungi: an intron map of Ascomycota mitochondria [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10(Suppl 6): S15.

(2016-04-12 收稿 责任编辑: 洪志强)