

· 基础研究 ·

基于“形态+分子”方法对疑似灵芝属样品的基原探究[△]董晓曼^{1,2}, 王亚君³, 查良平¹, 蒋超², 金艳², 赵玉洋², 袁媛^{2*}

(1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012;

2. 道地药材国家重点实验室培育基地 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700;

3. 国家纳米科学中心, 北京 100190)

[摘要] 目的: 为疑似“灵芝”属样品基原探究提供性状和分子鉴定证据。方法: 在基于传统形态特征初步鉴定基础上, 对疑似灵芝属两样品 ZZ 和 SS 的 rDNA-ITS 区序列进行 PCR 扩增, 经克隆测序后, 与 GenBank 数据库中序列进行 BlastN 比对, 样品及最相似物种 ITS 序列对齐后使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。结果: 测序得到样品 ZZ 和 SS 的 rDNA-ITS 区序列分别为 752、753 个碱基, 与已发表极硬红皮孔菌(*Pyrrhoderma adamantinum*) rDNA-ITS 区序列相似度达 99.0%, 并在系统发育树中与极硬红皮孔菌聚为一支, 而与紫芝、树舌灵芝遗传距离较远。结合样品 ZZ 和 SS 的子实体形态和扫描电镜观察鉴定结果判断其为极硬红皮孔菌。结论: 基于 rDNA-ITS 区序列分析和系统发育树构建药用真菌分子鉴定方法, 为疑似样品基原鉴定提供理论依据和技术支持。

[关键词] 分子鉴定; 极硬红皮孔菌; ITS 序列

A Primary Study on Classification and Identification of Two Samples Based on Morphological Characteristics and Molecular Analyses

DONG Xiaoman^{1,2}, WANG Yajun³, ZHA Liangping¹, JIANG Chao², JIN Yan², ZHAO Yuyang², YUAN Yuan^{2*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China)

[Abstract] **Objective:** In order to identify and classify two samples which were suspected as *Ganoderma*, the morphological characteristics and molecular analyses were performed. **Methods:** Basing on primary identification of them, the rDNA-ITS region were amplified thereby, the rDNA-ITS amplicon was characterized by cloning, sequencing, blasting in GenBank and phylogenetic analyses using MEGA. **Results:** The rDNA-ITS entire sequences of the two species was 752 bp and 753 bp, respectively. The sequences both related to the *Pyrrhoderma adamantinum* were available in GenBank, and the similarity reached 99.0%. The cluster analysis suggested that the relationship between the two samples and *P. adamantinum* was closer, however, the relationship between the two samples and the *Ganoderma* were relatively farther. The morphological and microscopic characteristics combined with the sequence analysis demonstrated that the two samples are *P. adamantinum*. **Conclusion:** The molecular biology methods of rDNA-ITS region analysis provides a technical support and theoretical reference for accurate identification on suspected fungi samples.

[Keywords] Molecular identification; *Pyrrhoderma adamantinum*; ITS

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.7.007

药用真菌含有多种有效成分, 具有抗肿瘤^[1]、氧化^[6]等多种药理活性。在市场上药用真菌常存在免疫调节^[2]、抗菌^[3]、抗病毒^[4]、解毒保肝^[5]、抗“同名异物”或“以假乱真”现象, 因此对其基原

[△] [基金项目] 中医药行业科研专项(201407003)

* [通信作者] 袁媛, 博士, 研究员, 研究方向: 分子生药学; Tel: (010)84044340, E-mail: y_yuan0732@163.com

准确鉴定是保证中药临床用药安全的重要基础。目前药用真菌主要依赖传统形态学鉴定,包括对子实体等宏观形态特征及孢子、菌丝等微观特征观察。由于真菌形态特征复杂且随着分布地域变化较大,即同一物种的外部形态会随分布区域的不同发生较大变异,如野生赤芝在中国的分布由北向南逐渐减少,且形态、颜色以及内部结构均有所变化,海南的赤芝多不像北方那样典型,通常菌盖较小、菌柄细长^[7],这体现了赤芝种群间的变化;另一方面,部分真菌样品采集后即不育且很难采集到孢子,因而丧失了部分鉴定特征。上述诸因素均限制了传统形态学方法在药用真菌鉴定中的应用。

由于 DNA 分子标记不受环境因素、生物体发育阶段、器官组织差异的影响,且个体中的任一细胞均含有相同的遗传信息,因而具有微量、准确、特异性好的优点,被广泛用于真菌物种鉴定^[8-10]。近年来,已有利用 rDNA-ITS 序列对大型真菌等进行分类鉴定、纯培养菌种鉴定和分子系统发育研究的报道^[11-16]。

本研究分别在湖南省采集了两个样品,在野外调查中根据子实体的形态特征,对这两个样品进行初步鉴定,其中湖南省株洲市淦田县东冲村样品可能为灵芝科灵芝属紫芝 *Ganoderma sinense*, 湘乡市梅桥镇井峰村采得样品可能为灵芝科灵芝属树舌灵芝 *Ganoderma app lanatum*。在前期野外鉴定的基础上,进一步通过对子实体和孢子的微观特征观测,发现其与《中国真菌志》中记载的紫芝与树舌灵芝特征不一致,并对样品 ITS 序列进行扩增和分析,建立了“形态 + 分子”结合的鉴定方法判断两样品基原,以期药用真菌疑似样品鉴定提供技术支持。

1 材料

1.1 样品

供试样品采自湖南省,新鲜子实体采集后去除表面泥沙杂物,子实体的采集信息及编号见表 1。

表 1 供试样品采集信息及子实体编号

编号	野外初步鉴定	采集地	海拔/m
ZZ	灵芝科灵芝属紫芝	湖南株洲淦田县东冲村	176
SS	灵芝科灵芝属树舌灵芝	湖南湘乡市梅桥镇井峰村	91.8

1.2 试剂

pEASY™-T5 Zero Cloning vector 和 Trans1-T1 感

受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;琼脂糖购自 Promega 公司;MightyAMP DNA Polymerase、2x MightyAMP Buffer、2000 bp DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;其他试剂均为国产分析纯。rDNA-ITS 分析所用的引物 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA-CAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3')^[15]由生工生物工程有限公司合成。

2 方法

2.1 子实体形态观察

用 Pentax K-7 单反相机拍摄记录供试标本的菌盖表面、菌管表面及菌盖剖面,并用直尺进行测量。

2.2 扫描电镜观察

采用 Quanta 200 ESEM (FEI)扫描电子显微镜观察供试标本的担孢子显微结构。

2.3 子实体基因组 DNA 的提取

所有供试材料均取子实体的菌盖部分来提取基因组 DNA。基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[16]。

2.4 PCR 扩增

ITS5F-4R 反应体系总体积为 25 μL,包括 MightyAmp DNA 聚合酶 0.8 μL, 2 × MightyAmp Buffer 12.5 μL, ITS5F 0.5 μL, ITS4R 0.5 μL, 灭菌蒸馏水 9.7 μL, 子实体 DNA 1.0 μL。反应条件:95 ℃ 预变性 5 min, 然后进入循环,95 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 复性 100 s, 共 40 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min, 终止温度为 4 ℃。两样品均平行实验 3 次。

2.5 目的片段的克隆及测序

将 ITS 的 PCR 产物与 pEASY™-T5 Zero Cloning vector 连接,转化到 Trans1-T1 感受态细胞中,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上进行培养,经 PCR 鉴定后随机选择 8 个阳性克隆,送北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序。

2.6 ITS 序列分析

将测得的 ITS 序列去掉 5' 和 3' 端的载体序列,转换为 FASTA 格式。将去除载体后的序列使用 BioEdit 分析软件进行分析和校对处理。在 GenBank 数据库中进行 BLASTN 分析,并用 MEGA 6.06 软件包进行系统发育树的构建。用 Kimura2-parameter 模式计算遗传距离,所有对位排列结果中的空位或缺失

数据做完全删除处理, 进化距离分析采用邻位相连法(NJ, neighbor-joining)。系统树的每个分支的统计学显著性分析以自展法进行检验, bootstrap 重复次数为 1000 次。

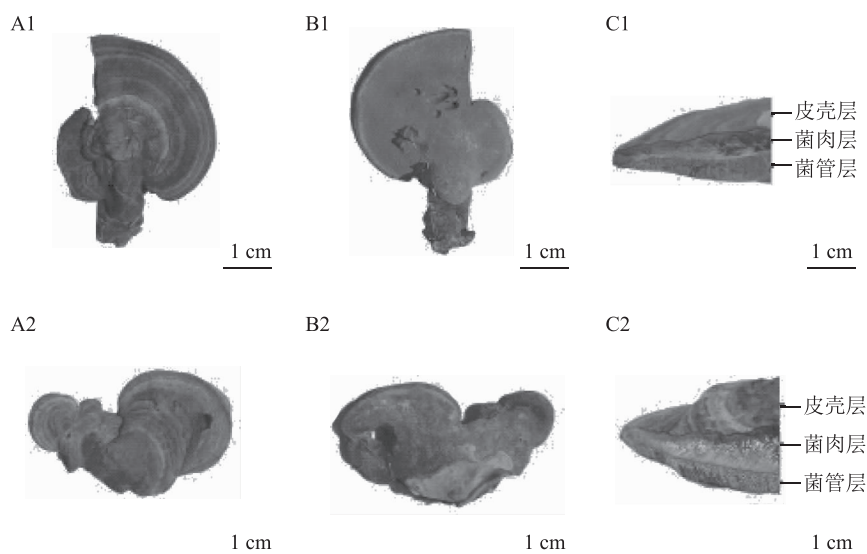
3 结果与分析

3.1 样品子实体形态观察

3.1.1 供试样品 ZZ 担子果硬骨质, 柄状基部。菌盖单生, 近圆形, 7.5 cm × 8.1 cm, 厚约 1.0 cm,

剖面近三角形。菌盖表面浅灰褐色, 有明显黑色皮壳, 具同心环纹及不明显的沟纹, 光滑, 边缘圆钝、完整。菌肉浅黄褐色, 硬木栓质, 菌管浅灰褐色, 较菌肉色淡, 呈纤维质。见图 1。

3.1.2 供试样品 SS 担子果硬骨质, 无菌柄。菌盖单生, 菌盖近扇形, 4.5 cm × 4.8 cm, 厚约 1.2 cm, 剖面近三角形。菌盖表面灰褐色, 有明显黑色皮壳, 具同心环纹及不明显的沟纹, 光滑, 边缘圆钝、完整。菌肉黄褐色, 菌管表面浅灰色, 纤维质。见图 1。



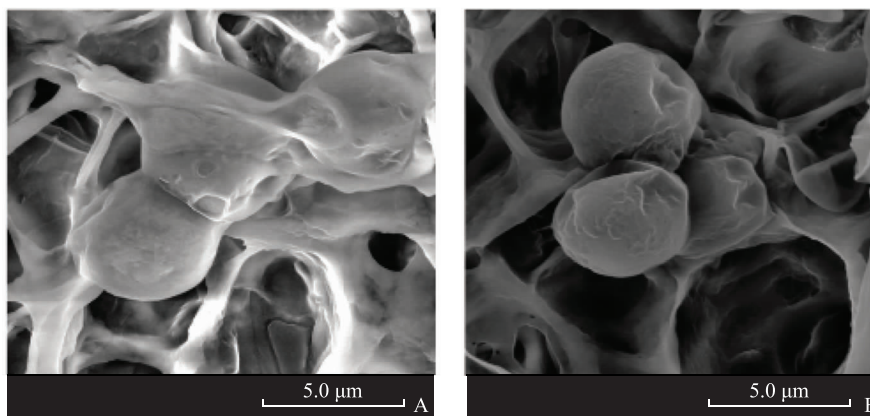
注: A1、A2 为 ZZ 和 SS 的菌盖表面; B1、B2 为 ZZ 和 SS 的菌管表面; C1、C2 为 ZZ 和 SS 的菌盖剖面。

图 1 供试标本子实体形态特征

3.2 扫描电镜观察

采用扫描电镜观察两供试样品的担孢子的形态特征, 扫描电镜观察结果表明两供试样品担孢子显微特征

基本一致, 担孢子近球形, 表面平滑, 薄壁。供试样品 ZZ 的担孢子大小为 $5.1 \mu\text{m} \times 4.9 \mu\text{m}$ (见图 2A); 供试样品 SS 的担孢子大小为 $5.0 \mu\text{m} \times 4.8 \mu\text{m}$ (见图 2B)。



注: A. 供试样品 ZZ; B. 供试样品 SS。

图 2 供试样品担孢子扫描电镜图

3.3 供试样品的 PCR 扩增、测序及分析

从 2 个样品子实体的基因组 DNA 中, 引物 ITS5F/4R 对均成功地扩增出单条带, 即位于样品 rDNA ITS 区(ITS1-5.8S-ITS2)的一段 ITS 序列, 序列长度约为 750 bp(见图 3)。

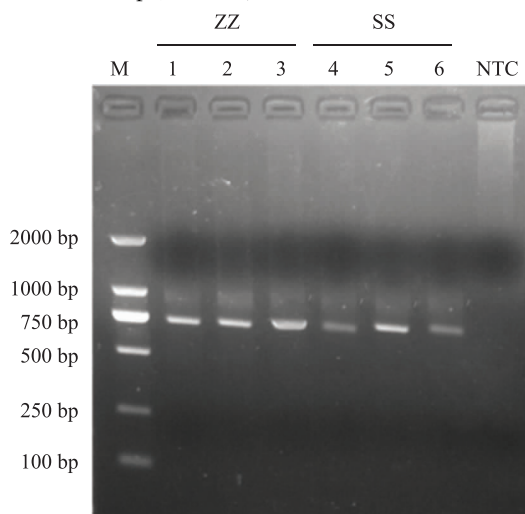


图 3 ZZ 与 SS 标本子实体的 PCR 扩增结果

将 PCR 产物连接到 pEASYTM-T5 Zero 克隆载体上, 随机挑选 8 个阳性克隆进行测序, 并对序列信

息进行分析。各样品 8 个阳性克隆的序列均一致。样品 ZZ 序列长度为 752 bp, GC 质量分数为 38.70%; 样品 SS 序列长度为 753 bp, GC 质量分数为 38.50%; 两样品 ITS 序列与 GenBank 数据库中发表的极硬红皮孔菌 *Pyrrhoderma adamantinum* (登录号: FJ481040.1) 序列相似度均达到 99.0%。

3.4 系统发育分析

从 GenBank 数据库中获得权威机构提交的灵芝、紫芝、树舌灵芝及极硬红皮孔菌的 ITS 序列, 与测序获得的 2 条序列, 用 Bioedit 软件多重对位排列后, 利用对位序列中共包括空位在内的 649 个碱基用于系统发育树构建。基于 Mega 6.0 构建的系统树如图 4 所示。从进化树中, SS 和 ZZ 两供试样品 ITS 序列首先聚为一分支, 然后与极硬红皮孔菌 *P. adamantinum* 聚为一个大的分支, 而灵芝 *G. lucidum*、紫芝 *G. sinense* 和树舌灵芝 *G. applanatum* 单独聚为一分支。以上结果说明, SS 和 ZZ 两供试样品与极硬红皮孔菌亲缘关系最近, 而与紫芝和树舌灵芝亲缘关系较远, 结合前期的序列相似度分析结果, 提示这两个供试标本最相似物种为极硬红皮孔菌。

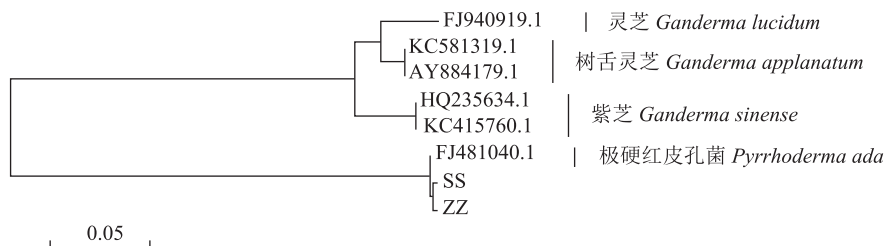


图 4 基于供试样品 rDNA-ITS 区碱基序列构建的 NJ 系统发育树

4 讨论

4.1 疑似灵芝属样品的鉴定结果

本研究利用扫描电镜对供试样品 ZZ 和 SS 进行了担孢子形态的观察, 结果发现两样品外观形态和担孢子显微特征基本一致: 菌盖单生, 近圆形, 菌盖表面浅灰褐色, 有明显黑色皮壳, 具同心环纹及不明显的沟纹, 光滑, 边缘圆钝、完整。菌肉浅黄褐色, 硬木栓质, 菌管浅灰褐色, 较菌肉色淡, 呈纤维质; 担孢子近球形, 表面平滑, 薄壁。前期野外鉴定结果认为样品 ZZ 可能为紫芝, 而 SS 可能为树舌灵芝, 对照外观形态和担孢子的观察结果, 发现样品 ZZ 表面无漆样光泽且无明显柄, 只有柄状基

部, 而样品担孢子和文献中记载的紫芝“担孢子卵圆形, 双层壁, 具明显小刺”等特征差异较大; 供试样品 SS 形态特征与文献记载树舌灵芝也有差异^[7], 样品具黑色皮壳, 基部具放射状菌丝束, 而样品担孢子亦不具备树舌灵芝“担孢子卵圆形双层壁, 外壁无色、平滑, 内壁有小刺”等特点。这表明两个样品实际上可能来源于同一种真菌, 而前期野外鉴定结果有误。

为进一步确定两个样品的来源, 本研究对样品进行了 rDNA-ITS 序列的扩增和比对。Renske Landeweert 等^[17]在对土层中外生菌根菌丝进行分子鉴定时, 提出将供试品 rDNA-ITS 序列在 GenBank 上进行 BlastN 分析, 如相似度 $\geq 99\%$, 可以鉴别为相

同种;序列相似性为95%~99%,可以鉴别为相同属;序列相似性 $\leq 95\%$,可以鉴别为相同科。两样品 rDNA-ITS 序列 BlastN 结果均为最相似物种是极硬红皮孔菌,且相似度达到99%,结合系统发育树结果,判断两样品均为极硬红皮孔菌,且两样品的子实体、担孢子显微结构与极硬红皮孔菌的特征也均一致^[18]。

4.2 分子鉴定是药用真菌疑似样品性状鉴定的重要补充

目前,对药用真菌的鉴定主要依赖传统形态鉴定,而分子鉴定是药用真菌传统性状鉴定的重要补充。在药用真菌的分子鉴定中,主要以基因组 DNA 序列片段作为分子标记,其中 ITS1 和 ITS2^[19-20]在保守性上表现为种内相对一致、种间差异明显,故 rDNA-ITS 序列适合并已成功运用于真菌种及种内系统发育分析以及物种的分子鉴定^[21-22]。然而基于 rDNA-ITS 序列分析并不能对所有真菌都精准地鉴定到属或种水平,原因主要包括:1) ITS 区序列虽然可变,但不同物种其变异程度不同,有些可能不足以用于进行属、种和居群的鉴定;2) ITS 序列分析结果受 BlastN 比对分析时所使用参考核酸数据影响,故真菌核酸数据库的不完善也可能影响鉴定的结果。因此,需要同时采用性状和分子鉴定两种手段,互相验证以保证鉴定结果的准确性。

致谢: 中国科学院微生物研究所张小青研究员对本实验中形态和显微结构鉴定提供指导,特此致谢!

参考文献

- [1] Kwon M S, Chung S K, Choi J U, et al. Antimicrobial and antitumor activity of triterpenoids fraction from *Poria cocos* Wolf[J]. J Korean Soc Food Sci Nutr, 1999, 28(5): 1029-1033.
- [2] 吕国英, 范雷法, 张作法, 等. 香菇多糖研究进展[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(2): 183-188.
- [3] 蒋继志, 石娟. 天然植物成分对几种植物病原真菌的抑制作用[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 1999, 19(2): 184-188.
- [4] 赵铭. 灰树花的抗爱滋病功效——日本药学会第 113 次年会报告[J]. 中国食用菌, 1993, 13(6): 40.
- [5] 曲晓华, 殷培峰, 浦冠勤. 中国药用真菌的研究概况[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2003(3): 22-24.
- [6] Yu Z H, Yin L H, Qian Y, et al. Effect of *Lentinus edodes* polysaccharide on oxidative stress, immunity activity and oral ulceration of rats stimulated by phenol[J]. Carbohydr Polym, 2009, 75(1): 115-118.
- [7] 赵继鼎, 张小青. 中国真菌志: 第十八卷[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 103.
- [8] Wang X C, Xi R J, Li Y, et al. The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China[J]. PloS one, 2012, 7(7): e40857.
- [9] 蔡丹凤, 陈美元, 郭仲杰, 等. 茯苓栽培菌株的 RAPD 分析[J]. 中国农学通报, 2010, 26(20): 57-60.
- [10] 李建宏. 冬虫夏草菌子实体发育起始阶段 cDNA 文库的构建及 ESTs 分析[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2013.
- [11] 林晓民, 李振岐, 王少先. 真菌 rDNA 的特点及在外生菌根菌鉴定中的应用[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 120-125.
- [12] Jiang Y, Yao Y J. ITS sequence analysis and ascomatal development of *Pseudogymnoascus roseus*[J]. Mycotaxon, 2005.
- [13] 熊涛, 肖满, 曾哲灵, 等. 松乳菇组织分离菌株的 rDNA ITS 序列分子鉴定[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 1-4.
- [14] Royse D J, Nicholson M S, Bunyard B A. Ribosomal DNA for molecular systematics and genetic analysis of populations of edible fungi[J]. The Biology and Technology of Lentinula Mushroom, 1995, 11: 121.
- [15] Bunyard B A, Chaichuchote S, Nicholson M S, et al. Ribosomal DNA analysis for resolution of genotypic classes of *Pleurotus*[J]. MycolRes, 1996, 100(2): 143-150.
- [16] 武冬梅. 新疆野生羊肚菌分子系统学和遗传多样性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [17] Landeweert R, Leeftang P, Kuyper T W, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. Appl Environ Microb, 2003, 69(1): 327-333.
- [18] 张小青, 戴玉成. 中国真菌志: 第二十九卷[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 171-173.
- [19] 辛天怡, 雷美艳, 宋经元. 中药材 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中国现代中药, 2015, 17(2): 170-176.
- [20] Liao B, Chen X, Han J, et al. Identification of commercial *Ganoderma* (Lingzhi) species by ITS2 sequences[J]. Chinese Medicine, 2015, 10: 22.
- [21] Zhang A W, Riccioni L, Pedersen W L, et al. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean[J]. Phytopathology, 1998, 88(12): 1306-1314.
- [22] 周火祥, 冯晓虎, 宋涛, 等. 一株高产油脂丝状真菌的形态学及 rDNA-ITS2 分子鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(6): 988-992.

(收稿日期 2016-11-16)