

文章编号: 1673-1689(2011)05-0793-08

不同方法鉴定桑黄真菌的比较

谢丽源¹, 张勇^{* 2}, 彭卫红¹, 甘炳成¹

(1. 四川省农业科学研究所土壤肥料研究所, 四川 成都 610066; 2. 电子科技大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610054)

摘要: 作者从形态、rDNA ITS 分子标记和成分 HPLC 指纹图谱分析鉴定供试桑黄真菌, 从不同水平相互验证鉴定结果。结果表明, 形态差异不能作为有效的鉴定证据, 成分的 HPLC 指纹分析构建的系统发育树与基于 rDNA ITS 序列构建的发育树得到结果基本相符, 均淘汰混淆菌株, 而分子标记还将其余菌株鉴定为 2 类, *P. baumii* 和 *P. linteus*, 成分分析没有明显聚类倾向, 说明成分分析可以作为菌种(株)鉴定的辅助手段, 在一定程度上有作用, 相对核酸分析而言, 不是一个准确可靠的方法。

关键词: 桑黄; 形态; rDNA ITS; 指纹图谱; 鉴定

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

Compare of Different Identifying Methods on Sanghuang

XIE Li-yuan¹, ZHANG Yong^{* 2}, PENG Wei-hong¹, GAN Bing-cheng¹

(1. Soil and Fertilizer Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China; 2. School of Life Sciences and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China)

Abstract: In this study, the different identification methods for Sang huang were compared. Sang huang was identified by modality, molecular marker and HPLC fingerprint alignment, and the identifying result was validated one another from different levels. The results showed that (1) the morphological difference of strain could not use as the index for strain identification. (2) the phylogenetic tree from HPLC fingerprint alignment and from rDNA ITS showed more consistent. (3) molecular marker identified other strains as *P. baumii* and *P. linteus*. Based on the above results, the component analysis could regard as assistant means for identifying strains, but was not exact and dependable in relative to nucleic acid analysis.

Key words: Sanghuang, modality, rDNA ITS, fingerprint alignment, identification

桑黄是担子菌亚门(*Basidiomycota*)、层菌纲(*Hymenomycetes*)、非褶菌目(*Aphyllphorales*),

收稿日期: 2010-11-09

基金项目: 四川省自然科学基金青年基金项目(2008ZQ026-072)。

作者简介: 谢丽源(1977-), 女, 四川成都人, 工学博士, 助理研究员, 主要从事农产品加工与贮藏工程方面的研究。

Email: xieliyuan77@163.com

* 通信作者: 张勇(1977-), 男, 甘肃武威人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事遗传学方面的研究。Email:

zhangyong916@126.com

锈革孔菌科 (*Hymenochaetaceae*), 针层孔菌属 (*Phellinus*) 的药用真菌^[1], 具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌、消炎、增强免疫等药理活性^[2-5], 尤其是显著的抗肿瘤活性, 近年来成为研究和开发的热点。桑黄来源于菌物的子实体, 在真菌传统形态学分类中, 菌物本身形态鉴定有一定的困难, 而且受主观因素影响较大, 使得在研究及应用中, 出现“同物异名”、“同名异物”的现象, 有些菌种保藏及生产单位并未对其研究材料作准确的鉴定, 随意给出种名, 甚至没有种名。因此, 利用形态、分子生物学技术和指纹图谱技术不同方法对 12 份不同来源的桑黄真菌进行鉴定, 从形态、分子和成分分析 3 个不同水平相互验证鉴定结果, 为桑黄真菌的准确鉴定提供保证。

1 试验材料

1.1 菌株

12 份测试菌种(株) 收集自我国各主要桑黄真菌保藏单位, 凭证标本保存于四川省农业科学院微生物研究中心, 具体信息见表 1。此外, 检索 GenBank 中登录的 3 种桑黄真菌基源物种 (*P. baumii*, *P. linteus*, *P. igniarius*) rDNA ITS 序列(去除过短、污染及低质量序列), 下载保存, 用于序列比较及系统发育分析。

表 1 桑黄真菌测试菌株

Tab. 1 Strains used for Sanghuang in this study

菌株编号	来源
<i>Phellinus</i> spp-01	武汉市周玉麟食用菌研究所
<i>Phellinus</i> spp-02	中国普通微生物保藏管理中心
<i>Phellinus</i> spp-03	山东省济宁市光大食用菌研究中心
<i>Phellinus</i> spp-04	山东省济宁市光大食用菌研究中心
<i>Phellinus</i> spp-05	华中农业大学菌种实验中心
<i>Phellinus</i> spp-06	武汉市新宇食用菌研究所
<i>Phellinus</i> spp-07	武汉市新宇食用菌研究所
<i>Phellinus</i> spp-08	山东省金乡真菌研究所
<i>Phellinus</i> spp-09	黑龙江省伊春市友好区食用菌研究所
<i>Phellinus</i> spp-10	中国农业微生物菌种保藏管理中心
<i>Phellinus</i> spp-11	四川农业科学院微生物研究中心
<i>Phellinus</i> spp-12	四川农业科学院微生物研究中心

1.2 试剂

各种引物: 由 Invitrogen(美国) 合成; Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)、dNTP(10 mM)、T4 DNA 连接酶

(25 000 U/μL)、DNA 标准相对分子量、pMD18-T Vector 克隆试剂盒: 日本 Takara 公司; UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(3.0)、电泳用琼脂糖及其他生化试剂(分析纯或分子生物学级): 上海 Sangon(中国) 产品。

1.3 仪器

BH-2 光学显微镜: 日本 Olympus 公司; 冷 CCD (Spot Rtk 7.1)、Spot Rtk 4.1 软件: 美国 Spot Diagnostic 公司; ND-1000 核酸测定仪: 美国 Nanodrop 产品; 5810R 冷冻离心机、MG 5331 PCR 仪: 德国 Eppendorf; Gibco BRL 200 多功能电泳仪: 美国 Life Technologies; Gene Genius 2 凝胶成像、Gene Snap 6.04C 软件: 英国 Syngene; -70 °C 低温冰箱: 日本 Sanyo 公司; 超净工作台、多功能杂交反应仪、恒温水槽、恒温培养箱: 均为国产设备。

2 试验方法

2.1 原始菌株形态观察

将活化菌种用接种钩挑取小块置于试管斜面上, 于 26 °C 培养 10 d, 观察并照相。挑取母种的菌丝, 压片后置于光学显微镜下观察并照相。将灭过菌的 PDA 培养基倒入 9 cm 培养皿中制成平板, 在平板中央接入块直径 5 mm 的活化菌种块, 于 26 °C 培养 10 d, 观察菌落性状。用打孔器从平板中打 5 块直径 5 mm 的活化菌种块, 接入 100 mL PDA 液体培养基中(250 mL 三角瓶), 于 120 r/min、26 °C 培养 9 d, 把菌球置于 9 cm 培养皿中, 观察并照相。

2.2 基因组 DNA 提取

从在 PDA 平板上打取 5 mm 的菌丝块, 接种到 PDA 液体培养基中, 25 °C 浅层静置培养 10 d, 收集菌丝, 无菌水漂洗 2 次, 灭菌滤纸吸干水分, -80 °C 保存。取 0.2~0.5 g 菌丝体用于基因组 DNA 提取, 参考 Murray 和 Thompson^[6] 的报道并稍作修改: 液氮中充分研磨, 转入 2 mL 离心管中, 每管加 500 μL 预热 DNA 提取缓冲液(1% CTAB、1.4 mol/L NaCl、80 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、20 mmol/L EDTA(pH 8.0)), 65 °C 保温 30 min, 期间摇动 2~3 次; 加等体积氯仿: 异戊醇(24:1), 振荡混匀, 10 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加 2 × 体积预冷无水乙醇, -20 °C 静置 60 min, 10 000 r/min 离心 10 min; 沉淀用 75% 的乙醇洗涤 2 次, 室温风干; 沉淀溶于 200 μL TE(pH 7.6), RNase (DNase-free) 至 200 mg/L, 37 °C 处理 60 min; 加等体积酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1), 振荡混匀,

10 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加等体积氯仿: 异戊醇(24: 1), 10 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 2× 体积预冷无水乙醇, 混匀, -20 °C 静置 60 min, 10 000 r/min 离心 10 min; 75% 乙醇洗涤 2 次, 室温风干, 溶于 50 μL 灭菌双蒸水。DNA 纯度和浓度以 0.8 g/dL 琼脂糖凝胶和 BioSpec-mini 分光光度仪(Shimadzu, Japan) 检测, 将基因组 DNA 稀释至 100 ng/μL, -20 °C 保存备用。

2.3 rDNA ITS 扩增及检测

参照 White^[7] 发表的 ITS 通用引物 ITS4、ITS5 及 GenBank 中登录的 *Phellinus* 属真菌 rDNA ITS 序列, 设计 ITS-PF (5'-AGTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3')、ITS-PR (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGG-3') 引物对, 由 Invitrogen 公司进行合成(Invitrogen, America)。25 μL 扩增体系包括: 1× PCR buffer(Takara, Japan)、1.5 mmol/L MgCl₂、200 μmol/L dNTPs(Sigma, America)、0.5 μmol/L 上下游引物、50 ng 基因组模板 DNA 以及 0.5 U Taq DNA 聚合酶(Takara, Japan)。以 E-Cycler 热循环仪(Bio-RAD, America) 进行扩增, PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 50 s、32 个循环; 72 °C 延伸 7 min。反应完成后, 产物中加入 6× loading buffer 5 μL 混匀, 于 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶上电泳分离, EB 染色, Bio-rad 凝胶成像系统拍照、记录结果。

2.4 rDNA ITS 序列克隆、测序及序列分析

目标产物于 1 g/dL 琼脂糖凝胶上分离, 以 PCR 纯化试剂盒进行回收。回收产物连接入 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌感受态细胞。每个样品均随机挑选 5 个阳性克隆, 采用 ABI-3730 DNA 测序仪进行双向序列测定, 测序工作委托 Invitrogen 公司进行序列信息登录 GenBank 注册。以 Guglielmo 等^[8] 公布的 *Phellinus* 属真菌 rDNA ITS 序列为参照, 对本研究测定及 GenBank 中登录的桑黄真菌基源物种的 rDNA ITS 序列进行界定, 除去 5' 端 18S rDNA 及 3' 端 28S rDNA 序列, 保留 ITS1-5.8S-ITS2 序列, 并对其进行分析。

2.5 醇溶性成分指纹图谱分析

精密称取桑黄菌丝体粉末 0.1 g, 置 50 mL 三角瓶中, 定量加入 20 mL 甲醇, 超声回流 60 min 后, 放置室温称其质量, 用甲醇补足损失的质量, 摇匀, 滤过, 取滤液备用。

色谱条件: LG-10ADHPLC 仪(岛津) 配备十八烷基硅烷键合硅胶柱 Kromasil C18 (250 mm×4.6

mm, 5 μm), LC solution 色谱数据工作站, SPD-M20A 紫外检测器, 甲醇-0.2% 醋酸水溶液(5: 95) 作为流动相, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测波长 254 nm。

2.6 基于指纹比对分析和 DNA 序列信息的比较

MEGA 4.1^[9] (Tamura et al. 2007) 对序列信息进行系统发育分析和进化树构建, 以 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离, 所有对位排列结果中的空位(gaps) 或缺失数据(missing data) 作完全删除(complete deletion) 处理。以 *Ganoderma lucidum* 为外组, 用 NJ 法构建分子进化树。

将 HPLC 全谱比较数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A (国家药典委员会) 进行相似性计算, 以 NTSYSpc 2.1 软件中 NJ 法遗传距离及构建系统发育树, 用 Mentel 法检验不同方法的相似性程度。

3 结果与分析

3.1 原始菌株形态特征分析

3.1.1 试管母种形态特征比较 将活化菌种接种于试管斜面培养 10 d, 试验结果发现从桑黄菌株母种形态特征来看, 母种颜色有细微差异, 总体上看为黄色、淡黄色、黄褐色或乳黄色, 见图 1。

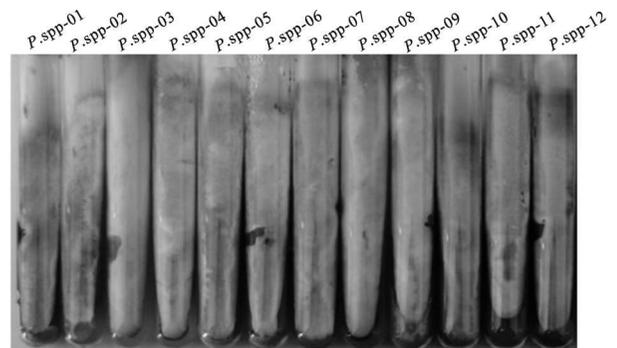


图 1 桑黄菌株试管母种形态特征

Fig. 1 Morphology of mother culture in Sanghuang strains

3.1.2 菌丝形态特征比较 挑取少量菌丝, 压片并于光学显微镜下观察。研究发现, 从菌丝形态特征上比较, 菌丝形态特征一致, 均为多分支, 可见菌丝横隔, 无锁状联合, 见图 2。

3.1.3 菌球形态特征比较 将 5 块 5 mm 的活化菌种块接入 PDA 液体培养基中, 振荡培养 9 d, 从桑黄菌株培养后的菌丝球的形态特征观察, *P. spp-04* 菌丝球表面较为光滑, 毛刺较少; 而其它菌株的菌丝球表面均长着柔软的毛刺, 但其菌球的颜色及大小有细微差别见图 3。

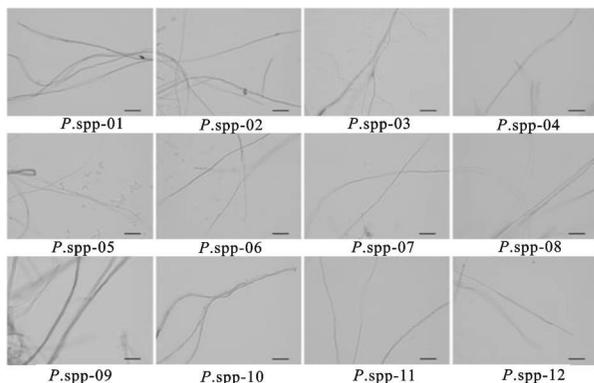


图2 桑黄菌株菌丝形态特征

Fig. 2 Morphology of vegetative hyphae in Sanghuang strains

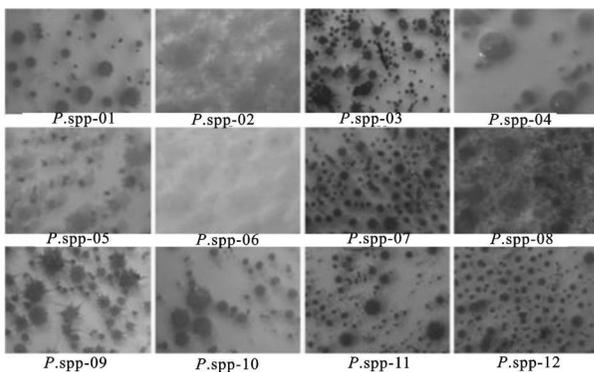


图3 桑黄菌球形态特征

Fig. 3 Morphology of mycelium pellet in Sanghuang strains

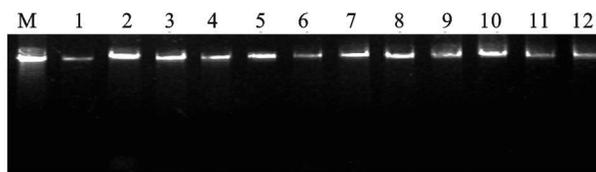
综上所述,所有引入的桑黄菌株从形态特征分析,菌丝形态间无差异;母种间有细微色泽差别;从液体培养菌丝球形态看,*P. spp-04*明显区别于其余菌株,除此之外,其余菌株间也有色泽上细微的差别,但是这些特征可能是由于遗传异质性造成,也可能是与培养环境及培养时间等外界因素有关。

3.2 桑黄基因组DNA提取及rDNA ITS序列PCR扩增

以桑黄液体静置培养菌丝体为出发材料,采用改进的CTAB法进行基因组DNA提取,所得DNA溶液紫外吸收OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.8左右,表明无RNA、蛋白质干扰,纯度较高,菌丝体DNA得率为10~20 μg/g。琼脂糖电泳结果表明,基因组DNA主带清晰,DNA片段大小在30 kb以上,无拖尾、降解现象,样品间均匀一致,见图4。这说明采用该法提取桑黄基因组DNA质量好、产量高,完全能满足后续PCR扩增对样品基因组DNA质量的要求。

以桑黄菌丝体基因组DNA为模板,ITS-PF/ITS-PR为引物,进行PCR扩增。扩增产物经1.0

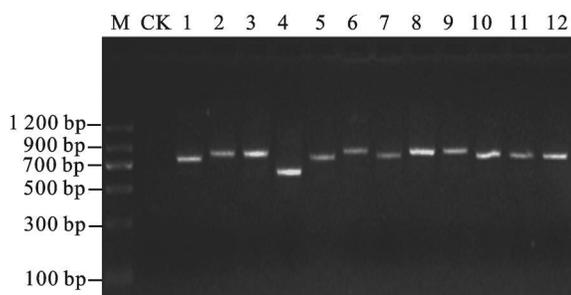
g/dL琼脂糖电泳分析,检测到特异性扩增片段,其中*P. spp-04*扩增片段和其余菌株相比明显较短,其余11个测试样品扩增产物长度在730~810 bp之间,见图5。



M. λ 基因组DNA; 1 *P. spp-01*; 2 *P. spp-02*; 3 *P. spp-03*; 4 *P. spp-04*; 5 *P. spp-05*; 6 *P. spp-06*; 7 *P. spp-07*; 8 *P. spp-08*; 9 *P. spp-09*; 10 *P. spp-10*; 11 *P. spp-11*; 12 *P. spp-12*

图4 桑黄样品基因组DNA提取电泳检测结果

Fig. 4 Result of electrophoresis analysis of genomic DNA isolated from Sanghuang



M. 标准DNA相对分子质量; CK. 空白对照; 1 *P. spp-01*; 2 *P. spp-02*; 3 *P. spp-03*; 4 *P. spp-04*; 5 *P. spp-05*; 6 *P. spp-06*; 7 *P. spp-07*; 8 *P. spp-08*; 9 *P. spp-09*; 10 *P. spp-10*; 11 *P. spp-11*; 12 *P. spp-12*

图5 桑黄样品rDNA ITS序列扩增电泳检测结果

Fig. 5 Result of electrophoresis analysis of PCR amplified product of Sanghuang rDNA ITS sequences

3.3 桑黄真菌rDNA ITS序列分析

对桑黄rDNA ITS扩增目标位点进行回收、克隆、测序,结果表明。本研究分析的12个桑黄样品序列精确长度分别为637 bp(*P. spp-04*)、772 bp(*P. spp-01*、05、07、10、11、12)、811 bp(*P. spp-03*、06、08、09)和812 bp(*P. spp-02*)。通过GenBank数据库BLAST比对,除*P. spp-04*外,测定的桑黄菌株序列与GenBank中已登录的*Phellinus*属真菌rDNA ITS序列显示较高的序列相似性,其中*P. spp-02*、03、06、08、09与*P. baumii*的rDNA ITS序列显示最高的同源性比对结果,*P. spp-01*、05、07、10、11、12与*P. linteus*的rDNA ITS序列显示最高的同源性比对结果,*P. spp-04*与*P. baumii*、*P. linteus*及*P. igniarius*的rDNA ITS序列同源性均不显著。依据Guglielmo等^[8]公布的*Phellinus*属真菌rDNA ITS序列为参照,对本文测定及

GenBank 中登录的 3 种桑黄基源菌种 (*P. baumii*、*P. linteus*、*P. igniarius*) 的 rDNA ITS 序列进行界定, 除去 5' 端 18S rDNA 及 3' 端 28S rDNA, 仅对 ITS1-5.8S-ITS2 区域序列进行分析。结果表明, 桑黄真菌 rDNA ITS 序列长度区别明显, 其中 ITS1-5.8S-ITS2 区域序列总长度分别为 708~710 bp (*P. baumii*)、668~671 bp (*P. linteus*)、594~619 bp (*P. igniarius*); ITS1 序列长度分别为 308~310 bp (*P. baumii*)、281~283 bp (*P. linteus*)、214~233 bp (*P. igniarius*); 5.8S 序列长度完全一致, 均为 160 bp; ITS2 序列长度分别为 240~241 bp (*P. baumii*)、227~229 bp (*P. linteus*)、217~226 bp (*P. igniarius*)。进一步对 rDNA ITS 序列的碱基构成进行分析, 发现源自不同桑黄真菌的 rDNA ITS 序列中 ITS1 及 ITS2 的 GC 含量明显相异, ITS1 GC 含量分别为 48.7%~49.4% (*P. baumii*)、46.6%~47.2% (*P. linteus*)、47.6%~51.5% (*P. igniarius*), ITS2 GC 含量分别为 49.6%~49.8% (*P. baumii*)、51.1%~51.8% (*P. linteus*)、47.9%~51.6% (*P. igniarius*), 5.8S GC 含量完全一致, 均为 46.3%。这与 rDNA ITS 序列长度变异相一致。作者测定的 12 株桑黄真菌中, rDNA ITS 区域存在明显差异, 明显区分为 3 类: 1) *P. spp-02*、*03*、*06*、*08*、*09* 的 ITS1 和 ITS2 序

列长度分别为 308 bp (ITS1)、240 bp (ITS2), GC 含量为 48.7% 或者 49% (ITS1)、49.6% (ITS2), 与 *P. baumii* 在 rDNA ITS 序列长度及碱基构成方面基本一致; 2) *P. spp-04* 的 rDNA ITS 区域构成较为特殊, ITS1、ITS2 序列长度分别为 182 bp、193 bp, GC 含量分别为 48.9%、46.1%, 与 3 种桑黄基源菌种及其余 11 株测试桑黄真菌明显相异; 3) *P. spp-01*、*05*、*07*、*10*、*11*、*12* 的 rDNA ITS 区域构成基本相同, ITS1 和 ITS2 序列长度分别为 282 bp、227 bp, GC 含量分别为 46.8%、51.5%, 与 *P. linteus* 基本一致。

3.4 桑黄真菌醇溶性成分的 HPLC 指纹图谱分析

对定量称取的桑黄样品的醇溶性成分的 HPLC 指纹图谱进行分析和比较, 可以发现: 12 个桑黄菌株以及灵芝的出峰时间主要集中在 3~7 min 之间, 而 3.5~5 min 出峰最多。12 个菌株间存在少部分相同的出峰时间, 说明其含有一定的相同成分, 但是, 其出峰面积全不相同, 说明其含量不同。但不同菌株更多的是具有完全不同的出峰时间, 说明含有的成分差异较大。因此, 从保留时间和出峰面积上看, 测试桑黄样品 HPLC 指纹图谱均不相同, 有一定的相似性, 但同时也存在一些差异, 并且和灵芝的醇溶性成分也存在一些共性, 见图 6。

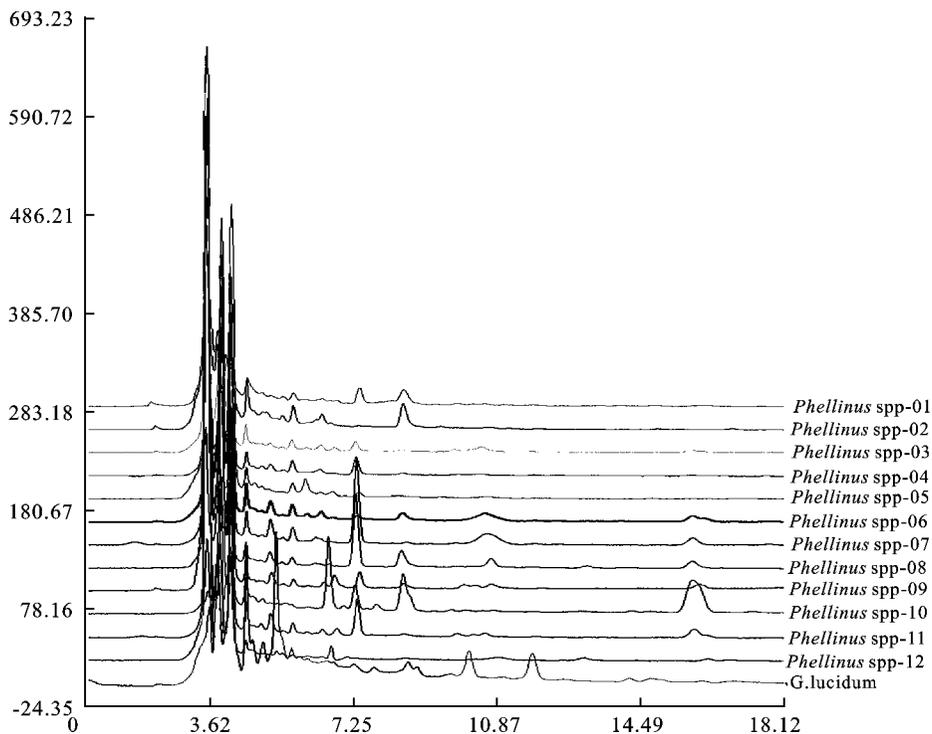


图 6 基于桑黄真菌醇溶成分 HPLC 指纹图谱比对分析

Fig. 6 HPLC fingerprint alignment of Sang huang

3.5 不同桑黄菌株基于醇溶成分指纹比对分析和DNA序列信息的比较

依据桑黄醇溶成分 HPLC 指纹比对及 rDNA ITS 序列分析结果, 分别计算不同菌株间遗传距离, 表 2。依据 rDNA ITS 序列分析可知, 12 个菌株间的遗传距离值在 0.000~0.605 之间, *P. spp-04* 与其余 12 个菌株的遗传距离最大, 为 0.586~0.605, 大于 *P. spp-04* 与外组灵芝的遗传距离 0.203, 除 *P. spp-04* 外的其余 11 个桑黄菌株间的遗传距离非常小, 均为 0.000 或 0.024。基于 HPLC 醇溶性成分指纹比对分析, 12 个菌株的遗传距离值处于 0.003~0.656 之间, *P. spp-04* 与其余 12 个菌株的遗传距离仍最大, 为 0.376~0.656, *P. spp-04* 与灵芝的遗传距离 0.448 处于这个区间, 而其余 11 个桑黄菌株间的遗传距离在 0.003~0.324, 最大值为 *P. spp-04* 和 *P. spp-01* 的遗传距离, *P. spp-05* 与 *P. spp-10* 的遗传距离最小。依据 Meantel 检测, 两者的 $R=0.8768$, $P=0.001000000$, (1000 permutations), 由此可知, 基于醇溶性成分的 HPLC 指纹

图谱和 DNA 序列分析得到的遗传距离具有显著相关性, 一定程度上可以互相作为验证。

将两种不同方法得到的遗传距离应用 NJ 法构建系统发育树见图 7。左边图为根据 HPLC 指纹分析构建的系统发育树, 右图为基于 rDNA ITS 序列构建的系统发育树。从基于 rDNA ITS 序列构建的系统发育树分析, 供试 12 个桑黄菌株明显聚为 3 个类群, I 组由 *P. spp-01*、05、07、10、11、12 构成, *P. spp-02*、03、06、08、09 聚为 II 组, *P. spp-04* 明显有别于 I 组和 II 组, 而与外组的灵芝显示了相对较高的遗传相似性并聚为一类。从基于 HPLC 指纹分析构建的系统发育树分析, 供试菌株明显可分为两组, *P. spp-04* 与灵芝聚为一组, 其余菌株聚为一组, 而组内不同菌株遗传距离较大, 没有成组相聚倾向, 通过参考 DNA 序列信息, 进一步可分成两组, *P. spp-05*、01、12、10、11、07 聚为 I 组, *P. spp-03*、08、09、02、06 聚为 II 组, 其菌株组合构成与基于 rDNA ITS 序列一致。

表 2 基于 rDNA ITS 序列及 HPLC 指纹分析的桑黄真菌遗传距离分析

Tab. 2 Genetic distance based on rDNA ITS and HPLC fingerprint of Sanghuang

	<i>G. lucidum</i>	<i>P. spp-01</i>	<i>P. spp-02</i>	<i>P. spp-03</i>	<i>P. spp-04</i>	<i>P. spp-05</i>	<i>P. spp-06</i>	<i>P. spp-07</i>	<i>P. spp-08</i>	<i>P. spp-09</i>	<i>P. spp-10</i>	<i>P. spp-11</i>	<i>P. spp-12</i>
<i>G. lucidum</i>	0.000	0.477	0.231	0.356	0.448	0.412	0.269	0.362	0.309	0.294	0.387	0.368	0.399
<i>P. spp-01</i>	0.562	0.000	0.201	0.066	0.656	0.026	0.240	0.036	0.105	0.149	0.023	0.025	0.064
<i>P. spp-02</i>	0.580	0.024	0.000	0.089	0.492	0.129	0.071	0.102	0.047	0.095	0.115	0.092	0.178
<i>P. spp-03</i>	0.580	0.024	0.000	0.000	0.583	0.014	0.150	0.023	0.014	0.154	0.014	0.024	0.080
<i>P. spp-04</i>	0.203	0.586	0.605	0.605	0.000	0.625	0.376	0.550	0.535	0.480	0.600	0.582	0.549
<i>P. spp-05</i>	0.562	0.000	0.024	0.024	0.586	0.000	0.197	0.021	0.037	0.157	0.003	0.012	0.061
<i>P. spp-06</i>	0.580	0.024	0.000	0.000	0.605	0.024	0.000	0.112	0.119	0.103	0.172	0.148	0.221
<i>P. spp-07</i>	0.562	0.000	0.024	0.024	0.586	0.000	0.024	0.000	0.041	0.107	0.013	0.014	0.072
<i>P. spp-08</i>	0.580	0.024	0.000	0.000	0.605	0.024	0.000	0.024	0.000	0.129	0.035	0.036	0.096
<i>P. spp-09</i>	0.580	0.024	0.000	0.000	0.605	0.024	0.000	0.024	0.000	0.000	0.127	0.093	0.155
<i>P. spp-10</i>	0.562	0.000	0.024	0.024	0.586	0.000	0.024	0.000	0.024	0.024	0.000	0.006	0.051
<i>P. spp-11</i>	0.562	0.000	0.024	0.024	0.586	0.000	0.024	0.000	0.024	0.024	0.000	0.000	0.057
<i>P. spp-12</i>	0.562	0.000	0.024	0.024	0.586	0.000	0.024	0.000	0.024	0.024	0.000	0.000	0.000

注: 对角线以下是依据 ITS 序列计算, 对角线以上是依据 HPLC 醇溶性成分指纹分析计算

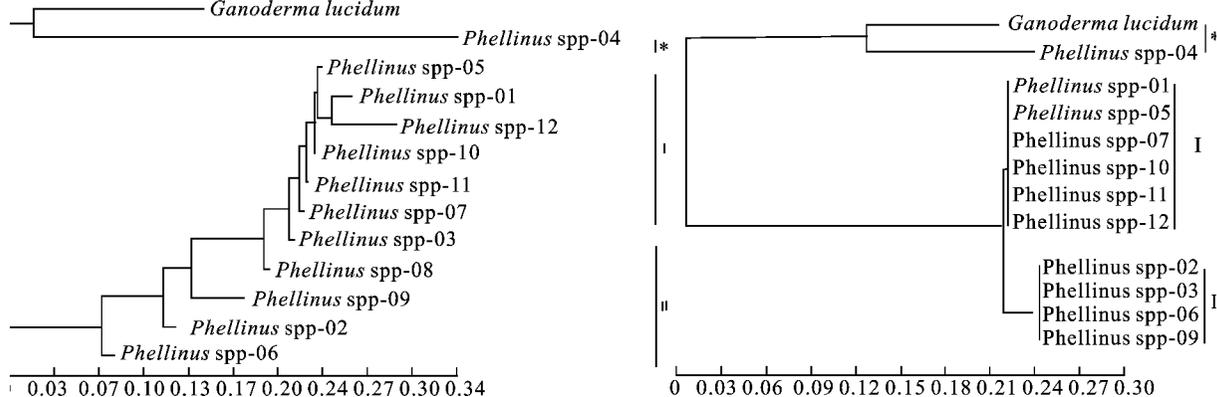


图 7 基于桑黄真菌 rDNA ITS 序列及 HPLC 指纹分析的 NJ 系统发育树

Fig. 7 NJ phylogenetic tree based on rDNA ITS and HPLC fingerprint of Sanghuang

4 结 语

长期以来真菌鉴定主要依据其子实体形态特征、生长特性以及理化指标为基础,而桑黄真菌物种间子实体形态差异较小,同时培养条件下难以获得子实体,鉴定工作较为困难。近年来大型真菌桑黄成为研究和开发的热点,但关于桑黄真菌的确切基源物种,在研究及应用领域却依然没有定论。已有的研究中,认定为桑黄基源物种的真菌超过7种,均为 *Phellinus* 属真菌,其中研究较多的为 *P. baumii*、*P. linteus* 和 *P. igniarius*。从不同菌株形态特征比较发现,不同桑黄菌株在菌丝形态上没有显著差异,均为有隔菌丝,无锁状联合。母种形态特征间有细微色泽差异。菌球形态特征比较发现,*P. spp-04* 与其余菌株形态上有显著差异,除此之外,其余菌株之间也存在差异,但这些差异杂乱无序,而且此类性状差异并不稳定,极易受到生长环境、发育时期等外界因素的影响,甚至在前期研究还发现,在培养过程中同一菌株在不同培养条件、不同生长发育时期出现了不同的外观形态性状。据此可知,不同桑黄菌株菌丝体培养阶段所表现出的形态差异并不能作为有效的菌株鉴定证据。

随着分子生物学及其相关技术的迅速发展,已被广泛应用于多种真菌的鉴定工作中,而 rDNA ITS 序列分析技术由于其 ITS rDNA 区域进化速率较快,表现出广泛的序列多态性,针对上游(18S rDNA)、下游(28S rDNA)保守序列设计引物,通过 PCR 扩增、序列测定便可实现样品的分子鉴定,适用于不同分类水平的物种鉴定及系统发育研究,被更为广泛的应用。对 12 份桑黄真菌 rDNA ITS 位点进行 PCR 扩增,通过电泳检测已经明显区分出 1 份疑似菌种 *P. spp-04*,其余 11 份材料扩增片段分布在 730~810 bp 范围内,且可大致分为两类。通过克隆测序及序列比对,小片段样品 *P. spp-01*、05、07、10、11、12(772 bp)与 *P. linteus* 显示最高的序列相似性,而大片段样品 *P. spp-03*、06、08、09(811 bp)和 *P. spp-02*(812 bp)与 *P. baumii* 显示最

高的序列相似性。通过对 ITS1+5.8S-ITS2 区域序列进行分析发现,不同桑黄真菌 rDNA ITS 区域在序列长度、碱基构成方面区别明显,这与前人的研究结果相一致^[10-13]。依据 rDNA ITS 序列信息构建 NJ 系统发育树,12 份桑黄真菌明显区分,独立成组。综合桑黄真菌 rDNA ITS 序列长度变异、碱基构成差异及系统发育分析的结果,我们可以明确对测试的 12 份桑黄真菌样品进行种级分类单元的鉴定:1) *P. spp-04* 与这 3 种已知的桑黄真菌基源物种(*P. baumii*、*P. linteus*、*P. igniarius*)明显相异,可以明确将其鉴定为混淆菌种;2) 将 *P. spp-02*、03、06、08、09 鉴定为 *P. baumii*;3) 将 *P. spp-01*、05、07、10、11、12 鉴定为 *P. linteus*。

成分分析是目前大型真菌及其中药鉴定应用比较广泛的一种方法,对桑黄真菌醇溶性成分的 HPLC 指纹图谱进行分析表明成分分析可以作为菌种(株)鉴定的一种辅助手段,12 个菌株从 HPLC 出峰时间上看,没有任何两个菌株的出峰时间和出峰面积完全一致,由此从组成成分分析,可以认为 12 个菌株为完全不同菌株。根据出峰时间和出峰面积计算不同菌株的遗传相似性并构建系统发育树,从发育树分析,从直观上可以非常明显的将不同桑黄真菌分为 2 类,*P. spp-04* 与外组灵芝聚为一类,基本上将其鉴定为疑似菌株。除此而外,在系统发育树上的分支没有明显分组聚内倾向,但是在参考 DNA 系统进化树情况下,可分为两组,其构成与 ITS 序列构建的进化树一致,这与遗传距离的相关性相一致,同时也反映了在测定遗传距离差异性的表现。据此成分分析方法虽在一定程度上有作用,相对核酸分析而言,不是一个准确可靠的方法。

目前多种大型真菌在子实体或菌丝形态上都比较相似,如果在使用过程中种质误用、滥用将会为后续食品的开发利用带来危害。因此,对物种进行鉴定从保证食品本身的安全性、控制食品质量的稳定以及高效利用方面具有非常重要的意义,这为后续产品的开发奠定了物质基础。

参考文献(References):

- [1] 张小青,戴玉成. 中国真菌志[M]. 北京:科学出版社,2005:117-191.
- [2] Kang D G, Cao L H, Lee J K, et al. Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by the butanol extract of *Phellinus igniarius* in isolated rat aorta[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2006, 34(4): 655-665.
- [3] Cho E J, Hwang H J, Kim S W, et al. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob/ob mice[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75

(6): 1257– 1265.

- [4] ZHU Tong-bo, KIM S H, CHEN Chang-yuan. A medicinal mushroom: *Phellinus linteus* [J]. **Curr Med Chem**, 2008, 15 (13): 1330– 1335.
- [5] 宋爱荣, 王光远, 赵晨, 等. 火针层孔菌(桑黄)粗多糖对荷瘤小鼠的免疫调节研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 295– 298.
- SONG Ai-rong, WANG Guang-yuan, ZHAO Cheng, et al. Immunological regulation of *Phellinus igniarius* crude polysaccharides to tumor bearing mice[J]. **Mycosystema**, 2009, 28(2): 295– 298.
- [6] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. **Nucleic Acids Research**, 1980, 8 (19): 4321– 4325.
- [7] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. New York: Academic Press Inc, 1990.
- [8] Guglielmo F, Bergemann S E, Gonthier P, et al. A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2007, 103(5): 1490– 1507.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. **Molecular Biology and Evolution**, 2007, 24(8): 1596– 1599.
- [10] 李海波, 吴学谦, 王立武, 等. 青藏高原黄绿蜜环菌纯培养菌种的分离培养及分子鉴定[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 873– 883.
- LI Hai-bo, WU Xue-qian, WANG Li-wu, et al. Pure culture isolation, cultivation and molecular identification of *Armillaria luteo-virens* from Tibet Plateau[J]. **Mycosystema**, 2008, 27(6): 873– 883. (in Chinese)
- [11] Alaei H, De Backer M, Nuytinck J, et al. Phylogenetic relationships of *Puccinia horiana* and other rust pathogens of *Chrysanthemum x morifolium* based on rDNA ITS sequence analysis[J]. **Mycological Research**, 2009, 113(6/ 7): 668– 683.
- [12] Tedersoo L, Suvi T, Jairus T, et al. Revisiting ectomycorrhizal fungi of the genus *Alnus*: differential host specificity, diversity and determinants of the fungal community[J]. **The New Phytologist**, 2009, 182(3): 727– 735.
- [13] Lim Y W, Lee J S, Jung H S. Type studies on *Phellinus baumii* and *Phellinus linteus* [J]. **Mycotaxon**, 2003, 85: 201– 202.
- [14] 鄢嫣, 聂少平, 陈奕, 等. 灵芝氯仿提取物的 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 589– 597.
- YAN Yan, NIE Shao-ping, CHEN Yi, et al. Study on HPLC fingerprint of chloroform extract of *ganoderma lucidum* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 589– 597. (in Chinese)