

文章编号:2095-7386(2016)02-0030-06

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.02.005

武陵山区四株真菌的分离与初步鉴定

何聪聪, 邓 威, 梅运军

(武汉轻工大学 化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘 要:从武陵山区分离到4株真菌,并对4株真菌的ITS序列进行了扩增与测序,MEGA6软件构建了真菌ITS序列系统发育树。从构建的系统发育树得知菌株HBM1、HBM2和菌株HBM3遗传关系较近,三者隶属*Schizophyllum commune*,菌株HBM4隶属*Irpex lacteus*。

关键词:真菌;ITS;系统发育树;裂褶菌;白囊耙齿菌

中图分类号:Q 93-331

文献标识码:A

Isolation and primary identification of four fungi from Wuling mountainous area

HE Cong-cong, DENG Wei, MEI Yun-jun

(School of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: Four fungi isolates were isolated from soil and their ITS sequences were amplified, sequenced and phylogenetically analyzed to identify species of the isolates. The result showed that the genetic distances of isolate HBM1, HBM2 and HBM3 were closer, all of three were belonged to *Schizophyllum*; the isolate HBM4 was classified as *Irpex lacteus*.

Key words: fungus; ITS; phylogenetic tree; *Schizophyllum*; *Irpex lacteus*

1 引言

真菌是自然界广泛分布的一类真核生物,是一种宝贵的自然资源,具有重要的食用及药用价值。目前已记载的食药真菌大约有2 500种,国内报道的食药真菌约1 000种。已探明的具有明显药效的真菌为400余种,而真正作为药物使用的仅20-30种^[1-2]。因此,分离、筛选和鉴定真菌对丰富真菌种质资源具有十分重要的意义。

在真菌的分类鉴定中,传统的真菌鉴定主要依据形态学、抗原构造、生理生化等特点,由于出发点

和依据不同,常出现分类难以统一;而随着真菌DNA条形码技术的出现,如将核糖体DNA内转录间隔区(ITS)引入到真菌的分类鉴定中,由于该分类鉴定不受个体形态特征、发育阶段的影响,能客观准确区分物种,且操作便捷,因此在真菌的分类鉴定中得到了广泛应用^[3-6]。

本研究旨在从自然土样中分离食药真菌,并通过真菌ITS序列对其进行分类鉴定,为丰富食药真菌的种质资源,进一步的开发利用真菌资源奠定一定的基础。

收稿日期:2016-03-01 修回日期:2016-04-20.

作者简介:何聪聪(1990-),女,硕士研究生,E-mail: hecongcongwh@163.com.

通讯作者:梅运军(1975-),男,博士,副教授,E-mail: meiyunjun_2000@163.com.

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划资助项目(D20151704).

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株来源

菌株分离自武陵山区湖南省张家界与湖北省恩施州交界处土样,分离所得 4 株真菌编号为 HBM1、HBM2、HBM3、HBM4。

2.1.2 培养基

PDA 固体培养基:200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、12 g 琼脂、1000 mL 蒸馏水、121 °C 灭菌 25 min、pH 自然。PDA 液体培养基不加琼脂,其它成分与处理方式与 PDA 固体培养基一致。

2.1.3 仪器

Eppendorf Mastercycler PCR 仪(艾本德,德国)。

2.1.4 试剂

引物及 PCR 扩增试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司;其它试剂购自国药集团,均为分析纯。

2.2 实验方法

2.2.1 真菌分离与纯化

取土壤样品 10 g 投入盛有 90 mL 无菌水的三角瓶中,并向三角瓶中投入 10 粒粒径大约 5 mm 灭菌玻璃珠,经充分震荡后梯度稀释至 10^{-4} 。取上述各梯度的稀释液 50 μ L 涂布于含 PDA 培养基的平板上,28 °C 倒置培养至长出单菌落。挑取单菌落再次于 PDA 培养基上纯化培养直至无杂菌。

2.2.2 DNA 提取

从平板上用接种铲接种 1 cm $\times$ 1 cm 纯化真菌种子至盛有 PDA 的液体培养基三角瓶中 180 r/min, 28 °C 培养 6 d。真菌 DNA 提取参照文献^[7,8]。

2.2.3 PCR 扩增真菌 ITS 序列

本实验选择 ITS1 和 ITS4 为真菌 ITS 扩增引物^[9]。以上述抽提的 DNA 为模板,ITS1 (5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3') 为引物进行 PCR 扩增。PCR 总体系为 25 μ L,具体组成为 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,dNTP (2.5 mmol/L) 0.5 μ L,引物 (5 μ mol/L) 各 1 μ L,Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L (5 U/ μ L),无菌水 19 μ L,模板 0.5 μ L。PCR 反应条件依次为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,52 °C 复性 45 s,72 °C 延伸 90 s,共 30 个循环;72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.4 测序与系统发育树构建

PCR 扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果用 Blast 软件比对 GenBank

上核苷酸序列并选择相似度高的序列。将测序得到的 ITS 序列与高度相似序列用 CLUSTALX 软件生成 fasta 序列格式,然后运用 MEGA6 软件分别构建 Neighbor-Joining (NJ) 系统发育树、Maximum Likelihood (ML) 发育树以及 Minimum-Evolution (ME) 系统发育树。根据 Felsenstein^[10]所使用的方法将发育树拓扑结构的评估参数 bootstrap 值设置为 1000。

3 结果与分析

3.1 菌株的培养特征

从武陵山区湖南省张家界与湖北省恩施州交界处土壤样品中分离到 4 株菌落形态各异的真菌菌株,分别编号为 HBM1、HBM2、HBM3、HBM4,如图 1 所示。其中菌株 HBM1 在 PDA 培养基上于 28 °C 恒温条件下培养 7 d 后,菌落表面为白色绒状,菌丝密集,气生菌丝明显且菌丝较长,基质白色;菌株 HBM2 在 28 °C 下,在 PDA 培养基上培养 7 d 之后,菌丝稀疏且在培养基中呈白色、辐射状,基质白色;HBM3 菌丝生长缓慢,菌落白色绒状,基质白色;HBM4 菌落白色呈绒毡状,菌丝密集较短,基质白色。

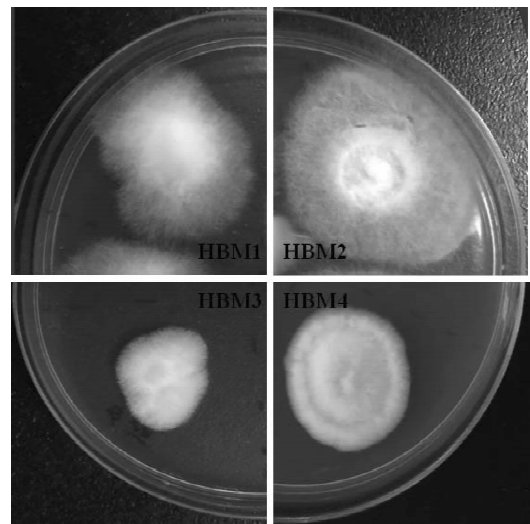


图 1 4 株真菌的菌落形态

3.2 ITS 序列系统发育树的构建

经测序后,得到菌株 HBM1、HBM2、HBM3 和 HBM4 的 ITS 序列长度分别为 597、597、597 和 635 bp,在 GenBank 上的登录号分别为 KU726503、KU726504、KU726505、KU726506。分别将所测得的序列进行 Blast 比对后构建系统发育树。

3.2.1 菌株 HBM1、HBM2 及 HBM3 ITS 序列系统发育树的建立及分析

菌株 HBM1、HBM2 及 HBM3 之间 ITS 序列经多

重比对其相似性为 99%, 仅有 1—2 个位点核苷酸不同, 分别位于 ITS1 区和 ITS2 区。此外, 三者 ITS 序列分别于 NCBI 上经 Blast 比对, 结果显示 HBM1、HBM2 及 HBM3 ITS 序列与 *Schizophyllum* 属菌株的相似性最高, 达到了 99%。由于该属的菌种种类过少, 为了加强发育树的稳定性, 选取分数最高的四个 ITS 序列相似性为 100% 的菌株 *Schizophyllum commune* (KJ588263.1)、*Schizophyllum commune* (FJ372688.1)、*Schizophyllum commune* (KP202299.1)、*Schizophyllum commune* (KP202296.1), 并结合该属的其他菌株构建 NJ 系统发育树, 如图 2 (显示节点值 ≥ 50 , 图中括号内的标注为相应菌株 rDNA 在 GenBank 中的登录号)。由图 2 可知, 菌株 HBM1、HBM2 及 HBM3 与裂褶菌 *Schizophyllum com-*

mune 的四个菌株形成了一个稳定的分支 (节点值为 85), 表明这三株菌与 *Schizophyllum commune* 亲缘关系最近; 但三者发育树中的进化地位有所差别, 序列 ITS 序列不完全相同, 这可能是存在种间变异, 可能为 *Schizophyllum commune* 的不同亚种。ML 与 ME 系统发育树也显示 HBM1、HBM2 及 HBM3 具有类似的进化关系, 如图 3 和图 4 所示。根据 Renske Landeweert 等对真菌的分子分类鉴定原则, 即通过 ITS 区域比对, 序列相似性 $\geq 99\%$, 可判定为相同种; 序列相似性在 95%—99% 之间, 可判定为相同属; 序列相似性 $\leq 95\%$, 可判定为相同科^[6-7]。因此根据 ITS 同源性及其系统发育树的结果, 菌株 HBM1、HBM2 和 HBM3 都隶属于 *S. commune*。

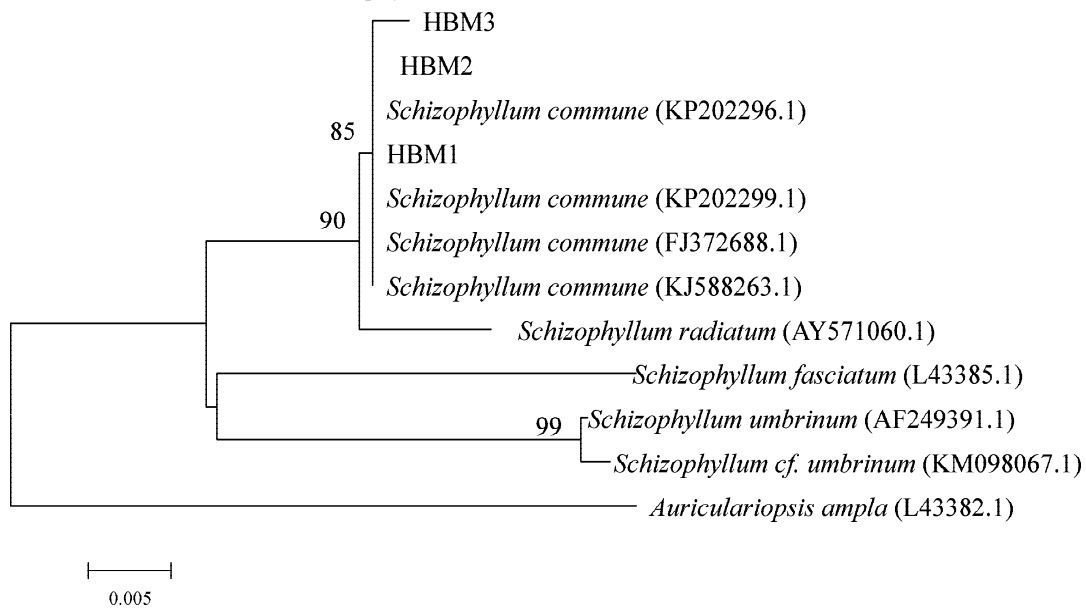


图2 HBM1、HBM2 和 HBM3 及其参考菌株的 rDNA ITS 序列的 NJ 系统发育树

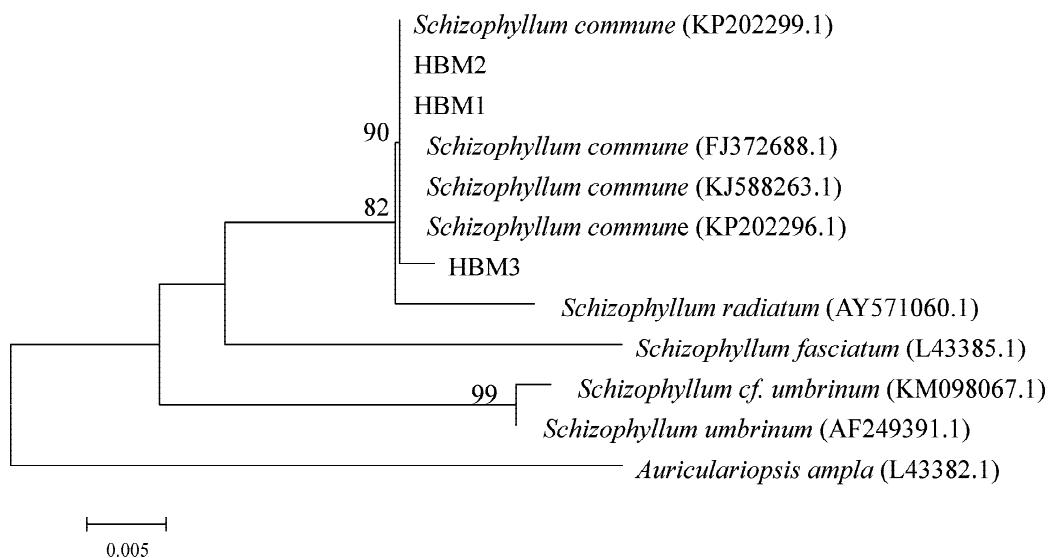


图3 HBM1、HBM2 和 HBM3 及其参考菌株的 rDNA ITS 序列的 ML 系统发育树

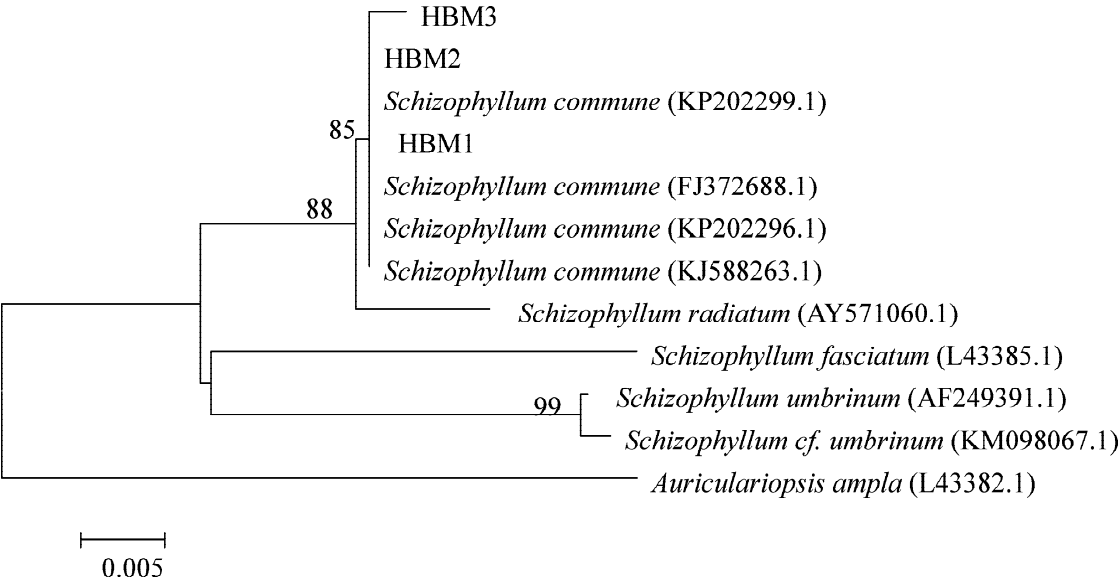


图4 HBM1、HBM2 和 HBM3 及其参考菌株的 rDNA ITS 序列的 ME 系统发育树

3.2.2 菌株 HBM4 ITS 序列系统发育树的建立及分析

菌株 HBM4 ITS 序列测序结果在 NCBI Blast 比对后,结果显示 HBM4 的 ITS 序列与白囊耙齿菌属 *Irpex* 的序列相似性最高(99%);在序列相似性 $\geq 99\%$ 的 ITS 序列中 *Irpex* 属菌株所占的比例约为 99%。由于该属的菌种类过少,为了加强发育树的稳定性,选取分数最高的四个 ITS 序列相似性为 100% 的白囊耙齿菌 *Irpex lacteus* JX311924. 1、HM992801. 1、JX290573. 1 及 JX290578. 1,并结合该

属的其他菌种构建 NJ 系统发育树,如图 5(显示节点值 ≥ 50)。由图 5 可知,菌株 HBM4 与白囊耙齿菌 *Irpex lacteus* 的四个菌株形成了一个稳定的分支(节点值为 99)表明 HBM4 与白囊耙齿菌 *Irpex lacteus* 亲缘关系最近,在进化上应属于同一亚类群。构建的 ML、ME 系统发育树结果基本一致,如图 6 和图 7。根据 Renske Landeweert 等对真菌的分子分类鉴定原则,结合 ITS 与系统发育树的结果,HBM4 隶属于白囊耙齿菌 *Irpex lacteus*。

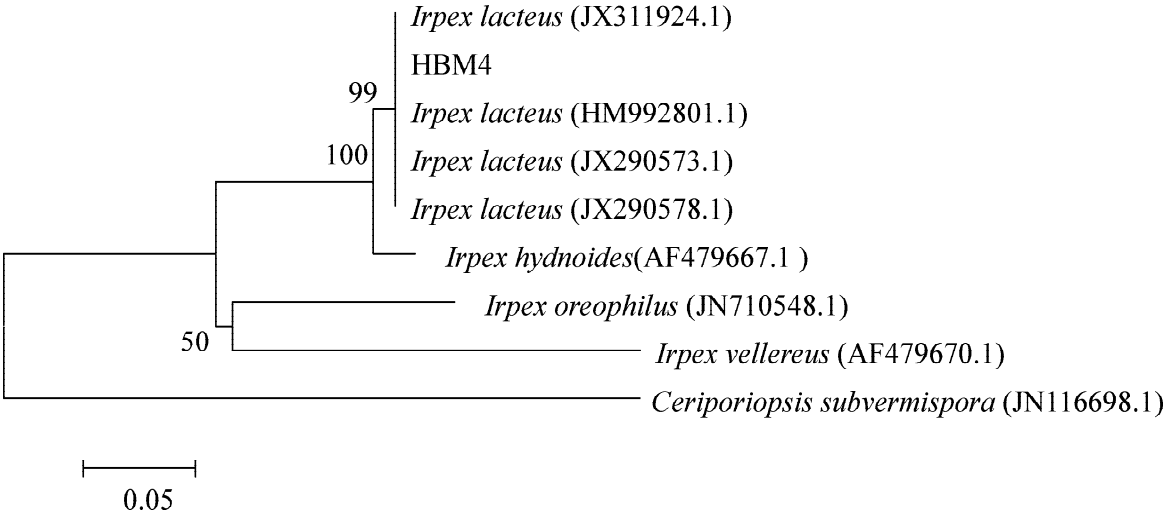


图5 HBM4 及其参考菌株的 rDNA ITS 序列的 NJ 系统发育树

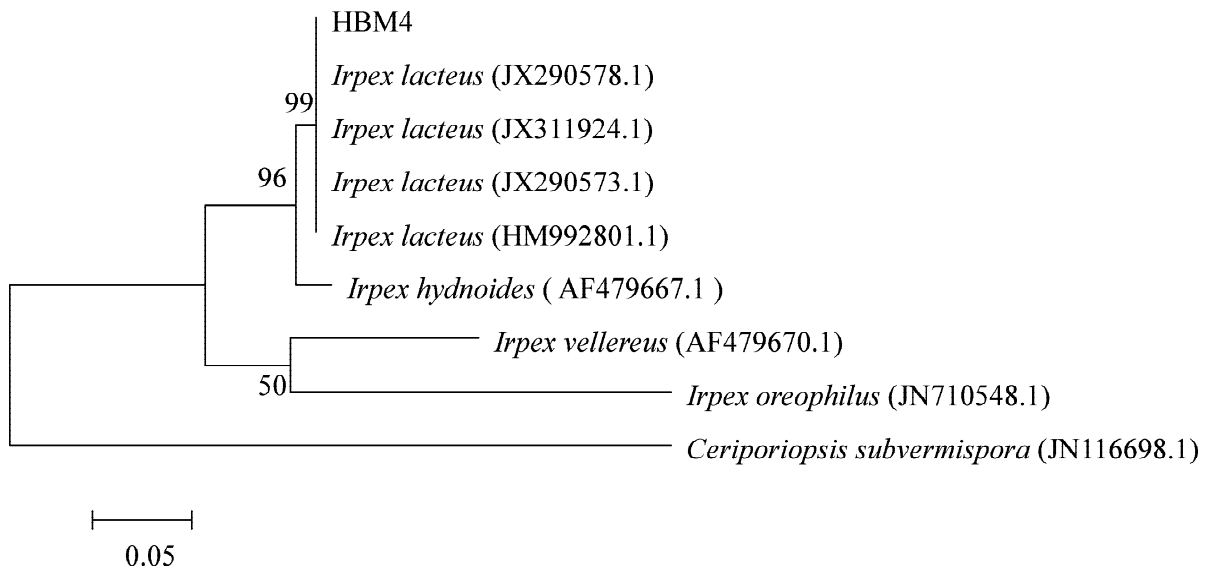


图6 HBM4 及其参考菌株的 rDNA ITS 序列的 ML 系统发育树

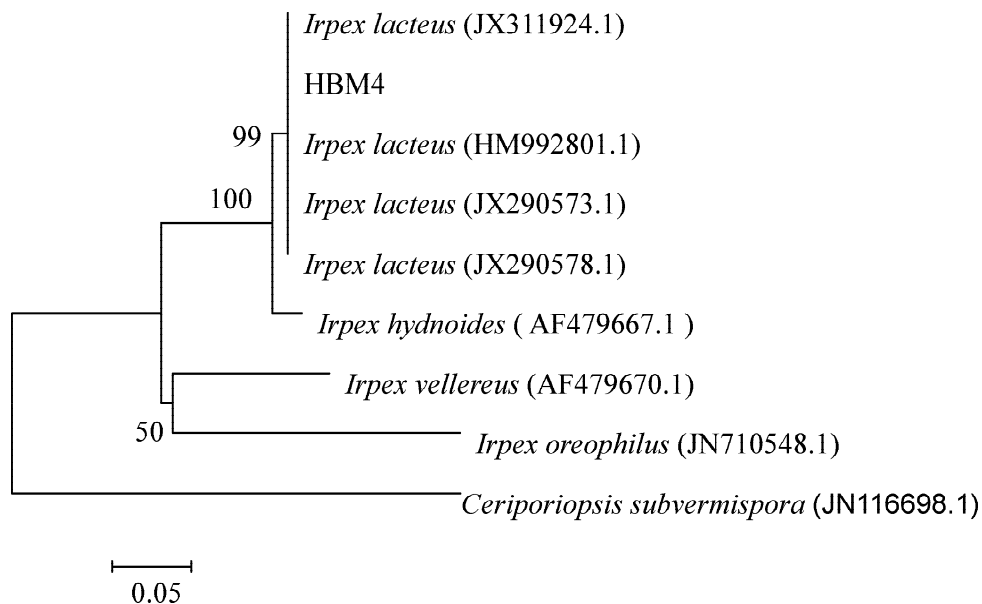


图7 HBM4 及其参考菌株的 rDNA ITS 序列的 ME 系统发育树

4 结束语

本研究从土壤样品中分离与纯培养到4株有益真菌,利用真菌 ITS 序列通过 MEGA6 软件分别构建了 NJ、ML、ME 系统发育树。初步鉴定 HBM1、HBM2 及 HBM3 三株菌隶属于裂褶菌 (*S. commune*),而 HBM4 则隶属于白囊耙齿菌 (*I. lacteus*)。该研究对丰富和发掘我国真菌资源具有一定的意义,但后续的研究和开发还需要进一步的深。

参考文献:

- [1] Brower A Z, DeSalle R, Vogler A P. Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1996, 27(1): 423-450.
- [2] Ciardo D E, Schar G, Bottger E C, et al. Internal Transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeast [J]. J Clin Microbio, 2006, 44(1): 77-84.
- [3] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3785-3786, 3792.
- [4] Gardes M, Bruns T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application

- to the identification of *mycorrhizae adnrusts* [J]. Mol Ecol, 1993, 2(2):113-118.
- [5] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4):783 - 791.
- [6] Vakalounakis D J, Fragkiadakis G A. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber; Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting [J]. Phytopathology, 1999, 89 (2): 161-168.
- [7] 王琢, 闫培生. 真菌毒素产生菌的分子鉴定研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2010, 12 (5):42-50.
- [8] Cuong V, Bachmann T T, Schmid R D. Development of a dipstick immunoassay for quantitative determination of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid in water, fruit and urine samples [J]. Fresenius J Anal Chem, 1999, 364(6): 584-589.
- [9] Campa D, Tavanti A, Gemignani F, et al. DNA microarray based on arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 909-915.
- [10] 谢丽源, 张勇, 彭金华, 等. 桑黄真菌分子鉴定及遗传多样性分析 [J]. 菌物学报, 2010, 29(3): 347-356.
-
- (上接第 21 页)
- [37] Noble A C, Ebeler S E. Use of multivariate statistics in understanding wine flavor [J]. Food Reviews International, 2002, 18(1): 1-2.
- [38] Grosch W. Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis [J]. Trends in Food Science and Technology, 1993, 4(3): 68-73.
- [39] Singh S, Hines E L, Gardner J W. Fuzzy neural computing of coffee and tainted water data from an electronic nose [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1996, 30(3): 185-190.
- [40] GB2730-2005 腌腊肉制品卫生标准 [S].
- [41] 王新惠, 张鉴, 王卫, 等. 四川腌腊肉制品食用安全性分析 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(24):49-52.
- [42] 张雪娇, 唐道邦, 肖更生, 等. 市售广式腊肉理化指标间的相关性分析 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 82-85.
- [43] 王芳兵, 刘以娟, 唐书泽, 等. 一种新的肉及肉制品酸价测定方法 [J]. 广州农业科学, 2012, 39(13): 119-121.
- [44] 刘永强. 氧化变质程度指标的商榷 [J]. 肉类工业, 2005, (11): 38-40.
- [45] 李贺楠, 时宏霞, 李莹莹, 等. 传统腌腊肉制品酸价和过氧化值指标适用性 [J]. 肉类研究, 2014, 28(1): 17-21.
- [46] 彭杨, 熊俊君. 我国传统腊肉在腌制过程中品质的分析监测 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(16): 5250-5257.
- [47] 马长伟, 张松山, 刘欢, 等. 对反映腌腊肉制品脂肪氧化酸败程度指标的探讨 [J]. 肉类研究, 2007, 21(6): 4-6.
- [48] Emami A, Fathim H, Ganjkanlou M, et al. Effects of dietary pomegranate seed pulp on oxidative stability of kid meat [J]. Meat Science, 2015, 104:14-19.
- [49] 王艳, 刘昌华, 章建浩, 等. 强化高温风干工艺对中式培根脂质分解氧化的影响 [J]. 食品科学, 2013, 34(11):77-82.
- [50] 孙群. 肉制品脂类氧化: 硫代巴比妥酸试验测定醛类物质 [J]. 食品科学, 2002, 23 (8): 331-334.