

ITS 序列分析鉴定大型真菌在生物学野外实习中的应用

俞皓鸣, 蔡毅鸣, 王珂, 程源九, 肖义平, 王英明^(✉), 张文驹, 乔守怡

1. 生物科学国家级实验教学示范中心(复旦大学), 上海, 200433
2. 复旦大学生命科学学院, 上海, 200433

摘要:以西天目山地区采集的大型真菌标本为研究对象,探讨在野外实习中用 ITS (internal transcribed spacer) 序列分析鉴定大型真菌的可行性和实验方案。方法:在野外采集大型真菌标本,在实习基地内提取基因组 DNA,回校后在实验室内进行 PCR 扩增,用获得的 ITS 序列 Blast 得到同源序列,用 Mega6 软件构建系统发生树进行鉴定。结论:选用野外采集的大型真菌标本 76 个,其中 66 个标本 PCR 扩增成功,59 个标本鉴定到种或属。上述结果表明通过优化实验方案,在野外实习中采用 ITS 序列鉴定大型真菌是可行的。

关键词:西天目山,大型真菌,ITS 序列,鉴定,野外实习

The Application of Identification of Macrofungi Using ITS Sequence Analysis to the Biology Field Practice

YU Hao-ming, CAI Yi-ming, WANG Ke, CHENG Yuan-jiu, XIAO Yi-ping, WANG Ying-ming^(✉), ZHANG Wen-jun, QIAO Shou-yi

1. National Demonstration Center for Experimental Biology Education (Fudan University), Shanghai 200433, China
2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

1 引言

西天目山位于浙江省临安市,森林覆盖率 95% 以上,是国家级自然保护区,环境优越,物种资源丰富,是国内 20 多所高校的生物学野外实习基地。

大型真菌,是指子实体较大,能用肉眼直接观察的真菌。大型真菌中有很多价值较高的食用

菌和药用菌,如灵芝 (*Ganoderma lingzhi*)、黑木耳 (*Auricularia heimuer*) 和糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*),而误食毒蘑菇,如毒鹅膏菌 (*Amanita phalloides*),是最重要的食源性死亡原因。此外,大型真菌是生态系统中重要的分解者,观察森林生态系统中大型真菌的种类、生境和分布,对于学生感受自然和认识生态系统具有不可替代的作用^[1-4]。因此,同动物学、植物学野外实习一样,大型真菌的野外实习也是生物学野外实习的重要内容,很多高校逐步引入了大型真菌的野外实习内容,但大型真菌的鉴定是教学难点。

和其他生物类似,大型真菌是根据宏观形态、显微形态和遗传特征进行分类和鉴定的。大型真菌种类

收稿日期:2018-05-27;修回日期:2018-08-27

基金项目:国家基础学科人才培养基金项目(J1210012);上海市教委本科教学质量和教学改革计划

通讯作者:王英明, E-mail: yingming_w@fuolan.edu.cn

众多,但子实体的宏观形态不如动植物的宏观形态特征显著、丰富和稳定,孢子和菌丝等结构的显微形态特征观察操作繁琐,工作量较大,还需要一定的专业技能和经验,因此,根据形态进行大型真菌的鉴定,难度大,准确性也难以保证。与之相反,遗传学特征稳定、客观,鉴定准确。真菌的 ITS 序列,包括 rDNA 内部转录间隔区 ITS1 (internal transcribed spacer 1) 和 ITS2 (internal transcribed spacer 2),两者分别位于核糖体 rDNA 的 18S、5.8S 和 5.8S、28S 之间(图 1),多拷贝,长度为 300~1 000 bp,种内高度保守,种属间差异明显,引物通用性强,扩增成功率高,这些特点使 ITS 成为真菌首选的 DNA “条形码”,广泛应用于真菌物种鉴定及系统发生学分析^[5]。

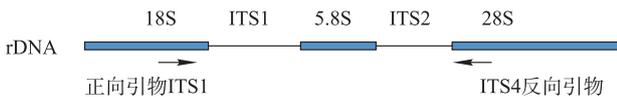


图 1 真菌的 ITS 序列及引物示意图

因此,为了研究野外实习中应用 ITS 序列分析鉴定大型真菌的可行性,探索分子生物学技术和生物信息学方法引入野外实习的方案,2017 年夏在天目山进行生物学野外实习时,我们采用 ITS 序列分析方法,对采集到的真菌标本进行了鉴定,并对相关问题进行了探讨。

2 设备、材料和试剂

提取基因组 DNA 用设备、材料和试剂:冰箱、200 μL 微量移液器及 tip、水浴锅、吹风机、匀浆棒、单面刀片、一次性手套、1.5 mL 离心管、载玻片、*TransDirect Plant Tissue PCR Kit* 的 PD1 溶液和 PD2 溶液。

PCR 扩增用设备、材料和试剂:PCR 仪、核酸电泳装置、DNA 凝胶成像仪、冰箱、微量移液器(10 μL 、200 μL)及 tip、电泳缓冲液 TAE、溴乙锭溶液(EB, 5 mg/mL)、DNA marker DL2000、2 \times *TransDirect PCR SuperMix*、引物 ITS1 和 ITS4 (20 $\mu\text{mol/L}$)。

引物 ITS1 序列:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'。

引物 ITS4 序列:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

3 实验方法和步骤

实验的主要流程见图 2。

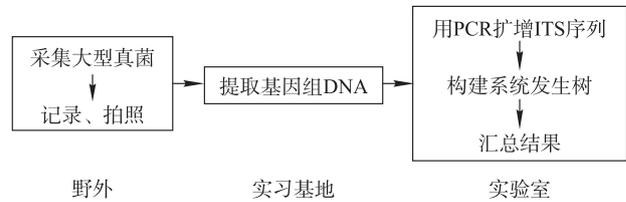


图 2 用 ITS 序列分析鉴定大型真菌流程图

3.1 大型真菌标本采集和基因组 DNA 提取

2017 年 7 月 1 日至 10 日,在浙江天目山的天目村、红庙和开山老殿等处采集大型真菌子实体标本,记录生境、基物和形态特征,拍照。把子实体装在纸袋中,做好标记,带回实习基地,晾在通风干燥处,直至提取样本或进一步处理。提取 DNA 时,先尽量除去标本表面泥土和杂物,然后用吹风机常温吹标本 2 min,再将标本放在载玻片上,用单面刀片切下适量标本。将切下来的样品约 30 mg 收集于 1.5 mL 离心管中,然后加入 150 μL PD1 溶液,用研磨棒将样品尽量研磨成糊状,置于沸水中加热 2 min,再次研磨,继续加热 10 min。取出 1.5 mL 离心管,冷却至室温,最后加入 150 μL PD2 溶液,混匀,得到大型真菌的基因组 DNA,即 PCR 的模板,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。野外实习结束后带回实验室,冰箱(-20 $^{\circ}\text{C}$)中保存。

3.2 样本 ITS 序列扩增

PCR 体系为模板 3 μL 、引物 ITS1 1 μL ,引物 ITS4 1 μL 和双蒸水 20 μL ,最后加入 2 \times *TransDirect PCR SuperMix* 25 μL ,混匀。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s) \times 35 循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,16 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,结束。PCR 产物电泳,在 DNA 凝胶成像仪上观察和拍照,符合预期相对分子质量的单一条带样品送生物技术公司测序。部分标本第一轮 DNA 提取和 PCR 扩增没有得到目的条带,则在实验室进行第二轮 DNA 提取和 PCR 扩增。此外,还选择了部分标本重复提取基因组 DNA 并进行 PCR 扩增,以确认方法的可靠性及用于干燥标本进行 ITS 鉴定的可行性。

3.3 序列分析和系统发生树的构建

PCR 产物送生物技术公司测序,测序引物用

ITS1 和 ITS4。结果序列在 NCBI 上进行 Blast, 根据同源性高的真菌学名检索图片和形态学描述, 判断扩增得到的序列是相应大型真菌标本的 ITS 序列, 还是污染的其他真菌 ITS 序列。

下载 NCBI 上的同源序列, 选择部分序列, 用 Mega6 软件构建系统发生树, 使用邻接法 (neighbor-joining, NJ 法) 和最大简约法 (maximum parsimony, MP 法) 两种方法, 测试的重复数 (number of replicates) 选择 500 次, 最终根据分支处的 bootstrap 值的大小确定采集标本与报道标本的亲缘关系, 确定鉴定结果, 并整理全部结果。

4 结果和讨论

4.1 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

提取大型真菌基因组 DNA 方法很多, 大都是将样品在液氮中研磨, 然后用 CTAB 破壁, 再离心获得含 DNA 的上清, 最后过柱分离基因组 DNA, 工作量较大, 耗时长, 不适于在野外实习时处理大量样品。因此采用 *TransDirect Plant Tissue PCR Kit*, 适量标本加 PD1, 研磨后加热裂解, 再加 PD2 溶液中和, 即得到基因组 DNA。提取的 DNA 在 4℃ 可以稳定保存数月, 适合野外实习时在实习基地内提取基因组 DNA, 缺点是不能用电泳直接检测。

野外采集的样本, 当天提取 DNA, 剩余材料晾干保存, 带回实验室, 如 PCR 失败则在实验室再次提取和扩增, 以尽可能得到 ITS 序列。按照子实体形态和质地, 大型真菌可以分为子囊菌类、胶质菌类、珊瑚菌类、多孔菌类 (含革菌、齿菌)、伞菌类、牛肝菌类、鸡油菌类和腹菌类 8 类^[1], 绝大部分多孔菌、部分腹菌和部分子囊菌质地较硬, 其余的大型真菌质地都比较软。对于质地较软的大型真菌, 如伞菌类、盘菌类、珊瑚菌类、胶质菌类、牛肝菌类和腹菌类中的鬼笔, 子实体的切割和研磨都比较容易, 裂解产物黏稠; 多孔菌类和部分炭角菌科 (*Xylariaceae*) 子实体较硬, 需要仔细切成粉末再研磨, 裂解液变化不明显; 秃马勃属 (*Calvatia*)、马勃属 (*Lycoperdon*) 和硬皮马勃属 (*Scleroderma*) 等腹菌类的成熟子实体主要是孢子粉, 裂解后无明显变化, 幼嫩子实体裂解效果同伞菌类似。

在此次野外实习过程中, 选择采集的大型真菌

标本 76 份, 经两轮基因组 DNA 提取和 PCR 扩增, 67 份标本得到了符合预期相对分子质量的条带, 成功率为 88.2%。扩增失败的 9 份标本, 其中 3 份根据形态特征判断属于子实体已经成熟的腹菌类, 5 份为老旧标本, 1 份为较新鲜的伞菌标本。由于样品迅速腐烂, 该伞菌仅在实习基地提取 DNA 一次, 多次 PCR 扩增未成功。部分标本的 ITS 扩增后电泳结果见图 3, PCR 产物的相对分子质量和产量符合预期。

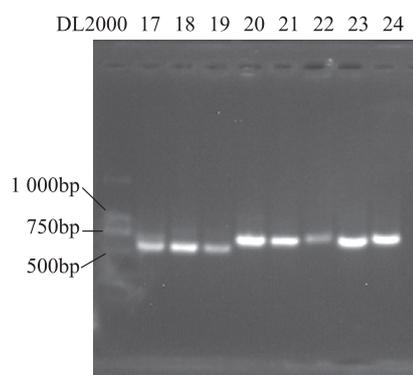


图 3 部分标本的 ITS 序列扩增结果

4.2 测序和鉴定

67 份标本的 PCR 扩增产物送生物技术公司测序, 7 份测序失败 (出现双峰), 原因可能是标本质量不好或提取效率不高; 60 份标本获得了测序结果, 根据序列比对、构建系统发生树 (TMS17-36 标本 NJ 法进化树见图 4), 并结合形态特征, 59 份标本经 ITS 序列分析鉴定到属或种, 分属于 2 门 4 纲 9 目 27 科 35 属, 结果汇总见表 1; 另一个标本的 ITS 序列与菌寄生属真菌 (*Hypomyces* sp.) 高度同源, 该标本表面有明显的真菌菌丝, 推测是标本感染的菌寄生属真菌比子实体的 DNA 提取效率更高, 因此被扩增。需要说明的是, 需要谨慎选择 Blast 到的同源序列, 尽量避免选择标本鉴定错误的 ITS 序列。

根据宏观形态特征, 对于熟悉的大型真菌一般可以鉴定到科, 但是进一步的鉴定则比较困难, 而 ITS 序列则可以比较准确地鉴定到属, 有少部分标本可以根据 ITS 和子实体形态迅速鉴定到种, 如白杯状囊泡杯伞 (*Singerocybe alboinfundibuliformis*) 和大链担耳 (*Sirobasidium magnum*), 但大部分标本不能鉴定到种, 如鹅膏属 (*Amanita*) (见图 5) 和红菇属 (*Russula*), 这是因为 ITS 序列对很多大型真菌不能

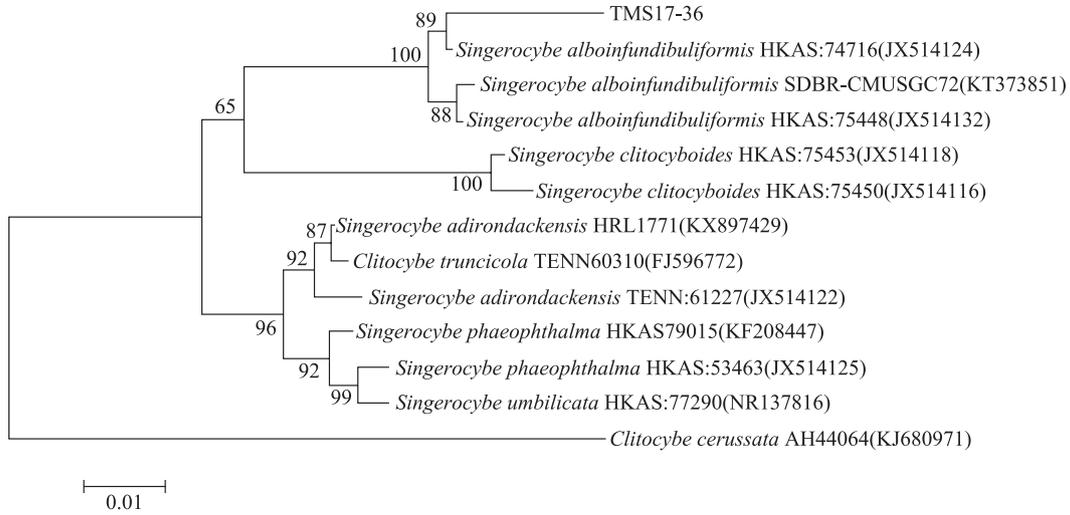


图 4 用 ITS 序列构建的 TMS17-36 系统发生树 (NJ, 重复数 500)

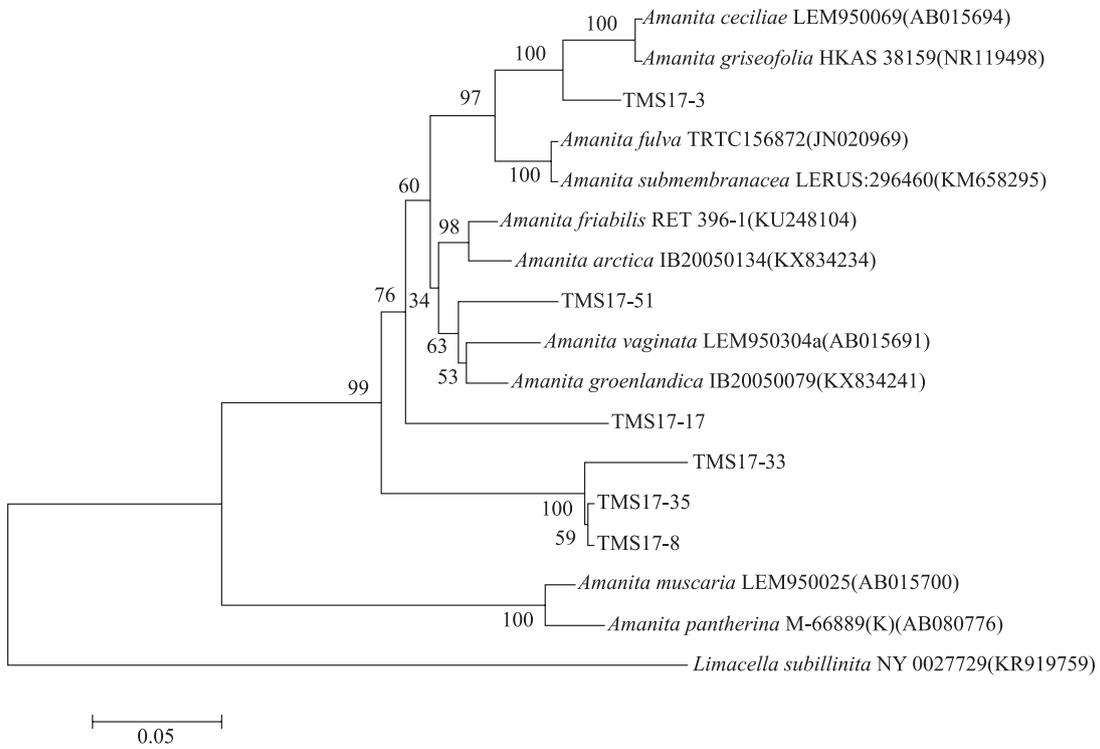


图 5 用 ITS 序列构建的 6 个鹅膏属标本系统发生树 (NJ 法, 重复数 500)

把近缘种有效区分, 同时数据库中序列的可靠性和完整性不能保证。

4.3 重复实验

选择了 9 份完好的伞菌标本 [包括拟锁瑚菌

属 (*Clavulinopsis*)、蜡蘑属 (*Laccaria*)、小皮伞属 (*Marasmius*)、锁瑚菌属 (*Clavulina*)、乳菇属 (*Lactarius*)、红菇属 (*Russula*) 和白杯状囊泡杯伞标本各 1 种、裸脚菇属 (*Gymnopus*) 标本 2 种], 在实验室重新提取 DNA 并进行 PCR 扩增, 测序结果与第一次相同, 说明在标本完好的情况下, 将标本带

表 1 部分标本的 ITS 序列鉴定结果

Phylum 门	Class 纲	Order 目	Family 科	Genus 属
Basidiomycota 担子菌门	Agaricomycetes 伞菌纲	Agaricales 伞菌目	Agaricaceae 伞菌科	<i>Agaricus</i> 蘑菇属
				<i>Leucocoprinus</i> 白鬼伞属
				<i>Leucoagaricus</i> × 2* 白环蘑属
				<i>Lycoperdon</i> 马勃属
			Amanitaceae 鹅膏科	<i>Amanita</i> × 5 鹅膏属
			Clavariaceae 珊瑚菌科	<i>Clavulinopsis</i> 拟锁瑚菌
			Cortinariaceae 丝膜菌科	<i>Cortinarius</i> 丝膜菌属
			Entolomataceae 粉褶菌科	<i>Entoloma</i> 粉褶菌属
			Hydnangiaceae 轴腹菌科	<i>Laccaria</i> × 2 蜡蘑属
			Hymenogastraceae 层腹菌科	<i>Psilocybe</i> 裸盖伞属
			Inocybaceae 丝盖伞科	<i>Crepidotus</i> × 2 靴耳属
				<i>Inocybe</i> × 2 丝盖伞属
			Marasmiaceae 小皮伞科	<i>Gerronema</i> 老伞属
				<i>Marasmius</i> × 2 小皮伞
			Omphalotaceae 类脐菇科	<i>Gymnopus</i> × 3 裸脚菇属
			Physalaciaceae 泡头菌科	<i>Xerula</i> 干蘑属
			Pleurotaceae 侧耳科	<i>Hohenbuehelia</i> 亚侧耳属
			Pluteaceae 光柄菇科	<i>Pluteus</i> 光柄菇属
			Psathyrellaceae 小脆柄菇科	<i>Psathyrella</i> 小脆柄菇属
			Strophariaceae 球盖菇科	<i>Pholiota</i> 环锈伞属
		Tricholomataceae 口蘑科	<i>Singerocybe</i> 囊泡杯伞属	
		Boletales 牛肝菌目	Gyroporaceae 圆孢牛肝菌科	<i>Gyroporus</i> 圆孢牛肝菌属
			Boletaceae 牛肝菌科	<i>Tylopilus</i> 粉孢牛肝菌属
		Cantharellales 鸡油菌目	Clavulinaceae 锁瑚菌科	<i>Clavulina</i> × 2 锁瑚菌属
		Phallales 鬼笔目	Phallaceae 鬼笔科	<i>Phallus</i> × 2 鬼笔属
		Polyporales 多孔菌目	Polyporaceae 多孔菌科	<i>Perenniporia</i> 卧孔菌属
				<i>Polyporus</i> 多孔菌属
		Russulales 红菇目	Russulaceae 红菇科	<i>Lactarius</i> × 3 乳菇属
<i>Russula</i> × 6 红菇属				
Tremellomycetes 银耳纲	Tremellales 银耳目	Sirobasidiaceae 链担耳科	<i>Sirobasidium</i> 链担耳属	
Ascomycota 子囊菌门	Pezizomycetes 盘菌纲	Pezizales 盘菌目	Helvellaceae 马鞍菌科	<i>Helvella</i> × 2 马鞍菌属
	Sordariomycetes 粪壳菌纲	Hypocreales 肉座菌目	Cordycipitaceae 虫草科	<i>Isaria</i> 棒束孢属
			Ophiocordycipitaceae 线虫草科	<i>Ophiocordyceps</i> 线虫草属
		Xylariales 炭角菌目	Xylariaceae 炭角菌科	<i>Xylaria</i> × 2 炭角菌属

说明: ①按照 indexfungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>) 的系统进行分类。

② *Leucoagaricus* × 2*, 表示标本中有白环蘑属 (*Leucoagaricus*) 的两个种, 其余含义与此相同。

回实验室提取 DNA 进行鉴定也是可行的。

4.4 注意事项

根据本次实验的经验,在野外实习时,用 ITS 序列分析鉴定大型真菌时应注意如下几点:

(1) 对含水量较高、容易腐败的大型真菌标本,如鬼笔类、鬼伞类和牛肝菌类,尽量在实习基地提取基因组 DNA,并且每个标本至少提取 2 次。多孔菌类、炭角菌类、硬皮马勃和含水量较低的伞菌,如红菇属 (*Russula*)、蜡蘑属 (*Lactarius*) 和小皮伞属 (*Marasmius*),可以带回实验室进行 DNA 提取。

(2) 提取 DNA 的标本应尽量新鲜。陈旧腐败标本采用这个简便方法提取的基因组 DNA 可能无法扩增或测序有多重峰。

(3) 注意提取 DNA 时的污染问题,台面保持洁净或垫上报纸,戴一次性手套操作,单面刀片需要清洗干净,其余材料均为一次性。

(4) Blast 后根据同源序列真菌的形态特征,判断扩增序列的可靠性。选择来源可靠的 ITS 序列,构建进化树。

5 结语

西天目山大型真菌资源比较丰富,已经报道过 500 多种^[2, 6-10]。本工作中,76 个大型真菌标本中的 59 个至少鉴定到属,少部分可以鉴定到种,白杯状囊泡杯伞等以前未见报道;另外一些大型真菌,如黑色的鹅膏菌 TMS17-35 虽然不能鉴定到种,但子实体形态和天目山已经报道的鹅膏菌显著不同。

生物学野外实习的主要内容是采集制作标本,并依据宏观形态特征分类和鉴定。大型真菌实习作为生物学野外实习的重要组成部分,用子实体形态进行鉴定是教学难点,短时间内学生难以掌握。用 ITS 序列鉴定则具有准确、通用等优点,但传统的实验方案不适合野外实习。根据实际情况,设计实验方案,即在野外基地热裂解提取基因组 DNA,回校后进行后续工作,77.6% (59/76) 的大型真菌标本至

少鉴定到属,鉴定结果和子实体形态特征吻合,表明在生物学野外实习中引入分子生物学和生物信息学教学,进行大型真菌 ITS 序列鉴定的可行性。这一探索,有助于解决实习中大型真菌的鉴定难题,拓展野外实习的内容,使教学内容更接近于科学研究。

致谢: 我们衷心地感谢复旦大学天目山野外实习的老师和同学提供的支持和帮助,特别感谢陆帆老师在天目山野外实习期间提供的全方位后勤保障。

参考文献

- [1] 李玉,李泰辉,杨祝良,等.中国大型菌物资源图鉴[M].郑州:中原农民出版社,2015.
- [2] 袁生.天目山微生物学野外实习手册[M].北京:高等教育出版社,2010.
- [3] 顾新伟,何伯伟.浙南山区大型真菌[M].浙江:浙江科学技术出版社,2012.
- [4] 吴兴亮,戴玉成,李泰辉,等.中国热带真菌[M].北京:科学出版社,2011.
- [5] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHDORF 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.
- [6] 苏俐英.西天目山自然保护区的大型真菌[J].浙江林学院学报,1996,13(1):53-57.
- [7] 俞彩珠,陈继团,钱银岳,等.西天目山自然保护区大型真菌资源初步调查[J].浙江林学院学报,1989,6(3):320-326.
- [8] 陈锡林.浙江西天目山药用真菌资源调查研究初报[J].现代应用药学,1996,13(1):22-24.
- [9] 陈锡林.浙江西天目山药用真菌资源调查研究再报[J].现代应用药学,1997,14(2):13-15.
- [10] CUI BK, DAI YC. Polypores from Tianmushan Nature Reserve in Zhejiang Province, eastern China [J]. Mycology and Pythopathology, 2007, 41 (6): 506-514.

(责编 李光跃 张磊)