



用于灵芝属 10 个物种快速鉴定的 DNA 条形码筛选与验证* 二号黑体

高萌¹, 肖世俊^{1,3}, 李明焱², 熊晖², 李振皓^{2**}, 韩雪容^{1**} 四号仿宋

1. 吉林农业大学食用菌新种质资源创制国际联合研究中心, 长春 130118; 2. 浙江寿仙谷植物药研究院有限公司, 杭州 321000; 3. 嘉兴市经济菌物新种质资源创制重点实验室, 嘉兴 334000 五号楷体

小五黑体 摘要: 灵芝栽培品种常出现同名异物或同物异名的现象, 依赖于灵芝的形态学特征鉴定物种的传统分类方法不足以鉴定物种的种间和种内差异。为开发简便而准确的分子水平灵芝属物种鉴定方法, 以常用于种属鉴定的核糖体内转录间隔区(ITS)、微管蛋白基因(β -tubulin)片段、大亚基核糖体 DNA(LSU)片段和基因编码 RNA 聚合酶 II 第二大亚基(RPB2)片段 4 个 DNA 条形码, 对灵芝属 10 个物种的 44 份菌株进行 PCR 扩增和测序, 比较 4 个条形码的扩增成功率和变异率, 根据种内、种间遗传距离差异分析筛选特异性的 DNA 条形码间隔(DBG), 并利用单独及联合条形码构建系统发育树验证筛选的 DBG 鉴定灵芝属物种的准确性。研究结果表明: β -tubulin 和 LSU 片段的 PCR 扩增成功率均达 100%, ITS 和 RPB2 片段分别为 95.35% 和 90.91%; 对比 ITS 和 LSU 片段, β -tubulin 和 RPB2 片段的种内最大遗传距离分别小于各自的种间最小遗传距离, 存在明显的 DBG, 有利于准确对物种进行种间鉴定; 利用 ITS、 β -tubulin 和 RPB2 片段分别构建的系统发育树均能使灵芝属 10 个物种的所有个体聚为 1 个单系分支, 而 LSU 片段不能准确区分所有供试菌株。与其他 3 种条形码综合相比, β -tubulin 片段更适用于灵芝属种间鉴定。小五仿宋

小五黑体 关键词: 灵芝属; 快速鉴定; β -tubulin 片段; 遗传距离; 条形码间隔 小五仿宋

小五黑体 中图分类号: Q949.329 小五仿宋 文献标志码: A 文章编号: 1672-3538(2023)1/2/3-0214-11

DOI: 10.13341/j.jfr.2023.1590

引文格式: 高萌, 肖世俊, 李明焱, 等. 用于灵芝属 10 个物种快速鉴定的 DNA 条形码筛选与验证[J]. 菌物研究, 2023, 21(1/2/3): 214-224.

DNA Barcode Screening and Validation for the Rapid Identification of Ten Species of the *Ganoderma* 四号 Times New Roman 加粗

GAO Meng¹, XIAO Shijun^{1,3}, LI Mingyan², XIONG Hui², LI Zhenhao^{2**}, HAN Xuerong^{1**} 四号 黑正体

1. International Cooperation Research Center for New Germplasm Breeding of Edible Mushrooms, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Zhejiang Shouxiangu Botanical Medicine Research Institute Co., Ltd., Hangzhou 321000, China; 3. Jiaxing Key Laboratory of New Germplasm Resources Creation for Economic Fungi, Jiaxing 334000, China 五号 白斜

五号 黑体 Abstract: *Ganoderma* cultivars often have homonymous foreign bodies or different names. Traditional classification methods based on morphological characteristics of *Ganoderma* are not enough to

六号黑体 * 基金项目: 吉林省科技发展计划国际合作项目(20210402047GH), 吉林省科技发展计划项目(20220202109NC), 吉林农业大学校企合作项目(GF20190034) 六号宋体

作者简介: 高萌, 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子菌物学。

收稿日期: 2022-10-26

** 通信作者: 李振皓, E-mail: zhenhao6@126.com; 韩雪容, E-mail: hanxuerong@jlau.edu.cn

identify interspecific and intraspecies differences of species. It is very important to develop simple and accurate methods for the identification of *Ganoderma* species at molecular level. In this study, ITS, β -*tubulin*, LSU and *RPB2* were used for species identification through PCR amplification and sequencing of 44 strains from 10 species of *Ganoderma*. The amplification success rate and mutation rate of the four barcodes were compared, and the specific DNA barcoding gap was screened according to the intra- and inter-specific genetic distance difference analysis. The accuracy of the screened DNA barcoding gap in identification of *Ganoderma* species was verified by constructing phylogenetic trees with single and combined barcodes. The results showed that the PCR amplification success rates of β -*tubulin* and LSU were 100%, ITS and *RPB2* were 95.35% and 90.91%, respectively. Compared with ITS and LSU, the intraspecies maximum genetic distance of β -*tubulin* and *RPB2* segments was smaller than the respective interspecific minimum genetic distance, and there was an obvious DNA barcoding gap, which was conducive to accurate interspecific identification of species. The phylogenetic trees constructed with ITS, β -*tubulin* and *RPB2* fragments could cluster all individuals of 10 species of *Ganoderma* into a monophyletic clade, while LSU segment could not accurately distinguish all tested strains. Compared with other three barcodes, β -*tubulin* is more suitable for interspecific identification of *Ganoderma*. 五号白正

五号黑体 Key words: *Ganoderma*; rapid identification; β -*tubulin* segment; genetic distance; barcoding gap 五号白正

五号宋体 灵芝属 *Ganoderma* 隶属于担子菌门 Basidiomycota, 蘑菇亚门 Agaricomycotina、蘑菇纲 Agaricomycetes, 多孔菌目 Polyporales, 灵芝科 Ganodermataceae^[1]。灵芝自古以来就是我国重要的食药用品, 已有 2 000 多年的药用历史^[2], 在食品和医学界享有盛誉。据《本草纲目》记载, 灵芝能够治疗多种疾病, 具有扶正固本、祛病延年、滋补强壮等功效^[3-5]。灵芝富含多种萜类和多糖类化合物^[6-8], 具有丰富的药理活性, 在抗肿瘤^[9]、抗衰老^[10]、增强免疫力^[11]等方面有显著作用, 还具有一定的观赏价值。近年来, 随着对灵芝需求的不断增加, 栽培面积不断扩大。灵芝栽培品种常出现同名异物或同物异名的现象, 品种退化、菌种老化和品种混杂等菌种质量问题也日益严重。依赖于传统的形态学观察等分类方法因受到外界生长环境的影响对相近物种的鉴定存在困难^[12]。因此, 开发一种简便而准确的分子水平灵芝属物种鉴定方法尤为关键。

在灵芝属物种的分子水平鉴定研究中, 灵芝属物种在 ITS 区域的基因序列上存在的差异, 可通过 ITS 分析构建系统发育树鉴定灵芝属物种, ITS 序列可作为其分子鉴定的 DNA 条形码^[8,13]。随着研究的进步, 物种的 *RPB2*^[14]、LSU^[15]、翻译延长因子 *EF1 α* ^[16] 和 β -*tubulin*^[17] 等基因片段也可应

用于灵芝属的物种鉴定和系统发育分析。苏春丽^[18]利用 ITS 和 β -*tubulin* 片段分别进行灵芝属菌株种间序列分析, 发现 β -*tubulin* 序列在内含子和第三位密码子位置的碱基替换率更高, 序列变异率具有多样性, 可用于其种间的鉴定。ITS 序列联合 β -*tubulin* 序列聚类分析结果与分别聚类得到的结果基本一致, 并且提高了部分置信度。Zhou 等^[14]联合 ITS、*EF1 α* 、*RPB1*、*RPB2* 4 个片段的序列, 用于灵芝 *Ganoderma lucidum* complex 种内的 13 个种系统发育分析, 明确了每个种的分类地位。以上研究表明, 对于物种资源鉴定, 通过多基因片段联合构建系统发育树的分析方法更加准确。虽然各种 DNA 条形码在灵芝属中都有相关的碱基位点统计^[19]、聚类分析^[20]等比较结果, 但并未对其 DBG^[21-22] 进行分析以获得用于其物种鉴定的最适 DNA 条形码序列。鱼类^[23]、昆虫^[24]和植物^[25-26]通过 DBG 分析获得用于物种鉴定的最适 DNA 条形码序列均有报道, 但在食药用品菌研究方面, 仅在侧耳属有过相关报道^[12]。

本研究对灵芝属的 10 个物种 44 份菌株的 ITS、 β -*tubulin*、LSU 和 *RPB2* 4 个 DNA 条形码分别进行 PCR 扩增与测序, 在比对变异位点的基础上, 根据计算的遗传距离评估供试菌种种内、种间差异, 筛选可用于种属鉴定的最适条形码。利用

Wilcoxon 秩和检验方法判断各片段序列之间变异性的统计学意义。利用单独的各基因片段及其联合序列构建系统发育树,评价 DBG 鉴定物种的准确性。本研究为灵芝属快速分子鉴定、系统发育及分类地位的确定增加了辅助证据,同时也为灵芝属种质资源的保育提供了理论指导。

1 材料与方法 小四黑体

1.1 供试材料 五号黑体

1.1.1 供试菌株 五号楷体 以灵芝属 44 份种质资源为研究材料,其中来自吉林省 6 份、山东省 6 份、黑龙江省 6 份、浙江省 5 份、海南省 4 份、福建省 3 份、湖北省 2 份、贵州省 2 份、广东省 2 份、俄罗斯 2 份、云南省 2 份,山西省、江苏省、广西和西藏各 1 份(表 1),所有菌种均保藏于吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心。 五号宋体

1.1.2 试剂 葡萄糖,麦芽糖,酵母浸粉,无水乙醇(北京化工厂);*Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ L), DNA Marker (DL2000), 10 $\times$ *Taq* Buffer (−Mg²⁺、MgCl₂、10 mmol/L dNTP Mix(美国 Thermo Scientific 公司);植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京康为世纪生物公司);琼脂糖,琼脂粉,6 $\times$ Loading Buffer,

Goldview (10 000 $\times$) 核酸染料,5 $\times$ TBE 粉剂(北京鼎国昌盛生物公司)。

1.2 PDA 固体培养基的配制

马铃薯洗净去皮,称 200 g 切成小块,加水煮烂,用纱布过滤,加入 15 g 琼脂粉搅拌继续加热,待琼脂完全溶解后加入 20 g 葡萄糖,再加入 ddH₂O 定容至 1 L,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 30 min。

1.3 菌种的活化与培养

将菌种接种于 PDA 固体培养基中进行活化,25 $^{\circ}$ C 恒温避光培养,待菌丝长至平板 2/3 处,进行 DNA 提取。

1.4 基因组 DNA 的提取

采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取灵芝属菌株的基因组 DNA。将从平板上收集到的菌丝放置研钵中,用液氮进行充分研磨,直至细粉状,之后将粉末转移到 1.5 mL 离心管中。为防止基因组 DNA 降解,操作过程需要迅速,详细步骤按照试剂盒说明书进行。用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度及降解情况,DNA 溶液于−20 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 PCR 扩增及测序

采用 ITS, β -*tubulin*, LSU 和 *RPB2* 4 个 DNA 片段对所有菌株进行鉴定和分析。利用通用引

表 1 供试菌株信息 小五号黑体

Table 1 Test strain information 小五 Arial Narrow

编号 Number	菌株编号 Strain No.	拉丁名 Latin name	来源地 Source	编号 Number	菌株编号 Strain No.	拉丁名 Latin name	来源地 Source
G20	CCMJ2454	<i>G. tsugae</i>	吉林	G77	CCMJ3024	<i>G. lingzhi</i>	浙江
G70	CCMJ3086	<i>G. lingzhi</i>	吉林	G92	CCMJ3058	<i>G. gibbosum</i>	浙江
G108	CCMJ3074	<i>G. applanatum</i>	吉林	G148	CCMJ4164	<i>G. sinense</i>	浙江
G109	CCMJ3075	<i>G. applanatum</i>	吉林	G149	CCMJ4168	<i>G. sinense</i>	浙江
G124	CCMJ4154	<i>G. applanatum</i>	吉林	G150	CCMJ4166	<i>G. sinense</i>	浙江
G135	CCMJ4138	<i>G. applanatum</i>	吉林	G86	CCMJ3053	<i>G. australe</i>	海南
G10	CCMJ2444	<i>G. tsugae</i>	黑龙江	G87	CCMJ3054	<i>G. weberianum</i>	海南
G14	CCMJ2448	<i>G. tsugae</i>	黑龙江	G88	CCMJ3055	<i>G. australe</i>	海南
G18	CCMJ2452	<i>G. tsugae</i>	黑龙江	G90	CCMJ3056	<i>G. weberianum</i>	海南
G21	CCMJ2455	<i>G. sinense</i>	黑龙江	G81	CCMJ3048	<i>G. multipileum</i>	福建
G35	CCMJ2469	<i>G. resinaceum</i>	黑龙江	G84	CCMJ3051	<i>G. multipileum</i>	福建
G49	CCMJ2483	<i>G. lingzhi</i>	黑龙江	G85	CCMJ3052	<i>G. multipileum</i>	福建
G31	CCMJ2465	<i>G. lingzhi</i>	山东	G12	CCMJ2446	<i>G. tsugae</i>	贵州
G53	CCMJ2490	<i>G. resinaceum</i>	山东	G123	CCMJ4156	<i>G. gibbosum</i>	贵州
G62	CCMJ2491	<i>G. resinaceum</i>	山东	G65	CCMJ2773	<i>G. sinense</i>	江苏
G67	CCMJ2669	<i>G. sinense</i>	山东	G138	CCMJ4148	<i>G. leucocontextum</i>	云南
G69	CCMJ2778	<i>G. resinaceum</i>	山东	G139	CCMJ4136	<i>G. leucocontextum</i>	云南
G74	CCMJ3045	<i>G. lingzhi</i>	山东	G95	CCMJ3061	<i>G. gibbosum</i>	广东
G94	CCMJ3060	<i>G. gibbosum</i>	湖北	G96	CCMJ3062	<i>G. gibbosum</i>	广东
G102	CCMJ3068	<i>G. lingzhi</i>	湖北	G97	CCMJ3063	<i>G. gibbosum</i>	广西
G104	CCMJ3070	<i>G. applanatum</i>	山西	G17	CCMJ2451	<i>G. tsugae</i>	俄罗斯
GB1	CCMJ2485	<i>G. leucocontextum</i>	西藏	G71	CCMJ3043	<i>G. applanatum</i>	俄罗斯

注：六号宋体

物^[18,27-29]ITS1/ITS4, β -*tubulin* F/R, LROR/LR5 和 b*RPB2*-6F/ b*RPB2*-7.1R 分别扩增 ITS, β -*tubulin*, LSU 和 *RPB2* 片段。PCR 反应体系为 25 μ L, 各片段的退火温度和时间分别为 56 $^{\circ}$ C、50 s, 60 $^{\circ}$ C、50 s, 55 $^{\circ}$ C、1 min, 62 $^{\circ}$ C、40 s。PCR 反应结束后取 2 μ L 扩增产物与 Loading Buffer 混合后使用 1% 琼脂糖凝胶鉴定扩增结果并拍照, 将正确扩增产物测序(北京六合华大基因科技有限公司)。

表 2 灵芝属相关条形码 GenBank 登录号信息
Table 2 Accession numbers of *Ganoderma*

种名 Species	登录号 GenBank Acc. No			
	ITS	β - <i>tubulin</i>	<i>RPB2</i>	LSU
<i>Ganoderma leucocontextum</i>	KM396271.1	—	MG367516.1	—
<i>Ganoderma sichuanense</i>	MN431189.1	JQ675642.1	MH294431.1	MT196413.1
<i>Ganoderma tsugae</i>	MG279195.1	DQ288093.1	DQ408116.1	AY684163.1
<i>Ganoderma sinense</i>	MK968730.1	DQ288081.1	MK371434.1	MK336404.1
<i>Ganoderma resinaceum</i>	MH855781.1	DQ288101.1	MK554743.1	MH867290.1
<i>Ganoderma applanatum</i>	MF143513.1	JQ675615.1	LN714655.1	KU220014.1
<i>Ganoderma multipileum</i>	JQ781874.1	—	MG367521.1	MN582953.1
<i>Ganoderma australe</i>	LC084734.1	—	—	—
<i>Ganoderma weberianum</i>	JQ520219.1	JQ675672.1	MK611971.1	MH876427.1
<i>Ganoderma gibbosum</i>	KY364271.1	—	KY393275.1	MN428668.1

1.7 种内和种间遗传距离的频率分布统计

使用 ClustalX 进行序列比对, 并利用 MEGA 7.0 软件计算 4 个 DNA 片段种内和种间的遗传距离, 选择 Kimura2-parameter 碱基替换模型^[27], 分析种内和种间距离的频率分布, 以此来检查是否有种内和种间遗传距离的重叠区域, 根据遗传距离的大小判断 4 种片段在灵芝属中条形码间隔区^[12], 并根据差异结果制作 DBG 图。最后通过 IBM SPSS Statistics 26 软件进行 Wilcoxon 秩和检验评判各片段序列之间变异性差异的统计学意义。

1.8 系统发育树的构建

利用 MEGA 7.0 软件, 同 NCBI 中下载的 *G. lingzhi* (ITS: KJ143907、JQ781864、KJ143908、JQ781858; *RPB2*: JX029978、JX029979、JX029980、JX029981) 和 *G. sichuanense* (ITS: JX029978、JX029977) 序列构建每个候选片段的邻接树(Neighbor joining, NJ), 采用 Kimura2-parameter 碱基替换模型, 对于所有对位排列结果中产生的空位(Gap)或缺失数据(Missing data), 选择完全删除(Complete deletion), 系统发育树的每个分支的支持率采用 bootstrap 方法计算, 设定 5 000 次重复, 若每个种的所

1.6 序列比对及位点信息统计

根据 GenBank 中已公开的灵芝属菌株 4 个基因片段的序列信息(表 2), 将所有获得的序列经 Blast 和 DNAMAN 软件比对, 统计各个 DNA 序列的 PCR 扩增成功率以及 GC 含量, 并利用 MEGA 7.0 软件统计 4 基因片段的排比长度、保守位点数、变异位点数和简约信息位点数等。同时, 用 BioEdit 软件将序列全部调整为 5'~3', 用于后续构建系统发育树。

有个体都聚为 1 个单系分支则认为该物种鉴定正确。

2 结果与分析

2.1 4 种 DNA 条形码序列信息

经 4 种 DNA 条形码 PCR 测序后, 灵芝属 44 份菌株的序列登录号见表 3。各片段的 GC 含量、扩增成功率、序列长度、变异位点信息见表 4。序列长度范围 356~854 bp, 其中 β -*tubulin* 片段最短为 356 bp, 其次是 ITS 片段 604 bp, *RPB2* 和 LSU 片段较长为 771 bp 和 854 bp, 较短序列可实现单向测序, 节约成本。GC 含量为 48.28%~56.18%, 均在最适范围内(40%~60%)。PCR 扩增成功率是评价 DNA 条形码的重要依据之一, β -*tubulin* 和 LSU 片段的扩增成功率均为 100%, ITS 和 *RPB2* 片段的扩增成功率分别为 95.35% 和 90.91%。此外, 较高的序列变异率是评价 DNA 条形码的另一个重要依据。*RPB2* 片段的变异率最高(27.8%), ITS 片段(20.5%)和 β -*tubulin* 片段(20.5%)的变异率相同, 而 LSU 片段序列最为保守, 变异率最低(3.9%)。综合以上分析, β -*tubulin* 片段与其他片段比较作为 DNA 条形码序列最为适合。

表3 灵芝属序列 Genbank 登录号
Table 3 GenBank accession number of *Ganoderma* sequences

编号 Number	种名 Species	登录号 GenBank Acc. No			
		ITS	β - <i>tubulin</i>	<i>RPB2</i>	LSU
G10	<i>G. tsugae</i>	MZ665487	MZ676907	MZ676868	MZ666243
G12	<i>G. tsugae</i>	MZ665488	MZ676908	MZ676867	MZ666244
G14	<i>G. tsugae</i>	MZ665489	MZ676909	MZ676869	MZ666245
G17	<i>G. tsugae</i>	MZ665490	MZ676910	—	MZ666246
G18	<i>G. tsugae</i>	MZ665491	MZ676911	MZ676870	MZ666247
G20	<i>G. tsugae</i>	MZ665492	MZ676912	MZ676871	MZ666248
G21	<i>G. sinense</i>	MZ665493	MZ676913	MZ676872	MZ666249
G31	<i>G. lingzhi</i>	MZ665494	MZ676950	MZ676873	MZ666250
G35	<i>G. resinaceum</i>	MZ665495	MZ676914	MZ676874	MZ666251
G49	<i>G. lingzhi</i>	MZ665496	MZ676915	MZ676875	MZ666252
G53	<i>G. resinaceum</i>	MZ665497	MZ676916	MZ676876	MZ666253
G62	<i>G. resinaceum</i>	MZ665498	MZ676917	MZ676877	MZ666254
G65	<i>G. sinense</i>	MZ665499	MZ676918	—	MZ666255
G67	<i>G. sinense</i>	MZ665500	MZ676919	MZ676878	MZ666256
G69	<i>G. resinaceum</i>	MZ665501	MZ676920	MZ676879	MZ666257
G70	<i>G. lingzhi</i>	MZ665502	MZ676921	MZ676880	MZ666258
G71	<i>G. applanatum</i>	MZ665503	MZ676922	MZ676881	MZ666259
G74	<i>G. lingzhi</i>	MZ665504	MZ676923	MZ676882	MZ666260
G77	<i>G. lingzhi</i>	MZ665505	MZ676924	MZ676883	MZ666261
G81	<i>G. multipileum</i>	MZ665506	MZ676925	MZ676884	MZ666262
G84	<i>G. multipileum</i>	MZ665507	MZ676926	MZ676885	MZ666263
G85	<i>G. multipileum</i>	MZ665508	MZ676927	MZ676886	MZ666264
G86	<i>G. australe</i>	MZ665509	MZ676928	MZ676887	MZ666265
G87	<i>G. weberianum</i>	MZ665510	MZ676929	MZ676888	MZ666266
G88	<i>G. australe</i>	MZ665511	MZ676930	MZ676889	MZ666267
G90	<i>G. weberianum</i>	—	MZ676931	—	MZ666268
G92	<i>G. gibbosum</i>	MZ665512	MZ676932	MZ676890	MZ666269
G94	<i>G. gibbosum</i>	MZ665513	MZ676933	MZ676891	MZ666270
G95	<i>G. gibbosum</i>	MZ665514	MZ676934	MZ676892	MZ666271
G96	<i>G. gibbosum</i>	MZ665515	MZ676935	MZ676893	MZ666272
G97	<i>G. gibbosum</i>	—	MZ676936	MZ676894	MZ666273
G102	<i>G. lingzhi</i>	MZ665516	MZ676937	MZ676895	MZ666274
G104	<i>G. applanatum</i>	MZ665517	MZ676938	MZ676896	MZ666275
G108	<i>G. applanatum</i>	MZ665518	MZ676939	MZ676897	MZ666276
G109	<i>G. applanatum</i>	MZ665519	MZ676940	MZ676898	MZ666277
G123	<i>G. gibbosum</i>	MZ665520	MZ676941	MZ676899	MZ666278
G124	<i>G. applanatum</i>	MZ665521	MZ676942	MZ676900	MZ666279
G135	<i>G. applanatum</i>	MZ665522	MZ676943	MZ676901	MZ666280
G138	<i>G. leucocontextum</i>	MZ665523	MZ676944	—	MZ666281
G139	<i>G. leucocontextum</i>	—	MZ676945	MZ676902	MZ666282
G148	<i>G. sinense</i>	MZ665524	MZ676946	MZ676903	MZ666283
G149	<i>G. sinense</i>	MZ665525	MZ676947	MZ676904	MZ666284
G150	<i>G. sinense</i>	MZ665526	MZ676948	MZ676905	MZ666285
GB1	<i>G. leucocontextum</i>	MZ665527	MZ676949	MZ676906	MZ666286

2.2 4种条形码的遗传距离分析

采用 K2P 模型计算 4 个 DNA 条形码在灵芝属种间种内的遗传距离(表 5)。比较 4 个条形码在灵芝属种间遗传距离,片段 β -*tublin* 和 RPB2 的平均遗传距离分别为 0.07 和 0.107,与 ITS 和 LSU 片

段对比显示出相对较高的种间多样性,更有利于准确鉴定物种。ITS 仅次于 β -*tubulin* 片段,而 LSU 片段显示出较低的种间变异。在物种水平的鉴定研究中,若某一序列的种间最小遗传距离大于其种内最大遗传距离时,则认为该序列可以成功鉴

表 4 候选 DNA 条形码片段序列信息
Table 4 Information about the DNA barcoding candidate segments

项目 Item	片段 Segments			
	ITS	β - <i>tubulin</i>	LSU	<i>RPB2</i>
GC 含量 /% GC content	48.28	54.83	51.57	56.18
PCR 扩增成功率/% PCR success	95.35	100	100	90.91
序列长度 Sequence length	604	356	854	771
保守位点 Conserved sites	477	281	812	541
变异位点 Variable sites	124	73	33	214
简约信息位点 Parsimony-information sites	108	66	22	200
变异率/% Mutation rate	20.5	20.5	3.9	27.8

别不同物种^[28-29]。本研究中 β -*tubulin* 和 *RPB2* 片段的种内最大遗传距离分别小于各自的种间最小遗传距离(β -*tubulin* 片段种内最大值 0.018<种间最小值 0.027; *RPB2* 片段种内最大值 0.014<种间最小值 0.020), 表明 β -*tubulin* 和 *RPB2* 片段可以区分灵芝属不同物种; ITS 和 LSU 片段的种内最大遗传距离大于种间最小遗传距离(ITS 种内最大值 0.007>种间最小值 0.004; LSU 片段种内最大值 0.004>种间最小值 0.000), 表明二者可能在小部分物种间存在鉴别不准确的现象。

2.3 条形码间隔 (Barcoding gap) 评价

DBG 是指物种的 DNA 条形码序列的种内和

种内 K2P 遗传距离之间存在 1 个明显的间隔区, 即种间变异大于种内变异, 并可根据这个间隔区鉴定未知物种^[30-31]。根据 4 个 DNA 片段的种内和种间遗传变异的分布图(图 1), 在种内遗传距离 0~0.005 范围内, 遗传变异所占百分比从高到低依次是 ITS(92.59%)、*RPB2* 片段(77.63%)、 β -*tubulin* 片段(61.8%), ITS 序列最保守。反之, β -*tubulin* 片段在种内变异上存在相对优势。 β -*tubulin* 片段和 *RPB2* 片段的种内变异值主要分布 0~0.015, 且 β -*tubulin* 片段的变异最大, 其次是 ITS(0~0.01), 而 LSU 片段分布范围最小为 0~0.004, 很难对物种的种内资源进行准确鉴定。

对于种间遗传距离分布范围, 以 0.005 为遗传距离基本单位, β -*tubulin* 和 *RPB2* 片段的最小种间遗传距离均大于最大种内遗传距离, 种间遗传距离分布范围为 *RPB2* 片段(0.02~0.15)> β -*tubulin* 片段(0.03~0.095), 二者都存在距离明显的 DBG, 种内变异和种间变异没有交叉, 表明 β -*tubulin* 和 *RPB2* 片段均可用于物种准确鉴定。ITS 在遗传距离为 0.005~0.010 处种间种内遗传距离有小部分重叠, 但是交叉重叠的比例相对较少, 可能存在极小的鉴定错误几率。而 LSU 片段以 0.002 为遗传距离基本单位, 其最小种间遗传距离小于最大种内遗传距离, 在遗传距离为 0~0.002 和 0.002~0.004 处有明显的部分重叠, 在种内和种间距离没有 DBG 存在, 表明 LSU 片段不能作为灵芝属理想的 DNA 条形码。

综上, 种内变异程度为 β -*tubulin* > *RPB2* > ITS > LSU, 种间变异程度为 *RPB2* > β -*tubulin* > ITS > LSU。

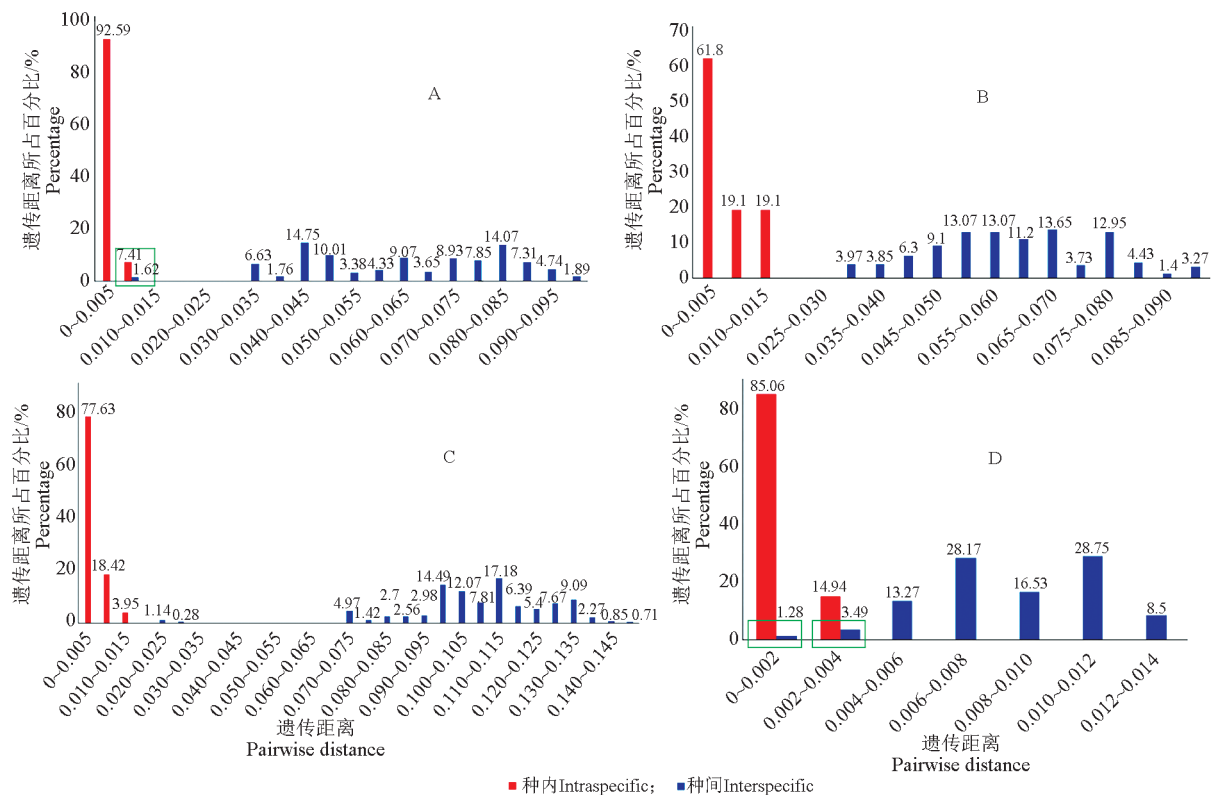
表 5 候选条形码片段在种内和种间的遗传距离
Table 5 Intra- and inter-specific distance of DNA barcoding candidate segments

基因片段 Segments	种内遗传距离 Intraspecific Genetic distance			种间遗传距离 Interspecific Genetic distance		
	平均值 Average	最大值 Maximum	最小值 Minimum	平均值 Average	最大值 Maximum	最小值 Minimum
ITS	0.002	0.007	0.000	0.063	0.100	0.004
β - <i>tubulin</i>	0.005	0.018	0.000	0.070	0.093	0.027
<i>RPB2</i>	0.003	0.014	0.000	0.107	0.150	0.020
LSU	0.001	0.004	0.000	0.008	0.014	0.000

2.4 不同条形码的种内和种间遗传差异的统计学检验

为了验证不同序列种内和种间的变异差异结果的统计学意义, 本研究使用 IBM SPSS Statistics

26 软件, 通过 Wilcoxon 秩和检验对其差异的显著性进行统计学分析。灵芝属种内变异差异显著性结果表明, 4 个 DNA 条形码片段变异差异性均为极显著 ($P<0.01$), 两两比较结果为 β -*tubulin* >



A. ITS 片段 ITS segment; B. β -tubulin 片段 β -tubulin segment; C. $RPB2$ 片段 $RPB2$ segment; D. LSU 片段 LSU segment

图 1 4 个条形码片段的种内和种间 K2P 遗传距离频率分布比较

Fig. 1 Comparisons of frequency distribution of intra- and interspecific pairwise distances among four candidate segments.

$RPB2 > ITS > LSU$; 灵芝属 4 个片段的种间变异差异性均极显著 ($P < 0.01$), 但与种内变异差异性不同, $RPB2$ 片段显著大于 β -tubulin 片段, 变异差异性为 $RPB2 > \beta$ -tubulin $> ITS > LSU$ (表 6)。因此, 灵芝属中种间变异较大的条形码是 $RPB2$ 片段,

其次是 β -tubulin 片段; 种内变异较大的条形码是 β -tubulin 片段, 其次是 $RPB2$ 片段。这与种间种内遗传距离和 DBG 评估结果相符, 该结果表明遗传距离分析具有统计学意义。

表 6 种内、种间遗传变异的 Wilcoxon 检验

Table 6 Wilcoxon test of pairwise intra- and interspecific variation

正秩 W+	负秩 W-	种内变异相关性 Correlation of intraspecific variations				种间变异相关性 Correlation of interspecific variations			
		Correlation of intraspecific variations				Correlation of interspecific variations			
		W+	W-	P 值 P value	结果 Result	W+	W-	P 值 P value	结果 Result
β -tubulin	ITS	54	0	<0.01	β -tubulin>ITS	377	335	<0.01	β -tubulin>ITS
$RPB2$	ITS	40	12	<0.01	$RPB2$ >ITS	694	10	<0.01	$RPB2$ >ITS
LSU	ITS	0	53	<0.01	LSU<ITS	2	727	<0.01	LSU<ITS
β -tubulin	$RPB2$	47	3	<0.01	β -tubulin< $RPB2$	10	694	<0.01	β -tubulin< $RPB2$
LSU	β -tubulin	0	54	<0.01	LSU< β -tubulin	0	857	<0.01	LSU< β -tubulin
LSU	$RPB2$	0	55	<0.01	LSU< $RPB2$	0	704	<0.01	LSU< $RPB2$

2.5 系统发育树的构建

为了更直观地呈现 4 个条形码的区分能力, 本研究以云芝为外群, 在基于 ITS、 β -tubulin 和 $RPB2$ 片段构建的邻接树上, 10 个物种的 44 份菌株所有个体都聚为 1 个单系分支, 具有较高的支

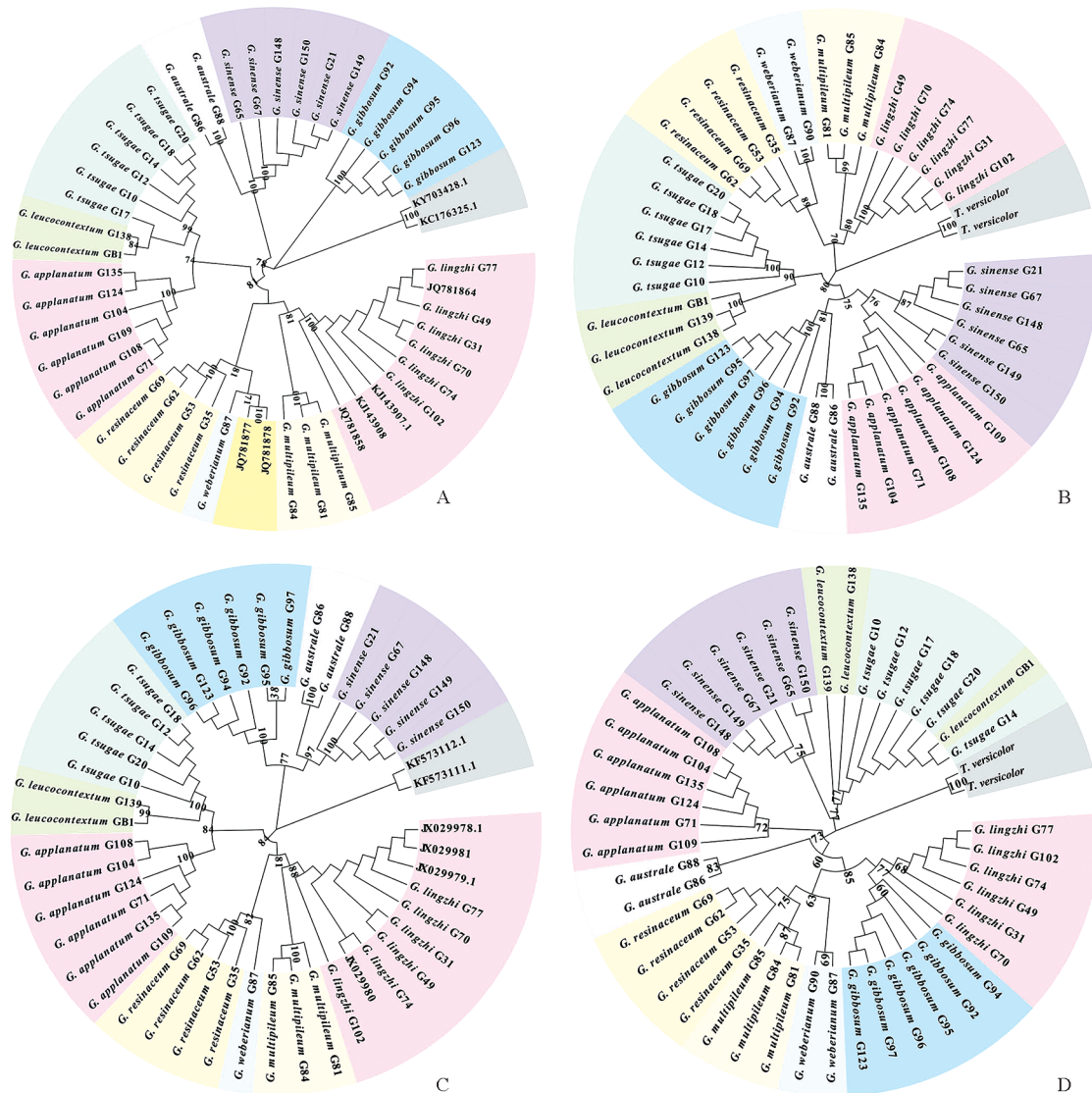
持率。

ITS 片段中最先分化出来的是 *G. gibbosum*, 其次是位于同一分支上的 *G. australe* 和 *G. sinense*, 其他灵芝分为 2 个亚群, 第一个亚群是 *G. tsugae*、*G. leucocontextum*、*G. applanatum* 和 *G. resinaceum*, 第

二个亚群是 *G. weberianum*、*G. multipileum* 和 *G. lingzhi*, 其中 *G. sichuanense* 与 *G. weberianum*、*G. resinaceum* 在同一分支上。 β -tubulin 片段中最先分化出来的第一个分支是 *G. resinaceum*、*G. weberianum*、*G. multipileum* 和 *G. lingzhi*。第二个分支又分为2个亚群, *G. tsugae* 和 *G. leucocontextum* 为同一亚群, *G. gibbosum*、*G. applanatum*、*G. australe* 和 *G. sinense* 为同一亚群。*RPB2* 片段中最先分化出来的一个分支是 *G. gibbosum*、*G. australe* 和 *G. sinense*, 另一个分支被分为的2个亚群与 ITS 结果一致。而 LSU 片段不能很清晰地将所有的供试菌株区别开来, *G. leucocontextum* GB 1 与 *G. tsugae* 聚为

同一分支, 难以对灵芝属所有物种进行正确鉴定 (图2), 不适合做灵芝属 DNA 条形码。

不考虑 LSU 片段, 联合 ITS+ β -tubulin+*RPB2* 3个片段构建的系统发育树 (图3), 将灵芝属10个物种分为3组, 第1组: *G. multipileum*、*G. lingzhi*、*G. resinaceum* 和 *G. weberianum*; 第2组: *G. australe*、*G. gibbosum*、*G. applanatum* 和 *G. sinense*; 第3组: *G. leucocontextum*、*G. tsugae*。联合建树结果与 β -tubulin 的发育树结构高度相似, 说明 β -tubulin 基因片段能准确地鉴定灵芝属物种, 片段序列联合在一定程度上提高了对物种区分的准确性, 有利于物种的分类鉴定。



A. ITS 片段 ITS segment; B. β -tubulin 片段 β -tubulin segment; C. *RPB2* 片段 *RPB2* segment; D. LSU 片段 LSU segment

图2 基于4种条形码片段分别构建的邻接树

Fig. 2 Neighbor-joining trees based on four candidate segments data separately

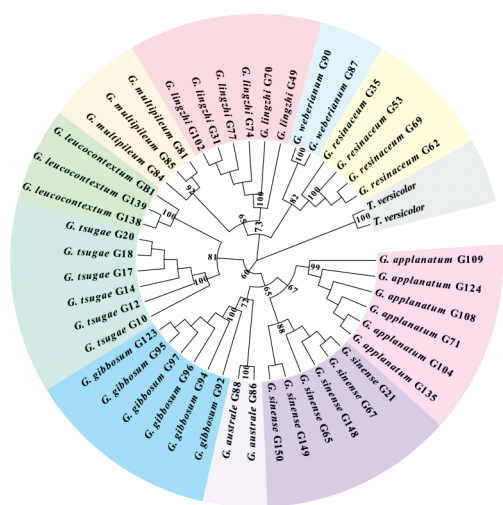


图3 基于 ITS+ β -tubulin+RPB2 片段联合构建的邻接树

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from NJ analysis generated by ITS+ β -tubulin+RPB2

3 讨论

为了解决目前市场上的灵芝品种经常出现同名异物或同物异名的现象,使用分子水平的DNA条形码鉴定菌种成为主流。用于物种鉴定理想DNA条形码的3个主要标准包括:DNA条形码长度合适,易于测序;引物通用性高;具有足够的序列变异^[22,32-33]。本研究从PCR扩增成功率、突变率、种间种内遗传距离差异分布、DBG等方面,对作为灵芝鉴定的候选DNA条形码片段进行评价,并通过构建系统发育树进行了验证。基于条形码的评价标准,本研究获得的4个基因片段中, β -tubulin片段长度合适,扩增成功率100%,且序列变异率较高,具有较多的变异信息位点,是用于灵芝物种鉴定的理想DNA条形码。该结果与苏春丽^[18]通过对ITS序列、 β -tubulin序列的研究,确定了基于 β -tubulin序列在灵芝属菌株种间的鉴定区分较为合适的结果类似。ITS片段长度适中,扩增成功率低于 β -tubulin和LSU片段,可能是由于ITS本身存在多个拷贝和丰富的Poly结构有关^[34]。GenBank数据库中物种的ITS片段数据较多,物种的ITS序列比对分析容易。虽然RPB2片段的变异率最高,但其扩增成功率最低(90.91%)且序列较长,适合用于 β -tubulin序列鉴定的辅助。LSU片段变异率最低,变异信息位点较少,相对保守,不适合作为灵芝物种分子鉴定的DNA条形码。

DNA条形码序列的种间和种内间隔是评价DNA条形码的另一个标准,理想的条形码其种内的遗传变异应该小于种间的遗传变异。序列的种间最小遗传距离大于其种内最大遗传距离,该序列可作为鉴别不同物种的条形码^[27]。王琬坤^[35]在地黄属*Rehmannia*的DNA条形码筛选中,利用DBG分析比较了不同DNA序列种间种内的变异差异性,成功获得鉴定该属分类能力最优的条形码序列。胡洁^[36]利用不同DNA条形码序列的种内种间变异性、DBG分析比较,并基于Wilcoxon秩和检验的统计学验证,筛选出短小杆菌属*Curtobacterium*中致病变种间遗传变异大于致病变种内遗传变异DNA条形码。本研究选取文献报道的4个鉴定灵芝属分类的DNA条形码片段,依据种内和种间遗传变异差异性以及DBG分析,基于数据的统计学意义,对比ITS、RPB2和LSU片段, β -tubulin片段是鉴定灵芝属分类的最适条形码。

系统发育树能够简单高效地评价不同条形码片段对物种的鉴别程度^[22]。韩玉立^[19]基于ITS、*EF1 α* 和RPB2片段统计了灵芝样品内、样品间、种内的核苷酸多态性,结果表明:RPB2片段杂合率低,核苷酸多态性水平较低,序列的种内差异较小且种间差异大,更适用于灵芝属的物种鉴定和系统发育研究。本研究结果表明,RPB2片段的遗传变异差异性分析和构建的系统发育树作为灵芝属分类鉴定的条形码优于ITS。 β -tubulin片段同样具有良好的灵芝属分类鉴定能力,同时,其片段长度和扩增成功率方面优于RPB2,是灵芝属分类鉴定的最适条形码。Li等^[12]使用ITS+TEF1+RPB1+RPB2条形码序列组合方式对侧耳菌种进行系统树构建研究,提高DNA条形码对种质资源的鉴别准确性。本研究基于ITS+ β -tubulin+RPB2片段联合构建的系统发育树与以 β -tubulin片段的构建结果最类似,不仅证明我们分析结果的准确性,而且证明条形码的联合使用会提高菌种鉴定的准确性和置信度。

本研究通过比对44份灵芝样品扩增的ITS、 β -tubulin、RPB2、LSU片段的序列信息,分析种间和种内的遗传距离、变异差异性分布,构建系统发育树评价4种片段作为灵芝属鉴定DNA条形码的准确性。 β -tubulin片段PCR扩增成功率100%,可作为通用引物;片段长度合适,容易测序;种间和

种内变异差异性较高,且存在明显的DBG,是准确鉴定灵芝属物种的最适条形码。联合*RPB2*和ITS DNA条形码片段构建系统发育树的分析手段可提高鉴定物种种属分类的准确性。

参考文献: 五号黑体

- [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. 六号宋体
- [2] Cao Y, Wu S H, Dai Y C. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi” [J]. Fungal Diversity, 2012, 56(1): 49–62. 六号Times New Roman
- [3] 戴玉成,杨祝良.中国药用真菌名录及部分名称的修订[J].菌物学报,2008,27(6): 801–824.
- [4] 戴玉成,曹云,周丽伟,等.中国灵芝学名之管见[J].菌物学报,2013,32(6): 947–952.
- [5] Dai Y C, Zhou L W, Hattori T, et al. *Ganoderma lingzhi* (Polyporales, Basidiomycota): the scientific binomial for the widely cultivated medicinal fungus Lingzhi [J]. Mycological Progress, 2017, 16: 1051–1055.
- [6] Huie C W, Di X. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components[J]. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2004, 812(1/2): 241–257.
- [7] Nie S P, Zhang H, Li W J, et al. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: isolation, structure and bioactivities[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 1(1): 10–20.
- [8] Wu F, Zhou L W, Yang Z L, et al. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species [J]. Fungal Diversity, 2019, 98(1): 1–76.
- [9] Cao Q Z, Lin Z B. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2004, 25(6): 833–838.
- [10] Si J, Meng G, Wu Y, et al. Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124(1): 1186–1196.
- [11] Wang X, Lin Z B. Immunomodulating effect of *Ganoderma* (Lingzhi) and possible mechanism[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1182: 1–37.
- [12] Li J, He X, Liu X B, et al. Species clarification of oyster mushrooms in China and their DNA barcoding[J]. Mycological Progress, 2017, 16(3): 191–203.
- [13] Smith B J, Sivasithamparan K. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia [J]. Mycological Research, 2000, 104 (8) : 943–951.
- [14] Zhou L W, Cao Y, Wu S H, et al. Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny [J]. Phytochemistry, 2015, 114: 7–15.
- [15] Moncalvo J M, Wang H F, Hseu R S. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters [J]. Fungal Biology, 1995, 99(12): 1489–1499.
- [16] 杨涛,刘宇,周均亮,等.灵芝的分子生物学鉴定[J].生物技术,2018,28(6): 554–559, 591.
- [17] Park Y J, Kwon O C, Son E S, et al. Taxonomy of *Ganoderma lucidum* from Korea based on rDNA and partial β -tubulin gene sequence analysis[J]. Mycobiology, 2012, 40(1): 71–75.
- [18] 苏春丽.中国栽培灵芝菌株的遗传多样性研究及分子鉴定[D].南京:南京农业大学,2006.
- [19] 韩玉立.灵芝属真菌常用DNA条形码基因核苷酸多态性的研究[D].北京:北京林业大学,2019.
- [20] 刘雪莹,韩玉立,司静,等.基于ITS序列的灵芝遗传多样性与群体遗传分化研究[J].菌物学报,2018,37(5): 565–575.
- [21] Hebert P D, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLoS Biology, 2004, 2 (10): e312.
- [22] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8369–8374.
- [23] Barman A S, Singh M, Pandey P K. DNA barcoding and genetic diversity analyses of fishes of Kaladan River of Indo-Myanmar biodiversity hotspot [J]. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal, 2018, 29(3): 367–378.
- [24] Song C, Wang Q, Zhang R, et al. Exploring the utility of DNA barcoding in species delimitation of *Polypedium* (Tripodura) non-biting midges (Diptera: Chironomidae) [J]. Zootaxa, 2016, 4079(5): 534–550.
- [25] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, et al. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae[J]. Planta Medica, 2010, 76(15): 1784–1786.
- [26] Zheng S H, Liu D W, Ren W G, et al. Integrated analysis for identifying radix astragali and its adulterants based on DNA barcoding[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014(10): 843923.
- [27] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J]. PLoS Biology, 2005, 3 (12) : e422.
- [28] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315–322.
- [29] Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species[J]. J Bacteriol, 1990, 172(8): 4238–4246.

- [30] 李艳春, 吴刚, 杨祝良. 我国云南食用牛肝菌的DNA条形码研究[J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(6): 725-732.
- [31] Matheny P B. Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (*Inocybe*; Agaricales) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 35(1): 1-20.
- [32] Song J Y, Yao H, Li Y, et al. Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 124(3): 434-439.
- [33] Yao H, Song J Y, Ma X Y, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region [J]. Planta Medica, 2009, 75(6): 667-669.
- [34] Senda M, Kageyama K, Suga H, et al. Two new species of *Pythium*, *P. senticosum* and *P. takayamanum*, isolated from cool-temperate forest soil in Japan [J]. Mycologia, 2009, 101(4): 439-448.
- [35] 王婉坤. 地黄DNA条形码序列的筛选与鉴定研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2016: 25-59.
- [36] 胡洁. 棒形杆菌属及短小杆菌属DNA条形码筛选及应用[D]. 西安: 陕西理工学院, 2016: 21-49.

作图说明:

一、通栏图, 宽度10~16 cm (具体根据图片内容), 所有字号是7.5pt, 汉字为宋体, 英文字母字体为Times New Roman, 线粗0.4pt; 数字与单位之间有1个空格; ABC等顺序标注在右下角; 拼图中间有细的留白。像素至少300dpi。

二、半栏图, 宽7~7.5 cm, 纵坐标长度与横坐标长度比值4.5:6左右, 字号7.5 pt, 汉字为宋体, 英文字母字体为Times New Roman, 坐标轴和刻度线为0.4pt, 刻度线在坐标轴内侧, 坐标轴内的折线和柱状图边框均为0.6pt, 刻度线在坐标轴内侧。像素至少300dpi。

注: 图例应置于横坐标下方 (如文中图1所示)