

基于DNA条形码的食用菌与其 易混有毒真菌的鉴定

郑梦迪^{1*}, 于佳琦¹, 王明珞²

(1. 西安医学院药学院, 西安 710021; 2. 莫纳什大学药学与药物科学学院, 墨尔本 VIC3052)

摘要: **目的** 利用DNA条形码技术对常见可食用真菌与其易混的野生有毒真菌进行分子鉴定。**方法** 使用MEGA7.0软件对GenBank中获得菌类的ITS2、nrLSU及*EF1- α* 基因序列进行分析和序列比对, 计算各分类群种内与种间的kimura 2-parameter (K2P)遗传距离、构建相邻结合法(neighbor joining, NJ)系统聚类树, 利用ITS2数据库预测各物种的ITS2二级结构。利用4Sale软件进行ITS2二级结构比对, 运用ProfDistS软件构建剖面邻接(profile neighbor joining, PNJ)进化树。**结果** 遗传距离结果表明各分类群存在明显的条形码间隔(barcoding gap); NJ树结果显示各物种均可独立分支, 具有良好的单系性; PNJ树同样可以区分食用菌与易混有毒真菌; 各物种的ITS2二级结构均存在明显差异。**结论** ITS2、nrLSU和*EF1- α* 可作为DNA条形码用于可食用真菌与其易混的野生有毒真菌的鉴定, 为推动真菌的分子鉴别在食品安全管理中广泛应用, 保障食品安全与公众健康提供了新的技术手段。

关键词: 分子鉴定; 食用菌; 有毒真菌; DNA条形码

Identification of edible fungi and their easily mixed wild toxic fungi based on DNA barcodes

ZHENG Meng-Di^{1*}, YU Jia-Qi¹, WANG Ming-Luo²

(1. School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Monash University, Melbourne VIC3052, Australia)

ABSTRACT: Objective To conduct molecular identification of common edible fungi and their easily mixed wild toxic fungi by DNA barcoding technology. **Methods** MEGA7.0 software was used to analyze and align the ITS2, nrLSU, and *EF1- α* gene sequences of fungi obtained from GenBank. The kimura 2-parameter (K2P) genetic distance within and between each taxonomic group was calculated, the neighbor joining (NJ) system cluster tree was constructed, and the secondary structure of ITS2 for each species was predicted by ITS2 database. 4Sale software was used to compare ITS2 secondary structure, and the ProfDistS software was used to construct a profile neighbor joining (PNJ) evolutionary tree. **Results** The genetic distance results indicated that there were significant barcoding

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目(2021JQ-782)、西安医学院 2022 年度科研能力提升计划项目(2022NLTS084)、西安医学院 2021 年大学生开放实验科研基金项目(2021DXS55、2021DXS72)

Fund: Supported by the Natural Science Basic Research Program of Shaanxi (2021JQ-782), the 2022 Scientific Research Capability Improvement Plan of Xi'an Medical University (2022NLTS084), and the Xi'an Medical University 2021 Open Experimental Research Fund Project for College Students (2021DXS55, 2021DXS72)

***通信作者:** 郑梦迪, 博士, 副教授, 主要研究方向为生物资源鉴定与评价。E-mail: hakuna_matata_mm@qq.com

***Corresponding author:** ZHENG Meng-Di, Ph.D, Associate Professor, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China. E-mail: hakuna_matata_mm@qq.com

gap in each taxonomic group; the NJ tree results showed that each species could independently branch and had good monophyletic traits; PNJ trees could also distinguished between edible fungi and easily mixed toxic fungi; there were significant differences in the secondary structure of ITS2 among different species. **Conclusion** ITS2, nrLSU, and *EF1- α* can be used as a DNA barcode for the identification of edible fungi and their easily mixed wild toxic fungi, providing a new technological means for promoting the widespread application of fungal molecular identification in food safety management and ensuring food safety and public health.

KEY WORDS: molecular identification; edible fungi; wild toxic fungi; DNA barcoding

0 引言

自然界大型真菌物种丰富, 已知种类约 14000 种, 然而由于野生菌种类繁多, 生长周期形态多变, 鉴定较困难, 即使是专业人员也很难精确地分辨部分有毒真菌与可食用真菌^[1-5]。全球因为误采误食野生有毒真菌而导致中毒的事件屡见不鲜。世界上已知具有明显毒性的毒蘑菇种类多达 400 多种, 毒性不一, 分布广泛。按照中毒的症状分为以下 6 个类型: 胃肠类型、肝脏损害型、光过敏性皮炎型、神经精神型、呼吸与循环衰竭型和溶血型等, 具有潜伏期, 有毒真菌对人体的伤害表现为腹泻、谵妄、黄疸、癫痫、昏迷等症状甚至死亡^[6-9]。

四孢蘑菇、双孢蘑菇、野蘑菇、草菇等均为常见食用菌类, 日常所需数量巨大, 野外分布广泛。因其味道鲜美、具有高蛋白低脂肪的特点, 富含多种氨基酸、维生素、矿物质等营养物质而备受青睐。同时这些食用菌有很高的药用价值, 如含有抗癌作用的多糖类成分、广谱抗菌素, 对于高血压、高血脂、糖尿病等疾病有很好的辅助治疗效果^[10]。食用菌类在中医方面也有悠久的入药历史, 如《本草纲目》中记载双孢蘑菇能够消食和胃, 化痰理气, 性甘味平, 归胃、肝、心经, 治疗体虚纳少、心烦失眠等症。四孢蘑菇与双孢蘑菇在外观上极易与白毒鹅膏菌(毒)、鳞柄白毒鹅膏菌(毒)、赭鹅膏(毒)、双孢鹅膏菌(毒)等相混淆^[11], 因其菌盖形状及颜色相似, 在初期中间均凸起呈半球状, 后期平展为伞状^[12-13]。另外, 野蘑菇与褐鳞蘑菇(毒)表面均呈污白色, 带有灰褐色绒毛, 子实体初期易与草菇混淆。此外, 子实体随生长时期的变化大小不定, 辨认难度加大。

DNA 条形码技术不受物种发育状态、形态特征完整性等的限制, 也无需依赖鉴定专家, 在基层医疗单位即可完成检测, 具有快速、准确、低成本等优点, 能够高效迅速地进行有毒真菌的物种鉴定, 其中 DNA 条形码技术如 ITS2、*EF1- α* 及 nrLSU 分子标记常用于生物类样本的鉴别^[14-18], 然而至今未有运用 DNA 条形码技术进行可食用菌及与其在外观上易混淆的有毒真菌的分子鉴别^[19-20], 因此本研究选取几种常见的可食用菌(四孢蘑菇、双孢蘑菇、野蘑菇、白林地菇、草菇)及外观上易与它们相混淆的剧毒

真菌(白毒鹅膏菌、毒鹅膏菌、鳞柄白毒鹅膏菌、赭鹅膏、白霜杯伞、褐鳞蘑菇、双孢鹅膏菌、白杯伞), 利用 DNA 条形码技术对这些常见可食用真菌与其易混的野生有毒真菌进行分子鉴定, 以期为流通领域、生产企业的原料监管、真伪鉴定、海关进出口鉴定与管理、出入境检验检疫等方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究选取了白毒鹅膏菌 [*Amanita verna* (Bull.Fr.) Pers]、毒鹅膏菌 [*Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link]、鳞柄白毒鹅膏菌 [*Amanita virosa* (Fr.) Bertil]、赭鹅膏 (*Amanita ocreata* Peck)、白霜杯伞 [*Clitocybe dealbata* (Sow. Fr.) Gill]、褐鳞蘑菇 (*Agaricus crocoseplus* Berk. & Br.)、双孢鹅膏菌 (*Amanita bisporigera*)、白杯伞 [*Clitocybe phyllophila* (Pers.) Kummer]、四孢蘑菇 (*Agaricus campestris*)、野蘑菇 (*Agaricus arvensis* Schaeff)、白林地菇 [*Agaricus silvi cola* (Vitt.) Sacc.]、草菇 [*Volvariella volvacea* (Bull.) Singer]、双孢蘑菇 [*Agaricus bisporus* (Large) Sing] 的 ITS2 序列、*EF1- α* 序列及 nrLSU 序列作为实验研究对象, 从 GenBank 数据库下载相应样本序列号及其对应物种信息, 如表 1 所示。

1.2 实验方法

1.2.1 分子标记序列的获取、ITS2 序列的注释及各二级结构预测

从 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中下载所选物种的 ITS2 序列、*EF1- α* 序列及 nrLSU 序列。在 ClustalOmega 网站进行 *EF1- α* 序列及 nrLSU 序列的比对及整合。对于 ITS2 序列, 基于隐马尔可夫模型 (HMMer)^[21] 的注释方法在 ITS2 Database^[22] 中进行注释, 再利用 ITS2 数据库二级结构预测器 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) 进行二级结构的预测。

1.2.2 遗传距离的计算和系统发育树的构建

利用 MEGA7.0^[23] 对注释过的 ITS2 序列、*EF1- α* 序列和 nrLSU 序列进行比对。基于 kimura 2-parameter (K2P) 模型进行种内和种间遗传距离的计算。基于 K2P 距离使用相邻结合法 (neighbor joining, NJ) 构建 ITS2 序列、*EF1- α* 序

表 1 序列号及其对应物种信息

Table 1 Serial numbers and corresponding species information

序列	物种名	拉丁学名	编号/序列号
ITS2	白毒鹅膏菌	<i>Amanita verna</i>	>OM451530.1; >OM451534.1; >OM451533.1; >OM451532.1; >MK512066.1
	毒鹅膏菌	<i>Amanita phalloides</i>	>MZ647957.1; >MZ647956.1; >KX449199.1; >KX449211.1; >KX449207.1
	鳞柄白毒鹅膏菌	<i>Amanita virosa</i>	>MZ647955.1; >KY924845.1; >FJ176737.1; >JX998030.1; >JX998028.1
	赭鹅膏	<i>Amanita ocreata</i>	>MZ997400.1; >MZ997394.1; >GQ486874.1; >GQ250404.1
	白霜杯伞	<i>Clitocybe dealbata</i>	>OP681746.1; >OP681733.1; >OP104060.1; >KY706184.1
	褐鳞蘑菇	<i>Agaricus crocoseplis</i>	>OP508342.1; >KT824783.1; >KT824787.1; >KT824786.1; >KT824785.1
	双孢鹅膏菌	<i>Amanita bisporigera</i>	>EU819411.1; >OP743456.1; >OP643388.1; >OP643304.1; >OP643083.1
	白杯伞	<i>Clitocybe phyllophila</i>	>MZ144144.1; >MZ144143.1; >MZ144142.1
	四孢蘑菇	<i>Agaricus campestris</i>	>OM985820.1; >MW426145.1; >OM859365.1; >MF616403.1; >OQ510033.1
	野蘑菇	<i>Agaricus arvensis</i>	>ON171455.1; >MT535720.1; >MH861005.1; >MH854618.1; >MW485429.1
	白林地菇	<i>Agaricus silvicola</i>	>MW485430.1; >AF059223.1
	草菇	<i>Volvariella volvacea</i>	>MZ621247.1; >OM417506.1; >MW077530.1; >MN738642.1; >MG280839.1
	双孢蘑菇	<i>Agaricus bisporus</i>	>MH859080.1; >MH856148.1; >KM657921.1; >KM657920.1; >AF432886.1
	白毒鹅膏菌	<i>Amanita verna</i>	>ON086254.1; >ON086255.1
	毒鹅膏菌	<i>Amanita phalloides</i>	>MT977104.1; >EU886739.1
	鳞柄白毒鹅膏菌	<i>Amanita virosa</i>	>KJ481999.1; >KJ481998.1; >KJ481997.1; >JX998008.1; >JX998007.1
	赭鹅膏	<i>Amanita ocreata</i>	>KJ481947.1
	白霜杯伞	<i>Clitocybe dealbata</i>	>EF421080.1
	EF1- α	双孢鹅膏菌	<i>Amanita bisporigera</i>
野蘑菇		<i>Agaricus arvensis</i>	>KX198047.1; >KT951619.1
双孢蘑菇		<i>Agaricus bisporus</i>	>OM972899.1; >OM972898.1; >OM972896.1; >OM972894.1; >OM972893.1
白毒鹅膏菌		<i>Amanita verna</i>	>OM423682.1; >OM423681.1; >OM423679.1; >OM423678.1; >OM423677.1
毒鹅膏菌		<i>Amanita phalloides</i>	>MH878248.1; >MT862265.1; >MG712357.1; >MG711610.1
鳞柄白毒鹅膏菌		<i>Amanita virosa</i>	>JX998059.1; >JX998058.1; >JX998057.1; >FJ755189.1
双孢鹅膏菌		<i>Amanita bisporigera</i>	>AF097385.1; >AF097384.1; >OQ345779.1; >MW031169.1; >MW788774.1
白杯伞		<i>Clitocybe phyllophila</i>	>AY207157.1; >MH867847.1
四孢蘑菇		<i>Agaricus campestris</i>	>KR006607.1; >MK277478.1; >MK050630.1; >KT951468.1
野蘑菇		<i>Agaricus arvensis</i>	>MK617825.1; >KT951454.1
nrLSU	白林地菇	<i>Agaricus silvicola</i>	>MH868102.1; >MK029338.1
	草菇	<i>Volvariella volvacea</i>	>MZ621247.1; >OM417506.1; >MW077530.1; >MN738642.1; >MG280839.1

列及 nrLSU 序列的系统进化树。利用靴带法(booststrap) 1000 重复检验各分支的支持率。对所有样本的 ITS2 序列进行共有二级结构的 4Sale 比对分析^[24], 利用 ProfDistS 软件对得到的 ITS2 序列及二级结构的联合矩阵构建剖面邻接进化树(profile neighbor joining, PNJ), 并用 bootstrap 1000 次检验各分支置信度^[25]。

2 结果与分析

2.1 菌类种内种间遗传距离分析

如表 2 所示, 各物种的 ITS2 序列的种内遗传距离(0.000~0.012)均小于种间遗传距离(0.037~1.052)。其中, 四

孢蘑菇与白毒鹅膏菌、鳞柄白毒鹅膏菌、赭鹅膏、双孢鹅膏菌的种间遗传距离分别为 0.710、0.705、0.826、0.744, 均大于四孢蘑菇种内遗传距离 0.000。野蘑菇的种内遗传距离为 0.005, 有毒真菌褐鳞蘑菇的种内遗传距离为 0.003, 野蘑菇与褐鳞蘑菇的种间遗传距离为 0.119; 草菇的种内遗传距离为 0.000, 草菇与褐鳞蘑菇的种间遗传距离为 0.653。如表 3 所示, *EF1- α* 序列的种内遗传距离(0.000~0.002)均小于种间遗传距离(0.028~1.095)。双孢蘑菇的种内遗传距离为 0.002, 其与白毒鹅膏菌、鳞柄白毒鹅膏菌、赭鹅膏和双孢鹅膏菌的种间遗传距离分别为 1.033、1.022、1.048 和 0.981, 均大于双孢蘑菇的种内遗传距离。

基于 K2P 模型计算的遗传距离分析(表 4)表明, 白毒鹅膏菌、毒鹅膏菌、鳞柄白毒鹅膏菌、双孢鹅膏菌、白杯伞、四孢蘑菇、野蘑菇、白林地菇、草菇的 nrLSU 序列的种内遗传距离(0.000)均小于种间遗传距离(0.006~1.186)。四孢蘑菇的种内遗传距离为 0.000, 其与有毒真菌白毒鹅膏菌、鳞柄白毒鹅膏菌、双孢鹅膏菌的种间遗传距离分别为

0.194、0.194、0.193, 均大于四孢蘑菇的种内遗传距离。因此, 基于 nrLSU 标记的四孢蘑菇与其易混淆的有毒真菌之间存在遗传间隔。另外, 毒鹅膏菌的种内遗传距离为 0.000, 其与草菇的种间遗传距离为 1.114, 与野蘑菇的种间遗传距离为 0.194, 即草菇、野蘑菇与易混有毒菌毒鹅膏菌之间均存在条形码间隔(barcoding gap)。

表 2 基于 ITS2 的 K2P 遗传距离
Table 2 K2P genetic distance based on ITS2

	白毒鹅膏菌	毒鹅膏菌	鳞柄白毒 鹅膏菌	赭鹅膏	白霜杯伞	褐鳞 蘑菇	双孢鹅 膏菌	白杯伞	四孢 蘑菇	野蘑菇	白林 地菇	草菇	双孢 蘑菇
白毒鹅膏菌	0.000												
毒鹅膏菌	0.050	0.000											
鳞柄白毒鹅膏菌	0.076	0.076	0.000										
赭鹅膏	0.089	0.089	0.043	0.000									
白霜杯伞	0.546	0.533	0.544	0.585	0.000								
褐鳞蘑菇	0.734	0.723	0.728	0.856	0.485	0.003							
双孢鹅膏菌	0.082	0.104	0.090	0.097	0.583	0.790	0.000						
白杯伞	0.497	0.484	0.492	0.556	0.070	0.428	0.518	0.000					
四孢蘑菇	0.710	0.681	0.705	0.826	0.470	0.061	0.744	0.415	0.000				
野蘑菇	0.820	0.783	0.833	0.981	0.551	0.119	0.858	0.501	0.099	0.005			
白林地菇	0.848	0.809	0.861	1.017	0.585	0.115	0.887	0.533	0.110	0.037	0.012		
草菇	0.963	0.963	0.932	1.052	0.729	0.653	0.962	0.645	0.609	0.710	0.734	0.000	
双孢蘑菇	0.799	0.786	0.770	0.905	0.506	0.095	0.887	0.448	0.090	0.129	0.132	0.685	0.000

表 3 基于 *EF1-α* 的 K2P 遗传距离
Table 3 K2P genetic distance based on *EF1-α*

	白毒鹅膏菌	毒鹅膏菌	鳞柄白毒鹅膏菌	赭鹅膏	白霜杯伞	双孢鹅膏菌	野蘑菇	双孢蘑菇
白毒鹅膏菌	0.000							
毒鹅膏菌	0.077	0.002						
鳞柄白毒鹅膏菌	0.049	0.067	0.000					
赭鹅膏	0.071	0.085	0.030	0.000				
白霜杯伞	0.333	0.293	0.293	0.282	0.000			
双孢鹅膏菌	0.056	0.083	0.028	0.042	0.289	0.000		
野蘑菇	0.276	0.284	0.269	0.255	0.279	0.252	0.000	
双孢蘑菇	1.033	1.062	1.022	1.048	1.008	0.981	1.095	0.002

表 4 基于 nrLSU 的 K2P 遗传距离
Table 4 K2P genetic distance based on nrLSU

	白毒鹅膏菌	毒鹅膏菌	鳞柄白毒 鹅膏菌	双孢鹅膏菌	白杯伞	四孢蘑菇	野蘑菇	白林地菇	草菇
白毒鹅膏菌	0.000								
毒鹅膏菌	0.012	0.000							
鳞柄白毒鹅膏菌	0.017	0.006	0.000						
双孢鹅膏菌	0.006	0.006	0.012	0.000					
白杯伞	0.186	0.186	0.185	0.178	0.000				
四孢蘑菇	0.194	0.186	0.194	0.193	0.186	0.000			
野蘑菇	0.194	0.194	0.193	0.186	0.085	0.023	0.000		
白林地菇	0.186	0.186	0.185	0.178	0.078	0.006	0.017	0.000	
草菇	1.186	1.114	1.124	1.149	0.996	1.024	0.996	0.996	0.000

2.2 各物种 ITS2 二级结构及分析

如图 1 所示, 各物种 ITS2 二级结构为典型的“一环四臂”结构^[26-27], 其中臂 III 最长。其发卡环、内环的数目、大小以及螺旋环的长度各不相同, 可以有效区分物种差异。四孢蘑菇的二级结构由一个中心环和四个螺旋区构成, 其臂上有 4 个发卡环和 5 个内环。与可食用真菌相比, 双孢蘑菇比四孢蘑菇多 3 个内环, 白林地菇比四孢蘑菇多 4 个内环。野蘑菇在中心环上凸起 1 个发卡环, 其内环比四孢蘑菇多 1 个。可食用真菌与其易混的有毒真菌相比, 二级结构的中心环即存在明显差异, 四孢蘑菇的中心环形状规整, 白毒鹅膏菌、鳞柄白毒鹅膏菌、双孢鹅膏菌及毒鹅膏菌的中心环均向外凸起形成 1 个自由单链, 并且赭鹅

膏、白霜杯伞、白杯伞的中心环再向外凸起形成发卡环。白霜杯伞与白杯伞不仅在生态学特征上相似, 其结构也有很大的相似性, 不同的是白霜杯伞的内环比白杯伞少 3 个。蘑菇的中心环比其易混的褐鳞蘑菇多 1 个凸起的发卡。

2.3 食用菌及易混有毒菌的聚类分析

分别基于 *EF1- α* 、*nrLSU*、ITS2 以及 ITS2 的一级序列与二级结构联合矩阵构建所研究物种的系统发育树(图 2~5)。基于 ITS2(图 2)、*EF1- α* (图 4)和 *nrLSU*(图 5)的 NJ 树结果显示, 不同物种均表现出单系性, 可食用真菌与有毒真菌区分明显。此外, 基于 ITS2 一级序列与二级结构联合矩阵的 PNJ 发育树(图 3)同样可以有效区分可食用真菌和有毒菌类, 只是白林地菇与野蘑菇具有交叉现象。

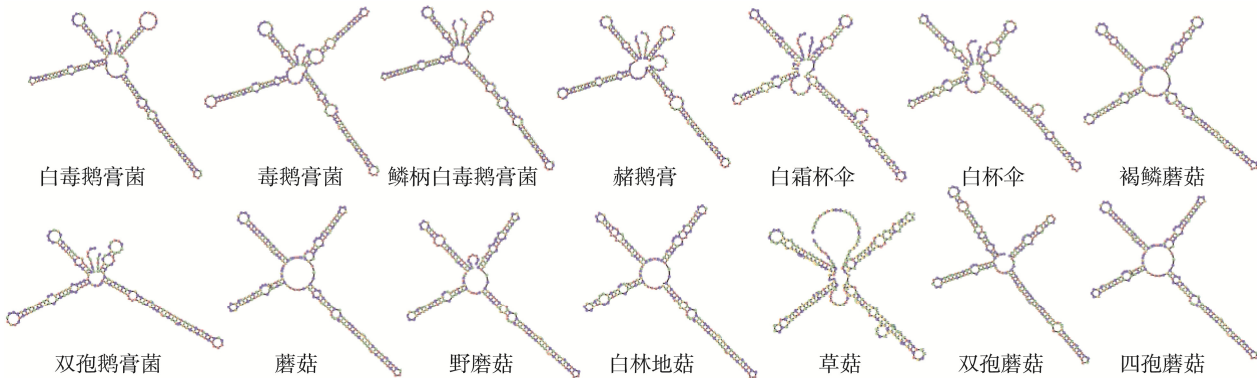


图 1 各物种的 ITS2 二级结构图
Fig.1 ITS2 secondary structures of all taxa

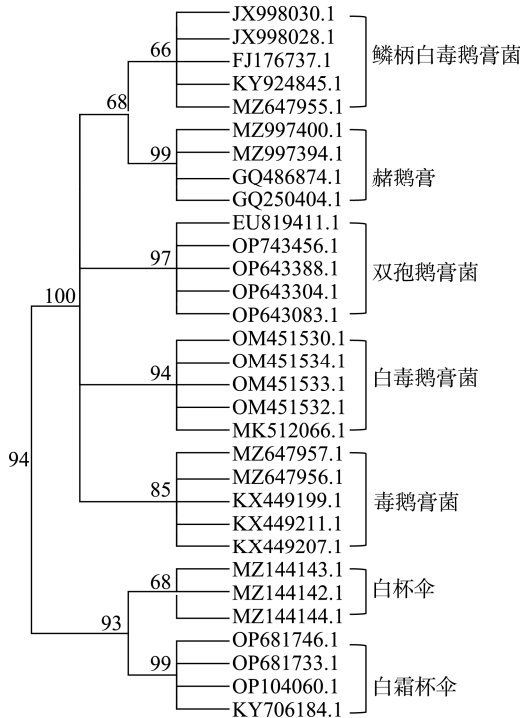


图 2 基于 ITS2 序列构建的可食用菌与有毒真菌的 NJ 树
Fig.2 NJ phylogenetic tree of edible fungi and confusing toxic fungi based on ITS2

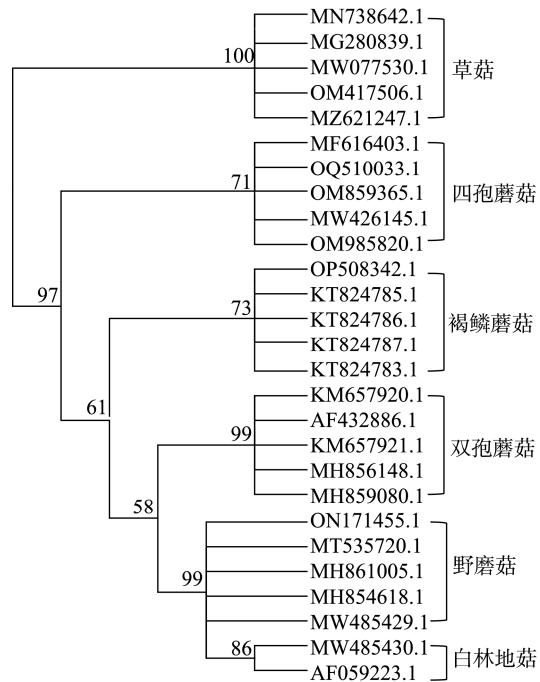


图 2(续) 基于 ITS2 序列构建的可食用菌与有毒真菌的 NJ 树
Fig.2 NJ phylogenetic tree of edible fungi and confusing toxic fungi based on ITS2

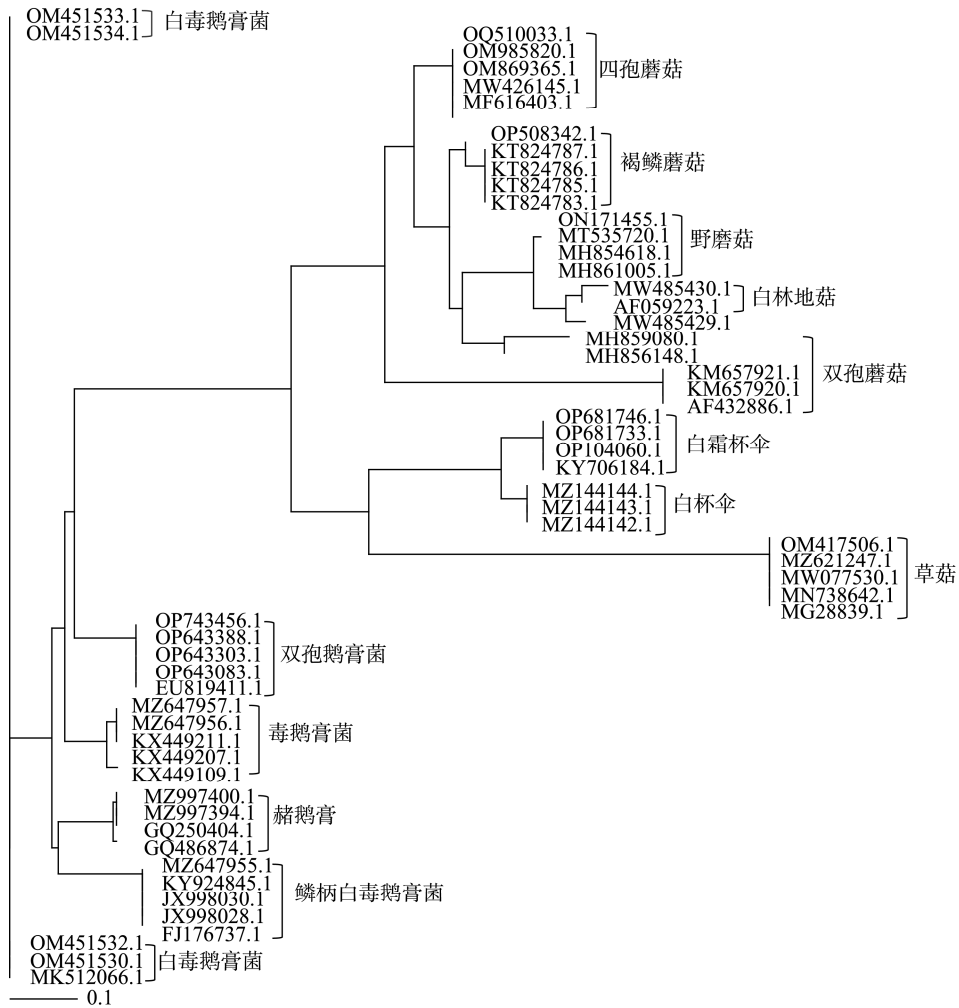


图 3 基于 ITS2 一级序列和二级结构联合矩阵构建的可食用菌与有毒真菌的 PNJ 树

Fig.3 PNJ phylogenetic tree of edible fungi and confusing toxic fungi based on ITS2 sequence and secondary structure joint matrix

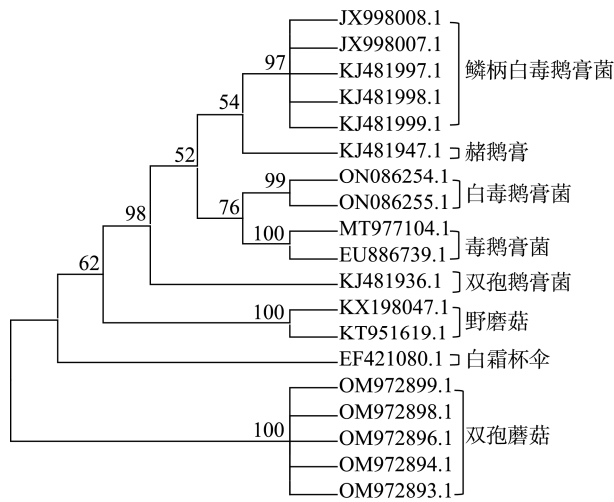


图 4 基于 EFl-α 序列构建的可食用菌与有毒真菌的 NJ 树

Fig.4 NJ phylogenetic tree of edible fungi and confusing toxic fungi based on EFl-α sequence

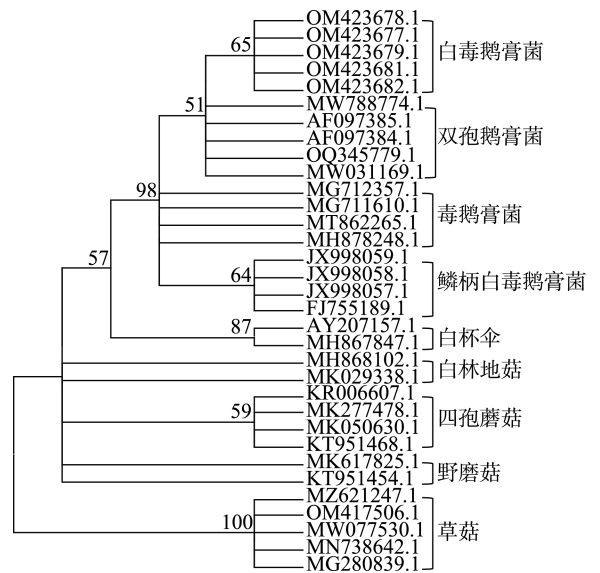


图 5 基于 nrLSU 序列构建的可食用菌与有毒真菌的 NJ 树

Fig.5 NJ phylogenetic tree of edible fungi and confusing toxic fungi based on nrLSU sequence

3 讨论与结论

经过 ITS2 的种内种间遗传距离分析, 四孢蘑菇与其易混淆的有毒真菌的最大种内遗传距离小于最小种间遗传距离, 野蘑菇、草菇与有毒真菌褐鳞蘑菇之间也存在显著遗传间隔。EF1- α 的遗传距离分析可以明确区分双孢蘑菇与其易混淆的有毒真菌, 并且各个有毒菌种之间可以彼此区分。基于 nrLSU 标记的四孢蘑菇与其易混淆的有毒真菌之间存在遗传间隔; 草菇、野蘑菇与易混有毒菌毒鹅膏菌之间均存在条形码间隔(barcoding gap)。理想 DNA 条形码种内遗传距离应明显小于种间距离, 两者之间存在明显的界限, 即“barcoding gap”^[28-30]。本研究中可食用真菌及其混伪易混有毒菌的 DNA 条形码候选序列中 ITS2、EF1- α 和 nrLSU 序列具有较小的种内变异和较大的种间变异, 其中 ITS2 序列保守稳定且具有明显的遗传间隔, 更适合本研究中可食用真菌和有毒菌类的分析。

另外, 通过 ITS2 的二级结构含有的内环、发卡环的数目, 不同二级臂的夹角大小不同, 也可鉴定所选物种。EF1- α 和 nrLSU 构建的 NJ 树均呈现出单系性, 所有物种均独立成支; 并且 ITS2 的 NJ 树和 PNJ 树也能够相互印证, 可将目标可食用真菌与有毒菌类有效区分。

实现真菌类 DNA 条形码物种鉴定, 就必须构建完善的 DNA 条形码数据库。由于我国野生菌物种数量极其丰富, 外观不易区分, 在各大植物数据库中难以调查出各类菌种与其准确相对应的图片。DNA 条形码技术可以直接从基因水平提供鉴定依据, 有助于非分类学专业工作者对真菌进行快速、准确地鉴定, 具有较好的推广和应用价值。本研究结果分析了 ITS2、EF1- α 和 nrLSU 3 种 DNA 条形码应用于可食用真菌及其易混有毒真菌鉴定中的问题, 证明了 ITS2、EF1- α 和 nrLSU 3 种 DNA 条形码均可用于可食用真菌与其易混有毒真菌的鉴定, 并且 ITS2 序列作为 DNA 条形码更稳定准确, 对实际生产中确认真菌来源及食品药品的监测流通等具有重要意义。

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.
LI Y, LI TH, YANG ZL, et al. Atlas of large fungi resources in China [M]. Zhengzhou: Zhongyuan Farmers' Publishing House, 2015.
- [2] 赵振西. 托木尔峰国家级自然保护区大型真菌多样性及重要类群分子系统学研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022.
ZHAO ZX. Molecular systematics study on the diversity and important groups of large fungi in the Tomur Peak National Nature Reserve [D]. Alar: Tarim University, 2022.
- [3] 史东明. 内蒙古沙日温都自然保护区大型真菌资源初探[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
SHI DM. Preliminary study on the resources of large fungi in the Shariwendu Nature Reserve of Inner Mongolia [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
- [4] 牟光福. 广西弄岗国家级自然保护区大型真菌资源调查与评价[D]. 南宁: 广西大学, 2019.
MOU GF. Investigation and evaluation of large fungal resources in Nonggang National Nature Reserve in Guangxi [D]. Nanning: Guangxi University, 2019.
- [5] 陈茜. 四川西部横断山脉地区大型真菌资源调查利用及灰褐纹口蘑与鸡枞菌多糖的结构鉴定、活性研究[D]. 南充: 西华师范大学, 2022.
CHEN Q. Investigation and utilization of large-scale fungal resources in the Hengduan Mountains region of Western Sichuan, as well as structural identification and activity study of polysaccharides from gray brown striped *Tricholoma* and *Cocktail* fungus [D]. Nanchong: West China Normal University, 2022.
- [6] 李海蛟, 章轶哲, 刘志涛, 等. 云南蘑菇中毒事件中的毒蘑菇物种多样性[J]. 菌物学报, 2022, 41(9): 1416-1429.
LI HJ, ZHANG YZ, LIU ZT, et al. Species diversity of poisonous mushrooms causing poisoning incidents in Yunnan Province, Southwest China [J]. Mycosystema, 2022, 41(9): 1416-1429.
- [7] 刘辉, 任婧寰, 伍雅婷, 等. 2018 年全国食物中毒事件流行特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(1): 147-152.
LIU H, REN JH, WU YT, et al. Epidemic characteristics analysis for food poisoning events in China, 2018 [J]. Chin J Food Hyg, 2022, 34(1): 147-152.
- [8] 杨祝良. 真菌系统学大趋势: 越来越多的分类单元[J]. 菌物学报, 2020, 39(9): 1611-1616.
YANG ZL. Trends in fungal systematics: More and more taxa [J]. Mycosystema, 2020, 39(9): 1611-1616.
- [9] 高崇华. 肝肾损害型毒蘑菇所属类群 DNA 条形码研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022.
GAO CH. Study on the DNA barcode of the genus of toxic mushrooms with liver and kidney damage [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022.
- [10] 贺新生. 现代菌物分类系统[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
HE XS. Modern bacterial classification system [M]. Beijing: Science Press, 2015.
- [11] 顾新伟, 陈再鸣, 吴邦仁. 中国毒蕈图鉴[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2018.
GU XW, CHEN ZM, WU BR. Chinese mushroom atlas [M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 2018.
- [12] 图力古尔, 包海鹰, 李玉. 中国毒蘑菇名录[J]. 菌物学报, 2014, 33(3): 517-548.
TU LGER, BAO HY, LI Y. List of Chinese poisonous mushrooms [J]. Mycosystema, 2014, 33(3): 517-548.
- [13] 卯晓岚. 中国鹅膏菌科毒菌及毒素[J]. 微生物学通报, 1991, 3: 160-165.
MAO XL. Toxic bacteria and toxins of the Amanita family in China [J]. Microbiol Bull, 1991, 3: 160-165.
- [14] ZHENG MD, LIU D, ZHANG H, et al. Molecular authentication of

- medicinal and edible plant gnaphaliumaffine (cudweed herb, “Shu-qu-cao”) based on DNA barcode marker ITS2 [J]. *Acta Physiol Plant*, 2021, 43: 119.
- [15] 郑梦迪, 孙咪咪, 贺紫涵, 等. 基于 ITS2 序列及二级结构对相似泻药材牛尾独活、当归、独活和羌活的鉴别研究[J]. *药学报*, 2021, 56(8): 2289–2294.
- ZHENG MD, SUN MM, HE ZH, *et al.* Molecular authentication of the medicinal species of *Rhizoma et radix heraclei*, *Radix angelicae sinensis*, *Radix angelicae pubescentis* and *Rhizoma et radix notopterygii* by integrating ITS2 and its secondary structure [J]. *Acta Pharm Sin*, 2021, 56(8): 2289–2294.
- [16] 郑梦迪, 贺紫涵, 张春, 等. 基于 ITS2 序列及二级结构对紫苏与其变种、紫苏子与其混伪品的鉴别[J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(4): 93–101.
- ZHENG MD, HE ZH, ZHANG C, *et al.* Molecular Identification of *Perilla frutescens* and its varieties, *Perillae fructus* and its adulterants based on ITS2 primary sequence and its secondary structure [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2022, 41(4): 93–101.
- [17] 郑梦迪, 张春, 马瑞龙, 等. 基于 matK 和 ITS2 及二级结构对药材香薷及其混伪品的鉴别研究[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(17): 2222–2228.
- ZHENG MD, ZHANG C, MA RL, *et al.* Identification of moslae herba and its adulterants based on matK, ITS2 and its secondary structure [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(17): 2222–2228.
- [18] KOETSCHON C, FORSTER F, ALEXANDER K, *et al.* The ITS2 database III—sequences and structures for phylogeny [J]. *Nucl Acid Res*, 2010, 38: 275–279.
- [19] 申慧娟, 张弛, 周爽, 等. 食品中新兴真菌毒素检测技术及其污染现状研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(12): 203–213.
- SHEN HJ, ZHANG C, ZHOU S, *et al.* Research progress of emerging mycotoxin detection technology and its contamination status in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(12): 203–213.
- [20] 易思嘉, 罗林, 陈子键, 等. 毒蕈中 α -鹅膏毒肽的中毒机制及检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(20): 129–139.
- YI SJ, LUO L, CHEN ZJ, *et al.* Research progress on the poisoning mechanism and detection technology of α -amanitin peptides in poisonous mushrooms [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(20): 129–139.
- [21] KELLER A, SCHLEICHER T, SCHULTZ J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50–57.
- [22] KOETSCHAN C, HACKL T, TOBIAS M, *et al.* ITS2 database IV: Interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2012, 63: 585–588.
- [23] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33: 1870–1874.
- [24] SEIBEL PN, MÜLLER T, DANDEKAR T, *et al.* 4SALE-A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing [J]. *BMC Bioinf*, 2006, 7: 498.
- [25] WOLF M, RUDERISCH B, DANDEKAR T, *et al.* ProfdistS: (Profile-) distance based phylogeny on sequence-structure alignments [J]. *BMC Bioinf*, 2008, 24: 2401–2402.
- [26] TELFORD MJ, WISE MJ, VIVEK GS. Consideration of RNA secondary structure significantly improves likelihood-based estimates of phylogeny: Examples from the bilateria [J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22: 1129–1136.
- [27] KELLER A, FRANK F, TOBIAS M, *et al.* Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees [J]. *Biol Direct*, 2010. DOI: 10.1186/1745-6150-5-4
- [28] CHEN SL, YAO H, HAN J, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5: 1–7.
- [29] CHEN SL, YAO H, HAN JP, *et al.* Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2013, 2: 141–148.
- [30] 陈士林, 吴问广, 王彩霞, 等. 药用植物分子遗传学研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(12): 2421–2432.
- CHEN SL, WU WG, WANG CX, *et al.* Molecular genetics research of medicinal plants [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2019, 44(12): 2421–2432.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



郑梦迪, 博士, 副教授, 主要研究方向为生物资源鉴定与评价。

E-mail: hakuna_matata_mm@qq.com