

# 裸盖菇属的真菌鉴定及分子系统学初探

刘如钊<sup>1,2</sup> 魏 涛<sup>1</sup> 何培新<sup>1</sup> 张长铠<sup>1\*</sup>

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)<sup>1</sup>

(河南师范大学环境微生物实验室 新乡 453007)<sup>2</sup>

**摘要:** 裸盖菇属 (*Psilocybe*) 的许多真菌含有神经致幻型毒素, 这些毒素被中国卫生部列为 A 类管制药品。在药检时, 这些真菌样品通常是粉末。因此, 仅依靠形态分类鉴定该类真菌非常困难。研究采用 ITS 序列分析的方法鉴定该类真菌并初步探讨了该属种间的系统发育关系。由系统发育树推断 *Psilocybe* 属可能是多源进化的。通过序列分析可以鉴定真菌样品为 *Psilocybe* 属。

**关键词:** ITS 区, *Psilocybe*, 系统发育分析, 多源进化

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0044-04

## Phylogenetic Relationships in the Genus *Psilocybe* and Their Identification

LIU Ru-Yin<sup>1,2</sup> WEI Tao<sup>1</sup> HE Pei-Xin<sup>1</sup> ZHANG Chang-Kai<sup>1\*</sup>

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)<sup>1</sup>

(Laboratory for Environmental Microbiology, Henan Normal University, Xinxiang 453007)<sup>2</sup>

**Abstract:** Many species of genus *Psilocybe* contain the hallucinogenic compounds, which are controlled as class A drugs in China. In most cases, these fungi samples are powder, so it's difficult to identify by morphological characters. Internal transcribed sequence (ITS) analysis was used to identify the fungi and study the phylogenetic relationship of genus *Psilocybe*. The method can identify the fungi in genus level and the phylogenetic tree indicates that genus *Psilocybe* is probably polyphyletic.

**Key words:** ITS, *Psilocybe*, Phylogenetic analysis, Polyphyletic

裸盖菇属 (*Psilocybe*) 的许多种类含有活性色胺类物质, 包括光盖伞素 (*Psilocybin*)、光盖伞辛 (*Psilocin*)、*Baeocystin* 和 *Norbaeocystin*<sup>[1,2]</sup>。误食含有这类物质的毒菌会引起神经致幻型中毒。在美国、德国、日本等国家, 携带含有这些毒素的真菌是违法的。我国将光盖伞素和光盖伞辛列为 A 类管制药品。为防止该类毒素的滥用和因误食该类真菌而中毒, 需要对含有神经致幻型毒素的真菌进行鉴定。由于这些真菌样品通常是不完整的, 破碎的, 甚至是粉末。因此, 仅依靠形态分类来鉴定该类真菌非常困难。随着分子生物学技术的发展, 基于内转录间隔区 (Internal Transcribed Sequence, ITS 区) 的多态性, 包括长度多态性和序列多态性<sup>[3-5]</sup>, 许多真菌分类学家通过 ITS 区的序列分析来研究真菌种属水平的分类关系<sup>[6-9]</sup>。目前, 我国对该类毒菌的研究尚属空白。本研究通过该类真菌 ITS1 的分子序列分析对 *Psilocybe* 属的真菌进行菌株鉴定和系统发育分析。

\* 通讯作者 Tel: 0531-88364427, E-mail: ckzhang@sdu.edu.cn

收稿日期: 2005-06-01, 修回日期: 2005-06-30

# 1 材料与方法

## 1.1 供试菌株

本研究供试菌株包括 12 个分类单元的 19 份材料 (表 1)。其中, 205, 807, 222 菌株均由西南科技大学贺新生提供。807 菌株, 222 菌株已鉴定至种, 205 菌株尚需鉴定。本试验对这 3 个菌株的 ITS 序列进行测序。其余序列均来自 GenBank 中。

表 1 供试菌株

Species	Code	GenBank (No.)
<i>Psilocybe semilanceata</i>	<i>P. sem</i> AY129353	AY129353
<i>P. semilanceata</i>	<i>P. sem</i> AY129350	AY129350
<i>P. semilanceata</i>	<i>P. sem</i> AY129349	AY129349
<i>p. silvaica</i>	<i>P. sil</i> AY129362	AY129362
<i>P. pelliculosa</i>	<i>P. pel</i> AY129354	AY129354
<i>P. montana</i>	<i>P. mon</i> AY129352	AY129352
<i>P. merdaria</i>	<i>P. mer</i> AY129372	AY129372
<i>P. merdaria</i>	807	AY995175
<i>P. fasciata</i>	222	DQ001041
<i>P. fasciata</i>	<i>P. fas</i> AB158635	AB158635
<i>P. cubensis</i>	<i>P. cub</i> AY129351	AY129351
<i>P. cubensis</i>	<i>P. cub</i> AY281023	AY281023
<i>p. crobula</i>	<i>P. cro</i> AY129358	AY129358
<i>p. crobula</i>	<i>P. cro</i> AY129359	AY129359
<i>p. australiana</i>	<i>P. aus</i> AY129366	AY129366
<i>Psilocybe</i> sp.	205	DQ002870
<i>Panaeolus subbalteatus</i>	<i>Panaeolus subbalteatus</i>	AB092794
<i>Pluteus petasatus</i>	<i>Pluteus petasatus</i>	AF085495
<i>Inocybe lacera</i>	<i>Inocybe lacera</i>	AB211269

## 1.2 DNA 提取

分别称取 1g 205、807、222 菌株的粉末, 加液氮充分研磨后, 迅速转移至 1.5mL 离心管中, 用上海生工的 UNIQ-10 柱式通用 DNA 纯化试剂盒提取基因组 DNA。

吸取少量 DNA 稀释 10 倍测定其浓度,  $15\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $A_{260}/A_{280} = 1.75$ )

## 1.3 ITS 区域的特异性 PCR 扩增

1.3.1 引物序列: ITS-1 5' -TCCGTAGCTGAACCTGCGG-3', ITS-4 5' -TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3', 由上海生工生物公司合成。

1.3.2 PCR 扩增反应体系: 制备 50 $\mu\text{L}$  反应体系, 其中 10 $\times$  扩增缓冲液 (不含  $\text{MgCl}_2$ ) 5 $\mu\text{L}$ , 10mmol/LdNTP 混和液 1 $\mu\text{L}$ , Taq 酶 (5U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5 $\mu\text{L}$ , 正反向引物 (ITS1 和 ITS4) 62.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$  各 0.4 $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2 $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (1.5mmol/L) 3 $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 38.7 $\mu\text{L}$ 。

1.3.3 PCR 反应程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ , 5min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ , 1min; 复性 55 $^{\circ}\text{C}$ , 1min; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ , 1.5min; 34 个循环, 最终 72 $^{\circ}\text{C}$ , 充分延伸 10min。

1.3.4 PCR 产物的检测: 取 5 $\mu\text{L}$  PCR 产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.4 T/A 克隆和转化

1.4.1 克隆体系: PMD18-Tvector 1 $\mu\text{L}$ , 纯化过的 PCR 产物 4 $\mu\text{L}$ , 连接缓冲液 5 $\mu\text{L}$ , 总

体系 10 $\mu$ L。16 $^{\circ}$ C 过夜，转化感受态细胞 (CaCl<sub>2</sub> 法制备感受态细胞) 然后涂布 LB 平板，每个平板涂 200 $\mu$ L X-gal (20mg/mL)，100 $\mu$ L IPTG (24 mg/mL)，氨苄青霉素 (Amp) 终浓度为 150 $\mu$ g/mL。

**1.4.2 PCR 验证重组质粒：**从上述 LB 平板上随机挑取 10 个白色菌落，转移到 10 个含有 Amp 的 LB 固体琼脂平板上，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。将 10 个平板上的菌转接到 LB 液体培养基 (含有 Amp 150 $\mu$ g/mL) 的三角瓶中，37 $^{\circ}$ C 振荡培养 5~6h，做菌落 PCR，反应条件如前 (模板为 1 $\mu$ L 培养菌液)，0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

**1.4.3 酶切验证重组质粒：**挑出 PCR 产物中含有目的基因的菌落，转接培养，提取质粒。提取的质粒用 *Pst*I 和 *Eco*RI 双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

**1.5 DNA 序列的测定**

挑取的重组子作为测序模板，测序工作由上海博亚生物技术有限公司完成。

**1.6 DNA 序列数据的分析**

将 205 菌株的序列提交到 NCBI 数据库 Blast 比对。将 12 个分类单元的 19 个序列构建系统树。使用 Clustal X 软件 (Thompson *et al*, 1997) 对序列进行对齐 (alignment)，序列间插入适当的空格，以达到最大同源性。采用该软件中的邻近-连接法构建进化树，再对得到的进化树进行自举法分析 (bootstrap analysis) (1,000 次重复)，以估算其内在分支的支持率。

**2 结果分析**

将 3 株菌的测序结果提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中，得到 3 个序列号：

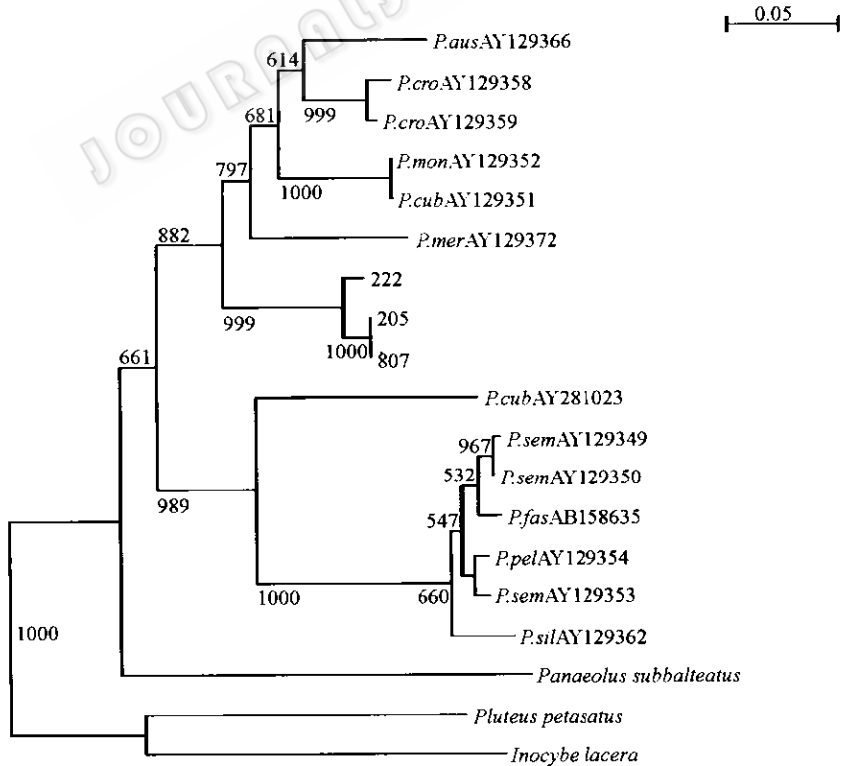


图 1 来源于 ITS1 序列的系统进化树

DQ001041 (222), AY995175 (807), DQ002870 (205)。205 菌株的 BLAST 比对结果显示, 205 菌株的 ITS 序列和 *P. coprophila* 同源性达到 99%, 和 *P. merdaria* 同源性达到 97%。本研究测定的 3 个 *Psilocybe* 序列长度均不大于 650bp, 利用 GenBank 中 13 个 *Psilocybe* ITS 区域的序列和另外另外 3 个相关属 (都能产生神经致幻型毒素)<sup>[10]</sup> *Panaeolus*、*Pluteus*、*Inocybe* 一起进行分析, 上述 19 个序列经 Clustal X 软件对齐后, 按照邻近连接法聚类, 经自举法检验 (1,000 次重复), 得到进化树 (图 1), 利用 Clustal X 软件附带的 njplotWIN95 软件显示进化树。序列号间连线长度代表序列两两比较中产生的相似性得分所换算成的分化距离, 线上数字代表 Bootstrapping 法评估进化树的评估值。

### 3 讨论

对 205 菌株的 ITS 区序列提交 NCBI 数据库 BLAST 比对结果显示, 205 菌株的 ITS 序列和 *P. coprophila* 同源性达到 99%, 和 *P. merdaria* 同源性达到 97%。推断 205 菌株为 *Psilocybe* 属。构建的发育树显示: *Psilocybe* 属的 9 个分类单元的 16 份材料聚为两大类, 205 菌株也聚在 *Psilocybe* 属中, 与另外 3 个属 *Panaeolus*、*Pluteus*、*Inocybe* 的关系较远。205 菌株与 *P. merdaria* (807) 的亲缘关系非常接近, Bootstrapping 法评估重复 1,000 次均聚在一起。*P. merdaria* (807) 与 *P. mer*AY129372 亲缘关系较接近。*P. fasciata* (222) 与 *P. fas*AB158635 的亲缘关系较远, 而与 *P. mer*AY129372 的亲缘关系比较接近。*P. cubensis* 也是类似情况, *P. cub*AY129351 与 *P. mon*AY129352 的亲缘关系非常接近, Bootstrapping 法评估重复 1,000 次均聚在一起, 与同种的不同序列 *P. cub*AY281023 的亲缘关系却比较远。造成这种现象的可能解释是在传统形态学分类中, 形态性状的选取受主观因素的影响较大, 不同的分类理论侧重于不同的性状而难以找到客观统一的标准。通过 ITS 区分子序列分析的方法, 可以对该类真菌鉴定至属, 但要鉴定至种, 需要进行多相分类。*Psilocybe* 属 9 个分类单元的 16 份材料聚为两大类, 推断 *Psilocybe* 可能是多源进化的。

### 参考文献

- [1] Guzman G, Allen J W, Gartz J. Ann Mus Civ Rovereto Sez, 1998, 14: 189 ~ 280.
- [2] Isbell H. Psychopharmacologia, 1959, 1: 29 ~ 38.
- [3] Henrion B, Le Tacon F, Matrin F. New Phytologist, 1992, 122: 289 ~ 298.
- [4] Dresler-Nurmi A, Kaijalainen S, Lindstrom K, et al. Res, 1999, 103: 990 ~ 996.
- [5] Briard M, Dutertre M, Rouxel F, et al. Res, 1995, 99: 1119 ~ 1127.
- [6] Gardes M, Bruns T D. Mol Ecol, 1993, 2: 113 ~ 118.
- [7] Shinohara M L, LoBuglio K, Rogers S. Curr Genet, 1999, 35: 527 ~ 535.
- [8] Graser Y, El Fari M, Vilgalys R, et al. Med Mycol, 1999, 37: 105 ~ 114.
- [9] Gottlieb A M, Lichtwardt R W. Mycologia, 2001, 93 (1): 66 ~ 81.
- [10] Strihny J, Borovicka J, Sokol M. Soud Lek, 2003, 48 (3): 45 ~ 49.