

松茸组织分离物的 rDNA-ITS 序列鉴定

张 灵^{1,2}, 赵 琪¹, 陈严平¹, 孟珍贵¹, 李荣春^{1*}

(1. 云南农业大学 食用菌研究所, 昆明 650201; 2. 云南农业大学 基础与信息工程学院, 昆明 650201)

摘要: 以采自云南丽江的松茸子实体为材料, 进行组织分离后, 利用一对 ITS 引物(ITS1-ITS4)对子实体(SR176B, SR172B)和分离物(SR176H, SR172H)进行了 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳分析, 得到了 700 bp 左右的扩增条带, 进一步对 ITS 序列进行同源性检索比对, 结果表明 SR176H 与 SR176B, SR172H 与 SR172B 序列同源性均为 100%, 鉴定出该分离物就是松茸的纯培养物。

关键词: 松茸; 子实体; 分离物; ITS 序列

中图分类号: Q949.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)02-0181-04

Identification of cultures isolated from fruit body of *Tricholoma matsutake* by rDNA-ITS sequence analysis

ZHANG Ling^{1,2}, ZHAO Qi¹, CHEN Yan-Ping¹,
MENG Zhen-Gui¹, LI Rong-Chun^{1*}

(1. *Institution of Edible Fungi, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China*; 2. *College of Science and Information Engineering, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China*)

Abstract: A pair of general primer(ITS1-ITS4) was used to test in the amplification of the internal transcribed spacer(ITS) region of the chromosomal DNA of fruit body of *Tricholoma matsutake* of Lijiang and its isolates. The results analyzed by Agarose gel electrophoresis showed that the primers of ITS1 and ITS4 amplified about 700bp fragments for all samples. The ITS fragments of *T. matsutake* fruit body and its corresponding isolates were sequenced and aligned. Their sequences of SR176H and SR176B showed a 100% homogeneity, the same result also appeared between SR172H and SR172B. Based on these facts, SR176H and SR172H were confirmed to be pure cultures of *T. matsutake*.

Key words: *Tricholoma matsutake*; fruit body; mycelia; rDNA-ITS

松茸(*Tricholoma matsutake*)是一种珍稀的外生菌根美味食用菌,其营养价值和药用价值都很高(吴映明等,2003),深受日本人喜爱,被誉为“食用菌之王”。人类对松茸的研究已有几百年历史,特别是近几十年来,许多国家在松茸的分类(弓明钦等,1999)、生物资源(Mankel等,1999)、生态(袁天凤等,2006)、半人工栽培(弓明钦等,2007)等方面都有广泛的研究。由于松茸是菌根菌,而菌根真菌在人

工培养基上生长比较困难,同时还由于到目前为止,仍无法应用松茸的纯培养物在人工培养条件下获得松茸子实体,以证明该纯培养物就是松茸菌种,所以对松茸组织分离物的鉴定成为对松茸进行各种研究的基础和前提。为此,我们在进行云南松茸自然扩繁机理研究时通过组织分离获得分离物,并将分离物的 ITS 序列和该分离物的母本子实体标本的 ITS 序列,以及 GenBank 中的松茸 ITS 序列进行了比

收稿日期: 2009-02-04 修回日期: 2009-08-18

基金项目: 云南省科技计划国际科技合作专项(2006GH06) [Supported by International Cooperation Project of Yunnan Science & Technology Plans (2006GH06)]

作者简介: 张灵(1975-),女,云南保山人,讲师,食用菌的研究与利用专业,(E-mail)yyr_km@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail:rongchunli@126.com)

较,以便为更准确和便捷地对松茸种类进行鉴定和培植研究提供技术手段和理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

松茸子实体采自云南省丽江市拉市乡“云南松茸自然扩繁机理研究”项目实验区。获得子实体后进行组织分离,在预先筛选出的专用培养基上培养

获得松茸分离物(编号 SR176H,SR172H)。对于组织分离剩余的子实体,取其菌柄中央完好部分,用硅胶干燥保存(编号 SR176B,SR172B)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取 将编号 SR176H,SR172H 的松茸分离物转培养到专用松茸培养基上,23 ℃下恒温培养 47 d,刮取白色短绒毛状的菌丝用于提取分离物的总 DNA,取硅胶干燥的子实体(编号 SR176B,SR172B)的标本的一部分用于提取子实体

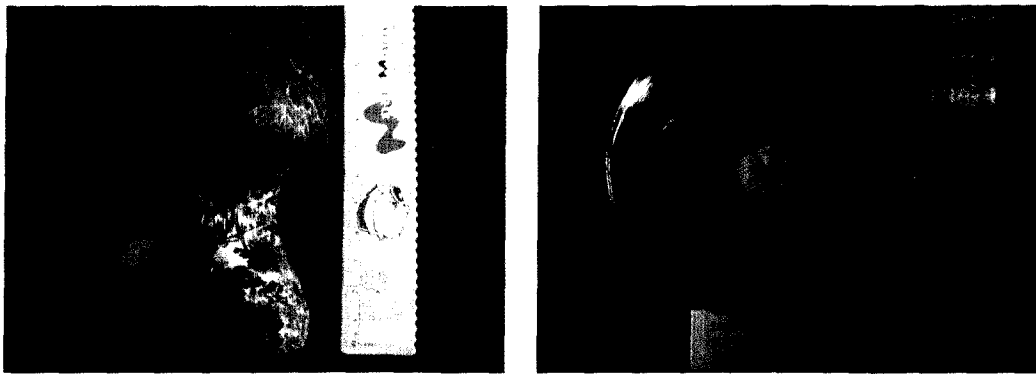


图 1 松茸子实体及分离物

Fig. 1 Fruit body and mycelia isolated from *Tricholoma matsutake*

的总 DNA。两种材料按改进的 CTAB 法提取 DNA。提取的 DNA 用 1% 凝胶电泳检测后置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 仪为美国 MJ 公司生产的 PTC-200 型。引物序列:用于 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增反应的引物 ITS1 和 ITS4 由上海生工公司合成。序列如下:ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3', ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-GC-3'(White 等,1990)。PCR 扩增反应体系:PCR 扩增反应体系选用 25 μ L 反应体系,其中包括 10 \times 扩增缓冲液(含 MgCl₂)2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,5 μ mol/L 的引物各 0.5 μ L,TaqDNA 聚合酶 0.25 μ L,DNA 模板 0.4~2 μ L(根据所提 DNA 浓度不同而异),用 ddH₂O 定容至 25 μ L。PCR 扩增反应程序的热循环参数:PCR 扩增反应程序的热循环参数:94 ℃ 变性 5 min,然后进入连续 35 个循环:94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,循环结束后 72 ℃ 再延伸 10 min,最后 4 ℃ 保存。

1.2.3 PCR 扩增反应结果检测 扩增反应产物取 2.0 μ L 点于塑料薄膜上和溴酚蓝(40% 蔗糖,0.25% 溴酚蓝)混匀,点样于 1% 的琼脂糖凝胶上,

于 1.0 \times TAE 缓冲液(电压为 5 V/cm)中电泳。当溴酚蓝远离点样孔到一定距离时(30~50 min),停止电泳,将凝胶取出,放入 EB 溶液中染色 20 min,再在紫外凝胶成像仪(蓝盾 621)上观察并记录结果。

1.2.4 PCR 扩增反应产物纯化及测序 (1)纯化:PCR 扩增反应产物使用上海生工生物工程技术服务有限公司生产的 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。(2)测序:PCR 扩增反应产物的测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司进行。选用 ABI 3730 DNA 测序仪,测序引物与 PCR 扩增引物相同。

2 结果与分析

2.1 ITS 的 PCR 扩增

四个样品(SR176H,SR172H,SR176B,SR172B)都有扩增条带,大小在 700 bp 左右。

2.2 ITS 序列比较

(1)将 SR176H 与 SR172H,SR176B 与 SR172B 的 ITS 序列分别用 ClustalX 软件进行序列比对,一致性均为 100%。(2)将 SR176B,SR176H 的 ITS 序列

在 GenBank 核酸序列数据库中进行序列相似性检索 (BLAST), 二者的同源性为 99%。结果表明: SR176H 为 SR176B 的纯培养物。(3) 将 SR176B, SR176H 的 ITS 序列分别与 GenBank 核酸序列数据库进行序列相似性检索 (BLAST), 结果表明: SR176B, SR176H 与多个松茸子实体及分离物的 ITS 序列相似程度都很高, 多为 99%。从中选取 AB188557 号序列与本研究中所测的序列进行比对。可以看到 SR176H 与 AB188557 的同源性为 100% (图 3), SR176B 与 AB188557 的同源性为 99%。结果表明: SR176B, SR172B 是松茸子实体, SR176H, SR172H 就是松茸的菌丝体, 由此证明我们通过组织分离方法获得了松茸的纯培养物(菌丝体、菌种)。

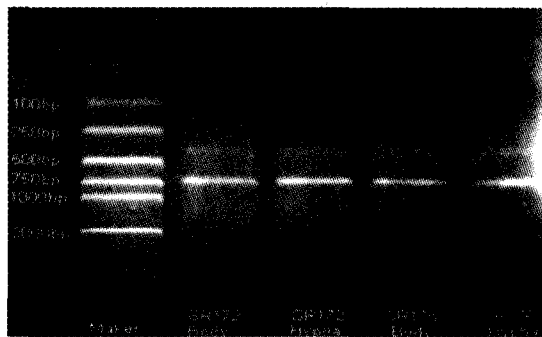


图 2 松茸子实体及分离物的 ITS 引物 (ITS1 and ITS4) PCR 电泳

Fig. 2 Electrophoresis of amplification products with a pair of primers (ITS1 and ITS4)

| | | | |
|----------|-----|---|-----|
| SR176H | 1 | GGGCA TGTGCACG CCTGACGCCAATCTTTTCAC CACCTGTGCACATTTTG TAGGCTTGG A | 60 |
| | | | |
| AB188557 | 51 | GGGCA TGTGCACG CCTGACGCCAATCTTTTCAC CACCTGTGCACATTTTG TAGGCTTGG A | 110 |
| SR176H | 61 | TAAATATGTCTCGAGGAAGCTCGGTTTGA GGACTGCCGTGCTGCAAAAGCCAGGCTTCC | 120 |
| | | | |
| AB188557 | 111 | TAAATATGTCTCGAGGAAGCTCGGTTTGA GGACTGCCGTGCTGCAAAAGCCAGGCTTCC | 170 |
| SR176H | 121 | TTGTATTTTCCAGCCTATGCATTTTATTATACACTCGGTA TGTCATGGAATGTTATT TTG | 180 |
| | | | |
| AB188557 | 171 | TTGTATTTTCCAGCCTATGCATTTTATTATACACTCGGTA TGTCATGGAATGTTATT TTG | 230 |
| SR176H | 181 | CTTGGCTTAATTGCCAGTAAACCTTATACA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCCG | 240 |
| | | | |
| AB188557 | 231 | CTTGGCTTAATTGCCAGTAAACCTTATACA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCCG | 290 |
| SR176H | 241 | ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATGCGA AATTCAGTGAATCA | 300 |
| | | | |
| AB188557 | 291 | ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATGCGA AATTCAGTGAATCA | 350 |
| SR176H | 301 | TCGAATCTTTGAA CGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCC TGT TTGAGTG | 360 |
| | | | |
| AB188557 | 351 | TCGAATCTTTGAA CGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCC TGT TTGAGTG | 410 |
| SR176H | 361 | TCATGAAATCTCAACCTTTTCAGCTTTT TGTGAATAGGCTTGGATTTGGGAGTTGTT | 420 |
| | | | |
| AB188557 | 411 | TCATGAAATCTCAACCTTTTCAGCTTTT TGTGAATAGGCTTGGATTTGGGAGTTGTT | 470 |
| SR176H | 421 | GCAGGCTGCTCAGAAGTCTGCTCTCCTTAAATG TATTAGCGGGCCCTTGTG TCTAGCA | 480 |
| | | | |
| AB188557 | 471 | GCAGGCTGCTCAGAAGTCTGCTCTCCTTAAATG TATTAGCGGGCCCTTGTG TCTAGCA | 530 |
| SR176H | 481 | TTTGG | 485 |
| | | | |
| AB188557 | 531 | TTTGG | 535 |

图 3 SR176H 与 AB188557 在 GenBank 中进行 BLAST 的序列分析结果

Fig. 3 Result of the sequence analysis between SR176 H and AB188557 in GenBank

3 讨论

对于腐生真菌,从子实体的组织分离获得分离物,其分离物可靠性的验证最直接的方法是用该分离物进行栽培出菇验证。但是对多数菌根真菌由于其营养生理的特殊性,在纯人工条件下还无法进行出菇验证,而形态学和细胞学鉴定结果可靠性较差,因此用传统方法对菌根真菌分离物的鉴定就比较困难。现代分子生物学的发展,特别是基因碱基序列分析技术的应用,为菌根性真菌菌种的鉴定提供了可靠、方便的技术手段(张志华等,2006)。而 ITS 序列分析因其保守性强,受环境因素影响较小(廖德聪等,2005)更成为其中的常用方法。刘春卉等(2007)对金耳及其近似种的鉴定,熊涛等(2006)对松乳菇的鉴定,王桂文等(2004)对红菇的鉴定,李海波等(2007)对鹅膏菌的鉴定,所有这些都证明 ITS 序列已成为大型真菌菌种鉴定的重要工具。

我们通过 ITS 序列比较研究证明获得了真正的松茸菌种,为后续的松茸菌丝体的营养生理特性,松茸人工和半人工栽培试验,松茸菌丝体液体发酵及代谢,原生质体单核化研究及交配型等遗传研究提供了可靠的材料。

参考文献:

- 弓明钦,仲崇禄,陈羽,等. 2007. 菌根型食用菌及其半人工栽培[M]. 广州:广东科技出版社,90—100
- 弓明钦,陈羽,王凤珍,等. 1999. 松茸[M]. 昆明:云南科技出版社,10—26
- 张志华,洪葵. 2006. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 生态学报,12(2):39—43
- 吴映明,陈爱葵,曾小龙,等. 2003. 松口蘑的镇咳,祛痰,平喘作用研究[J]. 中国食用菌,22(4):37—40
- 袁天凤,段彬,秋道持,等. 2006. 松茸的地理分布与生态研究[J]. 中国食用菌,25(4):14—17
- 廖德聪,陈强,李登煜,等. 2005. 四川省雅江松茸菌的分离与系统发育[J]. 生态学报,25(4):791—794
- Li HB(李海波),Wu XQ(吴学谦),Wei HL(魏海龙), et al. 2007. A primary studies on classification and identification of seven *Amanita* species based on morphological characteristics and ITS sequences of rDNA(基于形态特征和 ITS 序列对 7 个鹅膏菌属菌株的分类鉴定)[J]. *J Fungal Res*(菌物研究),5(1):14—19
- Liu CH(刘春卉),Qu WJ(瞿伟菁),Zhang W(张雯). 2007. Analyses of *Tremella aurantialba* (Tremellaceae) and its analog species inferred from ITS sequences(金耳与其近似种的 rDNA-ITS 序列分析)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),29(2):237—242
- Mankel A, Kost G, Kothe E. 1999. Re-evaluation of the phylogenetic relationship among species of the genus *Tricholoma* [J]. *Microbiol Res*, 153(4):377—388
- Wang GW(王桂文),Sun WB(孙文波). 2004. Nucleotide sequence analysis on ITS rDNA of fruitbodies and isolates of *Russula* in Guangxi(广西红菇子实体及分离株的 rDNA-ITS 序列分析)[J]. *Guangxi Sci*(广西科学),11(3):261—265
- White TJ, Bruns TD, Lee S, et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ(eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press:315—322
- Xiong T(熊涛),Xiao M(肖满),Zeng ZL(曾哲灵), et al. 2006. Molecular identification of isolate of *Lactarius deliciosus* by ITS analysis(松乳菇组织分离菌株的 rDNA-ITS 序列分子鉴定)[J]. *Microbiology*(微生物学通报),33(4):1—4
- (高度木质化材料的冰冻切片技术)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),18(1):118—120
- Liu JF(刘剑峰),Yan XF(阎秀峰),Cheng YQ(程云清), et al. 2006. Application of cryosectioning technique to cytology studies of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. (冰冻切片技术在高山红景天细胞学研究中的应用)[J]. *J Northeast Fore Univ*(东北林业大学学报),34(7):110—119
- Morin KX, Soll J. 1997. Immunogold labeling of cryosectioned pea chloroplasts and initial localization of the proteins associated with the protein import machinery[J]. *Planta*, 201:119—127
- Ruan CJ(阮成江),Qin P(钦佩),Chen JW(陈景文), et al. 2004. Analysis of nutritive compositions in the seeds of *Kosteletzkya virginica* (海滨锦葵种子营养成分分析)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报),30(9):901—905
- Ruan CJ(阮成江),Qin P(钦佩),Han RM(韩睿明), et al. 2005. Identification of hybrids of *Kosteletzkya virginica* using AFLP markers(AFLP 分子标记鉴定海滨锦葵杂交后代上的应用)[J]. *J Nanjing Fore Univ: Nat Sci Edi*(南京林业大学学报:

- 自然科学版),29(1):20—24
- Sathyanesan SN, Antonia D, Rose T, et al. 2002. A simplified method for combined immunohistochemistry and in-situ hybridization in fresh-frozen, cryocut mouse brain sections[J]. *Brain Research Protocols*, 9:214—219
- Wan YZ(万怡震),He PC(贺普超). 2001. The technic parameters of slicing vitis berries by freezing-microtome(葡萄浆果冰冻切片技术参数的研究)[J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*(西北植物学报),21(2):382—386
- Zhang XC(张新成),Li ZG(李志刚),Li SL(李素丽), et al. 2008. Cryosectioning method for the observation of microtubule cytoskeleton in plant cells(冰冻切片法在植物微管骨架研究中的应用)[J]. *Guihaia*(广西植物),28(2):164—166
- Zheng X(郑熙),Wang XY(王学英),Shan Y(单莹), et al. 2007. Callus induction and plant regeneration from embryo exes of *Kosteletzkya virginica* (海滨锦葵胚轴愈伤组织诱导及植株再生)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),24(2):194—199

(上接第 173 页 Continue from page 173)