

从 ITS 序列探讨猪苓与其伴生菌的亲缘关系

邢晓科 郭顺星*

(中国协和医科大学中国医学科学院药用植物研究所 北京 100094)

摘要: 对猪苓菌丝、野生猪苓子实体、野生猪苓菌核和其伴生菌的 5.8S rDNA 及其两侧的 ITS 1 区和 ITS2 区进行了序列分析。发现猪苓与其伴生菌的 ITS 序列同源性达 99.36%，说明猪苓与其伴生菌有着极高的分子亲缘关系。

关键词: 猪苓, 伴生菌, ITS 序列

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0034-03

THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *GRIFOLA UMBELLATA* AND ITS COMPANION FUNGUS: EVIDENCE FROM ITS SEQUENCE ANALYSIS

XING Xiao-Ke GUO Shun-Xing*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100094)

Abstract: The sequences of 5.8S rDNA and the flanking internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) were sequenced from hypha, fruit body and sclerotia of *Grifola umbellata* and its companion fungus. Their ITS sequences similarity was 99.36%. The results suggested that *G. umbellata* was closely related to its companion fungus.

Key words: *Grifola umbellata*, Companion fungus, ITS sequence

猪苓菌核具有利水渗湿之功效而为我国历次药典所收录, 随着其药用范围的扩大及缺乏有效的保护, 野生资源已濒临枯竭。然而, 长久以来, 在人工培养条件下使猪苓菌丝分化出菌核并未获得成功, 这无疑阻碍了猪苓的生产效率及规模。近来, 我们从野生猪苓菌核的穴中分离出一株与猪苓菌核形成密切相关的真菌, 称其为伴生菌^[1]。猪苓在与伴生菌共培养后, 能由菌丝分化出菌核。但是目前还不能明确伴生菌归属问题。

随着分子生物学的发展, 分子生物学方法越来越多地被应用于真菌系统学研究和分类鉴定。其中核糖体基因 (rDNA) 序列分析已被应用于真菌各个等级水平的系统学研究^[2], 尤其是 5.8S rDNA 和其两侧的转录区 ITS (internal transcribed spacer) 序列分析适用于种级水平的分类研究^[3], 由于 ITS 区为高度可变区, 进化速度最快, 在真菌的属间和种间有时存在巨大的变异, 因此可用于属以下水平的比较^[4]。本文试图通过分析伴生菌与猪苓的 5.8S rDNA 两侧的 ITS 序列, 对比同源性, 以期为伴生菌分类鉴定提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株及实验材料

猪苓 (*Grifola umbellata*) 与伴生菌菌种均为本室提供。野生猪苓子实体和菌核均为采自北京市延庆区的新鲜材料。

* 联系人 Tel: 010-62899729, Email: sxguo@hotmail.com

收稿日期: 2003-06-23, 修回日期: 2003-08-20

1.2 菌丝体培养

取猪苓与伴生菌的平板菌种,用0.5cm口径的打孔器延菌落边缘打孔,分别转接到液体PDA培养基中,22℃,120r/min,培养18d。抽滤收集猪苓与伴生菌菌丝体,用无菌水洗3次,吸去多余水分,备用。

1.3 DNA的提取

采用CTAB法提取总DNA,与文献[5]略有不同之处,在用氯仿异戊醇(24:1)抽提第二次后,取上清3mL,加入4μL 10μg/μL的RNase A,略混匀,并稍加离心,37℃ 30min后,再用氯仿异戊醇(24:1)抽提,以后操作同CTAB法。

1.4 PCR扩增

PCR扩增ITS片段选用ITS1及ITS4两种通用引物^[6],由上海生物工程有限公司合成。引物序列如下:

ITS1 (5'-3') TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4 (5'-3') TCCTCCGCTTATTGATATGC。

50μL反应体系:5μL 10×PCR buffer、2μL 5mmol/L dNTP、2μL 25mmol/L MgCl₂、ITS1和ITS4各1μL (1μmol/L)、2.5 uTaq酶、2μL模板(约含DNA 20ng),加ddH₂O至50μL。

PCR扩增程序:94℃预变性3min,然后94℃变性1min,55℃退火1min,72℃延伸80s,36个循环,最后72℃延伸10min。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5 DNA序列测定

猪苓、伴生菌及猪苓子实体的PCR产物由上海联众进行双向基因测序。

1.6 序列分析

对每一序列,用DNAMAN软件对正向(5'-3')和反向(3'-5')序列进行核对,生成5'-3'的完整序列。并进行同源性分析,生成聚类树。

2 结果

用引物ITS1和ITS4对猪苓菌丝、野生猪苓菌核及子实体和其伴生菌均扩增出了目的片段,大小均为620bp左右。其结果如图1所示。

对每一个样品的正反向测序结果进行序列拼接,并进行同源性分析,生成聚类树,结果如图2所示。

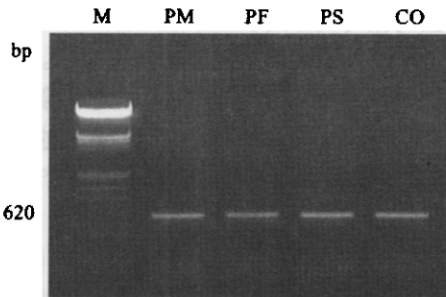


图1 PCR扩增产物的电泳检测图

PM 猪苓菌丝, PF 野生猪苓子实体,

PS 野生猪苓菌核, CO 伴生菌

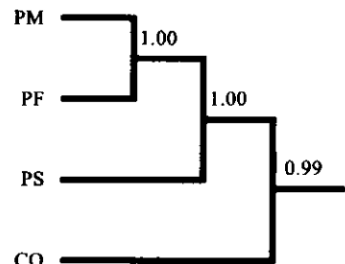


图2 猪苓与伴生菌5.8S rDNA及ITS1和ITS2序列分析形成的聚类树

伴生菌的序列为628bp,而猪苓菌丝、菌核及子实体的序列均为626bp,同源性达99.36%,聚类分析的结果见图2,可以看出伴生菌与猪苓有着极高的亲缘性。所得的猪苓与伴生菌的5.8S rDNA及两侧的ITS序列已登入GenBank,收录号分别为:AY

322495 和 AY 322496。

将所测得的猪苓菌核 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列与 GenBank 中收录的猪苓序列 (收录号 AF 324252) 进行对比, 结果发现 GenBank 中收录的猪苓 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列长 596bp, 与本实验所测猪苓菌株序列同源性达 94.73%。

猪苓及伴生菌与 GenBank 中收录的多孔菌属其它真菌的 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列比对结果:

猪苓菌核与 *P. abeolalis* (收录号为 AB070828) 的 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列 (全长 541bp) 同源性为 59.21%, 伴生菌与其同源性为 59.14%。

猪苓菌核与 *P. tricholoma* (收录号为 AB070885) 的 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列 (全长 580bp) 同源性为 63.61%, 伴生菌与其同源性为 61.70%。

猪苓菌核与 *P. ciliatus* (收录号为 AB070878) 的 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列 (全长 584bp) 同源性为 55.42%, 伴生菌与其同源性为 56.28%。

猪苓菌核与 *P. brumalis* (收录号为 AB070877) 的 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列 (全长 580bp) 同源性为 59.43%, 伴生菌与其同源性为 60.63%。

猪苓菌核与 *P. arcularius* (收录号为 AB070868) 的 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列 (全长 580bp) 同源性为 58.81%, 伴生菌与其同源性为 53.57%。

3 讨论

真核生物编码 rRNA 基因 (rDNA) 形成一个串联重复转录单位, 即 18S rRNA-ITS I-5.8S rRNA-ITS II-28S rRNA。rDNA 的 ITS 序列为多拷贝且较易于 PCR 扩增分离; 真菌 rDNA 相当保守, 但 rDNA 内转录区进化相对较快, 在同一属内可因种的不同而出现变异^[7,8]; 即便是同一种真菌不同的菌株之间其 ITS 序列也不尽相同^[9]。

通过对猪苓菌丝、菌核、子实体及伴生菌的 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列分析表明, 伴生菌的 5.8S rDNA 及两侧的 ITS 序列比猪苓 (菌丝、菌核及子实体) 仅多 2 个碱基, 另外有 3 个碱基有差异, 同源性达 99.36%, 说明伴生菌与猪苓有很高的亲缘性。伴生菌与猪苓的序列有着如此高的同源性, 从分子角度来说则是伴生菌与猪苓有着相同的分子进化, 这与伴生菌和猪苓有着相同的生境, 并长期共同进化有关。

以上研究只是从分子进化的角度分析了伴生菌与猪苓的亲缘关系, 要具体定义此种, 则有赖于其有性阶段的形成。我们期待在以后的工作中, 能明确伴生菌的归属问题。

参 考 文 献

- [1] Guo S X, Wang Q Y, Zhuang W Y, et al. Acta Botanica Sinica, 2002, 44: 1151 ~ 1154.
- [2] Brower A V, Desalle R, Vogler A. Ann Rev Ecol Syst, 1996, 27: 423 ~ 450.
- [3] Bruns T D, White T J, Taylor J W. Rev Ecol Syst, 1991, 22: 525 ~ 564.
- [4] O'Donnell K. Curr Genet, 1992, 22: 213 ~ 220.
- [5] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. Nucleic Acids Research, 1991, 19: 1349.
- [6] White T J, Lee S B, Taylor J W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocol, a guide to methods and application. San Diego: APS Press, 1990. 315 ~ 322.
- [7] 骆志成, 王端礼, 李若瑜, 等. 菌物系统, 2000, 19: 336 ~ 341.
- [8] Cees W, Jacq R A, de Koning, et al. Mycologia, 1996, 88: 361 ~ 368.
- [9] 祝明亮, 张克勤, 缪作清. 菌物系统, 2000, 19: 498 ~ 501.