

基于 IGS 序列的两株蜜环菌分子鉴定

冯 健, 范俊岗, 金若忠, 陈 罡

(辽宁省林业科学研究院, 辽宁 沈阳 10032)

摘 要:以从猪苓 [*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr.] 菌核和榛蘑 (*Armillariella mellea*) 子实体中分离得到菌株 bs 和 zm 为试材, 通过对其 IGS 区段进行分析并结合分离材料和培养菌丝的形态特征确定其分类学地位。结果表明: 菌核和子实体的生境及形态学特征初步鉴定为蜜环菌; 对 2 个菌株的分类学地位进行了分析确定, 并利用引物 5SA 和 CNL12 扩增其 IGS 区域, 进行 BLAST 比对分析, 菌株 bs 和 zm 均为高炉蜜环菌, 为辽宁省猪苓的伴生菌。

关键词:蜜环菌; PCR; rDNA

中图分类号:S 949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0116-03

蜜环菌 (*Armillaria*) 广泛分布于世界各地, 可引起多种针叶树及阔叶树根腐病, 其寄主植物多达 300 属, 对林业造成巨大的经济损失^[1]。然而, 蜜环菌又是一类具有重要经济价值的高等真菌。一些中药制剂, 如脑心舒、银蜜片等, 已广泛应用于临床治疗; 同时也是名贵中药天麻 (*Gastrodia elata*) 和猪苓 (*Gri fola umbellata*) 栽培必备的共生菌^[1-2]。

蜜环菌担子果形态变异大, 基于形态学的蜜环菌属的分类一直较为混乱, 全世界有 250 多个种划归该属, 同时也有一些蜜环菌被划分到其它属种^[2-3]。随着生物技术的发展, 分子生物学方法广泛应用于真菌系统学研究和分类鉴定中。目前, 在蜜环菌狭义种遗传多样性和分子系统学研究中, 应用较多的方法主要包括扩增 IGS (Intergenetic spacer, 基因间隔区)、ITS (Internal transcribed spacer, 内转录间隔区)、限制性内切酶的酶切、RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism, 限制性片段多态性) 和 RAMS (Random Amplified Microsatellite, 随机扩增微卫星) 等^[2]。该文以野生猪苓菌核和榛蘑子实体为材料, 从中分离得到 2 个菌株, 通过对其 IGS 区段进行分析并结合分离材料和培养菌丝的形态学特征确定其分类学地位。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 该试验待鉴定的菌株为辽宁省林业科学院森林保护实验室自丹东市宽甸县红松林分离和筛选

得到。将菌核从野外带回, 在无菌室内, 用犀牛牌刀片削去菌核表皮, 挑选内部黄白色部分切割成豆粒大, 用无菌镊子夹住, 放入含 PDA 培养基的试管中即可完成菌株的分离, 待菌索长出, 再行转管、纯化。另外, 为准确鉴定这 2 株菌株, 从沈阳农业大学购得 1 株已经过鉴定的蜜环菌。将分离自猪苓菌核的菌株命名为 bs, 分离自榛蘑子实体的菌株命名为 zm, 从沈阳农业大学购得的菌株命名为 nydx。

1.1.2 主要试剂及引物 rDNA-IGS 扩增所用试剂、DNA 凝胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司。rDNA-IGS 分析所用的引物 5SA/CNL12 由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。其它试剂为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株形态观察 将保存菌株接种于 PDA 培养基斜面上, 置于生化培养箱中 25℃ 培养 72 h, 观察并记录菌落特征和菌株形态特征。菌索 24 h 定植, 犹如小须根, 背光条件下, 可见荧光。这 2 种菌不像香菇等在 PDA 培养基上可以长出白色菌丝构成菌落, 只是在培养基内部生长, 后期部分菌索穿出培养基表面。菌索刚开始时是白色, 后期变褐色。

1.2.2 真菌基因组 DNA 的提取及检查 采用 CTAB 法^[5] 提取菌丝体基因组总 DNA, 用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳定性检测, 再用紫外分光光度计定量检测。

1.2.3 rDNA-IGS 分析 采用引物 5SA 和 CNL12 扩增其 rDNA-IGS 片段。引物序列为 5SA: 5'-CAGAGTC-CTATGGCCGTGGAT-3', CNL12: 5'-CTGAACGCCTCTA-AGTCAG-3'。扩增体系为: 10 × PCR Buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 酶 0.3 μL, 10 μmol/L 5SA 和 CNL12 引物各 1 μL, 50 ng/μL 模板 DNA 1 μL, ddH₂O

第一作者简介:冯健(1978-), 男, 博士, 工程师, 现主要从事林木分子遗传及生物技术和土壤微生物研究工作。E-mail: fengjian-0205@163.com。

基金项目:辽宁省科技支撑计划资助项目(2007207004)。

收稿日期:2011-10-12

16.2 μL , 反应总体积为 25 μL 。扩增反应条件为: 94℃ 预变性 2 min 后; 94℃ 变性 40 s, 58.9℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 100 s, 共 35 个循环; 最后于 72℃ 补平 10 min, 终止温度为 4℃。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2.4 rDNA-IGS 片段的回收、克隆和测序 采用 DNA 凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司)从 1.5% 的琼脂糖凝胶中回收 rDNA-IGS 扩增片段。回收产物用普洛麦格 pGEM-T Easy Vector 连接, 转化于大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 菌株感受态细胞, 经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后, 每个样品均随机挑选 3 个阳性克隆交付上海生物工程技术有限公司完成测序。

1.3 序列比较

将测得的序列用 Blastn 软件从 GenBank 搜索到的相关序列, 用 Clustal W 软件进行比对后手工校正。

2 结果与分析

2.1 2 株蜜环菌的分离与形态学鉴定

由图 1 可知, 来自猪苓菌核分离的菌株, 生长类似蜜环菌菌索。来自榛蘑的菌株子实体肉质, 菌盖幼时半球形至钟形, 成熟时圆形。菌柄上具有菌环, 柄基部膨大球形, 菌柄上有绒毛状菌墓残留物。另外, 将这 2 株待鉴定菌株与购得的已鉴定为蜜环菌的菌株在固体培养基上培养并定期进行观察, 结果表明, 这 3 个菌株生长非常相似, 具有蜜环菌典型的形态特征。根据上述观察结果, 初步鉴定, 从猪苓菌核和榛蘑子实体中分离得到的 2 株菌株为蜜环菌。

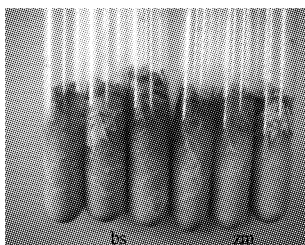


图 1 bs 和 zm 的菌索

Fig. 1 Rhizomorph of bs and zm

2.2 3 株蜜环菌的分子鉴定

为进一步确定这 2 株蜜环菌的分类地位, 采用分子生物学方法对其进行鉴定。分别提取 3 株蜜环菌的 DNA(sb、zm 和 nydx), 采用通用引物 5SA 和 CNL12 扩增其 rDNA-IGS 片段。将获得的扩增片段进行测序、序列比对等生物信息学分析, 结果表明, 3 株蜜环菌的同源性为 98.38%, sb 和 zm 的同源性为 99.07%, sb 与 nydx 的同源性为 96.75%, zm 与 nydx 的同源性为 97.10% (图 2)。将 3 株蜜环菌测序结果在 NCBI 上进行 Blast 分析表明, sb 和 zm 与高卢蜜环菌相似性较高 (EU636240.1), nydx 与黄小蜜环菌 (AF451803) 相似性比较高。为构建这 3 株蜜环菌的系统进化树, 从

GenBank/EMBL/DBJ 数据库中下载其它蜜环菌 rDNA-IGS 序列, 包括高卢蜜环菌 (EU636240.1、AF451829.1)、黄小蜜环菌 (DQ115581、AF451802.1、AF451803)、芥黄蜜环菌 (AY509169)、*Armillaria calvelescens* (FJ626849)、奥氏蜜环菌 (AF451815)、*Armillaria nabsnona* (AY509178) 和北方蜜环菌 (GQ847520)。系统进化树构建结果表明, bs 和 zm 与高卢蜜环菌 (EU636240.1、AF451829.1) 亲缘关系较近, nydx 与黄小蜜环菌 (AF451803) 亲缘关系较近 (图 3)。这一结果与 NCBI 比对结果一致。

nydx	TTGGTGTGCG	ACATTAGACT	TGTGTTTAAA	TAGAGCTTTG	CTCGTGAACC
zm	-----	-----	-----	-----	-----
bs	-----	-----	-----	-----	-----
nydx	AAATATGGTGGGCTGGGTTG	TCTTTGCGGA	AACGCTTGGA	CGACTTGCTCT	
zm	-----	-----	-----	-----G	-----
bs	-----	-----	-----	-----G	-----
nydx	ACGAATTGTAATCATAATAT	GGGCGGCGGT	GAATCCTTTG	CAGACGACTT	
zm	-----	-----	-----	-----	-----
bs	-----	-----T-----	-----	-----	-----
nydx	GAATGGGAACGGGGTACTGT	AAGTGGTAGA	GTAGCCTTGT	TGCTACGATC	
zm	-----	-----	-----	-----	-----
bs	-----	-----	-----	-----	-----
nydx	CACTGAGGTT	AAGCCCTTGT	TCTAAAGATT	TGTTCAACTT	TGTTGGACTT
zm	-----	-----	-----	-----	-----
bs	-----	-----	-----	-----	-----
nydx	TCTCTTTTCT	TTTACATGC	TGAAACCTTG	AGGGCCGGGA	TAGTATCCTT
zm	-----	-----	-----G-----	-----	-----
bs	-----	-----	-----G-----	-----	-----
nydx	TGTGCACTCG	CGACAGCATG	TACTTAGAT	TCGAAAGGGT	AAGCTAACAA
zm	-----	-----	-----	-----G-----	-----
bs	-----	-----	-----	-----G-----	-----
nydx	CAACGCCTTA	GTGTTTGTGTT	ACCTTTCTCC	TTTGAATCAC	GAGTTATTAT
zm	-----	-----	-----T-----	-----	-----
bs	-----	-----	-----T-----	-----	-----
nydx	GAGCCTTGAA	GACTTATAAG	GCACTTAGTT	AGCAAGCTCT	AACCGCGCGC
zm	-----	-----	-----	-----T-----	-----
bs	-----	-----	-----	-----T-----	-----
nydx	TGACTTGGAACGGTCTTTAT	CTTGACTTG	ATATCGACTT	TATGGCCGAT	
zm	-----C-----	-----	-----C-----	-----	-----
bs	-----C-----	-----	-----C-----	-----	-----
nydx	ATCCCGTATA	TGGTATAGCC	AAGATCCTTG	AAAGGGCAAG	TCAACGACTG
zm	-----	-----	-----	-----G-----	-----
bs	-----	-----	-----	-----G-----	-----
nydx	ATTTTCTGGA	TCGTTAGTGA	GCTTGAGGGT	CTGCCCTAAG	GTTGCCATGA
zm	-----	-----	-----C-----	-----	-----
bs	-----	-----	-----C-----	-----	-----
nydx	TTGAAAAGGCCTTAGAAGCT	AAGTAAAGTTA	AGCTACGGTT	ACCTTTTTAA	
zm	-----	-----	-----	-----G-----	-----
bs	-----	-----	-----	-----G-----	-----
nydx	CCGTTTCAAC	TGTTTACTTA	GCTTTCGAGG	GCTACGTTCA	AAATTTGAAC
zm	-----	-----C-----G-----	-----	-----	-----
bs	-----	-----C-----G-----	-----	-----	-----
nydx	AGCAACTGGT	TCTGAAACGA	AAGGTTTGCT	AAGTAAACCA	TTGGTCAAGA
zm	G-----	-----	-----	-----	-----
bs	G-----	-----	-----	-----	-----
nydx	CCGTTTTCGA	ACAATTTTGG	TGGCTGTAG	GATGAGTTTT	CATT-GACTT
zm	T-----	-----	-----	-----GC-----	-----T-----
bs	T-----	-----	G-----	-----GC-----	-----
nydx	GGCCTATAGT	GCGAGTTGGT	AACAAAACGC	AATAAAATGC	ATACTTGTTA
zm	-----	-----	-----	-----	-----C-----
bs	-----	-----	-----	-----	-----C-----
nydx	TC-CACGGCG	AGA			
zm	-----T-----				
bs	--A-----				

图 2 3 株蜜环菌核酸序列比对结果

Fig. 2 The blast of 3 Armillarias based on nucleotide sequences

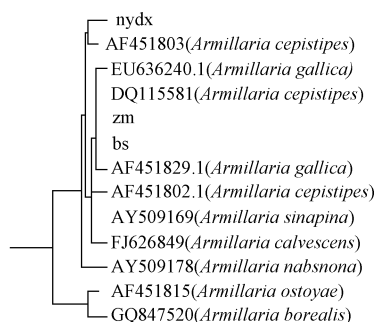


图3 3株蜜环菌与其它近缘种的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of 3 *Armillarias* and other related species

3 结论与讨论

猪苓为传统中药,有利水渗湿作用,近年来医疗上又发现其对医治肝炎和抗癌有疗效,具有较高的药用价值。榛蘑为我国东北特有的山珍之一,其富含人体必需的多种氨基酸和维生素,是目前市场上深受消费者喜爱的一种菌类。但是,猪苓和榛蘑人工繁殖均十分困难,研究表明猪苓和榛蘑均需要蜜环菌伴生才能生长。因此,明确猪苓和榛蘑的伴生蜜环菌对人工繁殖至关重要。由于蜜环菌分类比较混乱,传统实验手段很难准确鉴定蜜环菌的分类地位。随着生物技术的发展,将形态学与现代分子生物学技术相结合的方法对蜜环菌进行鉴定已得到广泛应用,尤其是分子技术的介入使得准确鉴定蜜环菌不再困难。Duchesne L C等^[6]在研究中发现,蜜环菌属(*Armillaria*)内各生物种的5S rRNA基因与18S、5.8S和28S rRNA基因共处于rRNA基因群的一个重复单位(rDNA)中,并且它们的转录方向是一致的,5S rRNA基因5'端距28S rRNA基因的3'端0.8 kb。据此,Duchesne L等^[6]和Anderson J B等^[7]设计了分别位于5S DNA和28S rDNA的引物5SA和CNL12,用于在PCR反应中扩增蜜环菌属(*Armillaria*)各生物种5S DNA和28S rDNA之间的IGS区段。Anderson J B等^[7]用这2个引物(5SA/CNL12)成功地扩增了蜜环菌属9个生物种24个分离株的IGS区段。Henrion B等^[8]用这一对引物(5SA/CNL12)成功扩增出IGS的真菌,包括*Lactarius*、*Rhizopogon*、*Amanita*、*Tricholoma*、

Tuber、*Cenococcum*、*Boletus*、*Paxillus*和*Scleroderma*等多个属。在后来的研究中,也在其它一些真菌中发现了类似蜜环菌属(*Armillaria*)物种的rDNA结构^[9-10],说明这种rDNA结构在真菌中具有一定的普遍性。同时,也表明5SA和CNL12这对引物组合可准确鉴定、区分蜜环菌。该研究即采用这对引物组合对所获得的2株蜜环菌进行鉴定,其鉴定准确性十分可靠。

该研究将传统的形态观察与分子技术相结合,首先从形态学上确定分离自猪苓菌核和榛蘑子实体的菌株为蜜环菌。与此同时,应用分子生物学技术,扩增所获菌株的rDNA-IGS区域。通过生物信息学分析,确定这2株蜜环菌与高卢蜜环菌具有较近的亲缘关系。另外,购买已获鉴定的蜜环菌菌株作为参照,通过形态观察和分子技术鉴定,均表明从猪苓菌核和榛蘑子实体中所获得菌株与参照蜜环菌具有非常高的相似性和同源性。这进一步证实了鉴定结果的准确性。

参考文献

- [1] 秦国夫,赵俊,郭文辉,等. 蜜环菌的生物学研究进展[J]. 东北林业大学学报,2004,32(6):89-94.
- [2] 邹容,康翼川. 蜜环菌研究进展[J]. 山地农业生物学报,2005,24(3):260-264.
- [3] Volk T J, Harold H B. The state of taxonomy of the genus *Armillaria* [J]. *Mc Ilvainea*, 1993, 11: 4-11.
- [4] Coetzee M P, Wingfield B D, Harrington T C, et al. Geographical diversity of *Armillaria*, S. S. based on phylogenetic analysis [J]. *Mycologia*, 2000, 92(1): 1056-1130.
- [5] Hillis D M, Moritz C M, Mable B K. *Molecular Systematics* [M]. Massachusetts: Sinauer Associates, 1990: 411-501.
- [6] Duchesne L C, Anderson J B. Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria* [J]. *Mycological Research*, 1990, 94: 266-269.
- [7] Anderson J B, Stasovski E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria* [J]. *Mycologia*, 1992, 84: 505-516.
- [8] Henrion B, Le T, Martin F. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes [J]. *New Phytol*, 1992, 122: 289-298.
- [9] Bell B I, Degennaro L J, Geleffand D H, et al. Ribosomal RNA genes of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 252: 8118-8125.
- [10] Garber R C, Turgeon B G, Selker E U, et al. Organization of ribosomal RNA genes in the fungus *Cochliobolus heterostrophus* [J]. *Current Genetics*, 1998, 14: 573-582.

Molecular Identification of Two *Armillaria* Based on IGS Sequence Analysis

FENG Jian, FAN Jun-gang, JIN Ruo-zhong, CHEN Gang

(Liaoning Academy of Forestry Sciences, Shenyang, Liaoning 110032)

Abstract: The bs and zm was isolated from sclerotia of *Polyporus Umbellatus* and body of *Armillaria mellea* respectively as test material. Through the IGS Section was analyzed and combined the morphological characteristics of mycelium of separation material, the taxonomic position were determined. The results showed that the habitats and morphological features of sclerotia of *Polyporus Umbellatus* and body of *Armillaria mellea*, two associated fungi were identified as *Armillaria preliminarily*. In order to confirm the taxonomic position of two *Armillarias*, PCR with 5SA and CNL12 as primers was used to amplify rDNA of two *Armillarias*. The results showed that both of *Armillarias* were *Armillaria gallica*, which was the associated fungus of *Polyporus Umbellatus* in Liaoning Province.

Key words: *Armillaria*; PCR; rDNA