

新疆伊犁昭苏野生羊肚菌分离株的分子鉴定研究

武冬梅^{1,2}, 许文涛^{2,3}, 谢宗铭¹, 李全胜¹, 罗云波^{2,3}

(1. 新疆农垦科学院 分子农业技术育种中心, 作物种质创新与基因资源利用兵团重点实验室, 新疆 石河子 832000;

2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 3. 农业部转基因生物食用安全监督检验测试中心(北京), 北京 100083)

摘要:以羊肚菌为试材, 采用组织分离法分别从 3 株野生羊肚菌子实体分离得到性状稳定的菌丝体, 根据子实体形态特征并结合 ITS 序列分析对分离株进行鉴定。结果表明: 3 株分离株均与黑脉羊肚菌同源性最高达 99.0%; 系统发育分析显示, 分离获得的 3 株野生羊肚菌分离株亲缘关系较近, 均聚在黑脉羊肚菌分支上。

关键词:羊肚菌; 分子鉴定; 内转录间隔区(ITS)

中图分类号:S 646.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)21-0145-04

羊肚菌隶属于囊菌亚门, 盘菌纲, 盘菌目, 羊肚菌科, 羊肚菌属。因其外观多为尖顶型或圆顶型, 表面呈蜂窝状, 与羊肚极为相似, 故名羊肚菌。羊肚菌子实体肉质脆嫩, 味道鲜美, 营养价值极高, 必需氨基酸和维生素含量丰富, 是一种珍稀、野生食药真菌^[1]。

新疆伊犁昭苏地区特殊的地理环境为野生羊肚菌的生长提供了优越的生态条件, 种质资源丰富, 是新疆野生羊肚菌的主要分布区域之一。然而, 近年来由于市场对野生羊肚菌需求量日益增加, 加之天然产量有限及毁灭性的采挖、生态环境的破坏, 导致野生羊肚菌分布

范围和产量呈现明显下降趋势。为了有效保护和合理利用这种珍稀野生资源, 羊肚菌人工栽培技术的实施迫在眉睫。羊肚菌纯种分离培养、物种鉴定是野生羊肚菌人工栽培的前提和基础。

传统的羊肚菌物种鉴定主要依据子实体、菌丝、子囊、子囊孢子及侧丝的形态特征^[2], 但因羊肚菌发育过程中具有形态特征随环境条件和个体发育年龄发生一定变化的复杂性和不稳定性, 导致形态学分类具有不确定性。目前, DNA 序列分析, 特别是 ITS 序列分析技术, 因其能实质性地反映出属间、种间及菌株直接的碱基对差异, 已被广泛应用于真菌属内不同种间或近似属间的分类鉴定研究^[3-5]。

该研究以新疆伊犁昭苏地区的野生羊肚菌为试材, 通过组织分离方法获得性状稳定的菌丝体, 提取菌丝体基因组 DNA 进行 ITS 序列比对分析, 旨在较为准确地确定分离获得的纯菌丝体所属物种, 为昭苏县野生羊肚菌纯培养菌种的保护利用, 长期保藏提供必要的技术支撑, 进而为野生羊肚菌人工栽培及进一步的开发利用提供科学依据。

第一作者简介:武冬梅(1976-), 女, 硕士, 副研究员, 现主要从事应用微生物等研究工作。E-mail: wdm0999123@sina.com.

责任作者:罗云波(1960-), 男, 博士, 教授, 现主要从事食品安全与食品生物技术及果蔬贮藏保鲜等研究工作。E-mail: lyb@cau.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160011); 国家星火计划资助项目(2013GA891001)。

收稿日期:2014-07-14

Logistics Fresh-keeping Test of Grape Under Delayed Cultivation

LI Wen-sheng, YANG Jun-jun, WANG Bao-gang, HOU Yu-ru, MIAO Fei

(Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093)

Abstract: Taking grape 'Hongti' as material, cultivated land and non-cultivated land facility grapes were planted with delayed cultivation technique in Gansu province, the logistics fresh-keeping test of highway and railway transport were studied. The results showed that the average temperature was 3.9—8.8℃ and relative humidity was 78.9%—85.5% during logistics of grapes under natural cold environment. The grapes could be maintained quality fresh at 60 days storage and were able to meet the market demand of New Year's Day and Spring Festival.

Keywords: grape; delayed cultivation; logistics; fresh-keeping

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:用于分离菌株的野生羊肚菌子实体于2012年采自昭苏县军马场,海拔2 300 m,常年有雪岭云杉生长。根据子实体形态差异分别命名为XJ13M04、XJ13M05、XJ13M06,形态鉴定分别为黑脉羊肚菌、尖顶羊肚菌、高羊肚菌。

培养基:PDA培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,维生素B₁ 0.5 mg。PDB培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,维生素B₁ 0.5 mg。

酶和试剂:2×Easy Taq Mix 购自北京康为世纪生物公司;SanPrep 柱式DNA胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;2×CTAB DNA提取液、裂解液、LB细菌培养基及其它试剂均为国产或进口分析纯试剂。

仪器:水浴锅、涡旋振荡器、冷冻离心机、PCR仪、电泳槽、Bio-Rad电泳仪、凝胶成像仪。

1.2 试验方法

1.2.1 组织分离培养及菌丝体纯化 选取新鲜的、健康无虫害的羊肚菌子实体,在无菌条件下,先用75%的酒精擦拭子实体表面,再用无菌水冲洗3~4次,然后用无菌滤纸吸干表面水分,撕开羊肚菌,以无菌手术刀片削取内部组织接种于PDA培养基上,置于25℃恒温培养箱中。当组织块从中心向四周辐射长出白色绒毛状菌丝时,取边缘端菌丝再次接种于新鲜的PDA培养基上,反复转接,直至没有细菌和霉菌污染,即获得羊肚菌纯菌丝体。

1.2.2 菌丝体DNA提取及琼脂糖凝胶电泳检测 分别取直径约1.5 cm的分离菌株扩大培养物接种于PDB培养基中,25℃培养4 d,8层纱布过滤,收集菌丝体,采用CTAB法进行菌丝体总DNA的提取。CTAB法提取羊肚菌菌丝体基因组DNA:称取0.20 g处理过的菌丝体,加入液氮迅速研磨成粉末,转入预冷的离心管中;迅速加入1 000 μL 2×CTAB DNA提取缓冲液,β-巯基乙醇20 μL,蛋白酶K 10 μL,涡旋混匀,冰浴保存10 min后4℃,12 000 r/min离心10 min;弃上清,沉淀中加2×CTAB DNA裂解液(65℃预热)500 μL,β-巯基乙醇20 μL,蛋白酶K 10 μL,混匀后置65℃水浴抽提30 min,每10 min翻转1次,以保证充分裂解;冷却,加入500 μL氯仿:异戊醇(24:1)混合液,12 000 r/min离心10 min;取上清,冷却,加入500 μL氯仿:异戊醇(24:1)混合液,12 000 r/min离心10 min;取上清,加入0.6倍体积预冷的异丙醇,混匀,静置10 min,12 000 r/min离心10 min;弃上清,沉淀用75%的乙醇洗涤2次,10 000 r/min离心10 min;弃上清,通风干燥,40 μL ddH₂O溶解DNA,加入3 μL RNA酶,37℃水浴消化

30 min后用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。以ddH₂O将获得的DNA稀释10倍备用。

1.2.3 ITS区扩增及克隆测序 采用White等^[6]设计的真菌核糖体基因间隔区(ITS)通用引物ITS1/ITS4对供试材料rDNA ITS序列进行PCR扩增。引物序列为,ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTC-CGCTTATTGATATGC。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。ITS-PCR扩增反应体系(20 μL)为:2×Easy Taq Mix 10 μL,ITS1(10 μM)0.8 μL,ITS4(10 μM)0.8 μL,模板DNA 0.6 μL,ddH₂O 7.8 μL。反应程序为:95℃预变性4 min,95℃变性30 s,57℃复性30 s,72℃延伸60 s,31个循环后72℃延伸7 min结束反应。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,用DNA凝胶回收试剂盒分别回收纯化目的片段,将扩增产物连接到pUCm-T载体上,转化大肠杆菌,转化子分别命名为pUCm-T-XJ13M04、pUCm-T-XJ13M05、pUCm-T-XJ13M06。经PCR鉴定后委托上海生工生物工程技术服务有限公司完成测序。

1.2.4 序列分析与系统进化树的构建 测序后利用DNASTar Lasergene v7.1软件包中的Editseq进行处理,得到ITS片段全序列信息。将获得的ITS全序列剔除两端的载体序列、18S、28S序列,使序列信息尽可能一致。利用Genbank数据库中BLAST程序进行序列同源性比较,下载相似性较大的序列,用MEGA 5.0中的Alignment程序对所测得的ITS序列进行多重对位排列,并手动删除对位排列结果中的非对位排列序列。对位排列结果中的空位或缺失数据作pair-wise处理,分析时所用参数均为系统默认值。以皱盖钟菌作为外类群,邻位相连法构建系统发育树。利用自展法(Bootstrap,1 000次重复)检验各分支的置信度。

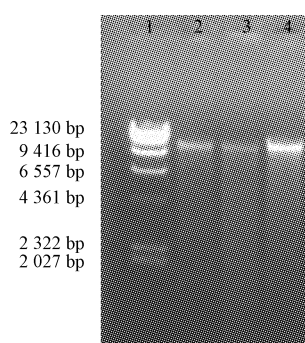
2 结果与分析

2.1 野生羊肚菌纯菌丝的获得

3株野生羊肚菌子实体通过组织分离培养及4次转接纯化后获得纯的菌丝体,菌丝生长初期为白色,培养大约5 d后菌丝颜色逐渐加深,随着培养时间的延长,菌丝分泌的褐色色素使培养基颜色渐变为褐色。菌丝体生长中后期有淡黄色菌核产生,随后颜色至深棕色。XJ13M06菌丝呈淡黄色,菌丝茂密,生长速度较快;XJ13M04、XJ13M05生长速度较慢;菌丝颜色呈褐色。显微镜下观察,3株分离株菌丝透明、均匀、有分隔和分支,分支菌丝稍细。

2.2 菌丝体基因组DNA提取及ITS序列PCR扩增、测序

由于野生羊肚菌中多糖、胶质等次生代谢物含量较高,容易与DNA吸附,给基因组DNA的提取和纯化带来一定困难。故研究中采用改进的CTAB法,电泳结果



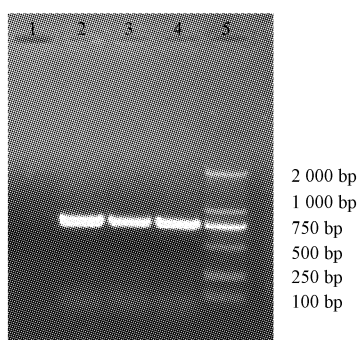
注: Lane 1. DNA Marker λ DNA/HindIII; Lane 2. XJ13M04; Lane 3. XJ13M05; Lane 4. XJ13M06.

图 1 野生羊肚菌基因组 DNA

Fig. 1 Wild *Morchella* genome DNA

显示该法可以顺利提取出菌丝体基因组 DNA(图 1)。

分别以分离株 XJ13M04、XJ13M05、XJ13M06 的菌丝体基因组 DNA 为模板,采用通用引物 ITS1/ITS4 进行 ITS 序列扩增,均得到清晰的,大小约为 700 bp 的特异性条带(图 2),这与 GenBank 中所报道的黑色羊肚菌 ITS 序列长度基本一致。初步证明获得的为纯菌丝。



注: Lane 1. Negative control; Lane 2. XJ13M04 ITS amplification; Lane 3. XJ13M05 ITS amplification; Lane 4. XJ13M06 ITS amplification; Lane 5. DNA Marker D.

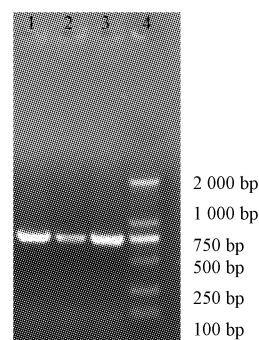
图 2 基因组 DNA ITS 序列扩增

Fig. 2 Amplification of ITS from genome

PCR 扩增产物经 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收纯化后连接至 pUCm-T 载体,转化子经 PCR 鉴定,均得到与预期大小一致的特异性目的片段(图 3)。结果表明,已分别克隆了羊肚菌 ITS 序列。转化子经测序后获得全部 ITS 区(18S+ITS1+5.8S+ITS2+28S)序列。

2.3 ITS 序列分析

测序结果用 DNASTar Lasergene v7.1 进行比对和分析,发现 3 株分离株具有较高的相似度。为保证序列信息的一致性,分别剔除两端的载体、引物序列、18S、28S 序列,3 株分离株 ITS 序列长度在 649~650 bp。



注: Lane 1. XJ13M04 ITS amplification; Lane 2. XJ13M05 ITS amplification; Lane 3. XJ13M06 ITS amplification; Lane 4. DNA Marker D.

图 3 pUCm-T-XJ13M04,05,06 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of ITS

XJ13M04、XJ13M06 ITS 序列长度相同,均为 649 bp,唯一不同的是 XJ13M04 第 194 位是 T,XJ13M06 第 194 位是 C,XJ13M05 ITS 长度为 650 bp,不同于前二者的是第 427 位上是 G,前二者此位缺失。利用 Genbank 数据库中 BLAST 程序中进行序列同源性比较,得到羊肚菌属不同物种序列,结果显示,分离获得的 3 株羊肚菌均与黑脉羊肚菌序列的相似度达 99.0%。

2.4 基于 ITS 序列的系统发育树构建与分析

利用 MEGA 5.0 中的 Alignment 程序对所测得的 ITS 序列进行多重对位排列后手动删除排列结果中 5'和

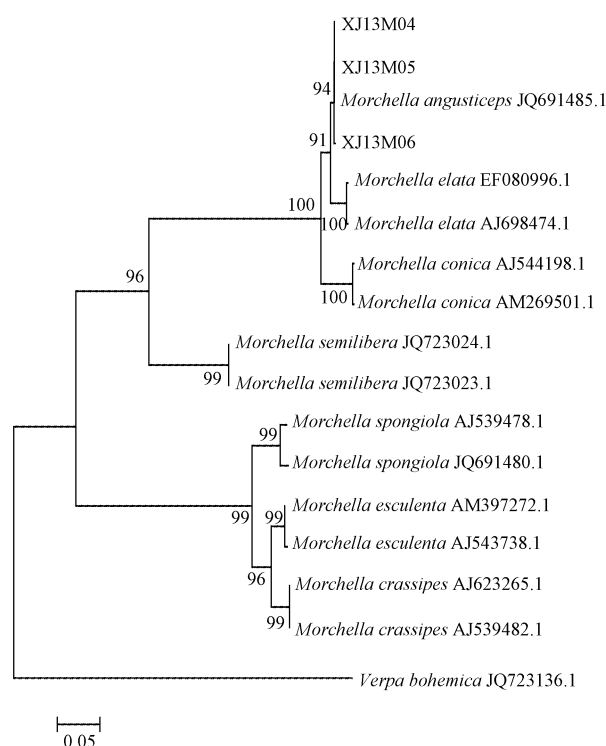


图 4 基于 ITS 序列构建的羊肚菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on ITS sequence

3'的非对位排列。对位排列结果中的空位或缺失数据作 pair-wise 处理,分析所用参数均为系统默认值。以皱盖钟菌 *Verpa bohemica* 作为外类群,采用邻位相连法构建系统发育树,用靴带自展法检验发育树,重复 1 000 次,判断各分支处的可信度。所显示的进化树见图 4。

从系统发育树可以看出,XJ13M06、XJ13M04、XJ13M05 共 3 株分离株以 94% 的 Bootstrap 值共同聚在一个大的分支上,表明它们之间的序列差异较小,亲缘关系较近,且都被聚类到黑脉羊肚菌类群中。

3 结论

羊肚菌发育过程中,其形态特征随环境条件和个体发育年龄产生一定程度的变化,根据传统的分类方法很难对其进行准确的分类鉴定。目前主要采用 ITS 序列分析技术进行鉴定。该研究综合利用形态学分类方法、ITS 序列分析技术确定分离获得的羊肚菌菌株的归属。ITS 序列分析技术显示,形态学分类为尖顶羊肚菌、高羊肚菌的物种经分子鉴定后均为黑脉羊肚菌,与 Bunyard 等^[7]的研究结果“黑脉羊肚菌尖顶羊肚菌与高羊肚菌可能属于同一生物学种的早中晚 3 个系统演化阶段”一致。该研究能够从种的水平上确保野生羊肚菌菌株来源的可靠性,为新疆伊犁野生羊肚菌的人工驯化、保护及进一步开发利用提供帮助。

参考文献

[1] 武冬梅,许文涛,罗云波,等.新疆野生羊肚菌研究现状及展望[J].食

品工业科技,2013,34(1):381-383.

[2] 戴芳澜.中国真菌总汇[M].北京:科学出版社,1979:238.

[3] 沈洪,陈明杰,赵永昌,等.云南羊肚菌 rDNA 的 ITS 序列与亲缘关系分析[J].食用菌学报,2007,14(2):15-18.

[4] 林晓民,李振岐,王少先.真菌 rDNA 的特点及在外生菌根菌鉴定中的应用[J].西南农业学报,2005,14(2):120-125.

[5] 陈剑山,郑服从.ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J].安徽农业科学,2007,35(13):3785-3786.

[6] White T J, Bruns T D, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications[M]. New York: Academic Press, 1990: 315-322.

[7] Bunyard B A, Nicholson M S, Royse D J. Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA[J]. Fungal Genetics and Biology, 1996, 20(4): 243-253.

[8] Du X H, Zhao Q, O'Donnell K, et al. Multigene molecular phylogenetics reveals true morels (*Morchella*) are especially species-rich in China[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49: 455-469.

[9] 张微思,罗孝坤,张丽英,等.松茸菌丝体的纯培养及其鉴定[J].中国食用菌,2010,29(3):34-36.

[10] 熊涛,肖满,曾哲灵,等.松乳菇组织分离菌株 rDNAITS 序列分子鉴定[J].微生物学通报,2006,33(4):1-4.

[11] 孙晓琳,商圆圆,张恩奎,等.基于 ITS 序列分析鉴定栓孔菌属物种[J].食品与发酵科技,2013,49(2):85-88.

[12] Vilgalys R. Taxonomic misidentification in public DNA databases[J]. New Phytologist, 2003, 160: 4-5.

[13] Nilsson R H, Kristiansson E, Ryberg M, et al. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implication for molecular species identification[J]. Evol Bioinform, 2008 (4): 193-201.

Molecular Identification of *Morchella* in Xinjiang Yili

WU Dong-mei^{1,2}, XU Wen-tao^{2,3}, XIE Zong-ming¹, LI Quan-sheng¹, LUO Yun-bo^{2,3}

(1. Center for Molecular Agrobiotechnology and Breeding, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Xinjiang Production and Construction Group Key Laboratory of Crop Germplasm Enhancement and Gene Resources Utilization, Shihezi, Xinjiang 832000; 2. College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083; 3. The Supervision, Inspection and Testing Center of Genetically Modified Food Safety, Ministry of Agriculture, Beijing 100083)

Abstract: Taking *Morchella* as material, three *Morchella* strains were isolated from wild *Morchella* by using standard tissue culture method, and identified by morphological characteristics and internal transcribed spacer sequence analysis, respectively. The results showed that these strains manifested high sequence similarity with *Morchella angusticeps*, with similarity of 99.0%; the phylogenetic tree also suggested that these strains belonged to *Morchella angusticeps*.

Keywords: *Morchella*; molecular identification; internal transcribed spacer sequence