

DOI:10.11937/bfyy.201510024

林芝地区两株优良黑木耳菌株的 ITS 序列验证

刘振东^{1,2}, 薛蓓^{1,2}, 王泽敏^{1,2}, 杨赞毓^{1,2}, 张彦龙³

(1. 西藏大学 农牧学院 食品科学学院, 西藏 林芝 860000; 2. 西藏野生特色生物资源开发平台, 西藏 林芝 860000;
3. 黑龙江大学 生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要:以林芝地区 2 株优良野生黑木耳菌株“西藏 6 号”和“西藏 7 号”为试材, 采用 ITS 序列分析方法对其进行分子生物学鉴定, 再用生物软件 Clustal X 1.83 和 MAGA 5.0 进行系统发育分析。结果表明:菌株“西藏 6 号”和“西藏 7 号”为黑木耳属黑木耳种, 通过对二者的碱基序列比对和共同系统发育树的构建, 确定二者之间存在一定遗传差异。

关键词:林芝; 黑木耳; ITS; 验证

中图分类号:S 646.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)10-0098-06

黑木耳(*Auricular auricular*)属真菌界担子菌门伞菌亚门伞菌纲木耳目木耳科木耳属黑木耳种^[1], 又名木耳、木茸、细木耳、黑菜等^[2], 广泛分布于温带与亚热带林区, 是木耳属真菌中分布最广泛的一类, 也是人工栽培面积较多的品种之一^[3]。林芝地区自 2010 年开始大面积人工栽培黑木耳以来, 一直都是引种栽培。为使林芝地区黑木耳产业健康持续发展, 从生产源头解决菌种的问题, 已是摆在当地相关科技工作者面前的首要问

题, 该研究以当地选育的优良黑木耳菌株为研究对象, 从分子生物学角度进行进一步的鉴定, 以期今后推广应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株共 2 个, 为西藏大学农牧学院食品科学与工程实验室从林芝地区不同地点采集的 25 株菌株中选育并保藏的优良菌株“西藏 6 号”和“西藏 7 号”。

引物及试剂: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATGTATGATGC-3'), 10 × Buffer, dNTP, Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

cPDA 液体培养基: 去皮马铃薯 200 g(煮汁 1 000 mL);

第一作者简介:刘振东(1986-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为食品微生物学及天然产物。E-mail: liu304418091@126.com.

责任作者:张彦龙(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然产物活性。

收稿日期:2015-01-22

Utilization of Preservative-treated Pinewood in Garden Wood Structure Architecture and Opuscul

ZHOU Jing-bin¹, ZHANG Ying-jie¹, HE Bin-xian²

(1. Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Shaanxi Senshi Environmental Services Engineering Co. Ltd., Xi'an, Shaanxi 710048)

Abstract: Preservative-treated Pinewood is mildewproof, anticorrosive and mothproof, with the long durability and environmental protection as its fine performance. It become an important material for landscape construction for the wide pine material sources, low price, small deformation, moderate density, good flexibility and strength, fine texture and good integration with the natural environment. Now on the basis of the introduction of pinewood species, preservatives and the production process of preservative-treated Pinewood, Focused on the application of preservative-treated Pinewood used in huts, pavilion, service buildings and other garden wood structure architecture and roads, platforms, bridges, rails, gallery frame, flower frame and other opuscul were introduced.

Keywords: preservative-treated pinewood; production process; wood structure architecture; opuscul; utilization

葡萄糖 20.0 g;硫酸镁 1.5 g;磷酸二氢钾 3.0 g;蛋白胨 0.5 g;维生素 B₁ 0.0 mg,加蒸馏水定容至 1 000 mL^[4]。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 菌丝体的培养与收集:将 80 mL cPDA 液体培养基装入 250 mL 三角瓶中,置于高压灭菌锅内 121℃ 灭菌 30 min。培养基冷却至室温后将事先活化好的试管斜面菌种,用接种耙打碎后接入到 250 mL 三角瓶中,25℃ 静止培养 2~3 d,然后在 130 r/min 摇床培养 3~5 d。将培养好的液体菌种置于 4 000 r/min 离心 8 min 后,用滤纸吸干水分收集菌丝体。菌丝体 DNA 的提取:采用改良 CTAB 法提取西藏黑木耳菌丝体 DNA,具体步骤参照郭鑫^[5]方法并略做改进,该实验室中 CTAB 浓度提高到 4%,65℃ 水浴时间提高至 35 min,以期达到更好的基因组 DNA 提取效果,对提取后的基因组 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测(1%)。

1.2.2 PCR 扩增 ITS 序列采用真菌通用引物详见 1.1。PCR 反应体系(50 μ L):10 \times PCR Buffer 5.0 μ L,dNTP(2.5 mmol/L)1 μ L,引物(10 pmol/L)各 1 μ L,ExTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)1 μ L,基因组 DNA 40 μ L。PCR 反应程序:94℃ 预变性 10 min;94℃ 变性 1 min;56℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 1.5 min,循环次数 30 次,72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。

1.2.3 PCR 扩增产物的检测 制备 1.0% 的琼脂糖凝胶,10 μ L DNA 样品+2 μ L 加样缓冲液上样,90 V 电压和 \geq 40 mA 条件下电泳 25 min,利用凝胶成像系统观察电泳结果并拍照。

1.2.4 目的 DNA 的回收 将含有目标片段的 PCR 产物全部点样,用 2% 的琼脂糖凝胶电泳,将胶中带有条带的区域切下^[6-7]。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIAGEN),按照试剂盒说明书要求,进行胶回收。

1.2.5 感受态细胞的制备 参照分子克隆实验指南^[8],用氯化钙法制备大肠杆菌感受态。

1.2.6 目的片段与载体连接 将纯化后的目的 DNA 片段,使用 T 载体试剂盒(购于 TAKARA 公司),连接到 pMD 18-TVector 载体上。连接组分 10.0 μ L(纯化 DNA 片段溶液 4.0 μ L,pMD 18-TVec 1.0 μ L,Solution I 5.0 μ L),16℃ 连接过夜后,直接用于转化。

1.2.7 目的 DNA 的转化 吸取 90 μ L 感受态细胞于无菌离心管中,然后加入纯化的 DNA 溶液 10 μ L,轻轻混匀,冰上放置 30 min。将离心管放入 42℃ 水浴中热击 90 s,然后迅速置于冰上冷却 3~5 min。向管中加入 800 μ L 37℃ 预热的 LB 液体培养基,混匀后 37℃ 90 r/min 振荡培养 2.5 h,使细菌恢复至正常生长状态。将上述菌液摇匀后取 100 μ L 并梯度稀释 10⁻²、10⁻⁴ 涂布于含 X-gal 及 IPTG 的氨苄 LB 平板培养基上的平板上,先正面向

上放置 30 min,待涂布的菌液被培养基完全吸收后,37℃ 倒置培养 16~24 h 至菌落可见。

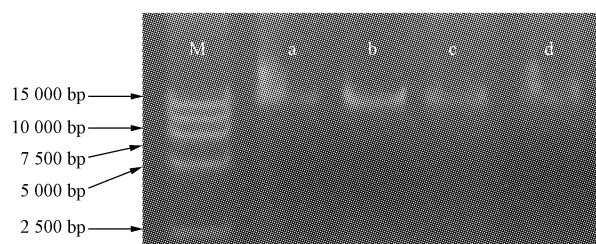
1.2.8 阳性菌落的筛选 将平板置于 4℃ 下 24 h 使菌落显色,带有野生型质粒克隆的菌落,因其具有编码 β -半乳糖苷酶的基因及 β -半乳糖苷酶活性,菌落呈蓝色。带有重组质粒克隆的菌落,因无 β -半乳糖苷酶活性,所以呈白色。挑取阳性菌落,在 LB 平板上扩大培养备用。PCR 验证阳性克隆:用枪头挑取筛选平板上的白色菌落,放入 10 μ L ddH₂O 中反复吸打混匀。以 ITS 通用引物进行 PCR,鉴定阳性克隆,反应体系 18 μ L(10 \times Buffer 2.5 μ L,dNTPt 1 μ L、引物 ITS1 和 ITS4 各 1 μ L、菌液 1 μ L),反应程序参照 1.2.2,PCR 扩增产物的检测(同 1.2.3)。

1.2.9 测序与比对 DNA 序列测定:将菌落 PCR 验证为阳性克隆的菌液与 80% 甘油互混后,送往上海英俊生物公司进行测序。比对与系统发育树的构建:去除载体信息后,将测得的“西藏 6 号”菌株与“西藏 7 号”菌株的 ITS 扩增结果,在 NCBI 中进行 BLAST 比对。同时下载其各自亲源序列采用的是 MEGA5.0 的 NJ 法构建的系统进化树,同时比较“西藏 6 号”菌株和“西藏 7 号”菌株 ITS 的相似度并进行二者的系统发育分析。

2 结果与分析

2.1 “西藏 6 号”和“西藏 7 号”菌株基因组 DNA 提取

由图 1 可知,提取的 DNA 条带清晰,b 和 c 2 组没有明显的拖尾现象,说明这 2 组 DNA 无蛋白质及 RNA 污染,完整性较好,可用于后续试验。



注:M;DNA Marker 15 000,a 和 b 为“西藏 6 号”基因组 DNA,c 和 d 为“西藏 7 号”基因组 DNA。

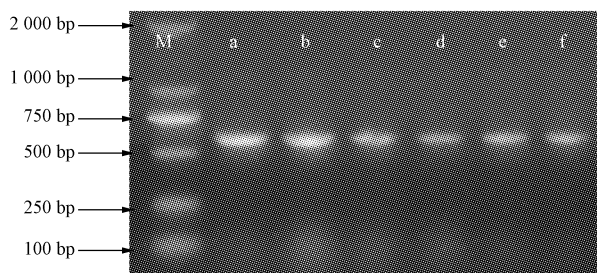
Note:Lane M;DNA Marker 15 000;Lane a,b;Genomic DNA of 'X6'; Lane c,d;Genomic DNA of 'X7'.

图 1 供试菌株基因组 DNA 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 The results of agarose gel (1%) electrophoresis of genomic DNA on tested stains

2.2 “西藏 6 号”和“西藏 7 号”菌株扩增结果

由图 2 可知,“西藏 6 号”和“西藏 7 号”所获得的电泳条带为 600 bp 左右,与预期结果一致,可确定为真菌的 ITS 序列。



注:M;DNA Marker DL 2 000,a,b,c为“西藏6号”PCR扩增的 ITS 序列,d,e,f为“西藏7号”PCR扩增的 ITS 序列。

Note:Lane M;DNA Marker DL 2 000;Lane a,b,c;ITS PCR product of ‘X6’;Lane d,e,f;ITS PCR product of ‘X7’.

图2 ITS序列扩增的琼脂糖凝胶电泳(1%)

Fig. 2 Results of agarose gel (1%) electrophoresis of ITS PCR product

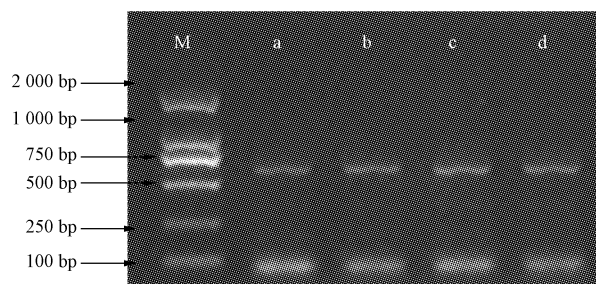
2.3 “西藏6号”和“西藏7号”菌株扩增后阳性克隆子的筛选

由图3可知,菌液均出现特异性条带,可初步确定

```

TGGTCTATTTTCGGCTGTGCGCTCAGGCTGCACGCCGATAACCTCTCACACCTGTGCACCTTTTCGGTTGCGG
TTTCGGCCGCTTCCGCTTTTACATGCAACCACGAAAAGTCTAGAATGTGACGAGAACTATAAAGTAACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCATGGAGCATGCCTGTTTGAGTGT
CACGTAAACCCCTACCCCTGCGATGTAACAGTCGCTGCGGTGGACTTGGACCGTGCCGGTAATCGGCTCGTC
TTGAAATGCATTAGCTGGCGCTTTTAGAGTGCTGGGCGAACGGTGTGATAATTATCTGCGCCGACTGCCCTGG
GCCTCTTCAGCGGCGCTGCTTACAGCCGTCCTTGTGGACAACCTATTTTAAAGCTTTGGCCTCAAATCAGGTA
GGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAAAGCCGGGAGAAAA
  
```

“西藏6号”菌株的 ITS 序列(ITS 区及部分 18 S 和 28 S)的核苷酸序列得到了有效扩增,将测序的“西藏6号”菌株的 ITS 序列与 GenBank 中已知序列进行了比对,比对结果见下图4,可知“西藏6号”的碱基序列和 GenBank 中的已知序列存在一定差异。将“西藏6号”菌株的 ITS 序列提交到 NCBI 中,运用 BLAST 程序与



注:M;DNA Marker DL 2 000,a,b为“西藏6号”菌液 PCR 产物,c,d为“西藏7号”菌液 PCR 产物。

Note:Lane M;DNA Marker DL 2 000;Lane a,b;PCR product of ‘X6’;Lane c,d;PCR product of ‘X7’.

图3 转化子通用引物 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR test of universal primer in transformed cloning 转化子为阳性。

2.4 生物信息学分析结果

“西藏6号”菌株的扩增序列为:

GenBank 已收录的序列库进行同源性比较,下载 MEGA 5.0 选取同源性在 99%以上的真菌构建系统发育树,通过图5系统进化树可知,“西藏6号”菌株与数据库中的黑木耳菌株‘428’为主的亚群处在同一分支上,因此可以确定被鉴定的优良菌株“西藏6号”与黑木耳菌株‘428’一样,同为木耳属黑木耳种。

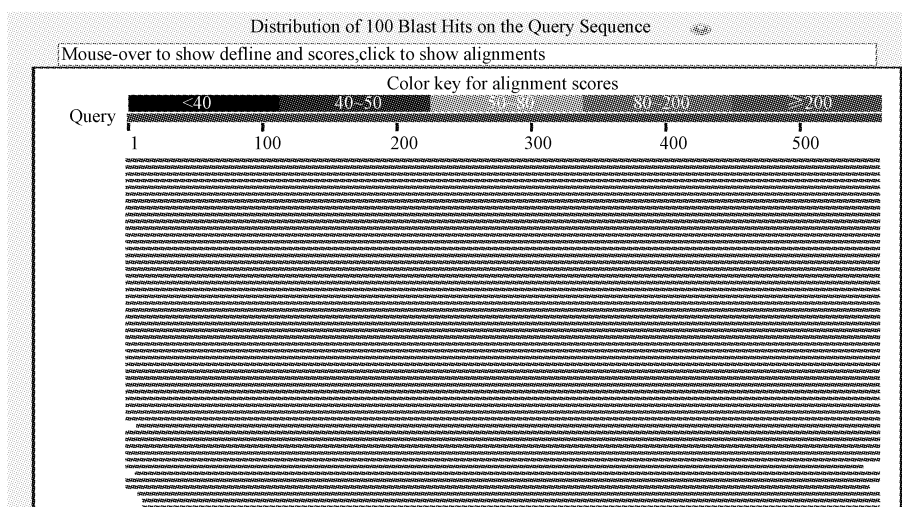


图4 “西藏6号”菌株的 ITS 序列比对

Fig. 4 The comparison results of ITS sequences of ‘X6’

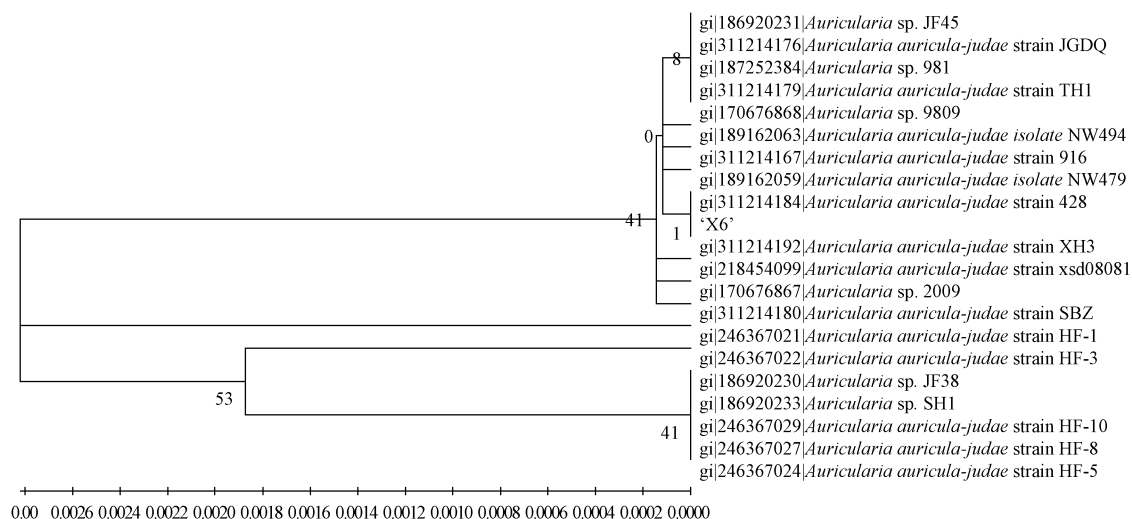


图5 基于ITS序列构建的“西藏6号”系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of 'X6' by ITS sequences

“西藏7号”菌株的扩增序列为:

```

GTCTTATTTTCGGCTGTGCGCTCAGGCTGCACGCCGATAACCTCTCACACCTGTGCACCTT
TTCGGTTTTCGGGTTTTGGCCGCTTCCGCTTTTACATGCAACCACGAAAAGTCTAGAATGT
GACGAGAAGTATAAAGTAACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGCGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGACACCTTGGCTCCTTGGTATTCCATGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCACGTA
AACCCCTCACCCCTGCGATGTAACAGTCGCTGCGGTGGACTTGGACCGTGCCGGTAATC
GGCTCGTCTTGAATGCATTAGCTGGCGCTTTAGAGTGCTGGGCGAACGGTGTGATAA
TTATCTGCGCCGACTGCCCTGGGCTCTTCAGCGGCGCTGCTTACAGCCGTCCCTTGTG
GACAACTATTTTAAAGCTTGGCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCAT
ATCAAAAGCGGGAGGAA

```

“西藏7号”菌株的ITS序列(ITS区及部分18S和28S)的核苷酸序列得到了有效扩增,将测序的“西藏7号”菌株的ITS序列与GenBank中已知序列进行了比对,比对结果见图6,可知“西藏7号”的碱基序列和GenBank中的已知序列存在一定差异。将“西藏7号”菌株的ITS序列提交到NCBI中,运用BLAST程序与

GenBank已收录的相似性序列库进行同源性比较,下载MEGA 5.0选取同源性在99%以上的真菌构建系统发育树,通过图7系统进化树可知,“西藏7号”菌株与数据库中的黑木耳菌株‘916’为主的亚群处在同一分支上,因此可以确定被鉴定的优良菌株“西藏6号”与黑木耳菌株‘916’一样,同为木耳属黑木耳种。

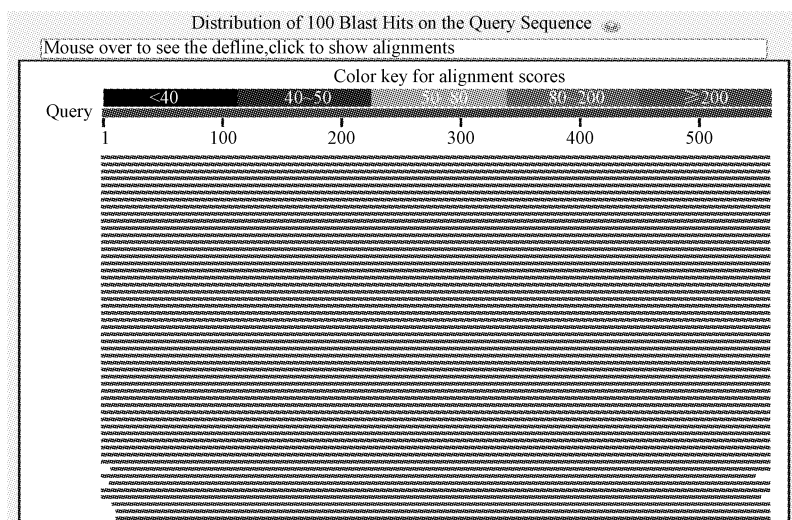


图6 “西藏7号”菌株的ITS序列比对结果

Fig. 6 The comparison results of ITS sequences of 'X7'

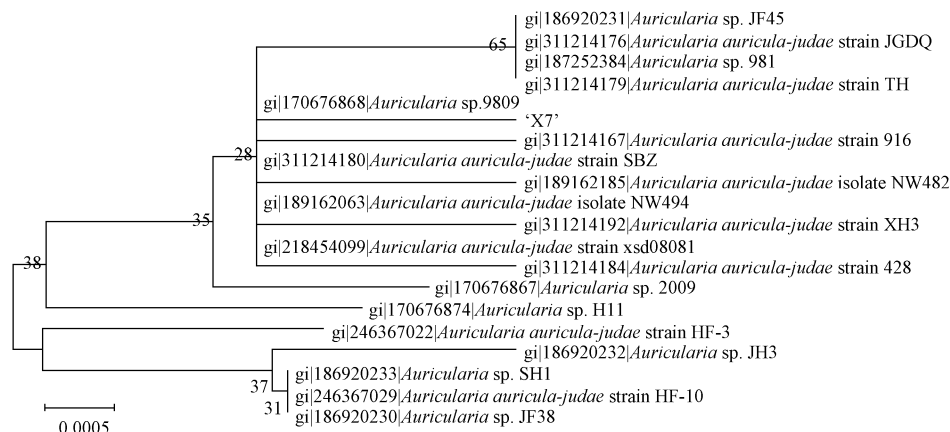


图7 基于ITS序列构建的“西藏7号”系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of 'X7' by ITS sequences

'X6'	GGTCTTATTTTCGGCTGTGCGCTCAGGCTGCACGCCGATAACCTCTCACACCTGTGCACCTTTTCGGTTGCGGTTTGGC	80
'X7'	GGTCTTATTTTCGGCTGTGCGCTCAGGCTGCACGCCGATAACCTCTCACACCTGTGCACCTTTTCGGTTGCGGTTTGGC	79
Consensus	ggctcttatttcggctgtgctcaggtgcacgccgataaacctctcacacctgtgcaccttttcggttgctggtt ggc	
'X6'	CGCTTCCGCTTTTACATGCAACCACGAAAAGTCTAGAATGTGACGAGAACTATAAAGTAACAACCTTTCAACAACGGATCT	160
'X7'	CGCTTCCGCTTTTACATGCAACCACGAAAAGTCTAGAATGTGACGAGAACTATAAAGTAACAACCTTTCAACAACGGATCT	159
Consensus	cgtcttcgcttttacctgcaaccacgaaaagtctagaatgtgacgagaaactataaagtaacaactttcaacaacggatct	
'X6'	CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT	240
'X7'	CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT	239
Consensus	cttggctctcgcacatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagttaattgtaattgcagaattcagtgaaatcatcgaaatct	
'X6'	TTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCATGGAGCATGCCCTGTTTGGTGTACAGTAAACCCCTACCCCTGCGATGTA	320
'X7'	TTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCATGGAGCATGCCCTGTTTGGTGTACAGTAAACCCCTACCCCTGCGATGTA	319
Consensus	ttgaacgcaccttgcctccttggatattccatggagcatgccctgtttgagtgtaacgtaaacccctcacccttgcgatgta	
'X6'	ACAGTCGCCTGCGGTGGACTTGGACCGTGCCGGTAAATCGGCTCGTCTTGAAATGCATTAGCTGGCGCTTTTAGAGTGCTG	400
'X7'	ACAGTCGCCTGCGGTGGACTTGGACCGTGCCGGTAAATCGGCTCGTCTTGAAATGCATTAGCTGGCGCTTTTAGAGTGCTG	399
Consensus	acagtcgcctgcggtggacttggacgctgcccgttaacgctcgtcttgaaatgcattagctggcgcttttagagtgctg	
'X6'	GGCGAACGGTGTGATAATTATCTGCGCCGACTGCCCTGGGCCTCTTCAGCGGCGCTGCTTACAGCCGTCCTTGTGGACA	480
'X7'	GGCGAACGGTGTGATAATTATCTGCGCCGACTGCCCTGGGCCTCTTCAGCGGCGCTGCTTACAGCCGTCCTTGTGGACA	479
Consensus	ggcgaaacggtgtgataattatctgcccgcactgccctgggcctcttcagcgcgctgctttacagccgctcccttgtggaca	
'X6'	ACTATTTTAAAGCTTTGGCCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAAAAAGCGGGAGAAA	554
'X7'	ACTATTTTAAAGCTTTGGCCTCAAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAAAAAGCGGGAGAAA	553
Consensus	actatitttaaagctttggcctcaaatcaggttaggactacccgctgaaccttaagcatatcaaaaag cgggag aa	

图8 “西藏6号”与“西藏7号”序列的相似性比对

Fig. 8 Identity of sequences between 'X6' and 'X7'

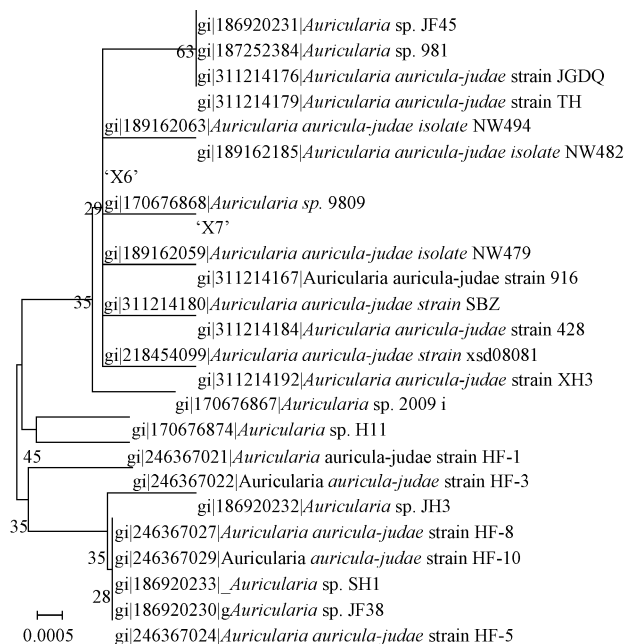


图9 “西藏6号”与“西藏7号”系统进化分析

Fig. 9 The evolution relationship between 'X6' and 'X7'

由图 8 可知,“西藏 6 号”与“西藏 7 号”菌株扩增的 ITS 序列存在 4 个碱基的差异,相似度为 99.28%。表明“西藏 6 号”和“西藏 7 号”ITS 序列存在较小差异。

通过对“西藏 6 号”和“西藏 7 号”的 ITS 序列比对分析,发现二者序列相似度较高。为了明确二者间的进化关系,结合二者相关序列进行系统生物学进化分析。图 9 表明,“西藏 6 号”和“西藏 7 号”处于同一分支,可判定二者遗传距离较小,亲缘关系较近。

3 结论与讨论

黑木耳在发育过程中,其形态特征随环境条件和不同个体发育阶段产生一定程度的变化,跟传统的分类鉴定手段很难进行准确的分类鉴定,该研究通过对“西藏 6 号”和“西藏 7 号”菌株 ITS 序列的分析,从分子生物学水平证实了 2 个菌株同为木耳属黑木耳种,是该研究要得到的黑木耳菌种,可用于林芝地区黑木耳人工栽培中的母种使用,改变林芝地区黑木耳人工栽培一直没有自己菌种的困境。同时通过对 2 个菌株 ITS 序列的比对,证实 2 个菌株的 ITS 序列中碱基存在差异,从分子层面证实了二者为独立的菌株。该试验为 2 个菌株在林芝

地区大范围推广袋料地栽黑木耳中使用奠定了坚实的理论基础的同时,为林芝地区林下资源人工繁育提供了一条可行的思路。

参考文献

- [1] 王贺祥. 食用菌栽培学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2008:121-124.
- [2] 张金霞,谢宝贵. 食用菌菌种生产与管理手册[M]. 北京:中国农业大学出版社,2006:5-7.
- [3] 李晓. 黑木耳标准化生产技术[M]. 北京:金盾出版社,2012:21-23.
- [4] 张伟林. 黑木耳单核杂交菌株远源性的研究[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2011.
- [5] 郭鑫. 地栽黑木耳菌种选育、鉴定与替代原料研究[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2010.
- [6] 赵丽. 紫外线诱变筛选黑木耳优良菌株及 RAPD 鉴定[D]. 延吉:延边大学,2009.
- [7] Fernandez M, Figueiras A, Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(5):845-851.
- [8] 莎姆布鲁克. 分析克隆实验指南[M]. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2008.

Verification of Two Excellent *Auricularia auricula* Species Based on Internal Transcribed Spacer(ITS) Sequences in Nyingchi Area

LIU Zhen-dong^{1,2}, XUE Bei^{1,2}, WANG Ze-min^{1,2}, YANG Yun-yu^{1,2}, ZHANG Yan-long³

(1. Department of Food Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Nyingchi, Tibet 860000; 2. Platform of Wild Characteristic Biological Resources in Tibet, Nyingchi, Tibet 860000; 3. Province Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150000)

Abstract: Taking two excellent field *Auricularia auricula* species ‘X6’ and ‘X7’ in Nyingchi area as test material, ITS Sequence Analysis was used to screen, the software Clustal X 1.83 and MAGA 5.0 were used to conduct the phylogeny analysis. The results showed that two excellent field species ‘X6’ and ‘X7’ were *Auricularia auricula*, comparing the DNA sequence and building a common phylogenetic tree, it was confirmed that there was a certain genetic difference between the two.

Keywords: Nyingchi area; *Auricularia auricula*; ITS; verification