

李 芳. 基于多个核基因序列的 1 株皮伞属菌株的鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 24–25.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.007

基于多个核基因序列的 1 株皮伞属菌株的鉴定

李 芳

(滨州学院化学工程系, 山东滨州 256600)

摘要:提取在北京市房山地区野外环境中采集的 1 株野生菌子实体的基因组 DNA, 并以此为模板进行 ITS、LSU 和 SSU 片段的扩增、测序及比对分析。结果发现, 从菌丝体基因组 DNA 中扩增获得了 700 bp 左右的 ITS 片段、850 bp 左右的 LSU 片段和 1 800 bp 左右的 SSU 片段, 经序列测定及比对, 表明该真菌是 *Marasmiellus* 属菌株。建立了一种野生真菌快速、准确的鉴定方法。

关键词:皮伞属; 分子鉴定; ITS; LSU; SSU

中图分类号: S646.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0024-02

我国地域广阔, 野生食用菌资源丰富、种类繁多、分布广泛、蕴藏量大。野生食用菌分类鉴定是涉及资源保护利用及产业发展的一项基础性研究工作^[1]。随着分子生物学技术的广泛应用, 从分子的层面上对野生菌进行快速、有效的鉴定, 为野生菌的鉴定、开发及利用提供了很大的便利^[2]。本研究对北京市房山地区采集的 1 株野生菌进行分子鉴定, 并通过多个核基因序列的测定及比对分析, 从而对该野生菌株的遗传地位进行解析, 为该野生菌的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 子实体, 采集自北京市房山区东湖港风景区的野生菌。

1.1.2 试剂 基因组 DNA 提取试剂盒 Dneasy Plant Mini Kit 和凝胶回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit 购自德国 QIAGEN 公司; TaKaRa PCR Mix 购自大连宝生物公司; 琼脂糖购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 仪器 PCR 仪 (BIO-RAD, mycycler)、凝胶成像系统 (BIO-RAD)、电泳仪 (北京六一 DYY-III-12B)、离心机

(Eppendorf 5418)、移液器 (Eppendorf) 等。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取少量子实体于 1.5 mL 离心管中, 加入少量液氮, 研磨棒研磨至粉末状后, 利用 Dneasy Plant mini Kit 试剂盒 (QIAGEN, 货号: 69104) 说明书进行 DNA 的提取。

1.2.2 ITS-PCR 扩增 选取 ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 为引物^[3], 以所提基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min; 降至 4 °C 结束。反应体系为 50 μL。然后进行电泳检测。

1.2.3 LSU-PCR 扩增 选取 LR5 (5'-TCCTGAGG-GAAACTTCG-3', <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>) 和 LROR (5'-ACCCGCTGAACCTTAAGC-3', <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>) 为引物, 以所提基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 降至 4 °C 结束。反应体系为 50 μL。然后进行电泳检测。

1.2.4 SSU-PCR 扩增 选取 NS1 (5'-GTAGTCATATGCT-TGTCTC-3', <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>) 和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3',

收稿日期: 2014-04-17

作者简介: 李 芳 (1981—), 女, 山东滨州人, 硕士, 讲师, 从事分子生物学研究。E-mail: lifang1981@126.com。

[27] 周丽华, 张华通, 龚 峥, 等. 互叶白千层工厂化育苗技术[J]. 广东林业科技, 2001, 17(1): 16–19.

[28] 郭逸成. 互叶白千层扦插育苗技术研究[J]. 防护林科技, 2007(3): 26–27.

[29] 李晓林, 梁国鲁, 胡英浩, 等. 互叶白千层的扦插繁殖试验研究[J]. 西南园艺, 2003, 31(1): 16–18.

[30] List S E, Brown P H, Low C S, et al. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree) [J]. Animal Production Science, 1996, 36(6): 755–760.

[31] De Oliveira Y, Pinto F, Da Silva A L L, et al. An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 2010, 46(2): 192–197.

[32] 樊吉尤, 莫昭展, 杨 福, 等. 不同培养条件对互叶白千层丛生芽增殖的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(24): 14705–14707.

[33] Scheidt G N, Lopes Da Silva A L, De Oliveira Y, et al. In vitro growth of *Melaleuca alternifolia* Cheel in bioreactor of immersion by bubbles [J]. Pakistan Journal of Botany, 2011, 43(6): 2937–2939.

[34] Southwell I A, Stiff I A, Brophy J J. Terpinolene varieties of *Melaleuca* [J]. Journal of Essential Oil Research, 1992, 4(4): 363–367.

[35] 张 梅, 幸世林. 互叶白千层大棚引种育苗[J]. 林业实用技术, 2003(7): 21–22.

http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm) 为引物,以所提基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 90 s,30 个循环;72 ℃ 10 min;降至 4 ℃ 结束。反应体系为 50 μL。然后进行电泳检测。

1.2.4 PCR 产物测序及分析 PCR 产物经过切胶回收后,委托生工生物工程(上海)股份有限公司利用 PCR 扩增引物为测序引物进行测序。测序结果经过 DNAMAN 5.2.9 和 Chromas Pro 软件进行碱基修正与拼接,最终获得的 ITS、LSU 和 SSU 序列提交到 GenBank 核酸序列数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov),并与数据库中已知的相关序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

以所获得的基因组 DNA 为模板,以材料与方法中所列的引物进行 PCR 扩增,结果如图 1 所示,所得 ITS 产物片段大小为 700 bp 左右,LSU 产物片段大小为 850 bp 左右,SSU 产物片段大小为 1 800 bp 左右,与预期结果相一致。

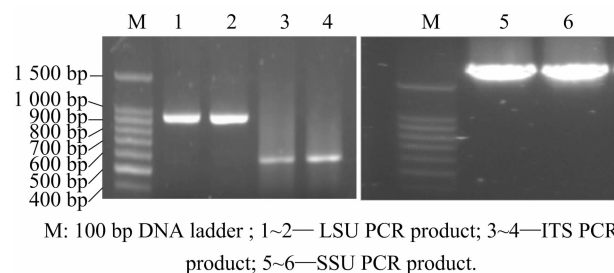


图1 PCR 扩增结果

2.2 序列测定及提交

上述 3 个 PCR 产物进行凝胶电泳,电泳条带经过 QIAquick Gel Extraction Kit 回收后,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。测序结果经过 Chromas Pro 软件进行碱基修正,修正后的正向引物的测序结果和反向引物的测序结果经过 DNAMAN 5.2.9 软件进行拼接,最终获得 ITS 序列 634 bp,LSU 序列 834 bp 和 SSU 序列 1 758 bp。将上述序列提交至 GenBank,获得 GenBank 登录号分别为: KJ545432、KJ545433 和 KJ545434。

2.3 BLASTN 比对分析

在 NCBI 网站上用 BLASTN 程序进行比对。ITS 序列(GenBank 登录号 KJ545432)的比对结果显示,该序列与 Uncultured root-associated fungus clone SC011c23P(FJ362110)、Uncultured Agaricales clone J2c863H(GQ924015)和 *Crinipellis* aff. *iopus* JFK-2009a isolate n774(FJ167636)的相似性系数为 100%,与 *Marasmiellus palmivorus* isolate C1(JQ653443)的相似性系数为 97%;LSU 序列(GenBank 登录号 KJ545433)的比对结果显示,该序列与 *Marasmiellus palmivorus* isolate C6(JQ654236)和 *Marasmius ruforotula* voucher BRMN 714674(FJ917612)的相似性系数为 100%,与 *Moniliophthora* sp. UTC 253824(JN692483)的相似性系数为 98%;而 SSU 序列(GenBank 登录号 KJ545434)的比对结果显示,该序列与 *Moniliophthora* sp. MCA2500(AY916753)和 *Marasmius* sp. MCA1708(AY916719)相似性系数为 100%,与 *Crinipellis*

zonata strain OKM 25450(AY916691)的相似性系数为 99%。由于 SSU 比对分析结果中发现目前还没有 *Marasmiellus* sp. 序列提交,导致比对结果中没有 *Marasmiellus* sp. 菌株的 SSU 序列信息。

因此综合以上比对结果,将本研究所用的菌株鉴定为 *Marasmiellus* sp. 菌株。

3 讨论

由于 ITS 序列比 5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA 更容易突变累计,被认为是在物种或物种内水平最有用的累计突变区域^[4]。ITS 目前已经被认为是真菌分子鉴定的条形码^[5]。但是相关研究表明,ITS 对于种内的区分不是很理想,因此,有必要结合其他的序列作为辅助的条形码,对物种进行鉴定^[6]。

核糖体小亚基(small subunit,SSU)序列 rRNA 基因是编码 rRNA 的基因,是高度重复串联序列。因此,核糖体小亚基 rRNA 基因的测序与分析在物种鉴定与系统发育演化方面的应用越来越广泛^[7]。然而 SSU 序列较长,一般为 1 800 bp 左右,扩增所用时间较长,测序则需要 3 个反应才能测通获得全长序列。

LSU 核糖体大亚基(large subunit,LSU)基因组的序列是位于 25~28S 的 RNA 序列。大多数分子系统学研究中都选择部分片段进行分析,相对比较保守^[8]。本研究只采用 LSU 序列 5'端 900 bp 的片段,获得了较好的鉴定结果,因此根据本研究的结果,皮伞属较为适合的条形码为 ITS + LSU。

参考文献:

- [1] 许峰,刘宇,王守现,等.一株野生大型真菌的分离与鉴定[J].中国农学通报,2012,28(13):176-179.
- [2] 尹永刚,刘宇,许峰,等.一株 *Agaricus* 属野生菌的分离与鉴定[J].华北农学报,2012,27(3):126-129.
- [3] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990.
- [4] Wang P, Liu Y, Yin Y G, et al. Diversity of microorganisms isolated from the soil sample surround *Chroogomphus rutilus* in the Beijing region[J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(2): 209-220.
- [5] Schoch C L, Seifert K A, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a Universal DNA barcode marker for fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [6] 李艳春,吴刚,杨祝良.我国云南食用牛肝菌的 DNA 条形码研究[J].植物分类与资源学报,2013,35(6):725-732.
- [7] Hansen Karen, Lobuglio K F, Pfister D H. Evolutionary relationships of the cup-fungus genus *Peziza* and *Pezizaceae* inferred from multiple nuclear genes: RPB2, beta-tubulin, and LSU rDNA[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 36(1): 1-23.
- [8] Pfister D H, Slater C, Hansen K. Chorioactidaceae: a new family in the *Pezizales* (Ascomycota) with four genera [J]. Mycological Research, 2008, 112(5): 513-527.