

王 龙,周庆平,刘建明. 基于 rDNA - ITS 序列的甘肃甘南野生羊肚菌遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(17):81 - 84.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.014

基于 rDNA - ITS 序列的甘肃甘南野生羊肚菌遗传多样性分析

王 龙,周庆平,刘建明

(唐山师范学院,河北唐山 063000)

摘要:通过对采自甘肃甘南藏区的 16 株野生羊肚菌菌株进行分子生物学分析,对 rDNA 基因内转录间隔区(ITS)片段进行 PCR 扩增并测序,测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对,鉴定得知,16 株供试羊肚菌共归纳为 5 种,分别为黑脉羊肚菌(*Morchella angusticeps*)、羊肚菌(*Morchella esculenta*)、高羊肚菌(*Morchella elata*)、粗腿羊肚菌(*Morchella crassipes*)和尖顶羊肚菌(*Morchella conica*)。根据采用最大简约法(MP)和邻接法(NJ)构建的分子进化树得知,2 种分子进化树拓扑结构相似,并且 Bootstrap 验证显示,系统发育树各分支都有很高的支持率,说明其系统关系有很高的可信度。结果可为该地区羊肚菌(*Morchella* spp.)的系统分类提供较为准确的分子性状依据。

关键词:rDNA - ITS;羊肚菌;序列分析;甘肃甘南

中图分类号:S646.701 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)17-0081-04

羊肚菌(*Morchella* spp.)是羊肚菌科羊肚菌属所有种类的总称,是一类经济价值很高的珍稀野生食(药)用真菌,具有较高的营养价值和药用价值^[1]。据有关资料显示,羊肚菌含有多种生理活性物质,尤其是蛋白质含量极为丰富,同时还含有人体必需的各类氨基酸、维生素和铁、锌等多种矿物质元素^[2-3]。在羊肚菌的分类学研究中,由于其形态特征具有很大的可塑性和人为性,给分类研究工作带来很多困难,单纯依靠传统形态分类方法很难解决羊肚菌的系统学问题,分子生物学的飞速发展从分子水平解决羊肚菌的系统学问题提供了新的技术方法和研究平台^[4-6]。针对我国羊肚菌主产地之一的甘肃甘南藏区,到目前为止,除 20 世纪 80 年代有学者开展过有关当地羊肚菌资源学方面的研究报道外^[7-8],至今鲜见有关该地区羊肚菌分子系统学方面的研究。鉴于上述问题,本研究试图从传统形态分类学以及分子系统学角度来探讨甘肃甘南境内野生羊肚菌的系统发育关系。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试菌株为 2017 年 4—5 月在甘肃甘南境内的迭部县、舟曲县收集到的野生羊肚菌菌株。供试菌株总共 16 株,结合《中国大型真菌原色图鉴》^[9]对菌株进行鉴定并分别编号为 GN - M1、GN - M2、GN - M3、GN - M4、GN - M6、GN - M9、GN - M10、GN - M12、GN - M14、GN - M17、GN - M19、GN - M22、GN - M25、GN - M27、GN - M31、GN - M32(图 1)。

1.2 主要试剂

CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)裂解缓冲液(pH 值为 8.0,美国 Genview 公司);2 × PCRmix(上海时代生物科技有限公司);DL2000 DNA marker(日本 Takara 公司);琼脂糖(上海艾研生物科技有限公司);EDTA(乙二胺四乙酸)、氯仿、异戊醇、无水乙醇、盐酸、乙酸钠、氯化钠、Tris(三羟甲基氨基甲烷)均为国产分析纯。扩增 ITS 片段(内转录间隔区)所用的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体为上游引物 ITS1:5' - TCCGTAGGTG AACCTGCGG - 3';下游引物 ITS4:5' - TCCTCCGCT TATTGATATGC - 3'。

1.3 总 DNA 提取

取供试菌株羊肚菌子实体的菌盖部分,参照白永宏等的研究方法^[10],经多次改进、验证,探索出适

收稿日期:2019-09-24

基金项目:河北省教育厅大学生创新创业训练计划(编号:20181009926)。

作者简介:王 龙(1981—),男,甘肃兰州人,博士,副研究员,主要从事蕈菌多样性及资源利用研究。E-mail:283503916@qq.com。

通信作者:周庆平,硕士,副教授,主要从事生物信息学研究。E-mail:470376608@qq.com。



图1 供试菌株

合本试验的 DNA 提取技术。(1)称取浸泡、冲洗、消毒后的羊肚菌子实体菌盖约 0.5 g,切碎置于无菌预冷的研钵中,加入适量液氮,研磨至粉末状。(2)迅速将其转入 2 mL 离心管中,加入 1.5 mL 预热至 65 °C 的 CTAB(pH 值为 8.0)裂解缓冲液,缓慢颠倒混匀后,置于 65 °C 下水浴 1.5 h,每隔 10 min 颠倒混匀 1 次。(3)在 12 000 r/min 下离心 15 min,将上清液移至新的离心管中。(4)加入等体积的苯酚和氯仿,缓慢摇匀,在 12 000 r/min 下离心 10 min,将上清液移至新的离心管中。(5)加入等体积的氯仿和异戊醇,缓慢摇匀,在 12 000 r/min 下离心 10 min,将上清液移至新的离心管中。(6)加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,轻轻混匀,在 -20 °C 下静置 3.0 h 后在 12 000 r/min 下离心 10 min,弃去上清液,留 DNA 沉淀。(7)用 75% 乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次,弃去上清液。(8)离心、真空抽干得到 DNA,每管加入适量无菌水溶解沉淀 DNA,在 -20 °C 下低温保存备用。

1.4 PCR 扩增

1.4.1 PCR 扩增反应体系 PCR 扩增反应体系为 50 μ L,含 10 \times PCR buffer 5.0 μ L;dNTPs 1.0 μ L;模板 DNA 1.0 μ L;ITS1 1.0 μ L;ITS4 1.0 μ L;Taq 聚合酶 1.0 μ L;双蒸水 40.0 μ L。

1.4.2 PCR 扩增程序 PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 40 s,55 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 100 s,35 个循环;72 °C 延伸 10 min,终止温度为 4 °C。采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 ITS-PCR 扩增产物,用凝胶成像系统拍照并记录电泳谱带。

1.5 ITS 片段测序

PCR 扩增产物经电泳检测后,使用上海基康生物技术有限公司提供的 UNIQ-10 柱式 DNA 回收试剂盒进行回收和纯化,并将样品报送上海基康生物技术有限公司进行测序。将获得的菌株序列结

果在 GenBank 上进行 BLAST 分析,利用软件 CLUSTALX 1.81 删除缺失位点和残缺位点,然后进行同源性比较,最后用软件 MEGA 6.06 通过最大简约法(maximum parsimony, MP)和邻位相连法(neighbour joining, NJ)分别构建分子系统发育树,明确供试菌株的种属及分类地位^[11-13]。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

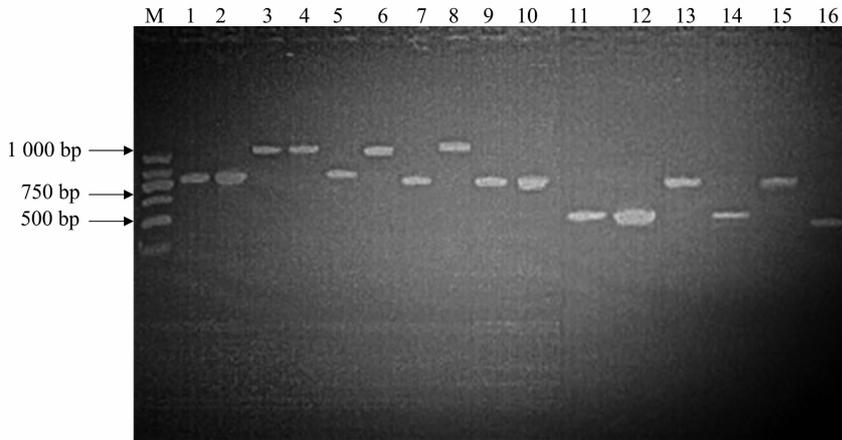
16 株野生羊肚菌 ITS 片段 PCR 扩增结果见图 2。

2.2 ITS 序列测序及 BLAST 比对分析

本试验中的 16 株羊肚菌标本所测得的 ITS 序列长度和 GC 含量见表 1。登陆 Genbank 数据库,将所测得的序列进行 BLASTN 比对分析。结果发现,GN-M1、GN-M2、GN-M6 和 GN-M10 的核苷酸序列与登录号为 JQ691485、DQ257338、AJ698476、JX069625 的黑脉羊肚菌(*Morchella angusticeps*) ITS 序列相似度达 99%;GN-M3、GN-M4、GN-M9 和 GN-M12 与登录号:U51851、AJ543741 的羊肚菌(*Morchella esculenta*) ITS 序列相似度达 99%;GN-M14、GN-M22、GN-M17 和 GN-M19 与登录号为 GQ249378、GQ249383、EU83482 的高羊肚菌(*Morchella elata*) ITS 序列相似度达 97%~98%;GN-M25 和 GN-M31 与登录号为 EU701002 的粗腿羊肚菌(*Morchella crassipes*) ITS 序列相似度达 99%;GN-M27 和 GN-M32 与登录号:AM269501 的尖顶羊肚菌(*Morchella conica*) ITS 序列相似性达 97%~98%。

2.3 基于 ITS 序列系统树的构建

为了更好地探讨甘肃甘南藏区野生羊肚菌的系统发育关系,从 GenBank 数据库下载了与本研究相关的羊肚菌科钟菌属(*Verpa*)的 3 个 ITS 序列(登



M 为 DNA Marker; 1—16 泳道分别为 GN-M1、GN-M2、GN-M3、GN-M4、GN-M6、GN-M9、GN-M10、GN-M12、GN-M14、GN-M22、GN-M17、GN-M19、GN-M25、GN-M27、GN-M31、GN-M32

图2 16 株野生羊肚菌 ITS 片段 PCR 扩增产物

表 1 16 株羊肚菌 ITS 序列测定结果

泳道号	编号	ITS 序列大小 (bp)	GC 含量 (%)	供试菌株
1	GN - M1	732	50.33	<i>Morchella angusticeps</i>
2	GN - M2	738	50.14	<i>Morchella angusticeps</i>
3	GN - M3	1 138	55.33	<i>Morchella esculenta</i>
4	GN - M4	1 138	56.80	<i>Morchella esculenta</i>
5	GN - M6	736	50.64	<i>Morchella angusticeps</i>
6	GN - M9	1 138	55.85	<i>Morchella esculenta</i>
7	GN - M10	675	50.92	<i>Morchella angusticeps</i>
8	GN - M12	1 138	55.61	<i>Morchella esculenta</i>
9	GN - M14	679	50.29	<i>Morchella elata</i>
10	GN - M22	675	50.19	<i>Morchella elata</i>
11	GN - M17	675	50.61	<i>Morchella elata</i>
12	GN - M19	673	50.53	<i>Morchella elata</i>
13	GN - M25	1 131	55.41	<i>Morchella crassipes</i>
14	GN - M27	737	50.70	<i>Morchella conica</i>
15	GN - M31	1 209	55.13	<i>Morchella crassipes</i>
16	GN - M32	738	50.38	<i>Morchella conica</i>

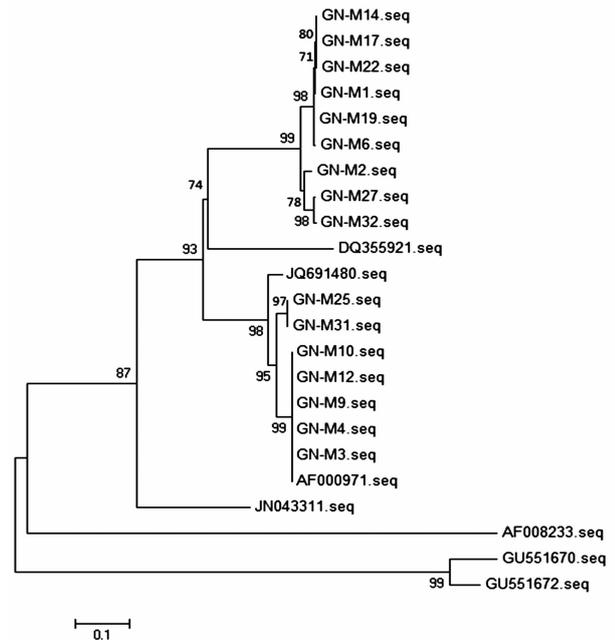


图3 邻接法构建系统发育树(Bootstrap 验证, 重复 1 000次)

录号分别为 GU551670、GU551672、JN043311) 以及羊肚菌属中的普通羊肚菌 (*Morchella vulgaris*)、小海绵羊肚菌 (*Morchella spongiosa*)、半开羊肚菌 (*Morchella semilibera*)、变红羊肚菌 (*Morchella rufobrunnea*) (登录号分别为 AF000971、JQ691480、AF008233、DQ355921) 的 ITS 序列, 对其进行 BLASTN 比对分析后, 分别采用邻接法 (neighbour-joining, NJ) 和最大简约法 (maximum parsimony, MP) 构建分子进化树, 结果分别见图 3 和图 4。

由图 3 和图 4 可以看出, NJ 和 MP 这 2 种方法构建的系统发育树拓扑结构相似, 并且 Bootstrap 验证显示, 系统发育树各分支都有很高的支持率, 说明系统关系的可信度高。结合测序结果分析, 本试验中 16 株羊肚菌经分子鉴定最终归类为 5 种, 分别为黑脉羊肚菌 (GN - M1、GN - M2、GN - M6、GN - M10)、羊肚菌 (GN - M3、GN - M4、GN - M9、GN - M12)、高羊肚菌 (GN - M14、GN - M22、GN - M17、GN - M19)、粗腿羊肚菌 (GN - M25、GN - M31) 和尖顶羊肚菌 (GN - M27、GN - M32), 这 5 种羊肚菌主要归类于黄羊肚菌类群 (羊肚菌、粗腿羊肚菌) 和黑羊肚菌类群 (尖顶羊肚菌、黑脉羊肚菌、高羊肚菌)。

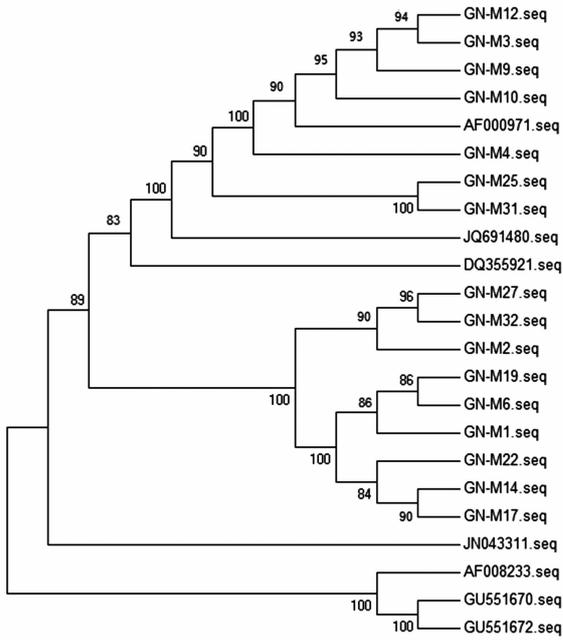


图4 最大简约法构建系统发育树(Bootstrap 验证, 重复 1 000次)

通过对系统发育树的分析发现,登录号为 GU551670 和 GU551672 的钟菌属 (*Verpa*) 的 2 个菌种聚为一支,但登陆号为 JN043311 的钟菌属 (*Verpa*) 的 1 个菌种却和羊肚菌聚为一类;登录号为 AF000971 的普通羊肚菌和登陆号为 JQ691480 的小海绵羊肚菌与羊肚菌 (GN - M3、GN - M4、GN - M9 和 GN - M12)、黑脉羊肚菌 (GN - M1、GN - M2、GN - M6、GN - M10) 亲缘关系较近,可以聚为一类;登录号为 DQ355921 的变红羊肚菌与尖顶羊肚菌 (GN - M27、GN - M32)、粗腿羊肚菌 (GN - M25、GN - M31) 大体聚为一类;登录号为 AF008233 的半开羊肚菌与其他羊肚菌遗传距离较远,似乎可与钟菌属 (*Verpa*) 的 2 个菌种 GU551670 和 GU551672 聚为一类,究其原因还有待进一步深入研究。

3 结论

经分子生物学研究得知,16 株供试羊肚菌菌株可归纳为 5 种,分别为黑脉羊肚菌 (GN - M1、GN - M2、GN - M6、GN - M10)、羊肚菌 (GN - M3、GN - M4、GN - M9、GN - M12)、高羊肚菌 (GN - M14、GN - M22、GN - M17、GN - M19)、粗腿羊肚菌 (GN - M25、GN - M31) 和尖顶羊肚菌 (GN - M27、GN - M32),且这 5 种羊肚菌主要归类于黄羊肚菌类群(羊肚菌、粗腿羊肚菌)和黑羊肚菌类群(尖顶羊肚菌、黑脉羊肚菌、高羊肚菌)。通过分子进化树

分析得知,利用最大简约法 (MP) 和邻接法 (NJ) 2 种方法构建的系统发育树拓扑结构相似,并且 Bootstrap 验证显示,系统发育树各分支都有很高的支持率,说明其系统关系有很高的可信度,同时也说明本研究结果可为该地区羊肚菌的系统分类提供较为明确的分子性状依据。本研究中的羊肚菌经分子鉴定后的结果与依据形态学分类的结果有一定差异,分析原因可能是该地区羊肚菌子实体的形态变化多样,其菌种的形态特征和生理生化指标又受多种外界因素的影响,这对其进行形态学分类具有很大的限制性。至于当前甘肃甘南境内还分布有该属多少种羊肚菌,还有待今后全方位地采集更多新鲜样品进行分离鉴定。此项工作的开展不但可以丰富该地区羊肚菌多样性分析的菌种资源库资料,还可为当地羊肚菌的人工栽培及其今后的开发利用提供科学理论与依据。

参考文献:

- [1] 卯晓岚. 中国蕈菌[M]. 北京:科学出版社,2009:316-318.
- [2] 谢占玲,谢占青. 羊肚菌研究综述[J]. 青海大学学报(自然科学版),2007,14(2):36-40.
- [3] 周丽伟. 羊肚菌培养条件优化及其多糖生物活性的研究[D]. 合肥:安徽大学,2007:11-14.
- [4] 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):15-18,91.
- [5] 匡治州,许杨. 核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用[J]. 生命的化学,2004,24(2):120-122.
- [6] 郭水良,陈国奇,毛俐慧. DNA C-值与被子植物入侵性关系的数据统计分析——以中国境内有分布的 539 种被子植物为例[J]. 生态学报,2008,28(8):3698-3705.
- [7] 顾龙云. 甘南藏族自治州羊肚菌调查[J]. 食用菌科技,1984,3(1):34-36.
- [8] 罗植柚. 甘南野生羊肚菌生态研究初报[J]. 中国食用菌,1986,5(1):30-32.
- [9] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,1998:156-158.
- [10] 白永宏,陈国梁,闫冬,等. 几种食用菌子实体总 DNA 提取方法的比较研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(19):11409-11410.
- [11] 戴璐,李峻志,李安利,等. 基于 ITS 序列分析对秦岭冷水沟羊肚菌的鉴定[J]. 中国食用菌,2010,29(6):45-46.
- [12] 刘文丛,刘颖,郭相,等. 滇西北地区羊肚菌的分子鉴定及 ITS 序列分析[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):31-34.
- [13] Chenna R, Sugawara H, Koike T, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs[J]. Nucleic Acids Research, 2003,31(13):3497-3500.