

中国 7 个毛木耳 (*Auricularia polytricha*) 菌株 ITS 序列比较*

张丹^{1**} 郑有良² 陈红¹ 高庭艳¹ 吴卫²

(¹中国科学院水利部成都山地灾害与环境研究所 成都 610041; ²四川农业大学农学院 四川雅安 625014)

摘要 对毛木耳 7 个菌株 rRNA 基因内转录间隔区 (ITS) 进行了克隆测序,并将其与木耳属其它几种的相应序列进行了比较. 在供试的 7 个毛木耳菌株中,除特大 (209 bp) 外,其余 6 个菌株的 ITS2 区序列长度完全相同;毛木耳 rRNA 基因的两个 ITS 区序列有一定数量的碱基变异,整个 ITS 区共有 11 个变异位点. 与下载的木耳属另外 4 个种相比较,均有较大程度的变异. 根据遗传同源性分析,遗传距离分析和系统树上所显示的供试菌株及相关已知种的亲缘关系, ITS 序列分析支持传统的依据形态学进行的木耳属分类. 图 2 表 2 参 9

关键词 毛木耳; ITS; 序列; 系统发育

CLC Q949.329.103

ITS Sequence Comparison of Germplasm Resources of *Auricularia polytricha**

ZHANG Dan^{1**}, ZHENG Youliang², CHEN Hong¹, GAO Tinyan¹ & WU Wei²

(¹Institute of Mountain Hazards and Environment, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

Abstract The internal transcribed spacer (ITS) region in rRNA gene of *Auricularia polytricha* was cloned and sequenced, and the sequences were compared with those of some common species of *Auricularia*. The results showed that 6 strains among tested strains, except Teda with different origins, had the same length of ITS2. There were base variances in ITS region of rRNA gene among the tested strains, and with 11 variance loci in ITS region. Compared with other 4 species from the GenBank, ITS1 and ITS2 sequences of *A. polytricha* varied in great extent. According to the analysis of distance matrix, the genetic relationship between strains and the related known species from systematic dendrogram, ITS sequence analysis supports the traditional classification of *Auricularia* based on morphology. Fig 2, Tab 2, Ref 9

Keywords *Auricularia polytricha*; ITS; sequence; phylogeny

CLC Q949.329.103

rRNA 作为细胞中最古老的分子之一,具有功能和进化上的同源性,成为研究生命起源和早期生物进化以及分子系统学研究的“活化石”. rDNA 最保守的区域是 18 S, 5.8 S, 28 S 的 rRNA 基因. 间隔区是 rRNA 基因中进化最快的区域^[1],而 ITS 区则是中度保守区,其保守性基本上表现为种内相对一致,种间差异比较明显^[2].

在外生菌根真菌如块菌 *Tuber*、蜡蘑属 *Laccaria*、粘花菇属 *Hebeloma*、假松茸 *Tricholoma bakamatsutake* 等的分子鉴定和系统发育研究方面, ITS 区段的应用较为普遍^[3]. 但对其它高等真菌研究的有关报道较少. 本文对毛木耳 (*Auricularia Polytricha*) 7 个菌株 rDNA 的 ITS 序列进行了研究,以揭示毛

木耳不同菌株间 rDNA 的遗传变异信息,为毛木耳的分类鉴定及系统发育提供分子水平的证据.

1 材料和方法

1.1 供试材料

选择子实体形态差异较大的 7 个毛木耳菌株作为试验材料. 其中, 2 个为野生分离菌株, 5 个为人工栽培菌株 (表 1). 下文以及图表中符号 T. fuc, A. aur, A. del, A. fuc 和 A. mes 分别为银耳 (*Tremella fuciformis*), 黑木耳 (*Auricularia auricula-judae*), 皱木耳 (*A. delicata*), 褐黄木耳 (*A. fuscousuccinea*) 和肠膜状木耳 (*A. mesenterica*) 的简写.

1.2 总 DNA 的提取

总 DNA 的提取采用 CTAB 法, 见文献 [1].

1.3 ITS 片段的 PCR 扩增

利用真菌通用引物 ITS1/ITS2 和 ITS3/ITS4 在 PCR 反应程序 (94 °C 预变性 1 min, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 36 个循环, 最后 72 °C 补平 10 min) 中特异性扩增 ITS 片段 (ITS1,

收稿日期: 2006-07-05 接受日期: 2006-09-13

* 四川省科技厅 2004 年应用基础项目 (04JY029-067) 和中国科学院水利部成都山地灾害与环境研究所博士后基金资助 Supported by the Post-doctorial Foundation of China and the Research Foundation of the Science and Technology Department of Sichuan, China (04JY029-067)

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: daniezhang@imde.ac.cn)

5. 8S rDNA 和 ITS 2 区序列). PCR 产物用 1.4 % 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳后切胶回收,利用 3S Spin Agar Gel Purification Kit (上海申能博采公司)纯化回收目的片段.

表 1 供试毛木耳菌株
Table 1 Tested strains of *A. polytricha*

序号和简写 No. and abbreviation	编号 No.	菌株名 Strain name	来源地 Source	说明 Note
1 (A. pap) 毛木耳 <i>A. polytricha</i>	AP7	AP7	四川省农科院 Sichuan Academy of Agricultural Sciences	杨树野生 Wild Poplar
2 (A. pzj) 毛木耳 <i>A. polytricha</i>	AP9	杂交 1 号 Hybrid 1#	山东济宁光大食用菌中心 Edible Fungi Center of Jining, Shandong	
3 (A. pxs) 毛木耳 <i>A. polytricha</i>	AP10	小上 3 Xiaoshan 3#	四川省食用菌菌种场 Edible Fungi Farm of Sichuan	
4 (A. ptd) 毛木耳 <i>A. polytricha</i>	AP24	特大 Teda	四川省食用菌菌种场 Edible Fungi Farm of Sichuan	
5 (A. pte) 毛木耳 <i>A. polytricha</i>	AP36	台耳 319 Taier 319	江苏江都市天达食用菌所 Jiangdu Institute of Edible Fungi	
6 (A. pml) 毛木耳 <i>A. polytricha</i>	AP57	MI	河北省微生物所 Hebei Institute of Microbiology	
7 (A. pel) 毛木耳 <i>A. polytricha</i>	AP49	AP059	四川省卧龙自然保护区 Wolong Nature Reserve of Sichuan	卧龙野生 Wolong

1.4 ITS 片段的克隆和测序

将纯化的 PCR 产物连接到日本 Takara 公司的 PMD-18T Vector 上,转化大肠杆菌 JM109 感受细胞,用含 X-gal, IPTC 的 AMP 平板筛选,挑白色菌落培养,提取质粒后做 PCR 检测.对成功克隆后的菌株送北京华大生物科技有限公司做正反向双向测序,利用 DNAMAN 软件拼接得全序.

1.5 ITS 序列分析

采用 DNAMAN 程序对序列进行自动排列,另从 NCBI 数据库中下载已公开发表的黑木耳、皱木耳、褐黄木耳、膜状木耳和银耳的 ITS 序列,分析系统发育关系. ITS1 和 ITS2 的范围参照黑木耳的范围确定.数据计算和系统发育树构建均在 DNAMAN 软件下完成.以银耳为分类外群.

2 结果与分析

2.1 ITS 序列变异分析

供试毛木耳 7 个菌株和从 GeneBank 下载的木耳属其它 4 个种包括黑木耳、皱木耳、褐黄木耳和膜状木耳及另一属银耳的 ITS 序列如图 1.

所有分析菌株的 ITS 区长度为 502 ~ 599 bp,最短为银耳 (502 bp),最长为毛木耳菌株 MI (599 bp),没有一个菌株的 ITS 区长度相同.供试毛木耳菌株的 ITS 长度变化范围为 532 ~ 599 bp,也没有一个菌株的 ITS 长度完全一样.所有分析菌株的 5.8 S rRNA 基因长度除仅银耳有一个位点的缺失外,其余菌株的完全相同,为 165 bp. ITS1 的长度为 163 ~ 230 bp,最短的是毛木耳杂交 1 号,最长的是毛木耳 MI,毛木耳台耳 319 和毛木耳特大的 ITS1 区序列完全相同,为 280 bp,群外菌种银耳的 ITS1 区序列也较短,为 180 bp. ITS2 区的长度变化范围为 163 ~ 210 bp,最短的为银耳,最长的为供试毛木耳的 6 个菌株,在供试的 7 个毛木耳菌株中,除特大(209 bp)外,其余 6 个菌株的 ITS2 区序列长度完全相同(210 bp).木耳属其它 4 个种的 ITS2 区序列长度均不相同,分别为 207 bp (黑木耳),183 bp (皱木耳),181 bp (褐黄木耳)和 178 bp (肠膜状木耳).除

去插入和缺失,供试毛木耳整个 ITS 区共有 11 个变异位点, ITS1 区和 ITS2 区的变异位点分别为 5 个和 6 个.在图 1 中,有 3 个碱基位点差异显著,其中,在第 168 个碱基位点上,台耳 319 和特大的碱基为 G,其余 5 个菌株为 A;在第 532 个碱基位点上,台耳 319 和特大的碱基为 C, AP059 缺失,其余 4 个菌株为 T;在第 552 个碱基位点上,变异情况与第 532 个位点相同.

2.2 遗传距离分析

表 2 列出了所有菌株基于 ITS 序列用 DNAMAN 软件计算的遗传距离.所有菌株的遗传距离变化范围 0.002 ~ 0.351,平均为 0.110.木耳属内各种的遗传距离变化范围 0.002 ~ 0.301,平均为 0.0739.毛木耳种内各菌株的遗传距离变化范围 0.002 ~ 0.301,平均为 0.0361.科内的遗传距离大于属内,属内的遗传距离大于种内,说明传统分类与 ITS 分类的一致性,也证实了传统分类的合理性.

2.3 系统发育分析

图 2 为基于 ITS 序列以银耳为外类群用 DNAMAN 软件描绘的木耳系统发育树状图.从图中可见,在低于 94 % 支持强度下,内群的 11 个菌株可分为 5 个组.在 99 % 支持强度下,毛木耳种的 7 个菌株在 A 组内形成独立的分支与其它的种区分开来,它们的 ITS 序列间的碱基差异为 12 bp.

在 86 % 的支持强度下,所有木耳属内的种聚在一起,表明其属内种间的亲缘关系.而以 95 % 为界,每一分支代表各自的种,即组 A ~ E 分别为毛木耳、单独的皱木耳、褐黄木耳、黑木耳及膜状木耳,说明 ITS 区域序列分析支持依据形态特征划分的木耳属的种.

包括两株野生菌株的所有毛木耳聚在一起,均被归在主分支 A 内,表明其亲缘关系近,与它们在形态上是一个种相吻合.其中特大和台耳 319,杂交 1 号和小上 3 两两菌株聚在一起,有可能是同一菌株的不同名称.两株分离于不同地方的野生菌株 (AP7 和 AP49) 和 AP57 不同而出现变异.已有研究报道黑木耳、褐黄木耳、皱木耳和肠膜状木耳的 ITS 区序列在种间存在一定的变异^[1].

菌株

Strains	1	70
T.fuc	TCCGTAGGTG AACCTGCGGA AGGATCATTT GAGATTA...	
A.aur	-A A-----CTYG GGGTTCGTCC CCCAAACTTC	ATTTCAGCTGT
A.del	CTG GGCCCTTACC TGCCCGTTTG	TTTCAGCTGT
A.fuc	CTG GGCCCTTACC TGCCCACTCT	ATTTCAGCTGT
A.mes	CCAGC TCTGCCTTTT	CCTCAGCTGT
A.pap	-G-----A A-----TAG GGCTTTTAA..	CCCAGATCG .TTCAGCTGT
A.pzj		
A.pxs	-G-----A A-----TTG GGCTTTTAA..	CCCAGATCG .TTCAGCTGT
A.ptd	-G-----A A-----TTG GGCTTTTAA..	CCCAGATCG .TTCAGCTGT
A.pte	-G-----A A-----TTG GGCTTTTAA..	CCCAGATCG .TTCAGCTGT
A.pml	-G-----A A-----TTG GGCTTTTAA..	CCCAGATCG .TTCAGCTGT
A.pel	-G-----A A-----TCG GGCTTTTAA..	CCCAGATCG .TTCAGCTGT

菌株

Strains	71	140
T.fuc	CA CCGGGCCGTG AGGCCCTTCC AAACACCTGT	GCACATCGGA CC..GCGCCC
A.aur	GCGCTTC... ..GGCTG-- -GCT-GA.C. GAAATC--..	---C-TTTC GGTC--GTT
A.del	GCCTAA... ..CGCTG-- -GCT-GA-CT CAA-ATC--..	---C-TTTC GGTT--G-T
A.fuc	GCGCTTC... ..GGCTG-- -GCT-GATG. CAA-A-C--..	---CATTTC GGTT--G--
A.mes	GCGCTTA... ..GGCTG-- -GCT-T..C. GAA-AAC--..	---C-TTTC GGTT--G--
A.pap	GCGCCCTTCA CAGGGCTG-- -GCT-GA.G. CAAGA-CC-..	---C-TTTC GGTT--G-T
A.pzj	GCGCCCATCA CAGGGCTG-- -GCT-GA.G. CAAGA-CC-..	---C-TTTC GGTT--G-T
A.pxs	GCGCCCTTCA CAGGGCTG-- -GCT-GA.G. CAAGA-CC-..	---C-TTTC GGTT--G-T
A.ptd	GCGCCCTTCA CAGGGCTG-- -GCT-GA.G. CAAGA-CC-..	---C-TTTC GGTT--G-T
A.pte	GCGCCCTTCA CAGGGCTG-- -GCT-GA.G. CAAGA-CC-..	---C-TTTC GGTT--G-T
A.pml	GCGCCCTTCA CAGGGCTG-- -GCT-GA.G. CAAGA-CC-..	---C-TTTC GGTT--G-T
A.pel	GCGCCCTTCA CAGGGCTG-- -GCT-GA.G. CAAGA-CC-..	---C-TTTC GGTT--G-T

菌株

Strains	141	210
T.fuc	CCGGGCCGGG CCGCCTTCAC ACAACATAT ...GTCAAGA ACGTAATGCA	T..CAT..AA CATGAAACAA
A.aur	T---C.-CTT -CG---T--- -TGC-AC--C AAAA.GTCC- GAA-GTGATC	-AAACGAT-. A-A-T-----
A.del	T---T-GCT- ---T---A -TGC-AC--C TCA---TC-- -T--C--TAT	AAA-TA..T- A-A-T-----
A.fuc	TT--C-GCT- ---T---A -TGC-ACC-C TCA---TC-- -T--C-ACA-	AACT--.. A-A-T-----
A.mes	T-T--T-CTT -CG---T--- -TGC-ACC-C AATCGGTCT- GAA-GTGTAT	AAAAC-AT-. .-A-T-----
A.pap	T---T-GCT- ---T---A -TGC-ACA-C TCA---TC-- -T--T-ACA-	AAC---.. A-A-T-----
A.pzj	T---T-GCT- ---T---A -TGC-ACA-C TCA---TC-- -T--T-ACA-	AAC---.. A-A-T-----
A.pxs	T---T-GCT- ---T---A -TGC-ACA-C TCA---TC-- -T--T-ACA-	AAC---.. A-A-T-----
A.ptd	T---T-GCT- ---T---A -TGC-ACG-C TCA---TC-- -T--T-ACA-	AAC---.. A-A-T-----
A.pte	T---T-GCT- ---T---A -TGC-ACG-C TCA---TC-- -T--T-ACA-	AAC---.. A-A-T-----
A.pml	T---T-GCT- ---T---A -TGC-ACA-C TCA---TC-- -T-CT-ACA-	AAC---AA- A-A-T-----
A.pel	T---T-GCT- ---T---A -TGC-ACA-C TCA---TC-- -T-CT-ACA-	AAC---AA- A-A-T-----

菌株

Strains	211	5.8SrDNA→	280
T.fuc	CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGCTCTCGCA TCGATGAAGA ACGCAGCGAA	TTGCGAAAAG TAATGTGAAT	
A.aur	-----	-----	A-----T--
A.del	-----	-----	A-----T--
A.fuc	-----	-----	A-----T--
A.mes	-----	-----	A-----T--
A.pap	-----	-----	A-----T--
A.pzj	-----	-----	A-----T--
A.pxs	-----G-----	-----	A-----T--
A.ptd	-----	-----	A-----T--
A.pte	-----	-----	A-----T--
A.pml	-----	-----	A-----T--
a.pel	----C-----	-----	A-----T--

菌株

Strains	281	350
T.fuc	TGCAGAATTC AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACCTT GCGCCTTTTG	GTATTCCGAA AGGCATGCCT
A.aur	-----	-----TCC-- -----ATG GA-----
A.del	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----
A.fuc	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----
A.mes	-----	-----T-- ----TCC-- ---C--ATG GA---A---
A.pap	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----
A.pzj	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----
A.pxs	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----
A.ptd	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----
A.pte	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----
A.pml	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----
A.pel	-----	-----T-- ----TCC-- -----ATG GA-----

菌株	Strains	351	ITS2→	420
T. fuc	TTTGTAGTGT	CATGTAGACT	CA.ACCCCC	GGGTTTCTGA
A. aur	-----	--C---A--C	-TC---T-G	C-A-G-AAC-
A. del	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. fuc	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. mes	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. pap	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. pzj	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. pxs	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. ptd	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. pte	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. pml	-----	--C---A--A	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
A. pel	-----	--C---A--C	-TC---TTG	C-A-G-AAC-
菌株	Strains	421		490
T. fuc	TCCTGGCTGG	CCTT...AAA	TGCCTTAGTG	GTTTCACGCA
A. aur	-AA-.CGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. del	-GA-TCGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. fuc	-AAC.CGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. mes	-AG-.TGGCT	-G-CCTG---	---A---CT	-G-G-TTTT-
A. pap	-AAC.TGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. pzj	-AAC.CGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. pxs	-AAC.CGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. ptd	-AAC.CGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. pte	-AAC.CGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. pml	-AAC.CGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
A. pel	-AAC.AGGCT	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-
菌株	Strains	491		560
T. fuc	CGCTCACAAC	CCCCCTAC.		
A. aur	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. del	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. fuc	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. mes	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. pap	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. pzj	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. pxs	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. ptd	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. pte	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. pml	TAA-T-TCTG	-G-AA-.GC	CCTGGGCCTC	TTCAGCGGCG
A. pel	-G-CTTG---	---A---CT	-GCG-TTTT-	--GTG-TGGG
菌株	Strains	561		630
T. fuc			TTTTGC	ACTCTGGCCT
A. aur	CCGTCCCTCG	TGG...ACAA	CTAT---AAA	G--T-----
A. del	CCGTCCCTCY	GCGGACAACT	YTTT...-AAA	G--T-----
A. fuc	TCGTCCCTCT	GCGGACAACT	AATA-C-AAA	G--T-----
A. mes	TCGTCCCTCAG	AGG...ACAA	CGTA-C-AAA	G--T-----
A. pap	CCGTCCCTCT	GTGGACACAT	TATT---AAA	G--T-----
A. pzj	CCGTCCCTCT	GTGGACACAT	TATT---AAA	G--T-----
A. pxs	CCGTCCCTCT	GTGGACACAT	TATT---AAA	G--T-----
A. ptd	CCGTCCCTCT	GTGGACACAT	TATT---AAA	G--T-----
A. pte	CCGTCCCTCT	GTGGACACAT	TATT---AAA	G--T-----
A. pml	CCGTCCCTCT	GTGGACACAT	TATT---AAA	G--T-----
A. pel	CCGTCCCTCT	GTGGACACAT	TATT---AAA	G--T-----
菌株	Strains	631	640	
T. fuc	AGCATATCAA	T		
A. aur	-----	.		
A. del	-----	.		
A. fuc	-----	.		
A. mes	-----	.		
A. pap	-----	.		
A. pzj	-----	.		
A. pxs	-----	.		
A. ptd	-----	.		
A. pte	-----	.		
A. pml	-----	.		

图 1 木耳属 5 个种和银耳 ITS 序列比较

Fig. 1 ITS sequence alignment of *Auricularia* spp. and *Tremella fuciformis*

T. fuc: AF444316; A. aur: AF291268; A. del: AF291269; A. fuc: AF291270; A. mes: AF291271.

ITS1 区包含部分 18 S rRNA 基因, ITS2 区包含部分 28 S rRNA 基因.

.....: 碱基缺失; ---: 碱基相同; 碱基外的其它字母: 不确定碱基.

18 S rRNA gene, partial sequence; complete ITS sequence; and 28 S rRNA gene partial sequence.

.....: base loss; ---: same bases; other letters out of bases: uncertain bases

表 2 基于 ITS 序列用 DNAMAN 计算的遗传距离
Table 2 Genetic distance matrix based on ITS sequence

菌株 Strains	A. pml	A. pte	A. ptd	A. pxs	A. pzj	A. pap	A. aur	A. del	A. fus	A. mes	T. fuc
A. pte	0.013										
A. ptd	0.012	0.002									
A. pxs	0.010	0.007	0.005								
A. pzj	0.011	0.008	0.006	0.004							
A. pap	0.014	0.010	0.009	0.007	0.006						
A. aur	0.129	0.121	0.121	0.121	0.112	0.122					
A. del	0.088	0.080	0.082	0.082	0.061	0.086	0.132				
A. fus	0.074	0.067	0.069	0.069	0.05	0.073	0.138	0.063			
A. mes	0.156	0.146	0.146	0.15	0.134	0.148	0.097	0.143	0.138		
T. fuc	0.298	0.293	0.294	0.302	0.310	0.300	0.312	0.333	0.338	0.351	
A. pel	0.014	0.014	0.012	0.010	0.009	0.007	0.126	0.090	0.076	0.156	0.301

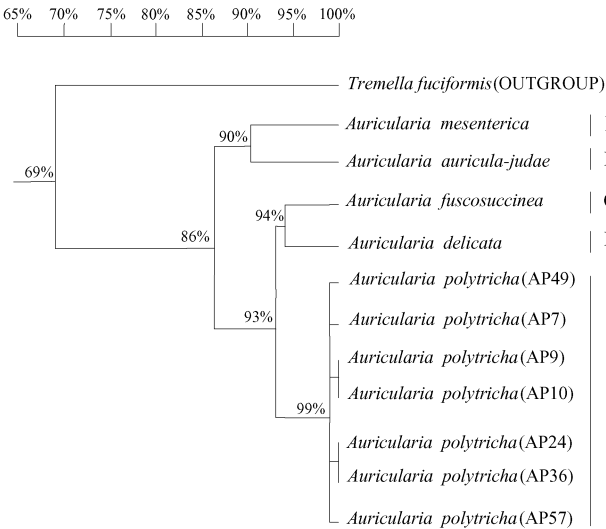


图 2 ITS 序列相似性树状图
Fig. 2 Phylogenetic tree based on ITS region sequence alignment

3 讨论

超显微结构在担子菌的系统发育分类上起着重要作用,长期以来,以担子类型为分类的主要指标掩盖了木耳属真实的系统发育地位^[4],在定义高级分类群时更是以担子类型的差异作为重要指标.据阿历索保罗等的《真菌概论》就根据担子类型把担子菌纲分为 3 个亚纲,即无隔担子菌亚纲、有隔担子菌亚纲和冬孢菌亚纲^[5].沿着该分类体系,隔担子菌亚纲由异担子典型地被横或纵隔膜分成 4 个细胞的真菌所组成.该亚纲中的银耳目和木耳目由腐生的类型所组成,前者以产生典型的被纵隔膜分成 4 个细胞的异担子为特征,普通的有黑耳属(*Exidia* spp.)和银耳属(*Tremella* spp.)的某些种,焰耳属(*Phlogiotis* spp.)也包括在该目中.木耳目的成员以产生由横隔膜分成 4 个细胞的异担子为特征.然而据嵇晓岚《中国大型真菌》和有些传统的分类,则把焰耳属和黑耳属与木耳属归在木耳目中,进一步将焰耳(*P. hebelloides*)、胶黑耳(*E. glandulosa*)和短黑耳(*E. recisa*)也纳入木耳属中^[6].该分类的思路是根据这些真菌的担子果为胶质而归为同类群,把银耳目、花耳目和木耳目并归于“胶质菌类”中,但花耳目的担子是无隔的,革菌属的有些种(*Eichlerilla incarnata*)则被放在银耳科(*Tremellaceae*).

Bandoni 结合显微形态、超显微结构、生态学及发生学资料对木耳目和银耳目的划分提出了一个选择性的分类意

见^[7].他把那些只具有简单隔膜孔的木耳目种类排除在外,木耳目包括有横的或纵的有隔担子,菌丝单倍体阶段,连续的桶孔覆垫,这种分离得到了 rRNA 和 rDNA 序列分析的支持.这样木耳目除了含有木耳属外,还包括了先前被 Martin 归在银耳目的那些分类种,而银耳则只包括那些具有隔膜孔复合体并具单细胞单倍体阶段的分类群^[8].

黑耳属和木耳属的担子类型不同,木耳有横隔膜,黑耳及其包含的种是纵隔膜.木耳和黑耳在外部形态上和子实体解剖学上,色素积累方面以及非形态阶段都极为相似. Weiß 等用 ITS 序列分析研究木耳目及其有关类群的系统发育关系时,得出的结果明显支持黑耳属和木耳属与其它相关属包括革菌属的某些种(*E. deglubens*)共存于木耳目中,与只包括银耳属和另外二属(*Sirobasidium magnum*, *Filobasidiella neoformans*)的银耳目分开^[4].

真菌学家们提出了各种分类体系^[3],但没有一家之说成为学术界的共识,正如 McGuire 指出的那样,“因为缺乏足够有关的不明显特征的资料,我们有可能不能将木耳类群内的真正关系弄清楚.”利用 ITS 序列的测定及其它分子生物学技术,结合形态特征、显微结构和超显微结构,可望使木耳目的系统发育地位更为客观,使其与相关类群关系的建立更接近实际^[9].

真菌 rDNA 相当保守,但 rDNA 内转录间区 ITS 进化相对较快,在同一属内可因菌种不同而出现变异.研究报道黑木耳、褐黄木耳、皱木耳和肠膜状木耳的 ITS 区序列在种间存在一定的变异^[1].作者首次对毛木耳的 ITS 区基因片段成功地进行了 PCR 扩增、克隆及测序.结果发现,7 株来源于不同地区的毛木耳菌株的 ITS 区序列均存在差异,碱基变异从 1~4 bp 不等.结合从 GeneBank 中查寻到的有关序列资料进行比较分析,发现毛木耳、黑木耳、褐黄木耳、皱木耳和肠膜状木耳等的种间 ITS 序列变异大于毛木耳的种内变异.

本文 ITS 序列分析的结果支持传统分类学中银耳和木耳的分离,也支持木耳属内部种的分类和种内菌株的分离.

References

- 刘祖同, 罗信昌. 食用蕈菌生物技术及应用. 北京: 清华大学出版社, 1999, 43~46
- Ling XM (林晓民), Li ZQ (李振歧), Wang SX (王少先). The characteristics of rDNA in fungi and its using for identification ectomycorrhizal fungi. *Acta Agri Bor - occid Sin* (西北农业学报), 2005, 14 (2): 120~125

- 3 Percudani R, Trevisi A, Zambonelli A, Ottonello S. Molecular phylogeny of *Truffles* (*Pezizales*; *Terfeziaceae*, *Tuberaceae*) derived from nuclear rDNA sequence analysis. *Mol Phylogen & Evol*, 1999, **13** (1): 169 ~ 180
- 4 Wei M, Oberwinkler F. Phylogenetic relationships in *Auriculariales* and related groups hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences. *Myc Res*, 2001, **105** (4): 403 ~ 415
- 5 阿历索保罗 CJ, 明斯 CW 著; 余永年, 宋大康等译. 真菌学概论. 北京: 农业出版社, 1983. 36 ~ 438
- 6 卯晓岚. 中国大型真菌. 河南洛阳: 河南科学技术出版社, 2000. 1 ~ 509
- 7 Bandoni RJ. The *Tremellales* and *Auriculariales*; an alternative classification. *Trans Mycol Soc Japan*, 1984, **25**: 489 ~ 530
- 8 Martin GR. The classification of the *Tremellales*. *Mycologia*, 1945, **37**: 527 ~ 542
- 9 McGuire JM. The species of *Sebacina* (*Tremellales*) of temperate North America. *Lloydia*, 1941, **4**: 1 ~ 43