

林木外生菌根真菌彩色豆马勃巢式PCR检测*

周爱东 吴小芹** 叶建仁

(南京林业大学森林资源与环境学院 南京 210037)

摘要 为探讨林木外生菌根真菌的分子检测方法,利用真菌通用引物ITS1-F/ITS4-B扩增了外生菌根真菌彩色豆马勃的核糖体DNA内转录间隔区并进行了序列测定。通过序列比较,设计了一对彩色豆马勃特异性引物PtF/PtR。利用该对特异性引物与ITS1-F/ITS4-B组合进行巢式PCR,能从供试的彩色豆马勃10个菌株中特异性地扩增出1条347 bp的条带,而供试的其他6个参比菌株未出现扩增产物。经分析,该巢式PCR检测技术的灵敏度可达到10 fg的DNA,是常规PCR检测的1 000倍。利用该技术从马尾松苗木菌根中检测到目的外生菌根真菌。这表明采用本研究设计的特异性引物,利用巢式PCR技术可以灵敏、准确地从林木外生菌根中检测出彩色豆马勃。图4 参20

关键词 外生菌根真菌;彩色豆马勃;巢式PCR;分子检测

CLC Q948.122.3 : Q78

Detection of Forest Ectomycorrhizal Fungi-*Pisolithus tinctorius* by Nested PCR*

ZHOU Aidong, WU Xiaoqin** & YE Jianren

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract For investigating a suitable molecular approach to detect ectomycorrhizal fungi (EMF), the internal transcribed spacer (ITS) region of the EMF *Pisolithus tinctorius* was amplified with universal primers ITS1-F/ITS4-B and sequenced. Based on the conserved sequence determined by alignment using Clustal W, a pair of specific primers named PtF/PtR were designed by Primer premier 5.0. The specificity of the primer pair was then analyzed in 10 *P. tinctorius* strains together with 6 reference strains, and a 347 bp product was amplified from all *P. tinctorius* strains but there was no product from the 6 reference strains. A nested PCR procedure using ITS1-F/ITS4-B as the first-round primers followed by PtF/PtR increased detection sensitivity 1 000-fold to 10 fg DNA template. The target EMF from the mycorrhiza of *Pinus massoniana* potted seedlings inoculated with *P. tinctorius* was detected by this technique. The results indicated that the nested PCR assay could be used as a sensitive and accurate way to detect forest EMF *P. tinctorius*. Fig 4, Ref 20

Keywords ectomycorrhizal fungi; *Pisolithus tinctorius*; nested PCR; molecular detection

CLC Q948.122.3 : Q78

外生菌根是真菌与植物根系相互作用形成的互惠共生体,是大多数森林植物正常生长不可或缺的组成部分,具有重要的生态环境效益和经济价值^[1]。准确描述和鉴定外生菌根真菌(Ectomycorrhizal fungi, EMF)是探索外生菌根在自然森林生态系统中功能的最基本要求之一,特别是在进行外生菌根种类和分布状况的野外调查时,对菌根真菌的监测也

需要鉴别EMF。同时,对EMF鉴定也可应用于检测接种了外生菌根食用真菌的植物质量,以确保被接种的植物在生产过程中没有被其它真菌污染^[2-3]。传统的EMF鉴定是通过真菌子实体颜色、形状和其它的宏观特征进行鉴定,后来辅以菌索和真菌细胞的显微结构等进行鉴定^[4]。但是,由于大多数EMF种类在野外或离体培养时不易形成子实体,因此对EMF进行形态学描述及鉴定存在一定困难。另外,相近种的EMF所形成的菌根往往具有相似的形态学结构,容易混淆^[5],所以探寻合适的检测EMF的方法是当前亟待解决的一个重要问题。真菌核糖体DNA(Ribosomal DNA, rDNA)的内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)是一段中度或高度保守序列,其保守性表现为种内相对一致,种间差异比较明显,因此为真菌的分子检测提供了理想的靶序列^[6],再加上分子生

收稿日期: 2011-04-02 接受日期: 2011-04-26

*国家林业局林业公益性行业科研专项(No. 201004061)、“十二五”国家科技支撑项目(No. 2012BAD19B07)和江苏省高校优势学科建设工程一期项目资助 Supported by the Special Research Program of State Forestry Administration of China for Public-welfare Forestry (No. 201004061), the “12th 5-year Plan” Sci & Technology Pillar Project of China (No. 2012BAD19B07) and the Project of Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions of China

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: xqwu@njfu.edu.cn)

物学和生物信息学的发展,许多真菌的rDNA ITS区序列被测定并且向GenBank等三大数据库提交,为通过ITS区序列来研究EMF的分子检测提供了方便。

彩色豆马勃 (*Pisolithus tinctorius*) 是一种地理分布广泛、寄主范围广、对林木有益的EMF,分布于世界三十多个国家,能够与松树 (*Pinus*)、桉树 (*Eucalyptus*)、栎树 (*Quercus*)、桦木 (*Betula*) 等多种林木形成菌根,在苗圃育苗、树木移栽和人工造林时具有提高幼苗成活率、促进树木营养吸收、提高树木抗病和抗逆境胁迫的能力^[7-9]。对彩色豆马勃进行准确检测有利于更好地发现和利用彩色豆马勃资源以及对该EMF的实际应用效果进行评价。近年来,许多分子生物学检测方法被应用到EMF的检测中,然而应用巢式PCR (Nested PCR) 技术对彩色豆马勃的检测尚未见报道。本研究以彩色豆马勃rDNA的ITS区为靶序列,通过设计特异性引物,以期利用巢式PCR技术检测松树外生菌根中的彩色豆马勃,为林木EMF的快速准确检测和评估其在野外生境中的丰度等提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试真菌菌株及菌根化松苗

选取彩色豆马勃10个菌株,其中1~2号2个菌株由南京林业大学森林病理实验室保存,3~10号8个菌株购自中国林业微生物菌种保藏管理中心;同时选取黄色须腹菌 (*Rhizopogon luteolus*)、紫金蜡蘑 (*Laccaria amethystea*)、劣味乳菇 (*Lactarius insulsus*) 和裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 纯培养菌种以及红菇 (*Russula* sp.)、小马勃 (*Lycoperdon pusillus*) 子实体作为参考菌株,其中除红菇、小马勃子实体采自江苏省林业科学研究院马尾松林,其余菌种均由南京林业大学森林病理实验室保存。供试彩色豆马勃2号菌株 (代号: Pt2) 是本实验室筛选出的对松树具有较好促生、抗病作用的优良菌株,因此本研究以Pt2作为检测的阳性菌株。

选取经彩色豆马勃2号菌株 (Pt2) 菌根化处理的湿地松 (*Pinus elliotii*)、赤松 (*Pinus densiflora*) 组培苗^[10],以及马尾松 (*Pinus massoniana*) 4年生菌根化盆栽实生苗^[11]为供试松树菌根化苗。

1.2 供试菌株及松苗DNA的提取和ITS扩增

供试菌株及松苗DNA的提取参考Gardes等的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法^[12]。在进行松树组培苗和实生苗菌根DNA提取时,当DNA溶于100 μ L TE溶液后,再次加入200 μ L CTAB重复提取一次。所提取DNA经紫外分光光度计和0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。以Pt2的DNA为模板,用真菌通用引物ITS1-F (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3')/ITS4-B (5'-CAGGAGACTTGACACGGTCCAG-3') 对Pt2进行PCR扩

增,反应体系20 μ L: 10 $\times$ PCR buffer (Mg²⁺ Free) 2 μ L; MgCl₂ (25 mmol/L) 1.3 μ L; dNTP Mixture (各2.5 mmol/L) 1.6 μ L; 引物各1 μ L; rTaq酶 (5 U/ μ L) 0.1 μ L; 模板DNA 2 μ L; 加无菌去离子水至20 μ L。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C变性1 min, 57.8 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

1.3 PCR产物克隆与测序

将Pt2的ITS区PCR产物经E.Z.N.A.TMCycle-Pure Kit回收,连接pMD19-T载体,转化JM109,挑选阳性克隆经插入片段验证后送上海美吉公司测序。本试验所用TaKaRa DNA Fragment Purification Kit、E.Z.N.A.TMCycle-Pure Kit、DNA聚合酶、dNTP、pMD19-T载体、DNA Marker等购自大连宝生物公司。试验所用引物由南京金斯瑞公司合成。

1.4 特异性引物设计

在GenBank上获得彩色豆马勃及其同属其余种的ITS序列16条,连同供试Pt2的ITS序列进行Clustal W多重序列比对,利用Primer premier 5.0设计了一对彩色豆马勃的特异性引物: PtF (5'-GGGACCTGTGCGTTTCGT-3')/PtR (5'-CATGCC CACCCGCTAATG-3'),扩增产物大小为347 bp。

1.5 常规PCR和巢式PCR扩增

巢式PCR第一轮PCR反应的引物为通用引物ITS1-F/ITS4-B,按照1.2中的体系和步骤进行PCR扩增。常规PCR和巢式PCR第二轮反应以特异性引物PtF/PtR为引物,巢式PCR第一轮PCR产物稀释50倍,取2 μ L作为第二轮反应模板,PCR反应体系与第一轮相同,PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C变性1 min, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

1.6 巢式PCR产物回收测序

为了进一步确认PCR产物的特异性,用TaKaRa DNA Fragment Purification Kit将巢式PCR电泳产物进行切胶回收,连接pMD19-T载体,转化JM109,挑选阳性克隆经插入片段验证后送上海美吉公司测序,测序后与目的序列比对来确认扩增产物的正确性。

2 结果与分析

2.1 彩色豆马勃巢式PCR引物的特异性分析

本研究以彩色豆马勃rDNA的ITS区为靶序列,设计了用于巢式PCR检测彩色豆马勃的特异性引物PtF/PtR,将所设计的引物放回GenBank中的Primer-Blast比对,只有彩色豆马勃的两个基因登陆序列AF374717、AF374710能产生347 bp的片段,说明了该对引物在目前GenBank中的特异性。此外,采用该对引物对供试10株彩色豆马勃,4种松林中常见EMF黄色须腹菌、紫金蜡蘑、劣味乳菇、红菇,以及2种松林中常见真菌裂褶菌、小马勃进行巢式PCR,所有彩色豆马勃菌株扩增

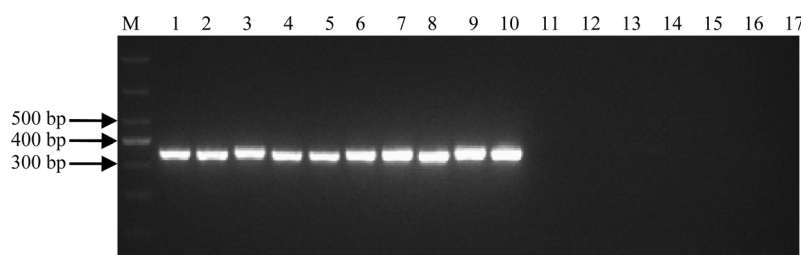


图1 彩色豆马勃巢式PCR引物特异性分析

Fig. 1 Specificity assessment of the nested PCR primers for *P. tinctorius*

M, Marker DL 1000; 1~10, 彩色豆马勃; 11, 黄色须腹菌; 12, 紫金蜡蘑; 13, 劣味乳菇; 14, 红菇; 15, 裂褶菌; 16, 小马勃; 17, 双蒸水

Lane M, Marker DL 1000; 1~10, *Pisolithus tinctorius*; 11, *Rhizopogon luteolus*; 12, *Laccaria amethystea*; 13, *Lactarius insulsus*; 14, *Russula* sp.; 15, *Schizophyllum commune*; 16, *Lycoperdon pusillus*; 17, ddH₂O

结果都为阳性, 获得大小为347 bp的扩增产物, 其他EMF和非EMF扩增结果为阴性(图1)。采用真菌ITS通用引物对所有供试真菌DNA进行PCR, 都获得了800 bp左右大小的产物。结果表明该对巢式PCR引物只能对彩色豆马勃进行特异性扩增, 其他真菌DNA不能获得相应扩增产物。

巢式PCR产物凝胶回收测序结果表明, 347 bp大小的扩增产物与Pt2 ITS区中的一段序列完全匹配。这表明, 引物PtF/PtR能特异地扩增出EMF彩色豆马勃ITS区347 bp的片段, 而对其他真菌没有扩增产物。

2.2 彩色豆马勃巢式PCR检测的灵敏度分析

为了评估巢式PCR检测彩色豆马勃的灵敏度, 将彩色豆马勃DNA稀释为10个梯度, 20 μ L PCR反应体系中分别含DNA模板100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、1 fg、100 ag, 分别用特异性引物进行常规PCR和巢式PCR, 结果显示常规PCR只能检测到10 pg的DNA(图2-A),

巢式PCR最低能检测到10 fg的DNA(图2-B), 巢式PCR检测灵敏度是常规PCR的1 000倍, 表明巢式PCR在彩色豆马勃的检测中具有灵敏、高效的特点。

2.3 巢式PCR检测松树组培苗菌根中彩色豆马勃

为了评价本研究所开发的EMF彩色豆马勃巢式PCR检测在实际应用中的效果, 首先以本实验室所培育的施用Pt2的组培苗进行巢式PCR检测。结果显示, 菌根化的湿地松和赤松组培苗菌根都能获得阳性扩增结果, 而未施用Pt2的湿地松和赤松组培苗根及松针和阴性对照都没有扩增产物(图3)。结果表明, 本研究所开发的特异性引物可以用于不同松树组培再生植株菌根苗中EMF彩色豆马勃的检测。

2.4 巢式PCR检测温室条件下盆栽松苗菌根中彩色豆马勃

对施用Pt2的4年生菌根化盆栽马尾松实生苗进行巢式PCR检测, 以进一步验证本研究所设计特异性引物的检测

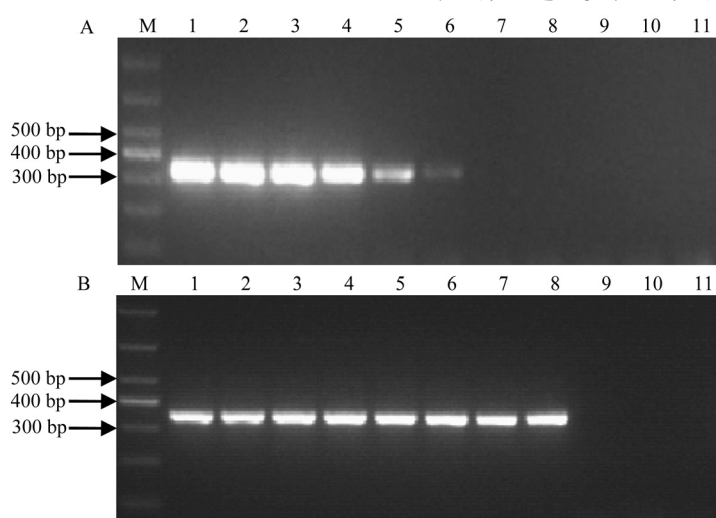


图2 特异性引物PtF/PtR常规PCR(A)和巢式PCR(B)扩增彩色豆马勃DNA灵敏度检测

Fig. 2 Sensitivity of regular PCR (A) and nested PCR (B) with the specific primers PtF/PtR for detection of *P. tinctorius* using different quantity of DNA

M, Marker DL 1000; 1~10, 20 μ L PCR反应体系中分别含DNA模板100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、1 fg、100 ag; 11, 双蒸水

Lane M, Marker DL 1000; 1~10, Products amplified DNA at quantity of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag in 20 μ L PCR reaction system respectively; 11, ddH₂O

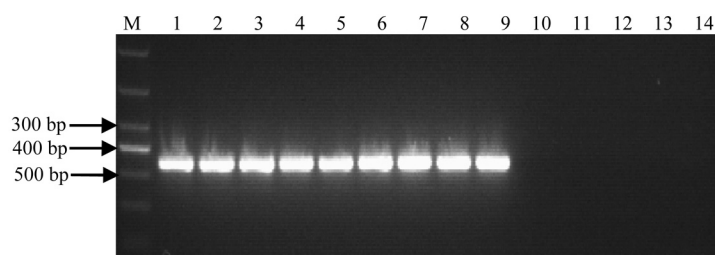


图3 巢式PCR检测两种松树组培苗菌根中彩色豆马勃

Fig. 3 Detection of *P. tinctorius* from the tissue culture seedlings of two pine species inoculated with Pt2 by the nested PCR assay
M, Marker DL 1000; 1, 100 ng DNA的阳性对照; 2~5, 菌根化湿地松根; 6~9, 菌根化赤松根; 10, 未菌根化湿地松根; 11, 未菌根化赤松根; 12, 湿地松松针; 13, 赤松松针; 14, 双蒸水

Lane M, Marker DL 1000; 1, 100 ng positive control DNA of Pt2; 2~5, *Pinus elliottii* roots inoculated with Pt2; 6~9, *P. densiflora* roots inoculated with Pt2; 10, *P. elliottii* roots; 11, *P. densiflora* roots; 12, *P. elliottii* needles; 13, *P. densiflora* needles; 14, ddH₂O

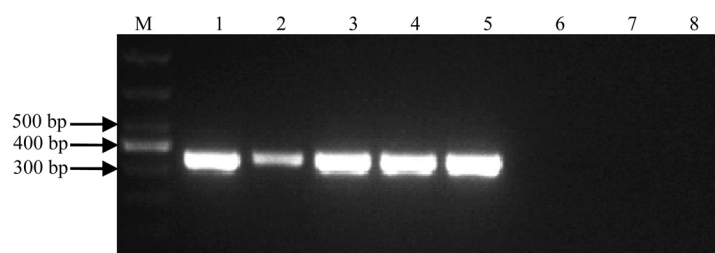


图4 巢式PCR检测盆栽马尾松实生苗菌根中彩色豆马勃

Fig. 4 Detection of *P. tinctorius* from the potted *P. massoniana* seedlings inoculated with Pt2 by the nested PCR assay
M, Marker DL 1000; 1, 100 ng DNA的阳性对照; 2~5, 菌根化马尾松根; 6, 未菌根化马尾松根; 7, 马尾松松针; 14, 双蒸水

Lane M, Marker DL 1000; 1, 100 ng positive control DNA of Pt2; 2~5, *P. massoniana* roots inoculated with Pt2; 6, *P. massoniana* roots; 7, *P. massoniana* needles; 8, ddH₂O

效果. 结果显示, 施用Pt2的马尾松菌根检测结果为阳性, 未施用Pt2的马尾松根、松针以及阴性对照都没有扩增产物(图4). 试验结果表明, 该巢式PCR检测技术可以检测温室条件下盆栽松树菌根中的彩色豆马勃, 从而为自然生境中彩色豆马勃的调查和鉴定及其它EMF资源的研究提供了一种可行的参考方法.

3 讨论

近年来, 一系列基于rDNA ITS区的分子生物学检测外生菌根的方法应运而生, 主要的分子生物学方法如运用限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism)^[13-14]、简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)^[15]、序列扩增特征区(Sequence characterized amplified region, SCAR)^[16], 还有设计特异性引物扩增ITS区^[8, 17]和设计专一性探针进行分子杂交检测和鉴定EMF^[18], 这使得对EMF的检测脱离了对形态学的依赖. 但是这些方法也存在一些不足, 如费用比较昂贵, 检测对象DNA质量不高或DNA浓度太小时难于分析等, 因此开发准确、灵敏的分子检测方法是十分重要的. 本研究通过合成彩色豆马勃特异性引物, 运用巢式PCR技术, 成功从彩色豆马勃离体培养物、松树菌根化组培苗及4年生实生苗菌根中检测出彩色豆马勃. 研究

结果表明, 巢式PCR具有准确、快速、灵敏度高等优点, 是EMF检测的一种高效可行的方法.

土壤中存在多种PCR扩增抑制剂, 如腐殖酸等, 会对PCR扩增产生严重影响, 另外, 从植物菌根中只能获得少量的真菌DNA^[19], 这些因素给EMF的分子检测带来了不便. 巢式PCR是基于内部引物, 进行两轮PCR扩增, 能增加DNA扩增片段的浓度, 对PCR抑制物质起到稀释作用, 因此可以避免低DNA浓度和PCR抑制化合物对检测的影响. 此外, 当模板结构复杂或序列高度相似的情况下, 直接PCR可能会导致非特异性扩增, 产生假阳性结果. 巢式PCR的第二轮扩增是在第一轮扩增的基础上进行的, 因此即使第一轮PCR出现了假阳性产物, 也可以通过第二轮扩增纠正^[20]. 本研究设计的特异性巢式PCR引物PtF/PtR最低能检测到10 fg的DNA, 是常规PCR检测的1 000倍, 并且能从两种不同松树的组培苗菌根和盆栽实生苗菌根中成功检测到目的EMF, 说明了本巢式PCR检测方法是准确高效的.

因此, 本研究所开发的基于ITS区特异性引物的巢式PCR检测技术为EMF彩色豆马勃的检测提供了一种有效的工具, 也为其他林木EMF, 尤其是一些食用价值很高的外生菌根食用菌的鉴定和检测提供了参考; 同时, 在森林生态研究中对于EMF的自然分布及种群丰度的评估监测等也具有好的参考和应用价值.

References

- 1 Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd Ed. London, UK: Academic Press, 2008
- 2 Amicucci A, Guidi C, Zambonelli A, Potenza L, Stocchi V. Multiplex PCR for the identification of white *Tuber* species. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **189** (2): 265~269
- 3 Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Granetti B, Arcioni S. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, **28** (1): 23~30
- 4 Agerer R. Characterization of Ectomycorrhiza. Methods in Microbiology: Techniques for the Study of Mycorrhiza. London, UK: Academic Press, 1991. 25~73
- 5 Marx DH. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can J Microbiol*, 1977, **23** (3): 217~223
- 6 Lin XM (林晓民), Li ZQ (李振岐), Wang SX (王少先). The characteristics of rDNA in fungi and its using for identification of ectomycorrhizal fungi. *Acta Agric Bior-occid Sin* (西北农业学报), 2005, **14** (2): 120~125
- 7 Zheng LY (邓来友), Li WT (李文钊), Cheng XF (成小飞), Hua XM (花晓梅). Study on ecto-endomycorrhizae associated by *Pisolithus tinctorius* with pine. *For Res* (林业科学研究), 2003, **16** (3): 262~268
- 8 Burgess T, Dell B, Malajczuk N. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated onto *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytol*, 1994, **127** (4): 731~739
- 9 Linde SVD, Alexander I, Anderson IC. A PCR-based method for detecting the mycelia of stipitate hydroid fungi in soil. *J Microbiol Methods*, 2008, **75** (1): 40~46
- 10 Zhu LH, Wu XQ, Qu HY, Ji J, Ye JR. Micropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2010, **102**: 121~128
- 11 Xu C (徐超), Wu XQ (吴小芹). Drought responses and related endogenous polyamine changes in mycorrhizaed *Pinus massoniana*. *Acta Bot-Occid Sin* (西北植物学报), 2009, **29** (2): 296~301
- 12 Gardes G, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 1993, **2** (2): 113~118
- 13 Farmer DJ, Sylvia DM. Variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of a diverse collection of ectomycorrhizal fungi. *Mycol Res*, 1998, **102** (7): 859~865
- 14 Chen DM, Cairney WG. Investigation of the influence of prescribed burning on ITS profiles of ectomycorrhizal and other soil fungi at three Australian sclerophyll forest sites. *Mycol Res*, 2002, **106** (5): 532~540
- 15 Longatoa S, Bonfante P. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol Res*, 1997, **101** (4): 425~432
- 16 Karkouri KE, Selodsse MA, Mousain D. Molecular markers detecting an ectomycorrhizal *Suillus collinitus* strain on *Pinus halepensis* roots suggest successful inoculation and persistence in Mediterranean nursery and plantation. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, **55** (1): 146~158
- 17 Amicucci A, Zambonelli A, Giomaro G., Potenza L, Stocchi V. Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species - Specific ITS primers. *Mol Ecol*, 1998, **7** (3): 273~277
- 18 Terashima Y, Nakai T. Identification of the DNAs of *Tricholoma bakamatsutake*. *Mycoscience*, 1996, **37** (3): 371~375
- 19 Tsai YL, Olsen BH. Rapid methods for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58** (7): 2292~2295
- 20 Huang L, Xu XL, Wu XQ, Chen FM, Li C, Ye JR. A nested PCR assay targeting the DNA topoisomerase I gene to detect the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytoparasitica*, 2010, **38** (4): 369~377