

四川省雅江松茸菌的分离与系统发育

廖德聪¹, 陈 强^{1*}, 李登煜¹, 张小平¹, 张昌兵²

(1. 四川农业大学微生物学系, 四川 雅安 625000; 2. 四川省草原研究所, 四川成都 611731)

摘要: 对外生菌根真菌-松茸的纯培养条件进行了探讨, 并从采集自四川省雅江县的松茸子实体中获得了 10 株松茸菌的纯培养物; 分别以 NS1 和 NS6, NS1 和 NS8, ITS4 和 ITS5 为引物, 对分离获得的松茸菌进行了 18S rDNA PCR-RFLP 和 ITS PCR-RFLP 分析, 结果显示, 用 *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* 和 *MspI* 四种限制性内切酶, 这些松茸菌株的 18S rDNA、ITS 片段的酶切图谱完全相同; 代表菌 E7 的 ITS 序列分析结果表明, 本研究分离的松茸菌与 *Tricholoma matsutake* 的菌株在系统发育上高度同源, 在分类上应属于同一个种。

关键词: 松茸; 系统发育; 菌根真菌; 18S rDNA; ITS

Isolation and phylogenetic study of *Tricholoma* spp. isolated from Yajiang, Sichuan, China

LIAO De-Cong¹, CHEN Qiang^{1*}, LI Deng-Yu¹, ZHANG Xiao-Ping¹, ZHANG Chang-Bing¹ (1. Department of Microbiology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625000, China; 2. Institute of Sichuan Grassland Science, Chengdu 611731, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(4): 791~794.

Abstract: The culturing condition for isolating ectomycorrhizal fungus *Tricholoma* spp. was performed, and 10 matsutake isolates were got from Yajiang, Sichuan Province. Using NS1 and NS6, NS1 and NS8, ITS4 and ITS5 primer pairs, the 18S rDNA and ITS fragments of these matsutake strains was amplified, and digested by *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* and *MspI*, respectively. The results showed that these strains had the same restriction patterns for each restriction enzyme, which showed that the homology among these strains were very high. Furthermore, the ITS sequence of representative strain E7 was analyzed, and compared with the data in the Genbank, and then the phylogenetic tree was constructed. The results showed that the ITS sequence of E7 was the same as that of *T. matsutake* KBF20T07 which was isolated from South Korea, and the ITS sequence of E7 had very high similarity to those of the most other matsutake strains in the Genbank. The phylogenetic analysis showed that E7 and the matsutake strains from Genbank were in the same phylogenetic branch, which suggested that, from the taxonomic point of view, these matsutake strains isolated from Yajiang belonged to *Tricholoma matsutake*.

Key words: *Tricholoma* sp.; phylogeny; ectomycorrhizal fungus; 18S rDNA; ITS

文章编号: 1000-0933(2005)04-0791-04 中图分类号: Q939.5 文献标识码: A

松茸(*Tricholoma matsutake* (S. Ito et I mai) Sing)是一种名贵的野生食药两用真菌,具有较高的商品价值。主要分布在欧洲、美洲、大洋洲,亚洲的朝鲜半岛、日本以及我国东北的长白山区和西南的横断山区。四川省的金沙江、雅鲁江流域及大渡河上游的高山峡谷河谷山原地区,年均出产松茸约 100t 左右^[1]。由于这些地方具有独特的气候条件和特殊的宿主植物,因此被认为是松茸群的多度中心和多样化中心^[2],曾对分离自四川省雅江县的 10 个松茸菌株用 AFLP 技术进行了研究^[3],发现这些松茸菌株间的遗传相似性很高,但其系统发育地位还不清楚。

由于松茸菌属于外生菌根真菌,在合成培养基上生长极为缓慢^[4],加之松茸的寄主植物范围较窄,主要包括松、栎、元江栲

基金项目: 华中农业大学农业部农业微生物重点实验室开放课题资助项目; 四川农业大学科研基金资助项目

收稿日期: 2004-04-10; **修订日期:** 2005-03-05

作者简介: 廖德聪(1972~),男,硕士,主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: liaodc@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: cqiang@sicau.edu.cn

Foundation item: Huazhong Agricultural University Key Laboratory Opening Task; Sichuan Agricultural University Science Foundation

Received date: 2004-04-10; **Accepted date:** 2005-03-05

Biography: LIAO De-Cong, Master, mainly engaged in microbial molecular. E-mail: liaodc@126.com

等,很难采用柯赫法则证实所分离的松茸菌株;另一方面,中国松茸的分布范围广、变化大^[1],寄主植物种类多^[2],松茸及其近缘种的类型也较多^[6],仅仅依据松茸子实体的形态学进行分类难度极大,因此探索适宜的培养基,可进一步研究松茸菌株特性,分子生物学技术则为松茸的系统发育和最终分类地位的确定提供了有力的技术保障^[3]。在本研究中,探讨松茸菌培养条件;用 18S rDNA PCR-RFLP 和 ITS RFLP 方法分析从雅江分离的松茸菌株的系统发育特征,并测定其代表菌的 ITS 序列,以初步明确这些菌株的分类地位。

1 材料方法

1.1 松茸菌的采集、分离

从四川省甘孜州雅江县采集松茸菌子实体,带回实验室后采用不同的培养基配方(表 1)分离松茸菌的纯培养物。制备土壤浸提液培养基时,取松茸菌窝土壤 100g 装入 1000 ml 三角瓶中,加入 500 ml 蒸馏水,108~115℃煮 60 min,用 4 层纱布过滤,滤液用于配制培养基。将培养基分别分装于 200 ml 三角瓶中灭菌备用。

取菌幕未破的松茸子实体,表面消毒后,分别以松茸子实体的孢子、菌柄和菌褶为分离材料,置于培养基上,20℃培养。获得的 10 个菌株编号为:F1,F2,F4,F7,E3,E4,E5,E6,E7,E15。

1.2 DNA 分离

各取培养好的松茸菌的纯培养菌丝体 1~2g,用液氮研磨成粉状,用 CTAB 法^[5]提取 DNA,检测后置于-20℃冰箱备用。

1.3 18S rDNA PCR-RFLP 和 ITS RFLP

以 NS1 (5'-GTA TCATATGCTTGTCTC-3') 和 NS6 (5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3'), NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') 和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTCA CCTACGGA-3') 为 18S rDNA 扩增引物,ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')为 ITS 引物^[5],分别扩增 18S rDNA 和 ITS 片段。PCR 反应体系为:Dynazyme 聚合酶缓冲液(10×) 5 μl,dNTPs (10 mmol/L) 1 μl,NS1 和 NS6(或 NS1 和 NS8、ITS5 和 ITS4)引物(50 mmol/L) 各 0.5 μl,模板 DNA 50 ng,Dynazyme 聚合酶(2 U/μl) 1 μl,用超纯水补足反应总体积 50 μl,反应程序见文献 4。各取 18S rDNA 和 ITS 扩增产物 8~10 μl 分别用 *Alu* I、*Hae* III、*Hinf* I、*Msp* I 于 37℃酶切过夜,用 3%的琼脂糖凝胶电泳分离,UV 凝胶成像系统扫描。

1.4 ITS 序列分析

用 ITS5、ITS4 为引物,扩增出松茸代表菌株 E7 的基因组 ITS 片段,用琼脂糖凝胶电泳纯化,由上海华诺公司测定 ITS 序列,用 ClustalX 和 TREECONW 软件^[6]分析序列,获得系统发育树。

2 结果分析

2.1 松茸菌株纯培养

众多研究表明,用松茸子实体不同部位分离获得纯培养物的成活率存在差异。从研究结果看,用孢子和菌柄分离很难获得松茸的纯培养物,用子实体菌褶部份能够获得纯培养。分离培养时,松茸菌丝生长很慢,约 20 d 左右开始萌发生长菌丝,60d 后菌落直径约 2~3 cm,菌落突起、草帽状,菌丝边沿呈现皱褶,表面菌丝短粗、刚直(图 1),菌丝体具有松茸香味。松茸菌落在培养基 A、C、D 上生长良好,但培养周期长,在培养基 B 上生长相对较弱。在培养基 A、C、D 的基础上,经过反复实验,获得了分离松茸的较好培养基组合:葡萄糖 20g,酵母浸膏 10g,VB₁ 1mg,VB₂ 1mg,吐温 80 0.5%。松茸菌丝在该培养基上生长较快。

2.2 18S rDNA 和 ITS PCR-RFLP

以 NS1 和 NS6、NS1 和 NS8、ITS5 和 ITS4 为引物扩增产物后,获得的 18S rDNA 片段大小分别约为 1.5kb 和 1.9kb,ITS

表 1 松茸组织分离培养基

Table 1 Medium for Isolation of *Tricholoma* sp.

成分 Content	A 改良滨田氏培养基	B	C	D
葡萄糖 Glucose(g/1000ml)	20	10	20	20
甘露醇 Mannitol(g/1000ml)		10		
酵母浸膏 Yeast Extract(g/1000ml)		10	10	
酵母粉 Yeast Extract powder(g/1000ml)	5			5
牛肉膏 Beef Extract(g/1000ml)		3		
蛋白胨 Peptone(g/1000ml)		5		
HCl (mol/L, ml)	1.6			
NaCl(g/1000ml)		0.25		
土壤浸提液 Soil Extract(ml)		200	200	200
马铃薯汁 Potato Extract(ml)			200	200
琼脂 Agar(g/1000ml)	20	20	20	20
pH	5.0~5.2	6.0	6.0	6.0



图 1 松茸菌株 E7 的菌落

Fig. 1 colony of matsuake strain E7

片段大小约为 700bp。用 4 种限制性内切酶对扩增片段酶切的结果显示,这 10 个菌株具有完全相同的酶切图谱(图 2),表明他们在系统发育上的一致性。这些结果与先前的研究结果一致^[3],可见这几个菌株在分类上应属于同一个种。

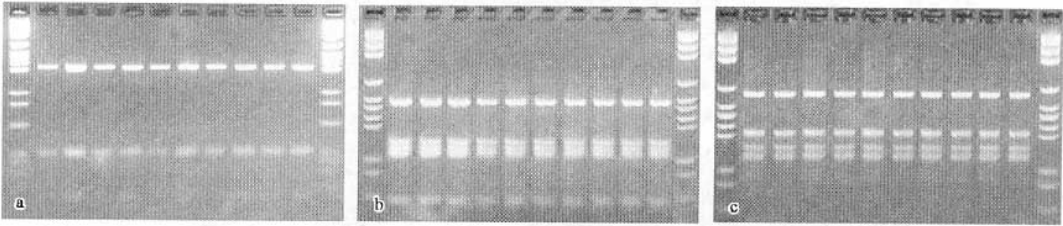


图 2 松茸菌 ITS 和 18SrDNA RFLP 图谱

Fig. 2 Fingerprints of ITS and 18S rDNA PCR-RFLP

2A ITS digested by *Alu* I; 2B, 2C 18S rDNA restricted by *Hae* III and *Msp* I, respectively; 从左至右 From left to right: 100bp gene ladder, F1, F2, F4, F7, E3, E4, E5, E6, E7, E15, 100pb gene ladder

2.3 ITS 序列分析

根据 18S rDNA 和 ITS PCR-RFLP 分析结果,以子实体长势较好的 E7 作为代表菌株,扩增其 ITS 片段并直接测定序列,获得了 ITS 全长 640bp 的序列(图 3)。从 Genebank 中获取相近种的 ITS 序列,用 ClustalX 软件进行比对(alignment)分析,再用 TREECONW 软件进行聚类(Neighborjoining)分析,得到供试菌株的系统发育树(图 4)。图 4 可见,菌株 E7 与 Park 等人从韩国分离的 *T. matsutake* KBF20T07 处于同一个系统发育分支,而且与 *T. matsutake* 的其他菌株遗传关系也很近。对 ITS 序列计算后,得到了松茸菌株与其它相近属、种 ITS 全序列差异百分比(表 2),由表 2 数据可见,分离自四川雅江的松茸菌株与 *Tricholoma matsutake* 其他种的序列差距很小(<1%),证明这些菌株在分类上属于同一个种。

```
1  AAGGATCATT  ATTGAATAAA  GCTTGGTAG  GTTGTCGCTG  GCTCTCCGGG  GCATGTGCAC
61 GCCTGACGCC  AATCTTTTCA  CCACCTGTGC  ACATTTTGTA  GGCTTGGATA  AATATGTCTC
121 GAGGAAGCTC  GGTTTGAGGA  CTGCCGTGCT  GCAAAAAGCCA  GGCTTTCCTT  GTATTTTTC
181 AGCCTATGCA  TTTTATTATA  CACTCGGTAT  GTCATGGAAT  GTTATTTGGT  TGGCTTAATT
241 GCCAGTAAAC  CTTATACAAC  TTTCAACAAC  GGATCTCTTG  GCTCTCGCAT  CGATGAAGAA
301 CGCAGCGAAA  TGCGATAAGT  AATGTGAATT  GCAGAATCA  GTGAATCATC  GAATCTTTGA
361 ACGCACCTTG  CGCTCCTTGG  TATTCCGAGG  AGCATGCCTG  TTTGAGTGTC  ATGAAATTCT
421 CAACCTTTTC  AGCTTTTGT  TGAATAGGCT  TGGATTTTGG  GAGTTGTTGC  AGGCTGCTCA
481 GAAGTCTGCT  CTCCTTAAAT  GTATTAGCGG  GGCCTTGT  GTCTAGCATT  TGGTGTGATA
541 ATTATCTACG  CCAITGTGAA  CAATGTAATA  GGTCCGGCTC  TAATCGTCTC  GTAAAGAGAC
601 AATCTCTGAC  ATTTTGACCT  CAAATCAGGT  AGGACTACCC
```

图 3 松茸菌株 E7 的 ITS 全序列

Fig. 3 ITS sequence of matsutake strain E7

表 2 供试菌株 E7 的 ITS 序列差异

Table 2 Distance of ITS sequence between strain E7 and reference strains										
编号 Code	菌株 Strains	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<i>T. matsutake</i> Y1									
2	<i>T. matsutake</i> KBF20T07	0.003								
3	<i>T. matsutake</i> UPS F-013394	0.003	0.000							
4	E7	0.003	0.000	0.000						
5	<i>T. matsutake</i> FRI91001	0.005	0.002	0.002	0.002					
6	<i>T. caligatum</i> sp.	0.005	0.002	0.002	0.002	0.003				
7	<i>T. magnivelare</i> sp.	0.006	0.003	0.003	0.003	0.005	0.005			
8	<i>T. matsutake</i> Tm33	0.003	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.003		
9	<i>T. matsutake</i> Tm. 1	0.003	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.003	0.000	
10	<i>T. matsutake</i> Tm-A-5	0.003	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.003	0.000	0.000

3 讨论

由于松茸属于外生菌根真菌,寄主专一性强,采用合成或半合成培养基即使能够分离获得松茸纯培养菌丝体,其生长速度也很慢,分离成活率也很低;即使用松茸生长区采集的松茸土壤浸提液制备分离培养基,但松茸菌丝的生长效果并不好。野外调查中发现,松茸菌能够形成大量乳白色菌丝,并不局限于某一点生长,而是环绕在宿主植物根系周围较大面积的范围内,形成“菌塘(shiro)”。可见实验室的纯培养条件并不是松茸菌丝最佳的生长条件,因此有必要继续对松茸的生境进行详细和全面的调查,并从分子水平探索松茸菌与寄主植物间的识别机制,进而优化纯培养条件,以寻找出菌丝生长的最佳培养配方。

现代微生物分类研究工作中,18S rDNA 和 ITS 序列因其保守性强,受环境因素影响较小,常常用于比较不同真菌菌株间的系统发育^[4, 7~10]。由于 18S rDNA 的保守性很强,而 ITS 位于不同的操纵子之间,在环境因素影响下,其序列比 18S rDNA 变异度大,因此 ITS 序列也常用于构建真菌的系统发育树。本实验中,首次分析了四川松茸 18S rDNA RFLP、ITS RFLP 和代表菌的 ITS 序列,供试菌株的 18S rDNA 和 ITS PCR-RFLP 酶切图谱完全相同,表明他们在系统发育上是高度一致的;而代表菌株 E7 与参比菌 *Tricholoma matsutake* KBF20T07 的 ITS 序列完全一致,在 ITS 系统发育树中位于同一个系统发育分支,说明在分类上,以 E7 为代表的四川雅江的松茸菌在分类上属于

Tricholoma matsutake。即便如此,若从已有的调查结果看,四川省松茸生长的海拔分布范围大^[1],宿主植物种类较多^[2],松茸的形态和香味也有差异^[6],仍然不能完全确定生长在四川省不同生态区内的松茸的分类地位,因此应进一步扩大采样范围,增加松茸菌株的数量,以最终确定四川省不同生态区以及不同植物共生的松茸的分类地位。

松茸菌的人工和半人工栽培研究已开展了多年。在日本,松茸的人工菌根苗已实现野外栽培,而且菌根可以存活 4 个月左右,但仍有许多问题需要进一步解决^[11]。我国的松茸人工促繁技术也已经初步开展,也取得了一些进展^[12, 13],但所用的植物是松树;四川松茸生长区,松茸的寄主植物包括松树、栎树、沿江栲树等,这些地区生态脆弱,因此,弄清松茸菌的分类,有利于探索松茸与不同宿主植物间的共生机理,进而在生态恢复区接种松茸菌根菌,实施人工促繁技术。这对于四川省松茸资源、川西高原松茸的特殊生态环境的保护、松茸资源的可持续利用,以及川西高原生态退化区的恢复与重建工作都具有积极的意义。

References:

[1] Gao M W, Dai X C. Ecology of *Tricholoma matsutake* in west plateau of Sichuan Province. *Edible Fungi of China*, 1996, **15**(6):34.

[2] Liu P G, Yuan M S, Wang X H, et al. Notes on the Resources of *Tricholoma matsutake* Group and their Reasonable Utilization as Well as Effective Conservation in China. *Journal of Natural Resources*, 1999, **14**(3): 245~252.

[3] Tan W, Zheng L Y, Peng W H, et al. Resoures distribution and sustainable exploitation and Utilization of *Tricholoma matsutake* in Sichuan Province. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2000, **13**(1): 118~121.

[4] Chen Q, Liao D C, Zhang X P, et al. Preliminary analysis of genetic characteristics of edible fungus *Tricholoma mutsutake* isolated from Yajiang, China, by AFLP technique. *Agricultural Sciences in China*, 2003, **2**(2):229~236.

[5] White T J, Bruns T D, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, 1990. 315~322.

[6] Van de Peer Y, De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.*, 1994, **10**:569~570.

[7] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. eds. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1990.

[8] Liao S Y, Leng H Q, Liu B. Study on Particular Ecology of *Tricholoma* sp. in Sichuan. *Journal of Agricultural University*, 1991, **9**(2): 297~302.

[9] Mankel A, Kost G, Kothe E. Re-evaluation of the phylogenetic relationship among species of the genus *Tricholoma*. *Microbiol. Res.*, 1999, **153**(4):377~388.

[10] Hwang S K, Kim J G. Small-subunit ribosomal DNA of an ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*; sequence, structure and phylogenetic analysis. *Mol. Cells*, 1998, **308**(3):251~8.

[11] Hwang S K, Kim J G. Secondary structural and phylogenetic implications of nuclear large subunit ribosomal RNA in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. *Curr. Microbiol.*, 2000, **40**(4):250~6.

[12] Yokoyama R, Yamada T. In vitro cultures of *Tricholoma matutake* and *Pinus densiflora*. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 1987, **28**:331~338.

[13] Gong M Q, Wang F Z, Chen Y, et al. The Artificial Cultivation of *Trichloma matutake* and its Application. *Journal of Forestry Science Exploitation*, 2000, **14**(5): 34~36.

[14] Hu S Q. Study on the Artificial Cultivation of *Trichloma matutake*. *Edible. Fungi.*, 2002, **2**:27~28.

参考文献:

[1] 高明文,代贤才. 川西高原的松茸生态. 中国食用菌,1996, **15**(6):34.

[2] 刘培贵,袁明生,王向华,等. 松茸群生物资源及其合理利用与保护. 自然资源学报,1999, **14**(3): 245~252.

[3] 谭伟,郑林用,彭卫红,等. 四川松茸资源分布及开发利用. 西南农业学报,2000, **13**(1): 118~121.

[4] 廖树云,冷怀群,刘彬. 四川松茸的特殊生态研究. 四川农业大学学报, 1991, **9**(2):297~302.

[5] 弓明钦,王凤珍,陈羽,等. 松茸人工促繁技术及其应用. 林业科技开发 2000, **14**(5): 34~36.

[6] 胡尚勤. 松茸人工栽培技术的研究. 食用菌,2002, **2**:27~28.

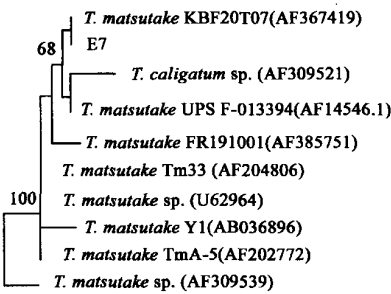


图 4 松茸菌株 E7 的 ITS 系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree constructed from ITS sequence of E7