

# 10 株镰刀菌 rDNA 内转录间隔区(ITS) 序列分析

陈玉玺, 张利平\*, 吕志堂 (河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

**摘要** [目的] 探索镰刀菌菌株间的系统发育关系。[方法] 采用氯化苄法从分离的10株镰刀菌菌株中提取基因组DNA, 对其内转录间隔区(ITS)序列进行PCR扩增和序列测定。采用Blast方法将测序结果在GenBank中进行同源搜索, 采用邻接法构建其与相关菌株的ITS序列系统发育树。[结果] 供试菌株分别位于系统发育树的3个分支上, 7株与腐皮镰刀菌为一个分支, 序列相似性为98.61%~100%。菌株F94与尖孢镰刀菌为另一个分支, 序列相似性为100%。菌株F83和F97与Fusarium incarnatum为另一个分支。各分枝内序列相似性均较高, 为97.61%~100%, 而不同分枝间菌株序列相似性较低。[结论] ITS序列系统发育分析可为镰刀菌属种的鉴定提供参考依据。

**关键词** 镰刀菌; ITS; 系统发育分析

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)12-04886-02

## Analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences in rDNA of 10 Strains of *Fusarium* spp.

CHEN Yu-xi et al (College of Life Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002)

**Abstract** [Objective] The aim of the research was to explore the phylogenetic correlations among the strains of *Fusarium* spp. [Method] The genomic DNAs was extracted from 10 isolated strains of *Fusarium* spp. by using benzyl chloride method and PCR amplification and sequencing were made on its internal transcribed spacer (ITS) sequence. The sequencing results were searched for the homology on GenBank website by using Blast method and the ITS phylogenetic tree with the related strains was constructed by neighbor-joining method. [Result] The tested strains were located in 3 clades of the phylogenetic tree. Seven strains and *Fusarium solani* were classified into one clade, with the sequence similarity of 98.61%~100%. Strain F94 and *Fusarium oxysporum* were classified into another clade, with the sequence similarity of 100%. And strains of F83, F97 and *Fusarium incarnatum* were classified into the third clade. The sequence similarity inside each clade were all higher, being 97.61%~100%. But the sequence similarity of strains among different clades were lower. [Conclusion] The phylogenetic analysis of ITS sequence could provide the important reference basis for the genus identification of *Fusarium* spp.

**Key words** *Fusarium* spp.; ITS; Phylogenetic analysis

镰刀菌属(*Fusarium*)是一类重要的真菌,分布范围广,对环境适应力强,变异迅速,其鉴定分类一直为人们所关注。它包括很多农业上的重要植物致病菌,由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum* Schwabe)引起的赤霉丝疫病(FHB)<sup>[1]</sup>是1993年以来美国中西部地区大麦的一个主要病害。镰刀菌可产生玉米赤霉烯酮、伏马菌毒素等多种真菌毒素,食用受其污染的农产品对人畜均有较强的毒害作用。此外,近年来随着广谱抗生素和免疫抑制剂的大量使用,尤其是免疫缺陷疾病的流行,人类感染镰刀菌的病例也越来越多。常见的有皮肤感染,镰刀菌角膜炎等<sup>[2]</sup>。因此,对镰刀菌快速、准确的鉴定变得尤为重要。

传统的镰刀菌鉴定技术主要以形态学特征为基础,但由于该属的种类较多,形态复杂且变异较大,有些种还需结合其宿主关系才能准确鉴定,使得菌种的鉴定具有一定的难度。近年来,探针检测技术<sup>[2]</sup>、核酸序列分析<sup>[3]</sup>、RAPD等分子生物学手段已越来越多地被用于真菌的分类鉴定。分子生物学方法的引入减少了鉴定过程中主观因素的影响,不但鉴定结果更加客观,还使种间同源性和系统发育关系研究成为可能。

笔者通过对分离的10株镰刀菌菌株核糖体RNA基因内转录间隔区(Internal transcribed spacer)进行PCR扩增,经测序分析其核酸序列差异,对菌株间的系统发育关系进行研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 菌株** 10株真菌系采自保定地区农田土壤中分离出的菌株,由河北大学河北省微生物多样性研究与应用重点实验室保藏。

## 1.2 rDNA ITS 系统发育分析

**1.2.1 菌体的收集。**将活化好的菌株接种到马铃薯液体培养基(去皮马铃薯200g、葡萄糖20g、蒸馏水1000ml),28℃、160r/min摇床培养至对数生长期,经镜检验纯后,离心收集菌体,然后用无菌去离子水洗涤2次,再用TE缓冲液洗涤1次,-20℃保存备用。

**1.2.2 基因组DNA的提取。**采用氯化苄法<sup>[4-5]</sup>。10ng菌丝体加入100μl提取液(100mmol/L Tris-HCl, pH值9.0, 25mmol/L EDTA, pH值8.0),冰上研磨,加入400μl 50℃预热的提取液,振荡混匀。加入100μl 10% SDS, 300μl 氯化苄,剧烈振荡,使呈乳状,50℃保温1h。每隔10min振荡混匀1次。300μl 3mol/L 醋酸钠(pH值5.2),冰浴15min。6000r/min、4℃离心15min,取上清液。等体积氯仿/异戊醇(24:1)轻轻颠倒混匀,9000r/min 4℃离心10min。重复抽提。取上清,加入等体积异丙醇,室温沉淀20min。10000r/min、4℃离心15min,取沉淀。70%乙醇洗涤2次,自然晾干后溶于100μl TE,置-20℃备用。

**1.2.3 PCR扩增ITS序列。**PCR扩增ITS(包括ITS1、5.8S rDNA、ITS2),序列采用通用引物<sup>[6]</sup>,正向引物ITS1为5'-TC-CGTAGGTGAACCTGCGG-3',反向引物ITS4为5'-TCCTCCGCT-TAITGATATGC-3'。

扩增程序为:94℃预变性5min,然后取出样品冰浴5min,加入Taq DNA聚合酶后,离心混匀进入循环:94℃变性1min,55℃退火1min,72℃延伸1min,进行35个循环后72℃延伸10min。PCR扩增产物送三博远志公司进行测序。

**1.2.4 系统发育树的构建。**将所测的ITS序列用Blast方式与GenBank数据库中所有已测定的真菌ITS序列进行检索,采用Clustal X 1.81软件进行多序列匹配排列<sup>[7]</sup>,系统发育树采用邻接法(Neighbor-joining)构建,应用自展法(Bootstrap)检验系统树,重复次数为1000次,进化距离使用Kimura两参数

作者简介 陈玉玺(1982-),男,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向:真菌分类学。\*通讯作者, E-mail: zhliping@mail.hbu.edu.cn。

模型进行计算。

## 2 结果与分析

共测定了10 株镰刀菌的ITS 序列。实验菌株与GenBank

中相关菌株的ITS 序列进行比较, 所构建的系统发育进化树见图1。

由图1 可知, 供试菌株分别位于发育树的3 个分支上。

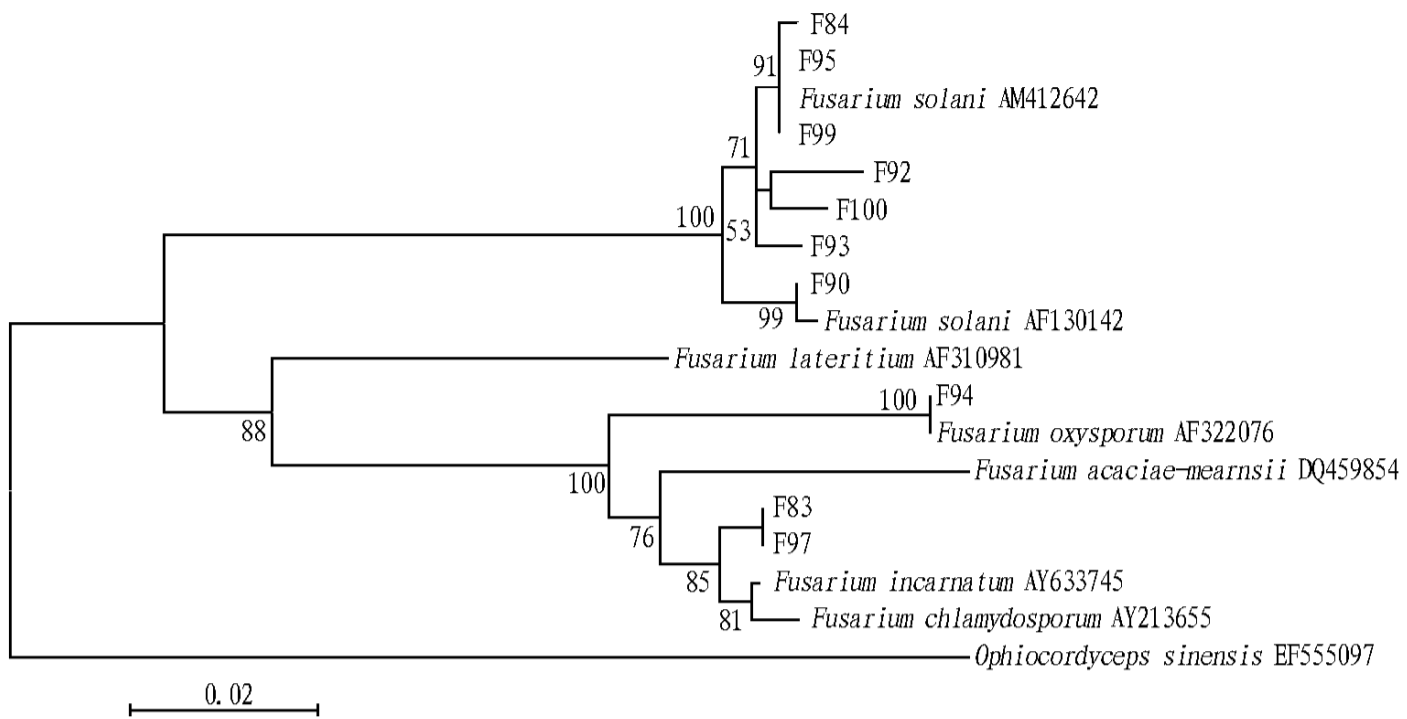


图1 根据镰刀菌rDNA ITS 序列构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on *Fusarium* rDNA ITS

菌株 F84、F90、F92、F93、F95、F99、F100 相互之间的序列同源性在97.61%~100%, 与系统发育关系最近的腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani* AM412642) 的序列相似性分别为99.80%、98.61%、98.61%、99.21%、100%、100%、99.01%, 此腐皮镰刀菌分枝各菌株间变异较大, 可能属于不同的生理小种。菌株 F94 与尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的序列相似性为100%。菌株 F83 和 F97 之间的相似性为100%, 属于同一种, 与同一大分枝上的 *Fusarium incarnatum* 序列相似性为99.21%。而不同分枝间菌株序列相似性均低于95.76%。

## 3 讨论

镰刀菌ITS 包括两个可变区ITS1 与ITS2, 且变异较快, 能提供足够的信息量和可变位点。通过对ITS 序列的系统发育分析, 可从遗传上准确地获得该属真菌菌株间的系统发育关系。对构建的系统发育树进行分析可知, 7 株镰刀菌与腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*) 位于同一发育分枝, 1 株与尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 位于同一分枝, 2 株与 *Fusarium incarnatum* 进化关系最近, 要进一步确定其分类地位还需结合形态、生理生化、生态的特征, 并进行DNA-DNA 杂交分析。

(上接第4873 页)

来去除糖的原理, 只要1 h 就可以提取到试验所需要的RNA, 不失为一种简单、有效的方法。TRIzol 试剂和Column kit 试剂盒用于其他植物材料或木薯的叶子时, 可提取到高质量、高产量的总RNA, 但用于棉花、葡萄、茶树等富含次生物质的植物材料时难以取得满意的效果<sup>[7-8]</sup>。根据已发表的序列设计1 对引物, 采用RT-PCR 技术扩增出木薯淀粉分支酶的基因片段, 说明Hart RNA Reagent kit 提取的RNA 质量可以满足试验的基本要求。

## 参考文献

[1] ROGERS D J. Studies on *Manihot esculenta* Gartz (cassava) and related species[J]. *Bill Torrey Bot*, 1963, 90:42-54.

各分枝内部相似性均较高, 为97.61%~100%, 而分枝间相似性均较低, 表明ITS 序列系统发育分析可为镰刀菌属种的鉴定提供重要的参考依据。

## 参考文献

- [1] KOLB F L, BAI G H, MEHLBAUER G J, et al. Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: Mapping and manipulation with molecular markers[J]. *Crop Science*, 2001, 41:611-619.
- [2] KERRY O'DONNELL, BRICE A J SARVER, MARY, BRANDT, et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the 2005-06 multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(7):2235-2248.
- [3] KARKOURI K E L, MURAT C, ZAMPIERI E, et al. Identification of internal transcribed spacer sequence motifs in truffles: a first step toward their DNA bar coding[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16):5320-5330.
- [4] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苜蓿提取适于分子生物学分析的真菌DNA [J]. *真菌学报*, 1994, 13(1):34-40.
- [5] 吴志红, 汪天虹. 简便易行的丝状真菌染色体DNA 提取法[J]. *菌物系统*, 2001, 20(4):575-577.
- [6] CHEN Y C, HESNER J D, KATTAR M M, et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(11):4042-4051.
- [7] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24):4876-4882.
- [2] 李宏, 王新力. 植物组织RNA 提取的难点及对策[J]. *生物技术通报*, 1999(1):36-39.
- [3] 山蓝, 王保莉, 张继澍. 从富含多糖和多酚的柿果中提取具转录活性RNA 的方法[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(5):463-466.
- [4] YONA BAGUMA, CHUANXIN SUN, STAFFAN AHLANDSBERG, et al. Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of *Cassava* (*Manihot esculenta* Gartz) [J]. *Hort Science*, 2003, 16:833-839.
- [5] 白斌, 张金文. 马铃薯块茎RNA 提取及RT-PCR 法克隆酸性转化酶基因[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(4):479-484.
- [6] FANG G, HAMMARS, GRUMET R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. *Biotechniques*, 1992, 13:52-56.
- [7] 林金科, 开国银. 茶树的提纯与鉴定[J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2003, 32(1):70-72.
- [8] 徐亚浓, 王学德, 蒋淑丽, 等. 排除棉酚等干扰提取棉纤维细胞方法的研究[J]. *棉花学报*, 2002, 14(3):143-146.