

滇产与日产松茸的 IGS1-RFLP 比较分析

沙涛¹, 钱勇², 张汉波^{1,2}, 丁骅孙², 程立忠², 赵之伟¹

(1 云南大学, 生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地, 云南 昆明 650091;

2 云南大学, 生物学系, 云南 昆明 650091)

摘要: 应用 *Cfr13 I* 限制性内切酶对采自于云南省 16 个市县的 127 个松茸子实体进行了 IGS1-RFLP 比较分析, 发现 126 个松茸子实体属于 A 类型, 来自大理白族自治州剑川县的 1 例 (TF89) 为 C 类型。通过对 A 类型的 IGS1 序列分析发现产自云南的松茸有一个 CTTT 的简单重复, 滇产松茸 IGS1 序列差异不明显。滇产松茸的 IGS1-RFLP 与日产松茸的主要类型十分相似, 两地松茸可能是同源的。

关键词: 松茸; 云南; IGS1-RFLP 酶切类型; IGS1 序列

中图分类号: Q 75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2007) 02-243-04

IGS1-RFLP Comparative Analysis of *Tricholoma matsutake* (Tricholomataceae) from Yunnan and Japan

SHA Tao¹, QIANG Yong², ZHANG Han-Bo^{1,2}, DING Hua-Sun²,
CHENG Li-Zhong², ZHAO Zhi-Wei¹

(1 Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2 Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: IGS1 genes were obtained by PCR amplification from genome DNA of *Tricholoma matsutake* fruit bodies collected from 16 counties in Yunnan. These gene fragments were digested by restriction endonuclease *Cfr13*. Two distinct IGS1 rDNA types were identified, namely A and C. Among the 127 fruit bodies investigated, 126 belong to type A while one from Jianchuan (T89) belongs to type C. Our results also showed that there are no significant heterogeneity in the IGS1 genes of these fruit bodies, except double CTTTs found in representative IGS1 gene of type A. The primary IGS1 RFLP patterns of *Tricholoma matsutake* from Yunnan are very similar to those from Japanese, implying that *Tricholoma matsutake* of these two areas are likely to be homologous.

Key words: *Tricholoma matsutake*; Yunnan; IGS1-RFLP types; IGS1 sequence

松茸 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai Sing.)] 是和植物共生的真菌 (Masui, 1972; Ogawa, 1975), 属国家二级濒危保护物种, 经济价值较高, 目前还不能实现人工栽培。云南省是中国松茸的主产地, 日本每年进口中国产松茸达 1 200 至 1 500 吨, 其中云南省产松茸达 700 至 900 吨左右, 占中国产松茸的 60% 到 70%, 全国

范围全年松茸出口金额达 5 000 万美元 (周宏, 2003)。

18S ~ 25S rDNA IGS (Intergenic Spacer) 是指位于 18S 基因和 25S 基因之间的间隔区, 是 rDNA 中基因进化速度最快的区域; 其中 IGS1 区是一个高变区, IGS2 区较 IGS1 区保守些, 它们常用于属内种间比较或种内群体比较。相对而言,

ITS (Internal Transcribed Spacers) 区域比 IGS1 区域序列变化少。因此, IGS1 常被选来做种内群体比较 (James 等, 2001)。限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 是指用限制性内切酶消化不同个体的同源 DNA 分子, 经电泳分离后表现的限制性片段长度的差异。这种差异主要来源于基因突变和 DNA 分子结构重排所引起的限制性内切酶识别位点的改变 (宋敦伦等, 2002)。限制性片段长度多态性有利用对较大样品量进行比较分析。日本食用菌学者应用 IGS1-RFLP 方法比较分析了日本和部分中国东北的松茸情况 (Guerin-Laguette 等, 2002; Matsushita 等, 2005), 本研究参照此方法来比较产自云南省的松茸与日本的松茸的差异。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 (表 1)

1.1.2 IGS1 PCR 引物 5SA-Anderson: CAGAGTCCTATG-GCCGTGGAT; CNL12: CTGAACGCCTCTAAGTCAG (Guerin-Laguette 等, 2002) 由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.1.3 RFLP (限制性内切酶) *Cfr* 13 (Asu) 由 Fermentas 公司提供, 酶切位点为:

5 ... G G N C C ... 3

3 ... C C N G G ... 5

1.2 DNA 提取方法

子实体总 DNA 的提取为 CTAB 法 (曾东方等, 2001)。

1.3 PCR 及 RFLP 反应

rDNA 的 IGS1 区域 (IGS1 位于 rDNA 25S 及 5S 的部位上) 通过 5SA CNL12 这对引物得到扩增。50 μ L PCR 反应体系包括 10 \times buffer 5 μ L, dNTP 2 μ L (25 mM), 引物 2 μ L, Taq 酶 0.25 μ L (大连宝生物工程有限公司), DNA 模板 1 μ L, 无菌去离子水补足 50 μ L, Mineral oil 覆盖。扩增程序: 94 5 min; 94 40 s, 63 1 min, 72 3 min, 35 个循环; 72 10 min。

1.4 限制性内切酶反应

10 μ L 酶切反应体系: 2 μ L PCR 产物, 1 μ L 10 \times buffer, *Cfr*13 酶 0.2 μ L, 6.8 μ L 无菌去离子水。反应时间: 37 , 2 h。

限制性内切酶产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 4 V cm 2~4 h, EB 染色观察。

1.5 测序

ITS 通用引物扩增的目的片段用 WATSON 胶回收试剂盒回收, 并纯化 DNA, 用 ABI DNA3700 分析仪测序。获得的序列用 NCBI 的 BLAST 进行序列搜索, 用 DNASTar 软件进行序列比较。从 GENBANK 获得日本松茸 IGS1-RFLP A 类型的 IGS1 序列号 AF280439。

表 1 松茸样品来源

Table 1 Samples of *Tricholoma matsutake*

采集地 Locality	凭证标本 Voucher	IGS1 酶切类型 IGS1 pattern
云南嵩明 Songming, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF4, TF6 (YUKU)	A
云南禄劝 Luquan, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF91, TF92, TF93, TF94, TF95, TF96, TF97, TF98, TF99 (YUKU)	A
云南陆良 Luliang, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF176, TF177 (YUKU)	A
云南易门 Yimen, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF140, TF143, TF144, TF145, TF146, TF147, TF173, TF174, TF175 (YUKU)	A
云南龙陵 Longlin, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF121, TF122, TF123, TF124, TF125, TF126, TF127, TF128, TF129 (YUKU)	A
云南丽江 Lijiang, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF15, TF28, TF51, TF52, TF53, TF54, TF55, TF56, TF57, TF58, TF59, TF60 (YUKU)	A
云南临沧 Lincang, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF131, TF134, TF135, TF136, TF137, TF138, TF139 (YUKU)	A
云南兰坪 Lanping, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF110, TF112, TF113, TF114, TF116, TF117, TF118, TF119, TF185, TF186 (YUKU)	A
云南中甸 Zhongdian, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF41, TF43, TF44, TF45, TF46, TF47, TF48, TF49, TF50 (YUKU)	A
云南德钦 Deqin, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF100, TF101, TF102, TF103, TF104, TF105, TF106, TF107 (YUKU)	A
云南维西 Weixi, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF29, TF31, TF32, TF33, TF34, TF35, TF36, TF37, TF38, TF39, TF40 (YUKU)	A
云南永平 Yongping, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF61, TF62, TF63, TF64, TF65, TF66, TF68, TF69, TF70 (YUKU)	A
云南剑川 Jianchuan, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF82, TF83, TF84, TF86, TF87, TF88, TF90 (YUKU)	A
云南剑川 Jianchuan, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF89 (YUKU)	C
云南南华 Nanhua, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF27, TF72, TF74, TF75, TF76, TF77, TF78, TF79, TF80 (YUKU)	A
云南禄丰 Lufeng, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF25, TF26, TF150, TF151, TF152, TF153, TF154, TF156, TF157, TF158, TF159 (YUKU)	A
云南楚雄 Chuxiong, Yunnan	丁骅孙 (H. S. Ding) TF172 (YUKU)	A
云南, 具体地点不详	丁骅孙 (H. S. Ding) TF11 (YUKU)	A
Without precise locality, Yunnan		

注: 表中 A、C 为 RFLP 酶切类型。Note: A and C represent RFLP pattern .

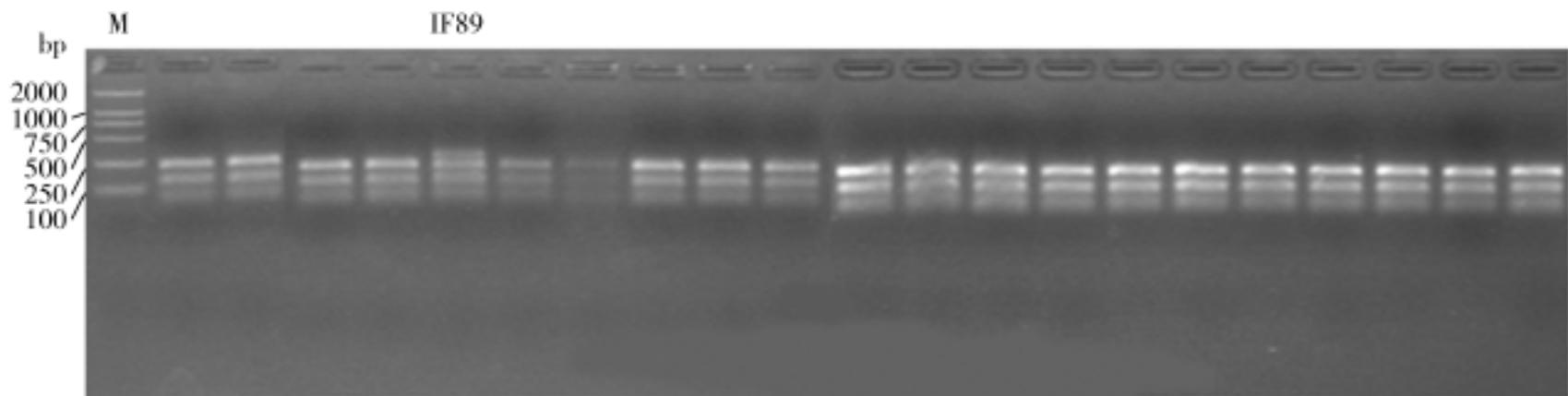


图 1 产自云南的部分松茸 IGS1-RFLP 酶切图谱

Fig . 1 Electrophoreses patterns of representative IGS1-RFLP of *T. matstake* from Yunnan

2 结果

2.1 IGS1-RFLP

对产自云南省 16 个市县的 127 个松茸子实体样品进行了 IGS1-RFLP 分析，其结果如图 1、表 1。样品 TF89 的 IGS1-RFLP 酶切图谱在 350-bp 左右处比其它样品多一条带（图 1，2），其余 126 个样品 IGS1-RFLP 酶切图谱一致。根据日本学者 Guerin-Laguette (2002) 的松茸 IGS1-RFLP 酶切图谱研究，可把产自云南省的松茸划分为 A 类型和 C 类型两种（图 2）。其中 A 类型占 99.22%。

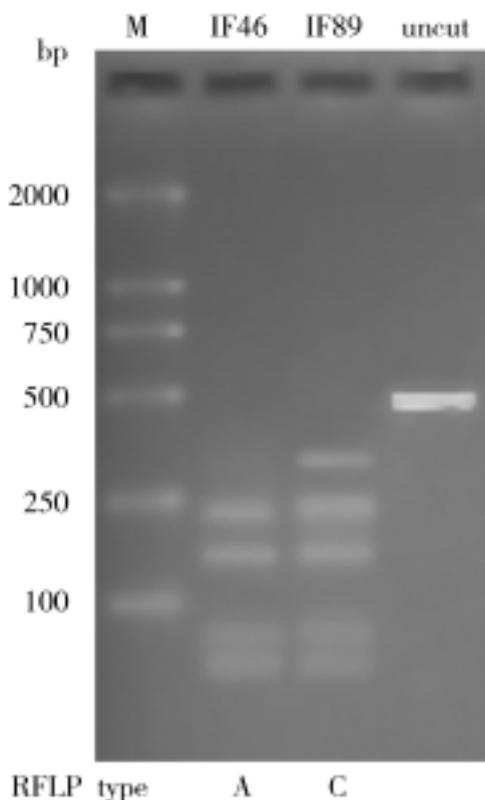


图 2 产自云南省的部分松茸 IGS1-RFLP 酶切类型

Fig . 2 Electrophoreses patterns of representative IGS1-RFLP of *T. matstake* from Yunnan

2.2 IGS 序列分析

经测序获得产自云南省的松茸 IGS1-RFLP 酶切图谱 A 类型 (TF46) 的 IGS1 序列共 459 bp,

应用 MegAlign 软件对产自云南省的松茸与日本的松茸 IGS1-RFLP 酶切图谱 A 类型的 IGS1 序列 (图 3) 进行比较，可以清楚的看出，在第 303 ~ 304 bp 中产自云南省的松茸在 IGS1 序列中有一个 CTTT 的简单重复。

```
300 C T T T - - - A T T AF280439
300 C T T T C T T T A T T TF46
```

图 3 IGS1-RFLP 酶切图谱 A 类型的 IGS1 序列片段，TF46 为产自云南省的松茸

Fig . 3 Partial IGS1 sequences of type an identified by *Cfr* 13 digestion . TF46 sample is from Yunnan

3 讨论

近年来，限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism RFLP) 的研究大大地促进了分子遗传多样性的研究。RFLP 的产生是由于点突变、DNA 的重排、插入或缺失引起的 (Goodwin 等, 1992)。利用 RFLP 来进行分类鉴定时的一个重要问题就是根据不同的分类水平 (属、种、株) 研究选择不同的 DNA 片段 (Kohn 等, 1988; Goodwin 等, 1992)。笔者对产自云南省的松茸的子实体及其培养物进行了 ITS 序列分析，发现 ITS 序列一致，松茸种内个体间无差异 (沙涛等, 2004)。

日本食用菌学者应用 IGS1-RFLP 方法比较分析了日本的松茸 (Guerin-Laguette 等, 2002) 得到了 8 种 IGS1-RFLP 酶切类型，我们对云南省 16 个市县的 127 个松茸子实体进行了 IGS1-RFLP 研究，发现只有 2 种 IGS1-RFLP 酶切类型，说明产自云南省的松茸酶切类型比较单一。酶切类型 A 占了绝对优势 (99.22%)，也是日本是主要类型。酶切类型 C 仅 1 例 (TF89)，分布于大理白

族自治州剑川县。

在对 IGS1-RFLP 酶切 A 类型的 IGS1 序列分析时, 发现虽然产自云南省的和日本的 IGS1-RFLP 酶切类型同是 A 型, 但 IGS1 序列不完全相同。说明限制性片断长度多态性在反映分子遗传多样性方面还有它的局限性。

致谢 本文得到了中国科学院昆明动物研究所张亚平院士的大力支持与指导, 实验中还得到了云南大学生物学系 2000 级生物学基地班李觅同学的协助。

〔参 考 文 献〕

- 周宏, 2003, 云南省松茸来日“观光”华人进口商与厂家大搞安全宣传. 中文导报, 9月1日
- Guerin-Laguette A, Matsushita N, Kikuchi K *et al*. 2002, Identification of a prevalent *Tricholoma matsutake* ribotype in Japan by rDNA IGS1 spacer characterization [J]. *Mycol Res*, 106 (4): 435—443
- Goodwin SB, Drenth A, Fry WE, 1992. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *phytophthora infestans* [J]. *Curr Genet*, 22 (2): 107—115
- James TY, Moncalvo JM, Li S *et al*. 2001. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune* [J]. *Genetics*, 157: 149—161
- Kohn LM, Petsche DM, Baley SR *et al*. 1988. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species [J]. *Phytopathology*, 78: 1047—1051
- Masui K, 1972. A study of the ectotrophic mycorrhizas of woody plants. Memoirs of the College of Science [J]. *Kyoto Imperial University*, B3: 149—279
- Matsushita N, Kikuchi K, Sasaki Y *et al*. 2005. Genetic relationship of *Tricholoma matsutake* and *T. nauseosum* from the Northern Hemisphere based on analyses of ribosomal DNA spacer regions [J]. *Mycoscience*, 46: 90—96
- Ogawa M, 1975. Microbial ecology of mycorrhizal fungus-*Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. In pine forest. Mycorrhiza formed by *T. matsutake* [J]. *Bull Govern Forest Exp Station*, 278: 21—49
- Sha T (沙涛), Ding HS (丁骅孙), Zhang HB (张汉波), 2004. Identification of Isolates from fruit bodies of *Tricholoma matsutake* by Specific ITS Primer [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 26 (5): 524—528
- Song DL (宋敦伦), Zhang J (张军), Chen JX (陈建新), 2002. DNA molecular markers and their application in *Cordyceps sinensis* research [J]. *Acta Edulis Fungi* (食用菌学报), 9 (3): 52—56
- Zeng DF (曾东方), Luo XC (罗信昌), Fu WJ (傅伟杰), 2001. Studies on the isolation, culture and DNA identification of mycelia of *Tricholoma matsutake* [J]. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 41 (3): 278—284