

植物病害研究与防治

中国植物病理学会第六届代表大会暨学术年会论文选编

主 编 刘 仪

副主编 尧庆基 李明远 黄大昉 章一华

中国农业科技出版社

1998

rDNA 中 ITS 区序列在根霉属小孢根霉组分类上的应用

黄河 刘小勇 郑儒永

(中国科学院微生物研究所真菌地衣系统学开放研究实验室, 北京 100080)

摘要 在形态分类的基础上, 对小孢根霉组的 13 株菌, 匍枝根霉组的 2 株菌, 和少根根霉组的 1 株菌的核糖体 DNA 转录区进行了序列测定。小孢根霉组内一致性很好, 与另外两组差异较大, 表明 ITS 区序列可以作为根霉属分组的依据。同组内种间差异明显, 可以作为分种的依据。变种内株间的一致性虽然很好, 变种间则差异不明显, 不宜作为划分变种的依据。

关键词 根霉属 序列分析 形态分类

1 引言

根霉 (*Rhizopus*) 属真菌在工农医各个方面都与人类密切相关。它首先是工业上的重要发酵用菌, 特别是在食品工业上, 如我国的茅台酒、印尼的“甜胚 (tempeh)”等即是用根霉发酵制成的。农业方面, 根霉常可引致果实、蔬菜贮藏运输中的腐烂, 条件合适时又是某些作物的弱寄生菌。此外, 根霉还是人、畜的重要病原菌。根霉虽然很重要, 但在分类上却很混乱。目前全世界已报道的根霉名称在 80 个以上, 但各有关研究者所承认的种数有很大的不同, 最多的承认 28 种 (Naumov, 1939), 最少的仅承认 5 种 (Schipper & Stalpers, 1984)。在 Schipper & Stalpers, (1984) 的分类中, 首先将根霉属分为 2 个组和 1 个种, 即匍枝根霉组, 米根霉, 以及小孢根霉组, 作者也初步对根霉属进行分组研究, 但将其分为 3 个组, 除上述 2 个组外, 还增加少孢根霉组, Schipper & Stalpers, (1984) 承认的 5 个种中, 有 2 个种属于小孢根霉组, 其中一个种由原变种在内的 4 个变种所组成。以后, 属于这个组的还有人描述了另外 2 个新种, 本文的第 3 作者也发现了我国的 1 个新变种, 并对上述所有种和变种的模式或菌种进行了形态学分类研究。为了验证形态分类的可靠性以及确定分类等级的合理性, 我们选用有关的代表性菌株进行 DNA 序列测定和分析, 其结果表明, 分子系统学与形态分类学之间存在着很好的一致性, 现介绍如下。

2 材料与方法

2.1 菌种

在形态分类的基础上, 选取根霉属 3 个组 12 个种和变种的 16 株菌进行序列测定。这些菌代表匍枝根霉组的 2 株, 少根根霉组 1 株, 小孢根霉组的 13 株, 包括了这些种类目前所有有下落的模式菌株, 其余的为分离自我国的菌种 (详见表 1)。

全部菌种保存在 PDA 斜面上。用活化 1 周龄的斜面菌种, 挑取菌丝置于天门冬酰胺-葡萄糖-无机盐培养液 (Huang & Yu, 1988) 中按所需温度摇床培养 3~4 天, 真空抽滤收集菌体, 经蒸馏水洗 3 次, 70% 乙醇洗 1 次后, 冻干或吸干后 -20℃ 备用。

2.2 DNA 的提取

称取 0.3~0.6g 菌体在液 N₂ 下研磨, 用 CTAB 法 (Rogers et al., 1989) 提取 DNA。

2.3 ITS 段的 PCR 扩增

为得到能反映种间和种下单位有一定差异的序列, 我们采用了 White 等 (1990) 设计的 ITS1

和 ITS4 通用引物, 经 PCR 扩增以得到 rDNA 的 ITS 段, PCR 的反应系在 0.5ml Eppendorf 管中
加入 50 μ l 反应液, 其中含 10 $\times$ Buffer 5 μ l, dTTP、dATP、dGTP 和 dCTP 各 100 μ m, MgCl₂ 1.5m
mol/L, ITS1 与 ITS4 各 0.5 μ M, 模板 DNA 约为 10ng (经摸索浓度后确定), Taq DNA polymer-
ase 2.0unit. 反映条件为 94 $^{\circ}$ C 1 分钟后经 93 $^{\circ}$ C 1 分钟, 52 $^{\circ}$ C 50 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C
3 分钟结束。经电泳检测后用 Promega Wizard™ PCR DNA 纯化系统纯化后备用。

表 1 用于测定 ITS 区序列的根霉属菌株

菌 名	菌 号
小孢根霉组	
<i>R. zygosporus</i>	CBS 357.93T
<i>R. caespitosus</i>	CBS 427.87T
<i>R. homothallicus</i>	CBS 336.62T
<i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	CBS 699.68
<i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	R39
<i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	CBS 631.82 T
<i>R. microsporus</i> var. <i>chinesis</i>	R 36
<i>R. microsporus</i> var. <i>chinesis</i>	CBS 337.62
<i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	R47
<i>R. microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	CBS 343.29
<i>R. microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	R49
<i>R. microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	3.1161
<i>R. microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	3.1145T
<i>R. microsporus</i> var. <i>tuberosus</i>	
少根根霉组	JCM 5579
" <i>R. arrhizus</i> "	
匍枝根霉组	JCM 5589
<i>R. stoloniifer</i> var. <i>lyococcus</i>	R11
<i>R. stoloniifer</i> var. <i>lyococcus</i>	

表 2 16 株根霉的 ITS 区序列经 PHYLIP 软件包 DNADIS 程序所得距离矩阵图

菌 号	3.114	3.1161	R49	343.29	631.82	R36	337.62	R47	R39	699.68	627.87	336.62	357.93	5589	R11
3.1145															
3.1161	0.0000														
R49	0.0016	0.0016													
343.29	0.0016	0.0016	0.0032												
631.82	0.0016	0.0016	0.0032	0.0032											
R36	0.0248	0.0248	0.0266	0.0266	0.0264										
337.62	0.0149	0.0149	0.0149	0.0166	0.0166	0.0219									
R47	0.0098	0.0098	0.0114	0.0114	0.0115	0.0216	0.0049								
R39	0.0295	0.0295	0.0313	0.0313	0.0313	0.0369	0.192	0.0207							
699.68	0.0251	0.0251	0.0268	0.0268	0.0268	0.0099	0.0185	0.0183	0.0352						
357.93	0.0165	0.0165	0.0182	0.0182	0.0182	0.0268	0.0100	0.0132	0.0261	0.0268					
427.87	0.2922	0.2922	0.2913	0.2913	0.2942	0.2885	0.2925	0.2846	0.3167	0.2835	0.2832				
336.62	0.3395	0.3395	0.3423	0.3367	0.3431	0.3533	0.3437	0.3428	0.3965	0.3562	0.345	0.3025			
5589	0.7982	0.7982	0.8067	0.8113	0.8070	0.8162	0.7690	0.7934	0.8416	0.8062	0.8013	0.8204	0.8612		
R11	0.7982	0.7982	0.8067	0.8113	0.8070	0.8209	0.7690	0.7934	0.8416	0.8062	0.8013	0.8204	0.8746	0.0112	
5579	0.5076	0.5076	0.5076	0.5113	0.5091	0.5011	0.5113	0.5076	0.5525	0.5092	0.5075	0.4253	0.5453	0.9894	0.9959

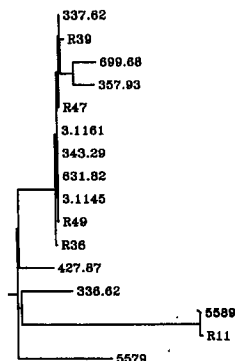


图1 16株根霉的ITS区序列的距离用PHYLIP软件包所作Neighbor-joining系统树

2.4 目的片段的克隆

先后采用了平头连接和T/A克隆两种方法。

2.4.1 平头连接 先将纯化的PCR产物用DNA polymerase I (L.F.)补平。用碱裂解法制备pBlue-script II SK+质粒，经SmaI酶切开后，与补平的PCR产物在高浓度T4 ligase作用下闭环成重组质粒 (Sambrook et al., 1989)。

2.4.2 T/A克隆法 由于PCR产物的3'端常突出接上A碱基，可以不用Klenow补平而改将制备的pBluescript II SK+质粒，经EcoRV酶切开后，经Taq DNA polymerase和dTTP存在下制成T-质粒。再与纯化的PCR产物在较低浓度T4 ligase作用下闭环形成重组子 (Marchuk et al., 1990)。

将上述方法得到的连接液转化到新鲜制备的TG1感受态细胞，转化液涂在含Amp并涂有X-gal和IPTG的LB平皿上选择白斑，再用碱裂解法制备重组质粒，经PvuII酶切证明含有插入子后用原平Purigen Kit玻片纯化，溶于双蒸水中供测序用。

2.5 ITS区DNA序列的测定

纯化后的重组质粒以 $[a^{35}S]$ dATP为标记物用Pharmacia的T7 Sequencing™ Kit按双脱氧末端终止法进行反应步骤按厂方提供程序进行。反应物电泳后，聚丙烯酰胺胶用干胶机在80℃下减压干燥后放射性自显影得到的X-光片直接目读出序列。

2.6 结果的分析

对所读序列用PHYLIP软件包进行距离矩阵和系统树的建立。采用Neighbor-joining, Parsimony, 和Maximum Likelihood比较，距离用Kimura双参数公式，不计算缺失与插入 (Swofford & Olsen, 1990)。

3 结果与讨论

3.1 根霉属小孢根霉组 ITS 区序列的比较

已获得所试 16 株菌的 ITS 区全序列, 约为 680 个碱基, 经比较发现虽为变异区, 各种株间差别很小, 有的完全无差别, 如用 PHYLIP 软件 DNADIS¹ 程序排列得出矩阵图 (见表 2), 可以明显看到小孢根霉种内和变种内各株距离非常之小, 在 0.0000 至 0.0352 之间, 如 *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* 的 2 株菌 CBS631.82 和 R36 为 0.0246; *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* 的 2 株菌, CBS343.29 与 R49 为 0.0032; *R. microsporus* var. *oligosporus* 的 2 株菌, CBS337.62 与 R47 仅为 0.0049; *R. microsporus* var. *microsporus* 2 株菌 CBS699.68 和 R39 距离稍大, 也只有 0.0352, 而且变种与变种间的距离也在这个范围之内, 明显地可将诸变种聚在 *R. microsporus* 种之下。组内各种间变异度则明显大于变种内, 如 *R. homothallicus* CBS336.62 和 *R. caespitosus* CBS427.87 和 *R. microsporus* 10 株菌的距离在 0.2758 到 0.4081 之间。因此, 可以将这两个种划分在 *R. microsporus* 之外。

3.2 根霉属 3 个组 ITS 区序列的比较

由于我们重点在解决小孢根霉组内各个种的归属, 其他两组暂时只各选 1~2 株菌进行测序。即使这样, 仍可看到少根根霉组的 *R. arrhizus* 1 株菌, JCM5579, 以及匍枝根霉组的 *R. stolonifer* var. *lyococcus* 2 株菌, JCM5589 和 R11 与小孢根霉组各株之间的距离也非常之大, 其距离分别达到 0.4253~0.5453 和 0.7842~0.8746, 这两组之间的距离也相互达到 0.9897~0.9959, 说明 ITS 区的序列可明显把这 3 个组区分开来, 而 *R. stolonifer* var. *lyococcus* 两株菌之间则很一致, 距离仅为 0.0112, 与小孢根霉组 *R. microsporus* 种内各株间的距离相吻合。用距离作 UPGMA 的 Neighbor-joining 树 (图 1) 即可将此 3 组分开, 而小孢根霉组的变种聚在一起, 种间则相互分开。用 Parsimony 和 Maximum Likelihood 程序处理也得到了相似的结果。

3.3 根霉属 ITS 区序列分析与形态分类的一致性

小孢根霉组内的 *R. microsporus* 种下各变种 var. *chinensis*, var. *oligosporus* var. *rhizopodiformis* 是 Schipper & Stalpers (1984) 将 *R. chinensis*, *R. oligosporus*, *R. rhizopodiformis* 各个种相应降级而成的新组合变种, 其他的根霉分类工作者几乎没有人采用她们的这一处理而仍然维持在种的等级上。本文第 3 作者根据形态学的研究结果, 同意将这些种降为 *R. microsporus* 种下的变种。ITS 区序列分析结果支持这种分类处理。

我国台湾作者 Yuan & Jong (1984) 发表的新种 *R. azygosporus* 经过本文第 3 作者对其形态进行研究后, 认为可与 *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* 合成同一变种或至多成为 *R. microsporus* 的另外一个变种, 即 *R. microsporus* var. *azygosporus*。序列分析结果与形态分类一致。

3.4 根霉属 ITS 区序列分析尚未能解决的问题

ITS 区本应表现出较大的变异度, 但 *R. microsporus* 的各个变种间却表现出惊人的一致, 因而失去了划分种下等级的作用。这些变种从形态上不难区分, 而从序列分析上则无法区分, 还有待于用其他手段或新的目的片段加以比较。