

中国几种剧毒鹅膏菌的 ITS 序列分析

戴为田, 张 平

(湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

摘 要: 测定了来自中国不同地区的 9 个剧毒鹅膏菌的核糖体内转录间隔区 (ITS) 核苷酸序列。以湖南鹅膏为外类群, 用 ITS 序列构建了系统进化树。结果表明: 两个不同产地的欧氏鹅膏存在一定的差异, 但仍可聚为同一组; 欧氏鹅膏与其它几种剧毒鹅膏的亲缘关系较远; 两个根据形态特征鉴定为灰花纹鹅膏的标本可能是两个不同的种; 欧氏鹅膏、致命鹅膏和黄盖鹅膏白色变种这 3 个产生白色子实体的种系统演化上不是同源的。

关键词: ITS 序列; 鹅膏菌; 系统树

中图分类号: Q949. 32

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S1-0110-04

ITS Sequence Analysis of Several Lethal *Amanita* Species in China

DAI Wei-tian, ZHANG Ping

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: ITS regions of nuclear ribosomal DNA of 9 lethal *Amanita* specimens collected from different localities of China were sequenced and analyzed. A phylogenetic tree of these specimens was built using *A. hunanensis* as out group. Two specimens of *A. oberwinklerana* from different regions were closely related even though there are some modifications between them. Phylogenetic relationship of *A. oberwinklerana* and other lethal *Amanita* species is relatively far. Two specimens, identified as *A. fuliginea* based on morphological studies can't be treated as one species. *Amanita* species producing white fruitbodies are not monophyletic.

Key words: ITS sequence; *Amanita*; phylogenetic tree

(Life Science Research, 2006, 10(3)S1: 110 ~ 113)

鹅膏菌属 (*Amanita*) 隶属于真菌界、担子菌门、担子菌纲、蘑菇目、鹅膏菌科。全世界已报道的大约有 500 种。鹅膏菌属中, 有些是著名的食用菌, 但是必须引起重视的是, 鹅膏菌科中有些种类是剧毒的。每年世界各地都有人因误食毒菌而死亡, 其中大多数是因误食有毒鹅膏菌引起的。在我国常见的剧毒鹅膏菌有致命鹅膏 *A. exitialis* Zhu L. Yang & T. H. Li、灰花纹鹅膏 *A. fuliginea*

Hongo、欧氏鹅膏 *A. oberwinklerana* Zhu L. Yang & Yoshim. Doi、黄盖鹅膏 *A. subjunquillea* S. Imai 及其白色变种 *A. subjunquillea* var. *alba* Zhu L. Yang。这几个种都属于鹅膏菌中的 *Phalloideae* 这个 Section^[1]。

传统的真菌分类主要是根据子实体宏观或微观的形态结构特征, 但表型特征受环境影响较大, 这就使得在不同环境条件下生长的同一种真菌经

收稿日期: 2006-06-12; 修回日期: 2006-07-06

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(05JJ40052)

作者简介: 戴为田(1982-), 男, 湖南宁乡人, 湖南师范大学生命科学学院学生, Tel: 0731-8872558, E-mail: daiweitian@163.com; 张平(1970-), 男, 湖南常德人, 湖南师范大学副教授, 博士, 主要从事真菌学研究。

常表现出较大的形态差异,给分类和鉴定带来困难.与此相反,以 DNA 核苷酸序列为基础的基因型则相对稳定,因而以 DNA 分子序列进行物种鉴别,其结果更加准确可靠.真核生物 rRNA(核糖体 RNA)的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS),是18S-26S 核糖体 DNA(nrDNA)转录单位的一个部分,它包括3个部分:5.8S 亚基(在进化上高度保守的一段序列)、ITS1和 ITS2两个间隔区.ITS 序列很短(不到700 bp),能够直接用 PCR 扩增,具有高度重复性,在长度上高度保守性和在科、属、种水平上的高度特异性,因此已经被广泛应用作一种分子标记,进行系统发育研究和物种鉴定.

本研究以采自中国各地的9个鹅膏菌标本为研究对象,包括不同产地的同名鹅膏菌、同一产地的不同菌株,用 ITS 序列作为分子标记,通过比较分析 ITS 序列,从分子水平深入探讨这几个剧毒鹅膏菌的系统演化关系.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品

供试的9个剧毒鹅膏菌标本均由作者从野外采集,根据形态和显微特征进行鉴定.供试材料的拉丁文学名、产地来源、标本采集号如表1所示.

表1 供试材料
Table 1 List of samples

学名(Scientific name)	中文名(Chinese name)	产地(Locality)	标本号(Voucher)
<i>A. exitialis</i>	致命鹅膏	广州市	ZP-278
<i>A. fuliginea</i> Hongo	灰花纹鹅膏	湖南莽山	ZP-459b
<i>A. fuliginea</i> Hongo	灰花纹鹅膏	湖南长沙	ZP-150
<i>A. obverwinklerana</i>	欧氏鹅膏	湖南张家界	ZP-326
<i>A. obverwinklerana</i>	欧氏鹅膏	湖南莽山	ZP-477
<i>A. subjunquillea</i>	黄盖鹅膏	湖南张家界	ZP-327
<i>A. subjunquillea</i> var. <i>alba</i>	黄盖鹅膏白色变种	吉林长白山	ZP-214
<i>A. subjunquillea</i> var. <i>alba</i>	黄盖鹅膏白色变种	湖南张家界	ZP-338
<i>A. subjunquillea</i> var. <i>alba</i>	黄盖鹅膏白色变种	湖南莽山	ZP-487b
<i>A. hunanensis</i>	湖南鹅膏(外类群)	湖南莽山	ZP-510

1.1.2 引物

PCR 扩增采用 ITS4, ITS5 双引物^[2]. ITS4 的序列为 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3', ITS5 的序列为 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'.

1.1.3 质粒及感受态细胞

转化载体采用 Takara 公司的 PMD18-T Vector 质粒,感受态大肠杆菌为实验室自制.

1.1.4 试剂盒

DNA 回收和质粒提取采用安比奥生物技术公司试剂盒 Purprep Gel Extraction Kit 和 Puprep Plasmid Miniprep Kit.

1.2 方法

1.2.1 样品总 DNA 提取

DNA 提取采用 CTAB 法,样品采用硅胶干燥的子实体,提取步骤参考 Zolan 等^[3].

1.2.2 PCR 扩增 ITS 序列

扩增反应体系(50 μ L 系统): 10 \times PCR buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, ITS4 2 μ L, ITS5 2 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.5

μ L, 模板 1 μ L, 加双蒸水至 50 μ L. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 循环 34 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

1.2.3 PCR 产物克隆

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,切下含目的 DNA 的胶条,采用安比奥生物技术公司的试剂盒回收其中的 DNA,回收步骤按试剂盒操作指南.回收后 DNA 的连接到 PMD18-T 质粒上,再转化到大肠杆菌感受态细胞,阳性克隆用液体 LB 培养基培养.

1.2.4 测序

将具有插入片段质粒的阳性克隆菌株送上海英骏生物技术公司测序,测序仪采用 ABI3730.

1.2.5 数据分析

所得序列采用 DNAMAN 软件进行排序,然后构建系统进化树.

2 结果与分析

2.1 ITS 序列扩增及测序结果

以 ITS4 和 ITS5 为引物,从 9 个样品的基因

组 DNA 中分别扩增到一条 600 ~ 700 bp 的片段, 经克隆测序, 得到这 9 个样品的 ITS 序列。

2.2 系统进化树构建结果

以湖南鹅膏的 ITS 序列为外类群, 把以上 9 个 ITS 序列载入 DNAMAN 软件分析, 得到系统树如图 1。

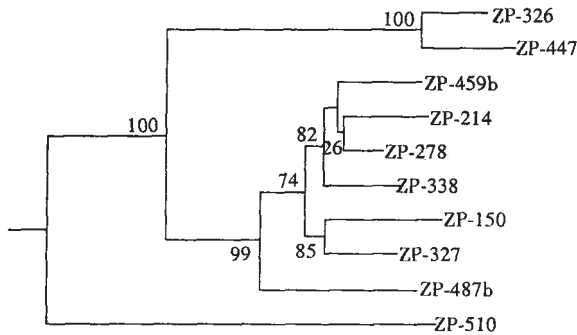


图 1 基于 ITS 序列分析构建的鹅膏菌 9 个材料的系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 9 specimens based on ITS sequence data

3 讨论

3.1 9 个样品总体分析

DNAMAN 软件分析显示, 9 个样品的总体相似性 (Identity) 为 70.51%, 在系统树中, 相对于外种群湖南鹅膏来说, 以 100% 的内部支持率 (bootstrapping) 分在同一分支。这说明, 从遗传进化角度来看, 这 9 个样品均可分入同一分类阶元, 这个结果与形态学分类上把这 9 个样都分在同一个组 (section) 的结果一致^[1]。另外, 总体上看, 相对于湖南鹅膏外类群来看, 9 个样品中有 7 个以 99% 的内部支持率分在同一分支, 只有另外两个样品以 100% 的内部支持率分在同一分支, 这两个样品就是来自张家界和莽山的欧氏鹅膏。据毒素分析的研究表明, 欧氏相对本研究中其它鹅膏菌来说, 毒性较低^[4], 实际可以不划入“剧毒”行列。而另外 7 个样品, 才算真正的“剧毒鹅膏菌”。从这里看出, 毒性大小与遗传进化的系统位置似乎也有着必然的联系。至于欧氏鹅膏是否应该被排除在 *Phalloideae* 这个 Section 之外, 由于本文还缺少其它几个 Section 的数据, 目前还不能下结论。

3.2 张家界和莽山的欧氏鹅膏比较分析

从 ITS 序列分析结果看, ZP-326 和 ZP-477 这两个分别采自湖南张家界和莽山的欧氏鹅膏以 100% 的内部支持率分在同一分支, 可以认为, 这

两个地方的欧氏鹅膏为同一个种。但二者 Identity = 78.35, 可见欧氏鹅膏种内遗传变异较大。

3.3 莽山和长沙的灰花纹鹅膏比较分析

ZP-150 和 ZP-459b 这两个标本分别是采自湖南长沙和湖南莽山, 根据形态和显微特征将二者都鉴定为灰花纹鹅膏, 二者形态基本一样, 只是后者的子实体较大一些。但 ITS 序列分析的结果与传统分类的结果却有差别, 二者的序列相似性仅为 65.81%, 聚类分析的结果也无法将二者聚在同一分支, 二者之间的差异已经大于种间差异。这种差异是由于同一物种分布于不同的生态环境后, 经过长期进化产生的遗传差异, 还是这两个标本本来就是不同的物种, 尚需要更多标本和其它方面的证据来证实。

3.4 3 个产地的黄盖鹅膏白色变种的比较分析

本研究中有采自东北、张家界和莽山 3 个产地的黄盖鹅膏白色变种, 分别是 ZP-214、ZP-338 和 ZP-487b。从 DNAMAN 分析的结果看, 三者总体相似性为 73.10%, 但是分开来看, 东北黄盖鹅膏白色变种与张家界黄盖鹅膏白色变种的相似性为 72.91%, 具有较高的一致性; 但是东北、张家界黄盖鹅膏白色变种与莽山黄盖鹅膏白色变种的相似性分别只有 66.15% 和 66.85%, 一致性相对较低。从系统树看, 也没将莽山黄盖鹅膏白色变种与前两者分在同一支。因此, 莽山黄盖鹅膏白色变种相对于东北黄盖鹅膏白色变种与张家界黄盖鹅膏白色变种已经产生了比较大的遗传变异。系统树并不支持把三者放入同一种名称下。三者是不是同一个种, 有待进一步的考察和鉴定。

3.5 广州的致命鹅膏与其它品种的关系

广州致命鹅膏与本组实验中其它单个样品的一致性都比较低; 在系统树中, 与最邻近的东北黄盖鹅膏白色变种分在同一小支, 但内部支持率仅为 26%; 在系统树中, 相对于外种群湖南鹅膏来看, 又以 99% 的内部支持率与其它几个剧毒品种分在同一分支。因此, 从遗传角度来分析, 致命鹅膏是 *Phalloideae* 这个 Section 中一个独立的种。

3.6 关于 ITS 序列在分子系统学研究中应用的讨论

由于 ITS 序列具有高度重复性, 在长度上高度保守性和在科、属、种水平上的高度特异性, 因此已经被广泛应用作一种分子标记, 进行系统发育研究和物种鉴定。但是, 在不同的生物类群中, ITS 序列所含信息的价值是不一样的。因为不同

类群的起源及进化(变异分化)的概率是不一样的. 本研究中,不同产地的灰花纹鹅膏 ITS 序列有比较大的差异,不同产地的黄盖鹅膏白色变种的 ITS 序列的差异更大,也支持这种说法.但是这些在形态学上定义为异域分布的同一物种是不是在遗传上也是同一物种,还有待进一步研究.我们认为,在鹅膏菌属中,单靠 ITS 序列提供的遗传信息,不足以鉴定亲缘关系很近的种和亚种水平的分类阶元.在鉴定种以内的分类阶元时,可综合应用其它分子标记和采用分辨率更高的手段.如基因间区序列(IGS),微卫星 DNA(SSR)指纹谱技术等.

参考文献(References):

- [1] 杨祝良. 中国真菌志, 第 27 卷, 鹅膏菌科[M]. 北京: 科学出版社 (YANG Zhu-liang. Flora Fungorum Sinicorum Vol. 27 Amanitaceae[M]. Beijing: Science Press), 2005. 1-258.
- [2] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, *et al.* PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 1990. 315-322.
- [3] ZOLAN M E, PUKKILA P J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*[J]. Mol Cell Biol, 1986, 6: 195-200.
- [4] 胡劲松, 陈作红, 张志光, 等. 我国鹅膏菌新发现种 -- 致命鹅膏的肽类毒素分析[J]. 微生物学报 (HU Jin-song, CHEN Zuo-hong, ZHANG Zhi-guang. Analysis of the main amatoxins and phallotoxins in amanita exitialis—a new species in China [J]. Acta Microbiologica Sinica), 2003, 43(5): 642-645.
- [5] 李娟, 曹月香. 美国的花卉产业 [J]. 河南科技, 1995, 36(9): 81-83.
- [6] 张振沫. 浅谈花卉市场[J]. 新农业, 1998, 6(5): 41-43.
- [7] 王意成. 观叶植物[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1998.
- [8] 郭忠怀. 世界珍奇花卉 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000.
- [9] CHEN Li-e, YU Shi-xian, MIAO Ru-huai. Rare and endangered flower and their distribution in Guangdong[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botang, 1997, 5(4): 1-7.
- [10] HURST C, DOBERSKI J. Wild flower seed predation by pterostichus madidus(carabidae: coleoptera) [J]. Annals of Applied Biology, 2003, 142(2): 251-254.
- [11] 王树栋, 刘建斌. 北京山区野生花卉资源及其主要应用类型[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(3): 191-193.
- [12] ARTHUR H. Wild flowers at wakeburst[J]. Curtis 's Botanical Magezine, 2004, 21: 88-90.
- [13] 宁伟. 我国野菜资源的利用开发及其可持续发展[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 2(1): 48-50.
- [14] EWANCHUK J, BERTNESS M D. Recovery of a northern new england lowers community[J]. Oecologia, 2003, 136: 616-626.
- [15] 陈俊愉, 刘师汉. 园林花卉 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [16] 克里斯托弗·布里布尔, 杨秋生, 李振宇, 等. 世界园林植物与花卉百科全书 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2004.
- [17] MAX F, JAHAN N, SMITH P. Emerging Animal and Plant Industries [M]. Bogota: RIRDC Press, 2005.
- [18] Improvement and Development Agency. Facilitating the Development of the Rural Economy [M]. London: KLM Press, 2004.
- [19] CHEN Wei-hui. Poisonous plant resources in the eastern of Guangdong and in Guangdong[J]. Journal of Hanshan Teachers College, 1992, 13(3): 82-86.

(上接第 109 页)不仅要为顾客提供各具特色的花卉品种,还要丰富花卉销售配套产品(如花盆、花肥、花卉护养书籍、花卉栽培工具等),使花卉销售成为人们集休闲、购物和欣赏为一体的花卉消费活动,让花的美丽不断为人类的文明服务.

参考文献(References):