

基于 rDNA ITS 序列探讨中国栽培灵芝菌株的亲缘关系

苏春丽^{1,2}, 唐传红¹, 张劲松^{1*}, 陈明杰¹, 潘迎捷³

(¹ 上海农业科学院食用菌研究所 上海市农业遗传育种重点实验室 上海 201106)

(² 南京农业大学生命科学院微生物学系 南京 210095)

(³ 上海水产大学食品科学学院 上海 200090)

摘 要 利用 ITS 序列分析技术对中国栽培灵芝菌株进行了亲缘关系分析。结果发现中国栽培灵芝菌株分布于 5 个聚类组,其中树舌亚属、紫芝组的菌株各自聚成一组,灵芝组的菌株分成 3 组,85.7% 灵芝组菌株均聚于同一组,表明树舌亚属、紫芝组和灵芝组间的遗传差异较大,灵芝组内虽然存在着一定的遗传差异,但总体上亲缘关系比较近,遗传多样性并不丰富。聚类结果也表明仅仅根据形态学特征并不能将灵芝属菌株进行有效的分类,利用分子生物学的手段对灵芝菌种进行分类是一种更有效的方法。

关键词: 栽培灵芝, ITS, 亲缘关系

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0011-06

灵芝是中医药学宝库中的珍品,在我国已有悠久的历史。灵芝属(*Ganoderma*)是由芬兰学者 P. Karsten 于 1881 年所建立,并以灵芝 *G. lucidum* (W. Cur. Fr.) Karst. 作为本属的代表种^[1]。随着对灵芝的生物学功效的不断了解,以其为原料开发的产品越来越多,销售量也越来越大,灵芝原料的质量越来越受到重视。近年来,随着灵芝各种产品的商品化,大大推动了灵芝栽培生产的迅速发展,同时灵芝种质资源也在不断扩大,但是由于我国食用菌品种登记制度尚未完善,因此灵芝的生产用菌种比较混乱,同种异名和异名同种的现象在栽培生产上非常普遍,这不仅给菌种的管理带来了难度,也给以灵芝为原料的保健品及药品等的相关产业造成了一定的经济损失^[2]。目前因为菌种问题常常造成我国灵芝产品质量难以稳定的局面,也严重地阻碍了我国灵芝产品走向国门,走向国际市场的步伐。

在灵芝科中,传统的分类鉴定主要依据子实体的形态学特征来进行,包括担孢子的大小和子实体真皮菌丝的形态特征,但是子实体的许多形态学特征往往随着生长条件的不同而发生变化,而且许多鉴别性特征经常是几个种所共有的,这给传统的分类学带来了很大的困难,因此造成灵芝属内有许多的同物异名(synonyms),复合种,甚至有错误命名的

情况发生^[3]。一些分类学家已经注意到灵芝属正处于分类混乱中^[4~6]。

分子生物学技术的发展,为研究者在分子水平上研究物种的亲缘关系提供了技术保证。近年来,DNA 序列分析已经被真菌学研究人员广泛用于各类真菌的系统发育学研究。目前,真菌 DNA 序列研究大多数集中在 rDNA 上,其中 ITS 区已广泛用于许多真菌的属内种间或种内群体的系统学研究^[7]。Moncalvo 等和 Smith 等通过 rDNA 的 ITS 序列对灵芝科的菌株进行了一些分类研究^[4,5]。

本研究针对 rDNA ITS 区来探讨我国栽培灵芝属菌株间在分子水平上的区别和关系,期望能为灵芝属菌株的分类鉴定及政府今后对菌种加强管理工作提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 本研究所用菌株包括 34 株国内的栽培菌株和 11 株来自 ATCC 的菌株。所有菌株经本实验室栽培后,获得的子实体经李泰辉博士根据形态学特征对其进行了鉴定。菌株的名称及来源见表 1。

基金项目:上海市农委重点攻关项目(农科攻字 2002-1-4-3)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-21-62201337 E-mail Zhangjs8888@yahoo.com.cn

作者简介 苏春丽(1982-),女,江苏如东人,硕士研究生,主要从事真菌遗传学方面的研究。

收稿日期 2006-03-20,接受日期 2006-07-12,修回日期 2006-08-30

表 1 供试菌株

Table 1 Tested isolates of *Ganoderma* spp.

Species	Isolates	Origins
<i>Ganoderma lucidum</i>	GL1	Wuyi, Zhejiang
	GL2	Xixia Research Center of Edible Fungi, Henan
	GL5	Engineering Center of Edible Fungi, Institute of Biology, Henan Academy of Agricultural Sciences
	GL11	Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences
	GL12	Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences
	GL20	Shanghai Agricultural College
	GL23	Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences
	GL25	Shanghai Agricultural College
	GL30	Hubei Institute of Microbiology
	GL33	Sichuan Academy of Agricultural Sciences
	GL36	Heilongjiang Institute of Microbiology
	GL37	Hebei Institute of Microbiology
	GL38	Hebei Institute of Microbiology
	GL44	Gaoyou Institute of Fungi, Jiangsu
	GL49	Dongbei Institute of Edible and Medicinal Fungi, Heilongjiang
	GL59	Xinyu Institute of Edible Fungi, Wuhan, Hubei
	GL93	Huanyu Institute of Edible Fungi, Jiayu, Hubei
	GL99	Jinxiang Institute of Fungi, Shandong
	GL101	Jinxiang Institute of Fungi, Shandong
	GL107	Jinxiang Institute of Fungi, Shandong
	GL109	Jinxiang Institute of Fungi, Shandong
	GL146	Jiangsu Academy of Agricultural Sciences
	GL158	Guangda Research Center of Edible Fungi, Shandong
GL161	Guangda Research Center of Edible Fungi, Shandong	
GL166	Yatai Institute of Edible Fungi, Jinzhou, Liaoning	
GL174	Chongming, Shanghai	
GL177	Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences	
GL122	ATCC 32471	
GL125	ATCC 64488	
GL126	ATCC 200597	
GL128	ATCC 32472	
<i>Ganoderma tenue</i>	GTEN24	Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences
<i>Ganoderma sinense</i>	GS92	Huanyu Institute of Edible Fungi, Jiayu, Hubei
	GS96	Huanyu Institute of Edible Fungi, Jiayu, Hubei
	GS111	Jinxiang Institute of Fungi, Shandong
	GS175	Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences
<i>Ganoderma applanatum</i>	GA117	Aodong Institute of Edible Fungi, Jilin
	GA165	Guangda Research Center of Edible Fungi, Shandong
<i>Ganoderma tsugae</i>	GT130	ATCC 76542
	GT132	ATCC 46754
	GT133	ATCC 64794
	GT135	ATCC 64485
<i>Ganoderma subamboinense</i>	GSUB136	ATCC 52419
	GSUB137	ATCC 52420
<i>Ganoderma oerstedii</i>	GO138	ATCC 52409

ATCC :American Type Culture Collection.

1.1.2 培养基:马铃薯液体培养基每升含马铃薯 200g,葡萄糖 20g, pH 自然。

1.1.3 主要试剂和仪器: *Taq* 酶(Promega);引物合成(Invitrogen);DNA 凝胶回收试剂盒(V-gene);PCR 仪(Eppendorf)。

1.2 菌丝培养和 DNA 提取

菌丝培养和 DNA 提取同唐传红等^[8]的方法进行。

1.3 ITS 区扩增

采用真菌核糖体基因间隔区通用引物 ITS1F 和

ITS4 进行 PCR 扩增。反应条件:94℃ 2min;94℃ 15s,62℃ 30s,72℃ 1min,28 个循环,72℃ 5min。

1.4 ITS 扩增产物的序列测定

PCR 扩增产物经 DNA 凝胶回收试剂盒纯化后,委托大连宝生物公司测序,以 PCR 引物为测序引物,分别从正反链测序。菌株 GL23、GTEN24、GS175 的扩增产物直接测序时,测序末尾部分发生噪音干扰,因此将这 3 个菌株的扩增产物克隆到 pGEM-Teasy 载体上转化大肠杆菌 DH5 α ,测得其全序列。

1.5 ITS 序列分析

根据 GenBank 中已有灵芝属菌株的 ITS 序列资料,确定 ITS 序列的 ITS1、ITS2 和 5.8S 的序列范围。根据常用兼并碱基代码:M=A/C,R=A/G,W=A/T,S=G/C,Y=C/T,K=G/T 等将序列中所含的杂合位点进行重编码,并结合 GenBank 中已报道的一些灵芝属的 ITS 序列,以樟芝(*Antrodia camphorata*)和虎皮香菇(*Lentinula tigrinus*)作为外类群,利用 ClustalX 1.8 软件对 DNA 序列进行排列分析后,由 MEGA 2.1 软件对上述序列进行分析,建立系统发育树。

2 结果

2.1 灵芝属菌株 ITS 的长度和序列变异分析

本研究共测定了 45 个灵芝属菌株的 ITS 序列,有部分菌株的 ITS 序列中存在一些杂合位点,表明这些菌株是异核体^[9],这些位点经重编码后再进行序列分析。另外菌株 GL23、GTEN24 存在两种相差两个碱基的 ITS 序列,将他们都用于系统分析中。各菌株的 ITS 序列已提交到 GenBank(序列号是 DQ424969-DQ425015)。

45 个供试灵芝属菌株的 ITS 序列和 18 条来自 GenBank 的灵芝属一些种的 ITS 序列(图 1)对位排列共有 579 个碱基位点。ITS 序列的长度变异较大,相差 20bp,在 541~561bp 之间。ITS1 的序列长度为 199~205bp,ITS2 的序列长度为 184~200bp,5.8S 的序列很保守,长度均为 158bp。灵芝属菌株 ITS 区 GC 含量在 46.5%~50% 之间,ITS2 的 GC 含量比 ITS1 的变化稍大,分别为 46.7%~52.4% 和 47.2%~51.8%。灵芝属菌株的 ITS 序列发生插入和缺失的频率比较高,ITS1 有 18 个插入和缺失位点,ITS2 有 28 个插入和缺失位点。序列排列的结果显示,ITS1 的变异位置主要位于 ITS1 区的中部,而 ITS2 则分布在两端。

灵芝属菌株 ITS 各区的序列对位排列长度、变异位点、信息位点及序列变异率见表 2。从表 2 可

知灵芝属菌株的 5.8S 基因很保守,只有两个碱基发生了变异。ITS1、ITS2 的变异较大,两区的碱基变异率很接近,ITS1 稍高一些,ITS1 信息含量也要比 ITS2 多一些,分别占 30.04% 和 27.40%。

表 2 灵芝属菌株 ITS 序列的变异情况

Table 2 Site variation within ITS region sequences of *Ganoderma* isolates

Regions	Total number of sites compared/bp	Number of variable sites	Number of informative sites	Percentage of sequence variation/%
ITS1	213	70	64	32.86
5.8S	158	2	1	1.27
ITS2	208	64	57	30.77
Total ITS	579	136	122	23.49

研究结果显示,灵芝属菌株间 ITS 序列变异位点是转换多于颠换,且转换率较高,平均转换/颠换的比率为 2.5,ITS1 区尤其高,平均转换/颠换的比率达到 3.5,ITS2 区比 ITS1 低,为 1.8。Bruns 和 Szaro 曾报道灵芝属真菌的核 rDNA 基因偏爱 T、C 间的转换^[10],但是在本研究中,灵芝属菌株 rDNA ITS 序列中 T、C 间的转换并没有占多数,和 A、G 间的转换大致相当。

2.2 ITS 序列的聚类分析

根据 MEGA2.1 软件中的 Neighbour-joining methods,以樟芝和虎皮香菇作为外类群,对 47 个本研究测得的和 22 个来自 GenBank 的 ITS 序列进行聚类分析,建立基于 ITS 序列的聚类分析树状图(图 1)结果将供试菌株分成 8 个聚类组。

从图 1 可以看到,34 个中国栽培灵芝菌株分布于 5 个聚类组:紫芝组(Group5:GS92,GS96,GS111,GS175)及树舌亚属(Group4:GA117,GA165)的菌株各自聚成一组,灵芝组的菌株分成 3 组:(Group2:GL11,GL166)(Group3:GL23,GTEN24);其它 85.7% 的灵芝组菌株均聚于同一组(Group1),也是中国栽培灵芝的主要栽培菌株。GL11、GL166 与来自 ATCC 的 *G. oerstedii* 菌株 GO138、*G. tsugae* 菌株 GT132、GT133 及 DQ206985 聚在一起,GL11 和 GO138 同源相似性高达 100%,GL166 和 GT132、GT133、DQ206985 的同源相似性也很高(99.1%,99.3%,99.3%)。GL23 与 *G. tenue* 菌株 GTEN24 聚成一起,同源相似性达 100%。据报道,灵芝属 ITS 序列种间的序列差异大于 6%,种内的差异小于 2%^[4],说明 GL11、GL166 和 GL23 可能分别属于 *G. oerstedii*、*G. tsugae* 和 *G. tenue*。这些结果提示根据形态学特征对它们的鉴定存在着一定的偏差,仅仅依据形态学

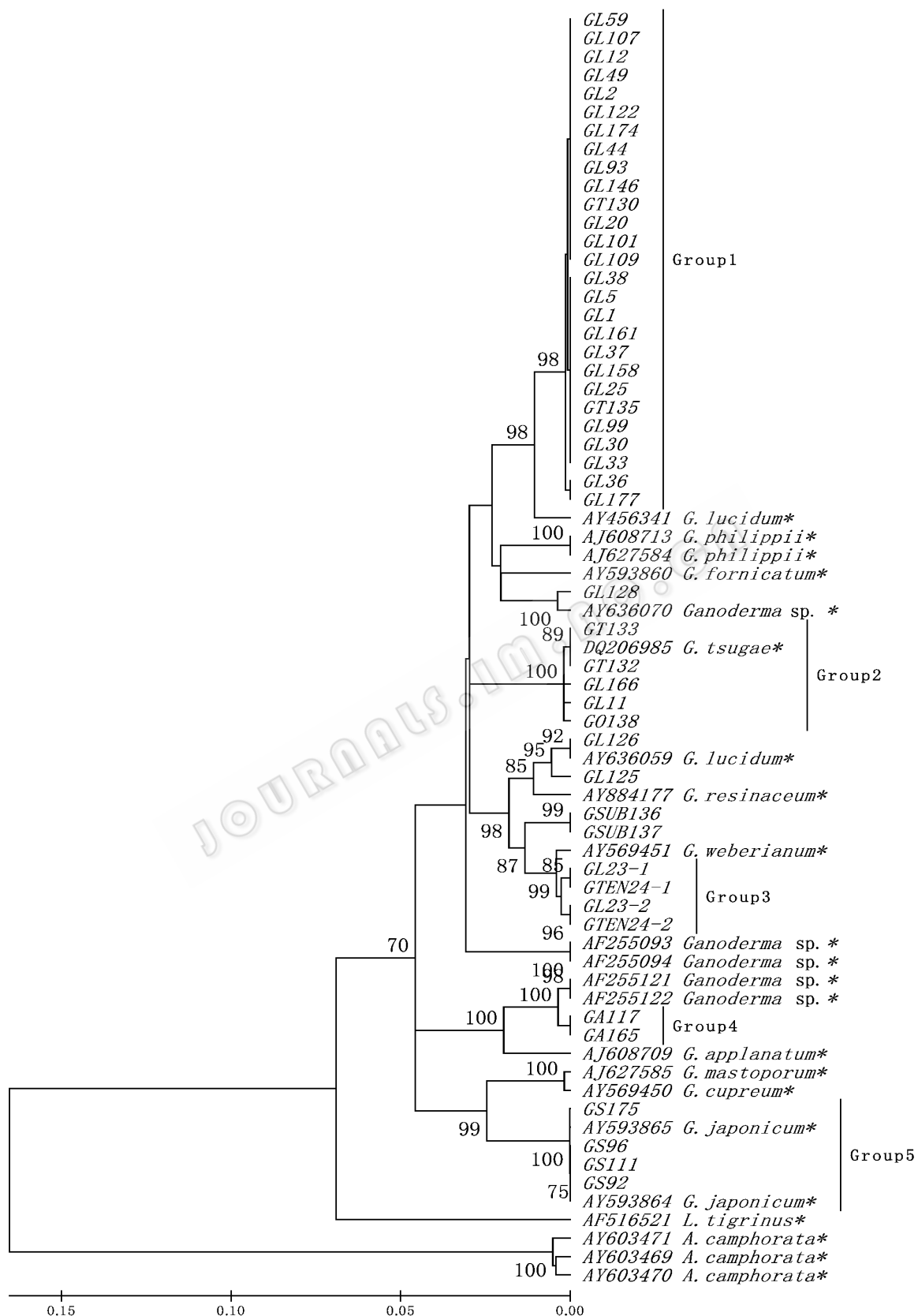


图 1 灵芝属菌株 ITS 序列聚类分析树状图

Fig.1 Phylogenetic tree indicating relationship among isolates of *Ganoderma* based on ITS region sequences. Bootstrap values, more than 70% from 1000 replication, are shown on corresponding branches. ITS sequences obtained from GenBank are marked with asterisks at the end of species names.

特征难于准确和一致地区分不同的种,这可能是造成同种异名或异名同种现象经常发生的原因。本研究的结果说明利用分子生物学的技术手段对灵芝菌种进行分类是一种更有效的方法。

本研究证明,利用 ITS 区可以准确地把中国栽培菌株分成树舌亚属、紫芝组和灵芝组三大类群,其中灵芝组又可以分为 3 组。树舌亚属、紫芝组和灵芝组之间的遗传差异较大,在灵芝组中,虽然各组间存在着一定的遗传差异,但总体上亲缘关系比较近。

3 讨论

在本研究中,为了能较真实地反映中国栽培灵芝菌株的亲缘关系,我们先在统一的条件下获得了所有供试菌株的子实体,以期在同等条件下消除野

外环境对子实体形态方面的影响,通过传统的分类学手段,对这些菌株进行了鉴定,所涉及的一些种的形态学特征见表 3。根据形态学特征,灵芝属被分为树舌亚属、紫芝组和灵芝组三大类群。在本研究中基于 ITS 序列的聚类分析也将灵芝属分为这三大类群,但是 ITS 序列能更加准确地将灵芝组内几个种进行区分,而仅仅根据形态学特征并不能将灵芝属菌株进行有效的分类,因为灵芝属有些种的子实体形态特征相近,而且这些特征易受环境因素的影响。因此,寻找不受环境因素影响的分类方法,搞清楚不同商品名菌株间的关系,将为我国灵芝产业的进一步发展提供必要的基础研究数据。另外,建立起快速有效的分类鉴定的方法,对我国灵芝产业的进一步发展是非常必要和迫切的。

表 3 灵芝属一些种的主要形态学特征

Table 3 Major morphological characters of certain *Ganoderma* spp.

Morphological characters	<i>G. lucidum</i>	<i>G. tenue</i>	<i>G. tsugae</i>	<i>G. sinense</i>	<i>G. applanatum</i>
Substrate adhesion	stipitate	stipitate	stipitate	stipitate	sessile
Pileus surface	laccate	laccate	laccate	laccate	dull
Pileus colour	yellow brown to brunneous	purple brown or dark brown	brunneous to prunosus or purple brown	bordeaux to almost black	gray or dust color
Context colour	cream	cream	cream or dust color	brown to sable	brown to sable
Tube colour	white, light brown to brown	light brown	light brown or brown	brown, dust color to sable	brown
Basidiospore size	8.5 ~ 11.2 (12.1) μm \times 5.2 ~ 6.9 μm	8.7 ~ 10.4 μm \times 5.7 ~ 6.9 μm	9 ~ 11 μm \times 6 ~ 8 μm	9.5 ~ 13.8 μm \times 6.9 ~ 8.1 (8.7) μm	7 ~ 9 (10.4) μm \times 4.3 ~ 6.2 μm

由于 ITS 区不加入成熟核糖体,所以受到的选择压力较小,进化速率较快,在绝大多数的真核生物中表现出了极为广泛的序列多态性;同时 ITS 序列长度适中,从人类到酵母的各种真核生物中 ITS 的序列长度可以大到约 1000bp,小到小于 300bp,大小不等,因此可以从不太长的序列中获得足够的信息,其已受到真菌分类学者的广泛关注^[7]。rDNA 的 ITS 区在核基因组内是中等重复的,而且通过不等交换和基因转换,这些重复单位已高度相似或一致化,这就为对 PCR 产物进行直接测序提供了可能;同时用于扩增 ITS 区的保守引物已经设计成功^[11],这些优点都使得 rDNA 的 ITS 序列成为用于探讨真菌种内变异和属内种间分子系统关系的重要分子标记。

在灵芝属的分类研究中,Moncalvo 等^[4]通过对 ITS 和 25S rDNA 的 D₂ 可变区序列的分析,将具有漆状光泽的灵芝属菌株分为 4 个相关族(cluster)。本研究运用 ITS 序列分析技术对中国的栽培灵芝菌株进行了亲缘关系分析,可以成功地将树舌亚属、紫芝组和灵芝组菌株区分开来,灵芝组的各个种也是可

以分开的。结果表明利用 ITS 序列分析技术来区分灵芝属的不同种是一种有效的手段。

1996 年, Hseu 等^[6]应用 RAPD 技术对群下关系进行研究,证实 RAPD 可以用来区别具有相同 ITS 序列的菌株,但是不能作为 ITS 测序的替代方法。2000 年, Smith 等^[5]对澳大利亚灵芝属 5 个种的 ITS 序列进行了分析,将澳大利亚的灵芝菌株分为 5 个末枝(terminal clade),并且认为系统发育分析比统计序列的变异更适合于种的描述。本研究基于 ITS 序列,对供试菌株进行系统发育分析,将供试菌株聚成 8 组。聚成一组的菌株的 ITS 序列同源性非常高(98.5% ~ 100%),但是组间的同源性相对较低,在 79.4% ~ 90.4% 之间,这说明 ITS 区的碱基变异为区分灵芝属的不同种提供了充分的信息。但是种内菌株的同源性很高,往往只是在少数几个位点上发生了变异,所以要进行种内菌株的鉴定,还要在此基础上应用其他的分子标记技术做进一步的研究。本实验室已经开展了一部分这方面的研究^[8]。

另外,基于我们的研究,以 ITS 为靶基因,建立

快速鉴定灵芝属菌株的种特异性 PCR 法是完全可能的, 这种方法的建立将为我们在菌种保护立法方面提供必要的菌种鉴定方法。

参 考 文 献

- [1] 林志彬. 灵芝的现代研究. 第二版. 北京 北京医科大学出版社. 2001, 1 - 327.
- [2] 秦俊哲, 谷睿, 陈合. 14 个灵芝菌株的酯酶同工酶分析. 微生物学通报, 2005, 32(4): 20 - 24.
- [3] Utomo C, Werner S, Niepold F, et al. Identification of *Ganoderma*, the causal agent of basal stem rot disease in oil palm using a molecular method. *Mycopathologia*, 2005, 159(1): 159 - 170.
- [4] Moncalvo JM, Wang HH, Hseu RS. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 1995, 87(2): 223 - 238.
- [5] Smith BJ, Sivasithamparan K. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. *Mycol Res* 2000, 104(8): 943 - 951.
- [6] Hseu RS, Wang HH, Wang HF, et al. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by Random Amplified Polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacers sequences. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1354 - 1363.
- [7] 匡治州, 许杨. 核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用. 生命的化学, 2004, 24(2): 120 - 122.
- [8] 唐传红, 张劲松, 陈明杰, 等. 灵芝属菌株遗传多样性的初步研究. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 133 - 136.
- [9] Molina MC, Paula TD, James DL. Genetic variation in the widespread lichenicolous fungus *Marchandiomyces corallinus*. *Mycologia* 2005, 97(2): 454 - 463.
- [10] Bruns TD, Szaro TM. Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small subunit rRNA genes in mushrooms. *Molec Biol Evol*, 1992, 9(5): 836 - 855.
- [11] 丁小余, 王峥涛, 徐红, 等. 枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别. 药学学报, 2002, 37(7): 567 - 573.

The phylogenetic relationship of cultivated isolates of *Ganoderma* in China inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences

SU Chun-li^{1,2}, TANG Chuan-hong¹, ZHANG Jing-song^{1*}, CHEN Ming-jie¹, PAN Ying-jie³

(¹ The Edible Fungi Institute, the Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agriculture Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201106, China)

(² Microbiology Department, Nanjing Agriculture University, Nanjing 211195, China)

(³ College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract Nuclear ribosomal DNA ITS sequences have been used to investigate phylogenetic relationships between 34 *Ganoderma* isolates cultivated in China. Five distinct groups were identified: the subgenus *Elfvigia*, the sect. *Phaeonema*, and three groups within the sect. *Ganoderma*. Most of the *Ganoderma* isolates (85.7%) formed a single group within the sect. *Ganoderma*. The result indicated clear genetic diversity between the subgenus *Elfvigia* and the sects *Phaeonema* and *Ganoderma*, but a smaller degree of genetic diversity between the three groups placed within the sect. *Ganoderma*. Analysis of molecular data is a more effective and useful approach for studying the taxonomy of *Ganoderma*, and for establishing phylogenetic relationships within the genus, compared to methods based on fruiting body morphology.

Keywords: Cultivated *Ganoderma* isolates; ITS; Genetic diversity