

小麦印度腥黑粉菌线粒体 DNA 提取及其 ATP6 基因 在真菌遗传发育分析中的应用

周业琴¹ 易建平^{2*} 周国梁² 董英¹

(¹江苏大学食品与生物工程学院 镇江 212013) (²上海出入境检验检疫局 上海 200135)

摘要 小麦印度腥黑粉菌(*Tilletia indica* Mitra)是一种世界范围的重要检疫性有害真菌,该病原菌和近似种之间冬孢子的形态特征极为相似,遗传关系非常相近。为了从分子水平上探讨小麦印度腥黑粉菌和近似种之间线粒体基因序列的差异,从新鲜菌丝中提取总 DNA,经两次氯化铯密度梯度超速离心分离线粒体 DNA(mtDNA),提取的 mtDNA 纯度较高,可用于克隆、酶切分析和 PCR 扩增等分析。选取基因 ATP(adenosine triphosphate)6 的序列,并结合 GenBank 中相关种类的 ATP6 基因 DNA 序列进行了系统发育分析。结果表明,线粒体基因 ATP6 可用于科属水平的分类鉴定。

关键词: 小麦印度腥黑粉菌;线粒体 DNA;系统发育分析

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)05-0817-06

小麦印度腥黑粉菌 *Tilletia indica* Mitra 是一种世界性的重要检疫性真菌。主要分布在印度、巴基斯坦、伊朗、伊拉克、尼泊尔、阿富汗、巴西、墨西哥、美国和南非等地^[1,2]。长期以来小麦印度腥黑粉菌因其检疫重要性一直是各国口岸检疫系统所关注的有害生物^[2~4]。该菌和近似种冬孢子之间的形态特征非常相似,比如进境粮食类产品中常混杂的黑麦草腥黑粉菌 *Tilletia walkeri*、水稻腥黑粉菌 *Tilletia horrida* 和沙地牧草腥黑粉菌 *Tilletia ehrhartae* 等腥黑粉病菌冬孢子,这几种病菌冬孢子的表面纹饰都是疣状(瘤状)突起,容易误诊而造成粮食类产品的贸易纠纷^[1,4~8]。应用光学显微镜和扫描电镜能将 *Tilletia indica* 与除 *Tilletia walkeri* 之外的其它近似种区别开,但在区别 *Tilletia indica* 与 *Tilletia walkeri* 方面则有一定的局限性^[9]。近年来国内外已经报道了一系列的分子生物学检测方法^[3,4,10~13],小麦印度腥黑粉菌和近似种黑麦草腥黑粉菌在 ITS(internal transcribed spacers)序列上只有一个碱基序列的差异,这给病原菌的分子鉴定带来了一定的困难。由于线粒体基因在真核生物中比较保守,且进化速度是核基因的 5~10 倍^[14],通过不同种线粒体基因序列的同源性分析易于发现种间的亲缘关系,为分子鉴定提供理论基础。

GenBank 中腥黑粉菌的线粒体基因序列只有同一个属的 *Tilletia hyalospora* 500bp 的序列,黑粉菌目有玉米瘤黑粉菌 *Ustilago maydis*(DQ157700) mtDNA 的全序列,其与腥黑粉菌线粒体序列之间的相似性不足 80%,根据线粒体基因片段设计 PCR 引物直接从总 DNA 中扩增线粒体基因,不能得到预期的结果。对 GenBank 中现有的黑粉菌线粒体基因序列进行分析发现,部分线粒体基因的序列比较少而难以进行对比分析,部分基因序列的分析结果与传统分类方法不符,ATP 合成酶的第六亚基(ATP Synthase subunit 6)与传统的分类方法一致。因此本文报道了一种分离纯化小麦印度腥黑粉菌 mtDNA 的方法,利用两次氯化铯密度梯度超速离心分离得到了小麦印度腥黑粉菌的 mtDNA,克隆测序得到了其线粒体基因组全序列,以其中 ATP6 基因的 DNA 序列为分析对象,结合 GenBank 中相关种的 ATP6 基因序列分析了小麦印度腥黑粉菌的系统进化,为小麦印度腥黑粉菌的分类与演化提供一些分子水平的证据,并对科属水平的分类研究进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 液氮、无水乙醇、溴化乙锭

基金项目:上海市重大科研项目(03DZ19315);上海检验检疫局项目(HK012-2007)

* 通讯作者。Tel 86-21-68549999 转 15175 Fax 86-21-68546481 E-mail yijp@shciq.gov.cn

作者简介:周业琴(1982-),女,江苏扬州人,硕士研究生,主要从事食品与生物技术的研究。E-mail zhouyeqin@163.com

收稿日期 2007-01-04 接受日期 2007-02-26 修回日期 2007-07-05

(EB) 荧光染料 Bisbenzimidazole (Hoechst 33258) 氯化铯 (CsCl) 酶 (BstHH, Bsh1236, Msp, Proteinase K, RNase) (上海生工生物工程有限公司) Tris-HCl; 显微镜 (ZEISS-Axiostar) 解剖镜 (OLYMPUS-SZX12) 恒温培养箱 (SANYO) 控温摇床 (HZQ-C, 空气浴振荡器) 超速离心机 (BeckMan Ultracentrifuge XL-90, 转子: BeckMan NVT 90) 凝胶成像系统 (Syngene G-box) 手持式紫外灯 (Spectroline) 电泳仪 (Amersham Bioscienced EPS301) 核酸蛋白含量测定仪 (Eppendorf Biophotometer) 超低温冰箱 (Angelantoni industrie)。

1.1.2 菌种来源: 试验用小麦印度腥黑粉菌菌株 F11 来源于上海出入境检验检疫局 1997 年接种小麦发病得到的菌瘿, 接种用冬孢子是从印度面粉中截获的小麦印度腥黑粉菌冬孢子。

1.1.3 培养基: 固体培养基 PDA (琼脂粉、蔗糖、马铃薯) 液体培养基 PDB (蔗糖、马铃薯)。

1.2 菌丝培养

取菌瘿置于解剖镜下, 用解剖针从菌瘿中挑取病菌冬孢子, 用灭菌水洗涤一次, 漂白粉溶液 (0.5% NaClO) 表面消毒 30 s, 灭菌水洗两次, 挑取冬孢子置于 2% 琼脂平板上, 20℃ 12h 光照条件下培养 5 ~ 10d, 显微镜下观察有无冬孢子萌发。冬孢子萌发后将萌发的单个冬孢子转移至 PDA 平板上, 20℃ 培养 10d, 取菌丝块转入 PDB 中 20℃, 108r/min 振荡培养 15 ~ 20d, 10000r/min (BeckMan AvantiTM-25, 转子 JA-14) 离心 15min 收集菌丝, 吸干水分后 -70℃ 冰箱保存备用。

1.3 总 DNA 提取

试验用菌丝 40g 提取菌丝总 DNA, 提取参考 Moller 等^[15]的方法进行。

1.4 线粒体 DNA 提取

参考 Robert 等提取丝状真菌 mtDNA 的方法^[16], 并结合《分子克隆实验指南》中氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心法纯化闭环 DNA 的方法^[17], 加以改进后, 使用氯化铯 (CsCl) 密度梯度离心法分离 mtDNA, 并用荧光染料 Bisbenzimidazole (= Hoechst 33258, Fluka) 进行染色。mtDNA 提取步骤如下: 配制 CsCl 密度梯度离心溶液: 用 0.1 × TE 配制 CsCl 溶液, 其密度为 1.55g/mL, 此溶液中还包括约 6.4mg 的总 DNA 和终浓度为 120μg/mL 的荧光染料 Bisbenzimidazole。将 CsCl 溶液分装于离心管 (BeckMan 342412) 中, 每管 5mL (用石蜡油封顶), 将离心管热封后, 放入超速离心机 (BeckMan Ultracentrifuge XL-90, 转子 BeckMan NVT

90) 中 20℃, 780000r/min 离心 5h; 取出离心管, 用手持式紫外灯照射离心管, 在长波长 (365nm) 的紫外光的照射下, 可看到三条蓝白色的条带, 最上面一条很细的条带是线粒体 DNA (mtDNA), 中间的条带是核糖体 DNA (rDNA), 最下面的条带是核 DNA (nDNA)。用注射器 (6 号针头) 从 DNA 带的下方刺破离心管壁, 慢慢取出 mtDNA 和 nDNA 的条带; 为了进一步纯化 mtDNA 和 nDNA, 将取出的条带分别进行第二次 CsCl 密度梯度离心。具体操作程序为: 将 mtDNA 分装于两个离心管, DNA 放入一个离心管, 用 CsCl 溶液 (此溶液只含 CsCl 和 TE, 其密度仍为 1.55g/mL) 补足 5mL (用石蜡油封顶), 离心方法及取样过程同第一次。

1.5 mtDNA 和 nDNA 纯化

参考《分子克隆实验指南》中用有机溶剂抽提法从 DNA 中除去溴化乙锭的方法^[17], 去除荧光染料和 CsCl₂。

1.6 DNA 浓度测定

提取得到的 mtDNA 和 nDNA 溶液稀释后用核酸蛋白含量测定仪 (Eppendorf Biophotometer) 测定其浓度及 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值, 计算 mtDNA 和 nDNA 的浓度。

1.7 mtDNA 和 nDNA 的酶切分析

用限制性内切酶 BstHH (识别 GCGC 序列) 和 Bsh123 (识别 CGCG 序列) 和 MspI (识别 CCGG 序列) 分别酶切 mtDNA (0.7mg) 和 nDNA (1.0mg)。

DNA 经酶切后取全部反应产物, 未酶切的 DNA 取 1μL 于琼脂糖凝胶中电泳 (Amersham Bioscienced EPS301) 检测。电泳缓冲液为 1 × TAE, 琼脂糖凝胶的浓度为 1.0%, 电压为 60V, 电泳时间为 4h。利用凝胶成像系统 (Syngene G-box) 进行分析。

1.8 mtDNA 全序列的测定和 ATP6 基因的系统发育分析

采用 Shotgun 的方法构建 DNA 文库并测序 (国家人类基因组南方研究中心 Chinese National Human Genome Center at Shanghai)。利用 Blast 查询所测序列的相似性, 利用 DNASTar 软件包中的 EdiSeq 软件对 DNA 序列进行同源性比较, 利用 PAUP4.0 软件构建 ATP6 基因的系统发育树。

2 结果和分析

2.1 总 DNA 和 mtDNA 提取

从 40g 菌丝粉中提取得到 6.4mg 总 DNA, 其

OD_{260}/OD_{280} 为 1.80,浓度为 926.4ng/ μ L,进行两次氯化铯密度梯度离心,得到 69.6 μ g mtDNA,mtDNA 约为总 DNA 含量的 1%。

2.2 超离次数对提取 mtDNA 纯度的影响

从菌丝提取的总 DNA 用氯化铯密度梯度离心法进行 mtDNA 和 nDNA 的分离纯化,超离后 DNA 在氯化铯密度梯度中形成的 3 条 DNA 条带,其中最上面一条很细的条带是 mtDNA;中间的条带是核糖体 DNA(rDNA),和最下面的条带靠近,连成一个宽的条带,最下面的一条带很亮,是核 DNA(nDNA)(图 1-A),分别取出 mtDNA 和 nDNA,分别进行第二次氯化铯密度梯度离心,mtDNA 经第二次超离,mtDNA 条带比较亮,nDNA 和 rDNA 的条带比较弱,和第一次离心效果相比,nDNA 和 rDNA 的条带明显减弱(图 1-B);同时 nDNA 经第二次超离,nDNA 条带比较亮,mtDNA 和 rDNA 的条带比较弱,和第一次离心效果相比,mtDNA 和 rDNA 的条带明显减弱(图 1-C)。离心试验结果表明一次离心得到的 mtDNA 中有 nDNA 和 rDNA 混杂,nDNA 中有 mtDNA 和 rDNA 混杂,两次离心可以得到高纯度的 mtDNA 和 nDNA。

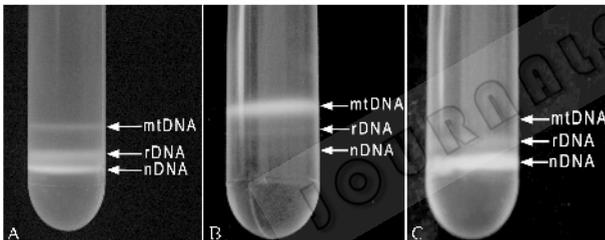


图 1 CsCl 密度梯度离心形成的 DNA 条带

Fig. 1 DNA bands after the CsCl/bisbenzimidazole density gradients ultracentrifugation. A: The first CsCl/bisbenzimidazole density gradients ultracentrifugation of total DNA; B: The second CsCl/bisbenzimidazole density gradients ultracentrifugation of mtDNA; C: The second CsCl/bisbenzimidazole density gradients ultracentrifugation of nDNA.

2.3 酶切分析

提取的 mtDNA 和 nDNA 分别用识别 4 个 GC 对的限制性内切酶酶切 1h,经琼脂糖凝胶电泳 4h,得到 DNA 的酶切电泳图。用 *Bst*HH、*Bsh*1236 和 *Msp* 完全酶切 nDNA 和 mtDNA 后,绝大部分 nDNA 被切成 1.5kb 以下的小片段,而 mtDNA 形成 10 个左右较大的片段(图 2)。BstHH、Bsh1236 和 Msp 酶切后的片段大小之和分别为 56.9kb、66.6kb 和 62.1kb。根据酶切电泳图中 mtDNA 被酶切的片段数目和大小,估算出小麦印度腥黑粉病菌 mtDNA 序列的总长度为 50~70kb。

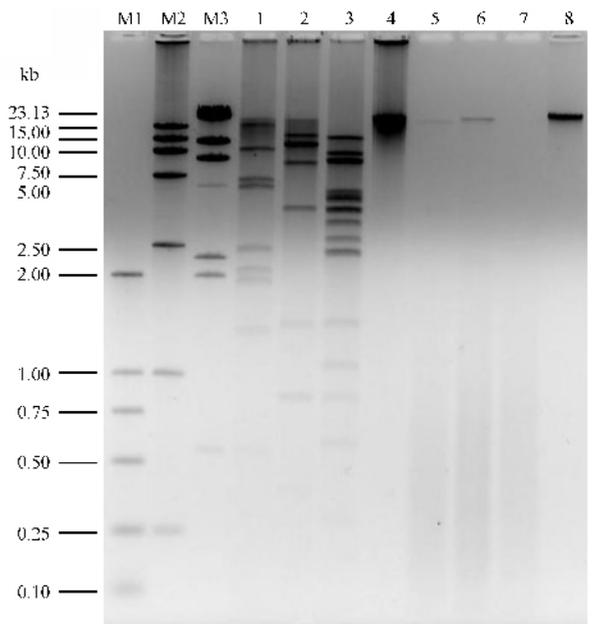


图 2 mtDNA 和 nDNA 的酶切电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of mtDNA and nDNA digested with *Bst*HH, *Bsh*1236 and *Msp*. M1: DL2000; M2: λ -*Hind* digest; M3: DL15000. Lane 1~3: mtDNA digested with *Bst*HH, *Bsh*1236 and *Msp*; Lane 5~7: nDNA digested with *Bst*HH, *Bsh*1236 and *Msp*; Lane 4: undigested mtDNA; Lane 8: undigested nDNA.

2.4 mtDNA 全序列测定结果

采用 Shotgun 的方法构建了 DNA 文库,测出 mtDNA 的全序列。在 GenBank 中登录,获得 Accession Number DQ993184(未公布)。经序列分析,选取 ATP6 基因进行系统发育分析。

2.5 ATP6 基因的系统发育分析

对 *Tilletia indica* 的线粒体基因 ATP6 以及 GenBank 中的 19 种共 20 种高等担子菌 ATP6 基因的 DNA 序列进行同源性比较。结果表明,种间同源性高,为 87.7%~97.6%。*Tilletia indica* 与同属的 *Tilletia hyalospora* 及同科的 *Conidiosporomyces ayresii* 同源性分别为 88.6% 和 82.4%。根据 ATP6 基因 DNA 序列的同源性,构建了 20 个相关种 ATP6 基因 DNA 序列的系统发育树(图 3),结果显示,*Ustilago* 属的不同菌种 *avenae*、*striiformis*、*cynodontis*、*davisii* 根据同源性的不同而相互区分开;同样,*Ustilaginaceae* 科的不同菌种 *Moesziomyces eriocauli*、*Moesziomyces bullatus*、*Melanopsichium pennsylvanicum* 也可以相互区分开,而 *Tilletia indica* 先与同属的 *Tilletia hyalospora* 聚集在一起,再与同科的 *Conidiosporomyces ayresii* 聚为一支,然后分别与黑粉菌亚纲及担子菌门的聚集在一起。从 *Ustilago* 属以及 *Ustilaginaceae* 科的分析可知,mtDNA 的 ATP6 基因可用于科属水平的分类研究。

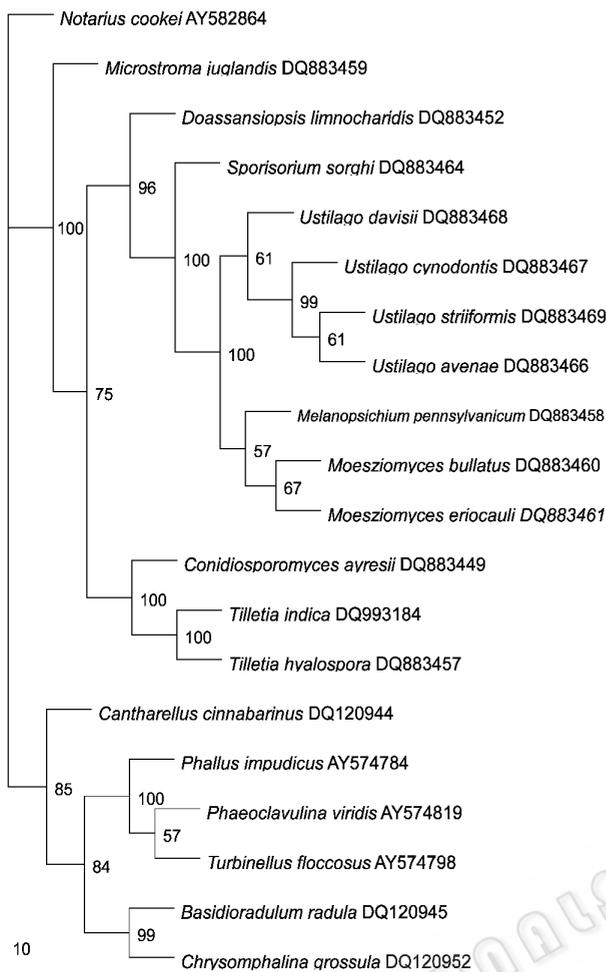


图3 线粒体 ATP6 基因 DNA 序列的系统发育树状图

Fig. 3 Phylogenetic tree derived from the DNA sequences of mitochondrial gene ATP6. Numbers behind the latin names represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

3 讨论

有报道认为 mtDNA 只占总 DNA 的 2% ~ 15% , 本试验从总 DNA 中分离得到了小麦印度腥黑粉病菌 mtDNA 约为总 DNA 的 1%。试验过程中进行了两次氯化铯密度梯度离心, 而且离心后吸取 DNA 带时未能完全转移 mtDNA 带, 在去除荧光染料和 CsCl 过程中也有部分 mtDNA 丢失, 最后得到的 mtDNA 量应该比实际含量偏小, 因此小麦印度腥黑粉病菌 mtDNA 在总 DNA 中的比例应大于 1%。

到 2006 年 10 月为止, GenBank 数据库中有 42 个真菌线粒体基因组全序列, 其大小变化很大, 从 wine yeast *Hanseniaspora waurum* 的 18.9 kb 到 *Crinipellis perniciosa* 的 109kb。通常真菌线粒体基因组比较大, 容易与 nDNA 缠绕在一起而难以分开, 这就给提取高纯度的 mtDNA 带来一定的困难。试验

中进行氯化铯密度梯度离心时发现, 离心次数对所提 mtDNA 的纯度有一定的影响, 两次离心要比一次离心的效果更好, 可以得到高纯度的 mtDNA, mtDNA 经第二次超离后仍可看见淡淡的 rDNA 和 nDNA 条带, 说明了一次离心后 mtDNA 中还有一定量的 rDNA 和 nDNA(图 1-B)。第一次超离形成的 3 条 DNA 条带彼此靠近, 其中最上面的条带是 mtDNA, 中间的 rDNA 与最下面的 nDNA 条带靠的很近, 形成一条宽带, 几乎分不开, 所抽取的 mtDNA 条带很容易被 rDNA 及 nDNA 污染(图 1-A)。Robert 等人报道增加超速离心的次数可以更好地分离 mtDNA 和 nDNA^[12], 因此, 本试验参考 Robert 等人提取丝状真菌 mtDNA 的方法^[16], 并结合《分子克隆实验指南》中氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心法纯化闭环 DNA 的方法^[17], 加以改进后, 采用两次氯化铯密度梯度离心, 得到了高纯度的小麦印度腥黑粉菌 mtDNA, 提取出的 mtDNA 可适用于电泳、克隆、酶切分析和 PCR 扩增等研究。这种氯化铯密度梯度超速离心的方法可以作为真菌线粒体分离纯化方法。

曾凡亚等用识别 4 个 GC 对的限制性内切酶 *Hae* III、*Cfo* I 和 *Msp* I 酶切担子菌总 DNA^[18, 19], 认为总 DNA 经酶切后所形成的分子量较大的 DNA 条带来源于 mtDNA。高等担子菌的 nDNA 与 mtDNA 的碱基组成有明显差异, nDNA 的 GC 含量一般在 50% ~ 80%, 存在大量识别 4 个 GC 对的限制酶酶切位点; mtDNA 的 GC 含量小于 50%, 识别 4 个 GC 对的限制酶在 mtDNA 中的酶切位点相对较少。试验中用识别 4 个 GC 对的限制性内切酶 *Bst* HI、*Bsh* 1236、*Msp* I 酶切 mtDNA, 成功得到了 mtDNA 的酶切图谱, 并根据电泳图片中的可见条带预测小麦印度腥黑粉菌 mtDNA 的总长度为 50 ~ 70kb。用识别 4 个 GC 对的限制性内切酶 *Bst* HI、*Bsh* 1236、*Msp* I 酶切 nDNA 时, 绝大部分 nDNA 被切成 1.5kb 以下的小片段; 但酶切总 DNA 时, 未能得到 mtDNA 的条带, 这可能与 mtDNA 占总 DNA 的比例太小有关。本实验所得结果与前人的报道基本一致。

1996 年 Ferreira 等利用氯化铯密度梯度超速离心方法从小麦印度腥黑粉菌总 DNA 中分离到了线粒体 DNA^[20], 然后通过酶切 mtDNA 得到了一段 2.3kb 的片段并进行了部分片段的测序。Frederick 等对 3 株 *Tilletia indica* 和 3 株 *Tilletia walkeri* 的线粒体 DNA 的 2.3kb 片段进行克隆和测序^[41], 发现 *Tilletia indica* 和 *Tilletia walkeri* 有 99% 以上的同源性, 两个种之间的差异不到 3%。但是我们分析后发现, 当时报道并在 GenBank 中公布的序列和已经

报道的其它生物种类的线粒体序列存在两个难以解释的现象:一是 AT 含量和线粒体 AT 含量不符,线粒体中 AT 含量大于 50%,而 Frederick 等报道的 *Tilletia indica* 线粒体片段的 AT 含量仅为 43.4% (AF218060)^[4];二是 BLAST 在线分析的结果表明,此序列与线粒体基因序列并没有比较高的相似性,而与一个蛋白序列具有一定的同源性。此外,我们在试验中测定的 *Tilletia indica* 线粒体基因组全序列中没有找到与此序列相似性高的序列片段。因此可以推测 Frederick 等人报道的 *Tilletia indica* 线粒体片段以及后来其他学者据此序列设计引物测定的一系列的线粒体序列都不是真正的线粒体序列。从 Ferreira 和 Frederick 等人采用的试验方法分析^[4,16],可能是试验中测定序列的 DNA 片段是 nDNA 而非 mtDNA,我们在试验中也证实了这种分析,利用 Ferreira 和 Frederick 等人的线粒体引物可以从我们试验分离到的 nDNA 中扩增预期的产物,而不能从 mtDNA 中得到扩增产物。其根本原因是分离纯化得到的 mtDNA 中还有一定浓度的 nDNA 污染,酶切以后得到的是 nDNA 酶切后的条带,最后测序得到的也是 nDNA 序列。试验中我们从 mtDNA 第二次超速离心的结果发现,总 DNA 第一次超速离心形成的 mtDNA 条带中混有相当数量的 nDNA(图 1-B),这种现象可以解释 Ferreira 和 Frederick 等人的试验误差。真菌 mtDNA 只占总 DNA 的 2%~15%,线粒体基因组比较大,容易与 nDNA 缠绕在一起而难以分开,此外,超速离心形成的三条 DNA 条带彼此靠近,即最上面的 mtDNA,中间的 rDNA 与最下面的 nDNA 条带,吸取 mtDNA 条带时容易被 rDNA 和 nDNA 污染。鉴于此,我们在试验过程中采用两次氯化铯密度梯度离心的方法分离总 DNA 以得到较为纯净的 mtDNA,这为随后构建 mtDNA 测序文库提供了有效保障。

根据线粒体基因 ATP6 的 DNA 序列构建的分子进化关系与传统的系统分类基本一致。*Ustilago* 属的不同菌种 *avenae*、*striiformis*、*cynodontis*、*davisii* 可以相互区分开;同样,*Ustilaginaceae* 科的不同菌种 *Moesziomyces eriocauli*、*Moesziomyces bullatus*、*Melanopsichium pennsylvanicum* 也可以相互区分开,而本试验所研究的 *Tilletia indica* 先与同属的 *Tilletia hyalospora* 聚集在一起,再与同科的 *Conidiosporomyces ayresii* 聚为一支,然后分别与黑粉菌亚纲及担子菌门的聚集在一起。构建的系统进化树所反映的系统进化关系能分析到腥黑粉菌的属,其结果与传统的系统分类非常一致,说明线粒体 ATP6 基因序列可

用于腥黑粉菌分类的研究。但由于 GenBank 中担子菌种类 ATP6 基因序列的数量有限,特别是 *Tilletia* 属的种类少,有关种的鉴定依据有待进一步研究。

目前,依据基因序列构建分子系统树进行分子系统进化研究较多,构建分子系统树所依据的基因不同,结果相差比较大。在分子系统学研究中,目的基因的选择非常重要。一般选择进化过程中保守性的基因序列作为分析对象,通常多选取 rDNA 序列进行分析,近年来线粒体 DNA 序列分析在担子菌类的发育研究中得到了广泛的应用。Sannenberg 等研究了 29 个双孢蘑菇线粒体的基因型,发现 29 个菌株中有 3 种线粒体 DNA 的基因型遗传差异小,并且大部分菌株是同一种线粒体 DNA 基因型^[21]。此外,有人利用 RFLP 技术研究了 51 株收集自不同地理种群的野生香菇菌株,发现根据地理区域不同,所收集菌株间的线粒体 DNA 有较多的类型。Forster 等对疫霉属 *Phytophthora* 真菌的 6 个种的线粒体 DNA 进行了 RFLP 分析,发现这项技术不仅可以区别种,甚至可以区别来自不同地理环境和寄主的种以下的分类单元—亚群^[22]。Taylor 等应用线粒体 DNA 的多态性对粗糙脉孢菌的 19 株自然分离株进化发育研究时,发现存在着明显的线粒体 DNA 群体的地域性差别^[23]。近年来越来越多的真菌线粒体基因组全序列得到测定,这为进一步基于线粒体基因进行分子系统学研究奠定了基础。

致谢 感谢中国科学院上海植物生理生化研究所提供超速离心试验场所;感谢中国农业大学生物学院微生物系李颖和张金祥老师对实验方法的指导;感谢国家人类基因组南方研究中心构建 DNA 文库和测序;感谢江苏大学生命科学研究院王文兵副研究员帮助修改文稿。

参 考 文 献

- [1] Castlebury LA, Carris LM. *Tilletia walkeri*, A new species on *Lolium multiflorum* and *L. Perenne*. *Mycologia*, 1999, **91**: 121-131.
- [2] Bonde MR, Peterson GL, Schaad NW, et al. Karnal bunt of wheat. *Plant Dis*, 1997, **81**: 1370-1377.
- [3] Smith OP, Peterson GL, Beck RJ, et al. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of karnal bunt of wheat. *Phytopathology*, 1996, **86**(1): 115-122.
- [4] Frederick RD, Karen ES, Tooley PW, et al. Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 2000, **90**(9): 951-960.
- [5] Pimentel G, Carris LM, Levy L, et al. Genetic variability among isolates of *Tilletia barclayana*, *T. indica* and allied species.

- [6] Pascoe IG , Priest MJ , Shivas RG , *et al.* Ustilospores of *Tilletia ehrhartae* , a smut of *Ehrharta calycina* , are common contaminants with *Tilletia indica* , the cause of Karnal bunt of wheat. *Plant Pathology* 2005 **54** :161 – 168.
- [7] 刘素萍 , 易建平 , 周国梁 , 等. 进境小麦中沙地牧草腥黑粉菌的鉴定. *植物检疫* 2006 **20** (1) :7 – 9.
- [8] Carris LM , Castlebury LA , Goates BJ. Nonsystemic bunt fungi——*Tilletia indica* and *T. horrida* : A review of history , systematics , and biology. *Annu Rev Phytopathol* 2006 **44** :113 – 133.
- [9] 章桂明 , 戚佩坤 , 章 正 , 等. 小麦印度腥黑粉菌与近似种的形态学比较. *菌物系统* 2002 **21** (3) :412 – 418.
- [10] Mishra A , Singh US , Goel R , *et al.* PCR based molecular technique for identification and discrimination of quarantined and non-quarantined *Tilletia* spp. *Indian J Exp Biol* 2002 **40** (10) :1137 – 1142.
- [11] 易建平 , 陶庭典 , 印丽萍 , 等. 小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌的单孢检测. *南京农业大学学报* 2003 **26** (2) :42 – 46.
- [12] 易建平 , 刘素萍 , 印丽萍 , 等. TaqMan-MGB 探针在小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌鉴定上的应用. *植物检疫* , 2005 **19** (1) :15 – 19.
- [13] Tan MK , Murray GM. A molecular protocol using quenched FRET probes for the quarantine surveillance of *Tilletia indica* , the causal agent of Karnal bunt of wheat. *Mycol Res* 2006 **110** (Pt 2) :203 – 210.
- [14] Brown WM , George MJr , Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1979 **76** :1967 – 1971.
- [15] Moller EM , Bahnweg G , Sandermann H , *et al.* A simple and efficient protocol for the isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi , fruit bodies , and infected plant tissue. *Nucleic Acids Res* , 1992 **20** :6115 – 6116.
- [16] Robert C , Garber RC , Yoder OC. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear , mitochondrial , ribosomal and plasmid components. *Analytical Biochemistry* , 1983 **135** :415 – 422.
- [17] Sambrook J , Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂 , 等译. 第三版. 北京 科学出版社 2002 53 – 60.
- [18] 曾凡亚 , 汤海妹 , 张义正. 用识别四个 GC 对的限制性内切酶研究高等担子菌线粒体 DNA. *微生物学报* , 1998 **38** (4) :283 – 288.
- [19] 曾凡亚 , 张义正. 食用真菌线粒体 DNA 的直接分析. *微生物学通报* , 1998 **25** (1) :5 – 8.
- [20] Ferreira MA , Tooley PW , Hatziloukas E , *et al.* Isolation of a species-specific mitochondrial DNA sequence for identification of *Tilletia indica* , the Karnal bunt of wheat fungus. *Appl Environ Microbiol* , 1996 **62** (1) :87 – 93.
- [21] Sannenberg ASM. The occurrence of mitochondrial genotype and inheritance of mitochondrial in the cultivated mushroom agaricus bisporus. *Mushroom Science* , 1991 **XIII** (1 – 6) :85 – 92.
- [22] Forster H , Oudemans P , Coffy MD. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of Phytophthora. *Experimental Mycology* , 1990 **14** :18 – 31.
- [23] Taylor JW , Smolich BD , May G. Evolution and mitochondrial DNA in *Neurospora Crassa* . *Evolution* , 1986 **40** (4) :716 – 739.

Extraction of mitochondrial DNA of *Tilletia indica* Mitra and application of the ATP6 gene on fungal phylogenetic analysis

ZHOU Ye-qin¹ , YI Jian-ping^{2*} , ZHOU Guo-liang² , DONG Ying¹

(¹ Department . of Food and Bioengineering , Jiangsu University , Zhenjiang 212013 , China)

(² Shanghai Entry-Exit Quarantine and Inspection Bureau , Shanghai 200135 , China)

Abstract : *Tilletia indica* Mitra , an important pest around the world which is the causative agent of Karnal Bunt of wheat , was very close to *Tilletia walkeri* phylogenetically and morphologically . 69.6ng mitochondrial DNA (mtDNA) of *Tilletia indica* obtained from 6.4mg total DNA by the method of CsCl/bisbenzimidazole density gradient ultracentrifugation can be used for electrophoresis , cloning , enzyme restriction analysis and PCR amplification . The ATP6 gene sequence was cloned from the fragment of mtDNA and sequenced for analysis of phylogenetic tree with the other related sequences in GenBank by the software PAUP to reveal the phylogenetic relationships within the *Tilletia* species .

Keywords : *Tilletia indica* ; mitochondrial DNA ; phylogenetic analysis

Foundation item Shanghai Municipal Committee of Science and Technology (03DZ19315) ; Shanghai Entry-Exit Quarantine and Inspection Bureau (HK012-2007)

* Corresponding author . Tel 86-21-68549999 Exe 15175 ; Fax 86-21-68546481 ; E-mail : yjip@shciq.gov.cn

Received 4 January 2007 / Accepted 26 February 2007 / Revised 5 July 2007