

云南松口蘑的遗传多样性研究

沙涛 张汉波 丁骅孙 李宗菊 程立忠 赵之伟 张亚平*

(云南大学生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地, 昆明 650091; 云南大学生命科学学院, 昆明 650091; 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化重点实验室, 昆明 650223. * 联系人, E-mail: zhangyp1@263.net.cn)

摘要 对分布于云南省9个地市13个县的56个松口蘑(*Tricholoma matsutake*)子实体进行了ITS序列、IGS序列和反转录转座子PCR图谱比较分析,发现ITS序列只有一种单倍型,IGS序列有3种单倍型,反转录转座子PCR图谱群体间的多态性不显著.对比我国东北和日本松口蘑的研究结果发现,云南松口蘑的遗传多样性较低,云南松口蘑和日本松口蘑同源,但松口蘑可能不是起源于云南.

关键词 松口蘑 ITS1 IGS1 反转录转座子间扩增多态性

松口蘑(*Tricholoma matsutake* (S. Ito et S. Imai) Singer)俗称松茸,是外生菌根真菌^[1,2],主要分布在东亚的日本、韩国和中国等国家.由于其味道鲜美、营养价值十分丰富,是我国著名的食用真菌.近年来,由于国际市场需求量很大,我国每年出口创汇金额达5000多万美元.由于松口蘑目前尚不能实现人工栽培,所有出口产品全靠自然采收.加上采收管理不当,种质资源量正快速降低,已被列为国家二级濒危保护物种.

云南是我国松茸的主产区之一,全省范围内都有分布,其松口蘑年出口量约占全国的1/4,年出口产值约3.2亿元人民币,是云南省的主要出口创汇农产品之一^[3].由于云南省极为多样的气候和植被类型为松口蘑的生长提供了丰富多样的生态位,一些学者认为我国西南是松茸群的多度中心、多样性中心和现代分布中心^[4],因此也是研究松口蘑的起源和遗传多样性的关键地区.为了制定科学的保护对策,了解云南松口蘑不同地理类群(居群)间的亲缘关系和遗传差异十分必要.

ITS (internal transcribed spacer)目前被广泛应用于不同水平的系统发育、进化和分类研究^[5].瑞典农业科学大学(Uppsala)对亚洲松口蘑(*Tricholoma matsutake*)以及瑞典松口蘑(*Tricholoma nauseosum*)进行了DNA的分析比较,发现两地区的松口蘑ITS序列有99%~100%的吻合度^[6].IGS (intergenic spacer)是rDNA中基因进化速度最快的区域,常用来进行种内群体比较^[7].Guerin-Laguette等人^[8]发现了日本松口

蘑的IGS1限制性片段长度多态性(RFLP)较高.反转录转座子(retrotransposon)以高拷贝在真菌基因组中广泛分布,可以通过纵向和横向分别在世代之间和不同种之间传递,同一家族的反转录转座子具有高度的异质性.因此,反转录转座子间扩增多态性(inter-retrotransposon-amplified polymorphism, IRAP)已成功地应用于多种生物,如大麦的遗传多样性分析^[9].Murata等人^[10]发现亚洲及美洲松口蘑的反转录转座子呈现更高的多态性.

本研究结合了上述3种遗传标记,研究云南省松口蘑不同地理群体间以及与日本松口蘑的遗传差异,为进一步探索松口蘑与不同宿主植物间的共生机理,进而为生态恢复区接种松口蘑菌根菌,实施人工促繁技术奠定基础.

1 材料及方法

() 材料. 松口蘑样品见表1和图1,假松口蘑(*Tricholoma bakamatsutake* TF9)来源于昆明市嵩明县.

() PCR引物. ITS引物: ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC)/ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')^[11]; IGS引物: 5SA-Anderson (5'-CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT-3')/CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3')^[8]; 反转录转座子引物: pS48 (5'-GAGGTGGGGAAAAATATGGGACGAAC-3')/pL281 (5'-CTTCACATATACTGGGCATCAGCAAGGG-3')^[10].以上引物由上海博亚生物技术有限公司合成.

() DNA提取方法. 子实体总DNA的提取采用CTAB法.

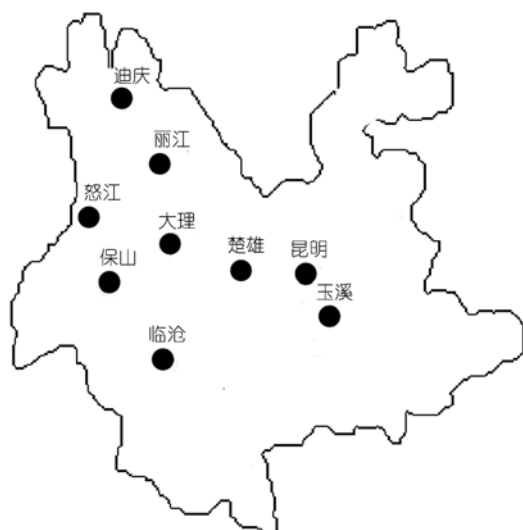


图 1 云南省松口蘑样品来源示意图

() PCR 反应. ITS 扩增: 50 μ L 反应体系包括 5 μ L 10 $\times$ 缓冲液, 2 μ L dNTP (25 mmol/L), 2 μ L 引物, 0.25 μ L *Taq* 酶(5 U/ μ L, 大连宝生物工程有限公司), 1 μ L DNA 模板, 无菌去离子水补足 50 μ L, Mineral oil 覆盖. 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 40 s, 52 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.

IGS1 区域(IGS1 位于 rDNA 25S 及 5S 部位上)通过 5SA/CNL12 引物对扩增. 50 μ L PCR 反应体系包括 5 μ L 10 $\times$ 缓冲液, 2 μ L dNTP (25 mmol/L), 2 μ L 引物, 0.25 μ L *Taq* 酶(5 U/ μ L, 大连宝生物工程有限公司), 1 μ L DNA 模板, 无菌去离子水补足 50 μ L, Mineral oil 覆盖. 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 40 s, 63 $^{\circ}$ C, 1 min, 72 $^{\circ}$ C, 3 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 扩增产物用 1.25% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色观察.

反转录转座子扩增: 引物 pS48/pL281, 50 μ L PCR 反应体系包括 5 μ L 10 $\times$ 缓冲液, 4 μ L dNTP (25 mmol/L), 引物各 1 μ L, 0.25 μ L *Taq* 酶(5 U/ μ L, 大连宝生物工程有限公司), 30 ng DNA 模板, 无菌去离子水补足 50 μ L, Mineral oil 覆盖. 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 40 s, 62 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 5 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 扩增产物 70 V 1.8% 琼脂糖(西班牙)凝胶电泳 2~3 h, EB 染色观察.

() 转化和克隆. PCR 扩增产物经试剂盒纯化(方法同上, 上海华舜生物工程有限公司小量胶回收试剂盒), 取 5 μ L 连接到 pMD18-T 载体(大连宝生物工程有限公司). 连接产物直接转化大肠杆菌 HB101,

涂 Amp/IPTG/X-Gal 的 LB 平板, 挑白斑检测目的片段并进行 DNA 序列测定.

() DNA 序列测定与分析. ITS 和 IGS 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, ABI DNA3700 分析仪测序. DNA 序列经 NCBI 的 BLAST 进行序列搜索, 从 GenBank 获得相关松口蘑序列. 用 DNAStar5.0 软件包中 SeqMan 和 MegAlign 程序对序列进行编辑、校对和排序. 以假松口蘑 TF9 (DQ323057) 为外群, 基于 Kimura 双参数模型用 MEGA3 构建了邻接树(Neighbor-joining tree). 树上主要节点的支持率通过 1000 次自展重复抽样(Bootstrap)获得.

() 反转录转座子数据处理. 每个样品, 同一位点的产物, 按扩增阳性(1)和扩增阴性(0)记录电泳谱带, 形成 0 和 1 数据矩阵, 用 POPGENE 软件进行分析. 根据 POPGENE 遗传距离, 用 Mega3 软件进行 UPGMA 聚类, 构建居群间的系统树.

2 结果

2.1 ITS 及 IGS 序列分析

对云南省 9 个地市 13 个县 56 个松口蘑子实体的 ITS 序列和 IGS1 序列测定, 结果显示, ITS 的 56 条序列只呈现一个单倍型 TF46 (登录号: DQ323063), 经 GenBank 的 BLAST 搜索、比较, 发现与已报道日本松口蘑的 ITS 序列一致. 在获得的 IGS1 序列中, 55 个松口蘑子实体为同一单倍型(登录号: DQ323058), TF89 为杂合子, 经克隆后得到 2 个单倍型 TF89c3 (登录号: DQ323060) 和 TF89c7 (登录号: DQ323062). 3 个单倍型序列与从 GenBank 获得的日本松口蘑 10 条单倍型序列构建的系统发育树见图 2. 结果显示, 云南松口蘑的 3 条单倍型序列与日本松口蘑处在同一个进化枝上, 这表明云南松口蘑与日本松口蘑是高度同源的. 对比 Guerin-Laguette 等人^[8]对日本松口蘑 IGS *Cfr13* 酶切研究的结果, 并结合 IGS 序列的比较分析发现, 云南松口蘑的 55 个子实体为 IGS *Cfr13* 酶切 A 类型, 子实体 TF89 为 C 类型.

2.2 IRAP 分析

从图 3 和 4 可以看出, 云南松口蘑不同居群间的亲缘关系聚类, 同一地区间的差异极小, 如迪庆州的维西、中甸、德钦 3 个县居群在 $D = 0.0001$ 处聚为一枝; 丽江与大理州的永平、剑川在 $D = 0.0000$ 处聚为一枝; 而保山的龙陵与临沧地区的临沧、楚雄州南

表 1 云南省松口蘑样品来源

松口蘑子实体	地区	县	方位
TF 31~35	迪庆藏族自治州	维西县	滇西北
TF 41, TF 43~46	迪庆藏族自治州	中甸县	
TF 100, TF 102~106	迪庆藏族自治州	德钦县	
TF 51, TF 53~56	丽江地区		滇西
TF 61, 62, TF 65, TF 66	大理白族自治州	永平县	
TF 84, TF 87~89	大理白族自治州	剑川县	
TF 127	保山市	龙陵县	
TF 110, TF 112~114, TF 116	怒江傈僳族自治州	兰坪县	
TF 134~136	临沧地区	临沧县	滇中
TF 74~76, TF 78, TF 79	楚雄彝族自治州	南华县	
TF 154, TF 156~159	楚雄彝族自治州	禄丰县	
TF 94, TF 97~99	昆明市	禄劝县	
TF 140~142, TF 153	玉溪市	易门县	

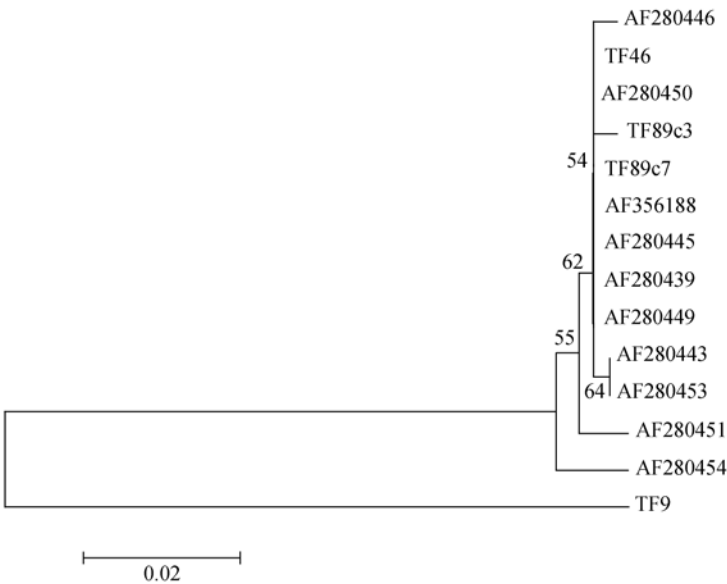


图 2 云南松口蘑与日本松口蘑的 IGS 序列的邻接树

AF280439, AF280443, AF280445, AF280446, AF280449, AF280450, AF280451, AF280453, AF280454 和 AF356188 是日本松口蘑; TF49, TF89c3 和 TF89c7 是云南松口蘑; TF9 是云南假松口蘑, 也是外群

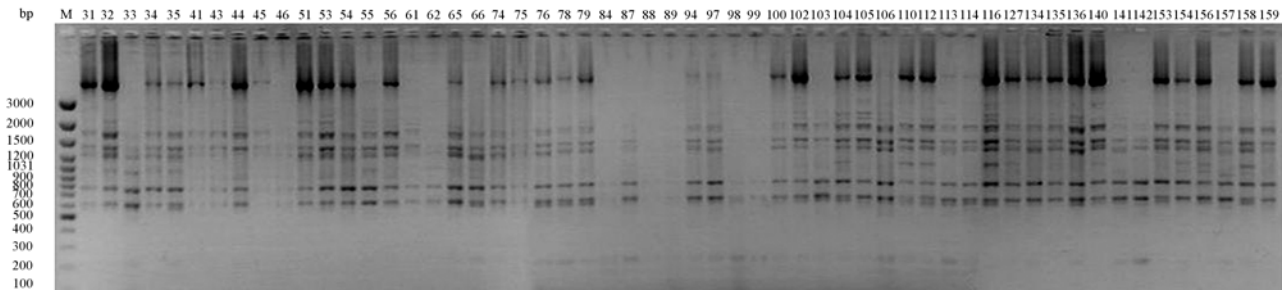


图 3 云南松口蘑反转录转座子 PCR 图谱

M 示 DNA Marker; 数字为样品编号

表 2 13 个松口蘑居群遗传多样性与遗传结构^{a)}

居群	PPB(%)	N_a	N_e	H	I	H_t	H_s	G_{st}	N_m
维西	11.11	1.1111	1.1105	0.0554	0.0769	0.0554	0.0527	0.0464	10.2779
中甸	11.11	1.1111	1.1039	0.0537	0.0751				
丽江	11.11	1.1111	1.1039	0.0537	0.0751				
永平	11.11	1.1111	1.1111	0.0556	0.0770				
南华	11.11	1.1111	1.1059	0.0542	0.0757				
剑川	11.11	1.1111	1.1111	0.0556	0.0770				
禄劝	11.11	1.1111	1.0965	0.0517	0.0731				
德钦	11.11	1.1111	1.0986	0.0522	0.0737				
兰坪	11.11	1.1111	1.1087	0.0549	0.0764				
龙陵	11.11	1.1111	1.0786	0.0460	0.0672				
临沧	11.11	1.1111	1.0786	0.0460	0.0672				
玉溪	11.11	1.1111	1.0965	0.0517	0.0731				
禄丰	11.11	1.1111	1.1059	0.0542	0.0757				

a) N_a , 观察的等位基因数量; N_e , 有效等位基因数量; H , Nei 基因多样性^[12], I , Shannon 多样性指数^[13]; G_{st} , Nei 基因差异系数; N_m , 从 G_{st} 的基因流估计

表 3 松口蘑 13 个居群 Nei's 遗传一致度(上三角)和遗传距离(下三角)

pop ID	维西	中甸	丽江	永平	南华	剑川	禄劝	德钦	兰坪	龙陵	临沧	玉溪	禄丰
维西	****	1.0000	0.9990	0.9990	0.9966	0.9990	0.9941	0.9999	0.9998	0.9896	0.9896	0.9941	0.9966
中甸	0.0000	****	0.9990	0.9990	0.9966	0.9990	0.9941	0.9999	0.9998	0.9896	0.9896	0.9941	0.9966
丽江	0.0010	0.0010	****	1.0000	0.9993	1.0000	0.9979	0.9983	0.9997	0.9950	0.9950	0.9979	0.9993
永平	0.0010	0.0010	0.0000	****	0.9993	1.0000	0.9979	0.9983	0.9997	0.9950	0.9950	0.9979	0.9993
南华	0.0034	0.0034	0.0007	0.0007	****	0.9993	0.9996	0.9953	0.9980	0.9980	0.9980	0.9996	1.0000
剑川	0.0010	0.0010	0.0000	0.0000	0.0007	****	0.9979	0.9983	0.9997	0.9950	0.9950	0.9979	0.9993
禄劝	0.0059	0.0059	0.0021	0.0021	0.0004	0.0021	****	0.9924	0.9960	0.9994	0.9994	1.0000	0.9996
德钦	0.0001	0.0001	0.0017	0.0017	0.0047	0.0017	0.0076	****	0.9994	0.9873	0.9873	0.9924	0.9953
兰坪	0.0002	0.0002	0.0003	0.0003	0.0020	0.0003	0.0040	0.0006	****	0.9921	0.9921	0.9960	0.9980
龙陵	0.0105	0.0105	0.0050	0.0050	0.0020	0.0050	0.0006	0.0127	0.0079	****	1.0000	0.9994	0.9980
临沧	0.0105	0.0105	0.0050	0.0050	0.0020	0.0050	0.0006	0.0127	0.0079	0.0000	****	0.9994	0.9980
玉溪	0.0059	0.0059	0.0021	0.0021	0.0004	0.0021	0.0000	0.0076	0.0040	0.0006	0.0006	****	0.9996
禄丰	0.0034	0.0034	0.0007	0.0007	0.0000	0.0007	0.0004	0.0047	0.0020	0.0020	0.0020	0.0004	****

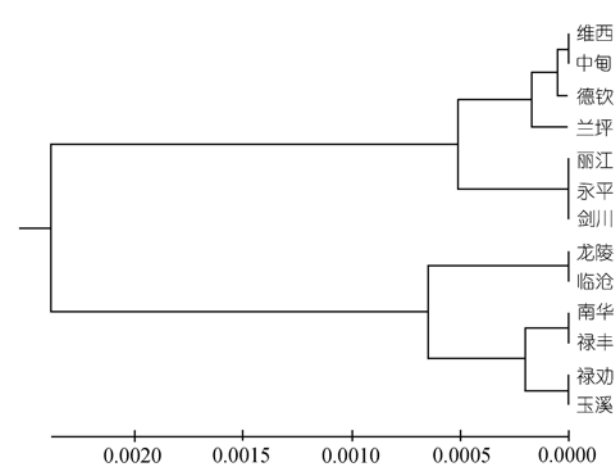


图 4 13 个松口蘑居群间的遗传聚类图

华、禄丰, 昆明地区的禄劝、玉溪地区都在 $D =$

0.0000 处聚为一枝. 在大类的划分上, 似乎与海拔的高低有关, 可能也与该区的(南北)地理有关. 如海拔较高的迪庆与怒江的兰坪(海拔 2500~3500 m)在约 $D = 0.0002$ 处聚为一枝, 再在 $D = 0.0005$ 处与丽江、大理(海拔 2500~2900 m)的合为一枝; 昆明(海拔 1700~1900 m)与楚雄(海拔 1900~2100 m)在约 $D = 0.0002$ 处聚为一枝, 再在约 $D = 0.0007$ 处与保山(海拔 2000~2500 m)、临沧(海拔 2100~2600 m)的聚为一枝; 海拔稍高与海拔稍低的又在 $D = 0.0023$ 处合并.

从表 2 可以看出, 云南省松口蘑不同居群间具有遗传变异性, 分布于维西、中甸、丽江、永平、南华、剑川、禄劝、德钦、兰坪、龙陵、临沧、玉溪和禄丰 13 个县的居群, 具有很高的相似性, 其多态条带比率(PPB)均为 11.11%; 其中平均每个位点的观测等位基因数为 1.1111, 平均每个位点的有效等位基因数为

1.1105; Shannon 多样性指数(H')估计的种内总遗传多样性为 0.0769, 居群内的遗传多样性为 0.0741, 表明在总的遗传变异中, 有 96.4%存在于居群内, 仅有 3.6%存在于居群间; 由 Nei 指数估计的种内总基因多样性(H_s)为 0.0554, 居群内基因多样性(H_d)为 0.0527, 居群间的基因分化系数(G_{st})为 0.0464, 表明有 95.36%的基因多样性存在于居群内, 有 4.64%存在于居群间; N_m 值表明, 居群间的每代迁移数为 10.2779, 居群间存在广泛的基因交流。

可见, 松口蘑总的遗传变异很小, 微小的变化由居群内不同的个体产生。这从表 3 可以看出, 13 个县的居群间的相似系数都在 99%以上。

3 讨论

云南省松口蘑的ITS序列只有一种单倍型, 我们的这一研究结果与 Matsushita 等人 [14] 完全一致。Guerin-Laguette 等人 [8] 应用 *Cfr13* 酶对 IGS1 进行了限制型酶切研究, 发现日本具有 8 个酶切类型; 2005 年 Matsushita 等人 [14] 同样应用 *Cfr13* 酶对来自中国吉林的 4 个子实体和云南的 12 株菌种的 IGS1 进行了限制型酶切研究, 结果发现吉林的 4 个松口蘑子实体就有 3 种酶切类型(A, B, C), 而在云南松口蘑中只检测到 A 类型。A 类型占日本松口蘑的 66.67%, 是日本松口蘑的主要酶切类型。本研究发现, 云南松口蘑的 IGS1 序列具有 3 个单倍型, 98.21% (55/56) 为同一单倍型, 经序列比对为 *Cfr13* 酶切 IGS1 A 类型, 另一个为 C 类型(1/56)。C 类型经克隆后呈现 2 个单倍型。我们的研究结果提示云南松口蘑的遗传变异较低。松口蘑主要与松科植物共生, 吉林长白山地区和日本的最主要寄主为赤松 (*P. densiflora*) [15,16], 而云南为云南松 (*P. yunnanensis*)。上述差异是否由于松口蘑的寄主不同而产生, 还值得深入研究。

有学者猜测, 在我国西南部的横断山区东南部(青藏高原东南部、四川西部、云南中部及西北部、贵州西北部)三角地区, 很可能是松茸群的现代分布中心 [4], 而 Chapel 和 Garbelotto [17] 则报道, 亚洲松口蘑可能是由北美西部通过白令海峡迁移进入。一般而言, 物种的起源中心相比其他地区会有相对较高的遗传多样性 [18]。就目前我们对云南松口蘑的ITS序列、IGS序列和IRAP的研究表明, 由于云南松口蘑和日本松口蘑主要遗传类型具有较高的同源性。云南松口蘑表现出较低的遗传多样性, 而我国吉林和日

本松口蘑却表现较高的遗传多态性。因此, 我们认为云南可能不是松口蘑的起源地。

致谢 感谢陈善元博士提供的宝贵建议。

参 考 文 献

- Gill W M, Lapeyrie F, Gomi T, et al. *Tricholoma matsutake*-an assessment of *in situ* and *in vitro* infection by observing cleared and stained whole roots. *Mycorrhiza*, 1999, 9: 227—231 [DOI]
- Yamada A, Kobayashi H, Murata H. *Tricholoma matsutake* IFO6933 and IFO30604, “matsutake” isolates that have been maintained on slants and widely used *in vitro* for a quarter to half a century, can form ectomycorrhiza in *Pinus densiflora*. *Mycoscience*, 2003, 44: 249—251
- 弓明钦, 王凤珍, 陈羽, 等. 保护松茸生态环境促进松茸可持续发展——关于恢复与发展云南松茸的探讨. *林业科学研究*, 2000, 13(5): 562—567
- 刘培贵, 袁明生, 王向华, 等. 松茸群生物资源及其合理利用与有效保护. *自然资源学报*, 1999, 14 (3): 245—252
- Horton T R. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: Variation in ITS at a local scale. *Plant Soil*, 2002, 244: 29—39 [DOI]
- 傅祿敏, 李玉花. 松口蘑的研究热点. *食用菌学报*, 2003, 10(3): 49—55
- James T Y, Moncalvo J M, Li S, et al. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics*, 2001, 157: 149—161
- Guerin-Laguette A, Matsushita N, Kikuchi K, et al. Identification of a prevalent *Tricholoma matsutake* ribotype in Japan by rDNA IGS1 spacer characterization. *Mycol Res*, 2000, 106: 435—443 [DOI]
- Kalendar R, Grob T, Regina M, et al. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 704—711 [DOI]
- Murata H, Babasaki K, Yamada A. Highly polymorphic DNA markers to specify strains of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* based on σ marY1, the long terminal repeat of gypsy-type retroelement marY1. *Mycorrhiza*, 2005, 15: 179—186 [DOI]
- 沙涛, 丁骅孙, 李觅, 等. 松口蘑与假松口蘑 ITS 序列测定和分析比较. *菌物学报*, 2005, 24(1): 48—52
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, 70: 3321—3323
- Lewontin R C. Population genetics. *Annu Rev Genet*, 1973, 7: 1—17
- Matsushita N, Kikuchi K, Sasaki Y, et al. Genetic relationship of *Tricholoma matsutake* and *T. nauseosum* from the northern hemisphere based on analyses of ribosomal DNA spacer regions. *Mycoscience*, 2005, 46: 90—96 [DOI]
- 傅伟杰, 许广波, 刘继生, 等. 长白山区松口蘑分布及生态研究. *食用菌学报*, 1996, 3(3): 46—50
- Lian C L, Narimatsu M, Nara K, et al. *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytol*, 2006, 171: 825—836 [DOI]
- Chapela I H, Garbelotto M. Phylogeography and evolution in *matsutake* and close allies inferred by analyses of ITS sequences and AFLPs. *Mycologia*, 2004, 96: 730—741.
- 陈善元, 张亚平. 家养动物起源研究的遗传学方法及其应用. *科学通报*, 2006, 51(21): 2469—2475