

3 讨论

3.1 覆膜既提高了土壤温度,又保存了土壤水分,同时防止了雨水对土壤养分的淋溶,因此对当归的株高、干物质积累都产生了较大的影响。特别是黑色地膜覆盖将当归地上部分干物质迅速积累期延长了 10 d 左右,这对于增加植株的光合能力有重要意义。而垄作和沟植虽然对株高没有产生明显的影响,但是由于沟植能提高对雨水的集聚和利用,垄作能接受更多的光照,增加光合作用面积,同时其土壤温度也相对较高,因此这两个处理也对当归地上部分产生了延缓衰老的作用,同时也增加了干物质在根部的积累。

3.2 当归麻口病是影响当归产量和品质的一个重要因素,有研究认为是由当归茎线虫引起的^[8],在土壤中温度和湿度是影响线虫的重要因素,土壤的温、湿度越高,线虫越活跃。垄作、黑色地膜覆盖、沟植可能是因为对土壤温湿度及土壤结构产生了影响,抑制了线虫的活动,表现出了一定的抗病性,但试验表明各处理间的麻口病发病普遍率和病情指数无显著差异,因此栽培方式对当归麻口病的影响还需做进一步研究。

3.3 试验表明,只要对传统的栽培技术进行改良均能提高当归产量,尤其是全生育期覆黑色地膜的处理,由于对地上部和根部当归干物质积累都产生了有利影响,因此产量最高。据实地观察,用黑色地膜

覆盖的处理膜下行间不长杂草,这不仅对当归高产有重要意义而且还节省了劳力和种植成本,因此,在当归高产优质高效栽培中应大力推广黑色地膜覆盖栽培技术。

References:

- [1] Zhou J H, Wang Y M. *Chinese Pharmacology* (中国药理学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.
- [2] Ye Y N, Koo M W, Li Y, et al. *Angelica sinensis* modulates migration and proliferation of gastric epithelial cells [J]. *Life Sci*, 2001, 68: 961-968.
- [3] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1992.
- [4] Zhao Y J, Chen S B, Gao G Y. Study on the physicochemical properties of cultivated soil of genuine crude and no-enuine crude *Chinese Angelica* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(1): 19.
- [5] Ma R J, Wang X, Chen X L. Advance in research of *Angelica sinensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (2): 280-282.
- [6] Chen C Y. Trace elements in Taiwanese health food, *Angelica keiskei*, and other products [J]. *Food Chem*, 2004, 84: 545-549.
- [7] Lu W D. *SPSS Statistic Analysis for Windows* (SPSS for Windows 统计分析) [M]. Beijing: Electronic Industry Press, 2000.
- [8] Chai Z X, Li J H, Li Y D. Spatial pattern of angelica root and its sampling techniques [J]. *Plant Protect* (植物保护), 2004, 30(3): 59-61.
- [9] Zhang G X. *Chinese Angelica* (当归) [M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1989.

刺革菌科 4 种药用真菌的 ITS 区序列分析

曹小迎, 蒋继宏*, 孙 勇, 陈凤美, 刘 群

(徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要:目的 对刺革菌科桦褐孔菌、缝裂木层孔菌、松针层孔菌及鲍姆木层孔菌 4 种药用真菌 rDNA ITS 片段进行分析,探讨该片段在中外同类真菌的系统学及鉴别研究意义。方法 对这 4 种药用真菌的 rDNA ITS 区进行了 PCR 扩增、测序,运用 Clustal X、Mega 3.1 等软件对 ITS 区序列进行分析。结果 获得 rDNA ITS1、ITS2 和 5.8S rDNA 完整序列,桦褐孔菌、缝裂木层孔菌、松针层孔菌、鲍姆木层孔菌的 ITS1 序列长度范围为 244~324 bp, ITS2 序列长度范围为 229~274 bp。以圆瘤孢多孔菌(DQ200923)为外类群,用分子进化遗传分析软件得到了包括这 4 种药用真菌及 GenBank 中 3 个与这 4 种中 3 种相应真菌的 ITS 序列的系统发育树。这一分析结果与来自形态学的鉴别结果相吻合。结论 ITS 序列可作为这 4 种药用真菌分子鉴定的依据。

关键词:刺革菌科;内转录间隔区;序列分析

中图分类号:R282.710.3

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)02-0261-04

收稿日期:2006-04-11

基金项目:江苏省药用植物生物技术重点实验室开放课题(02AXL12)

作者简介:曹小迎,女,江苏南通人,博士研究生,主要从事药用植物生物技术研究。

*通讯作者 蒋继宏 Tel:(0516)83403515 E-mail:jhjiang@xznz.edu.cn

ITS Sequence analysis on four fungi of Hymenochaetaceae

CAO Xiao-ying, JIANG Ji-hong, SUN Yong, CHEN Feng-mei, LIU Qun

(Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: Objective To analyze the rDNA ITS sequences of *Inonotus obliquus*, *Phellinus rimosus*, *Porodaedalea chrysoloma*, and *Inonotus baumii*, and study the utility in phylogenesis and identification of these strains between China and foreign countries. **Methods** The ITS gene fragments of the four fungi were PCR amplified and sequenced. The rDNA ITS regions were analyzed by means of the software of Clustal X and Mega 3.1. **Results** The entire sequences of rDNA ITS1, ITS2, and 5.8S rDNA were obtained. The sequences of ITS1 in these four fungi ranged from 244 to 324 bp in length and those of ITS2 from 229 to 274 bp. The phylogenetic relationships of four sequenced ITS sequences together with those of three selected fungi and *Bondarzewia montana* (DQ200923) downloaded from GenBank were constructed. *B. montana* was designated as outgroup. The analysis result was consistent with those from morphology. **Conclusion** The ITS sequence can be used to identify the molecule of these four medicinal fungi.

Key words: Hymenochaetaceae; internal transcribed spacers (ITS); sequence analysis

木层孔菌属(*Phellinus* Quél.)和纤孔菌属(*Inonotus* Karst. em. Imaz.),属于非褶菌目(Aphyllophorales)的刺革菌科(Hymenochaetaceae),是多孔菌类中非常重要的两属。本研究中的4个种分别为桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat、缝裂木层孔菌 *Phellinus rimosus* (Berk.) Pilat、松针层孔菌 *Porodaedalea chrysoloma* (Fr.) Fiasson & Niemela 和鲍姆木层孔菌 *I. baumii* (Pilat) T. Wagner & M. Fisch, 分属刺革菌科的3个属。这4个种在属的分类上一直很混乱,如松针层孔菌,Donk 于1971年将它归为木层孔菌属^[1],甚至到现在还有人这么认为。但是在1984年和1989年 Fiasson^[2]与 Imaze-ki^[3]将它命名为 *Porodaedalea chrysoloma*, 并为大多数人接受。而鲍姆木层孔菌自 Pilát 于1932年将它命名为 *Phellinus baumii*^[4],到现在还有人认为它属于木层孔菌属。2002年 Wagner 等通过形态学结合分子鉴定将它归为纤孔菌属^[5]。这4个真菌都属于药用真菌,其中鲍姆木层孔菌和缝裂木层孔菌具有抗氧化和游离基清除活性^[6,7]。缝裂木层孔菌还具有抗肿瘤活性^[8]。桦褐孔菌具有抗肿瘤^[9,10]、抗衰老、增强免疫^[11]、防治糖尿病等作用。而松针层孔菌主要用于治疗食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、子宫癌等。ITS1和ITS2是中度保守区域,其保守性基本上表现为种内相对一致,种间差异比较明显。这个特点使ITS广泛应用于真菌物种的分子鉴定以及属内物种间或种内差异较明显的菌群间的系统发育关系分析^[12~15]。本实验报道了采自黑龙江长白山桦褐孔菌、缝裂木层孔菌、松针层孔菌和鲍

姆木层孔菌的ITS序列及其相关分析。

1 材料与方法

1.1 材料来源:桦褐孔菌 *Inonotus obliquus*、缝裂木层孔菌 *Phellinus rimosus*、松针层孔菌 *Porodaedalea chrysoloma* 和鲍姆木层孔菌 *Inonotus baumii* 4种药用真菌采自黑龙江长白山,经 Prot. Margarita A. Bondartseva 鉴定。菌种由江苏省药用植物生物技术重点实验室提供。

1.2 真菌总DNA的提取:称取0.5g液体培养基培养的真菌菌丝体放于研钵中,用液氮速冻后,迅速研磨成细粉,分装于1.5 mL Eppendorf 管中;加入1 mL DNA 提取缓冲液(500 mmol/L NaCl、100 mmol/L Tris-Cl pH 8.0、2.0 mmol/L EDTA pH 8.0)用力摇动使其充分混匀后,8 000×g,15℃离心5 min;弃上清液,重新加入1 mL DNA 提取缓冲液,充分混匀,8 000×g,15℃离心5 min;弃上清液,加入1 mL 65℃预热的DNA裂解缓冲液(700 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-Cl pH 8.0、20 mmol/L EDTA pH 8.0、5% CTAB、1% β-巯基乙醇),悬浮沉淀,充分混匀,放入65℃水浴30 min,不时颠倒混匀;12 000×g,15℃离心5 min;取上清液,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),轻轻颠倒混匀至溶液呈乳浊状,静置15 min;12 000×g,15℃离心5 min;取上清液,加入等体积的异丙醇,充分混匀,4℃静置30 min;12 000×g,15℃离心10 min;弃上清液,加入75%乙醇洗两次;12 000×g,15℃离心3 min;弃上清液,自然风干直至无酒精味;加入100 μL TE 缓冲液,放在4℃待用或-20

℃ 储存。

1.3 ITS 序列的扩增、纯化:PCR 扩增反应在 AB 公司的 2400 型 PCR 扩增仪上进行,反应体系为 25 μL,内含:双链 DNA 模板(约 25 ng),MgCl₂ (25 mmol/L),dNTP (200 μmol/L),正反引物(5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3', 5' TC-CTCC-GCTTATTGATATGC 3') 2 μmol/L, *Taq* DNA 聚合酶(15 U),10×PCR Buffer(100 mmol/L Tris HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 0.01% gelatin)。扩增反应程序:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 90 s,循环 35 次;72℃ 延伸 7 min。ITS 扩增产物电泳后用上海华舜生物工程有限公司生产的胶回收试剂盒回收纯化。

1.4 ITS 序列的克隆和测序:将纯化后的产物连接到 pGEM-T 载体上,转入制备好的大肠杆菌 DH5α 的感受态中,通过蓝白斑筛选阳性克隆,通过 PCR 检测是否有插入片段。有插入片段的阳性克隆送上 海华诺生物有限公司测序。

1.5 DNA 序列的对位排列和系统树的构建:ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 序列范围根据所用引物以及美国生物信息中心(NCBI)网站提供的刺革菌

科其他真菌的相关序列确定。测定的 DNA 序列用 ClustalX 软件进行对位排列。并用分子进化遗传分析软件(MEGA version 3.1)构建分子系统树。

2 结果与分析

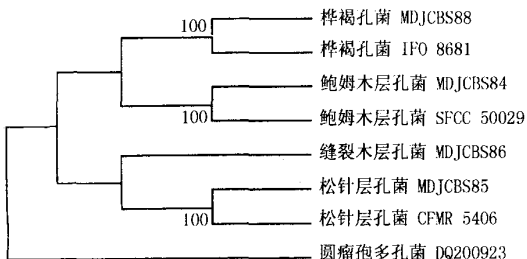
2.1 刺革菌科 4 个种的 ITS 序列的长度和 G+C 的量:本试验所测样品的 ITS 序列已登陆 GenBank (注册登记号见表 1)。测得的片段包括 ITS1、5.8S 和 ITS2 全长序列以及 18S、26S 部分序列,长度为 677~780 bp。从图 1 和表 1 可见:4 种药用真菌的 ITS1 长度在 244~324 bp,最大相差 80 bp,平均约为 292 bp,5.8S rRNA 均为 147 bp,且完全一致,说明该区比较保守;ITS2 长度在 229~274 bp,最大相差 45 bp,平均长度约为 254 bp。

2.2 刺革菌科 4 个种的 ITS 序列的遗传距离:本研究中 4 种药用真菌的 ITS1 和 ITS2 区序列差异性见表 2。表中 ITS1 和 ITS2 的差异性范围分别为 23.4%~79.3%,22.4%~28%,说明 ITS1 较 ITS2 的变异幅度大。ITS1 差异最小的出现在缝裂木层孔菌与松针层孔菌之间,而 ITS2 差异最小的出现在缝裂木层孔菌与鲍姆木层孔菌之间,ITS1 差异最大的出现在鲍姆木层孔菌与缝裂木层孔菌之间,ITS2 差异最大的出现在松针层孔菌与鲍姆木层孔菌之间。

表 1 刺革菌科 ITS1 和 ITS2 序列 G+C 量、长度及在 GenBank 的注册登记号

Table 1 G+C Contents and lengths of ITS1 and ITS2 of four fungi in Hymenochaetaceae, and their registered numbers in GenBank

菌种名称	ITS1		5.8S rDNA		ITS2		注册登记号
	长度/bp	G+C 量/%	长度/bp	G+C 量/%	长度/bp	G+C 量/%	
桦褐孔菌	324	51	147	47	274	57	DQ103883
缝裂木层孔菌	244	48	147	47	252	48	DQ103885
松针层孔菌	287	47	147	47	229	46	DQ103886
鲍姆木层孔菌	311	47	147	47	261	50	DQ103887



分支上的数字是1 000次重复抽样检测的靴带值(%)

Sequence numbers on branches are bootstrap values (%) of 1 000 replications

图 1 以圆瘤孢多孔菌为外类群基于 ITS1、5.8S 和 ITS2 序列分析构建的系统树

Fig. 1 Dendrogram of ITS1, 5.8 S, and ITS2 sequences with *B. montana* as outgroup

表 2 刺革菌科 4 种真菌间遗传距离

Table 2 Genetic distances of four fungi in Hymenochaetaceae

	缝裂木层孔菌	鲍姆木层孔菌	松针层孔菌	桦褐孔菌
缝裂木层孔菌		0.224	0.225	0.234
鲍姆木层孔菌	0.793		0.280	0.262
松针层孔菌	0.234	0.595		0.243
桦褐孔菌	0.385	0.474	0.365	

2.3 刺革菌科 4 个种与 GenBank 中相应种的 ITS 序列比较:从 GenBank 中下载了 3 条分别与这 4 种药用真菌中的 3 个同名的 ITS 序列及一条外源 ITS 序列,通过 ClustalX 对这 8 条序列进行比对,运用分子进化遗传分析软件 MEGA version 3.1 中的最大简约法(maximum parsimony)构建系统发育树,见图 1。除本研究所测的 4 条序列之外,还包括桦褐

孔菌 IFO 8681 (AY558593)、松针层孔菌 CFMR 5406 (AY558612)、鲍姆木层孔菌 SFCC 50029 (AY558608) 和外源序列圆瘤孢多孔菌 *Bondarzewia montana* (DQ200923)。获得的最大简约树其长度为 286 步,一致性指数为 0.86,保留指数为 0.79,复定一致性指数为 0.80,且多数分支具有很好的自举支持。从树上可以看出,桦褐孔菌与朝鲜的桦褐孔菌 IFO8681 聚在一起,自举支持率为 100%,将其定名为桦褐孔菌 MDJCBS88。鲍姆木层孔菌与朝鲜的鲍姆木层孔菌 SFCC 50029 (AY558608) 聚在一起,自举支持率达到 100%,定名为鲍姆木层孔菌 MDJCBS84。这 4 个真菌又聚为一大支,因为它们同属纤孔菌属,松针层孔菌与松针层孔菌 CFMR5406 聚在一起,自举支持率为 100%,定名为松针层孔菌 MDJCBS85。同时与缝裂木层孔菌聚成一大支,说明缝裂木层孔菌与松针层孔菌的关系较近。将缝裂木层孔菌定为缝裂木层孔菌 MDJCBS86。

3 讨论

已报道的刺革菌科的真菌,主要根据子实体的外部形态和内部微观结构进行分类鉴定。但在生产实践上,立木或木材腐朽往往不产生子实体,在人工培养基上也很少产生子实体,很难鉴定出这些菌的种类。本实验采自我国黑龙江长白山桦褐孔菌、缝裂木层孔菌、松针层孔菌及鲍姆木层孔菌 4 种药用真菌的核糖体 DNA 中的内转录间隔区(ITS)序列进行了测定,并与得到普遍承认的国外相应菌种的 ITS 进行了比较,运用 ClustalX 软件和 MEGA version 3.1 分子进化遗传分析软件进行的系统发育分析得到了较好的结果:4 种药用真菌中除缝裂木层孔菌没查到相应的菌种 ITS 序列外,其他 3 种均与国外相应菌种的 ITS 序列聚在一起。说明这 4 种药用真菌与形态学上的鉴定结果一致,ITS 序列测定可作为刺革菌科一些菌种的分类鉴定依据。

References:

- [1] Donk M A. Proceedings of the koninklijke nederlandse akademie van wetenschappen [J]. *Series C: Biol Med Sci*,

1971, 74(1): 39.

- [2] Niemelä T F. The hymenochaetaceae; a revision of the European poroid taxa [J]. *Karstenia*, 1984, 24: 14-28.
- [3] Imazeki R, Hongo T. *Colored Illustrations of Mushrooms of Japan Holokusha* [M]. Vol 1. Osaka: Hoikusha Publishing Co., Ltd. 1989.
- [4] Pilát A. Additamenta ad floram Sibiriae Asiaeque orientalis mycologicam. Pars prima: Polyporaceae [J]. *Bull Trimestriel Société Mycol France*, 1932, 48(1): 25.
- [5] Wagner T, Fischer M. Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera [J]. *Mycologia*, 2002, 94: 998-1016.
- [6] Shon M Y, Kim T H, Sung N J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts [J]. *Food Chem*, 2003, 82: 593-597.
- [7] Ajith T A, Janardhanan K K. Antioxidant and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 81: 387-391.
- [8] Ajith T A, Janardhanan K K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84: 157-162.
- [9] Konopa I, Ledochowski Z, Nazarewicz T. Studies on antineoplastic properties of *Poria obliqua*. II. Studies on the effect of *Poria obliqua* on the growth of transplanted tumors in animals [J]. *Nowotwory*, 1961, 11: 401-411.
- [10] Ichimura T, Watanabe O, Maruyama S. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia oblique* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(3): 575-577.
- [11] Jarosz A, Skorska M, Rzymowska I. Effect of the extracts from fungus *Inonotus obliquus* on catalase level in HeLa and nocardia cells [J]. *Acta Biochim Pol*, 1990, 37(1): 149-151.
- [12] Zhao H, Li G Q, Guo J, et al. Sequence analysis of ITS region for *Sclerotinia nivalis* [J]. *Chem Bioengineer* (化学与生物工程), 2005(12): 23-25.
- [13] Zheng H B, Li X Y, Lü Z Z, et al. A study of phylogenetic relationship of *Pleurotus ferulae*, *Pleurotus nebrodensis* and *Pleurotus eryngii* [J]. *Acta Edib Fungi* (食用菌学报), 2005(4): 1-4.
- [14] Thomas K A, Peintner U, Moser M M, et al. *Anamika*, a new mycorrhizal genus of Cortinariaceae from India and its phylogenetic position based on ITS and LSU sequences [J]. *Mycological Res*, 2002, 106(2): 245-251.
- [15] Martin F, Diez J, Dell B, et al. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences [J]. *New Phytolog*, 2002, 153(2): 345-357.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青