

ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用

陈剑山^{1,2}, 郑服丛^{2*}

(1. 华南热带农业大学环境与植物保护学院, 海南儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571737)

摘要 综述了ITS 序列分析技术的原理、特点及近年来在病原真菌分类鉴定上的应用, 同时对ITS 序列分析技术在真菌分类鉴定研究领域中的前景进行了展望。

关键词 ITS; 分类; 鉴定

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)13-03785-02

Application of ITS Sequences in Fungi Classification and Identification

CHEN Jian-shan et al (Environment and Plant Protection College, SCUTA, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract The principle, characteristics and the application of ITS sequences in fungi classification and identification in recent years were summarized. And its prospect was put forward.

Key words ITS; Classification; Identification

真菌的分类鉴定是一项浩大的系统工程。传统的真菌分类学主要按照真菌的形态学、生理生化特点、抗原构造等特征。由于真菌的种类众多、个体多态性明显, 因此传统的分类学指标常会得出假阳性或假阴性结果, 给真菌的分类鉴定带来了一定的难度。而现代分子生物学技术, 特别是核酸分子生物学技术, 在1953年Watson和Grick提出DNA双螺旋结构以来得到迅速发展, 并且已应用到各个学科领域。分子生物学应用于真菌分类学必将产生重要的意义, 尤其在科研和发酵工业领域。目前应用于真菌分类研究的分子生物学技术主要有限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、DNA扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)和核糖rDNA内部转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)序列分析技术、扩增多态性DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)^[1]等。利用PCR扩增病原菌核糖体ITS(Internal Transcribed Spacer)基因区段进行真菌鉴定、检测及病害诊断的方法因其快速、准确、简便而得到迅速地发展。

1 ITS 序列分析的特征和结构

构成真核生物核糖体RNA(rRNA)有5.8S、17~18S(以下统称为18S)和25~28S(以下统称为28S)。对于大多数真核生物来说, 核糖体rRNA基因群的一个重复单位(rDNA)包括以下区段(按5'→3'方向): 非转录区(Non Transcribed Sequence), 简称NTS; 外转录间隔区(External Transcribed Spacer), 简称ETS; 18SrRNA基因, 简称18SrDNA; 内转录间隔区1(Internal Transcribed Spacer 1), 简称ITS1; 5.8SrRNA基因, 简称5.8SrDNA; 内转录间隔区2, 简称ITS2; 28SrRNA基因, 简称28SrDNA。ITS1和ITS2常被合称为ITS, 并且5.8S RNA基因也被包括在ITS之内^[2]。

核糖体内转录间隔区包含2个不同的非编码区域, 即ITS1和ITS4。ITS序列在物种属内、近缘属间乃至科内系统进化关系研究中有一定的价值。真菌核糖体基因由小的亚单元(18S)、ITS1区、5.8S区、ITS2区和大的亚单元(28S)构成(图1), 头尾串联形成重复序列, 一个基因组内有60~200

个拷贝。真菌ITS区域长度一般在650~750bp(碱基对)^[3]。

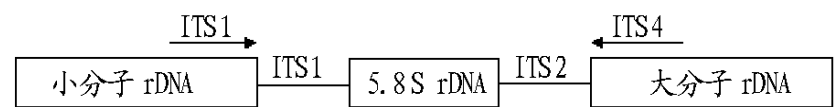


图1 ITS 结构

2 ITS 序列分析的应用原理

rDNA上的5.8S、18S和28SrRNA基因有极大的保守性, 即存在着广泛的异种同源性。而由于ITS区不加入成熟核糖体, 所以ITS片段在进化过程中承受的自然选择压力非常小, 因此能容忍更多的变异。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, 即使是亲缘关系非常接近的2个种都能在ITS序列上表现出差异, 显示最近的进化特征^[4]。研究表明, ITS片段的进化速率是18SrDNA的10倍。这就是ITS序列在微生物种类鉴定和群落分析的理论基础^[5]。

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。这种特点使ITS适合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。由于ITS的序列分析能实质性地反映出属间、种间以及菌株间的碱基对差异, 此外ITS序列片段较小、易于分析, 目前已被广泛应用于真菌属内不同种间或近似属间的系统发育研究中。Yan等利用ITS序列分析和比较形态学研究了被一些人认为是同种异名的 *Phialophora americana* 和 *P. verrucosa*, 得出了它们是不同的种的结论^[6]。章桂明根据对小麦印度腥黑粉菌(*Tilletia indica*)及其近似种的ITS序列分析和形态学比较结果, 提出黑麦草腥黑粉菌(*T. walkeri*)与*T. indica*应是同一个种, 建议将黑麦草腥黑粉菌列为我国对外检疫性有害生物^[7]。ITS的序列分析还有效地解决 *Lentinula*、*Suillus*、*Tuber*、*Ceratocystis* 和 *Gdiodendron* 等真菌应用形态学特征进行分类所引起的纷争, 弥补了传统分类上的一些不足^[8-10]。张正光等对非洲菊根腐病原疫霉菌的形态特征、致病性及核糖体DNA-ITS序列进行分析, 表明分离菌株与GenBank中隐地疫霉的ITS序列的同源性均为99.87%, 仅有1个碱基的差异, 进一步明确从非洲菊腐烂病植株根部分离的病原菌为隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)^[11]。杨雅云等比较了马铃薯、番茄晚疫病菌的核糖体DNA ITS区段序列的差异, 发现不可交叉的2类菌株间的同源性为98.28%, 可交叉侵染的番茄菌株和马铃薯菌株之间

作者简介 陈剑山(1982-), 男, 福建莆田人, 硕士研究生, 研究方向: 分子植物病理学。* 通讯作者。

收稿日期 2006-12-21

的同源性为99.17%，说明相似的序列使得生物学特性也很相似，反之，同源性有差异的，在生物特性上也表现出一定差异^[12]。此外，ITS的序列分析还广泛应用于真菌的快速检测。杨腊英等通过比对所测序的香蕉炭疽菌与GenBank中炭疽菌属中其他几个种的ITS全序列，找出可用于检测香蕉炭疽菌的特异性引物，为香蕉炭疽菌株的快速、准确检测提供了必要的依据^[13]。

3 ITS 序列分析的方法学 ITS序列间的差异已经应用于真菌中很多属的系统发育研究。研究表明，该序列在研究属内和关系较近的属间关系时是十分有价值的，尤其在近似种的区别中。在种内，ITS序列对于揭示异域分布或间断分布种群的关系具有潜力。真菌rDNA ITS序列分析用于真菌系统分类通常通过多聚酶链式反应(PCR)技术实现。rDNA多复制的特性，有利于低浓度或被更高度降解的DNA样品中ITS区域的扩增。这有利于研究尚无任何rDNA序列资料的生物。根据这些基因上高度保守区段设计出通用引物，借助PCR技术扩增rDNA的目的片段。PCR技术在真菌分类、鉴定中与直接测序法相结合有很大的优越性^[14]：只需少量的DNA，每次扩增只需约0.1~10 ng；可对DNA的2条链测序，从而减少错误；可利用总DNA的较粗制备品；适合于自动测序仪进行测序。决定PCR技术应用效果的主要因素在于所选择的扩增区域变异是否适当，所以首先要选择合适的引物。

White等为真菌rRNA基因的ITS设计了3对特异引物，即ITS1、ITS4、ITS5，可用于大多数担子菌和子囊菌^[15]。这些引物也能扩增一些植物ITS区域。ITS1-F和ITS4-B是Gardes等为真菌和担子菌分别设计的特异引物^[16](表1)，能明显提高特异性。Munnisse等还为外生菌根粘花菇属(Hebeloma)的真菌及菌株鉴定设计并合成了特异引物^[17]。Kamel通过比较镰刀菌ITS区域序列而设计的镰刀菌特异引物对镰刀菌有着良好的特异性^[18]。引物ITS1和ITS2用于扩增18SrDNA和5.8SrDNA之间的转录间隔区ITS1，引物ITS3和ITS4用于扩增5.8SrDNA和28SrDNA之间的转录间隔区ITS2^[19]。

表1 用于扩增真菌ITS区域的常用引物

引物	序列(5'→3')	位置
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGGC	18 S
ITS1-F	CTTGGICATTTTAGAGGAAGTAA	18 S
ITS1-R	(TA) TGGT(CI) (AGI) (TQ) (TC) TAGAGGAAGTAA	18 S
ITS5	GGAAGTAAAAGTCAAGG	18 S
ITS4	TCCCTCCGCTTATTGATATGC	28 S
ITS4-B	CAGGAGACTGTGACACGGTCCAG	28 S
ITS4-R	CAGACTI(GA)TA(CI)ATGGTCCAG	28 S

真菌最终的分类鉴定有赖于序列的测定，特别是在ITS片段长度相等或相似的情况下，必须借助于详细的序列对比，分析被试菌种与基因序列库中已知菌种的同源性。由于没有多拷贝的干扰，每一个种或亚种就只有一个ITS序列。这可以作为该菌种的特征序列。通常ITS的扩增产物是多种片段的混合物，可以通过克隆实现分离，然后对每一个克隆都测序，也可以通过电泳分离获得所需长度的条带，胶回收

后直接测序。如果选择的引物将18S和ITS一起扩增，那么可以分析18S序列在较高级别上确定样品的归属，然后通过分析ITS序列将样品归类到种甚至亚种。通过对种间ITS序列相似性的比较，还可以设计出种特异性甚至亚种特异性的寡聚核苷酸探针，然后借助于分子杂交技术，分析菌群结构。

目前，以ITS序列作为分子标记的应用技术的最大限制是有的真菌由于进化顺序、变异，甚至分析方法等原因，在间隔区上表现的差异性较小，不适合于属内种及种群的标记。另外，在一些真菌的不同地理分布、不同寄生宿主型别的鉴定上也存在困难。由于并不是所有物种的18S和28SrRNA数据库都已经建立，许多数据还很缺乏，这样就导致不能很好地设计所需要的特异性引物，而有时候通用引物并不能很好地扩增出所需要的ITS片段，这样就必然影响ITS方法的应用。因此，分子生物学方法的建立和完善，都与其他数据的建立和其他技术的发展分不开^[20]。

4 展望

植物病原真菌的分类鉴定主要依据其营养体和子实体的形态特征。由于形态特征容易受到培养条件和其他因素的影响，而且许多子实体类型经常难以获得，这些都给鉴定工作带来困难。然而真菌DNA的碱基组成遗传稳定，不易受环境影响，而且在生活史任何阶段均可获得。ITS区域在不同菌株间存在丰富的变异。对ITS区进行序列分析不仅丰富了真核生物核糖体基因ITS的序列信息，为病原菌的分类鉴定及系统发育等研究提供了十分重要依据，而且为建立病原菌的分子监测与疫病的快速诊断技术奠定了基础，对植物病害的防治具有一定意义。随着分子生物学的飞速发展，近年来已发展的一些全新的DNA测序方法，如毛细管凝胶电泳法、阵列毛细管凝胶电泳法、超薄层凝胶板电泳法以及杂交法、质谱法、原子探针法、流动式单分子荧光检测法等，已应用到ITS序列分析中。

参考文献

- [1] 赵瑞琳. RAPD在真菌分类鉴定上的应用[J]. 热带农业科技, 2004, 27(3): 23-26.
- [2] 林晓民, 李振岐, 王少先. 真菌rDNA的特点及在外生菌根菌鉴定中的应用[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 120-125.
- [3] 赵杰. ITS序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用[J]. 陕西农业科学, 2004(4): 35-37.
- [4] 郑雪松, 杨虹, 李道棠, 等. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(6): 678-684.
- [5] LEBLOND BOURGET N, HERVE P, IRENE M, et al. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific bifidobacterium phylogeny[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 102-111.
- [6] YUAN G F, LIU C S, CHEN C C. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(6): 2384-2387.
- [7] 章桂明. 小麦印度腥黑粉菌及其近似种的分子系统发育分析和形态学比较[J]. 华南农业大学, 1999.
- [8] HBBERT D S, FUKUMASA NAKAI Y, TSUNEDA A, et al. Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences[J]. Mycologia, 1995, 87(5): 618-638.
- [9] CANDEBOEUF D, DUPRE C, DREVET P, et al. Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers[J]. Can J Bot, 1997, 75(1): 36-45.
- [10] HAMBLETON S, EGGER K N, CURRAH R S. The genus *Odozon*: species delimitation and phylogenetic relationships based on nuclear ribosomal DNA analysis[J]. Mycologia, 1998, 90(5): 851-869.
- [11] 张正光, 郭成宝, 王源超, 等. 非洲菊根腐病原的鉴定与ITS序列分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 392-396.
- [12] 杨雅云, 罗文富, 杨艳丽. 马铃薯及番茄晚疫病病原的核糖体DNA ITS

(上接第3786 页)

- 区段序列分析[J]. 云南农业大学学报,2005,20(2) :188- 192.
- [13] 杨腊英, 黄华平, 唐复润, 等. 香蕉炭疽菌rDNA ITS 区的分子鉴定与检测[J]. 植物病理学报,2006,36(3) :219- 225.
- [14] 张志华, 洪葵. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 华南热带农业大学学报,2006,12(2) :39- 43.
- [15] WHITE T J, BRUNST, LEES. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[C]//INNIS M A. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York Academic, 1990,315- 322.
- [16] GARDES M, BRUNST T D. ITS primer with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. *Molecular Ecology*, 1993(2) :113- 118.
- [17] MARMISSE R, DEHAUD J C, CASSELTON L A. DNA probes for species and strain identification in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma*[J]. *Mycological Research*, 1992,96 :161- 165.
- [18] KAMEL A, ABDELSALAM, MOHMED A, et al. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2003,2(4) :82- 85.
- [19] 王源超, 张正光, 郑小波. 核糖体基因ITS 作为苎麻疫霉、恶疫霉分类辅助性状的研究[J]. 菌物系统, 2000,19(4) :485- 491.
- [20] 徐田军, 刘楚吾, 刘丽, 等. 基因间隔序列(ITS) 在水产动物种质鉴定和遗传多样性分析中的应用[J]. 湛江海洋大学学报, 2006,26(1) :84- 88.