

土生空团菌 (*Cenococcum geophilum* Fr.) 18S rDNA 中的 I 型内含子

王亭, 陈立红*

内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019

摘要: 【目的】分析土生空团菌 [*Cenococcum geophilum* Fr. (*Cg*)] 18S rDNA 中 I 型内含子的核苷酸序列和二级结构特征, 探讨影响土生空团菌遗传多样性的因素。【方法】对 23 个 *Cg* 菌株 18S rDNA 的 3' 端进行 PCR 扩增, 对其中 14 个菌株的扩增片段测序。利用 MAGE version 4.0 软件构建 Neighbor-Joining 系统发育树, 利用 Mfold 预测内含子的二级结构。【结果】序列分析表明, 19 个中国菌株中 14 个在 18S rDNA 中有 I 型内含子。结合 GenBank 中的相关数据, 可知 *Cg* 菌株 18S rDNA 中内含子的序列长度为 488–590 nt, 显示出 92.3%–100% 的同源性。在其 5' 端序列比较保守, 在 3' 端序列差异较大。二级结构分析表明 *Cg* 菌株 18S rDNA 中的内含子都有 10 个配对区 (P1–P10), 在 P5 区域由 P5, P5a, P5b, P5c, P5d 组成, 在 P9 的 3' 端有 2 个配对区 (P9.1、P9.2)。【结论】来源于不同寄主及地域的 *Cg* 菌株有丰富的遗传多样性, 本文未发现地理因素和寄主来源对 *Cg* 的遗传分化有影响。

关键词: 土生空团菌, I 型内含子, 二级结构, 遗传多样性

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012)09-1059-10

I 型内含子是能够自我剪接的 RNA 分子, 它们在自然界广泛存在, 可分布于多种真核生物的细胞核、线粒体和叶绿体基因组中, 以及噬菌体和细菌的基因组中。细胞核中的 I 型内含子只分布于 rRNA 编码基因 (rDNA), 而细胞器中的 I 型内含子可分布于 rRNA、tRNA 和蛋白编码区^[1–2]。I 型内含子的核苷酸序列长度约为 250–500 nt, 序列保守性很小, 但在其剪接位点具有保守的序列特征; 其二级结构都具有 10 个保守的配对区, 在其核心结构中有高度保守区 P、Q、R 和 S^[3–5]。目前, 有许多关于 rDNA 中 I 型内含子的报道, 在国外 rDNA 中的 I 型内含子已被应用于真菌的遗传多态性及分子进化的研究

中^[6–10]。在国内也有报道, 如周启明等对蜈蚣衣科真菌 18S rDNA 中 I 型内含子的分布模式进行了研究; 曹叔楠等对地衣型真菌 18S rDNA 中 I 型内含子进行分析, 探讨了其在地衣型真菌系统发育研究中的应用; 陈名军等利用 28S rDNA 中 I 型内含子来分析球孢白僵菌的种群遗传多样性和优势菌株^[11–14]。

土生空团菌 [*Cenococcum geophilum* Fr. (*Cg*)] 属于子囊菌门, 空团菌属。菌丝黑色, 不形成孢子, 只以菌丝体和菌核的形式存在。*Cg* 分布范围广泛, 具有突出的抗旱性和抗贫瘠能力, 在各种恶劣生境条件下常为优势种群。*Cg* 是自然界常见的外生菌根真菌, 宿主广泛, 可与 40 个属 200 多个种的裸子

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060112)

* 通信作者。Tel: +86-471-4308469; E-mail: chenlihong@imau.edu.cn

作者简介: 王亭 (1987–), 女, 内蒙古包头人, 硕士研究生, 主要从事微生物学方面的研究。E-mail: wangting060308@163.com

收稿日期: 2012-01-19; **修回日期:** 2012-05-09

与被子植物形成外生菌根^[9,15]。中国有丰富的 *Cg* 资源,但国内对 *Cg* 的研究相对较少。因此,本研究以来源于不同寄主和不同地域的 *Cg* 菌株为材料,运用分子生物学手段确定其 18S rDNA 中 I 型内含子的插入位置,分析内含子二级结构的特征,研究 *Cg* 菌种的遗传多样性和系统发育。并为内蒙及西部地区优势 *Cg* 菌株的筛选奠定基础,进一步为实现内蒙古及西部地区植被的恢复与重建、荒漠化的治理等生态建设提供极其可贵的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 本试验选用来源于内蒙古大青山分离自虎榛子 (*Ostryopsis daidiana* Decne.) 的土生空团菌 [*C. geophilum* Fr. (*Cg*)] 菌株: O1、O2、O4、O5、S01、S04、S05; 山杨 (*Populus davidiana* Dode) 的 SPOP1、SPOP2、SPOP3、SPOP4、SPOP5、SPOP6、SPOP_x、YANG1; 白桦 (*Betula platyphylla* Suk) 的 SB1、SB2; 云杉 (*Picea asperata* Mast) 的 SPICEA; 油松 (*Pinus tabulaeformis* Carr.) 的 MY; 和来自法国的菌株 CG5、CG417、CG54、CG。本试验菌株由内蒙古农业大学林学院菌根研究室闫伟教授惠赠。用于本研究内含子序列分析的 45 个 *Cg* 菌株见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶、DNA 分子标准量 Marker 购自大连宝生物公司 (TaKaRa); DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。PCR 仪购自 Biometra, 离心机和 UVIphotov1.1 凝胶成像仪购自北京北方华粤贸易有限责任公司。

1.2 基因组 DNA 的提取

将冰箱保存的菌株转接,用 Pach 培养基在室温下暗培养 2 个月后,从培养基上刮取 60 mg 菌丝体,采用 CTAB 法提取基因 DNA^[16]。

1.3 18 S rDNA3'端的 PCR 扩增

用真菌核糖体 18S rDNA 3'端引物 NS5' (5'-GATACCGTCGTATCTTAACC-3') (自己设计) 和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') (文献报道^[17]) 对供试菌株的基因组 DNA 进行了 PCR 扩增。扩增反应体系 (25 μ L) 如下: 2.5 μ L 10 \times buffer, 2 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 1 μ L 25 mmol/L

表 1 用于本研究内含子序列分析的 45 个 *Cg* 菌株

Table1 Forty-five *Cg* isolates used for analysis

of intron sequences in this study

Isolate	Location	Host	References
YANG1	中国 (China)	<i>Populus davidiana</i> Dode.	This study
SPOP1	中国 (China)	<i>Populus davidiana</i> Dode.	This study
O4	中国 (China)	<i>Ostryopsis daidiana</i> Decne.	This study
O5	中国 (China)	<i>Ostryopsis daidiana</i> Decne.	This study
MY	中国 (China)	<i>Pinus tabulaeformis</i> Carr.	This study
SB1	中国 (China)	<i>Betula platyphylla</i> Suk.	This study
SPICEA	中国 (China)	<i>Picea asperata</i> Mast	This study
CG	法国 (France)	Unknown	This study
CG5	法国 (France)	Unknown	This study
CG54	法国 (France)	Unknown	This study
CG417	法国 (France)	Unknown	This study
CGTAR	瑞士 (Switzerland)	Unknown	8
CGPIL	瑞士 (Switzerland)	Unknown	8
CGLESPAC	瑞士 (Switzerland)	Unknown	8
O10	美国 (USA)	<i>Pinus resinosa</i> Ait.	8
O11	美国 (USA)	<i>Pinus resinosa</i> Ait.	8
155	美国 (USA)	<i>Quercus alba</i> L.	8
ALB-2	美国 (USA)	<i>Abies lasiocarpa</i> (Hook.) Nutt.	8
S8-1	美国 (USA)	<i>Picea glauca</i> (Moench) Vess.	8
HUNT-8	美国 (USA)	<i>Picea rubrens</i> Sargent	8
HUNT-9	美国 (USA)	<i>Picea rubrens</i> Sargent	8
1-1-4	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
1-7-7	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
1-7-8	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
1-7-11	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
1-19-1	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
2-3-1	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
2-6-1	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
2-10-3	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
2-11-1	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
2-13-2	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
2-14-4	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
3-2-5	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
3-7-3	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
3-9-2	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
3-10-2	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
3-10-3	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
3-11-1	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
3-18-1	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
1-5-4	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
3-4-II	美国 (USA)	<i>Quercus douglasii</i>	9
I-2	美国 (USA)	<i>Quercus garryana</i>	9
I-3	美国 (USA)	<i>Quercus garryana</i>	9
BTREE1	美国 (USA)	<i>Quercus garryana</i>	9
Ve-95-12	Unknown	Unknown	
UN	Unknown	Unknown	

MgCl₂, 1 μ L 10 μ mol/L 引物 NS5' 和 NS8, 0.3 μ L 25 U/L *Taq* 酶, 1 μ L 5 ng/ μ L 模板 DNA, 16.2 μ L ddH₂O。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。电

泳检测。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化 PCR 产物, 由生工生物工程(上海)有限公司进行 DNA 测序。

1.4 数据分析

利用 DNAMAN (version 6.0) 软件进行序列比对并由人工校对; 利用 MEGA (version 4.0) 软件计算 Kimura's two-parameter 遗传距离并构建 Neighbor-Joining (NJ) 自展一致系统发育树, 自展重复总数为 1000^[18]。按照 Burke 等提出的方法并根据 Ceah 等提出的模型, 由 Mfold (<http://www.mfold.rna.albany.edu/>) 预测内含子的二级结构^[3-4, 19]。其中 P1 - P10 配对区通过与 CRW (<http://www.rna.icmb.utexas.edu/>) 网站已发表的 I 型内含子序列比较来确定。

2 结果和分析

2.1 内含子的插入位置和序列分析

Shinohara 等报道^[8] 和我们的前期研究表明 *Cg* 菌株 18S rDNA 中的 I 型内含子位于 3' 端位置, 因此本研究对供试菌株 18S rDNA 的 3' 端进行 PCR 扩增。扩增结果显示供试菌株可以得到分子量大小不同的扩增片段。菌株 CG54、CG417、CG、O5、SO1、SO5、SB1、SPOP1、SPOP6、SPOPx、YANG1、MY 和 SPICEA 的扩增片段约为 1300 bp; 菌株 O1、O2、SB2、SO4、SPOP4、SPOP5 的扩增片段约为 770 bp; 在菌株 O4、SPOP2、SPOP3 和 CG5 有两条扩增片段, 分别约为 1300 bp 和 770 bp。

对 CG54、CG417、CG5 (大片段)、CG5S (小片段)、CG、MY、O4 (大片段)、O5、SB1、SPOP1、YANG1、O2、SB2、SO4 和 SPICEA 菌株扩增片段进行测序并利用 DNAMAN 6.0 软件进行序列分析, 发现扩增片段大约为 770 bp 的菌株 (O2、SB2、SO4、CG5S) 不含有内含子, 扩增片段约为 1300 bp 的菌株 (CG54、CG417、CG5、CG、MY、O4、O5、SB1、SPOP1、YANG1 和 SPICEA) 都有内含子。19 个中国菌株中 14 个菌株有内含子, 而且来自每种寄主的中国菌株中有的存在内含子, 有的无内含子。经序列分析可知供试菌株 18S rDNA 中内含子上游外显子最后的核苷酸是 U, 内含子最后的核苷酸为 G, 根据 Cech 报道这是 I 型内含子的序列特征^[5]。其中对菌株 O4、CG54 和 SPOP1 的 18S rDNA 全基因进行测序,

可知内含子的位置在 18S rDNA 3' 端 1745 - 1747 bp 处 (图 1)。使用 DNAMAN 6.0 软件对本研究的和已发表的 *Cg* 菌株 18S rDNA 中的内含子序列进行比对分析, 结果显示 *Cg* 菌株 18S rDNA 中的内含子的序列长度为 488 - 590 nt, 在其 5' 端序列比较保守, 而 3' 端序列的碱基组成和长度有差异 (图 2)。总的来说, *Cg* 菌株 18S rDNA 中的内含子核苷酸序列是保守的, 显示出 92.3% - 100% 的同源性。



图 1 *Cg* 菌株 18S rDNA 中内含子的插入位置

Fig. 1 Location of *Cg* 18S rDNA introns.

2.2 内含子序列的系统发育分析

应用 DNAMAN 6.0 软件对本研究 10 个菌株和已发表 35 个 *Cg* 菌株的 18S rDNA 中的内含子进行序列比对, 应用 MEGA 4.0 软件计算 Kimura's two-parameter 遗传距离和构建 NJ 系统发育树 (图 3)。系统分析结果表明来源于不同采样地域及寄主植物的 45 个 *Cg* 菌株有着丰富的遗传多样性, 它们的遗传距离在 0.000 - 0.078 之间。由图 3 可知, 中国菌株 YANG1、MY、SB1、SPOP1、SPICEA 法国菌株 CG、CG417 和瑞士菌株 CGTAR 在一个分支中, 它们的遗传距离在 0.000 - 0.024 之间; 美国菌株 011 和法国菌株 CG54、CG5 在一个分支中, 遗传距离在 0.000 - 0.008 之间; 美国菌株 ALB-2、HUNT8、HUNT9、155、S8-1 和瑞士菌株 CGLPIL 在一个分支中 (自展值较低), 遗传距离在 0.003 - 0.024 之间。这表明地理距离很远菌株的亲缘关系会很近。而中国菌株 YANG1、MY、SB1、SPOP1、SPICEA、O4、O5 的遗传距离在 0.000 - 0.051 之间; 法国菌株 CG54、CG5、CG、CG417 的遗传距离是在 0.000 - 0.046 之间; 瑞士菌株 CGLESPAC、CGTAR 和 CGPIL 的遗传距离为 0.040; 美国菌株 010、011、ALB-2、HUNT8、HUNT9、155、S8-1、2-6-1、3-2-5、1-1-4、1-7-7、2-11-1、3-18-1、1-7-8、1-7-11、1-19-1、2-3-1、3-10-3、3-11-1、1-5-4、3-4-II、3-9-2、3-10-2、3-7-3、BTREE1、2-10-3、2-14-4、I-2 和 I-3 的遗传距离在 0.000 - 0.074 之间。可见有些菌株虽然来源于同一地区, 但它们的亲缘关系较远, 处在不同的分支中, 说明在同一地域 *Cg* 菌株也存在遗传分化现象。因此, 本研究结果未发现 *Cg* 菌株的亲缘关系与地理来源有明显相关性。

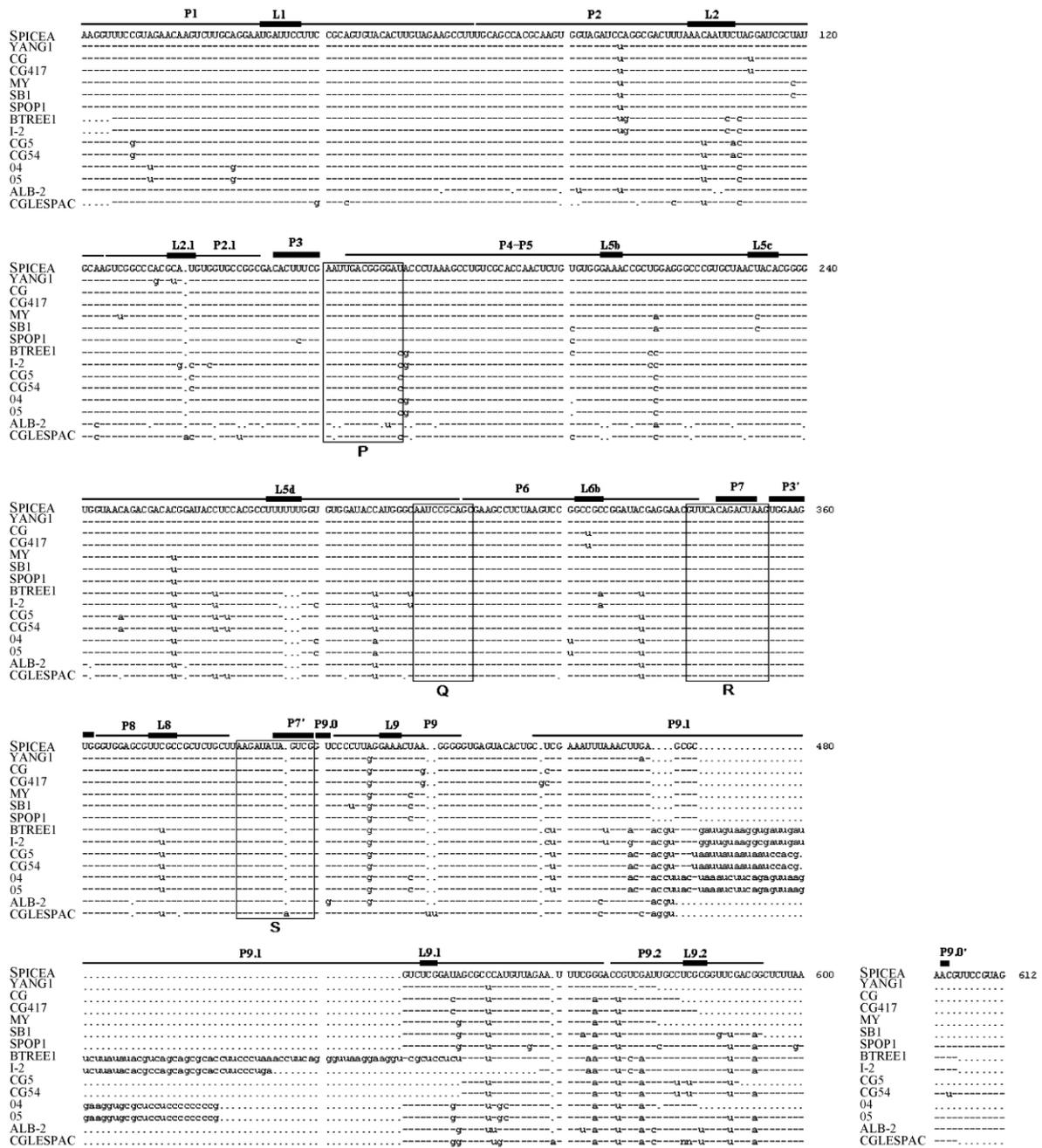


图2 *Cg* 菌株 18S rDNA 中内含子序列的比对

Fig. 2 Alignment of 18S rDNA intron sequences from *Cg* isolates. The SPICEA sequence is at the top. Nucleotides of the other sequences that are identical to those in the SPICEA sequence are indicated by *dashes*. Gaps are indicated by *dots*. Differences are indicated by *lower case letters*. Pairing regions of secondary structure are indicated by *thin line*, the end loops of each stem (pairing regions) and P3, P3', P7, P7', P9.0, P9.0' are indicated by *solid bars*. The four conserved elements P, Q, R and S are indicated by *boxes surrounding the sequences*.

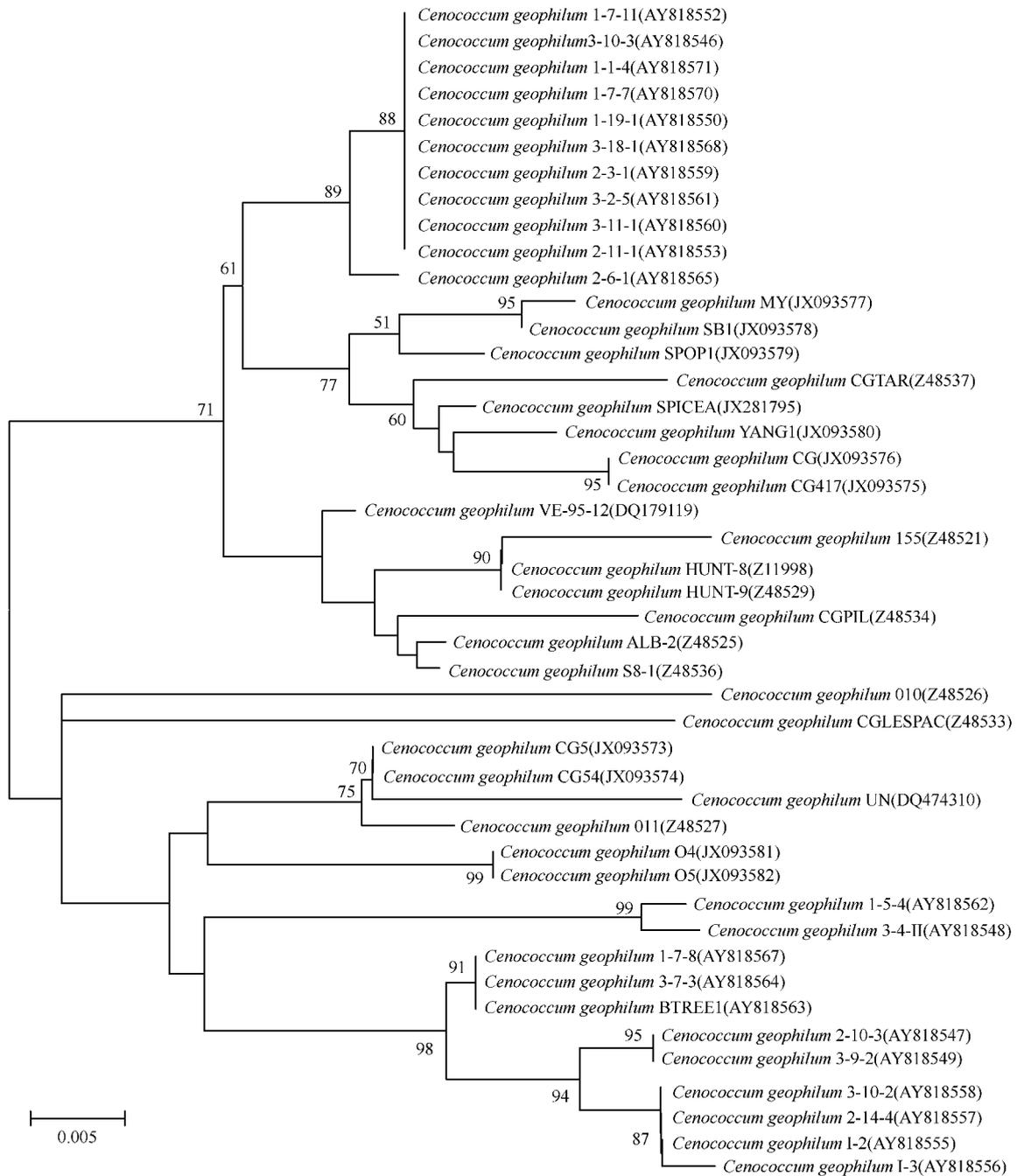


图 3 45 个 *Cg* 菌株 18S rDNA 中内含子序列的 Neighbor-Joining 系统发育树

Fig. 3 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 18S rDNA intron sequences from *Cg* forty-five isolates. The numbers at branch points represent bootstrap values with 1,000 replicates. Only bootstrap values greater than 50% are shown. The scale bar represents 0.005 substitutions per site. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

从图 3 也可看出, 来源于不同寄主 *Populus*、*Betula*、*Picea* 和 *Pinus* 的中国菌株 SPOP1、YANG1、SBI、SPICEA 和 MY 亲缘关系较近; 而来源于相同寄主 *Quercus* 的美国菌株 155、2-6-1、3-2-5、1-1-4、1-7-7、2-11-1、3-18-1、1-7-8、1-7-11、1-19-1、2-3-1、3-10-3、3-11-1、1-5-4、3-4-II、3-9-2、3-10-2、3-7-3、BTREE1、2-10-3、2-14-4、I-2 和 I-3 处在不同的分支中, 本研究也未发现 *Cg* 菌株的亲缘关系与寄主来源有相关性。

2.3 内含子的二级结构分析

本研究 10 个菌株及已发表 35 个 *Cg* 菌株的 18S rDNA 中的内含子虽然在核苷酸序列差别较大, 但是它们的二级结构非常相似(图 4)。通过分析可知 *Cg* 菌株 18S rDNA 中内含子的二级结构中都有 10 个碱基配对区(P1-P10), 富 A 的环状结构, 以及位于核心结构中的保守区 P、Q、R 和 S。如图 4 所示, *Cg* 菌株内含子的近 5' 端有内部引导序列(IGS), 它可以通过碱基配对识别两端的外显子。在 4 个保守区 P、Q、R 和 S 中, Q、R 和 S 的保守性比较好, P 中有碱基的变化(图 2), 这与 Shinohara 等的报道一致。在 P5 区域由 P5, P5a, P5b, P5c, P5d 组成; 在 P9 的 3' 端有 2 个配对区分别为 P9.1 和 P9.2, 其中 P9.1 的核苷酸序列和二级结构均有较大差异(图 2、图 5)。P9.1 的二级结构有 2 种类型(A 型和 B 型)(图 5)。菌株 O4、O5、1-5-4、3-4-II、1-7-8、3-7-3 和 BTREE1 的 P9.1 为 A 型(图 5-A), 其它 38 个菌株的 P9.1 为 B 型(图 5-B)。由于 *Cg* 菌株 18S rDNA 中内含子二级结构的 P5 有多个配对区(P5abcd)和缺少 P7 的额外配对区(P7.1 和 P7.2)等特点, 该内含子比较接近 I 型内含子的 IB 和 IC 亚类^[3-4,8]。

3 讨论

到目前为止, *Cg* 没发现有性生殖, 除了无性生殖以外, 有时还会出现准性生殖。准性生殖广泛存在于真菌界, Pontecorvo 等第一次在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中描述了准性生殖的遗传过程, 即包括异核体形成、核融合形成双倍体的杂核体和有丝分裂^[20]。陈名军等证实了自然界中球孢白僵菌准性生殖的普遍存在^[13-14]。或许正是由于 *Cg* 存在准性生殖, 在菌株 O4、SPOP2、SPOP3 和 CG5 中扩增得到大小不同的两条片段。

Cg 菌株 18S rDNA 中 I 型内含子的位置在 18S rDNA 3' 端, 这和 Gargas 等报道的 *Chlorella ellipsoidea*, *C. mirabilis*, *Genicularia spirotaenia*, *Hildebrandis rubra*, *Hymenoschyphus ericae*, *Mougeotia scalaris*, *Phialophora americana*, *Pneumocystis carinii*, *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*, *Stanastrum* sp. 中 I 型内含子的位置相同, 然而有许多 I 型内含子也可插在 18S rDNA 的其它位置^[8, 21]。所有已报道的 I 型内含子的二级结构都是高度保守的, 都是由 10 个碱基配对区构成内含子的核心结构。它们的空间结构分为 3 个结构域: P1-P10 结构域进行底物结合(含 P1、P2、P10)、P4-P6 结构域充当分子的骨架(含 P4、P5、P6)和 P3-P9 为催化结构域(含 P3、P7、P8、P9)^[2, 4, 22-26]。P1 是由内含子和上游外显子构成, 在几乎所有内含子的 5' 剪切位点有 GU 碱基对; P10 是由下游外显子与内含子构成。I 型内含子的催化中心由 P5-P4-P6 和 P7-P3-P8 共同构成, 其中在 P7 中有鸟苷辅因子的结合位点(G-C 碱基对), P3 以及与 P3 相连的部分 P2 和 P4 形成假结带状结构, 围绕分子中部(纵向)一周, 这些结构对催化作用至关重要。I 型内含子高度保守的分子结构是由于它在内含子剪接过程需要, 承受着高度的选择压力。除了 10 个保守的配对区外, 多数 I 型内含子至少有一个周边结构, 如本研究 *Cg* 菌株内含子中的 P5abcd 和 P9.1-P9.2。这些周边结构包裹在核心结构的外围, 一般来讲它们可以稳定核心结构, 对内含子的高效剪切是必要的^[2, 27-28]。根据周边结构的差异 I 型内含子可分为 13 个亚型, 如 IA1、IB1、IC1 等, 周边结构在亚型内是保守的。另外, 在许多 I 型内含子的周边结构中发现有蛋白编码序列、重复序列及其它插入序列, 这造成内含子的长度和二级结构的较大差异, 如本研究的 *Cg* 菌株的内含子在 P9.1 的差异。

Shinohara 等利用保守区 P、Q、R 和 S 核苷酸序列, 把 *Cg* 菌株 18S rDNA 中的内含子(来源于菌株 ALB-2、010、011、155、CGLESPAC、CGPIL、CGTAR、HUNT-8、HUNT-9 和 S8-1)与 11 个亚型(IA1、IA2、IA3、IB1、IB2、IB3、IB4、IC1、IC2、IC3 和 ID)的内含子进行系统发育分析, 总体而言 *Cg* 菌株 18S rDNA 内含子之间的系统发育关系很近, 显示它们可能来源于同一个祖先, 并且该内含子与 IC1 亚型的关系最近^[8]。我们的内含子序列分析结论与 Shinohara

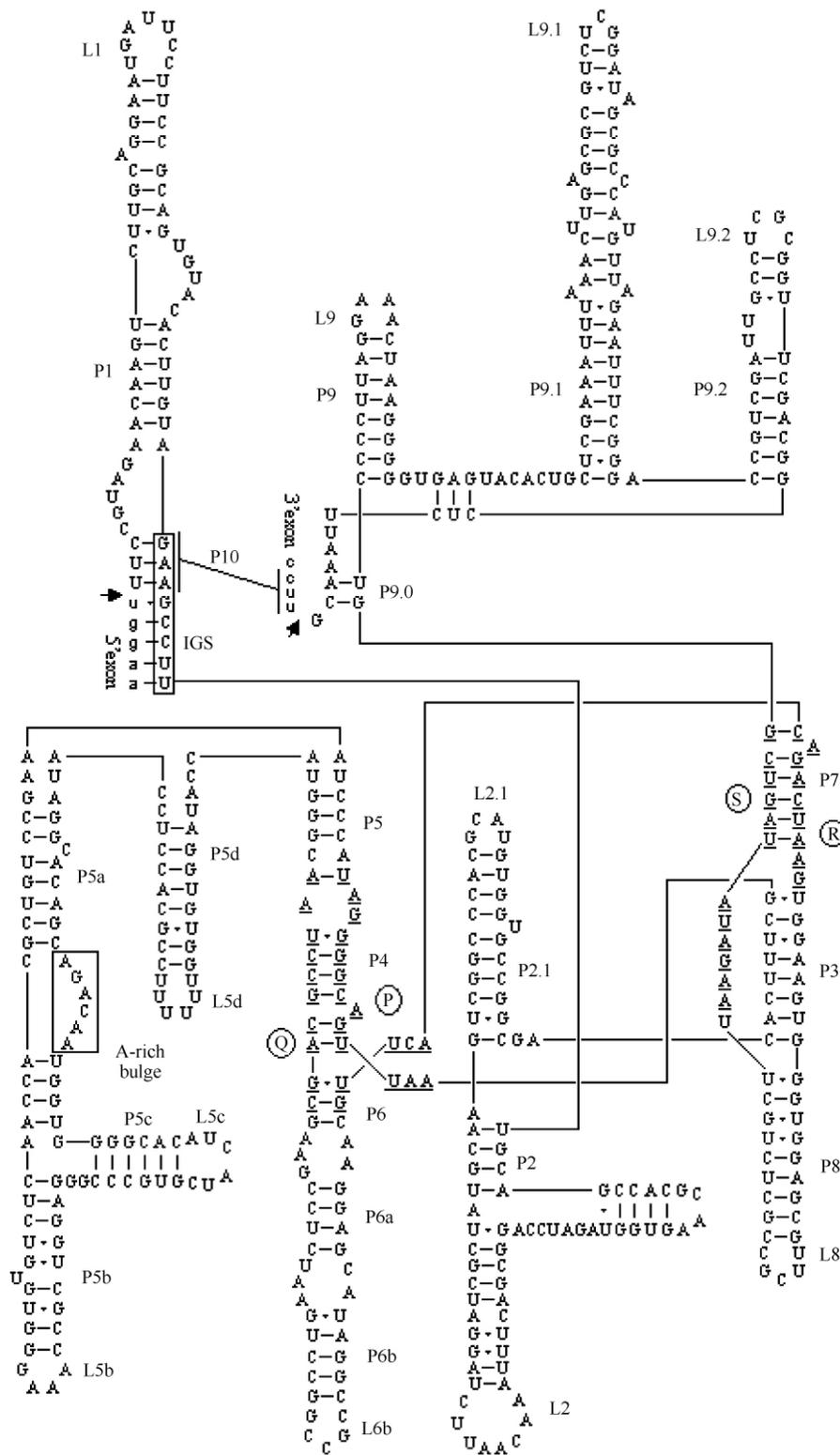


图 4 SPICEA 菌株 18S rDNA 中内含子的二级结构

Fig. 4 Secondary structure of the 18S rDNA intron of the isolate SPICEA. The nucleotides of the 18S rDNA intron are indicated in *capital letters*, while the flanking exons are in *lower case letters*. *Arrows* denote the 5' and 3' splice sites. Nucleotides within the conserved core element P, Q, R and S regions are *underlined*. The IGS region and A-rich bulge are indicated by *boxes surrounding the sequences*.

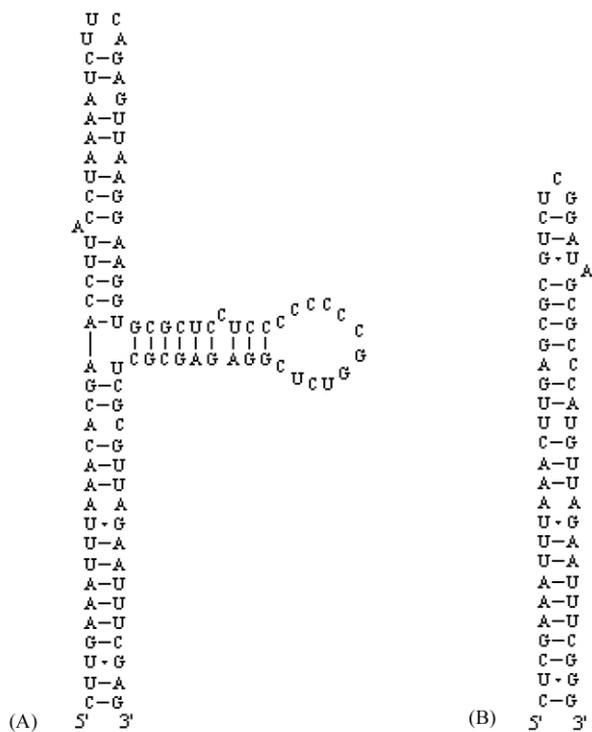


图5 二级结构中 P9.1 的差异

Fig. 5 Structural variations in P9.1 of *Cg* introns. A representative secondary structure is shown for each type (O5 for Type A, SPICEA for Type B).

等一致,45 个 *Cg* 菌株整个内含子核苷酸序列的同源性为 92.3% - 100%, 如果只考虑保守区 P、Q、R 和 S 核苷酸序列则同源性为 98% - 100%, 其内含子序列的变异远比其他真菌内含子序列的变异小。此外,我们利用 *Cg* 核糖体 ITS 区和 18S rDNA 3' 端序列进行系统发育分析也得出同样的结论(未发表)。

用于本研究系统发育分析的 45 个 *Cg* 菌株地理来源于中国、美国、瑞士和法国, 寄主来源于 *Ostryopsis*、*Populus*、*Betula*、*Picea*、*Quercus* 和 *Pinus* 等植物, 然而对其 18S rDNA 中 I 型内含子序列的分析中, 我们用 Kimura's two-parameter 距离法构建 NJ 系统发育树, 没有发现 *Cg* 菌株的遗传分化与地理因素和寄主来源有相关性。同时我们也用 Jukes-Cantor、Maximum Composite Likelihood 和 P 距离法构建 NJ 系统发育树, 得到了相同的结论。这可能是由于我们用于系统发育分析的来源于每个地点和每种寄主植物的 *Cg* 菌株都相对较少, 无法进行全面分析, 今后应在不同采样地点、对不同寄主植物要采集

更多的 *Cg* 样品, 对 *Cg* 菌种的系统发育进行深入的分析。

参考文献

- [1] Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D. The natural history of group I introns. *TRENDS in Genetics*, 2005, 21 (2) : 111-119.
- [2] Nielsen H, Johansen S. Group I introns. *RNA Biology*, 2009, 6 (4) :375-383.
- [3] Cech TR. Conserved sequences and structures of group-I introns: building an active site for RNA catalysis—a review. *Gene*, 1988, 73 (2) : 259-271.
- [4] Michel F, Westhof E. Modeling of the three-dimensional architecture of group-I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 216 (3) : 585-610.
- [5] Lehnert V, Jaeger L, Michele F, Westhof E. New loop-loop tertiary interactions in self-splicing introns of subgroup IC and ID: a complete 3D model of the *Tetrahymena thermophila* ribozyme. *Chemistry and Biology*, 1996, 3 (12) : 993-1009.
- [6] Feau N, Hamelin RC, Bernier L. Variability of Nuclear SSU-rDNA Group Introns Within Septoria Species: Incongruence with Host Sequence Phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 2007, 64 (5) : 489-499.
- [7] Perotto S, Nepote-Fus P, Saletta L, Bandi C, Young JPW. A diverse population of introns in the nuclear ribosomal genes of ericoid mycorrhizal fungi includes elements with sequence similarity to endonuclease-coding genes. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17 (1) : 44-59.
- [8] Shinohara ML, LoBuglio KF, Rogers SO. Group-I intron family in the nuclear ribosomal RNA small subunit genes of *Cenococcum geophilum* isolates. *Current Genetics*, 1996, 29 (4) : 377-387.
- [9] Douhan GW, Rizzo DM. Phylogenetic divergence in a local population of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *New Phytologist*, 2005, 166 (1) : 263-271.
- [10] Nikoh N, Fukatsu T. Evolutionary dynamics of multiple group I introns in nuclear ribosomal RNA genes of endoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution*, 2001, 18 (9) : 1631-1642.

- [11] 周启明, 黄满荣, 魏江春. 蜈蚣衣科 SSU rDNA 中 I 型内含子的初步研究. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2004, 23 (1) : 56-62.
- [12] 曹叔楠, 刘萌, 周启明, 郭守玉. 地衣型真菌的 I 型内含子及其在系统发育中的应用. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2011, 30 (6) : 920-931.
- [13] 陈名军, 张中, 樊美珍, 李曾智, 黄勃. 利用 28S rDNA I 型内含子研究琅琊山球孢白僵菌菌株的遗传多样性. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2006, 25 (4) : 559-566.
- [14] 刘玉军, 侯奎, 王滨, 陆荣. 黄山球孢白僵菌野生种群流行菌株的 28S rDNA I 型内含子分析. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 2008, 24 (2) : 116-121.
- [15] Trappe JM. Mycorrhizal host and distribution of *Cenococcum graniforme*. *Lloydia*, 1964, 27 (2) : 100-106.
- [16] Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi // Gelvin SB, Schilperoort RA. Plant Molecular Biology Manual. 2nd eds. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, 1994: 1-8.
- [17] Rogers SO, Yan ZH, Shinohara M, LoBuglio KF, Wang CJK. Messenger RNA intron in the nuclear 18s ribosomal RNA gene of deuteromycetes. *Current Genetics*, 1993, 23 (4) : 338-342.
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8) : 1596-1599.
- [19] Burke JM, Belfort M, Cech TR, Davies RW, Schweyen RJ, Shub DA, Szostak JW, Tabak HF. Structural convention for group I introns. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15 (18) : 7217-7221.
- [20] Pontecorvo GJA, Rope LM, Hemmons KD, Macdonald KD, Bufton AW. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 1953, 5 (1) : 141-238.
- [21] Gargas A, DePriest PT, Taylor JW. Positions of multiple insertions in SSU rDNA of lichen-forming fungi. *Molecular Biology and Evolution*, 1995, 12 (2) : 208-218.
- [22] Adams PL, Stahley MR, Kosek AB, Wang J, Strobel ST. Crystal structure of a self-splicing group I intron with both exons. *Nature*, 2004, 430 (6995) : 45-50.
- [23] Adams PL, Stahley MR, Gill ML, Kosek AB, Wang J, Strobel ST. Crystal structure of a group I intron splicing intermediate. *RNA*, 2004, 10 (12) : 1867-1887.
- [24] Sogin ML, Edman JC. A self-splicing intron in the small subunit rRNA gene of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17 (13) : 5349-5360.
- [25] Murphy FL, Cech TR. GAAA tetraloop and conserved bulge stabilize tertiary structure of group-I intron domain. *Journal of Molecular Evolution*, 1994, 236 (10) : 49-63.
- [26] Oliveira MC, Ragan MA. Variant forms of a group-I intron in nuclear small-subunit rRNA genes of the marine red alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia*. *Molecular Biology and Evolution*, 1994, 11 (2) : 159-207.
- [27] Engelhardt MA, Doherty EA, Knitt DS, Doudna JA, Herschlag D. The P5abc peripheral element facilitates preorganization of the tetrahymena group I ribozyme for catalysis. *Biochemistry*, 2000, 39 (10) : 2639-2651.
- [28] Johnson TH, Tijerina P, Chadee AB, Herschlag D, Russell R. Structural specificity conferred by a group I RNA peripheral element. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 2005, 102 (29) : 10176-10181.

Group-I introns in 18S rDNA of *Cenococcum geophilum* Fr.

Ting Wang, Lihong Chen*

College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010019, China

Abstract: [Objective] To analyze the sequences and secondary structure of group-I introns in 18S rDNA of *Cenococcum geophilum*, and to study the factors effecting *Cg* genetic diversity. [Method] The 3' end region of 18S rDNA were amplified from twenty-three *Cg* isolates, and the PCR fragments from thirteen isolates were sequenced. The Neighbor-Joining phylogenetic analyses were performed using MAGE version 4.0, and the secondary structures of the *Cg* introns were predicted using Mfold. [Result] The results showed that fourteen out of nineteen *Cg* isolates originated in China had group-I introns in 18S rDNA. Their sequences, ranging in size from 488 to 590 nucleotides, were from 92.3% to 100% similar to each other from our data and GenBank data. The 5' end sequences of the introns were conserved, while the 3' end sequences were variable. The analysis of secondary structure indicated all the introns from forty-five *Cg* isolates contained ten pairing regions (P1 – P10). The P5 region was composed of P5, P5a, P5b, P5c and P5d, and there were two extra pairing stems (P9.1, P9.2) besides the 3' end of P9. [Conclusion] It was suggested that *Cg* had rich genetic diversity, and we did not found the relationship between *Cg* genetic variation and its geographical and host origination.

Keywords: *Cenococcum geophilum* Fr., Group-I intron, Secondary structure, Genetic diversity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (31060112)

* Corresponding author. Tel: +86-471-4308469; E-mail: chenlihong@imau.edu.cn

Received: 19 January 2012/Revised: 9 May 2012

《微生物学报》综述文章投稿最新要求

2011年12月,第3次修订

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,自2003年本刊对综述类投稿提出了具体的要求,先后又作了两次修订。

1. 篇幅:主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 新意:选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 述和评:结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
4. 结合工作:结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
5. 参考文献:控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。

6. 作者:(1)数量不多于3人;(2)提供一份背景材料,内容包括:第一作者科研简介、责任作者(即通讯作者)科研简介、本课题组对相关工作情况的介绍(附已发文章)。

欢迎投送“能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义”的述评类文章。