

# 六个灰树花菌株遗传多样性分析

王守现, 刘宇, 张英春, 耿小丽, 王兰青, 孟莉莉

(北京市农林科学院 植保环保研究所, 北京 100097)

**摘要:**以6个灰树花菌株(灰分、灰通、灰怀、灰1、灰4和灰高)为材料,利用酯酶同工酶、RAPD和ISSR 3种分子生物学技术对其进行比较分析。结果表明:经酯酶同工酶经聚类分析,可将6个灰树花菌株分为三大类,灰分、灰通、灰怀和灰1为一类,灰4单独为一类,灰高单独为一类;经特异性较好的RAPD和ISSR引物验证,其结果与酯酶同工酶分析的一致。

**关键词:**灰树花;酯酶同工酶;RAPD;ISSR

**中图分类号:**S 646.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)01-0201-04

灰树花 [*Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray] 又名贝叶多孔菌,俗称栗蘑、莲花菇、舞茸菇等,在分类系统中属于担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、多孔菌科、树花属<sup>[1]</sup>。灰树花子实体形似盛开的莲花,扇形菌盖重重叠叠,鲜嫩的子实体香味沁脾,味道鲜美,口感极佳;富含灰树花多糖、维生素、人体必需的氨基酸和微量元素,经常食用可预防和治疗肝脏系统、胃肠道疾病,被世界卫生组织确认为“天然、营养、保健”功能为一体的16种珍稀食用菌之一<sup>[2]</sup>。

目前,国内主要对灰树花的栽培技术、生态特性与营养分析等方面的研究,但对灰树花菌株在分子生物学方面的研究较少。在生产上,由于认识上的混乱致使

“同名异物、同物异名”的现象普遍存在,该研究采用酯酶同工酶、RAPD和ISSR方法对6个灰树花菌株进行了综合分析,对规范灰树花菌种市场及优良菌株的选育奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

该研究所用的菌株如表1所示。

### 1.2 试验方法

1.2.1 供试培养基(PDA) 斜面培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL、pH 值自然。液体培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、水 1 000 mL、pH 值自然。

1.2.2 酯酶同工酶分析 样品的制备:将活化后的菌株接种于马铃薯综合培养基平板上(马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g、MgSO<sub>4</sub> 1.5 g、琼脂 20 g、1000 mL)<sup>[3]</sup>;培养 16 d 后,刮取菌丝, -20℃冰冻 24 h,按每克菌丝 5 mL TBE (0.1 M Tris-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-EDTA) 冰浴中研磨 3 min 成匀浆, 10 000 rpm 离心 15 min,取上清 -20℃保

第一作者简介:王守现(1980-),男,博士,助理研究员,现从事食用菌遗传育种和分子生物学研究。E-mail: wangshouxian2002@163.com.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2007BAD89B07)。

收稿日期:2009-09-20

## Study on The Preservation Method on Fresh Rose Cut Flowers

DONG Bi-hui<sup>1</sup>, YAO Xiao-qing<sup>2</sup>

(1. Yancheng Teachers University, Yancheng, Jiangsu 224051; 2. Center of Jiangsu Coastland Research and Development, Jiangsu 224051)

**Abstract:** The experiment was done on the fresh unopened roses on the March 20<sup>th</sup> and April 1<sup>th</sup> respectively, experiment was divided into five groups: (I, II, III, IV, V), with beer treatment on the different groups, the results showed that: the Rose Group IV Played the longest life expectancy, come up to an average of 9.1 d. 16.2% higher than The control group.

**Key words:** Reose; preservation method; vase life

存备用。电泳: 采用北京六一厂的 DYY-10C 型双垂直电泳槽, 1.0 mm 厚 12 孔凝胶梳进行垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 浓缩胶浓度为 3% (pH 6.7), 分离胶浓度为 7.5% (pH 8.9), 电极缓冲液采用 Tris-Gly pH 8.3 系统, 以点样液<sup>[4]</sup> (40%蔗糖, 0.05%溴酚蓝) : 酶液 = 1 : 5 每孔 35  $\mu$ L 点样, 浓缩胶 70 V, 分离胶 150 V 恒压 5 h。染色: 乙酸-1-萘脂 25 mg, 乙酸-2-萘脂 25 mg, 固蓝 R 盐 50 mg, 丙酮 3 mL; 将前 3 样加 3 mL 丙酮, 稍微加热后加入 75 mL 染色缓冲液 (pH 6.0 PBS) 中即得酯酶同工酶的染色液, 现配现用<sup>[4]</sup>。将胶板浸入上述染色液中, 在 150 mm 培养皿中, 用 TS-2000A 型脱色摇床振荡染色至出现清晰的酶带, 用蒸馏水漂洗后照相。系统聚类分析: 计算各个酶带的  $R_f$  值 (相对迁移率)。把染色酶带分为 0=没有; 1=较淡; 2=中等; 3=较浓。统计各个菌株的酯酶同工酶信息, 输入 DPS v3.01 分析软件进行系统聚类分析。

表 1 灰树花供试菌株

菌株	学名	来源
灰分	<i>Grifola frondosa</i>	北京市农林科学院植保环保研究所
灰4	<i>Grifola frondosa</i>	北京市农林科学院植保环保研究所
灰1	<i>Grifola frondosa</i>	北京市农林科学院植保环保研究所
灰高	<i>Grifola frondosa</i>	江苏高邮食用菌研究所
灰怀	<i>Grifola frondosa</i>	北京市农林科学院植保环保研究所
灰通	<i>Grifola frondosa</i>	北京市农林科学院植保环保研究所

1.2.3 DNA 验证 菌丝培养: 将菌株转接于斜面培养基活化 7~10 d, 耙碎, 接入 250 mL 三角瓶液体培养基中, 25 $^{\circ}$ C 摇床上 130 rpm 培养 3 d, 纱布过滤, 蒸馏水冲洗, 滤纸吸干, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 下备用。DNA 提取: 基因组 DNA 提取方法为 CTAB 法, 参照曾凡亚等<sup>[6]</sup>, 并稍加改

进。DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 UV-2802H 型紫外可见分光光度计检测, OD260/OD280 的比值在 1.8~2.0 之间, 说明 DNA 基本无降解, 适合于 RAPD 引物和 ISSR 引物的 PCR 扩增。RAPD、ISSR 引物: 利用该实验室筛选出特异性较好的 RAPD 和 ISSR 引物进行从 DNA 水平对酯酶同工酶结果的验证。RAPD 引物序列: H16: 5'-TCTCAGCTGG-3'; S17: 5'-AGGGAACGAG-3'。ISSR 引物: P4: 5'-GGATGCAACACACACACAC-3'。PCR 扩增: ① RAPD 扩增反应体系: 1  $\mu$ L 模板 (含 50 ng DNA), 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  buffer 缓冲液, 2  $\mu$ L Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L), 0.6  $\mu$ L dNTP (10 mmol/L), 1  $\mu$ L Primer (10  $\mu$ mol/L), 0.3  $\mu$ L Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ L。② RAPD 扩增反应程序: 92 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; (92 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min) $\times$  40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。③ ISSR 扩增反应体系: 1  $\mu$ L 模板 (含 25 ng DNA), 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  buffer 缓冲液, 2  $\mu$ L Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L), 0.8  $\mu$ L dNTP (10 mmol/L), 0.5  $\mu$ L Primer (10  $\mu$ mol/L), 0.25  $\mu$ L Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu$ L。④ ISSR 扩增反应程序: 92 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; (92 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min) $\times$  33 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。⑤ 电泳: 取 6  $\mu$ L 扩增产物, 在 1.2% 琼脂糖凝胶 (0.5  $\mu$ g/mL EB) 上电泳, 140 V 恒压 2 h, 通过紫外凝胶成像系统观察并拍照。

1.2.4 数据分析 扩增出现强带或可分辨或重复性好的弱带均视为扩增阳性赋值为“1”, 否则视为扩增阴性赋值为“0”, 记录电泳带谱形成“0-1”数据表, 从而把图形资料转换成数据资料。用 DPS v3.01 软件进行聚类分析。

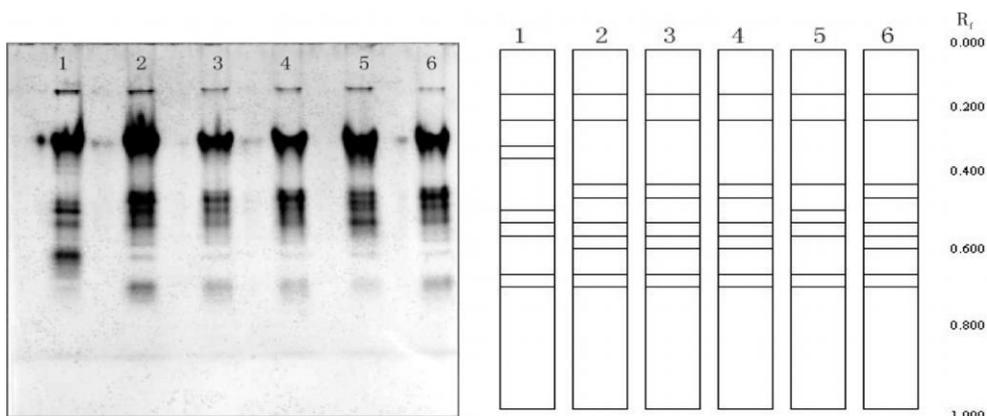


图 1 灰树花菌株酯酶同工酶图谱

注: 1 代表灰4; 2 代表灰怀; 3 代表灰1; 4 代表灰分; 5 代表灰高; 6 代表灰通。

## 2 结果与分析

### 2.1 酯酶同工酶分析

酯酶同工酶电泳共检测到 12 条迁移速度不同的酶带, 其  $R_f$  分别为 0.107、0.261、0.322、0.349、0.418、0.433、0.447、0.47、0.512、0.564、0.61 和 0.701。 $R_f=0.107$ 、0.261、0.47、0.512、0.61、0.701 为 6 个菌株的共有酶带;  $R_f=0.322$  和 0.349 是菌株灰 4 的特有酶带;  $R_f=0.433$  和 0.564 灰 4 和灰高都没有酶带, 其它菌株都有酶带;  $R_f=0.447$  时, 灰 4 和灰高都具有酶带, 其它菌株都没有酶带; 由此可以看出, 灰 4 和灰高与其它 4 个菌株的酶带差异较大, 灰 4 和灰高之间在  $R_f=0.433$ 、0.564、0.447 时, 具有相似性, 但是在  $R_f=0.322$  和 0.349 时, 灰 4 具有特有酶带, 说明了灰 4 和灰高有一定的差异性。从表 2 中可以看出, 6 个菌株之间的相似系数在 68.7~94.5, 灰 4 与其它 5 个菌株的相似系数不超过 80.0, 其它菌株之间的相似系数在 80.0 以上, 说明了灰 4 与其它 5 个菌株的遗传差异最大。

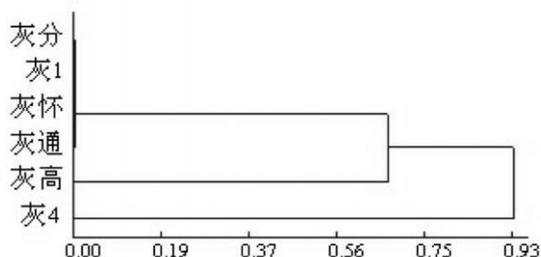


图 2 灰树花菌株聚类树状图

从图 2 中可以看出, 6 个灰树花菌株在 0.66 水平上被聚为三大类, 第 1 类是灰分、灰 1、灰怀、灰通, 其中, 这 4 个菌株的相异系数为 0, 说明很可能是相同的菌株; 第 2 类是灰高; 第 3 类是灰 4。灰 4 与其它 5 个菌株的相异系数最大, 说明其与其它菌株遗传差异大, 亲缘关系远。

表 2 灰树花菌株酯酶同工酶谱的相似系数

菌株	灰 4	灰怀	灰 1	灰分	灰高	灰通
灰 4	100					
灰怀	69.8	100				
灰 1	70.9	94.5	100			
灰分	73.1	90.9	93.8	100		
灰高	77.1	81.9	86.8	90.7	100	
灰通	68.7	91.8	93.4	90.8	85.2	100

### 2.2 RAPD 分析

利用该实验室筛选出的特异性、稳定性较好的 RAPD 引物 H16 和 S17 对酯酶同工酶的结果进行了验证。从图 3 和图 4 中可以看出, 引物 H16 和 S17 对 6 个灰树花菌株扩增的片段在 2 500~250 bp 之间, 条带的数量 5 条以上, 说明了这 2 个引物对 6 个灰树花菌株的多态性较好, 重复 3 次结果一致, 从而可以进一步的说

明了此引物可以对 6 个灰树花菌株进行简单的鉴别与分类。最后从图 3 和图 4 中的条带中分析得出菌株灰分、灰通、灰怀和灰 1 带型是一致的, 可以归为一类, 灰高单独为一类, 灰 4 单独为一类。此结果与酯酶同工酶的结果一致, 从而进一步验证了酯酶同工酶的结果可靠性。

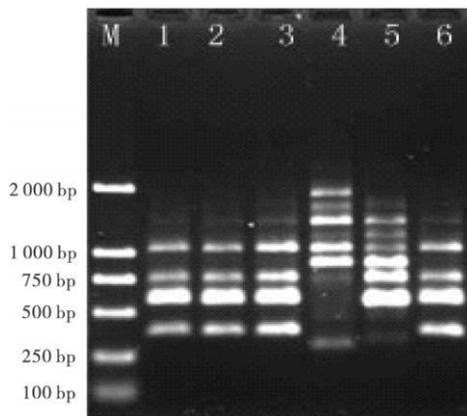


图 3 引物 H 16 对 6 个灰树花菌株扩增的条带

注:“M”为 DL 2 000 marker, 1 代表灰分, 2 代表灰通, 3 代表灰怀, 4 代表灰高, 5 代表灰 4, 6 代表灰 1。

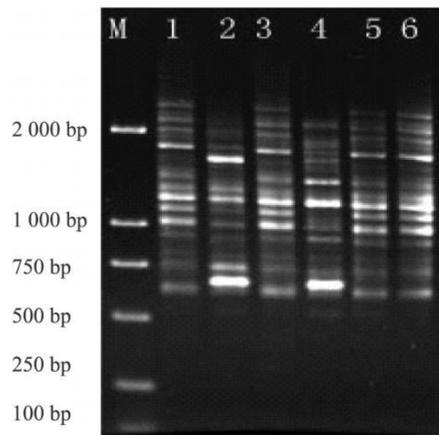


图 4 引物 S 17 对 6 个灰树花菌株扩增的条带

注:“M”为 DL 2 000 marker, 1 代表灰分, 2 代表灰 4, 3 代表灰 1, 4 代表灰高, 5 代表灰怀, 6 代表灰通。

### 2.3 ISSR 分析

从图 5 中可以看出, ISSR 引物 P4 把 6 个灰树花菌株可分为四大类, 第 1 类为灰分、灰怀、灰通; 第 2 类为灰 1; 第 3 类为灰 4; 第 4 类为灰高; 这与酯酶同工酶和 RAPD 标记的结果存在一定的差别。其中灰 1 与灰分、灰通和灰怀的条带图谱基本一致, 仅在 1 000 bp 处有一特异性条带, 这说明灰 1 与灰分、灰通和灰怀还存在一定的细微差别, 它们之间的亲缘关系较近。

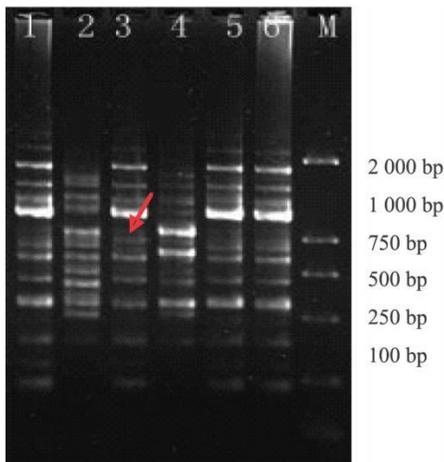


图5 引物对6个灰树花菌株扩增的条带

注“M”为DL 2000 marker, 1代表灰分, 2代表灰4, 3代表灰1, 4代表灰高, 5代表灰怀, 6代表灰通。红箭头代表灰1的差异条带。

### 3 结论与讨论

综合3种方法可以看出灰分、灰怀和灰通这3个菌株从带型上看是非常相似的,说明这3个菌株可能为同一个菌株,存在同种异名现象。灰1在ISSR分析中存在一条1000 bp的特异性条带,与灰分、灰怀和灰通存在一定的差异性,所以灰1与这3个菌株(灰分、灰怀、灰通)的亲缘关系的较近。灰4和灰高不论哪种方法验证,始终与其它4个菌株有较大的差异性,遗传差异大,亲缘关系远,并且2个菌株之间也存在着差异性。

利用同工酶和某一分子标记进行食用菌菌株的鉴定已有不少报道,该研究利用了同工酶和2种分子标记

中特异性较好的引物对6个灰树花菌株进行了分析及分类,最后发现同工酶方法与分子标记的方法结果基本相同,但是分子标记比酯酶同工酶的分析更细化,更能准确的对菌株进行分类与鉴别。因此,对菌株进行鉴别应尽可能选用多种标记,避免某一种分子标记存在一定的片面性。

同工酶的特点是其酶条带变异丰富,结构的差异直接来源于基因的差异,并能够稳定遗传;其次,同工酶分析采用酶活性染色和电泳检测,非酶类成分不被显示,电泳图谱简洁、清晰,能够快速检测菌株间的差异性。因此,用它可以快速鉴别许多从外部形态上难以区分的菌株。而分子标记是应用不同的引物对生物的基因型进行分析,其鉴别结果不受环境因素、样品形态和材料来源的影响;因此,该技术具有重复性好、灵敏度高、准确可靠等优点,可广泛应用于食用菌不同菌株的分类鉴定、遗传图谱构建及遗传多样性分析。

#### 参考文献

- [1] 黄年来. 培种珍稀美味食用菌栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [2] 胡昭庚, 曾长华, 肖建京. 名贵食用菌栽培[M]. 上海: 上海科学普及出版社, 2000.
- [3] 程艳丽. 不同培养基对灰树花菌丝的影响[J]. 中国食用菌, 2002, 21(2): 8-9.
- [4] 贾建航. 酯酶同工酶IEF电泳及香菇品种鉴别[J]. 河北农业大学学报, 1997, 20(1): 1-5.
- [5] 黄大斌, 杨菁, 林杰, 等. 寿宁花菇菌株的酯酶同工酶研究[J]. 中国食用菌, 2000, 19(3): 33-34.
- [6] 曾凡亚, 张义正. 从多糖丰富的样品中制备食用菌DNA[J]. 食用菌学报, 1996(3): 13-17.

## The Analysis of Genetic Diversity of Six *Grifola frondosa* Strains

WANG Shou-xian, LIU Yu, ZHANG Ying-chun, GENG Xiao-li, WANG Lan-qing, MENG Li-li

(Institute of Plant Protection and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

**Abstract:** Three molecular biology techniques of esterase isozyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) were used to analyze the genetic diversity of six *Grifola frondosa* strains. The results from the different bands analysis showed that the six *Grifola frondosa* strains were divided into three groups. Strains Hui fen, Huitong, Hui huai and Hui 1 were divided into one group. The strain hui 4 and hui gao was divided into one group, respectively. After being tested by special primers of RAPD and ISSR, the results of DNA level were same to esterase isozyme electrophoresis.

**Key words:** *grifola frondosa*; esterase isozyme electrophoresis; RAPD; ISSR