

# 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℃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℃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: ①RAPD 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。②RAPD 扩增反应程序: 92℃预变性 5 min; (92℃变性 1 min, 35℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min) $\times$ 40 个循环; 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。③ISSR 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。④ISSR 扩增反应程序: 92℃预变性 5 min; (92℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 5 min) $\times$ 33 个循环; 最后 72℃延伸 7 min, 4℃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。

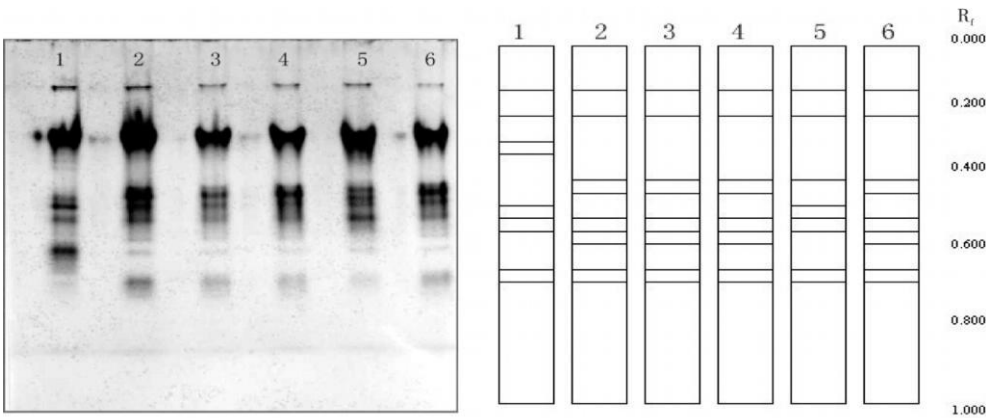


图 1 灰树花菌株酯酶同工酶图谱  
注: 1 代表灰4; 2 代表灰怀; 3 代表灰1; 4 代表灰分; 5 代表灰高; 6 代表灰通。

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。

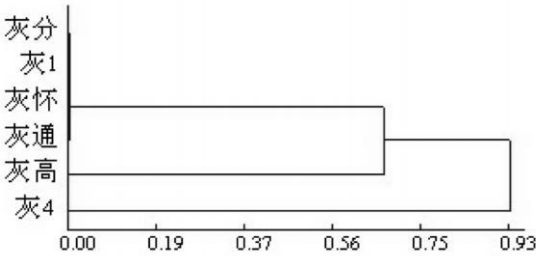


图 2 灰树花菌株聚类树状图

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。

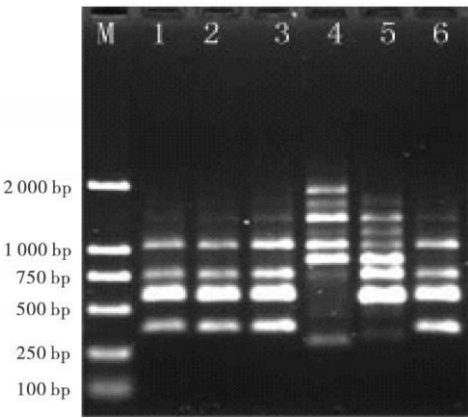


图 3 引物 H 16 对 6 个灰树花菌株扩增的条带  
注: “M”为 DL 2 000 marker 1 代表灰分, 2 代表灰通, 3 代表灰怀 4 代表灰高, 5 代表灰 4 6 代表灰 1。

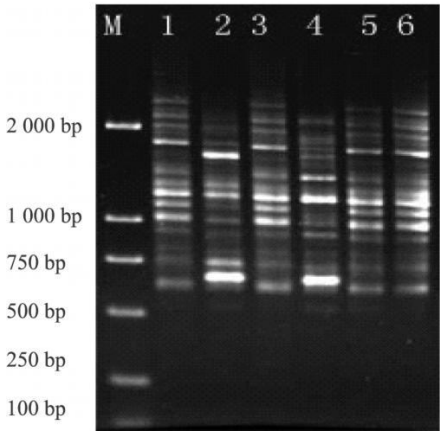


图 4 引物 S 17 对 6 个灰树花菌株扩增的条带  
注: “M”为 DL 2 000 marker 1 代表灰分, 2 代表灰 4 3 代表灰 1, 4 代表灰高, 5 代表灰怀 6 代表灰通。

2.3 ISSR 分析

从图 5 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。

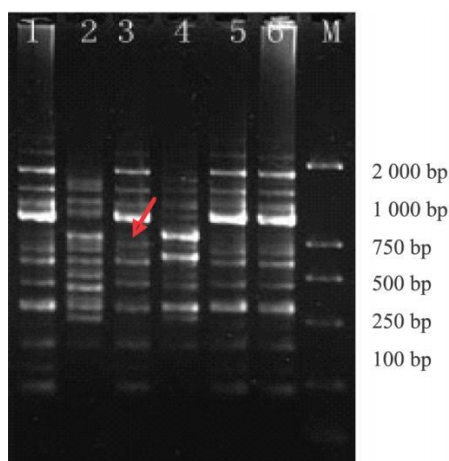


图5 引物对6个灰树花菌株扩增的条带

注：“M”为DL 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。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1 000 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 Huifen, Huitong, Huihuai and Hui1 were divided into one group. The strain hui4 and huigao 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