

黄伞种质资源遗传多样性的 RAPD 分析

瞿惠君, 刘连强, 周永斌, 张志军, 魏雪生

(天津市林业果树研究所, 天津 300384)

摘要:利用 RAPD 分子标记技术对 9 个黄伞菌株进行遗传多样性分析。结果表明:RAPD 技术是准确评估黄伞遗传多样性的有效方法。50 条 RAPD 引物中筛选出 8 条多态性引物,共检测出 226 条带,其中多态性条带 143 条,多态率为 63%。菌株之间遗传相似系数(GS)变幅范围为 0.6181~0.9306,平均 GS 值为 0.746,表明黄伞遗传变异较丰富。聚类分析结果表明,在相似系数 0.763 处可将 9 个黄伞菌株划分为 4 类。

关键词:黄伞;种质资源;遗传多样性;随机扩增多态性 DNA(RAPD)

中图分类号:S 759.8 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)17-0187-03

黄伞(*Pholiota adiposa* (Fr.) Quél.) 属球盖菇科鳞伞属,又名多脂鳞伞或肥鳞伞^[1],其子实体菌肉肥厚、营养丰富,菌盖表面有一层粘液,是一种核酸物质,具有恢复人体精力和脑力的特殊作用,从中提取的多糖具有强烈抗癌活性,是一种药膳同功的珍稀食用菌^[2-3]。野生黄伞在我国分布广泛,尤以北方地区常见,每年春季 5~6 月和秋季 8~10 月生长于杨、柳及桦等倒木或枯枝上^[4]。目前国内对黄伞的研究主要停留在野生驯化、生物学特性及人工栽培技术等方面,对黄伞种质资源分类和鉴定研究未见报道。

RAPD 是分子标记中比较方便、快捷的标记方法,仅用 10 bp 左右的引物就可以对整个基因组进行标记,而且多态性较高,呈显性遗传。现以 9 个黄伞菌株为材

料,采用 RAPD 技术对其遗传多样性及亲缘关系进行分析,为黄伞种质鉴定、资源保护和育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:Pa-1、2、3 为天津野生黄伞组织分离获得,Pa-4、5、6 购于福建三明市真菌研究所,Pa-7 购于江苏江都天达公司,Pa-8 购于湖北华中农业大学,Pa-9 购于北京吉蕈公司。菌株编号顺序为 1~9。供试培养基及试剂:PDA 固体培养基,PDM 液体培养基, λ -Hind III、digest DNA Marker 购自鼎国生物公司;Taq 酶、10xbuffer、MgCl₂、dNTPs 为 TaKaRa 公司产品,随机引物为上海生工公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝液体培养及收集 将活化后的供试菌株分别接种于含有 100 mL 无菌 PDM 液体培养基的 250 mL 三角瓶内,25℃ 恒温、150 r/min 摇床培养 10 d,用 2 层纱布过滤,蒸馏水冲洗干净后收集菌丝体,

第一作者简介:瞿惠君(1971-),女,天津人,硕士,助理研究员,现主要从事食用菌育种及栽培研究工作。

基金项目:天津市农业科学院院长基金资助项目(06008)。

收稿日期:2011-06-08

Study on Culture Conditions for Mycelium of *Morehella deliciosa*

TAO Re, TAN Yu-qin, CHEN Ye, FAN You-fu, XU Ming-min, HU Hao, PAN Li-hui

(College of Life Science, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000)

Abstract: Effects of culture medium, carbon sources, nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and pH on mycelium growth of cultivated *Morehella deliciosa* produced from Jiujiang in Jiangxi were studied. The results showed that the optimum culture medium was bean cake 200 g (boiled), corn flour 5 g, sucrose 20 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, NaNO₃ 0.01 g, yeast extract 0.5 g, agar 20 g and water 1 000 mL. Various carbon sources and nitrogen sources could be used by *Morehella deliciosa*. Among them, the best carbon sources was fructose, and the best nitrogen sources was NH₄NO₃ and beef paste. The optimum carbon to nitrogen ratio was 20:1. The mycelia of *Morehella deliciosa* were fitting to grow in neutral to low acid conditions, and the optimum pH was 6.

Key words: *Morehella deliciosa*; mycelium; nutrition; culture conditions

置-20℃贮存备用。

1.2.2 DNA提取 参照 CTAB 法从 9 个黄伞菌株的菌丝体提取基因组 DNA,并用紫外分光光度仪检测提取 DNA 的质量和浓度^[5]。

1.2.3 RAPD 扩增引物 从 50 条随机引物(RAPD Primers)中筛选出 8 条扩增效果好,且可重复性高的 10 碱基引物,其核苷酸序列见表 1。

表 1 随机引物编号及核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences of the random primers

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
Primer names	Primer sequence	Primer names	Primer sequence
S5	TGCGCCCTTC	S23	AGTCAGCCAC
S6	TGCTCTGCCC	S62	GTGAGGCGTC
S17	AGGGAACGAG	S80	ACTTCGCCAC
S22	TGCCGAGCTG	S1005	TTGCAGGCAG

1.2.4 RAPD 扩增条件 反应体系:扩增反应的总体积为 25 μ L,各组成成分为:10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L,NTPs(2.5 mmol/L)2 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L)1 μ L,随机引物(10 μ mol)0.5 μ L,模板 DNA(50 ng/ μ L)1 μ L,Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L)1 μ L,用 ddH₂O 补足体积。反应条件:扩增反应在 PCR 扩增仪上进行,94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min、35℃ 复性 1 min、72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;最后 72℃ 补平 10 min,终止温度为 4℃。

1.2.5 PCR 扩增产物检测 取 10 μ L DNA 反应液,于 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 GoldViewTM 核酸染料)、100 V 电压电泳 4 h 后,于紫外凝胶成像系统上拍照。

1.2.6 数据处理 DNA 指纹分析的结果为二元性状,同一位置上的带属于同一个位点,在每个位点上,有带的样品记为 1,无带的样品记为 0,所得的位点按分子量从大到小排列。数据输入聚类分析软件 NTsys 2.10e 进行分析,并选定 UPGMA 聚类方法,自动生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记的遗传多态性分析

筛选出的 8 个随机引物对 9 个黄伞菌株进行 PCR

表 3

9 个黄伞菌株遗传相似系数矩阵

Table 3 Matrix of similarity coefficient between 9 *Pholiota adiposa* strains

菌株 Strains	Pa-1	Pa-2	Pa-3	Pa-4	Pa-5	Pa-6	Pa-7	Pa-8	Pa-9
Pa-1	1.0000								
Pa-2	0.8333	1.0000							
Pa-3	0.7986	0.8958	1.0000						
Pa-4	0.7014	0.7431	0.7083	1.0000					
Pa-5	0.7153	0.7569	0.7361	0.9167	1.0000				
Pa-6	0.7431	0.8125	0.7917	0.8611	0.9306	1.0000			
Pa-7	0.6389	0.7361	0.7569	0.6181	0.6458	0.6875	1.0000		
Pa-8	0.6250	0.6944	0.7153	0.6181	0.6458	0.6875	0.8472	1.0000	
Pa-9	0.7292	0.7847	0.7778	0.7083	0.7361	0.7917	0.7014	0.7569	1.0000

反应,共扩增出 226 条带,其中多态性带 143 条,多态率达到 63%,呈现出较为丰富的遗传多样性(表 2)。不同引物扩增出的 DNA 片段数从 13~23 条不等,部分 RAPD 电泳图谱见图 1。

表 2 RAPD 引物的多态性分析

Table 1 Analysis of polymorphism observed using different random primers

引物 Primer	扩增总带数 Total bands/条	多态性带数 Polymorphic bands/条	多态率 Polymorphism rate/%
S5	23	16	70
S6	33	19	58
S17	30	23	77
S22	24	16	67
S23	36	21	58
S62	39	20	51
S80	26	15	58
S1005	15	13	87
总和 Total	226	143	63

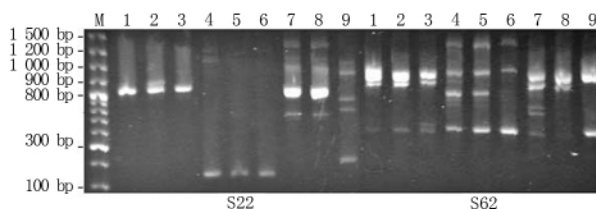


图 1 引物 S22、S62 对 9 个黄伞菌株的 RAPD 扩增电泳

Fig. 1 RAPD results of nine *Pholiota adiposa* samples using primer S22 and S62

注: M-分子质量标准(100 bp 梯度);1~9 供试样品。

Note: M-DNA Marker(100 bp ladder);1~9 Samples tested.

2.2 菌株间的遗传相似系数比较

采用 NTsys 2.10e 软件处理 RAPD 二元数据结果,计算出 9 个黄伞菌株两两间相似系数(Genetic similarity,GS),并组成相似系数矩阵(表 3)。供试菌株间 GS 值变化范围为 0.6181~0.9306,平均相似系数为 0.746。福建引入的 3 个菌株遗传距离相近,其中 Pa-5 与 Pa-6 的 GS 值最大(0.9306);GS 值最小为 0.6181,出现在 Pa-7、Pa-8 和 Pa-4 菌株之间;天津地区采集的野生菌株之间的 GS 值也较高,在 0.7986~0.8958 之间。

2.3 RAPD 聚类结果分析

利用 UPGMA 法进行聚类分析,结果如图 2 所示。当聚类水平为 0.763 时,可将 9 个黄伞菌株划分为 4 类,即采自天津地区的野生菌株被聚为 1 类;购自北京的菌株单独聚为 1 类;引自福建的菌株聚为 1 类;第 4 类包括从江苏、湖北引入的菌株。

各类群之间表现出较丰富的遗传多样性,每个群内的菌株间遗传上相似程度较高,如 Pa-5 和 Pa-6 之间 GS 大于 0.93,说明二者在 DNA 水平上具有极高的相似性。3 个天津野生菌株间遗传变异较少,亲缘关系较为接近,它们与引自其它地区栽培种的 GS 值均小于 0.8125,显示出一定的遗传差异(表 3),可能是由于地理隔离导致的结果。

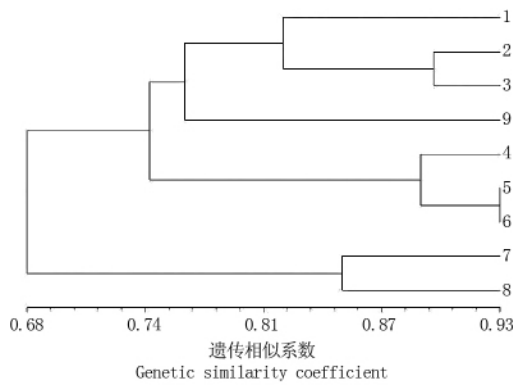


图 2 9 个黄伞菌株的聚类分析

Fig. 2 Dendrogram based on cluster analysis of RAPD data from nine *Pholiota adiposa* strains

3 讨论

RAPD 技术具有简便、快速、费用低、分子识别率高、对环境污染小等优点,因而它在食用菌研究中被广泛应用^[6]。该研究利用分子生物学方法研究黄伞种质资源,从 DNA 水平揭示了菌株间遗传差异,其结果与酯酶同工酶分类基本一致(研究结果待发表),表明了 RAPD 技术能够准确可靠地用于黄伞菌株的鉴定。

该试验的黄伞菌株来源于全国各地,大部分为国内主要栽培菌株,少数为天津地区采集分离的野生菌株。从聚类图可看出,野生菌株间相似性系数较高,变异较小,而与其它栽培菌株之间亲缘关系较远,表明天津野生菌株的种质资源多样性与地理分布具有一定相关性。但是从各地引入的栽培菌株之间的遗传差异和其来源地的地理位置却未体现出必然联系,可能是由于这些菌株在长期人工驯化和引种栽培过程中获得了更丰富遗传多样性的结果。

参考文献

[1] 刘波. 山西大型食用真菌[M]. 太原: 山西高校联合出版社, 1991: 59-60.
[2] 应建浙, 赵继鼎, 卯晓岚, 等. 食用蘑菇[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
[3] 黄清荣, 辛晓林, 姜华, 等. 碳、氮浓度对黄伞深层培养的影响[J]. 河南农业科学, 2006(2): 90-92.
[4] 马凤, 张天民, 昌明, 等. 黑龙江省珍稀野生黄伞驯化栽培技术的研究[J]. 中国林副特产, 2006(5): 34-37.
[5] 张红, 秦莲花, 谭琦, 等. 用改进的 CTAB 法提取香菇基因组 DNA[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2006(12): 90-92.
[6] 吕长武, 吕杰, 陈恒雷, 等. RAPD 分子标记在食用菌研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(1): 77-80.

Genetic Diversity Analysis of *Pholiota adiposa* Strains Based on RAPD

ZI Hui-jun, LIU Lian-qiang, ZHOU Yong-bin, ZHANG Zhi-jun, WEI Xue-sheng
(Tianjin Research Institute of Forestry and Pomology, Tianjin 300384)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA(RAPD) molecular markers were used to detect the genetic diversity among nine *Pholiota adiposa* strains. The results showed that eight primers worked well on stability and polymorphism were filtered for RAPD, the total number of band was 226, among which the number of the polymorphic band was 143, occupied with 63%. The genetic similarity among the strains ranged from 0.6181 ~ 0.9306, with a mean of 0.746, indicating very high genetic diversity in *Pholiota adiposa*. The cluster analysis results showed that nine *Pholiota adiposa* strains were classified into four groups with GS 0.763. RAPD technique might be an effective method to evaluate the genetic diversity of *Pholiota adiposa*.

Key words: *Pholiota adiposa*; genetic resource; genetic diversity; RAPD