

云南田头菇属两个物种遗传多样性的 AFLP 分析

何莹莹^{1,2}, 陈卫民², 赵永昌², 周德群¹

(1. 昆明理工大学 环境科学与工程学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650223)

摘要:利用扩增片段长度多态性(AFLP)技术分析了田头菇属的茶树菇(*Agrocybe aegerita*)及杨柳田头菇(*Agrocybe. salicicola*)基因组 DNA 的多态性,使用 11 对引物组合建立了 18 个供试菌株的指纹图谱。结果表明:通过聚类分析,18 个供试菌株聚为两大类,彼此关系得到很好的分辨。AFLP 技术可用于茶树菇和杨柳田头菇 2 个形态上非常相似物种的 DNA 分子指纹图谱构建。

关键词:茶树菇;杨柳田头菇;DNA 指纹图谱;聚类分析

中图分类号:S 646. 1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2012)21—0085—04

田头菇属(*Agrocybe*)隶属于真菌界(Fungi kingdom)、担子菌门(Basidiomycota)、伞菌纲(Agaricomycetes)、伞菌亚纲(Agaricomycetidae)、伞菌目(Agaricales)、球盖菇科(Strophariaceae),共有 155 个种和变种^[1]。中国有 7 个种,云南有 6 种,分别为 *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer, *Agrocybe dura* (Bolton) Singer, *Agrocybe erebia* (Fr.) Kühner ex Singer, *Agrocybe praecox* (Pers.) Fayod, *Agrocybe pediades* (Fr.) Fayod 和 *Agrocybe salicicola* Zhu. L. Yang, Zang et X. X. Liu^[2]。其中,茶树菇(*A.*

aegerita),也称茶薪菇,因其香纯味美,菌肉肥厚脆嫩,又含有 18 种氨基酸及丰富的 B 族维生素、矿物质元素及大量多糖,为国际菇类交易市场十大畅销食用菌之一^[3]。而杨柳田头菇(*A. salicicola*)为无孔组的种类,主产地为滇西北地区,味道鲜美,营养价值极高^[4-5]。因其与茶树菇外形很相似,仅从形态特征不容易对这 2 个物种区别,容易导致种类鉴定的混乱。采用分子生物学的方法对这 2 种菇的野生资源进行比对分析研究其遗传多样性,将对这 2 个种的遗传育种提供科学基础。

在我国过去发表的关于田头菇属的论著中,存在不引用拉丁学名或引用拉丁学名不规范问题,特别是同种异名现象显著。长期以来,一方面由于有关茶树菇系统地位的报道较少,导致了命名上的混乱。另一方面,国内外对该属的遗传多样性鲜有报道,至今还没有杨柳田头菇遗传多样性分析相关研究的报道^[7-11]。随着茶树菇的商品化,人工栽培技术日益成熟且规模迅速扩大以及杨柳田头菇的驯化栽培潜力增加,对这 2 个种野生资源

第一作者简介:何莹莹(1984-),女,硕士,研究方向为大型真菌分子生物学。E-mail:hy148427952@163.com.

责任作者:赵永昌(1964-),男,硕士,研究员,研究方向为大型真菌资源与利用。E-mail:yaasmushroom@yahoo.com.cn.

基金项目:云南省自然科学基金资助项目(2011FZ214);国家自然科学基金资助项目(31101591,31160160);国家食用菌产业技术体系资助项目(CARS-24)。

收稿日期:2012—06—19

Study on Antimicrobial Activity of *Bidens pilosa* L. Extracts

CHEN Jian-zhong, GE Shui-lian, XIAO Yu-fei

(Department of Biology, Handan College, Handan, Hebei 056005)

Abstract: With filter paper and spore germination method, the antibacterial activity of *Bidens pilosa* L. against three vegetable pathogens (*Botrytis* spp., *Alternaria* spp. and *Rhizopus* spp.) were studied. The results showed that the inhibition of mycelial growth from ethanol extraction was better than the effect of water extraction; the inhibition ratio of spore germination from water extracts was less than the ethanol extracts. Comprehensive antibacterial activity was always enhanced with increasing concentration of the extracts; with different concentrations of the same extracts, the inhibitory effect of *Rhizopus* spp. was the best, the inhibitory effect on *Botrytis* spp. was relatively poor.

Key words: Compositae; *Bidens pilosa* L.; antimicrobial activity; extracts

的搜集,以及对所分离菌株的准确鉴定就愈发显得重要^[6]。

该研究采用 AFLP 技术对田头菇属 2 个种(共 18 个标本)进行基因组 DNA 多态性分析,检测茶树菇及杨柳田头菇的遗传变异,并结合聚类分析探讨供试菌株的亲缘关系。以期进一步证明 AFLP 技术用于田头菇属 DNA 分子指纹图谱构建的可行性,并为 AFLP 技术在野生食用菌分类鉴定中的应用提供科学依据,同时也为野生资源的发掘利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从云南各地采集 18 个标本,分别属于茶树菇和杨柳田头菇 2 个种。经组织分离得到纯化菌株作为试材,所用材料均由云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所实验室提供。菌株来源见表 1。

表 1 用于 AFLP 分析的供试菌株

菌株编号	生长基质	采集地点
YAASM0594	生于滇杨(<i>Populus yunnanensis</i>)	建水县
YAASM0625	生于柳树(<i>Willow</i>)	漾濞县
YAASM0711	生于柳树(<i>Willow</i>)	香格里拉县
YAASM0894	生于柳树(<i>Willow</i>)	剑川县
YAASM0963	生于柳树(<i>Willow</i>)	剑川县
YAASM0967	生于柳树(<i>Willow</i>)	剑川县
YAASM0969	生于滇杨(<i>Populus yunnanensis</i>)	剑川县
CS45	栽培种质	该实验室保存
YAASM0971	生于柳树(<i>Willow</i>)	洱源县
YAASM0972	生于柳树(<i>Willow</i>)	洱源县
YAASM0973	生于柳树(<i>Willow</i>)	洱源县
YAASM0974	生于柳树(<i>Willow</i>)	洱源县
YAASMI024	生于滇杨(<i>Populus yunnanensis</i>)	大姚县
YAASMI413	生于柳树(<i>Willow</i>)	香格里拉县
YAASMI415	生于柳树(<i>Willow</i>)	玉龙县
YAASMI443	生于滇杨(<i>Populus yunnanensis</i>)	玉龙县
YAASMI963	生于滇杨(<i>Populus yunnanensis</i>)	玉龙县
XW01	生于腐木	宣威市

1.2 试验方法

1.2.1 菌株培养及 DNA 的提取 接种少量菌丝体到 PYD 固体培养基(琼脂粉 1.2%,葡萄糖 2%,酵母浸出粉 0.2%,蛋白胨 0.2%,pH 自然)上,25℃恒温培养至菌丝长满平板。将长满平板的菌丝用灼烧灭菌过的接种铲刮取至 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,加入液氮研磨至粉状,用 CTAB 法提取供试材料的 DNA。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,条带清晰,亮度高的即可。

1.2.2 AFLP 扩增 模板 DNA 经限制性内切酶 *EcoRI* (MBI Fermentas)、*MseI* (MBI Fermentas) 分别酶切;双酶切产物加入 *EcoRI* 和 *MseI* 接头序列 (MBI Fermentas) 和 *T₄* 连接酶 (MBI Fermentas) 进行连接;连接产物加入 *EcoRI* 和 *MseI* 进行预扩增。预扩增采用 1 个选择性碱基的引物,反应液组成:2×Power Taq PCR Master Mix (Bioteke) 15 μL, Eco + 1/*MseI* + 1 引物对的用量为 0.5 μL/0.5 μL (35 ng/μL),经酶切连接的模板 DNA

4 μL。扩增程序为:94℃预变性 2 min,94℃变性 20 s,56℃退火 30 s,72℃延长 2 min,循环 20 次,最后 60℃延伸 30 min。将预扩产物稀释 20 倍作为模板,用具有 3 个选择性碱基的引物 E+3 引物和 M+3 引物进行扩增,反应液组成:2×Power Taq PCR Master Mix 15 μL, Eco+3/*MseI* + 3 引物对的用量为 0.5 μL/0.5 μL (35 ng/μL),经稀释的模板 DNA 4 μL。扩增程序为:①94℃预变性 2 min,94℃变性 20 s,66℃退火 30 s,72℃延长 2 min,进行“降落式”PCR 程序,循环 1 次,退火温度降低 1℃,共循环 10 次。②94℃变性 20 s,56℃退火 30 s,72℃延长 2 min,循环 20 次,最后 60℃延伸 30 min。扩增反应在 BIO-RAD 公司的 C1000™PCR 仪中进行,所用 Eco+1/*MseI* + 1, Eco+3/*MseI* + 3 引物由生工生物公司合成,扩增后产物作为聚丙烯酰胺凝胶电泳样品置于 -20℃保存备用。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 取选择性扩增产物 6 μL 与 6×Loading Buffer 混匀,在 6%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,恒定电压 120 V,电泳时间 6 h。电泳完毕,取下胶板固定,银染,显影,拍照。

1.3 数据分析

扩增条带采用人工读带,模糊带及弱带不计,只选用 150~750 bp 间出现的扩增条带,分别用“1”或“0”表示条带的有或无,产生二态数据矩阵。数据用 POPGENE 软件计算得到。用 NTSYS Pc 分析软件 UPGMA(平均连锁法)进行聚类分析,获得树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 不同引物组合扩增产物的多态性

由表 2 可知,该试验共选用 11 对引物组合对 18 株供试菌株进行 AFLP 扩增,共得到 108 条带,其中多态性条带为 106,多态性比率为 98.15%。

表 2 用于 AFLP 的引物组合及扩增片段数目

序号	E+3 引物	M+3 引物	扩增片段数目/条
1	E-AAG	M-CAA	10
2	E-AAG	M-CAC	10
3	E-ACT	M-CAC	10
4	E-ACC	M-CAC	10
5	E-AGG	M-CAC	10
6	E-AGC	M-CAC	11
7	E-ACA	M-CAC	11
8	E-AAC	M-CAC	9
9	E-ACC	M-CAA	10
10	E-ACT	M-CAA	9
11	E-ACG	M-CAA	8

2.2 AFLP 指纹图谱

试验共获得 18 株供试菌株的 AFLP 指纹图谱 11 份。由图 1、2 可知,11 对引物应用于供试菌株均有效,

不同的 AFLP 引物组合在扩增带型、扩增带数量、条带分布均匀度、多态性位点检出率等方面存在明显差异,同时每对引物组合在不同的材料间也出现共同的带。一方面表明供试材料遗传背景的复杂性,另一方面也显示出茶树菇和杨柳田头菇之间的共性。同时所试材料间无完全相同的谱带,表明了应用 AFLP 技术构建田头菇属指纹图谱的高效性。不同材料的 DNA 指纹图谱可以为品种鉴定,亲缘关系的演化分析以及种质资源多样性研究提供可靠的遗传背景依据。

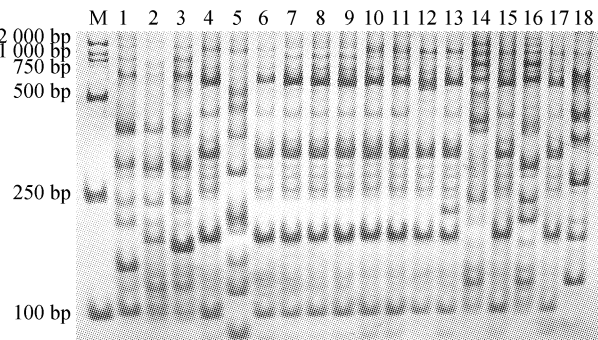


图 1 引物组合 E-AAG/M-CAC 的 AFLP 指纹图谱

注:1~18 的菌株编号分别为 YAASM1024,CS45,YAASM0625,YAASM0711,YAASM0594,YAASM0972,YAASM0969,YAASM0967,YAASM0963,YAASM0974,YAASM0971,YAASMI443,YAASMI415,YAASMI963,YAASM0894,XW01,YAASM0973,YAASMI413。

Fig. 1 The AFLP fingerprint of 18 strains by E-AAG and M-CAC selective primer pair

Note:1~18 means YAASM1024,CS45,YAASM0625,YAASM0711,YAASM0594,YAASM0972,YAASM0969,YAASM0967,YAASM0963,YAASM0974,YAASM0971,YAASMI443,YAASMI415,YAASMI963,YAASM0894,XW01,YAASM0973,YAASMI413.

2.3 聚类分析

18 株供试菌株的聚类结果见图 3,当阈值为 0.54 时,18 株菌株可聚为 2 类:茶树菇和杨柳田头菇。当阈值为 0.60 时聚为 3 类:编号 YAASM0594 的菌株因其特异性而独立于茶树菇和杨柳田头菇。当阈值为 0.74 时聚为 4 类:YAASM0594,YAASMI413 均独立于茶树菇和杨柳田头菇。当阈值为 0.89 时,杨柳田头菇分为 2 个分支,而茶树菇的供试菌株均一一独立。

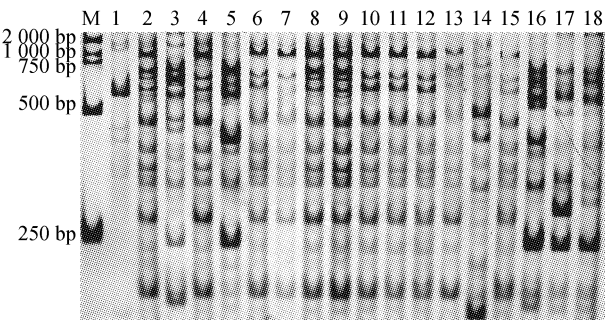


图 2 引物组合 E-AGG/M-CAC 的 AFLP 指纹图谱

注:1~18 的菌株编号分别为 YAASM1024,CS45,YAASM0625,YAASM0711,YAASM0594,YAASM0972,YAASM0969,YAASM0967,YAASM0963,YAASM0974,YAASM0971,YAASMI443,YAASMI415,YAASMI963,YAASM0894,XW01,YAASM0973,YAASMI413。

Fig. 2 The AFLP fingerprint of 18 strains by E-AGG and M-CAC selective primer pair

Note:1~18 means YAASM1024,CS45,YAASM0625,YAASM0711,YAASM0594,YAASM0972,YAASM0969,YAASM0967,YAASM0963,YAASM0974,YAASM0971,YAASMI443,YAASMI415,YAASMI963,YAASM0894,XW01,YAASM0973,YAASMI413.

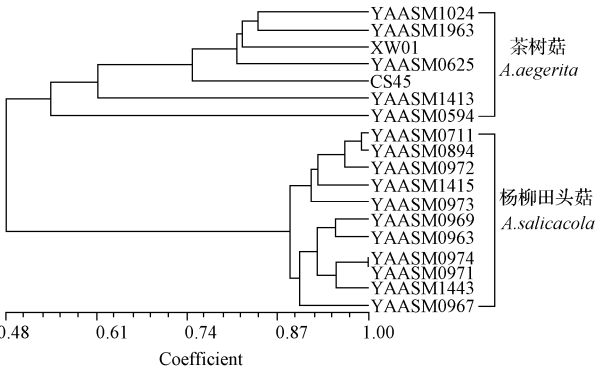


图 3 18 份田头菇属菌株基于 AFLP 分析的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA cluster diagram of 18 Agropyce strains based on AFLP analysis

2.4 遗传多样性分析

由表 3 可知,18 株菌株个体水平上遗传多样性为: $P=98.15\%$,期望杂合度 $He=0.2849$,Shannon 多样性指数 $Ho=0.4365$;分组水平上期望杂合度 $He=0.2943$,Shannon 多样性指数 $Ho=0.4481$ 。

表 3 聚类分析分类群的遗传多样性分析

Table 3 Cluster analysis of genetic diversity of taxa analysis

名称	多态性位点数	p	Ne	He	Ho	Ht	Hs	Gst	Nm
茶树菇	60	55.56%	1.3642	0.2199(0.1840)	0.3386(0.2574)				
杨柳田头菇	77	71.30%	1.3030	0.1780(0.1992)	0.2681(0.2837)				
组间水平	106	98.15%	1.5018	0.2943(0.1703)	0.4481(0.2165)	0.3140	0.1989	0.3666	0.8640

注:括号内数值为标准差。

3 结论与讨论

杨柳田头菇属于田头菇属的无孔组,仅仅依据形态和生理生化特征对其进行鉴定并与该属其它物种,尤其是与茶树菇区分非常困难。应用 AFLP 技术研究分析遗传变异和差异表达,对于鉴定田头菇属的种质资源具有高效、稳定、准确的优点。该研究结果为云南田头菇属野生资源的遗传多样性及其进化提供了新的科学依据。

该试验发现某些引物组合能够扩增出田头菇属的 DNA 特异条带,一旦这些条带被确认为是某个种所特有,对于鉴别该种以及田头菇属分类学研究都有重要意义,并为构建野生食用菌的生命条形码(Barcoding)提供了试验数据。此外,若能设计出特有的 AFLP 标记,并转化为更便捷的 STS 标记,利用该标记快速确定物种更为省时省力。关于茶树菇和杨柳田头菇的鉴定,有研究者利用 2 个种线粒体小亚基 V9 区的差异找到一个单一的 DraI 酶切位点,能够把 2 个种 V9 区片段有效的区分开来^[12]。该方法与之相比较,也可以有效的将 2 个物种区分开来。而且还可以从全基因组的角度分析资源的多样性,为野生资源收集及育种研究提供更多、更有价值的遗传信息。

由聚类图可以看出,杨柳田头菇一类的遗传相似系数均大于 0.87,菌株之间的亲缘关系相对较近,说明该种具有较高的遗传一致性,遗传基础相对狭窄,表明杨柳田头菇种内分化不大。而茶树菇菌株的遗传相似系数分布范围为 0.54~0.84,可见云南的茶树菇种质资源之间存在较大的遗传多样性,说明茶树菇种内分化较大,在地理隔离或者其它因素影响下,存在种下单位分化的可能性。此外,茶树菇的遗传多样性也为选种育种提供了丰富的遗传材料和应用前景。其中, YAASM0594 和

YAASM1413 与其它 5 个菌株的遗传相似系数相比最小,表明这 2 个菌株的亲缘关系最远,是否因地理隔离的影响(YAASM0594 产于建水,而 YAASM1413 产于香格里拉),导致了这 2 个菌株向不同的方向演化还需要做进一步的研究。

参考文献

- [1] NCBI. Bioscience databases[J/OL]. 2011-12-16. <http://www.index-fungorum.org>.
- [2] 戴玉成,周丽伟,杨祝良,等. 中国食用菌名录[J]. 菌物学报,2010,29(1):1-21.
- [3] 彭世红. 茶薪菇在云南大理州的栽培新技术[J]. 中国果菜,2011(1):24.
- [4] 杨祝良,戴穆,刘学系. 杨柳田头菇—无孔组的一个滇产新种[J]. 云南植物研究,1993,15(1):18-20.
- [5] 田果廷,徐学忠,杨琼芳,等. 柳松茸滇 As-018 菌株特性及高产栽培技术[J]. 食用菌,2004(2):14-15.
- [6] 周会明,赵永昌,陈卫民,等. 杨柳田头菇交配型因子与菌丝生长速度的连锁研究[J]. 云南植物研究,2010,32(4):315-322.
- [7] 谭琦,严培兰,詹才新,等. 利用 RAPD 技术对不同地理环境下柳松菇菌株亲缘关系的分析[J]. 上海农业学报,1999,15(4):18-21.
- [8] 鲍大鹏,王南,陈明杰,等. 同工酶和 RAPD 技术对柳松菇(*Agrocybe aegerita*)菌株遗传多样性的分析[J]. 农业生物技术学报,2000,8(3):284.
- [9] 鲍大鹏,王南,陈明杰,等. 采用 ARDRA 和 RAPD 对柳松菇(*Agrocybe aegerita*)菌株遗传多样性的分析[J]. 上海农业学报,2001,17(1):18-22.
- [10] Salvado J C, Labarère J. Protein mapping and genome expression variations in the basidiomycete *Agrocybe aegerita* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1989, 78(4):505-512.
- [11] Marmeisse R. Genetic variation in basidiocarp production within wild and controlled dikaryotic populations of the edible basidiomycete *Agrocybe aegerita* [J]. Mycological Research, 1989, 92(2):147-152.
- [12] 陈卫民,张小雷,柴红梅,等. 基于线粒体序列特征的茶树菇及杨柳田头菇分离物快速鉴定[J]. 中国农学通报,2011,27(31):152-155.

Genetic Diversity Analysis of Two *Agrocybe* Species in Yunnan by AFLP

HE Ying-ying^{1,2}, CHEN Wei-min², ZHAO Yong-chang², ZHOU De-qun¹

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500;

2. Institute of Biotechnology and Germplasmic Resource, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming, Yunnan 650223)

Abstract: AFLP technique was used to analyze the genomic DNA polymorphism of *Agrocybe aegerita* and *A. salicicola* collected from Yunnan. The DNA fingerprint of the eighteen strains in *Agrocybe* was generated by eleven primer combinations. Eighteen strains of *Agrocybe* were clustered into two big groups, which phylogenetic relationship was distinguished clearly. The results indicated that AFLP technique could be used to construct the DNA molecular fingerprint of *A. aegerita* and *A. salicicola*, both of which were very similar in morphology.

Key words: *Agrocybe salicicola*; *Agrocybe aegerita*; DNA fingerprint; cluster analysis