

黄绿蜜环菌 SSR-PCR 反应体系的优化及引物筛选

李 颖¹, 谢占玲^{1,2}, 田 飞¹, 贾贤卿¹, 方 慧¹, 夏明哲¹

(1. 青海大学 生态环境工程学院, 青海 西宁 810016; 2. 青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘 要:以 CTAB 法提取的黄绿蜜环菌(*Armillaria luteo-virens*)DNA 为模板,应用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计,对 Mg^{2+} 、dNTPs、引物和 Taq DNA 聚合酶、模板浓度 5 种因素进行 SSR-PCR 反应体系优化,建立了适合黄绿蜜环菌 SSR-PCR 反应的最佳体系并对退火温度进行检测。结果表明:在 15 μ L 反应体系中包括:1 \times PCR Buffer,100 ng 模板 DNA,dNTPs 217 μ mol/L,引物 0.5 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 0.75 U, Mg^{2+} 1.3 mmol/L。稳定性检测证明,该反应体系具有较高的稳定性和重复性,并从 34 对引物中共筛选出扩增条带清晰、多态性丰富的 SSR 引物 8 对。该体系的建立为今后利用 SSR 标记对黄绿蜜环菌遗传多样性研究、亲缘关系分析及种质资源鉴定等研究提供了依据。

关键词:黄绿蜜环菌;SSR-PCR;体系优化;正交设计;引物

中图分类号:S 503.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0114-06

黄绿蜜环菌(*Armillaria luteo-virens*)属担子菌门(Basidiomycota)层菌纲(Hymenomycetes)伞菌目(Agaricales)口蘑科(Tricholomataceae)蜜环菌属[*Armillaria*(Fr.:Fr.)Stauder],又名黄蘑菇,主要分布在我国的青海、西藏等地,海拔 3 000~4 500 m 的草原或高山草甸上,与高原牧草嵩草属(*Kobresia*)植物形成外生菌根^[1]。黄绿蜜环菌营养丰富,香气浓郁,味道鲜美,具有重要的食药价值 and 生态功能,是青藏高原珍贵真菌资源宝库中典型代表种之一^[2]。但是由于其特殊生态环境及短促的发生时间,其研究才刚刚起步。

蜜环菌属是口蘑科中一个重要的属,也是全球森林生态系统真菌区系的一个重要的组成部分,世界各大洲均有分布^[3]。蜜环菌具有较高的食药价值,而且还是名贵中药天麻(*Gastrodia elata*)和猪苓(*Grifola umbellata*)栽培所必备的共生菌。同时,蜜环菌在全世界温带和寒带侵染 600 多种树木,可导致林木根朽病,造成巨大的经济损失^[4]。目前,已报道的蜜环菌有 52 种,其中中国记录种有 14 种^[5]。近年来,在对蜜环菌属真菌

的分子研究方面, Kim 等^[6-7]采用 RFLP、ITS、IGS-1 和 AFLP 对北美的部分蜜环菌属种进行了分子鉴定以及亲缘关系分析; Coetzee 等^[8-9]基于 ITS 和 IGS-1 序列对南美、印尼以及马来西亚的部分蜜环菌属种进行分子鉴定和系统进化地位分析, Langrell 等^[10]对法国西南的部分蜜环菌属种进行简单重复序列多态性位点分离和鉴定; Prospero 等^[11-12]对法国西南的部分蜜环菌属种的种群遗传结构进行了研究并用 8 个微卫星标记对瑞士和乌克兰的部分蜜环菌属种进行研究,并将其成功运用到蜜环菌属其它种,在这些研究报道中均未见有黄绿蜜环菌(*Armillaria luteo-virens*)种;国内关于蜜环菌报道中,孙立夫等^[13]采用 ISSR 对采自东北的 53 个法国蜜环菌(*Armillaria gallica*)菌株进行遗传多样性分析,且表明 ISSR 标记在蜜环菌中存在较高的多态性;王守现等^[14]用 RAPD 技术对 13 个蜜环菌(*Armillaria mellea*)菌株进行了遗传多样性分析,研究结果表明 RAPD 技术可以有效区分蜜环菌菌株并分析其遗传多样性。目前,青藏高原黄绿蜜环菌研究报道主要是关于黄绿蜜环菌的生物学特征,人工培养,化学成分分析等方面^[15-16];李海波等^[17]首次基于分子手段对我国青藏高原的黄绿蜜环菌种进行了分离培养、分子鉴定和系统发育分析,但是关于黄绿蜜环菌(*Armillaria luteo-virens*)菌株 SSR 研究方面鲜见报道。

简单重复序列(Simple sequence repeats, SSR),又称微卫星 DNA(Microsatellite DNA),是由 1~6 个核苷酸为单位多次串联重复的 DNA 序列,广泛分布于真核生物基因组中。同一类微卫星 DNA 可分布在整个基因组

第一作者简介:李颖(1987-),女,硕士,研究方向为真菌分子遗传。E-mail:liyings1196@126.com

责任作者:谢占玲(1966-),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向为真菌及酶学。E-mail:xiezhanling2003@yahoo.com.cn

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260021);青海省自然科学基金资助项目(2011-z-724);国家重点实验室培育基地青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室开放课题资助项目(2011-05)。

收稿日期:2013-04-09

不同位置上,由于重复次数不同,或重复程度不完全,而形成每个座位的多态性^[18-19]。由于微卫星标记具有中性、量大、共显性、多态性高等特点,故而是一种理想的遗传标记。自发现以后,它很快发展为一种极具价值的遗传标记^[20],并在种群分化、家系分析、基因连锁分析、进化研究、遗传多样性等方面的研究中广泛应用^[21-22]。在已有的报道中,Langrell 等^[10]对法国西南的部分蜜环菌属种进行 SSR 位点分离和鉴定;Prospero 等^[11-12]对法国西南的部分蜜环菌属种的种群遗传结构进行了研究并用 8 个微卫星标记对瑞士和乌克兰的部分蜜环菌属种进行了研究,将其成功运用到蜜环菌属其它种;Baumgartner 等^[23]用 12 个微卫星标记对北美的部分蜜环菌属种进行了研究。目前尚鲜见有关将微卫星技术应用到黄绿蜜环菌遗传多样性研究的报道。由于微卫星引物具有种属特异性,研究适用于黄绿蜜环菌遗传分析的微卫星引物的任务就变得越来越紧迫和重要。

该研究选用采自青藏高原的野生药食两用菌—黄绿蜜环菌为试材,利用正交实验设计方法,首次对影响黄绿蜜环菌 SSR-PCR 反应体系中的因素进行优化,以期建立较为完整可靠的黄绿蜜环菌 SSR 反应体系,为后续开展遗传多样性的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄绿蜜环菌子实体于 2012 年 7 月采自青海祁连和西藏那曲、当雄及安多,体系优化仅选用采自青海祁连样品。采集回来的样品立刻 40℃ 烘干,之后于干燥环境中存储备用,用于 DNA 提取。

用于 SSR-PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 均购于 TaKaRa 公司,引物参考自文献^[10-12,23],由上海生物工程公司合成。标准分子量(Marker)DL 5 000 购于 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取与浓度测定 黄绿蜜环菌总 DNA 提取采用改良 CTAB 法^[24],提取黄绿蜜环菌 DNA 于 -20℃ 下保存待用。用 Eppendorf 公司生产的 BioPhotometer 核酸检测仪检测 DNA 溶液浓度与纯度,并将其稀释 50 ng/ μ L, -20℃ 下保存。

1.2.2 PCR 反应因素水平的确定与正交表的设计 经初步筛选,以条带清晰的 Arm11 作为正交实验的引物,其序列为:F:5'-CGAGCCGTCAACAGAGAATC-3',R:5'-TACCAGTCCATCTGGCATGA-3',为了确定 PCR 反应中的 5 个因素,即 *Taq* 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTP、引物、DNA 模板 5 个因素的最佳水平,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交设计进行试验,正交实验因素及水平见表 1,设计方案见表 2,设 2 次重复。共 32 个 PCR 管,按表 2 的数据加样;另外,每管还加入 1.5 μ L 的 10×PCR Buffer(终浓

度为 1×PCR Buffer),其余用 ddH₂O 补足,反应体系总体积为 15 μ L。

表 1 PCR 反应的因素和水平

Table 1 Factors and levels in PCR system μ L					
水平	因素				
	<i>Taq</i> 聚合酶 (5 U/ μ L)	dNTP (各 2.5 mmol/L)	Mg^{2+} (25 mmol/L)	引物 (10 μ mol/ μ L)	DNA 模板 (50 ng/ μ L)
1	0.10	0.9	0.8	0.25	0.5
2	0.15	1.1	1.0	0.50	1.0
3	0.20	1.3	1.2	0.75	1.5
4	0.25	1.5	1.4	1.00	2.0

表 2 SSR-PCR 正交实验设计 $L_{16}(4^5)$

Table 2 Orthogonal design for $L_{16}(4^5)$					
处理	引物 (10 μ mol/L)	Mg^{2+} (25 mmol/L)	dNTP (各 2.5 mmol/L)	DNA 模板 (50 ng/ μ L)	<i>Taq</i> 酶 (5 U/ μ L)
1	0.25	0.8	0.9	0.5	0.10
2	0.25	1.0	1.1	1.0	0.15
3	0.25	1.2	1.3	1.5	0.20
4	0.25	1.4	1.5	2.0	0.25
5	0.50	0.8	1.1	1.5	0.25
6	0.50	1.0	0.9	2.0	0.20
7	0.50	1.2	1.5	0.5	0.15
8	0.50	1.4	1.3	1.0	0.10
9	0.75	0.8	1.3	2.0	0.15
10	0.75	1.0	1.5	1.5	0.10
11	0.75	1.2	0.9	1.0	0.25
12	0.75	1.4	1.1	0.5	0.20
13	1.00	0.8	1.5	1.0	0.20
14	1.00	1.0	1.3	0.5	0.25
15	1.00	1.2	1.1	2.0	0.10
16	1.00	1.4	0.9	1.5	0.15

1.2.3 SSR-PCR 扩增及检测 PCR 扩增反应在 Bio-Rad PCR 扩增仪上进行,反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延长 10 min,4℃ 保存。PCR 产物加 3 μ L 6×Loading buffer,混匀后取 5 μ L,以 TaKaRa 公司的 DL 5 000 Marker 为对照,用 2.0% 琼脂糖凝胶,在电泳仪上电泳。之后在凝胶成像系统拍照,得到 PCR 电泳图。

1.2.4 PCR 退火温度筛选 依据以上所得的最佳因素水平,利用 PCR 扩增仪进行 PCR 反应程序中退火温度梯度试验。退火温度在 51~58℃ 之间设置 12 个梯度:51.0、51.2、51.6、52.2、53.0、54.0、55.2、56.2、57.0、57.5、57.9、58.0℃。选择 51.0、52.2、53.0、54.0、55.2、56.2、57.0、58.0℃ 共 8 个温度设为梯度,对所得 PCR 产物进行电泳检测。

1.2.5 SSR 最佳反应体系稳定性检测 应用上述最佳反应体系,用筛选出的其它 SSR 引物,对 17 份黄绿蜜环菌 DNA 进行 SSR 扩增,进行黄绿蜜环菌 SSR-PCR 反应体系的稳定性检测。

1.2.6 SSR 引物筛选 首先,将获得的 34 对蜜环菌属 SSR 标记引物对黄绿蜜环菌的基因组 DNA 模板进行初步筛选,对初步筛选出的引物先进行退火温度梯度试

验,再根据每对引物的最佳退火温度对 4 个不同地域黄绿蜜环菌 DNA 模板进行复筛,以条带数量丰富,清晰度高,易于统计,稳定性好,背景低,多态性好作为核心引物的标准,筛选核心引物。PCR 产物均在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)进行检测,用银染法进行显色、定影,待凝胶干燥后使用扫描仪记录图像。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果

用改良 CTAB 法提取的黄绿蜜环菌基因组 DNA,其检测结果 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.79~1.89 之间,DNA 浓度大致在 213.1~725.3 $\mu\text{g/mL}$ 之间,其纯度和产量均较高。说明所提取的 DNA 可用于 SSR 分析。

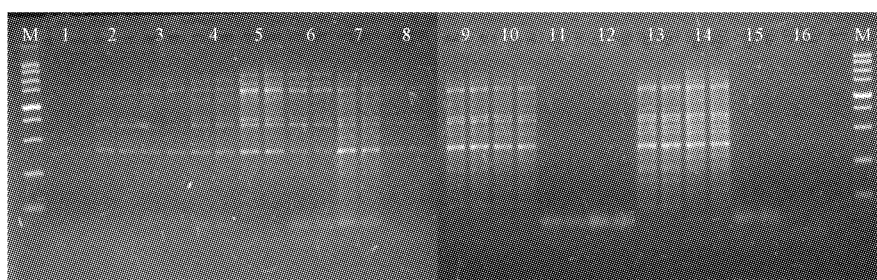


图 1 正交设计 SSR-PCR 反应体系的扩增结果

注:1~16 为处理组合代号,参见表 2;M:DL 5 000 Marker。

Fig. 1 Amplification results of SSR-PCR reaction by orthogonal design

Note:1~16 are the codes of orthogonal design in table 2;M:DL 5 000 Marker.

2.3 不同退火温度对黄绿蜜环菌 SSR-PCR 扩增的影响

不同的引物有不同的退火温度。PCR 反应中,退火温度的高低直接影响引物与模板 DNA 的特异性结合。利用最佳反应体系进行退火温度梯度试验,由图 2 可以看出,退火温度过低,则产物多且非特异性扩增条带较多,结果不可靠;退火温度过高,引物与模板结合差,PCR 产物丰度低,电泳条带亮度小,因此,如果采用该试验选

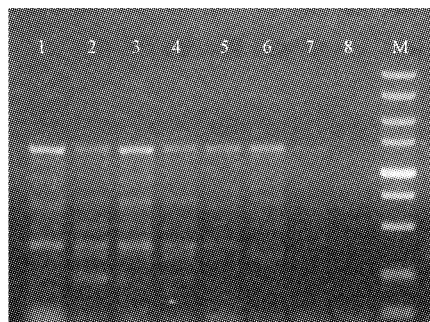


图 2 不同退火温度对 SSR-PCR 反应体系的影响

注:1~8 依次为 51、52、53、54、55、56、57、58 $^{\circ}\text{C}$;M:标准分子量 DL 5 000。

Fig. 2 Effects of different annealing temperature on SSR-PCR amplification

Note:1~8 are 51,52,53,54,55,56,57,58 $^{\circ}\text{C}$;M:标准分子量 DL 5 000。

2.2 SSR-PCR 正交实验设计的直观分析

图 1 可以清晰看出,16 个组合的扩增结果存在差异。可见 PCR 的扩增结果是由 Mg^{2+} 、dNTPs、引物和 Taq DNA 聚合酶、模板等组分浓度综合作用的结果。其中,第 1、11、12、15、16 组合扩增效果很差,几乎扩增不出条带;第 2、3、4、6、8 组合电泳条带较弱;第 5、7、9、10、13、14 组合处理效果较好,通过条带数量丰富、清晰度高、背景低的比较原则并综合经济因素等选择出最佳反应体系 9。即在 15 μL 反应体系中包含:1 \times PCR Buffer, 100 ng 模板 DNA, dNTPs 217 $\mu\text{mol/L}$, 引物 0.5 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶 0.75 U, Mg^{2+} 1.3 mmol/L。

用的引物,应该采用 53.0 $^{\circ}\text{C}$ 的退火温度,即可扩增出清晰的 SSR 靶目标条带。

2.4 SSR 最佳反应体系稳定性检测

对已经筛选处理的引物中随机选择引物 FLL7,应用上述最佳反应体系对 17 份黄绿蜜环菌 DNA 进行 SSR 扩增。由图 3 可知,引物对每份 DNA 样品均扩增出清晰、亮度较好的目的片段,说明该体系稳定,适用于黄绿蜜环菌 SSR 反应。

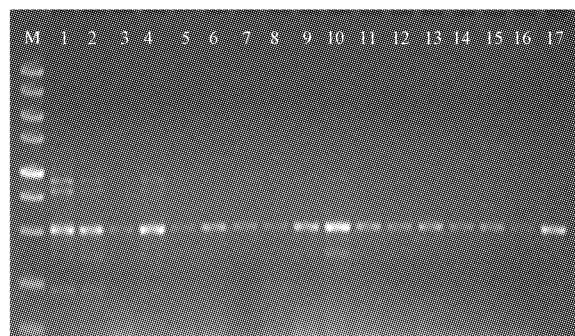


图 3 引物 FLL7 对 17 份黄绿蜜环菌个体的扩增结果

注:1~17 为 17 份黄绿蜜环菌 DNA 扩增结果。M:DL 5 000。

Fig. 3 DNA bands amplified by primer FLL 7 in 17 *Armillaria luteo-virens*

Note:1~17 are 17 *Armillaria luteo-virens*. M:DL 5 000。

表 3 14 对微卫星引物序列

Table 3 Sequences of the 14 pairs of microsatellite primers

引物代号	位点名称	引物序列(5'-3')	碱基数	筛选结果
FLL1	CAG25aF	AGGACTTCCAGAGGATGATGA	21	p
	CAG25aR	TATGACCCACCACCACTG	19	
FLL2	AoSSR21aF	GCAGAGCGCAAATGAAACTA	20	p
	AoSSR21aR	CACCACGAGTGCTTCTACCA	20	
FLL3	CAG77aF	TAGCCTGCGGTACGATGAC	20	m
	CAG77aR	AGTGCTCTCTCAATCTTTGG	20	
FLL4	Arm15F	CGAGCGTCAACAGAGAATC	20	—
	Arm15R	TCCCCAAACACAACCTTCTC	20	
FLL5	Arm11F	CATCCCTTTTCGGACAGCAC	19	p
	Arm11R	TACCACTCATCTGGCATGA	20	
FLL6	Arm05F	GAGGAAGAGCTACGCACAGG	20	p
	Arm05R	CGGTTTCATCGGAGGTCTA	19	
FLL7	Arm16F	ATTTGGAATCCTGACGTTGC	20	p
	Arm16R	GGCGCATTTGGTCAAAGTAA	20	
FLL8	Am024F	GACCGGACCTCGTATGACAC	20	±
	Am024R	GCACTTTGGTGAAACCATCC	20	
FLL9	Am109F	ATGAGACCCAGAAAGTTGAAGA	22	±
	Am109R	CACGTTGACAAATCCAATGC	20	
FLL10	Am125F	AGCGTGTGATCTCAACAGCA	20	p
	Am125R	CACATCCTGCAACTTCCTTG	20	
FLL11	Am036F	ATTCTTGCAATCCGTCGAGT	20	—
	Am036R	TGCACAGCTCCTGATCATCT	20	
FLL12	Am094F	CGCAGAAGAACATTCGAACA	20	p
	Am094R	AGACGGTAGGTTGGCTGGTA	20	
FLL13	AoSSR22F	AGATACCATAAGAGCGCGAT	20	p
	AoSSR22R	GGCTAGAAATGCAACAGCG	19	
FLL14	AoSSR74F	GCTCACCTCAAACCTTAACA	20	—
	AoSSR74R	GCAGGCACAAATGAAACTA	20	

注:—:无电泳条带;±:有条带但不清晰,模糊且不稳定;m:电泳条带没有多态性;p:电泳条带多态性好。

Note:—:No band;±:There are bands but not clear,vague but not stable;m:No polymorphism;p:Good polymorphism.

2.5 SSR 引物筛选结果

在初步筛选出的 14 对微卫星引物中,有 11 对微卫星引物得到明显扩增产物,如表 3 所示。将初筛得到的 11 对微卫星引物对 40 份黄绿蜜环菌 DNA 模板进行扩增。电泳检测后发现,引物 FLL4、FLL11、FLL14 没有扩增条带,说明这 3 对微卫星引物不适用于黄绿蜜环菌种群,引物 FLL8、FLL9 扩增带非常弱且难分辨,引物 FLL3 扩增的带型中多态性较低,其余的 8 对引物(占 57.1%)都能对黄绿蜜环菌 DNA 模板产生各自特有且清晰的微卫星带谱,电泳条带丰富,能较灵敏和准确的反应黄绿蜜环菌 DNA 的多态性(图 4)。复筛入选的引物信息见表 4。

表 4 筛选获得的 8 对 SSR 引物信息和 PCR 扩增退火温度

Table 4 Characteristics of 6 identified microsatellite primers and annealing temperature in PCR amplification

引物 Primer	位点名称 Locus	重复序列 Reference motif	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃
FLL1	CAG25	(CAG) _n	F:AGGACTTCCAGAGGATGATGA R:TATGACCCACCACCACTG	55
FLL2	AoSSR21	(CA) _n	F:GCAGAGCGCAAATGAAACTA R:CACCACGAGTGCTTCTACCA	52
FLL5	Arm11	(CAG) _n	F:CATCCCTTTTCGGACAGCAC R:TACCAG TCCATCTGGCATGA	53
FLL6	Arm05	(GTC) _n	F:GAGGAAGAGCTACGCACAGG R:CGGTTTCATCGGAGGTCTA	54
FLL7	Arm16	(TCG) _n	F:ATTTGGAATCCTGACGTTGC R:GGCGCATTTGGTCAAAGTAA	52
FLL10	Am125	(CAC) _n	F:AGCGTGTGATCTCAACAGCA R:CACATCCTGCAACTTCCTTG	52
FLL12	Am094	(CAC) _n	F:CGCAGAAGAACATTCGAACA R:AGACGGTAGGTTGGCTGGTA	53
FLL13	AoSSR22	(GT) _n	F:AGATACCATAAGAGCGCGAT R:GGCTAGAAATGCAACAGCG	54

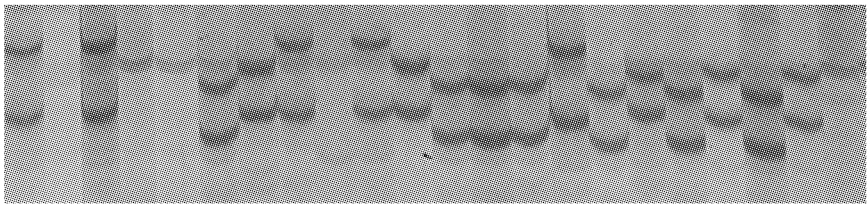


图 4 引物 FLL1 对黄绿蜜环菌部分个体扩增

Fig. 4 DNA bands amplified by primer FLL1 in *Armillaria luteo-virens*

3 讨论

利用正交设计优化黄绿蜜环菌 SSR 反应体系是一种有效、简便且适用的方法,它能较好较快的识别 SSR 反应体系中各影响因素,并优化反应条件。在该试验中,若采用单因素试验需要处理数为 $4^5 = 1\,024$ 个,而应用正交设计方法只利用了 5 因素 4 水平共 16 个处理,较快的找到了最佳反应体系,大大提高了工作效率。该研究构建的适宜黄绿蜜环菌遗传分析的

SSR-PCR 体系为:1×PCR Buffer,100 ng 模板 DNA,dNTPs 217 μmol/L,引物 0.5 μmol/L,Taq DNA 聚合酶 0.75 U,Mg²⁺ 1.3 mmol/L,加 ddH₂O 至 15 μL。

SSR 标记技术是一种多态性和稳定性俱佳的分子标记技术,在水稻、玉米、棉花等作物的基因图谱绘制、标记基因、进化研究、分析群体遗传、揭示遗传多样性及亲缘鉴定等方面已得到广泛应用^[25-28]。但在真菌中,尤其在食用真菌中,SSR 研究起步较晚^[29]。由于 SSR 标

记是基于 PCR 反应的分子标记技术,而 PCR 反应所含组分较多,各组分均可能对扩增结果的特异性和敏感性产生影响。用传统方法探讨 SSR-PCR 最佳反应体系时,常采用固定几种因素而变换其中某一因素的方法,需要进行多次梯度试验,有耗时、耗力、耗材、特异性差的缺点,且没有兼顾各因素的交互作用。因此,采用正交设计,利用正交表的均衡分散性和整齐可比性,可有效地解决理论上需要进行的试验次数与实际可行的试验次数间的矛盾以及实际所做的有限量试验与要求全面掌握事物内在规律之间的矛盾^[30]。

该研究表明,采用不同的体系组合,黄绿蜜环菌 SSR-PCR 扩增结果差异明显。 Mg^{2+} 浓度对扩增结果影响较大,不仅影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性,还影响引物与模板的结合效率产物的特异性,同时又受到 dNTPs 的拮抗作用^[31],该试验中 Mg^{2+} 终浓度是 1.33 mmol/L。引物浓度太高电泳时会产生非特异性条带和引物二聚体,这二者又可作为 PCR 反应的底物,与靶序列竞争 *Taq* DNA 酶和 dNTPs 底物,从而使靶序列的产量降低^[32]。高浓度 dNTPs 易产生错误掺入,过高则可能不扩增;但浓度过低,将降低反应产物的产量。PCR 中常用终浓度为 50~400 μ mol/L 的 dNTPs^[33],该试验中 dNTPs 终浓度为 217 μ mol/L,符合这一范围。*Taq* DNA 聚合酶浓度过高易产生非特异性产物,且从经济角度考虑不合理。此外,退火温度也对 PCR 扩增有一定影响,其随 SSR 引物不同而变化。在具体应用中应根据不同的引物试验选择其适宜的退火温度。PCR 试验中,研究者常采用低于 T_m 值 5℃ 的温度作为实际退火温度,该试验中引物 FLL5 上游和下游 T_m 值分别为 59.72 和 57.8℃,因此设置 51~58℃ 为试验退火温度梯度,并根据试验结果选择 53℃ 为退火温度,此结果与前人经验一致。

通常微卫星引物构建方法是首先建立 DNA 文库,用各种简单重复序列作为探针在 DNA 文库中筛选,在获得阳性克隆子后进行测序,之后根据所测的序列设计 SSR 引物。这种方法工作量大,资金投入较高,目前只在少数模式生物中得到大量开发。由于在近缘物种间微卫星位点左右的侧翼序列是相对保守的,因此可以通过近缘物种跨种扩增来进行所需物种的微卫星引物筛选,达到省时省力的效果。该试验依据优化的 PCR 体系对黄绿蜜环菌同属不同种的 34 对微卫星引物筛选后,从初步筛选的 14 对引物中再次筛选获得了 8 对(占 57.1%)具有较高多态性的 SSR 引物。这说明蜜环菌属 SSR 引物适用于黄绿蜜环菌,同时黄绿蜜环菌是参考文献^[10-12,23]中蜜环菌属种的近缘物种,该试验结果也说明在近缘物种间共用 SSR 引物来进行遗传研究的思路和方法是切实可行的。

在所筛选出的引物中,参考自 Langrell 等^[10]、Prospero 等^[12] 文献中的 *A. ostoyae* 微卫星引物 FLL1、FLL2、FLL13 在黄绿蜜环菌扩增效果良好,多态性较高,因此,蜜环菌属物种 *A. Ostoyae* 的微卫星引物也可适用于黄绿蜜环菌,同时说明同为蜜环菌属的 *A. ostoyae* 与黄绿蜜环菌亲缘关系最近。此外,Prospero 等^[11] 发现引物 FLL5、FLL6、FLL7 在 *A. gallica*、*A. ostoyae*、*A. borealis*、*A. mellea* 4 个蜜环菌群体中均得到良好扩增,FLL4 只在除 *A. Mellea* 之外的 3 个群体中得到扩增,而该试验中 FLL5、FLL6、FLL7 能对黄绿蜜环菌 DNA 模板产生各自特有且清晰的微卫星带谱,引物 FLL4 并未得到扩增,这与 Prospero 等^[11] 研究的结果一致。Baumgartner 等^[23] 在 *A. Mellea* 群体微卫星标记研究中发现,引物 FLL8、FLL9、FLL10、FLL12 在 *A. Mellea* 群体中扩增效果好的多态性均较高,但该试验结果发现只有引物 FLL10、FLL12(50%)是适用于黄绿蜜环菌的微卫星引物,引物 FLL8、FLL9 虽然得到了扩增带,但是带谱非常弱且难辨认,可能是因为和其它蜜环菌属种相比,*A. Mellea* 与黄绿蜜环菌 2 个物种间亲缘关系不够近所致。该试验成功筛选的 8 对微卫星引物对将来黄绿蜜环菌遗传多样性研究提供了宝贵的资源,同时证明了微卫星引物在同属不同物种间的高效通用性。

该试验应用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验设计筛选并优化了黄绿蜜环菌 SSR-PCR 反应体系,通过稳定性检测首次建立了适合黄绿蜜环菌的 SSR-PCR 反应体系并筛选出了 8 对具有较高多态性的 SSR 引物。该体系的建立为今后利用 SSR 标记对黄绿蜜环菌遗传多样性研究、亲缘关系分析及种质资源鉴定等研究工作奠定基础。今后将进一步研究黄绿蜜环菌遗传多样性,丰富黄绿蜜环菌基础研究。

参考文献

- [1] 刁治民. 青海草地黄绿蜜环菌生态学特性及营养价值的研究[J]. 中国食用菌,1996,16(4):21-22.
- [2] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000:18.
- [3] Kile G A,Guillaumin J J,Mohammed C,et al. Biogeography and pathology of *Armillaria*[M]//Jonhansson M, Stenlid J. Proceedings of the eighth international conference on root and butt rots. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences,1994:411-436.
- [4] 秦国夫,赵俊,郭文辉,等. 蜜环菌的生物学研究进展[J]. 东北林业大学学报,2004,32(6):89-94.
- [5] 赵俊,赵杰. 中国蜜环菌的种类及其在天麻栽培中的应用[J]. 食用菌学报,2007,14(1):67-72.
- [6] Kim M S,Klopfenstein N B,McDonald G I,et al. Characterization of North American *Armillaria* species by nuclear DNA content and RFLP analysis[J]. Mycologia,2000,92(5):874-883.
- [7] Kim M S,Klopfenstein N B,Hanna J W,et al. Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers[J]. Forest Pathology,2006,36(3):145-164.

- [8] Coetzee M P A, Wingfield B D, Ridley G S, et al. Molecular identification and phylogeny of *Armillaria* isolates from South America and Indo-Malaysia[J]. Mycologia, 2003, 95: 285-293.
- [9] Coetzee M P A, Wingfield B D, Bloomer P, et al. Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand *Armillaria* species[J]. Mycologia, 2001, 93: 887-896.
- [10] Langrell S R H, Lung-Escarmant B, Decrooc S. Isolation and characterization of polymorphic simple sequence repeat loci in *Armillaria ostoyae* [J]. Molecular Ecology Notes, 2001(1): 305-307.
- [11] Prospero S, Jung E, Tsykun T, et al. Eight microsatellite markers for *Armillaria cepistipes* and their transferability to other *Armillaria* species [J]. Eur J Plant Pathol, 2010, 127: 165-170.
- [12] Prospero S, Lung-Escarmant B, Dutech C. Genetic structure of an expanding *Armillaria* root rot fungus (*Armillaria ostoyae*) population in a managed pine forest in southwestern France [J]. Molecular Ecology, 2008 (17): 3366-3378.
- [13] 孙立夫, 裴克全, 张艳华, 等. 法国蜜环菌 *Armillaria gallica* 菌株遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 菌物学报, 2011, 30(5): 686-694.
- [14] 王守现, 刘宇, 张英春, 等. 蜜环菌菌株遗传多样性 RAPD 分析[J]. 食用菌学报, 2009, 16(3): 15-19.
- [15] 周连玉. 黄绿蜜环菌的研究概述[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(3): 52-53.
- [16] 周劲松, 熊辉岩, 杨春江, 等. 黄绿蜜环菌子实体挥发油的化学成分 [J]. 农业科学与技术, 2008, 9(2): 90-92.
- [17] 李海波, 吴学谦, 王立武, 等. 青藏高原黄绿蜜环菌纯培养菌种的分离培养及分子鉴定[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 873-883.
- [18] Haymer D S. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: what are they, and can they tell us anything we don't already know[J]. Entomol Soc Am, 1994, 87(6): 717-722.
- [19] Cho Y G, Ishil T, Temnykh S, et al. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and Genbank sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Thero Apple Genet, 2000, 100: 713-722.
- [20] Weber J K, May P E. Abundant class of human DNA Polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction[J]. American Journal of Human Genetics, 1989, 44: 388-396.
- [21] 黄磊, 王义权. 扬子鳄种群的微卫星 DNA 多态及其遗传多样性保护对策分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(2): 143-150.
- [22] Lanteri S, Acquadro A, Comino C, et al. A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. scolymus L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 1532-1542.
- [23] Baumgartner K, Grubisha L C, Fujiyoshi P, et al. Microsatellite markers for the diploid basidiomycete fungus *Armillaria mellea* [J]. Molecular Ecology Resources, 2009(9): 943-946.
- [24] 孙立夫, 张艳华, 裴克全. 一种高效提取真菌总 DNA 的方法[J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 299-302.
- [25] 席章营, 张桂权. SSR 标记及其在作物遗传育种中的应用[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(3): 293-297.
- [26] 高文伟, 陈全家, 曲延英, 等. 棉花 DNA 提取及优化 SSR 反应体系的建立和应用[J]. 新疆农业大学学报, 2009, 32(6): 34-37.
- [27] 吴承来, 张倩倩, 董炳雪, 等. 我国部分玉米自交系遗传关系和遗传结构解析[J]. 作物学报, 2010, 36(11): 1820-1831.
- [28] 彭锁堂, 王海岗, 魏兴华, 等. 我国三系杂交稻主要不育系的微卫星标记多样性和遗传结构分析[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(4): 365-369.
- [29] 肖扬, 李黎, 吴茜, 等. 香菇 SSR-PCR 技术体系的优化及其在遗传多样性分析中的初步应用[J]. 中国农学通报, 2009, 25(2): 20-24.
- [30] 姜同川. 正交实验设计[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1985.
- [31] 王士磊, 李玉鹏, 高树仁. 正交设计优化玉米 SSR-PCR 反应体系的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(1): 119-122.
- [32] 屈伸, 刘治国. 分子生物学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 82.
- [33] 安建平, 王廷璞. 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 2005: 291-293.

Establishment and Primer Screening of the SSR-PCR Reaction System for *Armillaria luteo-virens*

LI Ying¹, XIE Zhan-ling^{1,2}, TIAN Fei¹, JIA Xian-qing¹, FANG Hui¹, XIA Ming-zhe¹

(1. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016; 2. National Key Laboratory Breeding Base for Innovation and Utilization of Plateau Crop Germplasm, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: Taking DNA extracted from *Armillaria luteo-virens* by CTAB method as template, $L_{16}(4^5)$ orthogonal design was used to optimize the main factors affecting the SSR-PCR system, which were Mg^{2+} , dNTPs, primers, *Taq* DNA polymerase and template DNA concentration. It established the optimum SSR-PCR reaction amplification system of *Armillaria luteo-virens*, and based on the optimum SSR-PCR reaction amplification system annealing temperature was selected. The results showed that a 15 μ L reaction system contained $1 \times$ PCR Buffer, 100 ng template DNA, dNTPs 217 μ mol/L, primer 0.5 μ mol/L, *Taq* DNA polymerase 0.75 U, Mg^{2+} 1.3 mmol/L. The reaction system was proved in good stability and reproducibility. At the same time, 8 primer combinations were selected with the optimized system among 34 primer combinations, which had abundant polymorphism bands. This study could be used in analysis of genetic diversity, genetic relationship and fingerprint in *Armillaria luteo-virens*.

Key words: *Armillaria luteo-virens*; SSR-PCR; system optimization; orthogonal design; primers