

我国双孢菇菌株与国外引进菌株间亲缘关系的 ISSR 分析

王 鸿 磊, 丁 强, 吕 蔚, 曲 威, 崔 从 光, 邹 积 华

(中国农业大学 烟台研究院, 山东 烟台 264670)

摘 要:以国内外的 10 个双孢菇菌株为试材,利用 ISSR 分子标记技术对其进行亲缘关系分析。结果表明:从 117 个 ISSR 引物中筛选出 11 个条带清晰重复性好的引物,对 10 个双孢菇菌株的基因组 DNA 进行扩增,共获得 73 条清晰条带,其中多态性条带 51 条,多态性位点百分率为 69.86%。利用 NTSYSpc 2.10 软件计算菌株间 Nei 遗传距离为 0.5479~0.9589,以平均连锁法(UPGMA)进行聚类分析,可将 10 个双孢菇菌株分为 4 个类群:类群 I 为国内的 2 个菌株 258 和 2796;类群 II 是引自荷兰的 HRLM;类群 III 包括引自美国的 L901、5113、XXX 和 2200;类群 IV 包括引自荷兰的 H901、F3F 和 HA15。引自美国和荷兰的双孢菇菌株之间亲缘关系较近,相似性达 0.85 以上,而与我国的双孢菇亲缘相似性仅为 0.61。因此,国外优质双孢菇菌株的引进对于增加我国双孢菇遗传多样性具有重要作用。

关键词:双孢菇;ISSR;亲缘关系;聚类分析

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0096-04

双孢菇(*Agaricus bisporus*)又称白蘑菇、洋蘑菇,是世界上栽培最为广泛的食用菌^[1],我国是世界上最大的

第一作者简介:王鸿磊(1977-),男,山东莱州人,硕士,副教授,现主要从事应用微生物等研究工作。E-mail:whl197749@163.com.

责任作者:邹积华(1953-),女,山东烟台人,本科,研究员,现主要从事食用菌菌种选育和推广等研究工作。

基金项目:国家“948”计划资助项目(2012-Z19);山东省农业良种工程重大课题资助项目;山东省现代农业产业技术体系食用菌产业创新团队资助项目(SDAIT-11-011-15)。

收稿日期:2014-01-27

双孢菇生产国,但是,我国双孢菇的生产技术水平与发达国家相差甚远,主要表现在双孢菇菌种种质非常落后,产量相对较低。同时我国不是双孢菇的发源地,野生的双孢菇种质资源十分缺乏^[2]。因此,引进国外抗逆性强、产量高、品质好的优良菌株,以丰富我国的双孢菇菌株种质资源,拓宽遗传基础,对选育适于我国栽培现状的优质双孢菇菌株具有重要的作用。

ISSR(Inter-simple sequence repeats)即简单重复中间序列,是基于 SSR 发展起来的一种新型分子标记技术^[3-4]。该技术利用 SSR 本身设计引物,对 SSR 之间的

Comparative Research of Total RNA Extraction Methods From *Apocynum venetum* L.

LI Miao^{1,2}, LI Guo-qi¹

(1. Key Lab for Restoration and Recovery of Degraded Ecosystem in Northwestern of Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: Total RNA was extracted by Trizol, modified SDS and RNA plant plus Reagent Kit methods, the extracted effect were compared by UV Spectrophotometry and Gel Electrophoresis, in order to screen out the best method for extracting *Apocynum venetum* L.. The results showed that the RNA samples extracted by the method of Trizol were degraded gravely. Samples extracted by the method of modified SDS were low concentration and less amount, and the operation results were in poor repeatability. RNA plant plus Reagent Kit method was optimum extraction of *A. venetum* L. total RNA. The RNA samples extracted by the method of RNA plant plus Reagent Kit method were high quality, purity and good reproducibility, and could be used for research of molecule biology directly.

Key words: *Apocynum venetum* L.; Trizol method; modified SDS method; RNA plant plus Reagent Kit method; extraction of total RNA

序列进行扩增,具有操作简单、重复性强、多态性丰富等优点,与 RAPD 技术相比较更加稳定可靠,试验重复性更好^[5],目前已广泛应用于木耳^[6-9]、姬菇^[10]、香菇^[11]、白黄侧耳^[12]、四孢蘑菇^[13]、平菇^[14]等食用菌的遗传及亲缘关系的研究之中。

该试验利用 ISSR 技术对我国的 2 个主栽双孢菇菌株和从美国和荷兰引进的 8 个优质双孢菇菌株进行亲缘关系分析,通过对不同菌株间遗传相似系数的计算分析,从分子水平上研究来自不同国家(地区)双孢菇菌株之间的亲缘关系和遗传差异,以期引进的双孢菇种质资源在双孢菇遗传育种方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌株:L901、5113、XXX、2200 引自美国;H901、HRLM、F3F、HA15 引自荷兰;258、2796 为国内主栽菌株,该实验室保藏。

PCR 试剂:ISSR 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物序列参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的 ISSR 引物序列及《食用菌菌种真实性鉴定 ISSR 法》附录 B^[15]。

仪器设备:JY300C 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),蓝盾 580 可见光凝胶电泳透射仪(厦门致善生物科技有限公司),A200 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司),04S-3C 全自动数码凝胶图像分析系统(北京君意东方电泳设备有限公司),3K30 冷冻高速离心机(德国 sigma)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 将各双孢菇菌株接种于马铃薯葡萄糖液体培养基中^[16],24℃ 150 r/min 培养 14 d,过滤收集菌丝体。菌丝体 DNA 提取采用 CTAB 法^[17]。0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,紫外分光光度计检测 DNA 浓度,于-20℃保存备用。

1.2.2 ISSR 扩增 PCR 反应体系为 15 μL,含 1×PCR 缓冲液、DNA 模板 20 ng, dNTPs 200 mmol/L,引物 0.4 μmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 退火 30 s(退火温度视引物而定), 72℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 终止反应。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,电压 80 V, Gelstain 染色,凝胶成像系统观察并照相(以 TIFF 格式保存)。

1.3 数据分析

将重复试验中稳定出现的条带用于数据分析,有条带的标记为 1,没有条带的标记为 0。利用 NTSYSpc

2.10 按 Nei 计算菌株间遗传距离,以平均连锁法(UPGMA)进行聚类分析,得出聚类图谱^[18]。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

各菌株于马铃薯葡萄糖液体培养基中培养 14 d,收集菌丝体,采用 CTAB 法提取菌体 DNA,其结果如图 1 所示。提取的 DNA,没有明显降解,纯度较好,分子量约 15 kb,可以作为 ISSR 标记扩增的良好模板。

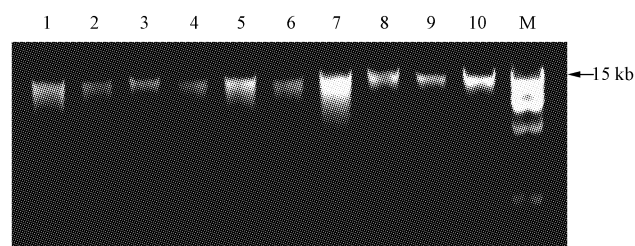


图 1 双孢菇基因组 DNA 电泳检测结果

注:M 为 15 kb DNA marker,1~10 为菌株编号,1:2796;2:258;3:L901;4:5113;5:XXX;6:2200;7:H901;8:HRLM;9:HA15;10:F3F。下同。

Fig. 1 The gel-electrophoresis profiles of the total genomic DNA of 10 *Agaricus bisporus* strains

Note:M is 15 kb DNA marker,the stains are numbered as follows:1:2796;2:258;3:L901;4:5113;5:XXX;6:2200;7:H901;8:HRLM;9:HA15;10:F3F. The same as below.

2.2 双孢菇菌株 ISSR 扩增结果

该试验利用 117 个引物对 10 个双孢菇菌株进行了 ISSR 扩增,由表 1 可以看出,其中 11 个引物扩增出了清晰且具有多态性的条带,共产生了清晰的扩增条带 73 条,其中多态性条带 51 条,多态性位点百分率为 69.86%,部分引物扩增图谱如图 2 所示。

表 1 ISSR 引物序列和扩增位点统计

Table 1 Sequence of ISSR primers and their number of amplified loci

引物 Primer	序列 Sequence	扩增位点数 Number of amplified loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性比例 Percentage of polymorphic loci/ %
8	(AG)8C	13	11	84.62
9	(AG)8G	9	5	55.56
29	(TG)8C	4	3	75.00
66	(CTC)6	9	7	77.78
27	(AC)8G	5	4	80.00
69	(GTT)6	3	3	100.00
42	(GA)8CG	6	4	66.67
62	(AGC)6	8	4	50.00
28	(TG)8A	4	2	50.00
61	(ACC)6	6	4	66.67
64	(ATG)6	6	4	66.67

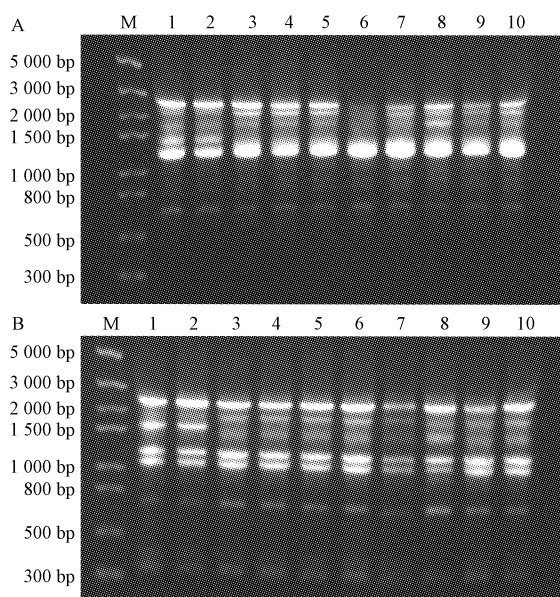


图2 引物 61 和 62 对 10 个双孢菇菌株的扩增结果

注: M 为 5 000 bp DNA marker; A 为引物 61 扩增结果; B 为引物 62 扩增结果。

Fig. 2 Amplified results of 10 *Agaricus bisporus* strains using the 61 and 62 primers

Note: M is 5 000 bp DNA marker; A: amplified results of 61 primers; B: amplified results of 62 primers.

2.3 遗传分析

由表 2 可知, 10 个菌株的遗传相似系数变异范围为 0.5479~0.9589, 平均遗传系数为 0.7497。

表 2 10 个供试双孢菇菌株的遗传相似系数矩阵

Table 2 Matrix of genetic similarity coefficient of 10 *Agaricus bisporus* strains

编号	2796	258	L901	5113	XXX	2200	H901	HRLM	HA15	F3F
2796	1.0000									
258	0.9589	1.0000								
L901	0.6575	0.6438	1.0000							
5113	0.5890	0.5753	0.9315	1.0000						
XXX	0.6164	0.6027	0.8767	0.8904	1.0000					
2200	0.5616	0.5479	0.8767	0.8904	0.8904	1.0000				
H901	0.6712	0.6301	0.8493	0.8630	0.8904	0.8630	1.0000			
HRLM	0.5753	0.5890	0.6438	0.6849	0.6575	0.6301	0.6849	1.0000		
HA15	0.6301	0.5890	0.8356	0.8493	0.8493	0.8493	0.9041	0.6986	1.0000	
F3F	0.6438	0.6027	0.8493	0.8630	0.8630	0.8904	0.9178	0.6575	0.9041	1.0000

以平均连锁法(UPGMA)对 10 个双孢菇菌株进行聚类分析, 构建 10 个双孢菇菌株的亲缘关系图谱。从图 3 可以看出, 10 个双孢菇菌株可分为 4 个类群, 类群 I 包括 258 和 2796 菌株, 2796 菌株是福建省轻工业研究所选育的高产优质菌株^[19], 拥有自主知识产权, 与国外菌株亲缘关系较远。258 菌株也为国内筛选菌株, 与

2796 菌株亲缘关系很近, 相关系数高达 0.96; 类群 II 为 HRLM 菌株, 此菌株引自荷兰, 单独归为一个类群, 经栽培出菇试验证实为褐色双孢菇, 与同引自荷兰的其它白色双孢菇菌株亲缘关系较远; 类群 III 包括 L901、5113、XXX 和 2200 菌株, 这 4 个菌株均引自美国, 相似性达到 0.88 以上; 类群 IV 包括 H901、F3F 和 HA15 菌株, 这 3 个菌株均引自荷兰, 相似性高达 0.90。引自美国和荷兰的双孢菇菌株亲缘关系较近, 相似性达 0.85 以上, 而与我国筛选的双孢菇菌株相似性仅为 0.61。

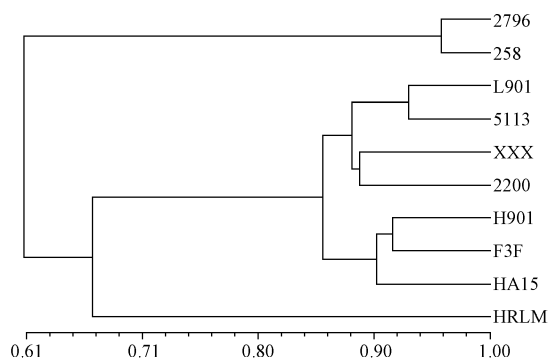


图 3 10 个双孢菇菌株 UPGMA 聚类图

Fig. 3 Dendrograms of UPGMA analysis of 10 *Agaricus bisporus* strains

3 讨论与结论

菌种是开展食用菌科学研究和生产的重要基础材料, 是决定食用菌产量和质量最重要的生产资料, 在食用菌产业中有着至关重要的作用。双孢蘑菇是世界上消费最大, 栽培范围最广的食用菌。但是由于其自身保守的次级同宗配合遗传方式以及野生种质资源的匮乏, 导致双孢蘑菇在育种上变得异常艰难, 商品化菌种资源极少且遗传变异不丰富^[20]。我国双孢菇菌种种质非常落后, 主要双孢菇栽培菌株的遗传相似度很高, 有研究表明其遗传相似系数在 0.77 以上^[21], 参与该试验的 2 个国内主栽品种的遗传相似系数更是高达 0.96, 这表明, 目前我国双孢菇的主栽菌株来源单一, 遗传多样性很低, 且我国野生的双孢菇种植资源不丰富, 这给双孢菇菌种改良和选种工作带来相当大的困难。

该研究显示, 国内 2 个主栽菌株与国外引进菌株的亲缘关系较远, 相似性只有 0.61。表明引进国外双孢菇菌株对于增加我国双孢菇遗传多样性, 改善我国双孢菇菌株质量具有重要作用。通过引进国外优质菌株, 选育适于我国栽培特点的高产优势双孢菇菌株, 将成为影响我国双孢菇行业健康可持续发展的重要途径。

参考文献

- [1] 李叶昕,党永,慕娟. 双孢蘑菇不同菌株的 RAPD 扩增研究[J]. 中国食用菌,2008,27(6):41-42,48.
- [2] 王泽生. 双孢蘑菇杂交育种研究进展[J]. 中国食用菌,1992,11(4):10-11.
- [3] Moreno S,Martin J P,Ortiz J M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization closely related grape vine germplasm[J]. Euphytica,1998,101(1):117-125.
- [4] Zietkiewicz E,Rafalski A,Lahuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genome,1994,20:176-183.
- [5] 孙洪,程静,詹克慧,等. ISSR 标记技术及其在作物遗传育种中的应用[J]. 分子植物育种,2005,3(1):123-127.
- [6] 贾定洪,郑林用,王波,等. 22 个毛木耳菌株的 ISSR 分析[J]. 西南农业学报,2010,23(5):1595-1598.
- [7] 李辉平,黄晨阳,陈强,等. 黑木耳栽培菌株的 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2007,34(4):935-940.
- [8] 任广明,李滇华,郭兴,等. 黑木耳栽培菌株亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 东北林业大学学报,2011,39(5):99-101.
- [9] 唐利华,肖扬,边银丙. 中国黑木耳主要栽培菌株 ISSR 指纹分析及 SCAR 标记[J]. 菌物学报,2008,27(2):243-251.
- [10] 周洁,郭勇,贾定洪. 姬菇杂交菌株的 ISSR 分析[J]. 西南农业学报,2009,22(6):1694-1698.
- [11] 王子迎. 安徽野生香菇 ISSR 和 RAPD 分析的比较[J]. 安徽教育学院学报,2005,23(6):94-96,105.
- [12] 张金霞,黄晨阳,管桂萍,等. 白黄侧耳 *Pleurotus cornucopiae* 微卫星间区 (ISSR) 分析[J]. 菌物学报,2007,26(1):115-121.
- [13] 王波,王一,卢冰. 蘑菇圈上四孢蘑菇个体间遗传差异的 ISSR 分析[J]. 食用菌学报,2009,16(4):1-4.
- [14] 任海霞,宫志远,曲玲. 平菇 ISSR-PCR 反应体系影响因素研究[J]. 中国食用菌,2009,28(4):35-37.
- [15] 中华人民共和国农业部. 食用菌菌种真实性鉴定 ISSR 法[M]. 北京:中国农业出版社,2009.
- [16] 宋渊. 微生物学实验教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,2012.
- [17] Lee S B. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores[C]//PCR protocols,a guide to methods and applications,1990:282-287.
- [18] Nei M,Li W H. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1979,76(10):5269-5273.
- [19] 王泽生,廖剑华,陈美元,等. 双孢菇杂交菌株 As2796 家系的分子遗传研究[J]. 菌物系统,2001,20(2):233-237.
- [20] Royse D J,May B. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*[J]. Mycologia,1982,14:93-102.
- [21] 詹才新,张引芳,凌霞芬. 中国主栽双孢蘑菇菌株的 DNA 多态性[J]. 食用菌学报,1998,5(2):1-7.

Genetic Relationship Based on ISSR Markers Among *Agaricus bisporus* Strains From China and Overseas

WANG Hong-lei,DING qiang,LV Wei,QU Wei,CUI Cong-guang,ZOU Ji-hua
(Yantai Academy of China Agricultural University,Yantai,Shandong 264670)

Abstract: The genetic relationship of 10 *Agaricus bisporus* cultivation strains was analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSR). The results showed that 11 effective primers were screened from 117 ISSR primers. A total number of 73 clear bands were amplified from the 10 *Agaricus bisporus* strains, among which 51 bands were polymorphic and the polymorphic loci ratio was 69.86%. The genetic similarity coefficients among 10 strains were between 0.5479 and 0.9589 using NTSYSpc 2.10. The clustering analysis conducted with UPGMA indicated that 10 *Agaricus bisporus* strains could be divided into four groups: the first group included two domestic strains i. e. 258 and 2796; the second group only included HRLM from Netherlands; the third group was consisted of L901, 5113, XXX and 2200 from American; the fourth group was consisted of H901, F3F and HA15 from Netherlands. In contrast to two domestic strains, the genetic relationship of *Agaricus bisporus* strains between from American and from Netherlands was closer and the genetic similarity coefficients was higher than 0.85, but the genetic similarity of *Agaricus bisporus* from China was only 0.61. The introduction of foreign high-quality *Agaricus bisporus* strains would play an important role to increase *Agaricus bisporus* genetic diversity in our country.

Key words: *Agaricus bisporus*; ISSR; genetic relationship; cluster analysis