

平菇 ISSR 遗传多样性分析

刘志曦, 李志强, 魏海莲, 赵中雷, 何 德, 李翠新

(西南林业大学 生命科学学院, 云南 昆明 650224)

摘 要:以 53 个平菇菌种为试材, 采用 ISSR 标记技术, 对采自多地的平菇材料进行遗传多样性检测, 以期为平菇优良品种选育和亲缘关系的研究提供分子生物学依据。结果表明: 从 27 个 ISSR 引物中共筛选出 14 个多态性明显的引物; 在 53 份供试材料中共扩增出 189 条谱带, 其中多态性条带 189 条, 多态性为 100%; 材料间遗传相似系数范围在 0.44~0.99, 聚类分析结果显示, 在 0.62 水平上 53 株菌株分为 8 组, 多数菌株之间遗传相似性较低。这表明供试菌株在 DNA 水平上存在比较显著的遗传变异和丰富的遗传多样性; 同时发现供试材料间的聚类与地域无明显相关性。

关键词:平菇; ISSR; 遗传多样性

中图分类号:S 646.1⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0094-06

平菇 (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer) 属菌物界真菌门担子菌纲伞菌目侧耳科侧耳属食用菌。平菇营养丰富、风味独特、高蛋白、低脂肪, 具有较高的营养价值和保健功能, 是人们喜食的食用菌之一。其适应性强、产量高, 是一种广泛栽培的食用菌。如何获得高产、优质平菇一直是平菇研究的重点, 目前大部分研究侧重于平菇栽培管理技术。多年来, 品种的生态型、地理特性及地理距离的差异被作为选配亲本的依据, 但由于这些差异与亲本固有的遗传差异并不完全一致, 往往是环境影响的结果, 最终导致育种失败。因此, 寻找亲本 DNA 水平上的差异尤为必要^[1]。目前, 运用 ISSR 分子标记的方法研究食用菌遗传多样性的报道很少^[2-3]。王子迎等^[4-5]采用 RAPD 和 ISSR 技术, 利用 12 条 RAPD 引物和 10 条 ISSR 引物对 10 个安徽香菇菌株进行了 DNA 标记比较分析, 结果表明, ISSR-PCR 较 RAPD-PCR 稳定, 更具可操作性; 供试菌株存在比较显著的遗传变异, 具有较丰富的遗传多样性。因此, 该试验将 ISSR 分子标记技术应用于平菇的遗传多样性研究, 以期为平菇优良品种选育和亲缘关系的研究提供分子生物学依据。

第一作者简介:刘志曦(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: snake_dragon@126.com.

责任作者:李翠新(1972-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为食药真菌开发与研究。E-mail: cuixinheli@163.com.

基金项目:云南省优势特色重点学科生物学一级学科建设资助项目(50097505); 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室开放基金资助项目(KL200707); 云南省高校特色专业建设点资助项目(50116001); 西南林业大学科研启动基金资助项目(111046)。

收稿日期:2014-01-16

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种的种类和来源见表 1。

表 1 供试菌种名称及来源

Table 1 Name and origin of tested *Pleurotus* strains

菌株号 Index	品种 Species	来源地 Origin
01	平菇	<i>P. ostreatus</i> 河北微生物所(西德引进)
02	金顶侧耳	<i>P. citrinopileatus</i> 辽宁抚顺(育成品种)
03	哥伦比亚侧耳	<i>P. columbinus</i> 香港中文大学(育成品种)
04	平菇	<i>P. ostreatus</i> 江苏省江都市(野生菌株)
05	平菇	<i>P. ostreatus</i> 华中农大(德国引进)
06	杏鲍菇	<i>P. eryngii</i> 福建三明真菌研究所(意大利引进)
07	平菇	<i>P. ostreatus</i> 华中农大(广西)
08	元蘑	<i>Hohenbuehelia serotina</i> 吉林和龙(野生菌株)
09	杏鲍菇	<i>P. eryngii</i> 福建三明真菌研究所(育成品种)
10	阿魏菇	<i>P. eryngii</i> var <i>ferulae</i> 福建三明真菌研究所(育成品种)
11	阿魏蘑	<i>P. nebrodensis</i> 福建三明真菌研究所(育成品种)
12	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
13	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
14	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
15	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
16	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
17	鲍鱼菇	<i>P. abalonus</i> 四川成都(野生菌株)
18	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川青川(野生菌株)
19	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川会理(野生菌株)
20	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
21	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川青川(野生菌株)
22	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
23	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川青川(野生菌株)
24	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
25	平菇	<i>P. ostreatus</i> 西藏拉萨(野生菌株)
26	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川青川(野生菌株)
27	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
28	平菇	<i>P. ostreatus</i> 四川理县(野生菌株)
29	阿魏蘑	<i>P. nebrodensis</i> 福建三明真菌研究所(育成品种)

续表 1

菌株号	品种	来源地
Index	Speices	Origin
30	白灵菇	<i>P. nebrodensis</i> 新疆木垒(野生菌株)
31	阿魏菇	<i>P. eryngii</i> var <i>ferulae</i> 福建三明真菌研究所(育成品种)
50	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南昆明(野生菌株)
51	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南昆明(野生菌株)
52	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南昆明(野生菌株)
58	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
59	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
60	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
61	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
62	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
63	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
64	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
65	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
66	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
67	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
68	平菇	<i>P. ostreatus</i> 云南大姚(野生菌株)
74	鲍鱼菇	<i>P. abalonus</i> 云南昆明(野生菌株)
75	鲍鱼菇	<i>P. abalonus</i> 云南昆明(野生菌株)
76	鲍鱼菇	<i>P. abalonus</i> 云南昆明(野生菌株)
89	平菇	<i>P. ostreatus</i> 老挝(育成品种)
90	平菇	<i>P. ostreatus</i> 老挝(育成品种)
91	平菇	<i>P. ostreatus</i> 老挝(育成品种)
92	平菇	<i>P. ostreatus</i> 老挝(育成品种)
93	平菇	<i>P. ostreatus</i> 老挝(育成品种)

1.2 试验方法

1.2.1 菌种培养、DNA 提取与纯化 菌种经过一次 PDA 平板活化培养后,采用液体培养获取菌丝体。菌丝体经液氮冷冻研磨后用 CTAB 法^[6-8]提取总 DNA, TE 缓冲液溶解后,经琼脂糖凝胶电泳检验后,保存在-20℃冰箱中备用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应条件调整 参照文献[2,4,9],并

以单因素法调整,最终确定反应条件为每 20 μL 反应液中包含 2.0 μL 模板 DNA,10 倍 Ex Taq 缓冲液(无 MgCl₂) 2.0 μL,25 mmol/L 的 MgCl₂ 溶液 1.6 μL,20 μmol/L 引物 0.8 μL,5 U/μL 的 Ex Taq 酶(TAKA-RA 公司)0.1 μL,dNTP 混合液(4 种脱氧核糖核苷酸浓度均为 2.5 mmol/L)1.6 μL,最后以 ddH₂O 定容。PCR 程序为:94℃ 预变性 4 min 后;33 次循环执行 94℃ 变性 30 s,退火 30 s(退火温度参见表 2),72℃ 延伸 2 min;72℃ 后延伸 10 min。

1.2.3 ISSR-PCR 引物粗筛和细筛 参照文献[2,10],初步确定 27 条引物。以随机选择的 22 号和 59 号菌株 DNA 为模板对这些引物进行 PCR 扩增,并以电泳检测进行粗筛,从多态性高,条带清晰,扩增稳定的 PCR 结果中选择引物用于细筛。用粗筛得到的引物对所有 53 个供试菌株 DNA 进行 ISSR-PCR 扩增,扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测,用于 ISSR 分析。

1.2.4 电泳图谱分析及系统树绘制 对每个引物 ISSR-PCR 扩增的电泳条带,按有或无进行记录,采取 0、1、2 赋值,电泳条带清晰存在时赋值为 1,否则赋值为 0,不确定赋值为 2。用 NTSYS-PC (version 2.10e)软件按照 UPGMA 法进行遗传相似性聚类,绘制树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

提取得到的平菇菌丝体总 DNA 结果见图 1,图中 2 027 bp 上方的亮带是未去除的 RNA 组分。由图 1 可以看出,所得到的基因组 DNA 的电泳谱带处在大于 23 000 bp 处,且条带明亮清晰,无降解,适于 ISSR 分析。

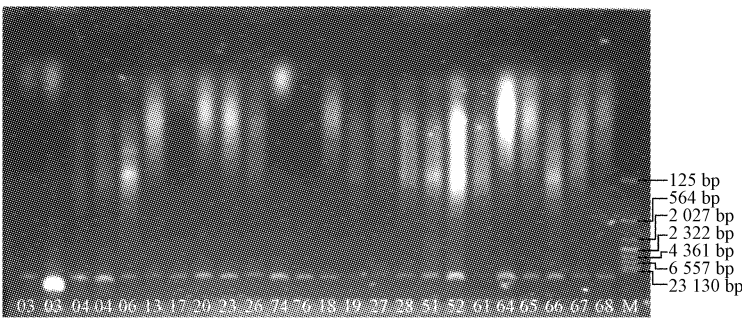


图 1 CTAB 法提取 DNA 效果

注:M 是 λ-hind III digest DNA Marker。

Fig. 1 DNA extracted by CTAB method

Note:M;λ-hind III digest DNA Marker.

2.2 ISSR 粗筛结果

从图 2、3 结果可以看出,用 59 号和 22 号菌株 DNA 为模板对 27 个(图中只显示了部分引物)引物进行扩增所得到的条带数、清晰度及多态性各不相同。综合 2 份菌株扩增的效果图,从中筛选出 14 个多态性高,条带清晰,

扩增稳定的引物,结果见表 2。

2.3 ISSR 细筛结果

从图 4~6 用粗筛的 14 个引物进行 ISSR-PCR 扩增结果可以看出,用同一引物对不同样品的扩增能得到条带清晰、多态性高的产物。因全部 14 条引物都能在所有

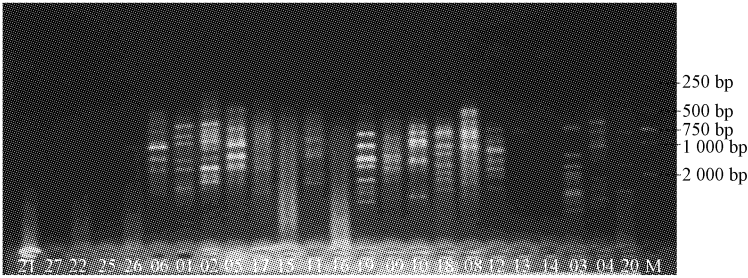


图 2 59 号菌株 DNA 模板对 24 个引物初筛效果
注:M是 DL 2 000 DNA marker。下同。

Fig. 2 PCR result using strain No. 59 as template with each primer as first screening
Note:M;DL 2 000 DNA marker. The same below.

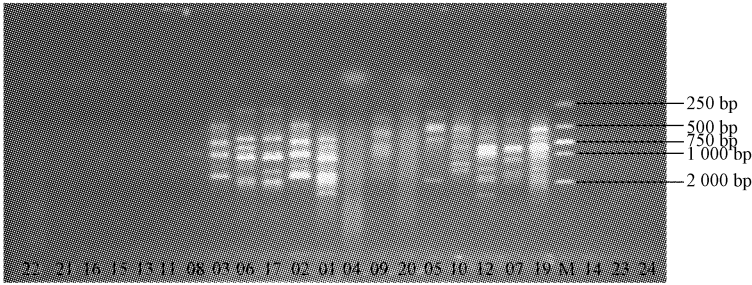


图 3 22 号菌株 DNA 模板对 23 个引物初筛效果
Fig. 3 PCR result using strain No. 22 as template with each primer as first screening

表 2 筛选出的 ISSR 引物

Table 2 ISSR primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	理论退火温度	实际退火温度
Primer name	Sequence of primer	Theoretical temperature/℃	Actual temperature/℃
ISSR01	TGC(AC) ₆	50.83	47.7
ISSR02	GTG(AC) ₆	50.83	47.7
ISSR03	GTGACGA(CT) ₆	57.56	55.0
ISSR04	GGATGCA(AC) ₆	57.56	55.0
ISSR05	C(GT) ₇	50.83	47.7
ISSR06	A(GT) ₇	48.10	46.6
ISSR07	CCA(GTG) ₄	56.30	54.0
ISSR09	(AG) ₈ G	54.59	52.5
ISSR10	(GA) ₈ C	54.59	52.5
ISSR12	(AG) ₈ GC	57.30	55.0
ISSR17	(AC) ₈	51.55	49.5
ISSR18	(AC) ₈ C	54.59	52.5
ISSR19	(AC) ₈ CT	55.02	52.5
ISSR20	(AC) ₈ CTG	57.56	55.0

菌种中扩增出多个多态性条带,细筛未排除引物,电泳结果可直接用于下一步分析(限于幅面,仅列 05、10、12 号引物的结果)。

ISSR 分析结果表明,14 条 ISSR 引物对 53 株菌株进行扩增,共检测到 189 条条带,多态性条带 189 条,多态性百分率为 100%。其中每条引物扩增的条带数为 8~18 条,平均每条引物扩增 13.5 条。

2.4 聚类分析

由图 7 聚类结果可以看出,53 株菌株的遗传相似系数在 0.44~0.99 之间(使用 NTSYS-PC (version 2.10e) 计算得到)。所有菌株聚为两大组,其中 04 号菇与其余材料差异非常明显,单独聚为一组(Ⅷ)。在 0.62 水平,第一组的 52 株菌株又可聚为 7 个亚组:19 号平菇菌株聚为一组(Ⅲ);01 号、05 号、12 号 3 种平菇与 02 号金顶

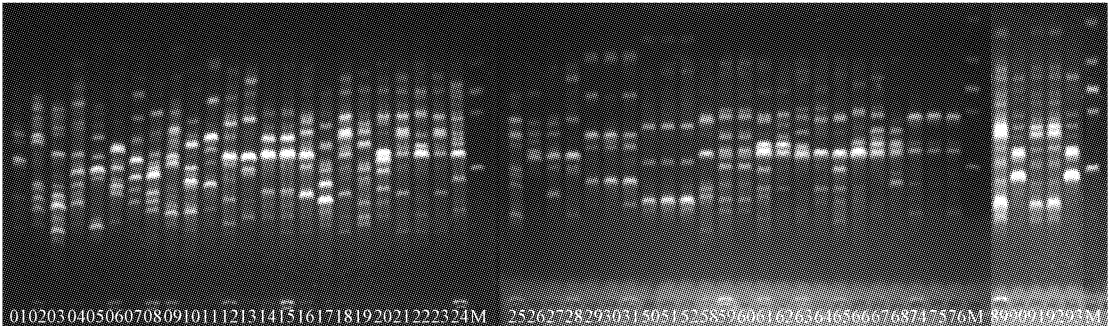


图 4 ISSR05 引物对 53 株菌株扩增效果
Fig. 4 Electrophoresis result amplified from 53 tested materials with primer ISSR05

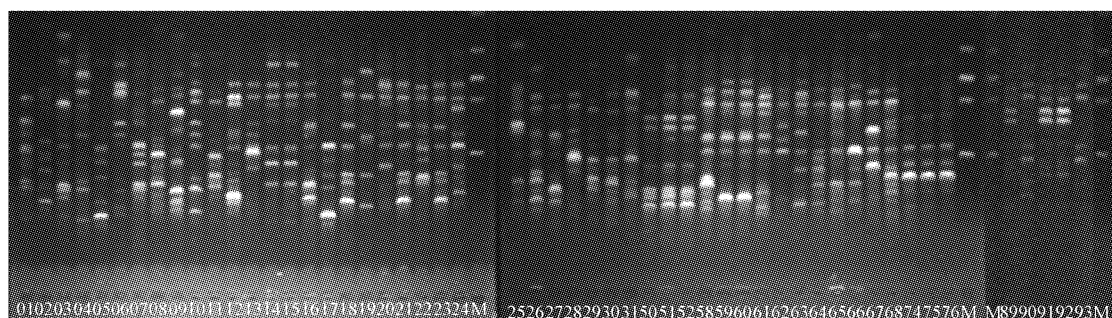


图 5 ISSR10 引物对 53 株菌株扩增效果

Fig. 5 Electrophoresis result amplified from 53 tested materials with primer ISSR10

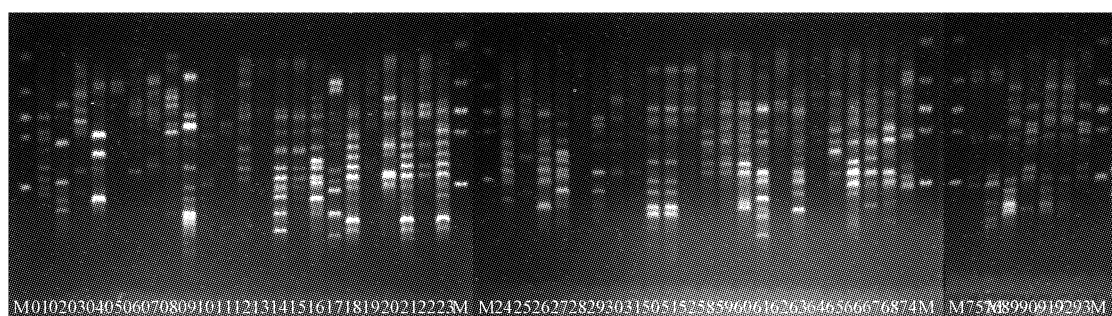


图 6 ISSR12 引物对 53 株菌株扩增效果

Fig. 6 Electrophoresis result amplified from 53 tested materials with primer ISSR12

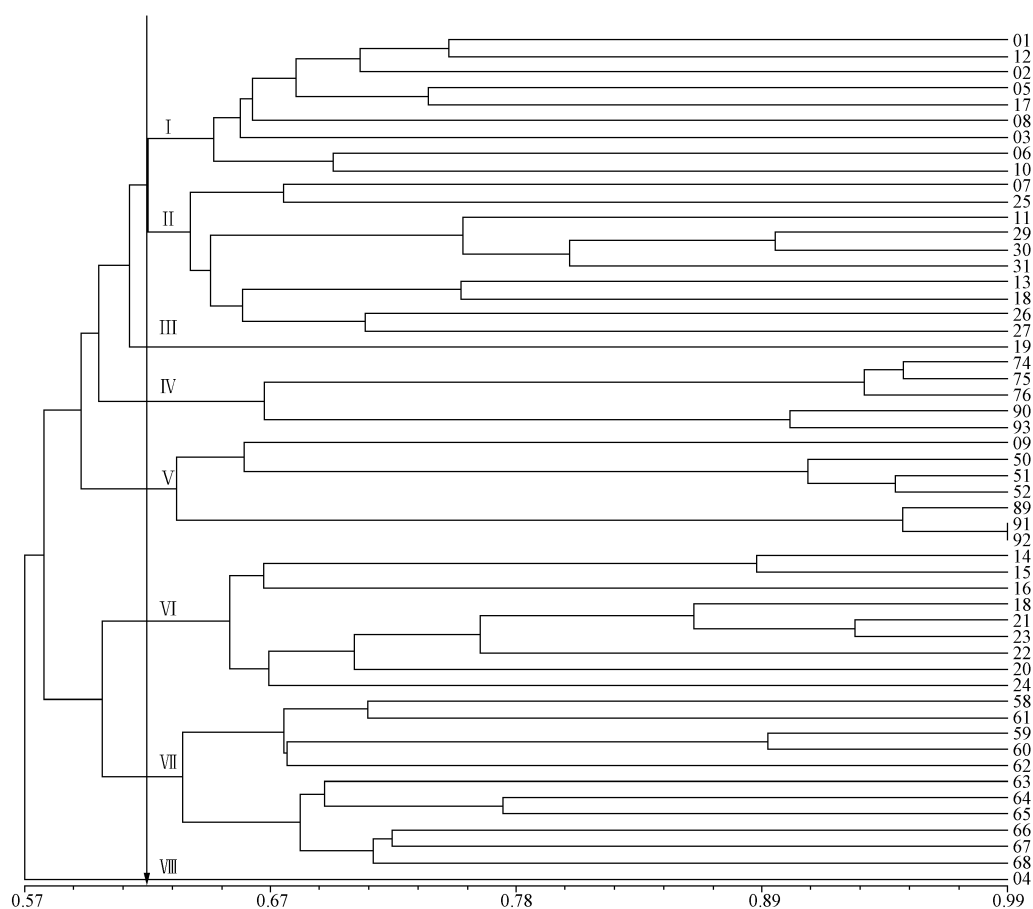


图 7 53 株平菇菌株基于 ISSR 遗传相似系数的聚类结果

Fig. 7 The result of cluster analysis for 53 *Pleurotus* strains based on ISSR genetic similarity

侧耳、17号鲍鱼菇、08号元蘑、03号哥伦比亚侧耳、06号杏鲍菇、10号阿魏菇聚为一组(I);07号、13号、18号、25号、26号、27号6种平菇与11号阿魏蘑、29号阿魏蘑、30号白灵菇、31号阿魏菇聚为一组(II);74号、75号、76号3种鲍鱼菇与90号、93号2种平菇聚为一组(IV);09号杏鲍菇与50号、51号、52号、89号、91号、92号6种平菇聚为一组(V);14号、15号、16号、18号、21号、23号、22号、20号、24号9种平菇聚为一组(VI);58号、59号、60号、61号、62号、63号、64号、65号、66号、67号、68号共11种平菇聚为一组(VII)。

从图7还可以看出53株菌株之间的亲缘关系和形态学分类存在不一致之处:形态学鉴定同为鲍鱼菇的17号菌株与74号、75号、76号菌株,在ISSR聚类图上却相差很远,聚类在不同的亚组;形态学鉴定同为杏鲍菇的06号与09号菌株、形态学鉴定同为阿魏菇的10号与31号菌株在聚类图上也相差很远,分别聚类在不同的亚组。II组中31号阿魏菇与11号阿魏蘑、29号阿魏蘑、30号白灵菇聚在一个亚组;I组中02号金顶侧耳、08号元蘑、03号哥伦比亚侧耳聚在一个亚组,说明它们之间的亲缘关系很近。其它聚类结果则与形态学鉴定结果相同。

图8为把采集的菌株按照采集地分布在地图上,综合聚类结果与菌株分布可以得出结论,供试菌株的聚类结果与地理位置没有明显联系。

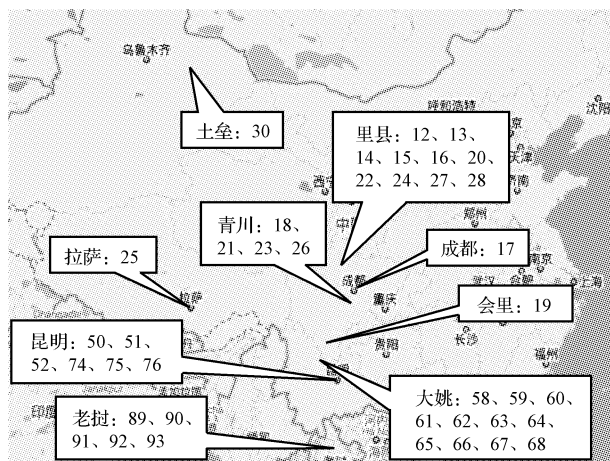


图8 部分供试菌株的地理位置

Fig. 8 Geographical origins of part of tested strains

3 讨论与结论

利用ISSR标记技术得到了清晰且多态性高的平菇

ISSR电泳图谱。53株菌株共得到189条多态性条带,多态性百分率为100%。每条引物扩增平均条带13.5条。这些都说明将ISSR技术应用于平菇甚至蘑菇的遗传多样性之中是完全可行的。

53株菌株的遗传相似系数在0.44~0.99之间,不同组间的遗传相似系数差异很大,即使是在同一组的遗传相似系数也出现很大差异,这在DNA分子水平上说明了不同平菇材料之间的遗传差异较大,遗传多样性丰富。

聚类分析结果显示,53株菌株之间的亲缘关系和形态学分类上存在不一致现象,例如形态学鉴定同为杏鲍菇的06号和09号菌株在聚类图上却相差很远;形态学鉴定同为鲍鱼菇的17号和74、75、76号的在聚类图上也相差很远,而基于线粒体基因COXIII的分子标记分析结果也显示它们为同一物种(此部分研究内容另行发表)。这也说明ISSR试验的影响因素较多,稳定性仍有待提高。因此光凭ISSR分析无法完全弄清楚平菇的遗传多样性情况,仍需要其它证据的支持。

该试验所用的04号菌株和其它平菇材料在形态上有很大的相似性,但ISSR结果显示其与其它平菇的相似系数很低,把04号单独归为一枝,因此该菌株是否属于平菇需要做进一步的工作。可以看出ISSR可以对形态上差异不大的菌株进行区分,为形态上的鉴定提供了一定的依据和佐证。

参考文献

- [1] 张金霞,黄晨阳,张瑞颖,等. 中国栽培白灵侧耳的RAPD和IGS分析[J]. 菌物学报,2004(23):514-519.
- [2] 马志刚,吕作舟,郑和斌,等. ISSR标记在侧耳属菌株分类学中的初步应用[J]. 华中农业大学学报,2006,25(1):55-59.
- [3] 张建博,桂明英,刘蓓,等. 分子生物学在大型真菌遗传多样性研究中的应用[J]. 中国食用菌,2008,27(6):3-7.
- [4] 王子迎,王书通. 安徽野生香菇遗传多样性及杂种优势的ISSR分析[J]. 菌物学报,2006,25(2):211-216.
- [5] 王子迎. 安徽野生香菇ISSR和PAPD分析的比较[J]. 安徽教育学院学报,2005,23(6):96-105.
- [6] 胡芳名. CTAB法抽提香榧种子胚乳DNA的改进[J]. 福建林业科技,2002,29(1):1-5.
- [7] 王艺红,林俊芳,张炜阳,等. 食用菌DNA提取方法研究[J]. 食用菌,2008(3):18-20.
- [8] 钟卫鸿. 基因工程技术实验指导[M]. 北京:北京化学工业出版社,2007(6):20-25.
- [9] 任海霞,宫志远,曲玲,等. 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.
- [10] 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.

Phylogenetic Analysis of Oyster Mushrooms by ISSR Marker

LIU Zhi-xi, LI Zhi-qiang, WEI Hai-lian, ZHAO Zhong-lei, HE De, LI Cui-xin
(College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

不同时期盆栽牡丹叶片 RNA 的提取研究

郭 丽 丽, 李 军, 李 金 航, 候 小 改, 孔 祥 生

(河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要:以牡丹品种‘洛阳红’为试材,采用 CTAB-LiCl 改良法,对小风铃期、大风铃期、圆桃期、平桃期、破绽期、初开期和谢花期的牡丹叶片进行总 RNA 提取。利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 RNA 纯度。结果表明:7 个时期提取的总 RNA 经电泳均检测到 28S、18S 和 5S rRNA 条带,吸光度比值 A_{260}/A_{280} 均介于 1.8~2.0 之间,其中大风铃期、圆桃期、平桃期、破绽期和初开期的 rRNA 条带整齐清晰,并且 28S rRNA 亮度高于 18S rRNA;上述表明 CTAB-LiCl 改良法适合从牡丹叶片中提取总 RNA,且大风铃期、圆桃期、平桃期、破绽期和初开期是最适合提取总 RNA 的 5 个时期。

关键词:牡丹;CTAB-LiCl 改良法;总 RNA 提取

中图分类号:S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)12-0099-04

目前 RNA 提取方法有很多,如异硫氰酸胍法^[1]、酚-SDS 法^[2]、Trizol 法和总 RNA 提取试剂盒等。牡丹是中国特有的木本传统名花,因其花大色艳,雍容华贵,享有“花中之王”的美誉^[3-4]。从牡丹组织中提取出高质量的 RNA 是进行 RT-PCR、Northern 杂交、cDNA 文库构建、差异显示、体外转译等分子生物学研究的基础^[5-6]。能否从不同时期牡丹组织中提取纯度更高和完整性更好的 RNA 能够为探索牡丹生长发育过程奠定良好的分子生物学基础,还可以为确定牡丹转录组测序最佳取材时间提供科学参考。木本植物细胞壁坚硬,纤维素、木

质素等多聚糖和多酚类含量高^[7],因此在提取牡丹叶片总 RNA 时,叶片在提取液中必须经过强烈震荡或温浴步骤,该试验选用 CTAB-LiCl 改良法,以春节催花牡丹品种‘洛阳红’为试材,对不同时期牡丹叶片总 RNA 的提取进行了研究,以确定适宜盆栽牡丹总 RNA 提取的最佳时期,为进一步提取干旱及高温逆境条件下牡丹叶片 RNA 进行转录组研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为洛阳国家牡丹园冬季催花品种‘洛阳红’,用剪刀剪下叶片后,立即用锡箔纸包好,投入液氮中速冻,-70℃保存备用。催花牡丹‘洛阳红’的物候期见表 1。

CTAB 提取缓冲液:2% CTAB,2% PVP,2 mol/L NaCl,100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),25 mmol/L EDTA (pH 8.0),2% β -巯基乙醇(使用前加入)。SSTE 缓冲

第一作者简介:郭丽丽(1982-),女,博士,讲师,研究方向为逆境生理与分子生物学。E-mail:guolili0928@126.com

责任作者:孔祥生(1955-),男,硕士,教授,研究方向为植物生理生态。E-mail:kxsh55@163.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31200468)。

收稿日期:2014-01-21

Abstract: Taking 53 varieties of oyster mushroom as materials, phylogenetic analysis of oyster mushrooms from different places were carried out by ISSR marker in order to provide some molecular biology evidences for research to varieties breeding and genetic relationship of mushroom. The results showed that from 27 ISSR primers, 14 primers whose polymorphisms were obviously screened out. 189 bands as well as 189 polymorphic bands were obtained from all the 53 tested strains, indicating that their polymorphism was 100%. The coefficients of genetic similarity ranged from 0.44 to 0.99. The results of cluster analysis showed that all 53 strains were classified into eight groups at 0.62 levels and that the coefficients of genetic similarity for majority of strains were pretty low, indicating that there were significant genetic variation and rich genetic diversity between the tested strains at the DNA level. The result also showed that there's no significant correlation between the tested materials' clustering and their geographic origins.

Key words: oyster mushroom (*Pleurotus*); ISSR; phylogenetic