

糙皮侧耳杂交后代遗传多样性分析

盛春鸽, 王延锋, 潘春磊, 徐德海, 侯国强

(黑龙江省农业科学院 牡丹江分院, 黑龙江 牡丹江 157041)

摘要:以糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* 白色菌株 P1 和深灰色菌株 P2 为亲本, 通过单孢菌株配对杂交获得 40 个杂交组合。出菇记录杂交后代子实体颜色, 提取 42 个样本的全基因组 DNA, 用 ISSR 进行遗传多样性分析。结果表明: 6 条 ISSR 引物共扩增出 45 条带, 其中多态性条带 34 条, 多态性比率为 75.56%, 有效等位基因数为 $N_e=1.4858$, 遗传多样性指数 $H=0.2725$, 香农信息指数 $I=0.4021$ 。聚类分析后发现, 在 0.6889 水平上聚为 4 类, 聚类结果与子实体颜色关系不大, 表明糙皮侧耳杂交后代存在丰富的遗传变异。分类结果将有利于更好的利用这些丰富的育种资源。

关键词:糙皮侧耳; 杂交后代; 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(2015)04-0149-03

糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)俗称平菇, 栽培范围遍及全球, 产量在世界菇类总产中位居前列^[1], 由于其易于栽培, 价格合理深受菇农和消费者的青睐。近年来, 平菇生理生化、遗传多样性等相关研究比较多, 但以平菇的杂交后代为材料进行遗传多样性分析的相关研究却鲜有报道。现以糙皮侧耳杂交后代为试材, 采用 ISSR 技术对其进行遗传多样性分析, 以期为更好的利用后代资源作为育种材料提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试糙皮侧耳: 白色亲本(P1)、暗灰色亲本(P2)以

及 40 个杂交后代。菌种保藏在黑龙江省农业科学院牡丹江分院。

1.2 试验方法

1.2.1 担孢子单核体的获得 按照黄毅^[2]的方法收集担孢子。镜检后确认为单核体^[3]的菌丝置于 25℃ 恒温箱培养, 保存待用。

1.2.2 杂交后代的构建 2 个亲本单核体随机配对进行单对单培养, 将出现锁状联合的双核体移植培养, 备用。共获得可出菇的杂交双核体 40 个。

1.2.3 全基因组 DNA 的提取 菌丝 DNA 的提取使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305-03, 天根生化科技有限公司)。

1.2.4 PCR 扩增 引物由上海 Sangon 公司合成。扩增反应体系: dNTPs(2.5 mmol/L) 2 μL, 引物(0.2 mmol/L) 1 μL, 10×ExTaq PCR buffer 2 μL, ExTaq (5 U/μL) 0.1 μL (TaKaRa), DNA 模板 2 μL, ddH₂O 补至 20 μL。反应程序为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 50 s, 57~58℃ 复性 50 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 补齐 7 min。1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

第一作者简介:盛春鸽(1985-), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向为食用菌遗传育种。E-mail: shengchunge@163.com.

责任作者:王延锋(1973-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事食(药)用菌遗传育种与栽培技术及产品保鲜精深加工等研究工作。E-mail: mdjunks@126.com.

基金项目:黑龙江省应用技术研究及开发计划资助项目(WB13B10602); 牡丹江市科技攻关资助项目(Z2013n014)。

收稿日期:2014-11-19

Abstract: In order to get the stock spawn of wild Guangxi Russula, and lay the foundation for the next step of semi artificial cultivation. According to the mother seed culture experience and using various materials for fungi, compose of a variety of formulations of Russula stock spawn. The results showed that peanut cake had bigger simulative effect to cultivate seed; wheat was more suitable for cultivation as the main material; formulation of cottonseed shell 15%, wheat bran 10%, wheat 57%, corn flour 8%, peanut cake 8%, sucrose 0.8%, and gypsum powder 1%, magnesium sulfate 0.2% could grew qualified stock spawn.

Keywords: *Russula lepida*; stock spawn; culture

1.3 数据分析

ISSR 产物按条带的有无赋值,有带记为 1,无带记为 0,构建二元数据矩阵。利用 NTSYS 2.10 软件分析计算样品间的相关遗传参数,并用 UPGMA 法进行聚类分析得到树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 F_1 代 ISSR 扩增产物的多态性

对 34 条 ISSR 引物进行筛选,选择 6 条(表 1)带型清晰、多态性较好的引物对 40 个杂交菌株以及 2 个亲本进行多态性分析。研究 42 份供试菌株的遗传多样性。

表 1

供试材料 ISSR 扩增产物的多态性

Table 1

The polymorphism of ISSR PCR bands in tested samples

| 序号 No. | 序列 Sequences | 退火温度 Annealing temperature | 扩增条带数 DNA bands | 多态性条带数 No. of polymorphic bands | 多态性比率 Polymorphism ratio/% |
|-----------|-------------------|-------------------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| P1 | TGCACACACACAC | 57 | 9 | 7 | 77.8 |
| P2 | GTGACACACACAC | 57 | 7 | 4 | 57.1 |
| P4 | GGATGCAACACACACAC | 58 | 8 | 6 | 75.0 |
| P9 | AGAGAGAGAGAGAGG | 58 | 8 | 8 | 100 |
| P11 | GAGAGAGAGAGAGAAC | 57 | 8 | 6 | 75.0 |
| P24 | CACGAGAGAGAGAGAGA | 58 | 5 | 3 | 60.0 |

2.2 杂交后代遗传多样性的 UPGMA 聚类分析

基于 ISSR 数据对 42 份供试材料进行聚类分析,构建亲缘关系树状图(图 1),在阈值 0.6889 处,可将 42 份供试菌株划分为四大类群,P1 和 P2 菌株被分聚在了第

6 条引物在 42 个样本中共扩增出 45 条带,其中 34 条呈多态性,多态性比率为 75.56%,单个 ISSR 引物扩增的条带数在 5~9 条,平均 7.5 条,扩增产物的分子量介于 0.4~4.2 kbp,有效等位基因数(N_e)和基因多样性指数(H)是衡量遗传变异最常用的遗传指标^[4]。42 份供试材料的有效等位基因数为 $N_e=1.4858$,基因多样性指数(H)为 0.2725,Shannon 信息指数(I)为 0.4021。其中引物 P9 扩增出 8 条多态性条带;引物 P24 扩增出 3 条多态性条带,为最少。

一枝和第二枝里。二者之间的遗传相似性系数为 0.5111。将系统发育树的数据列表,见表 2。

由表 2 可知,40 个遗传后代中,深灰色子实体共有 19 株,浅灰色子实体有 17 株,青灰色的子实体有 4 株。表明杂交后代出现了不同程度的遗传变异,表现出了较丰富的遗传多样性。这些子实体呈无规律性的分布在各个进化枝中,各供试菌株间的遗传相似性系数介于 0.511~0.867,平均为 0.69。

表 2 聚类结果与子实体颜色之间的关系

Table 2 Relationship between cluster results and fruit-body color

| 进化枝 Branch | 菌株 Strain |
|---------------|--|
| 第 I 枝 | P1 21* 32* |
| 第 II 枝 | P2 38# 17# 19# 12# 39* 25# 22+ 23# 18* 11+ 37* 20* 14* 36* |
| 第 III 枝 | 35# 8* 13* 16# 40* 02+ 09* 30# 31# 03# 10* 05* 04* 06# 01# 15# 07* 27+ 24# 29# 34* 33* 26# |
| 第 IV 枝 | 28* |

注: * 代表深灰色; # 代表浅灰色; + 代表青灰色。

Note: * represents dark grey; # represents light grey; + represents grey.

各进化枝中子实体颜色和聚类结果没有必然联系。类群划分与子实体颜色性状关系不大。第一枝是以白色亲本为主的代表枝,第二枝是以暗灰色亲本为主的代表枝。第二、三枝是文章中的核心菌株,其菌株的数量大,颜色也较为丰富,是很不错的育种材料。从结果来看,P1 和 P2 之间的遗传相似性系数最小为 0.5111,颜色不同。而杂交后代 24 与 27 号菌株之间的遗传相似性系数最大,为 0.8667,颜色也不同。无论是在遗传相似性

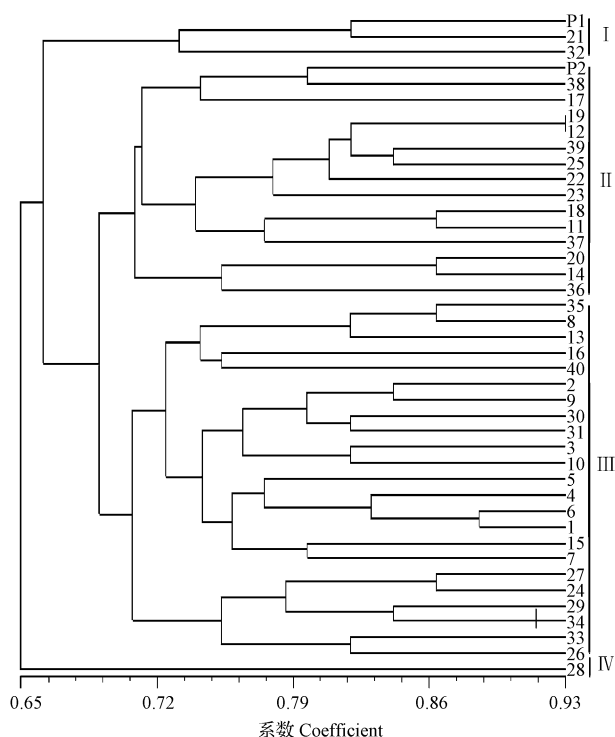


图 1 ISSR 标记下 42 份供试菌株 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of cluster analysis for 42 tested strains based on ISSR markers

大的菌株之间还是在遗传相似系数小的菌株之间,其颜色的分布都毫无规律可言,这进一步佐证了 ISSR 聚类结果和颜色无直接关系。

3 讨论

以杂交、自交或回交后代群体为材料进行相关遗传分析的研究很多,范凯等^[6]研究了茶树自然杂交后代的遗传多样性,结果表明其聚类结果与形态学性状存在极显著的正相关。李红梅等^[6]通过农艺性状分析了刺芹侧耳自交 S1 代的遗传分化。韩国辉等^[7]用 SSR 技术分析了沙田柚 2 个杂交组合 159 株后代的杂种性质,并分析了亲本和后代群体的遗传关系。吕林兰等^[8]用 ISSR 技术分析了马氏珠母贝 3 个野生种群及种群间杂交后代的遗传多样性。邓普恩等^[9]利用 RAPD 分析了罗非鱼亲本与杂交子代遗传差异,并找到了 9 条特异性的分子标记。

ISSR 技术是一项快速、可靠、高效的分子标记系统,具有重复性好、多态性高的优点。目前该技术在食用菌菌株鉴定、遗传多样性分析以及种质资源评价等很多方面都有广泛的应用。宫志远等^[10]对山东省 35 株平菇栽培菌株的 ISSR 研究表明,相似水平在 66.5% 左右时,35 个菌株分为黑色、灰黑色和白色子实体 3 个组群;王卓仁等^[11]对香菇单孢杂交子代群体的 ISSR 分析中也表明,聚为同一亚类的菌株,常具有相似的子实体形态或农艺性状。但是该研究的聚类结果与子实体颜色没有直接联系,同一颜色的菌株可能遗传相似性系数很小,而不同颜色的菌株其遗传相似性系数又很大。笔者认为可能不同材料不同引物所提供的信息量不同及检测位点不同所致,因此在该研究的基础上增加更为深入的研究对象如对菌株菌丝长速、酶活等更多农艺性状的调查,或抓住值得研究的几个有代表性的菌株采用 SNP 等更为精准的标记来分析,为揭示遗传多样性提供更具说服力的证据。从分子水平上看,该研究表明杂交后代具有较丰富的遗传变异。该研究结果充分证明其杂

交子杂交,产生了丰富的遗传变异,可以按照不同的变异类型从中筛选出具有不同生物学特性的特殊材料,为侧耳属系统定向选种奠定基础。

该研究 P9 引物扩增 9 条带,是所有引物里面扩增出位点最多的引物。而张金霞等^[12]在 2007 年对白黄侧耳 ISSR 的研究中,单条引物最多扩增出 45 条带,是该研究中的 5 倍,这可能与课题组所选的材料是杂交后代遗传背景没有那么宽泛有关,同时也有理由大胆推测,糙皮侧耳经数年的人工筛选之后,遗传背景已经变得相对狭窄,这就亟待要求广大菌物研究者保护野生菌物资源,为育种材料的尽量丰富而努力。

参考文献

- [1] 马晓龙. 糙皮侧耳优良杂交子筛选与侧耳属野生菌株驯化栽培研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009.
- [2] 黄毅. 食用菌栽培[M]. 北京:高等教育出版社,2008:87-89.
- [3] 林芳灿,汪中文,孙勇. 中国香菇自然群体的交配因子分析[J]. 菌物系统,2003(22):235-240.
- [4] 黄建安,李家贤,黄意欢,等. 茶树品种资源遗传多样性的 AFLP 研究[J]. 园艺学报,2006,33(2):317-322.
- [5] 范凯,洪永聪,丁兆堂,等. 茶树“黄山种”自然杂交后代遗传多样性分析[J]. 园艺学报,2010,37(8):1357-1362.
- [6] 李红梅,尚晓冬,谭琦,等. 刺芹侧耳自交 S1 代若干性状的遗传分化[J]. 菌物学报,2009,28(4):541-547.
- [7] 韩国辉,向素琼,汪卫星,等. 沙田柚杂交后代群体的 SSR 鉴定与遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2010,43(22):4678-4686.
- [8] 吕林兰,杜晓东,王嫣,等. 马氏珠母贝 3 个野生种群及种群间杂交后代遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水生生物学报,2008,32(1):26-32.
- [9] 邓普恩,刘丽,刘楚吾. 罗非鱼亲本与杂交子代遗传差异的 RAPD 分析[J]. 现代农业科学,2008,15(12):95-98,111.
- [10] 宫志远,任海霞,姚强,等. 35 个山东主栽平菇菌株的 ISSR 遗传差异分析[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(3):507-512.
- [11] 王卓仁,刘启燕,边银丙,等. 香菇单孢杂交子代群体灰色关联度和 ISSR 分析[J]. 菌物学报,2010,29(2):267-272.
- [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.

Analysis for Genetic Diversity of *Pleurotus ostreatus* Hybrids

SHENG Chun-ge, WANG Yan-feng, PAN Chun-lei, XU De-hai, HOU Guo-qiang

(Mudanjiang Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang, Heilongjiang 157041)

Abstract: White strain (P1) and dark grey strain (P2) of *Pleurotus ostreatus* were used as dikaryon parents for single-spore crossbreeding. 40 inbred lines P1×P2 were constructed, fruit-body color of 40 combines were observed. 40 offspring and 2 parents were identified for genetic diversity by ISSR technique. The results showed that, 6 ISSR primers generated 45 fragments, polymorphic bands was 34, polymorphism ratio 75.56%, the effective number of alleles (N_e) = 1.4858, Nei's gene diversity (H) = 0.2725, Shannon information index (I) = 0.4021, UPGMA based clustering separated the 42 test strains into 4 groups at an overall similarity coefficient of 0.6889 which had no directly contacts with its fruit-body color. The results showed that, a high level of genetic variation in *P. ostreatus* inbred lines. It would be beneficial to use various target varieties to broaden the genetic background of *P. ostreatus*.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; hybrid generation; genetic diversity