

DOI:10.11937/bfyy.201705019

# 辽宁省主栽香菇菌株 ISSR 遗传差异性分析

宋莹, 刘俊杰, 刘岩岩, 李宏亮, 刘娜, 张士义

(辽宁省农业科学院 食用菌研究所, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:**以 20 个辽宁省主栽香菇菌株为试材, 采用 ISSR 分子标记方法, 研究了 20 个菌株的遗传差异性, 并采用 NTSYS-PCR 软件进行聚类分析。结果表明:从 30 个随机引物中筛选出 9 个 ISSR 备用引物, 并用这 9 个引物对供试香菇菌株基因组 DNA 进行了 ISSR-PCR 扩增, 共扩增出 72 条清晰条带, 其中多态性条带占 83.3%。通过聚类分析发现, 异化系数在 0.36 为阈值时, 20 个菌株聚为 4 个组群。

**关键词:**香菇; ISSR-PCR; 聚类分析

**中图分类号:**S 646.1+2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)05-0082-04

香菇(*Lentinula edodes*)是世界上产量仅次于双孢蘑菇的第二大人工栽培食用菌, 辽宁省是香菇栽培的主要省份, 近年来辽宁香菇生产迅猛发展<sup>[1]</sup>。菌种作为食用菌的基础材料, 其在收藏、保存、遗传多样性评价及利用, 及在遗传育种领域及食用菌产业经济增长方面有着重要的作用<sup>[2]</sup>。然而, 由于香菇菌种的检测鉴定需要专业的仪器设备, 加之香菇菌种无性繁殖的特性, 致使香菇菌种“同种异名, 异种同名”现象普遍存在, 造成品种混乱, 严重影响香菇产业发展。

随着分子生物学的发展, DNA 分子标记技术日益受到重视, 准确性明显高于形态学和生理生化指标, 而且操作简便、特异性好、准确性高。ISSR (inter-simple sequence repeat) 其基本原理是用锚定的微卫星 DNA 为引物, 即在 SSR 序列的 3'端或 5'端加上 2~4 个随机核苷酸, 在 PCR 反应中, 锚定引物可引起特定位点退火, 导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间 DNA 片段进行 PCR 扩增。所扩增的 inter SSR 区域的多个条带通过聚丙烯酰胺凝胶电泳得以分辨, 扩增谱带多为显性表现<sup>[3-4]</sup>。该研究主要通过 ISSR 的方法对辽宁省农业科学院收集保藏的性状表现优良的 20 个香菇菌株进行遗传

差异性分析, 确定其遗传背景关系, 以期杂交育种工作提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的 20 个香菇菌株名称及来源见表 1。

表 1 供试香菇菌株

Table 1 <i>L. edodes</i> test strains		
菌株编号	菌株	来源
No.	Strain	Origin
XX1	“日 71”	日本
XX2	“日 73”	日本
XX3	“抚香 2 号”	抚顺市农业科学院
XX4	“931”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX5	“L808”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX6	“937”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX7	“清原向阳 2 号”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX8	“抚香 3 号”	抚顺市农业科学院
XX9	“平泉 18”	平泉
XX10	“香 001”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX11	“1363”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX12	“C66”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX13	“L26”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX14	“武香 1 号”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX15	“433”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX16	“辽抚 4 号”	抚顺市农业科学院
XX17	“荷香 1 号”	辽宁省农业科学院食用菌研究所
XX18	“锦香 1 号”	锦州
XX19	“野香 1 号”	新宾冈山
XX20	“野香 2 号”	新宾冈山

PDA 培养基: 葡萄糖 20 g、马铃薯 200 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL。

供试引物与试剂: 引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的 ISSR 引物序列, 均由上海捷瑞工程

**第一作者简介:**宋莹(1982-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为食用菌遗传育种。E-mail: sy.512@163.com

**基金项目:**辽宁省农业领域青年科技创新人才培养资助项目(2015026)。

**收稿日期:**2016-10-08

技术有限公司合成。CTAB、dNTPs 和 *Taq* 酶等试剂均由宝生生物科技有限公司提供。

表 2 ISSR 引物及序列

引物编号	序列
Primer No.	Sequence(5'-3')
ISSR1	AGAGAGAGAGAGAGAGT
ISSR2	AGAGAGAGAGAGAGAGT
ISSR3	ACACACACACACACT
ISSR4	CTCCTCCTCCTCCTC
ISSR5	ACACACACACACACC
ISSR6	CACCACCACCASC
ISSR7	CTCCTCCTCCTCSC
ISSR8	BDBACAACAACAACA
ISSR9	VHVGTTGTGTGTGTGTGT

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌丝体的制备 供试菌株在 PDA 平皿培养基上, 25 ℃ 培养 14 d。菌丝培养好后, 刮下菌丝, 放入 1.5 mL 离心管内, 每管 0.2 g, 再将菌丝冷冻干燥, -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 模板 DNA 的制备 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA<sup>[3]</sup>。

1.2.3 PCR 反应及电泳 PCR 反应体系总体积为 20  $\mu$ L, 含有 1 $\times$ PCR 反应缓冲液、0.2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP、1 U *Taq* DNA 聚合酶、0.4  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 引物、50 ng 模板 DNA, 加灭菌双蒸水至 20  $\mu$ L。按上述比例将反应液依次加入 0.2 mL 离心管中, 混匀, 放入 PCR 仪中, 进行 PCR 扩增: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 复性 45 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后 72 ℃ 补平 7 min。将适量的琼脂糖加入 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中, 配制成琼脂糖浓度为 1.0% 的溶液, 将其倒入制胶模具, 室温下凝固后, 放入装有适量 1 $\times$ TBE 缓冲液的电泳槽中。取 PCR 扩增产

物和加样缓冲液, 按照体积比 3:1 混匀点样。以 120 V 电压进行电泳, 待溴酚兰距凝胶前缘 1 cm 左右停止电泳。

## 1.3 数据分析

将电泳谱带上清晰且具有重复性的条带记为 '1', 相对应位置没有条带者则记为 '0', 形成 '0-1' 数据表。用 DPS 软件计算相似性系数, 得到相似性系数矩阵。采用 Jaccard 聚类距离中的类平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 生成聚类图。

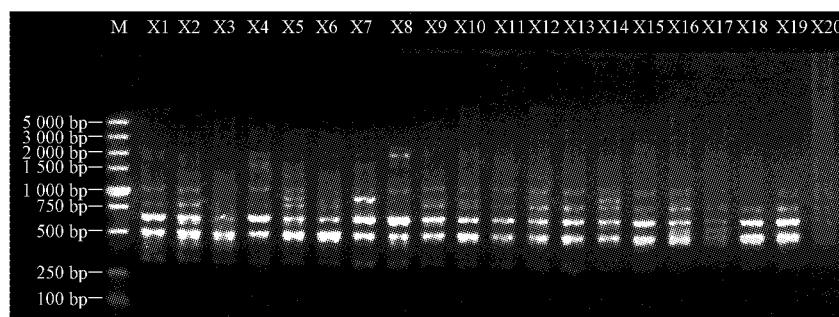
## 2 结果与分析

### 2.1 20 个香菇菌株 ISSR 标记分析

对 30 条 ISSR 引物进行筛选, 其中有 9 条引物能扩增出条带清晰且具多态性的带谱, 共计扩增出 72 条位点片段, 各引物扩增的位点数介于 5~11 条, 平均位点数为 8 条; 多态性条带总共为 60 条, 平均多态比率为 83.3%, 图 1、2 分别为 9 条引物其中 ISSR3 和 ISSR9 的扩增图谱。

### 2.2 DNA 扩增图谱聚类分析

ISSR 分子标记技术产生的条带经 NTSYS-PCR 软件进行聚类分析, 获得各个菌株的遗传聚类图 (图 3)。20 个菌株两两间的遗传相异系数介于 0.00~0.61。20 个菌株在 0.61 时聚在一起, 在 0.36 时分为 4 个群, 其中 XX1、XX2、XX5、XX7 菌株聚为一组; XX3 和 XX8、XX9、XX4、XX12、XX10、XX11、XX15、XX13、XX14、XX18、XX19 聚为一组; XX6、XX20、XX16 聚为一组; XX17 为单独一组。20 个香菇菌株中, 菌株 XX11 和 XX15 亲缘关系最近, 遗传相异系数为 0.00, 说明它们的遗传背景相似, 二者的出菇温度范围均在 10~20 ℃, 适合半熟料栽培, 同物异名的可能性较大。



注: M 为 Marker, X1~X20 为供试的香菇菌株 ISSR 扩增条带。下同。

Note: M, Marker; X1-X20, Amplification bands of testing edodes strains by ISSR. The same below.

图 1 ISSR3 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification result of *L. edodes* strains by primer ISSR3

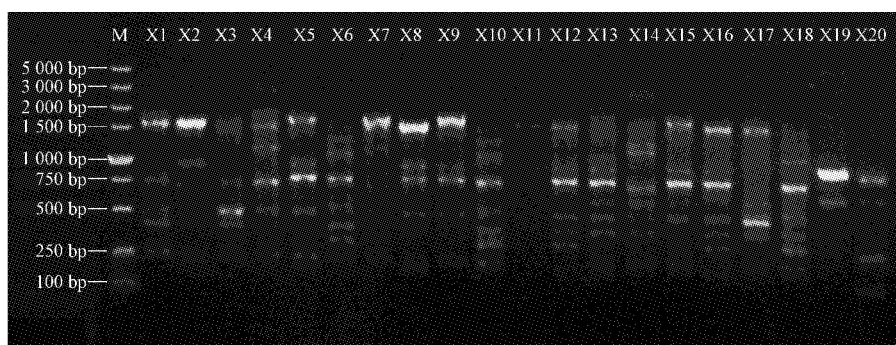


图 2 ISSR9 的 PCR 扩增结果

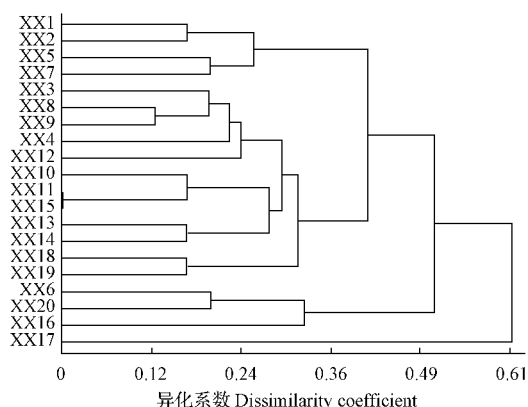
Fig. 2 Amplification result of *L. edodes* strains by primer ISSR9

图 3 基于 ISSR 分子标记的香菇菌株聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of 20 *L. edodes* strains based on ISSR

### 3 结论与讨论

ISSR 是根据真核生物中广泛存在简单重复序列(SSR)的特点,利用在真核生物基因组中常出现的简单重复序列本身设计引物,无需预先克隆和测序。简单重复序列通常为显性标记,呈孟德尔式遗传,具有良好的稳定性和多态性,有 DNA 用量少、技术要求低、成本低廉等优点<sup>[5-7]</sup>。该试验利用 ISSR 引物对性状表现优良的香菇菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增,发现利用 ISSR 分子标记能将香菇菌株区分开,共计扩增出 72 条位点片段,各个引物扩增的位点数介于 5~11 条,平均位点数为 8 条;多态性条带总共为 60 条,平均多态比率为 83.3%。并将 20 个

菌株聚为 4 个群。第一类群为“日 71”“日 73”“L808”“清原向阳 2 号”菌株,菌龄均为 110~150 d;第二类群为“抚香 2 号”和“931”“抚香 3 号”“香 001”“平泉 18”“1363”“C66”“L26”“武香 1 号”“433”“锦香 1 号”“野香 1 号”,菌龄均为 90~110 d;第三类群为“937”“野香 2 号”“辽抚 4 号”,生育期均为 70~90 d;第四类群为“荷香 1 号”,生育期为 100 d。聚类分析初步发现,前 3 个类群中每个类群的香菇菌株菌龄较相近,但其结果尚需进一步验证。

该研究通过对辽宁省主要栽培的 20 个香菇菌株遗传多样性的分析,初步明确了这些菌株的遗传差异,为辽宁省香菇遗传信息库的建立和香菇遗传育种工作奠定了一定的基础。

### 参考文献

- [1] 宋莹,张忠伟,刘俊杰,等. ISSR 分子标记鉴定香菇杂交菌株试验[J]. 食用菌,2015(3):12-14.
- [2] 张金霞. 中国食用菌菌种学[M]. 北京:中国农业出版社,2011:96-97.
- [3] 冯伟林,蔡为明,金群力,等. 秀珍菇主要农艺性状比较及 ISSR 分子标记鉴定[J]. 食用菌学报,2014,21(2):14-18.
- [4] 闫可,尹勇刚,傅嫦娥,等. 棒褐孔菌菌株遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 食用菌学报,2012,19(2):26-30.
- [5] 刘靖宇,宋秀高,叶夏,等. 香菇菌株遗传多样性 ISSR、RAPD 和 SRAP 综合分析[J]. 食用菌学报,2011,18(3):1-8.
- [6] 殷丽琴,彭云强,付绍红,等. 基于 ISSR 标记的彩色马铃薯遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. 西南农业学报,2016,29(1):20-25.
- [7] 吴凡,李德臣,赵春晓,等. ISSR 分子标记技术在家蚕遗传研究上的应用进展[J]. 湖北农业科学,2015,54(24):6124-6126.

## ISSR Analysis of Genetic Diversity of Main Cultivated Strains of *Lentinula edodes* in Liaoning

SONG Ying, LIU Junjie, LIU Yanyan, LI Hongliang, LIU Na, ZHANG Shiyi

(Institute of Edible Mushroom, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

# 耧斗菜野生资源的 AFLP 遗传多样性分析

杜 艳<sup>1</sup>, 王 娟<sup>2</sup>, 陈 冲<sup>2</sup>, 段 莎莎<sup>3</sup>

(1. 山西运城农业职业技术学院 农林与工程系, 山西 运城 044000; 2. 山西省农业科学院 果树研究所, 山西 太原 030031; 3. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

**摘 要:**以包括 22 份野生资源的 5 个耧斗菜物种为试材, 采用 AFLP 分子标记方法, 分析了中国耧斗菜野生资源的遗传变异和遗传多样性, 为系统鉴定耧斗菜野生资源奠定基础。结果表明: 10 对引物共扩增出 293 个多态性位点, 多态性位点比率为 62.5%。Shannon 多样性和  $H_e$  值分析结果表明, 5 个物种的遗传多样性大小顺序为无距耧斗菜>耧斗菜>尖萼耧斗菜>直距耧斗菜>华北耧斗菜。遗传距离分析结果表明, 耧斗菜与尖萼耧斗菜遗传距离最小, 尖萼耧斗菜与直距耧斗菜遗传距离最大。

**关键词:**耧斗菜; AFLP; 遗传多样性

**中图分类号:**S 649.602 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)05-0085-04

耧斗菜(*Aquilegia viridiflora*)系毛茛科耧斗菜属(*Aquilegia*)植物, 主要分布于北半球的温带区域。目前全球发现的耧斗菜属有 76 个种, 其中 22 个种分布于北美洲, 23 个种分布于亚洲, 21 个种分布于欧洲, 其余种零星分布于其他洲<sup>[1]</sup>。中国有 13 种耧斗菜属植物, 其中 4 个为特异地地方种<sup>[2]</sup>。耧斗菜属物种生长环境极广, 从沙漠温泉到高山草甸、裸露岩石及温带森林, 从海平面到阿尔卑斯山区、洛基山区及阿尔卑斯山区均有分布。各物种间分布范围差异显著, 如 *A. borodinii*、*A. laramiensis* 及 *A. barbaricina* 仅分布在极其狭窄的地域, 而 *A. sibirica*、*A. vulgaris*、*A. canadensis* 和 *A. formosa* 在整个大陆均有分布<sup>[3-4]</sup>。耧斗菜还存在显著的形态学差异, 其中花距

长短及性状、花瓣及花萼颜色、柱头外露程度及花冠大小极为明显, 同时其叶片数目和大小、叶形、株高等营养器官性状也是物种识别的标准<sup>[5]</sup>。此外, 耧斗菜为虫媒花, 其传粉媒介主要有苍蝇、大黄蜂、天蛾及蜂鸟等。因生理、形态和传粉方面的多样性, 以及种间杂交的高亲和力, 耧斗菜的系统发生学地位及进化研究热度仅次于双子叶模式植物拟南芥<sup>[6-7]</sup>。目前耧斗菜种间的系统发生关系及遗传多样性研究仅限于欧洲及北美洲, 国内耧斗菜种间亲缘关系和遗传多样性系统研究尚鲜见报道<sup>[8]</sup>。分子标记是研究植物亲缘关系及遗传多样性的重要工具。该研究利用 AFLP 标记技术对 22 份耧斗菜进行遗传变异及遗传分化程度分析, 以期对系统评价中国耧斗菜遗传多样性提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的 22 份耧斗菜材料具体信息见表 1。经表型鉴定, 供试样本分为 5 个耧斗菜属物种, 群体材料

**第一作者简介:**杜艳(1980-), 女, 山西运城人, 硕士, 讲师, 现主要从事花卉植物栽培与应用等研究工作。E-mail: xudu20061@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31400131, 81603223)。

**收稿日期:**2016-12-12

**Abstract:** Twenty *Lentiniula edodes* strains mainly cultivated in Liaoning were used as test materials, the genetic diversity and cluster analysis were studied by ISSR technique and NTSYS-PCR software, respectively. The results showed that 9 ISSR primers were selected from 30 random primers and 72 clear bands were identified by the ISSR-PCR amplification including 83.3% polymorphic bands. Clustering analysis found that 20 strains were gathered into four groups when the dissimilarity coefficient was 0.36.

**Keywords:** *Lentiniula edodes*; ISSR-PCR; clustering analysis