

云南昭通野生紫丁香蘑群体的遗传多样性分析

魏海莲, 刘志曦, 张婉洁, 何德, 李翠新, 马建

(西南林业大学 生命科学院, 云南 昆明 650000)

摘要:以采自云南昭通的 66 株野生紫丁香蘑(*Lepista nuda*, *L. nuda*)为研究对象, 分析了其 ITS 序列及其单核苷酸多态性(SNP)。结果表明:经结合形态和分子水平的鉴定, 确定所采的野生蘑菇为紫丁香蘑;66 个紫丁香蘑的 ITS 序列长度变化范围为 666~671 bp, ITS1 为 241~244 bp, 5.8S 为 155 bp, ITS2 为 267~275 bp, G+C 含量的变化范围为 41.5%~42.4%, 所有样本的平均遗传距离为 0.003 0;通过序列比对, 共筛选出 7 个 SNP 位点, 单突变位点 3 个, 简约信息位点 4 个;转换与颠换的比值 R 为 0.672;该群体的核酸多态性指数 P_i 为 0.002 91, 每位点核苷酸多态性指数 Θ (per site from Θ) 为 0.002 36。采用邻接法(neighbour joining, NJ)构建的系统发育树分支支持率低, 表明群体内各菌株遗传距离小, 该群体的遗传多样性丰度较低。综上所述云南昭通野生紫丁香蘑群体的遗传多样性水平很低, 需要加强保护。

关键词:紫丁香蘑;ITS;SNP;遗传多样性

中图分类号:S 646.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0132-05

紫丁香蘑(*Lepista nuda*)又名紫晶蘑、裸口蘑^[1]。分布于我国黑龙江、福建、青海、新疆、西藏、山西等地区。可食用, 菌肉厚, 具香气, 味鲜美, 是优良食药食用菌^[2]。子实体中含有人体必需氨基酸、维生素及矿质元素, 具有较高的营养价值。紫丁香蘑内含丰富的维生素 B₁、硬脂酸、神经酰胺和麦角甾醇类化合物;其子实体提取物能抑制癌细胞、病毒、并能调节机体正常的糖代谢, 促进神经传导^[3-4]。用此菌所做的抗癌试验表明, 对小白鼠肉瘤 180 的抑制率为 90%, 对艾氏癌的抑制率为 100%^[5]。为了保护和开发利用这一优良的食药真菌资源, 需要进一步了解其群体结构、遗传多样性及其群体演化历史, 这对其保护与可持续利用具有重要意义。

遗传多样性是种质资源保护的核心, 体现了物种对环境变化的适应能力和开发利用的潜力。核糖体 DNA 内转录间隔区(nuclear ribosomal internal transcribed

spacers, nrDNA ITS)是核糖体基因中位于核糖体 18S、5.8S 和 28S 之间的转录间隔区的 DNA 片段, 包含被 5.8S rDNA 片段所分隔的 ITS1 和 ITS2 两个片段。由于转录间隔区内多为中性碱基突变, 使得 nrDNA ITS 受到的选择压力较小, 具有相对较快的进化速率, 能为研究真菌的分类鉴定和分子检测提供丰富的遗传信息^[6]。单核苷酸多态性(SNP)是指生物基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性^[7]。SNP 是目前所有分子标记中多样性最丰富的标记, 是继以 RFLP(限制片段长度多态性)、SSR(简单序列重复标记)为代表的第二、三代分子标记之后的最新一代分子标记^[8]。SNP 能够广泛用于遗传多样性研究, 对于资源保存、种质利用有重要意义。

该研究对采自云南省昭通市昭阳区三甲村附近山上的 66 个样本进行群体 ITS 序列测定和分析, 通过单核苷酸多态性(SNP)研究了昭通紫丁香蘑群体 ITS 序列碱基群体内变异, 构建系统发育树进行聚类与遗传多样性分析。为菌种的选育、引种栽培、遗传多样性等研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为采自云南省昭通市昭阳区三甲村附近山上的 66 株野生紫丁香蘑, 形态上初步判断为紫丁香蘑(图 1)。

第一作者简介:魏海莲(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail:771453668@qq.com.

责任作者:李翠新(1972-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为微生物学与森林保护学。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);云南省应用基础研究计划资助项目(2011FZ141);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)。

收稿日期:2015-05-28



图1 云南昭通采集的野生紫丁香蘑

Fig. 1 *L. nuda* collected from Zhaotong, Yunnan

1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取 采用CTAB法提取紫丁香蘑子实体全基因组DNA^[9]。将DNA溶于TE液中,终浓度为50 ng/ μ L,于-20℃保存备用。

1.2.2 PCR扩增及测序 用2×含染料高保真Taq酶预混PCR反应体系(含优化浓度的GenStar HiFi Taq DNA Polymerase、dNTPs、Mg²⁺、反应缓冲液和稳定剂等成分,北京康润诚业生物科技有限公司),利用真菌通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增rDNA ITS片段(引物由上海生物工程公司合成)。反应体系35 μ L: DNA模板1 μ L, ITS1、ITS4 0.7 μ L, 2×HiFi Taq PCRStarMix 17.5 μ L, ddH₂O 15.1 μ L。ITS片段扩增反应程序采用94℃预变性2 min, 94℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 34个循环后, 72℃延伸8 min。扩增得到的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后,由北京六合华大基因科技股份有限公司完成测序。为避免误差所有片段采用双向测序。

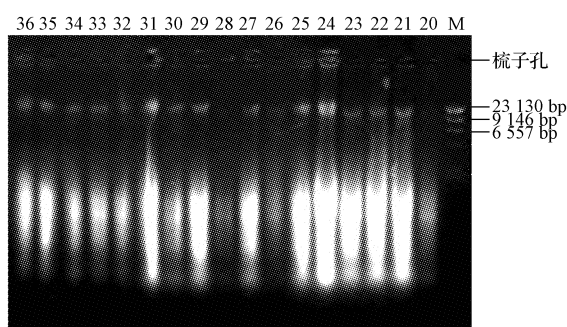
1.2.3 序列分析 将测序所得序列用BioEdit^[10]进行序列查看;用Contig^[11]进行序列拼接并人工校正,在NCBI数据库中进行搜索,在分子水平鉴定所得菌株情况。用ClustalX^[12]进行序列比对,利用MEGA 5.05^[13]软件分析碱基组成,计算群体平均遗传距离,用DNAsp^[14]软件分析确定SNP位点,分析样本单核苷酸多态性。

1.2.4 聚类和遗传多样性分析 将菌株序列与从GenBank数据库中获得的其同科不同属的*Collybia cirrhata*(登录号DQ830804)、*Clitocybe dealbata*(登录号JF907804)序列,运用Clustalx软件进行序列排比,生成Phylogeny格式文件,使用Phylogeny^[15]软件构建系统发育树。用Seqboot程序优化系统树,通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测,自举支持率为1 000次。序列间进化距离根据Kimura-2参数遗传距离模型计算,用Neighbor程序(邻位相接法)建树。

2 结果与分析

2.1 DNA提取、PCR扩增及测序鉴定结果

由图2可知,提取时未特意除去RNA, RNA残留较多。得到的野生紫丁香蘑菌株DNA约23 130 bp, DNA电泳条带清晰, DNA的纯度、浓度及产率都较高, 可用于PCR扩增。



注: M为琼脂糖凝胶电泳的分子量标准。下同。

Note: M is standard of molecular weight in agarose gel electrophoresis. The same below.

图2 部分样品总基因组DNA检测电泳图

Fig. 2 Part of electrophoresis to detect DNA extraction

由图3可知, PCR产物分子量相同, 长度在700 bp左右。经测序后, 所得序列在NCBI中Blast, Blast结果hit中紫丁香蘑序列一致性达99%, E value(期望值)为0,

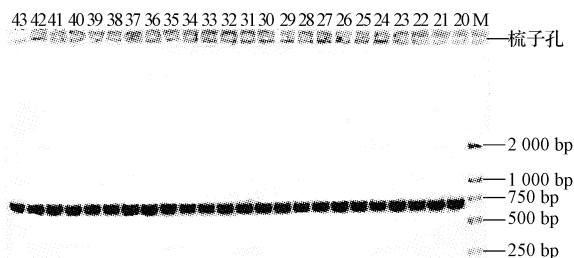


图3 部分ITS扩增产物电泳图

Fig. 3 Part of ITS amplification products electrophoresis

LANDEWEERT 等^[16]认为通过 ITS 序列比对,序列一致性 $\geq 99\%$,为相同种;序列一致性 $>95\%$, $<99\%$,为相同属;序列一致性 $\leq 95\%$,为相同科。该试验 Blast 结果显示,供试菌株与紫丁香蘑的序列一致性达 99%,结合形态上的鉴定,确定所采的野生蘑菇为紫丁香蘑。

2.2 ITS 序列分析

由表 1 可知,软件 MEGA 5.0 分别对 ITS、ITS1、5.8S、ITS2 序列的长度、4 种碱基的含量、G+C 的含量进行统计分析。由表 1 可以看出,ITS 长度有 12 bp 长度的变化。ITS 序列中 G+C 含量变化范围为 41.5%~42.4%,其中 5.8S G+C 含量相对 ITS1、ITS2 较高。ITS1、5.8S、ITS2 中碱基 T 含量都较高。MAGE 5.0 计算得出所有样本在内的遗传距离变化范围在 0~0.009 7 之间,平均遗传距离为 0.003 0。群体内各个体之间遗传距离较小。

表 1 紫丁香蘑 ITS 序列长度及碱基组成

Table 1 The length and base composition of *L. nuda* in ITS sequence

| 序列 Sequence | 长度 Length/bp | C/% | G/% | A/% | T/% | G+C/% |
|----------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ITS | 666~671 | 20.0~20.3 | 21.5~22.1 | 24.8~25.7 | 32.5~33.0 | 41.5~42.4 |
| ITS1 | 241~244 | 18.8~19.3 | 20.3~21.0 | 24.5~25.2 | 34.9~36.0 | 39.1~40.3 |
| 5.8S | 155 | 21.9 | 23.2 | 27.1 | 27.7 | 45.1 |
| ITS2 | 267~275 | 19.8~20.2 | 21.3~22.9 | 23.5~25.3 | 33.6~34.0 | 41.1~43.1 |

2.3 ITS 序列单核苷酸多态性(SNP)分析

试验中 HiFi *Taq* DNA Polymerase 的保真性能约为普通 *Taq* DNA Polymerase 的 3~4 倍,错配率可降到 10^{-6} 碱基/循环数,大大降低了 PCR 扩增出错的可能性。通过序列比对,共筛选出 7 个 SNP 位点,3 个为单突变位点,4 个为简约信息位点。

表 2 紫丁香蘑 ITS 序列变异位点与碱基替换

Table 2 Variable sites and base substitution of *L. nuda* in ITS sequence

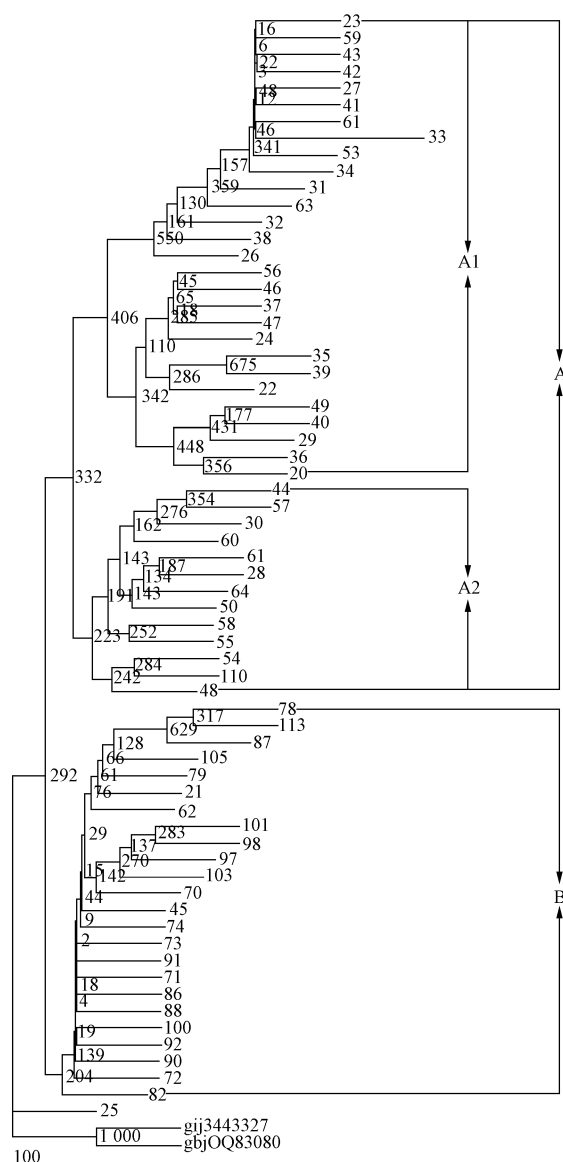
| 序列 Sequence | 保守位点 Conserved sites | 变异位点 Variable sites | 简约信息位点 Parsimony informative site | 单突变位点 Singleton sites | 转换碱基对 Conversion base pairs | 颠换碱基对 Transversion base pairs |
|----------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| ITS | 661 | 7 | 4 | 3 | 2 | 5 |
| ITS1 | 237 | 4 | 2 | 2 | 0 | 4 |
| 5.8S | 155 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ITS2 | 264 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 |

由表 2 可以看出,SNP 位点均在 ITS1、ITS2 区段,5.8S 为保守序列,未发生单核苷酸突变现象。SNP 位点中 2 个 C/G 颠换的位置分别在 ITS1 区、ITS2 区,1 个 A/C 颠换位点在 ITS1 区,2 个 G/T 颠换位点在 ITS1 区,2 个 G/A 转换位点在 ITS2 区,ITS 序列中发生转换与颠换的比值 R 为 0.672。该群体的核酸多态性指数

P_i 为 0.002 91,每位点核苷酸多态性指数 Theta(per site from Eta)为 0.002 36,说明该群体的 DNA 遗传多样性的丰度较低。

2.4 聚类与遗传多样性分析

由图 4 可知,该群体各样本在系统树上基本可分为 A、B 两大分支,但支持率仅为 39.2%;A 又分为 A1、A2 两支,但支持率也仅为 33.2%;以上几大支之内的分支支持率更是偏低,有的甚至低至 0.2%。支持率低说明置信度低,也说明群体内各菌株的进化关系并不明显,群体内各菌株之间遗传距离太小,进化树不能很好地反



注:树节点处数字标注为支持率,由 1 000 次 bootstrap 估算,端点处数字标注为菌株编号。

Note: The digital mark at node is support rate, by 1 000 bootstrap estimates, endpoint numerals is strain No.

图 4 基于 ITS 序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree constructed based on ITS sequence

映该群体各菌株间的进化关系。结合以上对核苷酸多态性的分析,进一步说明该群体内遗传多样性丰度低。

3 结论与讨论

紫丁香蘑作为珍稀的食药两用真菌,国内外对紫丁香蘑的研究主要集中在菌丝生物学特性^[17]、化学成分^[18]、食药两用价值^[19]、驯化栽培^[20]等方面的研究。分子研究比较缓慢,国内外相关的研究较少,李萌伟等^[21]获得了紫丁香蘑的最佳 ISSR-PCR 反应体系(25 μ L),包括 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶、2.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.2 mmol/L dNTP、0.15 μ mol/L 引物、160 ng 模板 DNA,最佳反应循环数为 37。其研究结果为进一步采用 ISSR 分子标记方法研究紫丁香蘑的遗传多样性提供了研究基础。LEE 等^[22]通过 RAPD 和 ITS 序列分析了紫丁香蘑、肉色香蘑和花脸香蘑的遗传变异。用 RAPD 分析分别计算了 10 株紫丁香蘑的种内遗传差异范围为 0%~21.6%,10 株花脸香蘑种内遗传差异范围为 16.93%~24.82%,10 株肉色香蘑为 20.62%~25.54%,花脸香蘑和肉色香蘑的种间遗传差异为 23.49%;基于 ITS1 和 ITS2 区域测序分析了 6 株紫丁香蘑的种内遗传差异范围为 1.58%~11.47%,紫丁香蘑和花脸香蘑种间遗传差异为 3.83%~12.88%,紫丁香蘑和肉色香蘑 7.11%~15.61%,花脸香蘑和肉色香蘑为 4.79%。研究结果显示,RAPD 和 ITS 测序可以用于开发分子遗传标记和不明香蘑属物种的筛选。

该研究中紫丁香蘑群体内平均遗传距离为 0.003 0,遗传距离变化范围为 0~0.009 7,遗传距离较近。由于采样地点较为集中,群体样本内的遗传多样性丰度也较低,因此该地区紫丁香蘑在采集过程中应关注种质保护问题,切勿过度滥采,否则极易造成资源的枯竭。紫丁香蘑群体间遗传多样性的研究目前尚鲜见报道。因而对紫丁香蘑群体遗传多样性,不同居群间的遗传多样性更深入的研究,对这一珍稀食药两用菌的进一步开发利用,种质资源的保护具有重要意义。

参考文献

- [1] 陈士俞. 食用菌生产大全[M]. 北京:中国农业出版社,1988.
- [2] 谢支锡,王云,王柏,等. 长白山伞菌图志[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1986.
- [3] 陈士瑜,陈惠. 菇菌栽培手册[M]. 北京:科学技术文献出版社,2003.
- [4] YANG S, HAN J Y, JOO E Y, et al. Study on the antitumor effects of extrmcts from *Lepista nuda* mushroom[J]. Journal of the Korean Society of

Food Science and Nutritio,2005,3(34):317-322.

- [5] KIM S D, KIM J H, KIM J B, et al. Mycelial culture conditions of *Lepista nuda* and extracellular enzyme activity[J]. The Korean Journal of Microbiology,2005,3(6):42.
- [6] 史全良,赵卫国. 桑树 ITS 序列测定及特点的初步分析[J]. 蚕业科学,2001,27(2):140-141.
- [7] FRUDAKIS T, VENKATE S K. A classier for the SNP-based inference of ancestry[J]. Journal of Forensic Sciences,2003,48(4):771-782.
- [8] GAO Z X, YAN L, WANG X F, et al. Sodium nitroprusside (SNP) alleviates the oxidative stress induced by $NaHCO_3$ and protects chloroplast from damage in cucumber[J]. African Journal of Biotechnology,2012,11(27):6974-6982.
- [9] 吴发红,黄东益,黄小龙,等. 几种真菌 DNA 提取方法的比较[J]. 中国农学通报,2009,25(8):62-64.
- [10] HALL T A. BioEdit:a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series,1999,41:95-98.
- [11] WANG L, ROOSINCK M J. Comparative analysis of expressed sequences reveals a conserved pattern of optimal codon usage in plants[J]. Plant Molecular Biology,2006,61(4-5):699-710.
- [12] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BRONW N P, et al. Clustal W and clustal X version 2. 0[J]. Bioinformatics,2007,23(21):2947-2948.
- [13] KUMAR S, NEI M, DUDLEY J, et al. MEGA:a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Briefbioinform,2008,9(4):299-306.
- [14] LIBRADA P, ROZAS J. DnaSP v5:A Software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics,2009,25(11):1451-1452.
- [15] PLOTREE D, PIOTGRAM D. Phylip-phylogeny inference package (version 3. 2)[J]. J Felsenstein Cladistics,1989,5(1):164-166.
- [16] LANDEWEERT R, LEEFLANG P, KUYPER T W, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. Appliedand Environmental Microbiology,2003,69(1):327-333.
- [17] 谢富刚,刘雁英,邱慧兰. 紫丁香蘑菌丝体生物学特性研究初报[J]. 现代农业科技,2010(2):72-76.
- [18] 高锦明,董泽军. 紫丁香蘑的化学成分[J]. 中草药,2002,33(5):398-401.
- [19] 周峰,王瑞娟,李玉,等. 珍稀食药两用菌紫丁香蘑的研究进展[J]. 食用菌学报,2010,17(4):79-83.
- [20] 赵婷. 紫丁香蘑菌丝体培养特性及人工驯化栽培研究[D]. 延边:延边大学,2010.
- [21] 李萌伟,李芳菲,樊志宏,等. 紫丁香蘑 ISSR-PCR 反应体系的正交优化与建立[J]. 生物技术,2013,23(6):55-59.
- [22] LEE Y S, KIM N W, KIM J B. Genetic variation based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) and internal transcribed spacer (ITS) region sequences in *Lepista nuda*[J]. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition,2012,22(11):1470-1476.

Analysis of Genetic Diversity of Wild *Lepista nuda* Population From Zhaotong, Yunnan

WEI Hailian, LIU Zhixi, ZHANG Wanjie, HE De, LI Cuixin, MA Jian

(College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650000)

DOI:10.11937/bfyy.201517036

不同处理对祖师麻基源植物黄瑞香种子萌发特性的影响

闫芳¹, 王勤礼¹, 毛著鸿², 张亚娟¹

(1. 河西学院 河西生态与绿洲农业研究院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃泰康制药有限责任公司, 甘肃 武威 733000)

摘要:以黄瑞香种子为试材,通过对黄瑞香种子形态和萌发特性的研究,寻找打破种子休眠、提高种子萌发率的适宜条件。观察种子外部形态,对黄瑞香种子千粒质量、饱满度、含水量、生活力和吸水率等多项指标进行测定,对黄瑞香种子分别进行化学物质处理、低温层积和热水处理,分析不同层积时间、不同质量浓度化学物质、不同萌发介质处理对种子萌发率的影响。结果表明:黄瑞香种子含水量为 7.12%,带外种皮的种子吸水率为 33.4%,去除外种皮的种子吸水率为 60.3%;化学物质处理和热水处理不能完全打破黄瑞香种子休眠;化学物质结合低温层积处理 70 d 种子萌发率为 64.93%;平纸床和皱纸床介质上的发芽率分别为 65.8%和 53.2%。种皮不是限制种子萌发的主要因素,用 200 mg/L GA₃ 和 25 mg/L 6-BA 混合溶液浸种 10 h 后结合 70 d 低温层积处理可显著提高种子萌发率,种子萌发最佳发芽介质为平纸床。

关键词:祖师麻;种皮;吸水率;萌发率

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0136-05

黄瑞香(*Daphne giraldii* Nitsche.)属瑞香科瑞香属灌木,其根皮和茎皮为民间治疗风湿和止痛的常用中药

第一作者简介:闫芳(1980-),女,陕西宝鸡人,硕士,副教授,现主要从事药用植物栽培等研究工作。E-mail:lgod_forever@163.com.

责任作者:王勤礼(1966-),男,甘肃永昌人,硕士,教授,现主要从事蔬菜育种及中草药栽培教学与科研工作。E-mail:wangqinli66@163.com.

基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(1308RJZG156);河西学院 2013 年度河西学院科研创新与应用校长基金资助项目。

收稿日期:2015-05-25

祖师麻。经科学验证与临床试验,其味辛、苦,性温,具有止痛散瘀、风湿痹痛之功效,主用于治疗抗肿瘤活性、抗溶血活性、牙痛、跌打损伤、风湿关节痛、肝区痛等诸多痛症^[1-2]。黄瑞香主要分布在甘肃、陕西、青海、宁夏、四川等海拔 2 000 m 的山坡灌丛、林缘、沟谷地带^[3]。黄瑞香的野生资源较少,人工栽培技术尚未成熟。目前对黄瑞香的研究多集中在其茎皮的化学成分和活性成分^[4-7]等方面研究,但有关黄瑞香生物学特性及萌发条件的研究和报道极少。黄瑞香种子的外种皮木质化,种皮的透水性和透气性较差,故其种子休眠时间长、发芽率低,很难满足大面积人工栽培种苗的需求。该试验以

Abstract: *Lepista nuda* from Zhaotong, Yunnan Province was used as the research object, its ITS sequence and single nucleotide polymorphism (SNP) were analyzed. The results showed that: combined with morphological and molecular identification, the collected wild mushrooms were confirmed as *Lepista nuda*; 66 strains *L. nuda*'s ITS sequence length was 666—671 bp, ITS1: 241—244 bp, 5.8S: 155 bp, ITS2: 267—275 bp; G+C content was 41.5%—42.4%; the average genetic distance of all samples was 0.003 0. By sequence alignment, seven SNPs loci were screened out; three singleton variable sites, four parsimony informative sites; transition and transversion ratio was 0.672. The nucleic acid polymorphisms index *Pi* of the population was 0.002 91. Each site nucleotide polymorphisms index *Eta* was 0.002 36. Neighbor (neighbour-joining, NJ) phylogenetic tree was constructed. Bootstrap support rate was low, which indicated that genetic distance of each strain in the population was very close and their genetic diversity was very low. In summary, the genetic diversity of the wild *Lepista nuda* population from Zhaotong was very low so that its protection should be strengthened.

Keywords: *Lepista nuda*; internal transcribed spacers (ITS); single nucleotide polymorphism (SNPs); genetic diversity