

# 利用 ISSR 分子标记鉴别杏鲍菇生产菌株的研究

陆娜, 周祖法, 王伟科, 宋吉玲, 袁卫东, 闫静

(杭州市农业科学研究院 菌种站, 浙江 杭州 310024)

**摘要:**以 15 个杏鲍菇生产菌株为试材, 采用 ISSR 分子标记鉴别方法, 从 52 个 ISSR 通用引物中筛选出 32 个 ISSR 引物对其 DNA 进行 PCR 扩增, 分析其 DNA 序列多态性; 同时, 比较研究了各菌株的菌丝长势及产量情况。结果表明: 菌丝生长速度和产量没有表现出各类群的特点, 杏鲍菇的菌丝生长速度和产量比较易受环境条件和基因显隐性的影响; 参试菌株遗传相似系数变异范围为 0.64~0.98, 采用 UPGMA 分析表明, 在 0.87 处 15 个杏鲍菇菌株可分为 5 类。

**关键词:**杏鲍菇; ISSR; 菌丝生长速度; 产量

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>41 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0150-03

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii* Quel)又名刺芹侧耳, 是近年来开发栽培成功的集食用、药用、食疗于一体的珍稀食用菌新品种。杏鲍菇营养丰富, 富含蛋白质、碳水化合物、维生素及钙、镁、铜、锌等矿物质, 可以提高人体免疫功能, 对人体具有抗癌、降血脂、润肠胃以及美容等作用<sup>[1]</sup>。国内杏鲍菇的发展很快, 但各地种植杏鲍菇过程中经常出现品种混杂, 由于品系不清菇农不敢大面积栽培, 每年都需要反复的引种试种, 因而经常耽误生产季节。为了更加准确的提供亲本材料的遗传信息, 提高育种针对性, 达到高产、优质的目的<sup>[2]</sup>, 需要对不同来源的杏鲍菇菌株进行品种比较试验。ISSR 分子标记技术可以辅助提供有效的基因组信息, 已经广泛的应用于食用菌遗传多样性研究, 该研究将 ISSR 分子标记结合杏鲍菇栽培特性进行分析, 旨在为杏鲍菇菌种分类及栽培用种选择提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

根据杏鲍菇菌株种类和特点, 从国内有代表性的科研单位和基地引进 15 个杏鲍菇菌株, 详见表 1。

母种培养基为马铃薯综合培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蛋白胨 5 g、酵母膏 1 g、水 1 000 mL、pH 5.5。原种培养基: 棉子壳 78%、麸皮 20%、石灰

1%、石膏 1%。栽培料配方: 桑枝 17%、木屑 20%、棉子壳 37%、麸皮 24%、糖 1%、轻质 CaCO<sub>3</sub> 1%、含水量 65%。

供试药剂: 2×Power Taq PCR MasterMix、新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒、ISSR 通用引物购自北京百泰克生物技术有限公司。

表 1 供试杏鲍菇菌株

Table 1 The tested varieties of *Pleurotus eryngii* Quel

编号 No.	原名 Name	来源 Source
P1	杏鲍菇	上海市农业科学院食用菌研究所
P2	杏鲍菇 9 号	华中农业大学菌种实验中心
P3	杏鲍菇 5 号	华中农业大学菌种实验中心
P4	杏鲍菇	浙江磐安
P5	杏鲍菇 1 号	江苏高邮食用菌研究所
P6	杏鲍菇 2 号	江苏高邮食用菌研究所
P7	杏鲍菇 3 号	江苏高邮食用菌研究所
P8	杏鲍菇 AA	江苏高邮食用菌研究所
P9	杏鲍菇	广东微生物研究所
P10	杏鲍菇 01	武安何氏食用菌产业中心
P11	杏鲍菇 02	武安何氏食用菌产业中心
P12	杏鲍菇	四川食用菌菌种场
P13	杏鲍菇	湖南省微生物研究所
P14	杏鲍菇 01	湖南省微生物研究所
P15	杏鲍菇	淳安工厂化生产企业

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌丝长势试验及栽培方法 每个杏鲍菇菌株接种 5 个 750 mL 的玻璃瓶, 培养基配方为原种培养基配方, 当菌丝铺满整个瓶面时开始测量, 并定期进行记录<sup>[3]</sup>; 出菇试验是在钢架大棚内按照桑枝杏鲍菇栽培方法生产管理出菇, 采用杏鲍菇棒式栽培, 每袋干料为 0.5 kg, 每个配方 100 棒。记录各菌株的菌丝长势、生长速度、统计前 2 潮菇产量。

1.2.2 总 DNA 的制备及检测 采用新型快速植物基

**第一作者简介:**陆娜(1983-), 女, 本科, 农艺师, 研究方向为食用菌栽培。E-mail: lulu\_838700@163.com.

**责任作者:**周祖法(1969-), 男, 本科, 高级农艺师, 研究方向为食用菌育种与栽培。E-mail: fage@hz.cn.

**基金项目:**国家食用菌产业技术体系资助项目(CARS-24); 杭州市科技发展专项资金资助项目(20140432B11)。

**收稿日期:**2015-07-24

因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取,提取后检测其浓度并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测质量,然后 DNA 统一稀释至 20 ng/ $\mu$ L 备用。

1.2.3 PCR 反应及电泳 PCR 扩增反应体系(20  $\mu$ L):模板 3  $\mu$ L(20 ng/ $\mu$ L),引物 3  $\mu$ L(PCR 通用引物),2 $\times$  Power Taq PCR Master Mix 10  $\mu$ L,无菌双蒸水 4  $\mu$ L,按上述比例将反应液加入 0.2 mL 离心管中,混匀,进行 PCR 扩增。反应程序 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 数据分析

将 ISSR 图谱用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行照相,有 ISSR 带谱统计为 1,无 ISSR 带谱统计为 0,构建初始数据矩阵,用 NTSYSpc 2.1 软件计算遗传相关系数,采用平均连锁法 UPGMA 进行聚类分析,得出聚类图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 杏鲍菇不同菌株菌丝长势及出菇比较

根据杏鲍菇菌种的生物学特性,接种后,当菌丝铺满整个瓶面时开始测量。根据观察,各杏鲍菇菌株菌丝生长良好,生长均匀整齐,菌丝洁白。表 2 表明,杏鲍菇 P5 和 P12 菌丝生长速度最快为 0.50 cm/d,其次为杏鲍菇 P15、P9,生长较慢的菌株是杏鲍菇 P13,其菌丝生长速度为 0.40 cm/d,长势较弱。各菌株间前 2 潮菇产量有着明显的差别。其中产量最高的菌株是杏鲍菇 P14,产量达到 26.21 kg,其次为杏鲍菇 P15、P12 和 P3,产量较低的是杏鲍菇 P13 和 P6。

表 2 杏鲍菇不同菌株菌丝长势及子实体产量

Table 2 Growth and yield of different varieties

菌株 Test sample	菌丝长势 Growth	菌丝生长速度 Growth rate /(cm $\cdot$ d $^{-1}$ )	第一潮产量 First tide output /(kg $\cdot$ 袋 $^{-1}$ )	第二潮产量 Second tide output /(kg $\cdot$ 袋 $^{-1}$ )	合计产量 Total output /(kg $\cdot$ 袋 $^{-1}$ )
P1	++	0.43	6.22	10.44	16.66
P2	+++	0.46	10.04	8.54	18.58
P3	++++	0.48	10.51	11.66	22.17
P4	+	0.43	6.23	9.92	16.15
P5	++++	0.50	7.9	8.47	16.37
P6	+++	0.46	6.97	4.70	11.67
P7	++	0.45	7.87	10.12	17.99
P8	+++	0.47	5.62	6.54	12.16
P9	++++	0.49	5.8	9.36	15.16
P10	+++	0.44	8.82	5.82	14.64
P11	+++	0.49	8.38	12.69	21.07
P12	++++	0.50	8.43	16.46	24.89
P13	+	0.40	6.38	5.34	11.72
P14	++++	0.47	8.06	18.15	26.21
P15	++++	0.49	7.56	17.55	25.11

### 2.2 杏鲍菇 ISSR 标记分析

对 52 条 ISSR 引物进行筛选,其中有 32 条引物能扩增出条带清晰具多态性的带谱,共计扩增出 235 条清晰的多态性条带,每个引物扩增的 DNA 片段条带的数目在 6~10 条,平均 7.3 条(图 1)。

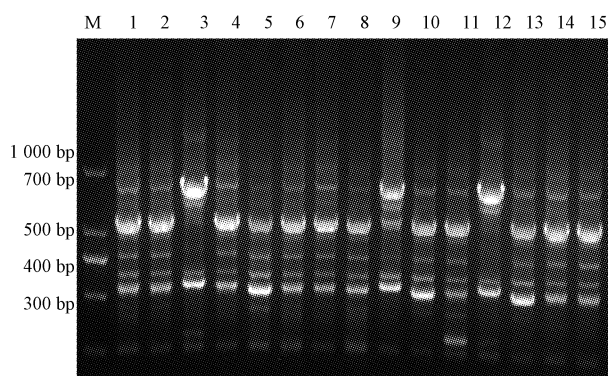


图 1 引物 891 的 PCR 扩增图谱

Fig. 1 PCR amplification of primer 891

### 2.3 DNA 扩增图谱聚类分析

从图 2 的 ISSR 聚类图可以看出,15 个杏鲍菇菌株在 0.64 时聚在一起,0.87 时分为 5 个群。其中菌株 P1、P2、P4、P7、P14、P15、P6、P8 号菌株聚为 1 组;P5、P10、P13 聚为一组;P3、P12 聚为一组;P11 和 P9 各为单独的一组。15 个杏鲍菇菌株中,P4 和 P7 亲缘关系最近,遗传相似系数达到了 0.98,很可能是一个品种;参试菌株遗传相似系数变异范围为 0.64~0.98,表明杏鲍菇遗传差异较大,背景丰富。

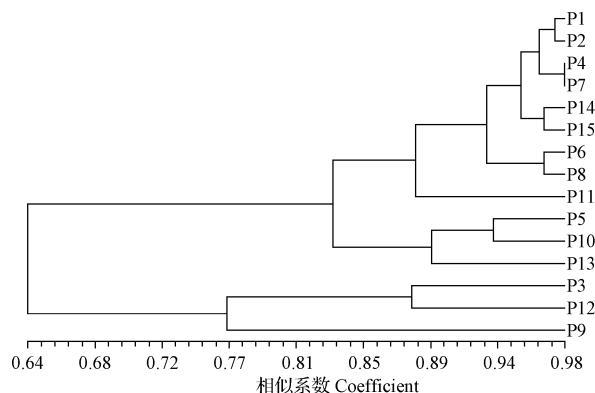


图 2 杏鲍菇菌株基于 ISSR 分析的 UPGMA 聚类树状图

Fig. 2 The UPGMA clustering tree of *Pleurotus eryngii* Quel

## 3 讨论

该试验利用 ISSR 引物对杏鲍菇生产用菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增,发现利用 ISSR 分子标记技术能够将杏鲍菇菌株区分开,并将 15 个杏鲍菇菌株聚为 5 个群;参试杏鲍菇菌株聚类的结果在整体上没有体现出与来源地理位置吻合的规律,这也反映出目前杏鲍菇生产用种反复的引种试种现象较为混乱。但是从菌丝生长速度和产量却没有表现出各类群的特点,即使从聚类分析中相似系数极为相似的菌株在生长速度和产量上也存在着差异,说明杏鲍菇的菌丝生长速度和产量比较易受环境条件和基因显隐性的影响。

DOI:10.11937/bfyy.201521039

# 一株野生灰树花菌丝体液体培养基正交方法筛选

刘 西 周

(天津师范大学 蕈菌研究所,天津市动植物抗性重点实验室,天津 300387)

**摘 要:**以 1 株野生灰树花菌株为试材,采用正交实验设计法,研究了不同液体培养基对其菌丝体生物量的影响。结果表明:其最适配方为蔗糖 25 g/L、玉米粉 25 g/L(浸提液)、麦麸 20 g/L(浸提液)、酵母粉 2 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g/L、维生素  $\text{B}_1$  0.030 g/L、pH 自然,24℃ 培养静置培养 10 d,其菌丝生物量为 10.41 g/L。

**关键词:**灰树花;液体培养基;正交设计;生物量

**中图分类号:**S 646.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0152-03

灰树花(*Grifola frondosa*)属担子菌纲多孔菌目多孔菌科,又名贝叶多孔菌,多生长在海拔 800~1 400 m 的阔叶林下或栗树周围,喜温暖和潮湿环境。子实体呈莲花形,有柄,分枝,高 9~18 cm,宽 2~8 cm,幼嫩时呈灰白色,成熟后为灰白色或灰褐色,菌盖扇形,肉质,边缘薄而稍内卷,表面有细毛,老后光滑呈放射状条纹,菌孔面白色至淡黄色,管口多角形。孢子无色透明,表面光滑,卵圆形,具有较高的食药价值<sup>[1-2]</sup>。研究发现其具有抗肿瘤、抗 HIV 病毒作用、免疫调节作用、治疗肝炎

作用、抗辐射,调节血脂,降血压,降血糖,改善脂肪代谢等功能<sup>[3-5]</sup>。该试验以天津蓟县地区野生灰树花为试验材料,进行液体培养基筛选研究,以探索其适宜的生长条件,为天津地区野生灰树花种质资源研究、开发、利用提供有益支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株分离于天津蓟县,菌种保藏于天津师范大学蕈菌研究所。

PDA 综合培养基(M/V)<sup>[6]</sup>:马铃薯 200 g/L(浸提液),棉籽皮 200 g/L(浸提液),琼脂 18 g/L,葡萄糖 20 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g/L,维生素

**作者简介:**刘西周(1984-),男,硕士,助理实验师,研究方向为蕈菌设施化培植与植物组织培养。E-mail:fusant@126.com.

**收稿日期:**2015-07-27

## 参考文献

- [1] 陈土瑜. 食用菌生产大全[M]. 北京:中国农业出版社,1988.  
[2] 冯伟林,蔡为明,金群力,等. 秀珍菇菌株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.

- [3] 黄志龙,肖淑霞,上官舟建. 杏鲍菇优良菌株筛选及配套标准化栽培技术[J]. 食用菌,2008(2):25-27.

## Study on Identification of Produce *Pleurotus eryngii* Quel by ISSR Molecular Marker

LU Na,ZHOU Zufa,WANG Weike,SONG Jiling,YUAN Weidong,YAN Jing

(Bacteria Station, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310024)

**Abstract:** With 15 *Pleurotus eryngii* Quel varieties as test materials, using ISSR molecular marker identification method, 32 ISSR primers were screened from 52 ISSR primers and the DNA was amplified by PCR, the DNA sequence polymorphism was analyzed; at the same time, the varieties of mycelial growth and yield were compared. The results showed that mycelial growth rate and yield did not exhibit the characteristics of each group, the effect of mycelial growth rate and yield were more susceptible to environmental conditions and dominant or recessive gene; reference strains of genetic similarity coefficient of variation ranged 0.64—0.98. Using the UPGMA analysis showed that, in 0.87 at 15 *Pleurotus eryngii* Quel varieties were divided into five types.

**Keywords:** *Pleurotus eryngii* Quel; ISSR; mycelial growth rate; yield