

# 广西野生灵芝菌株的遗传多样性分析

陈雪凤, 韦仕岩, 吴圣进, 王灿琴, 吴小健

(广西农业科学院 微生物研究所, 广西 南宁 530007)

**摘要:**以 10 个广西野生灵芝菌株为试材,采用酯酶同工酶分析和拮抗试验的方法,研究供试菌株的遗传多样性。结果表明:广西野生灵芝具有丰富的遗传多样性。试验共检测到 22 条谱带,10 个菌株间的谱带均有差异。各菌株间的遗传相似系数在 0.36~0.95;在相似系数为 0.55 时,10 个菌株可以分为 3 类,即菌株 C3(红芝)为一类,菌株 C9(白芝)为一类,C1、C2、C4、C5、C6、C7、C8、C10(黑芝)为一类;在相似系数为 0.64 时,黑芝类又可分为 2 类,即 C1、C2、C4、C8、C10 为一类,C5、C6、C7 为一类。菌株 C4 与 C10、C5 与 C7 间的遗传相似系数大于 0.90,亲缘关系很近,且这 2 对菌株间无拮抗,说明菌株 C4 与 C10 为同一菌株,C5 与 C7 也为同一菌株。

**关键词:**野生灵芝;酯酶同工酶;遗传多样性

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)07-0136-04

广西地处亚热带地区,野生灵芝资源独特而丰富,目前发现灵芝约 20 种,其种类占全国灵芝总数的 30%<sup>[1]</sup>。为了更好的开发利用广西本土的野生灵芝资源,选育出广西本地的优良灵芝品种,发展广西灵芝产业,近年来,广西农业科学院微生物研究所研究人员在田林、靖西、融水等地进行了灵芝野生资源的收集,并进行了驯化栽培试验。由于灵芝生长形态不仅受遗传因素的影响,还受地理环境、栽培条件、气候因素的影响,同一灵芝品种在不同的栽培条件下也会表现出不同的形态特征。因此仅通过栽培试验表现出的农艺性状进行菌株间的遗传差异分析其稳定性差,很难做出明确的分类。

**第一作者简介:**陈雪凤(1976-),女,本科,高级农艺师,现主要从事食用菌育种及推广等工作。E-mail:xuefeng767@126.com。

**责任作者:**韦仕岩(1965-),男,硕士,研究员,现主要从事食用菌育种等研究工作。

**基金项目:**广西农业科学院基本科研业务专项资助项目(2015YT77, 2015JZ60);国家现代农业产业技术体系广西食用菌创新团队专项资金资助项目。

**收稿日期:**2015-12-14

拮抗试验和酯酶同工酶技术是室内鉴定品种遗传多样性的一种有效方法。近年来也有不少国内学者对灵芝的遗传多样性进行了研究<sup>[2-3]</sup>,但对于广西野生灵芝品种的遗传多样性研究鲜见报道。该研究对 10 个广西野生灵芝菌株的酯酶同工酶酶谱和拮抗反应进行了分析,研究鉴定它们各自间的亲缘关系,旨在为广西野生灵芝资源的保护和优良菌株选育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试 10 个灵芝菌株均由广西农业科学院微生物研究所从广西各地采集分离所得野生灵芝菌株,具体见表 1。

表 1 供试灵芝菌株

Table 1 Strains of wild <i>Ganoderma</i> spp.			
菌株编号	菌株名称及来源	菌株编号	菌株名称及来源
Strain No.	Strain name and origin source	Strain No.	Strain name and origin source
C1	“黑灵芝”(南丹)	C6	“黑灵芝”(大明山)
C2	“黑灵芝”(融水)	C7	“黑灵芝”(大王滩)
C3	“红灵芝-1”(大王滩)	C8	“黑灵芝 1”(田林)
C4	“龙州黑灵芝”(龙州)	C9	“白灵芝”(融水)
C5	“黑灵芝”(靖西)	C10	“黑灵芝 2”(百色田林)

**Abstract:** With the expanding of mushroom industry in China, the demand of cultivation materials move in a uptrend. Traditional materials, like sawdust and cottonseed hull, can't support the sustainable development of this industry. *Pennisetum* sp., a new variety with large biomass introducing from Lesotho, could be used as raw material of edible mushrooms cultivation. The technical measures of cultivating *Pleurotus ostreatus* by *Pennisetum* sp. was introduced, so as to provide a kind of new material for *Pleurotus ostreatus* cultivation, and promote the sustainable development of *Pleurotus ostreatus* industry.

**Keywords:** *Pennisetum* sp.; *Pleurotus ostreatus*; cultivation; key technology

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗试验 制备 PDA 平板,用接种铲移取培养 7 d 的供试灵芝菌株菌落边缘 0.5 mm<sup>2</sup> 的菌丝块接到 PDA 培养基上,每个平板按品字形分别接 3 个菌株,要求 10 个菌株之间进行一对一拮抗试验。接种后的平皿放置于 28℃ 的培养箱中培养,培养皿用封口胶封口,防止培养基水分损失,培养 10 d 左右观察 10 个菌株之间的拮抗反应<sup>[4]</sup>。

1.2.2 菌株的培养和样品的制备 菌株的培养和样品的制备参考韦仕岩等<sup>[5]</sup>的方法,将活化好的灵芝菌株菌丝接到固体料培养基中,28℃ 下培养 30 d 左右,至菌丝长满试管为止。称取菌丝固体培养物 5 g,加 5 g 石英砂,7~8 mL 样品提取液(6.02 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 0.5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O,溶于 100 mL 水,pH 7.5)冰浴研磨。研磨后将样品收集于离心管中,4℃,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液(可保存于-18℃)。将上清液、40%蔗糖溶液、0.1%溴酚蓝溶液按(V:V:V)8:3:1 的比例混合,混合液即为电泳样品。

1.2.3 电泳条件 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法,分离胶(pH 8.9)和浓缩胶(pH 7.0)浓度分别为 7%和 2.5%;每槽进样量 20 μL,电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Gly 系统;浓缩胶阶段电泳电流 10 mA,进入分离

胶后电流升至 15 mA,恒流约 3 h,当溴酚蓝指示剂距离胶底端处时停止电泳。

1.2.4 染色 采用坚牢蓝染色法:以 0.01%乙酸-1-奈酯、乙酸-2-萘酯为底物,坚固蓝为染色剂,并加入磷酸缓冲液(pH 6.4),染色到酶带清晰为止。染色好的凝胶取出用蒸馏水漂洗,观察染色酶带,并及时拍照后进行数据分析。

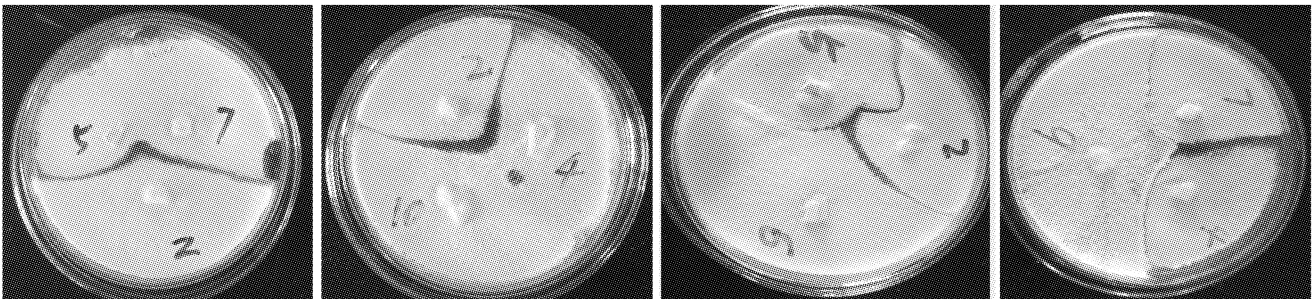
1.3 数据分析

测量和计算样品的 Rf 值,在同一 Rf 值处,有谱带的条带记为 1,无带的记为 0,获得电泳数据。用 NTSYS-PC 软件对所获得的电泳数据进行材料间遗传相似系数分析计算,并进行野生灵芝菌株的遗传相似性聚类分析,构建系统树。

2 结果与分析

2.1 拮抗试验结果

10 个菌株菌丝两两对抗生长的结果表明(表 2),除菌株 C4 与 C10 和菌株 C5 与 C7 之间没有拮抗反应外,其余菌株对之间均有拮抗现象,说明 C4 与 C10 可归为同一菌株,C5 与 C7 为同一菌株。不同灵芝菌株对间,拮抗反应类型存在差异(图 1),表现为隔离沟型(C5 与 C2)、隔离带型(C7 与 C9)和隆起型(C6 与 C5)3 种不同类型;菌株间的拮抗反应强度也不同(表 2),菌株 C1 与



注:图中 2、4、5、6、7、9、10 分别代表菌株 C2、C4、C5、C6、C7、C9、C10。

Note: The number 2,4,5,6,7,9 and 10 in the figure represent the strains C2,C4,C5,C6,C7,C9 and C10, respectively.

图 1 部分菌株的拮抗结果

Fig. 1 Antagonistic activity test of several strains

表 2

不同灵芝菌株间的拮抗关系

Table 2

Antagonism between the strains of wild *Ganoderma* spp.

序号	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
C1	—									
C2	++	—								
C3	+++	++	—							
C4	+	++	++	—						
C5	++	++	+++	++	—					
C6	++	++	+++	+++	+	—				
C7	++	+++	+++	+++	—	+	—			
C8	++	++	++	++	+	++	+	—		
C9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	
C10	+	++	+++	—	+++	+++	+++	+++	+++	—

注:+++表示拮抗显著;++表示有拮抗;+表示有拮抗,但拮抗弱;—表示无拮抗作用。

Note:+++ showed significant antagonistic activity; ++ showed middle level antagonistic activity; + showed feeble antagonistic activity; — showed no antagonistic activity.

C10、C4 间拮抗较弱, C5 (C7) 与 C6、C8 间拮抗较弱, 说明 C1、C10、C4 亲缘性比较接近, C5 (C7)、C6、C8 亲缘性比较接近; C9 与所有菌株都有很强的拮抗, 说明 C9 与其它菌株间亲缘性关系较远; C3 与 C1、C5、C6、C7、C9、C10 有很强拮抗, 与 C4、C8、C2 有较强的拮抗, 说明 C3 与其它菌株间的亲缘性关系也较远。

## 2.2 灵芝菌株的酯酶同工酶谱

由图 2 可知, 广西野生灵芝菌株的酯酶同工酶谱具有较高的多态性, 其中 C3、C9 明显与其它菌株的带谱不同。

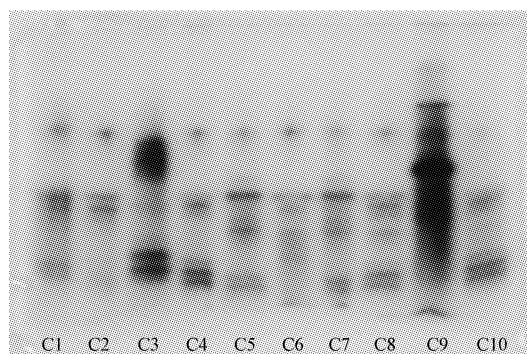


图 2 10 个野生灵芝菌株的酯酶同工酶谱

Fig. 2 Esterase isozyme zymogram of ten wild *Ganoderma* spp. strains

根据酶谱进行测量并计算  $R_f$  值分布率(表 3), 10 个菌株共检测出 22 条谱带, 各菌株的谱带在 6~8 条。谱带的迁移率在 15.89%~92.37%, 分布率在 10%~70%, 其中酶带分布率在 60% 以上只有带 4、带 10、带 11、带 15、带 19, 由此可见菌株间的多态性强。

## 2.3 灵芝菌株的相似系数及聚类分析

利用 NTSYS-PC 软件对 10 个野生灵芝菌株的酯酶同工酶谱数据进行聚类分析, 结果见表 4、图 3。从聚类图上可以看出, 10 个菌株在相似系数为 0.55 时可以分为 3 类, 即 C3 红芝为一类, C9 白芝为一类, C1、C2、C4、C5、C6、C7、C8、C10 黑芝为一类; 当相似系数为 0.64 时, 黑芝类又分为 2 类, 即 C1、C2、C4、C8、C10 为一类, C5、C6、C7 为一类。菌株 C4 与 C10 相似系数为 0.91, C5 与 C7 相似系数为 0.95, 说明亲缘性比较近。C3 与其它菌株间相似系数在 0.36~0.64, C9 与其它菌株间的相似系数在 0.36~0.59, 说明亲缘性比较远。

## 3 讨论

通过拮抗试验和酯酶同工酶技术对 10 个广西野生灵芝菌株进行了遗传多样性分析。广西野生灵芝菌株间的拮抗反应表现有 3 种类型, 拮抗反应强度也不一致, 表明了菌株间的遗传多样性。酯酶同工酶分析结果也表明, 广西野生灵芝各菌株间的酯酶同工酶谱均存

表 3 10 个野生灵芝菌株的酯酶同工酶带分布与迁移率

Table 3 Distribution of esterase isozyme bands and their relative  $R_f$  of the ten wild *Ganoderma* spp. strains

谱带号 Band No.	泳道号 Lane No.										迁移率 Rf /%	分布率 Distribution frequency/%
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	15.89	10.00
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	29.58	10.00
3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	33.36	20.00
4	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	38.71	70.00
5	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	40.75	20.00
6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	43.33	10.00
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	47.70	10.00
8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	52.19	10.00
9	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	54.79	20.00
10	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	58.64	60.00
11	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	61.34	60.00
12	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	62.66	40.00
13	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	64.50	30.00
14	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	66.37	40.00
15	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	68.86	70.00
16	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	73.53	40.00
17	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	76.90	20.00
18	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	80.13	30.00
19	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	84.08	60.00
20	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	87.21	40.00
21	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	90.41	40.00
22	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	92.37	20.00
总带数 Total band	7	7	6	8	7	6	8	8	8	8		

表 4 10 个野生灵芝菌株的遗传相似系数矩阵

Table 4 Similarity coefficient matrix for the ten wild *Ganoderma* spp. strains

菌株编号 Strain	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
C1	1.00									
C2	0.64	1.00								
C3	0.50	0.50	1.00							
C4	0.77	0.68	0.45	1.00						
C5	0.55	0.55	0.41	0.68	1.00					
C6	0.59	0.59	0.64	0.64	0.68	1.00				
C7	0.50	0.59	0.36	0.64	0.95	0.73	1.00			
C8	0.50	0.77	0.55	0.73	0.59	0.73	0.64	1.00		
C9	0.59	0.59	0.55	0.45	0.41	0.36	0.36	0.45	1.00	
C10	0.86	0.77	0.45	0.91	0.59	0.63	0.54	0.64	0.45	1.00

在差异, 具有较高的多态性; 菌株间的相似系数在 0.36~0.95, 各菌株间的亲缘关系有较远的, 也有较近的。在相似系数为 0.55 时, 可有效将白芝、红芝和黑芝 3 类表型明显不同的灵芝区分开; 酯酶同工酶结果与拮抗反应结果基本一致, 遗传相似系数高于 0.90 的菌株对 C4 与 C10 和 C5 与 C7 间, 同时表现为无拮抗反应, 可归并为 2



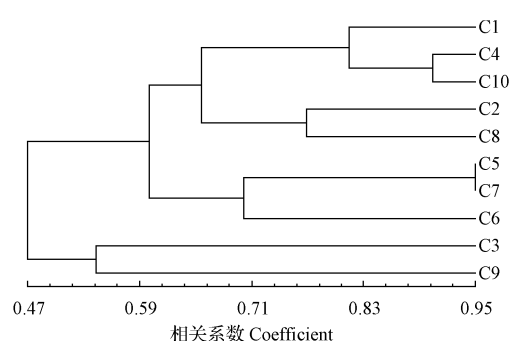


图3 10个野生灵芝菌株同工酶聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of the ten wild *Ganoderma* spp. strains based on esterase isozyme analysis

个菌株;红芝菌株 C3 和白芝菌株 C9 与其它菌株间的遗传相似系数较低,拮抗反应也较强。上述结果表明酯酶同工酶技术和拮抗试验方法相结合,可有效区分不同的灵芝菌株,而且同工酶能更细的区分亲缘性近的菌株。因此,采用拮抗试验和酯酶同工酶技术联合进行野生灵芝亲缘性鉴定更客观、准确,为野生品种的选育提供有效的遗传学依据。

广西野生灵芝资源丰富,但该次收集试验的菌株 10 个,其中红灵芝和白灵芝只有 1 个,样品数偏少,不能更全面反映广西野生灵芝的多样性。在研究过程中发现,菌丝培养时间的长短会影响酯酶同工酶带谱多少,即培

养时间长带谱多,培养时间短带谱少,从而对鉴定稳定性有一定的影响。近年来,分子标记技术在食用菌分类和遗传育种上开始应用,如潘丽晶等<sup>[4]</sup> 荧光 AFLP 和拮抗试验对灵芝菌遗传多样性研究、顾敏等<sup>[6]</sup> 双孢蘑菇 SSR 分子标记开发及其在遗传多样性分析中的应用、王华等<sup>[7]</sup> 5 种食用菌遗传多样性的 RAPD 分子标记。DNA 分子标记技术具有稳定遗传、可靠性强、标记位点多、多态性高等优点。为此,在下一步的研究工作中,应继续收集更多的野生灵芝菌株,同时结合分子技术进行遗传多样鉴定。

### 参考文献

- [1] 陈振妮,陈丽新,黄卓忠,等. 广西灵芝产业现状及发展建议[J]. 食用菌, 2015(1): 4-6.
- [2] 贾定洪,郑林用,张小平,等. 灵芝属 38 个菌株的酯酶同工酶研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(3): 502-505.
- [3] 唐传红,张劲松,陈明杰,等. 灵芝属菌株遗传多样性的初步研究[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 133-136.
- [4] 潘丽晶,沈汉国,陈继敏,等. 荧光 AFLP 和拮抗实验对灵芝菌遗传多样性研究[J]. 中国食用菌, 2013, 32(6): 38-42.
- [5] 韦仕岩,王灿琴,覃小娟,等. 金福菇菌株的酯酶同工酶分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(5): 1025-1030.
- [6] 顾敏,沈颖越,金群力,等. 双孢蘑菇 SSR 分子标记开发及其在遗传多样性分析中的应用[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(5): 987-993.
- [7] 王华,李渊,郭尚,等. 5 种食用菌遗传多样性的 RAPD 分子标记[J]. 山西农业科学, 2015, 43(5): 516-517, 547.

## Genetic Diversity Analysis of Wild *Ganoderma* Strains Collected From Guangxi

CHEN Xuefeng, WEI Shiyun, WU Shengjin, WANG Canqin, WU Xiaojian

(Institute of Microbiology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

**Abstract:** Genetic diversity of ten wild *Ganoderma* strains collected from Guangxi was analyzed by using the technique of esterase isozyme analysis and antagonistic experiment. The results showed that there were rich genetic polymorphisms within the wild *Ganoderma* in Guangxi. 22 bands were determined in the trail, and the bands among the strains were different. Cluster analysis demonstrated that the similarity coefficients ranged from 0.36 to 0.95 among the ten strains and were divided into 3 groups at the similarity coefficient of 0.55, which was *Ganoderma lingzhi* (strain C3), *Ganoderma lucidum* (strain C9) and *Ganoderma atrum* (strains C1, C2, C4, C5, C6, C7, C8, C10). The group of *G. atrum* could be divided into 2 subgroups (subgroup A included strains C1, C2, C4, C8 and C10, subgroup B included strains C5, C6 and C7) at the similarity coefficient of 0.64. Strains C4 and C10, as well as strains C5 and C7 could be considered as different isolates in the same strain, as they had high similarity coefficients above of 0.90 and without antagonistic activity between both strains.

**Keywords:** wide *Ganoderma* spp.; esterase isozyme; genetic diversity