

郑素月,郑伟,邢志伟,等.冀中南地区 16 个平菇栽培菌株的 ISSR 分析[J].江苏农业科学,2015,43(11):73-75.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.021

冀中南地区 16 个平菇栽培菌株的 ISSR 分析

郑素月,郑伟,邢志伟,卢月霞

(河北工程大学农学院,河北邯郸 056038)

摘要:应用 ISSR 分子标记技术对 16 个平菇栽培菌株进行遗传多样性研究。从 16 个 ISSR 引物中筛选出 8 个引物,扩增到 78 个多态性位点,其大小分布在 200~3 000 bp 之间。聚类分析结果表明,16 个平菇菌株在遗传相似系数为 0.75 处可分为 6 个组群:第 1 组包括以 89 为代表的 5 个菌株;第 2 组包括白平菇菌株;第 3 组包括以冀农 11 为代表的 4 个菌株;第 4 组包括 558 菌株;第 5 组包括以 99 为代表的 3 个菌株;第 6 组包括以夏抗 8 为代表的 2 个高温菌株。

关键词:平菇;ISSR;遗传多样性;聚类分析

中图分类号: S646.1⁺40.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0073-03

平菇营养丰富,味道鲜美,具有较高的营养价值和保健功能,是人们喜爱的食用菌之一。平菇抗逆性强、适应性好、产量高、易栽培,是我国栽培规模最大、产量最高的一种食用菌。目前,生产上平菇菌种混杂、种源不清、同物异名严重,严重制约平菇产业的发展。随着科学技术的迅猛发展,许多生化和分子生物学手段已在食用菌种质资源研究中得到了广泛应用。微卫星间区分子标记技术具有多态性丰富、稳定可靠、试验重复性好等优点,在食用菌种质鉴定方面得到了广泛的应

用。张金霞等利用 ISSR 技术对侧耳属菌株进行研究^[1-2];李辉平等利用 ISSR 技术研究木耳菌株的遗传多样性^[3-4];李莹等研究杏鲍菇的 ISSR 标记多态性^[5];秦莲花等用 ISSR 鉴别香菇生产用种^[6-7]。本试验采用 ISSR 分子标记技术,对河北省冀中南地区 16 个平菇生产菌株进行鉴别及遗传多样性分析,可为解决平菇品种混乱、对平菇进行资源利用和品种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及来源

供试平菇菌株共 16 个,分别收集于河北省冀中南地区,由笔者所在实验室保存。菌株编号、名称见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 PDA 培养基平板上铺玻璃纸隔膜培养菌

收稿日期:2015-04-07

基金项目:河北省现代农业产业技术体系食用菌产业创新团队建设专项;河北省科技支撑计划(编号:15226404D)。

作者简介:郑素月(1969—),女,河北石家庄人,博士,教授,主要从事食用菌新品种选育与菌种生产技术方面的研究。E-mail:zhengsuyue@sina.com。

参考文献:

- [1] Goh C J. Production of flowering orchid seedlings and plantlets[J]. Malayan Orchid Rev, 1996, 30: 27-29.
- [2] 张孟锦,陈文贞,杨志娟,等.春石斛生物学特性及栽培技术研究进展[J].中国农学通报,2011,27(6):35-39.
- [3] 陈肖英,徐明全,郑平,等.兰花试管开花研究进展[J].华南热带农业大学学报,2006,12(4):27-31.
- [4] 刘义存,周俊辉,白志川.试管开花的研究评述[J].西南园艺,2006,34(5):20-22.
- [5] 王光远,许智宏,蔡德发,等.铁皮石斛的离体开花[J].中国科学 C 辑:生命科学,1997,27(3):229-234.
- [6] Hossain M M, Sharma M, Pathak P. *In vitro* propagation of *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae) - seed germination to flowering[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2013, 22(2): 157-167.
- [7] Lee P L, Chen J T. Plant regeneration via callus culture and subsequent *in vitro* flowering of *Dendrobium huoshanense* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(10): 2619-2625.
- [8] Deb C R, Sungkumlong. Rapid multiplication and induction of early *in vitro* flowering in *Dendrobium primulinum* Lindl [J]. Journal of

- Plant Biochemistry and Biotechnology, 2009, 18(2): 241-244.
- [9] Tee C S, Maziah M, Tan C S. Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium Sonia* 17 [J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(4): 723-726.
- [10] Wang Z H, Wang L, Ye Q S. High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile* [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 122(2): 328-331.
- [11] Sim G E, Loh C S, Goh C J. High frequency early *in vitro* flowering of *Dendrobium* Madame Thong - In (Orchidaceae) [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(4): 383-393.
- [12] Jaime A, Silva T D, Zeng S J, et al. *In vitro* flowering of *Dendrobium* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 119: 447-456.
- [13] Wang G Y, Xu Z H, Chia T F, et al. *In vitro* flowering of *Dendrobium candidum* [J]. Science in China Series C - Life Sciences, 1997, 40(1): 35-42.
- [14] Ren X Q, Liang H W, Chen B Q, et al. Dwarfing effects of plant growth regulators on narcissi [J]. Journal of Forestry Research, 2003, 14(4): 339-341.
- [15] 徐京,庞基良.兰花离体开花的研究进展[J].北方园艺,2010(24):215-218.

表 1 供试菌株

| 序号 | 原号 |
|----|--------|
| 1 | 89 |
| 2 | 夏抗 8 |
| 3 | 早秋 615 |
| 4 | 白平菇 |
| 5 | 双抗黑平 |
| 6 | 满城野生 |
| 7 | 冀农 11 |
| 8 | HP-1-1 |
| 9 | 新平 106 |
| 10 | 四季美 |
| 11 | 紫袍 |
| 12 | 高平 88 |
| 13 | 558 |
| 14 | 特抗黑平 |
| 15 | 平菇 206 |
| 16 | 99 |

丝,液氮研磨菌丝后用 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,紫外分光光度计测定其 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$,去离子水稀释到 20 ng/ μL 左右, -20℃ 保存备用。

1.2.2 引物筛选 所用引物及扩增程序参考李辉平的研究^[8],由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 2。

表 2 引物序列

| 引物 | 序列 (5'→3') | 引物 | 序列 (5'→3') |
|----|---------------------|-----|-------------------|
| P1 | TGCACACACACACAC | P9 | AGAGAGAGAGAGAGAGG |
| P2 | GTGACACACACACAC | P10 | GAGAGAGAGAGAGAGAC |
| P3 | GTGACGACTCTCTCTCTCT | P11 | CACGAGAGAGAGAGAGA |
| P4 | GGATGCAACACACACAC | P12 | AGAGAGAGAGAGAGAGT |
| P5 | CGTGTGTGTGTGTGT | P13 | AGAGAGAGAGAGAGAGC |
| P6 | AGTGTGTGTGTGTGT | P14 | CTCTCTCTCTCTCTCTT |
| P7 | CCAGTGGTGGTGGTG | P15 | CTCTCTCTCTCTCTCTA |
| P8 | GGAGTGGTGGTGGTG | P16 | CACACACACACACACAT |

1.2.3 PCR 反应体系 25 μL 反应体系:2 μL DNA 模板(约 50 ng), 2.5 μL 10 × *Taq* PCR buffer, 0.8 μL dNTPs(各 0.25 mmol/L), 1 μL 引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL), 18.5 μL 双蒸水。

1.2.4 扩增程序 94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;72℃ 补齐 10 min;4℃ 终止反应。

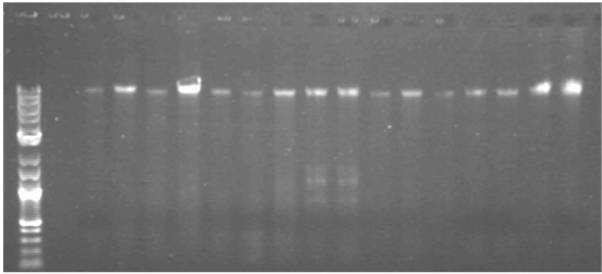
1.2.5 琼脂糖凝胶电泳 配制 1.4% 琼脂糖凝胶,缓冲液为 1 × TAE,PCR 产物在电压 100 V 下电泳 70 min。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

16 个菌株基因组 DNA 提取结果见图 1。由于采用了基因组 DNA 提取试剂盒,与传统的 DNA 提取方法相比,得到的 DNA 比较纯净,条带清晰、杂质较少,在紫外分光光度计上测定其 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 。可以看出, $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 值均在 1.8~2.0

MCK 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



M—Marker; CK—阴性对照; 1~16—菌株编号(同表1)。图2同图1 16 个平菇菌株基因组 DNA 的电泳检测结果

之间,可用于 PCR 扩增。

2.2 引物的筛选

本试验从供试的 16 个 ISSR 引物中筛选出 8 个扩增效果较好的引物,可扩增出所有供试菌株的 DNA 条带,且条带清晰、稳定、分布合理、重复性好,而在对照中没有扩增出 DNA 条带。这些引物分别为 P2、P3、P5、P6、P7、P8、P11、P13。

2.3 ISSR 扩增图谱分析

用筛选出的 8 个引物对 16 个平菇菌株进行 ISSR 扩增,共扩增出 78 个多态性位点(图 2),且分布均匀,大小在 200~3 000 bp 之间。以凝胶 DNA 片段的有无分别记为 1 或 0,用统计软件 NTSYSpc 计算菌株间的遗传相似性系数,进行遗传相似性分析。由图 3 聚类分析结果可知,遗传相似水平在 0.75 左右,16 个菌株分为 6 个组群:第 1 组(Ⅰ)包括以 89 为代表的 5 个菌株;第 2 组(Ⅱ)包括白平菇菌株;第 3 组(Ⅲ)包括以冀农 11 为代表的 4 个菌株;第 4 组(Ⅳ)包括 558 菌株;第 5 组(Ⅴ)包括以 99 为代表 3 个菌株;第 6 组(Ⅵ)包括夏抗 8 为代表的 2 个高温菌株。

3 结论与讨论

ISSR 分子标记技术是 1994 年由 Zietkiewicz 等创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记,其技术原理是在 SSR 序列的 3'端或 5'端加锚 1~4 个随机的碱基为引物,对两侧具有反向排列的简单序列间的基因片段进行扩增,不仅多态性好、稳定性高,而且简单、快速、通用性好,在食用菌种质资源研究中得到了广泛的应用^[9]。笔者所在课题组在前期工作中收集了冀中南地区 54 个不同栽培平菇菌株,并进行了拮抗与酯酶同工酶测定,将 54 个菌株分为 12 个营养不亲和群^[10]。本试验在此基础上选取 16 个代表菌株进一步进行 ISSR 分析。结果表明,用筛选出的 8 个引物对平菇菌株 DNA 进行 ISSR 扩增,共扩增出 78 个多态性位点,大小在 200~3 000 bp 之间,且分布均匀。聚类分析结果表明,同一营养亲和群的平菇 89 和早秋 615、双抗黑平和新平 106、以及 99、特抗黑平和平菇 206 菌株群内 ISSR 图谱完全相同,不同营养亲和群菌株 ISSR 图谱存在差异,进一步说明 ISSR 分析在食用菌菌株鉴定方面的可靠性。

参考文献:

[1] 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.

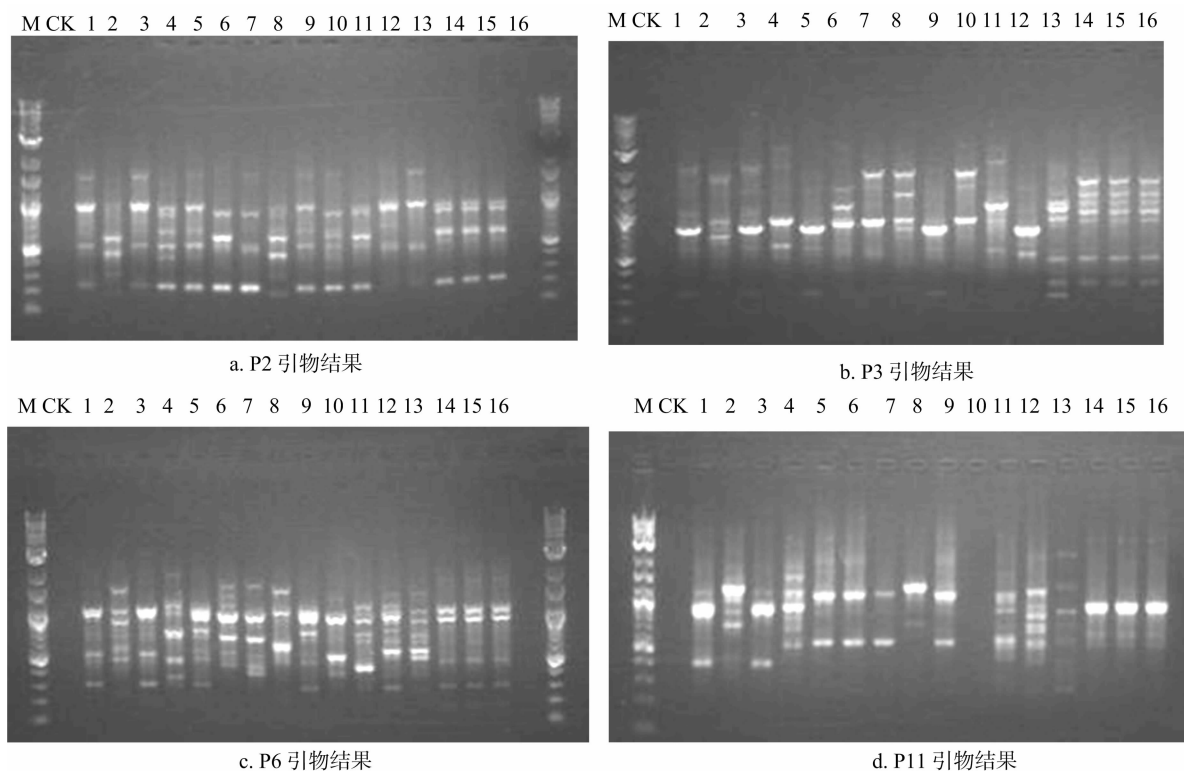


图2 部分供试菌株的 ISSR 扩增结果

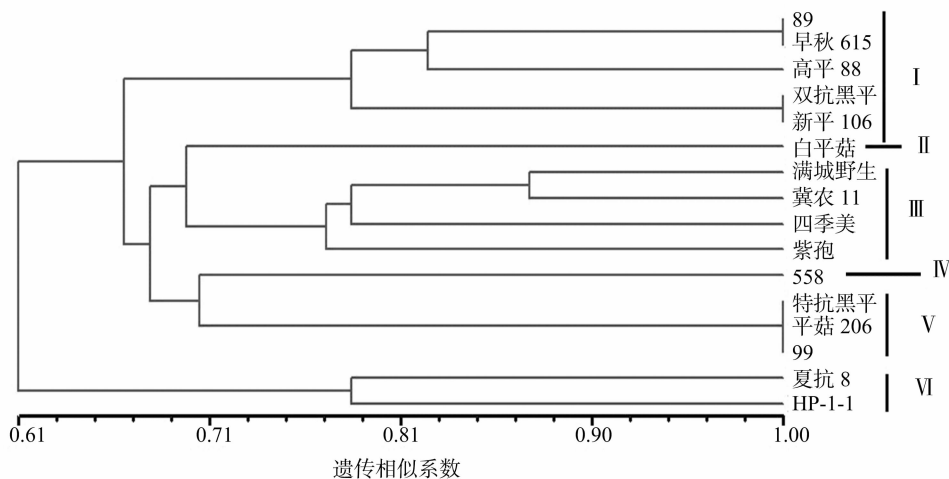


图3 根据 ISSR 构建的 UPGMA 树

- [2]马志刚,吕作舟,郑和斌,等. ISSR 标记在侧耳属菌株分类学中的初步应用[J]. 华中农业大学学报,2006,25(1):55-59.
- [3]李辉平,黄晨阳,陈 强,等. 黑木耳栽培菌株的 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2007,34(4):935-940.
- [4]戴肖东,马银鹏,张介驰,等. 黑龙江省木耳主栽品种遗传多样性分析[J]. 生物技术,2014,24(5):86-89.
- [5]李 莹,李 莉,刘艳玲,等. 杏鲍菇菌种遗传多态性的 ISSR 分析[J]. 微生物学杂志,2014,34(2):24-28.
- [6]秦莲花,宋春艳,谭 琦,等. 用 ITS 和 ISSR 分子标记技术鉴别香菇生产用种[J]. 菌物学报,2006,25(1):94-100.
- [7]贾定洪,王 波,郑林用,等. 应用拮抗及 ISSR 方法鉴定袋料香菇菌株[J]. 西南农业学报,2013,26(2):832-834.
- [8]李辉平. 应用 ISSR 标记对食用菌的遗传多样性分析[D]. 北京:中国农业科学院,2007.
- [9]Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics,1994,20(2):176-183.
- [10]郑素月,张庆桥. 生化标记在河北省栽培平菇种质资源鉴别中的应用研究[J]. 北方园艺,2011(14):162-164.