

李 红, 张 敏, 肖千明, 等. 基于 ISSR-PCR 分子标记的滑菇遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(6): 39-41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.008

基于 ISSR-PCR 分子标记的滑菇遗传多样性分析

李 红, 张 敏, 肖千明, 宋 莹, 曹 君

(辽宁省农业科学院食用菌研究所, 辽宁沈阳 110161)

摘要:以辽宁省主栽的 16 个滑菇菌株为研究对象, 应用 ISSR 分子标记技术对其遗传多样性进行了分析, 从 20 条引物中筛选出 9 条多态性丰富、谱带清晰且重复性好的引物进行了 ISSR-PCR 扩增。9 条引物共扩增出 101 条带, 其中多态性谱带 92 条, 多态位点百分率为 91%。遗传相似系数变化范围为 0.59~0.90。在遗传相似系数为 0.69 时, 可将 16 个滑菇菌株划为 5 大类群, 为今后滑菇的分类鉴定及遗传育种亲本的选配提供了理论依据。

关键词:滑菇; ISSR; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: S646.1⁺60.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)06-0039-03

滑菇 (*Pholiota nameko* Ito et Imai) 别称光帽鳞伞、光帽黄伞、滑子蘑、光滑环锈伞、光盖环锈伞、光盖库恩菇、珍珠菇, 是一种较为常见的低温型食用菌, 具有丰富的营养成分和很强的药理活性。滑菇是世界上五大人工栽培的优质食用菌之一。我国是滑菇的主要生产和消费大国, 产量居世界首位, 每年大量对外出口, 国内市场滑菇价格高于香菇和平菇等其他菌类价格。目前滑菇栽培所用的菌株同名异物和同物异名现象严重, 因此对滑菇菌株进行有效的分类和亲缘关系鉴定是滑菇育种成功与否的首要因素。

ISSR 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, 它是在 SSR 基础上发展起来的技术, 根据基因组广泛存在 SSR 的特点, 利用 SSR 本身设计引物, 无需预先克隆和测序^[1]。ISSR 通常为显性标记, 呈孟德尔式遗传, 具有很好的稳定性和多态性, DNA 用量少、技术要求低、成本低廉、通用性好, 已成功地运用于居群生物学研究、菌株鉴定、物种的分类系统学比较, 并作为构建遗传图谱的工具^[2]。

在食用菌方面, ISSR 技术较多用于种群内、种群间、物种间的系统发育和遗传多样性研究。秦莲花等利用 ISSR 标记结合 ITS 分析, 以豹皮香菇和虎皮香菇为外群, 对 12 个香菇菌株进行遗传分析, 结果认为此方法是鉴别香菇菌株的良好方法^[3]。王子迎等用 13 个 ISSR 引物对 26 个安徽野生香菇和 6 个栽培菌株进行了遗传多样性分析, 并根据 ISSR 分析选择遗传距离远近不同的亲本进行杂交, 评价了其杂种优势^[4]。马志刚等基于重复序列 (TATG), 设计了 7 条引物, 对侧耳属的 22 个菌株和 1 株双孢蘑菇菌株的基因组 DNA 进行 ISSR 分析, 验证了重复序列 (TATG)₄ 在侧耳属中的存在^[5]。Zhang 等设计 2 个锚定 ISSR 引物, 将 17 个香菇菌株很好地鉴

别开^[6]。但在滑菇方面, 尚无相关研究报道。本研究应用 ISSR-PCR 分子标记的方法对滑菇菌株遗传多样性进行分析, 以期对滑菇的分类鉴定及遗传育种亲本的选配提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本研究以辽宁省主栽的 16 个滑菇菌株为研究对象 (表 1)。

表 1 供试菌株

编号	菌株名称	来源
PI1	C31	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI2	112	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI3	辽滑 1	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI4	西羽	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI5	申 14	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI6	HSH	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI7	早壮	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI8	D 工羽 3	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI9	延滑	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI10	EH	葫芦岛农函大玄字食用菌野驯繁育有限公司
PI11	曲新	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI12	华 3	辽宁省农业科学院食用菌研究所
PI13	丹 9	辽宁省丹东市林业科学研究所
PI14	N103	大连宝野农业发展有限公司
PI15	N108	大连宝野农业发展有限公司
PI16	N109	大连宝野农业发展有限公司

1.2 培养基

PDB 综合培养基用于总 DNA 提取的菌丝培养, 配方: 马铃薯 400 g, 葡萄糖 40 g, 磷酸二氢钾 6 g, 硫酸镁 3 g, 蛋白胨 6 g, 水 2 000 mL, pH 值不需要调整。

1.3 试剂和仪器

ISSR-PCR 反应所用的 *Taq* DNA Polymerase、dNTP、10 × buffer、Mg²⁺ 购自北京鼎国昌盛公司, DNA marker (DL5000)、引物购自 TaKaRa (大连) 有限公司。PCR 仪为德国 Biometra 公司的 Thermocycler 型。

收稿日期: 2016-04-11

基金项目: 辽宁省科技农业攻关计划 (编号: 201404266)。

作者简介: 李 红 (1979—), 女, 辽宁开原人, 硕士, 助理研究员, 从事食用菌菌种选育及栽培工作。E-mail: li79hong@163.com。

通信作者: 张 敏, 博士, 研究员, 从事食用菌育种及栽培等工作。E-mail: zhangmindun@163.com。

1.4 引物

本研究使用的 20 个引物见表 2。

表 2 20 个引物序列

引物 编号	序列(5'→3')	引物 编号	序列(5'→3')
P1	TGCACACACACACAC	P11	GAGAGAGAGAGAGAGAAC
P2	GTGACACACACACAC	P12	AGAGAGAGAGAGAGAGGC
P3	GTGACGACTCTCTCTCTCT	P13	TCTCTCTCTCTCTCTCCG
P4	GGATGCAACACACACACAC	P14	ACACACACACACACACCG
P5	CGTGTGTGTGTGTGTGT	P15	GTGTGTGTGTGTGTGTTA
P6	ACTGTGTGTGTGTGTGT	P16	TGTGTGTGTGTGTGTGGA
P7	CCAGTGGTGGTGGTGTG	P17	ACACACACACACACAC
P8	GGAGTGGTGGTGGTGTG	P18	ACACACACACACACACC
P9	AGAGAGAGAGAGAGAGG	P19	ACACACACACACACACCT
P10	GAGAGAGAGAGAGAGAC	P20	ACACACACACACACACCTG

1.5 菌丝体培

将活化的菌丝切下 0.5 cm² 菌块,接种于 PDB 综合培养基,23 ℃ 摇床培养,转数为 150 r/min。将培养好的菌液,无菌水洗涤 2 次,汲干菌丝体表面的水分,-20 ℃ 保存备用。

1.6 总 DNA 提取及检测

采用改良的 CTAB 法^[7] 提取基因组总 DNA,0.2% 琼脂

糖凝胶电泳检测质量。

1.7 PCR 反应及电泳

引物参照加拿大哥伦比亚大学公布的 ISSR 引物序列^[8],由 TaKaRa 有限公司(大连)合成。

PCR 反应体系(20 μL):模板 DNA 200 ng/μL,dNTPs 200 μmol/L,引物 0.75 μmol/L,Taq DNA 聚合酶 0.5 U,Mg²⁺ 2.5 mmol/L,10 × buffer 2 μL,用 ddH₂O 补至总体积 20 μL。

扩增程序为:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,45 ~ 55 ℃ 退火 1 min(退火温度因不同引物而定),72 ℃ 延伸 2 min,38 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。

PCR 产物在 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳,用 GelDoc - It 型凝胶成像系统照相。

1.8 数据处理

电泳结果采取 0/1 赋值记带,将在琼脂糖凝胶上出现 DNA 片段的记为 1,不出现的记为 0,统计后输入电脑,用聚类分析软件 NTsys 进行聚类分析,并计算遗传相似度。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取

16 个滑菇菌株基因组 DNA 图谱见图 1。

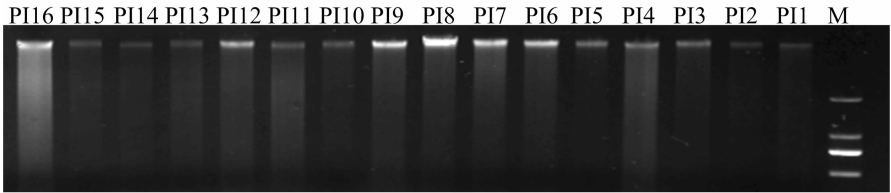
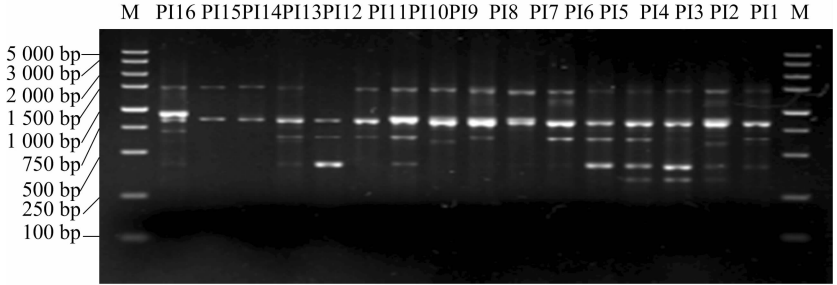


图1 滑菇菌株基因组 DNA 图谱

2.2 引物筛选

从 20 条 ISSR 引物中筛选出 9 条多态性丰富、谱带清晰且重复性好的引物,对 16 个供试菌株进行了 ISSR - PCR 扩

增。9 条引物共扩增出 101 条带(图 2 至图 5),其中多态性条带为 92 条,多态位点百分率为 91%。每条引物扩增出大约 11 条带,DNA 片段大小为 250 ~ 2 000 bp。



M—DL5 000; PI1~PI16 泳道表示 16 个不同的滑菇菌株。图 3 至图 5 同
图2 引物 P1 对 16 个滑菇菌株的 ISSR-PCR 扩增效果

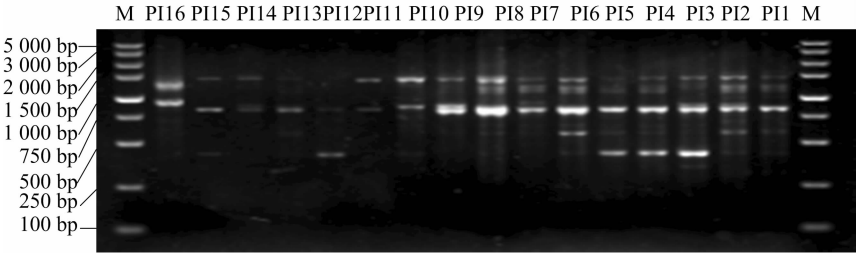


图3 引物 P4 对 16 个滑菇菌株的 ISSR-PCR 扩增效果

2.2 基于 ISSR 分析结果构建树状图

16 个菌株间的遗传相似系数变化范围在 0.59 ~ 0.90 之

间。当遗传相似系数为 0.69 时,供试菌株被聚类成 5 个类群:第 1 类为早壮、N109;第 2 类为 N103、N108、延滑;第 3 类

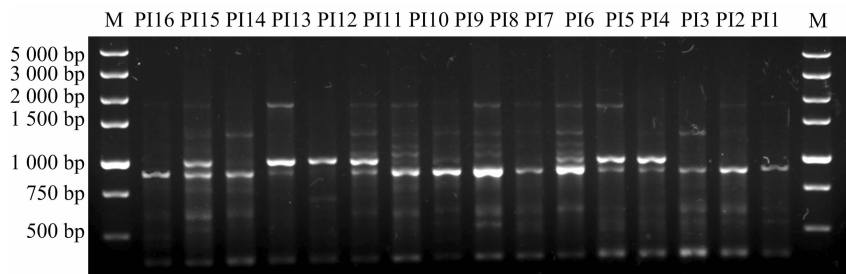


图4 引物 P12 对 16 个滑菇菌株的 ISSR-PCR 扩增效果

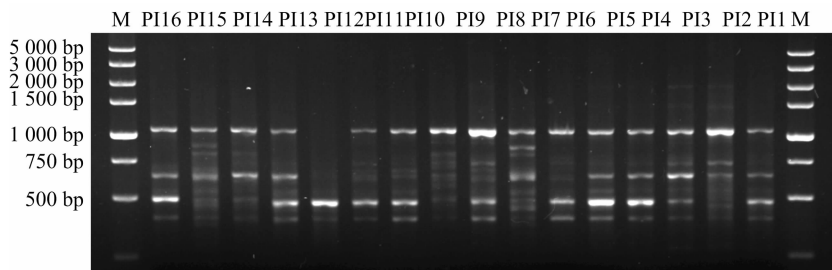


图5 引物 P19 对 16 个滑菇菌株的 ISSR-PCR 扩增效果

为丹 9、申 14、C31、西羽、EH、曲新、D 工羽 3、HSH, 其中丹 9 和申 14 亲缘关系最近, 遗传相似系数达到 0.9; 第 4 类为

112、辽滑 1; 第 5 类为华 3, 与其他菌株亲缘关系最远, 遗传距离为 0.59(图 6)。

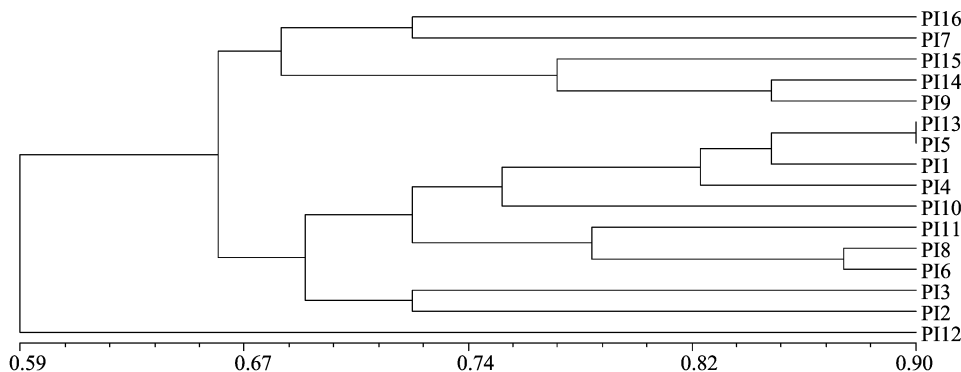


图6 16 个滑菇菌株的 ISSR 聚类

3 结论与讨论

选择杂交亲本是食用菌杂交育种中最为重要的环节之一。一直以来, 育种工作者都是通过表型分析的 DUS (distinctness, uniformity and stability, 简称 DUS) 测试来鉴定和选择亲本。这种方法耗时费力, 鉴定结果也易受环境的干扰。随着分子生物学技术的发展, 在分子水平上进行亲本菌株的选择势在必行。目前, 关于滑菇分类鉴定多局限于传统分类法和同工酶分析研究^[9], 应用分子标记鉴定的报道较少。

本研究应用 ISSR-PCR 分子标记的方法对滑菇菌株遗传多样性进行了分析, 从 20 条引物中筛选出 9 条多态性丰富、谱带清晰且重复性好的引物进行了 ISSR-PCR 扩增。结果显示 9 条引物均能将供试菌株区分开, 表明 ISSR 分子标记对滑菇菌株遗传多样性分析是可行的。16 个滑菇菌株遗传相似性较高, 遗传背景比较一致, 部分品种间亲缘关系较近, 可能与来源同一地区有关。

参考文献:

[1] 闫可, 尹勇刚, 傅常娥, 等. 桦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.

[2] 王春晖, 尹永刚, 胡汝晓, 等. 基于 ISSR 和 RAPD 标记的八株灰树花栽培菌株遗传多样性分析[J]. 食用菌学报, 2013, 20(4): 1-5.

[3] 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.

[4] 王子迎, 王书通. 安徽野生香菇遗传多样性及杂种优势的 ISSR 分析[J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 211-216.

[5] 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.

[6] Zhang Y, Molina F I. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay[J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 131(1): 17-20.

[7] 张丹, 宋春艳, 章炉军, 等. 基于全基因组序列的香菇商业菌株 SSR 遗传多样性分析及多位点指纹图谱构建的研究[J]. 食用菌学报, 2014, 21(2): 1-8.

[8] 王守现, 刘宇, 张英春, 等. 六个灰树花菌株遗传多样性分析[J]. 北方园艺, 2010(1): 201-204.

[9] 张敏, 肖千明, 李红, 等. 滑菇主要栽培品种间亲缘关系的同工酶研究[J]. 辽宁农业科学, 2010(4): 25-27.