

李 红,李 超,张 敏. 金针菇菌株遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):19-22.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.005

金针菇菌株遗传多样性的 RAPD 分析

李 红,李 超,张 敏

(辽宁省农业科学院食用菌研究所,辽宁沈阳 110161)

摘要:采用 RAPD 分子标记技术对 35 株来源不同的金针菇菌株进行遗传多样性分析,从 22 条引物中筛选出 8 条多态性丰富、谱带清晰且重复性好的引物进行了 RAPD-PCR 扩增。结果表明:8 条引物共扩增出 68 条条带,其中多态性条带为 56 条,多态位点率为 82%,遗传相异系数变化范围为 0~0.71。在遗传相异系数为 0.60 时,可将 35 个金针菇菌株划为五大类群,为今后金针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:金针菇;RAPD;分子标记;遗传多样性;多态性;谱带;重复性;多态位点;分类鉴定

中图分类号:S646.1⁺50.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)01-0019-04

金针菇[*Flammulina velutipes* (Fr.) Singer.] 隶属于真菌门担子菌亚门层菌纲无隔担子菌亚纲伞菌目口蘑科小火焰菌属,因形似金针菜而得名。金针菇是古今中外著名的食用菌之一,金针菇蛋白质含量高,氨基酸种类丰富,具有抗癌功能,经常食用具有预防高血压、治疗肝病和胃溃疡等功效。金针菇特别以富含赖氨酸而著称,可以活化神经细胞,促进智力发育,素有“增智菇”之美称,是当今市场上十分走俏的天然保健食品之一。随着金针菇产业的迅速发展,金针菇新品种选育已成为食用菌育种研究的重要内容之一,为此,开展金针菇菌株的遗传多样性分析及了解菌株间遗传差异就具有重要意义。

随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 标记以基因组 DNA 为模板,以 1 个随机的

寡核苷酸序列(通常为 10 个碱基对)作引物,通过 PCR 扩增反应,产生不连续的 DNA 产物,用以检测 DNA 序列的多态性。它具有程序简单、DNA 用量少、随机引物没有严格的种属界限、不须要事先知道基因组的任何分子信息就能快速检测大量遗传多态性等优点。在食用菌领域常用于品种鉴定、遗传关系分析、分子遗传的构建及基因定位等研究。Khush 等用 RAPD 技术分析双孢蘑菇的野生和栽培品种,在 8 个异核体中识别出 7 个不同的基因型。说明 RAPD 标记在遗传研究中的通用性和对菌株指纹识别的有效性^[1]。Zhang 等用 RAPD 标记对 15 个香菇菌株行分析,其中 13 个菌株的 DNA 指纹各异,2 个菌株谱带一致,说明 RAPD 标记可用于鉴别香菇菌种,并可用于香菇育种和菌种改良^[2]。詹才新等以金针菇不同亲本菌株及其杂交种为材料进行 RAPD 分析后,认为 RAPD 技术可鉴别出真伪杂种^[3]。Castle 等曾以 RFLP 为标记进行双孢蘑菇及大肥菇种内和种间多态性研究。王翠等应用 RAPD 技术对滇西北地区冬虫夏草、阔孢虫草和蛹虫草进行遗传分化研究,表明虫草群体中存在着显著的地区差异性^[4]。本研究应用 RAPD-PCR 分子标记的方法对金针菇菌株遗传多样性进行分析,以期对金针菇资源遗传多样性及遗

收稿日期:2017-05-18

基金项目:辽宁省科学事业公益研究基金(编号:2015002012)。

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研究。E-mail:li79hong@163.com。

通信作者:李 超,硕士,副研究员,从事食用菌育种及栽培技术研究。E-mail:lnnkylxy@163.com。

生长率与芽增殖系数之间并不存在线性关系,平均增长率高的试验组,芽增殖系数并不一定高,反之亦然。因此,在进行最佳培养条件确定时,需要综合材料的培养状况,选择适宜生产最优质培养材料的培养方案。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草:第六卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [2] 范崇庆,李尧尧,金 艳,等. 白花蛇舌草质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(17):98-101.
- [3] 纪宝玉,范崇庆,裴莉昕,等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(19):235-240.
- [4] 陈永康. 白花蛇舌草的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):290-293.
- [5] 于 新,杜志坚,陈悦娇,等. 白花蛇舌草提取物抗氧化作用的研究[J]. 食品与发酵工业,2002,28(3):10-13.

- [6] 赵浩如,李 瑞,林以宁,等. 白花蛇舌草不同提取工艺对抗肿瘤活性的影响[J]. 中国药科大学学报,2002,33(6):510-513.
- [7] 王宇翎,张 艳,方 明,等. 白花蛇舌草总黄酮的免疫调节作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(4):444-447.
- [8] 孟 玮,邱世翠,刘志强,等. 白花蛇舌草对小鼠淋巴细胞增殖和抗体产生的影响[J]. 中国中医药科技,2003,10(6):340.
- [9] Kim Y, Park E J, Kim J, et al. Neuroprotective constituents from *Hedyotis diffusa*[J]. Journal of Natural Products,2001,64(1):75-78.
- [10] 朱雪瑜. 白花蛇舌草中的神经保护成分[J]. 国外医药(植物药分册),2002,17(1):28-29.
- [11] 李国平,杨鹭生. 白花蛇舌草的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2002,38(2):150.
- [12] 巢建国,谈献和,张 瑜,等. 白花蛇舌草组织培养研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版),2005,21(6):369-370.

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

各供试菌株的具体情况见表 1。

表 1 供试菌株			
编号	菌种名称	子实体颜色	来源
L1	BJ-11	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L2	BJ-13	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L3	BJ-14	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L4	黄金 5032	黄	山东省寿光市食用菌研究所
L5	白金 2	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L6	白金 16	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L7	白金 48	白	江苏省高邮市科学食用菌研究所
L8	川金 3	黄	山东省寿光市食用菌研究所
L9	金 19	黄	山东省寿光市食用菌研究所
L10	白金 1	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L11	千曲	白	大连双兴现代农业发展有限公司
L12	韩金 51	白	韩国
L13	恒生金	白	沈阳恒生物科技发展有限公司
L14	日白金	白	日本
L15	高产 2	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L16	金 851	白	四川省农业科学院
L17	韩金	白	韩国
L18	金新美 15	白	江苏省江都天达食用菌研究所
L19	金玉 22	黄	江苏省江都天达食用菌研究所
L20	738	黄	江苏省高邮市科学食用菌研究所
L21	白金 8	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L22	白金 10	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L23	白金 3	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L24	411	白	四川省农业科学院
L25	珍玉 8	白	江苏省江都天达食用菌研究所
L26	913	白	江苏省高邮市科学食用菌研究所
L27	F21	白	浙江省农业科学院
L28	406	黄	江苏省江都天达食用菌研究所
L29	寿光 5	白	山东省寿光市食用菌研究所
L30	纯白 68	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所
L31	FV80	白	贵州习水县习酒镇食用菌研究中心
L32	金 43	黄	江苏省江都天达食用菌研究所
L33	特丰 6	白	山东省寿光市食用菌研究所
L34	黄金 55	黄	山东省寿光市食用菌研究所
L35	金 1312	白	辽宁省农业科学院食用菌研究所

1.2 培养基

PDB 综合培养基: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 值自然。用于总 DNA 提取的菌丝培养。

1.3 试剂和仪器

RAPD-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 (DL2000)、引物购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 仪为德国 Biometra 公司 Thermocycler。

1.4 引物

各引物的具体情况见表 2。

1.5 试验时间和地点

试验于 2017 年 3 月在辽宁省农业科学院食用菌研究所

表 2 22 个引物序列

引物编号	序列 (5'→3')	引物编号	序列 (5'→3')
S1	AATCGGGCTG	S12	GACGGATCAG
S2	ACTTCGCCAC	S13	GGGAATTCGG
S3	AGGGGTCTTG	S14	GGTAACGCC
S4	AGTCAGCCAC	S15	GGTGATCAGG
S5	CAATCGCCGT	S16	GTGACGTAGG
S6	CAGGCCCTTC	S17	GTGAGGCGTC
S7	CCCATGGCCC	S18	GTGATCGCAG
S8	CCGATATCCC	S19	GTTGCCAGCC
S9	CCGCATCTAC	S20	TCGGCGATAG
S10	GAAACGGGTG	S21	TGAGTGGGTG
S11	GACCGCTTGT	S22	TGCCGAGCTG

进行。

1.6 菌丝体培养

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,转速为 150 r/min。将培养好的菌液用无菌水洗涤 2 次,用无菌滤纸吸干菌丝体表面的水分,-20℃ 保存备用。

1.7 总 DNA 提取及检测

采用改良的 CTAB 法提取基因组总 DNA,0.1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。

1.8 引物筛选

引物筛选是进行 RAPD 分析的一个关键环节。用来筛选引物的模板采用 4 个具有典型性状、亲缘关系较远的材料,这样筛出的引物才具有代表性,RAPD-PCR 扩增出的结果多态性较高且可能每份供试材料都能扩增出丰富的多态性位点。

引物参照 NY/T 1743—2009《食用菌菌种真实性鉴定 RAPD 法》公布的 22 条引物序列,由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.9 PCR 反应及电泳

PCR 反应体系(25 μL):模板 DNA 200 ng/μL,dNTPs 200 μmol/L,引物 0.4 μmol/L,*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U,Mg²⁺ 2.5 mmol/L,10×buffer 2.5 μL,用 ddH₂O 补至总体积 25 μL。扩增程序为:94℃ 5 min;94℃ 1 min,*T_m* 退火 1 min(退火温度因不同引物而定),72℃ 1 min,35 个循环;最后 72℃ 10 min,4℃ 保存。

PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳,用 GelDoc-It 型凝胶成像系统照相。

1.10 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,将统计形成的“0-1”数据表输入 DPSv6.55 版数据统计分析软件中,采用 Jaccard 聚类距离采用类平均法(UPGMA)进行“0-1”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

由图 1 可以看出,每一样品在电泳时均形成明显的 1 条整齐带,并且条带比较亮,无弥散的荧光区出现,说明 DNA 样

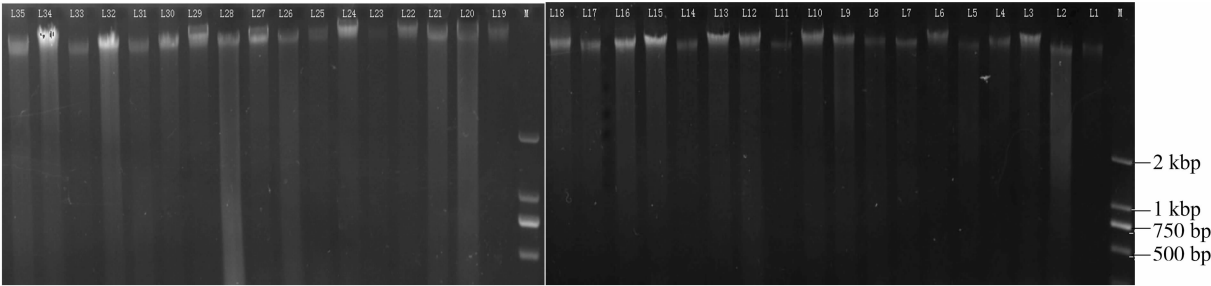


图1 金针菇菌株基因组 DNA 图谱

品没有降解。用 CTAB 法提取的 DNA 色泽近白色或无色。说明大多数酚类、多糖、蛋白质等物质已被较彻底去除,纯度比较高。

2.2 引物筛选

从 22 条引物中筛选出 8 条多态性丰富、谱带清晰且重复性好的引物,分别为 S15、S9、S6、S16、S18、S10、S4、S11,如图 2

所示。
2.3 PCR 反应

利用筛选出来的 8 条引物对 35 个供试菌株进行 RAPD-PCR 扩增,共扩增出 68 条条带(图 3、图 4、图 5),其中多态性条带为 56 条,多态位点率为 82%。每条引物扩增出约 9 条条带,DNA 片段大小为 500~2 000 bp。

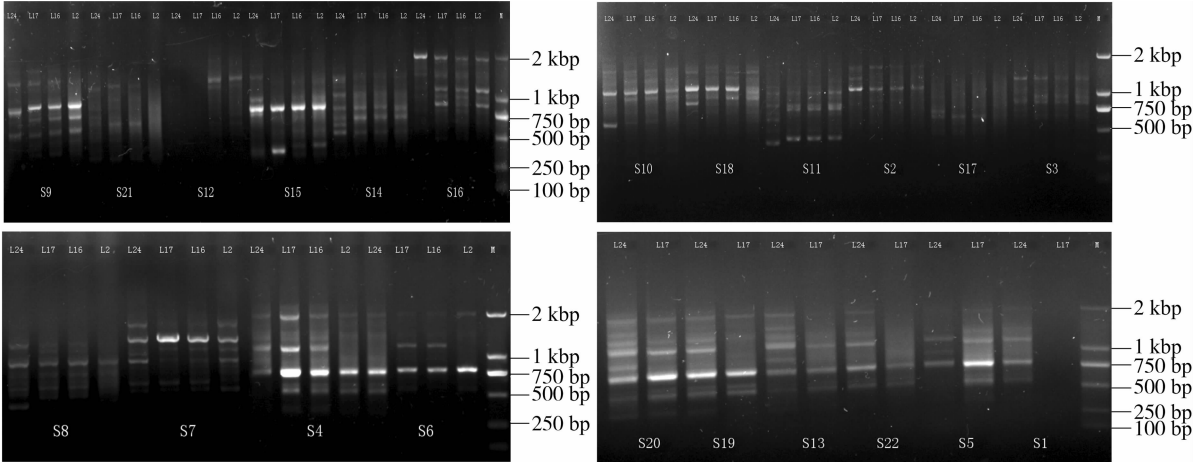
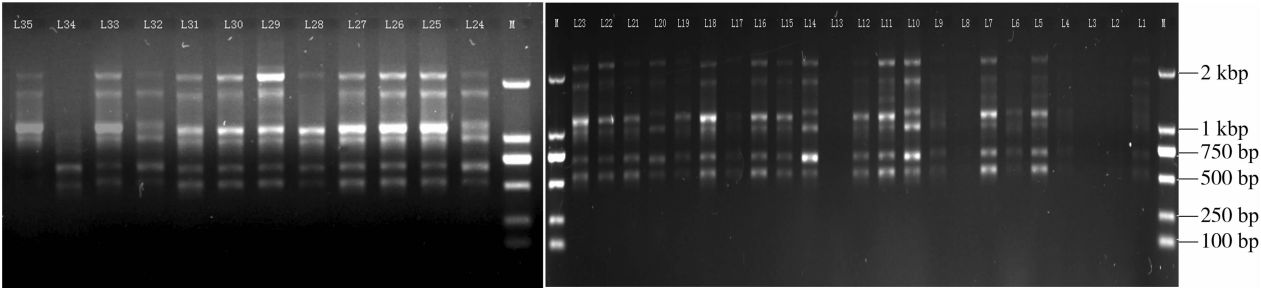
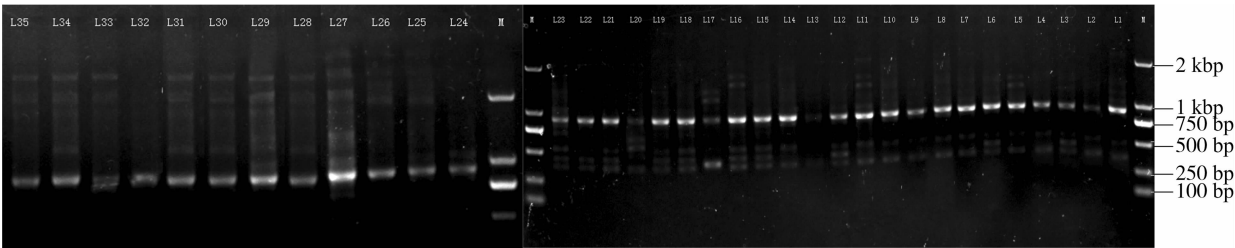


图2 金针菇菌株 RAPD-PCR 扩增反应引物筛选



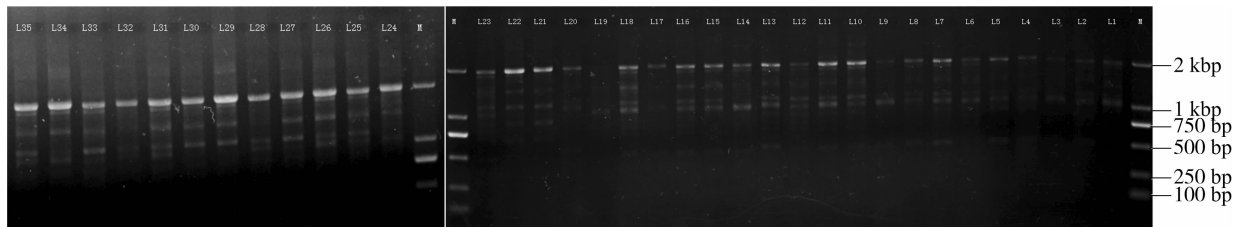
M—DL2000; 1~35泳道—表1所示菌株

图3 引物 S9 对 35 个金针菇菌株的 RAPD-PCR 扩增效果



M—DL2000; 1~35 泳道—表 1 所示菌株

图4 引物 S15 对 35 个金针菇菌株的 RAPD-PCR 扩增



M—DL2000; 1~35 泳道—表 1 所示菌株

图5 引物 S16 对 35 个金针菇菌株的 RAPD-PCR 扩增效果

2.4 基于 RAPD 分析结果构建树状图

如图 6 所示,35 个菌株间的遗传相异系数变化范围在 0~0.71 之间。当遗传相异系数为 0.60 时,供试菌株被聚类成 5 个类群:第 1 类为 BJ-11、BJ-12、BJ-13、日白金、韩金、珍玉 8、411、白金 2、千曲、白金 48、913、白金 1、恒生金、白金 16、高产 2、FV80、金 851、白金 3、金新美 15、F21、纯白 68、特丰 6、寿光 5、金 1312、韩金 51、白金 8、白金 10,全部为白色品种;第 2 类为黄金 5032、川金 3、738;第 3 类为金玉 22;第 4 类为 406、黄金 55;第 5 类为金 19、金 43。第 2、第 3、第 4、第 5 类都是黄色金针菇品种,说明 RAPD 分析结果与菌株农艺性状结果趋同。

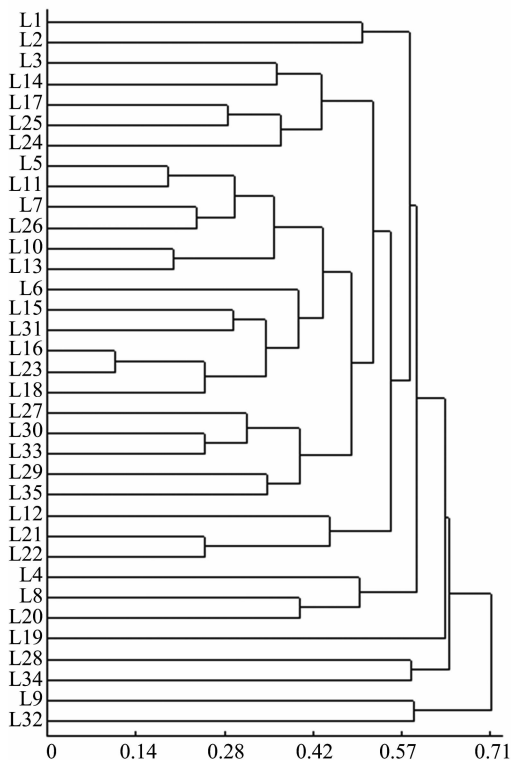


图6 35 个金针菇菌株的 RAPD 聚类图示

3 结论与讨论

食用菌菌种、菌株的质量好坏直接关系到食用菌产业能否良性发展。目前食用菌市场缺乏统一管理,菌种管理混乱,菌种退化、老化,品种混杂,同种异名、同名异种等问题严重。

分子标记技术为这一难题提供了快速、准确的鉴定手段,可以快速、灵敏、准确地用于食用菌的菌种、菌株鉴定。

选择杂交亲本是食用菌杂交育种中最为重要的一个环节之一。一直以来,育种工作者都是通过形态学分析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^[5]。

本研究应用 RAPD-PCR 分子标记的方法对金针菇菌株遗传多样性进行分析,从 22 条引物中筛选出 8 条多态性丰富、谱带清晰且重复性好的引物进行 RAPD-PCR 扩增。结果显示,8 条引物均能将供试菌株区分开,表明 RAPD 分子标记对金针菇菌株遗传多样性分析是可行的,并能把白色金针菇和黄色金针菇区分开来,与菌株农艺性状结果趋同。

但是,RAPD-PCR 分子标记技术也有缺点,即稳定性和重复性不好,为了克服这些缺点,下一步的工作将开发由 RAPD 标记转化的特定序列扩增(SCAR, sequence characterized amplified region)标记,相对于 RAPD 标记^[6],SCAR 标记所用引物较长且引物序列与模板 DNA 完全互补,可在严谨条件下进行扩增,因此结果稳定性好、可重复性强^[7-8],用 SCAR 标记分析金针菇种质资源更可靠。

参考文献:

- [1] Khush R S, Becker E, Wach M. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(9): 2971-2977.
- [2] Zhang Y, Moilina F L. Strain typing of *lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay [J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 131(1): 17-20.
- [3] 詹才新, 朱兰宝. RAPD 技术在金针菇杂交育种中的应用 [J]. 食用菌学报, 1995, 2(1): 7-11.
- [4] 王 翠, 谢宝贵, 陈梁军, 等. 金针菇菌株的 SCAR 标记分子鉴别 [J]. 福建农业学报, 2013, 28(10): 966-970.
- [5] 李 博. 金针菇遗传连锁图的构建及菌丝生长速度的 QTL 定位 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009: 30-37.
- [6] 庞瑞华, 王 玲, 李小宁, 等. 信阳地区水稻资源的遗传多样性分析 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 113-116.
- [7] 傅 冰. SCAR 标记在地木耳菌株分类鉴定中的运用 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 64-66, 74.
- [8] 刘靖宇, 宋秀高, 叶 夏, 等. 香菇菌株遗传多样性 ISSR, RAPD 和 SRAP 综合分析 [J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 1-8.