

赵光辉,方洪枫,陈 剑,等. 20 株草菇遗传多样性的分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):194–197.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2020.16.037

20 株草菇遗传多样性的分析

赵光辉¹, 方洪枫¹, 陈 剑¹, 陈躬国¹, 林 原¹, 袁 滨²

(1. 福州市农业科学研究所,福建福州 350000; 2. 漳州市农业科学研究所,福建漳州 363005)

摘要:旨在借助分子标记手段对草菇菌株进行鉴别。利用 17 条扩增条带清晰、稳定的随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)、简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat,简称 ISSR)引物对 20 株草菇菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增,分析草菇菌株的遗传差异。结果表明,17 条引物共扩增出 123 条清晰的 DNA 片段,其大小为 250~2 000 bp,其中多态性片段 92 条,平均多态性位点占比为 74.80%。DNA 电泳结果表明,所有供试菌株间的 DNA 指纹均存在差异。

关键词:草菇;菌株;分子标记;遗传多样性

中图分类号: S646.1⁺303.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2020)16–0194–03

草菇[*Volvariella volvacea* (Bull. ex Fr.) Sing.] 别称苞脚菇、兰花菇、麻菇、贡菇、秆菇、中国菇等,是一种喜温、喜湿、自然发生于稻草上的草腐真菌,因而得名。草菇原产于我国热带及亚热带地区,在我国各地都有栽培。草菇栽培原料广泛,味道鲜美,营养价值丰富^[1–4],深受广大消费者喜爱。草菇属于高温型菌类,栽培原料及栽培方式多样化,但是由于低产、不稳产等原因,制约了草菇的发展。真菌的鉴定方法主要有形态学方法及分子标记方法等,草菇的形态学区别不大,而分子标记鉴定可以克服形态学鉴别的不足。随着分子生物技术的发展,如序列特征化扩增区域(sequence characterized amplified region,简称 SCAR)简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat,简称 ISSR)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA,简称 RAPD)、简单重复序列(simple sequence repeat,简称 SSR)等分子标记技术已被广泛应用到鲍鱼菇、草菇、香菇、金针菇、杏鲍菇、双孢蘑菇、黑木耳、野生蘑菇等食用菌遗传多样性、品种鉴定和育种研究中^[5–20]。ISSR、RAPD 这 2 种分子标记技术具有简单、快速、稳定性强的特点,已经被广泛用于食用菌的遗传多样性、品种鉴定、系统进化等研

究中。本研究对收集的 20 株草菇菌株进行 ISSR、RAPD 遗传多样性分析,旨在为草菇鉴定及育种提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

20 株试验菌株见表 1,均保藏于福建省食用菌种质资源保藏管理中心。

表 1 20 株供试草菇菌株的基本信息

序号	菌株编号	来源
1	V0024	福建农林大学菌物研究中心
2	V1296	福建农林大学菌物研究中心
3	V0062	福建农林大学菌物研究中心
4	V1172	福建农林大学菌物研究中心
5	屏优一号	福建农林大学菌物研究中心
6	V1295	福建农林大学菌物研究中心
7	V238	福建农林大学菌物研究中心
8	V0022	福建农林大学菌物研究中心
9	V0038	福建农林大学菌物研究中心
10	V668	福建农林大学菌物研究中心
11	VF001(上海草菇)	福州市农业科学研究所
12	V663	福建农林大学菌物研究中心
13	V0032	福建农林大学菌物研究中心
14	H1521	福建农林大学菌物研究中心
15	V901	章丘市农业科学研究所
16	V971	章丘市农业科学研究所
17	银丝草菇	北京吉蕈园科技有限公司
18	V32	北京吉蕈园科技有限公司
19	V34	北京吉蕈园科技有限公司
20	VF002(江田草菇)	福州市农业科学研究所

收稿日期:2019–08–22

基金项目:福建省科技计划(编号:2016N3018、2016N0052、2018N2010314);国家食用菌产业技术体系专项基金(编号:CARS20)。

作者简介:赵光辉(1985—),男,山东济南人,硕士,助理研究员,主要从事食用菌栽培研究工作。E-mail:1150832936@qq.com。

1.2 试剂与仪器

十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 简称 CTAB) 抽提液; 2% CTAB (50 ~ 100 mg/L), 100 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.0; 20 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, 简称 EDTA); Bio - Rad C1000 PCR 仪; DYY - 12 型电泳仪, 北京六一仪器厂; GL - 20G - II 高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂。

1.3 草菇菌丝体的制备

将草菇马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 试管菌种接种在 PDA 液体培养基中, 35 °C 摇床培养 8 d, 收集菌丝, 称取 1 g 菌丝用滤纸包好, 保存于 -20 °C 备用。

1.4 基因组 DNA 的提取

取 1 g 菌丝放入研钵中, 加入液氮迅速研磨成粉末, 将粉末转入 7 mL 离心管中, 用 CTAB 法提取 DNA, 于 -20 °C 保存备用, 具体操作参考熊芳等的试验方法^[5-6]。

1.5 PCR 扩增

供试的 RAPD、ISSR 引物序列参照江玉姬等的研究^[7]。RAPD、ISSR 这 2 种标记的 PCR 反应体系组分见表 2。RAPD PCR 程序设定如下: 94 °C 预变性 7 min; 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温。ISSR PCR 程序设定如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温。电泳扩增方法: 取 10 μL 扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 保

持 160 V 恒压, 电泳时间为 1.5 h, 通过紫外凝胶成像系统观察并拍照。

表 2 25 μL PCR 反应体系

成分	原浓度	体积 (μL)	使用浓度
模板	100 ng/μL	1.0	4 ng/μL
buffer (Mg ²⁺)	10 ×	2.5	1 ×
dNTP	2.5 mmol/L	1.5	0.3 mmol/L
引物	10 μmol/L	1.0	0.4 μmol/L
Taq DNA 聚合酶	5 U/μL	0.3	0.06 U/μL

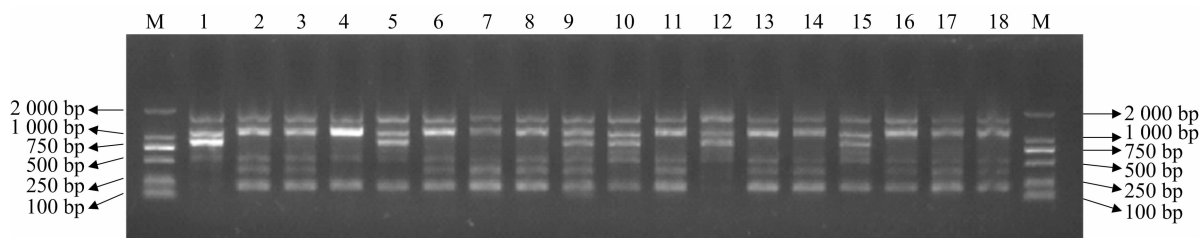
1.6 聚类分析

根据电泳图上的扩增片段进行统计, 有相应多态性条带的记为“1”, 无相应多态性条带的记为“0”, 将统计形成的“0-1”数据表输入 NTSYS - PC V2.10 数据统计分析软件中, 采用平均连锁法 (UPGMA) 进行聚类分析, 生成遗传聚类图。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增全模板电泳结果

选用 17 条扩增条带清晰、稳定的 RAPD、ISSR 引物, 通过 PCR 扩增获得 DNA 指纹图谱 (图 1、图 2)。可以看出, 每个引物对不同菌株扩增得到的 DNA 条带数不等, 一般为 3 ~ 13 个, 绝大多数扩增片段大小为 200 ~ 2 000 bp; 部分扩增产物片段为所有菌株共有, 说明草菇菌株基因组的相应结合位点比较保守, 该区域可作为草菇菌株物种特征遗传信息。



M—DNA marker DL 2000。泳道 1~18 对应表 1 中 1~18 号草菇菌株

图 1 RAPD 引物 S1010 对供试菌株的扩增结果

2.2 PCR 扩增产物的多态性分析

采用 17 条引物对 20 个草菇菌株进行遗传多样性分析, 结果显示, 17 条引物均能扩增出稳定性强、可重复性高且多态性丰富的带型。由表 3 可见, 不同引物所扩增条带的多态性频率不同, 引物 S227、S380、S1010、811、864、868 所扩增条带的多态性位点频率均达到 100.00%, 17 条引物所扩增条带的平均多态性频率为 73.18%。另外, 由 17 条随机引物

扩增得到的共 123 个 RAPD、ISSR 位点中, 有 92 个位点具有多态性, 其多态性频率为 74.80%。试验结果表明, 草菇菌株之间具有丰富的遗传多样性。

2.3 基于 RAPD、ISSR 的系统综合聚类结果

通过 NTSYS - PC 聚类分析软件分析得出, 草菇菌株之间的遗传多样性比较丰富。此外, 借助 RAPD、ISSR 分子标记技术可以将 20 株菌株完全区分开。由图 3 可以看出, 亲缘关系较近的菌株有 13

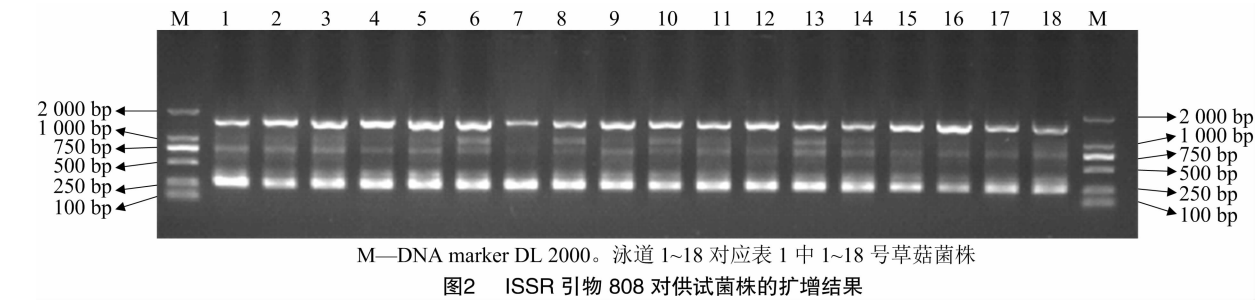
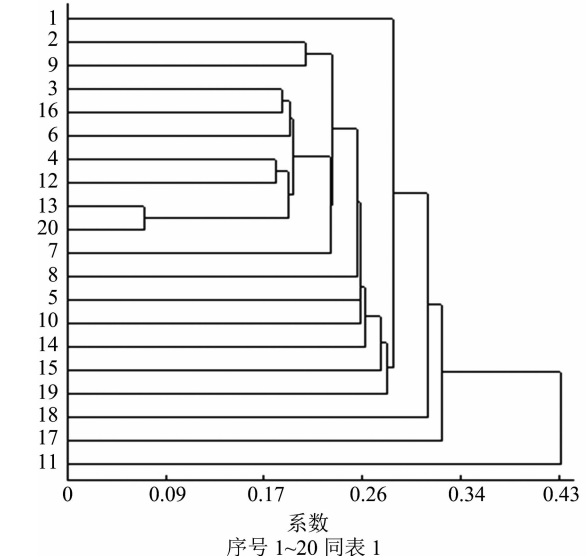


表 3 供试菌株的 RAPD、ISSR 多态性位点统计结果			
随机引物	RAPD、ISSR 位点数 (个)	多态性位点数 (个)	多态性比率 (%)
S33	8	4	50.00
S147	5	3	60.00
S227	6	6	100.00
S230	3	1	33.33
S234	4	2	50.00
S380	5	5	100.00
S1010	7	7	100.00
S2111	4	3	75.00
808	12	5	41.67
809	8	3	37.50
811	9	9	100.00
834	12	11	91.67
864	8	8	100.00
868	5	5	100.00
873	13	12	92.31
891	8	5	62.50
893	6	3	50.00
合计	123	92	73.18



号、20 号;11 号草菇(上海草菇)菌株与其他草菇菌株之间的亲缘关系较远。在相似系数为 0.21 左右处,可以将 20 株菌株分为 13 类;有 11 株菌株为单独的 1 类,分别为 1、7、8、5、10、14、15、19、18、17、11 号菌株;第 12 类为 2、9 号菌株;第 13 类为 3、4、6、16、12、13、20 号菌株。

3 讨论

草菇是我国重要的食用菌品种之一,属于高温菌,目前对草菇遗传物质的研究尚较少。草菇是初级同宗结合的食用菌,与其他食用菌相比,其有性后代存在更加广泛的遗传变异。余志晟等利用 RFLP、RAPD 方法对国内 12 株草菇栽培菌株进行分析,结果表明,菌株间的平均相似系数为 0.707^[17];江玉姬等利用 RAPD、ISSR、相关序列扩增多态性

(SRAP)3 种分子标记对来自不同地区的 74 株草菇菌株进行遗传多样性分析,结果表明,菌株之间的相似系数范围为 0~0.79,具有较丰富的遗传多样性^[7]。韦仕岩等借助筛选到的 9 个 ISSR 引物对 17 株草菇菌株基因组 DNA 进行了遗传差异分析,结果表明,草菇菌株之间的相似系数为 0.63~0.95^[18]。

4 结论

本研究选用 17 条多态性高、分辨率强的 RAPD、ISSR 引物对收集到的 20 份草菇种质 DNA 进行扩增,结果表明,草菇 RAPD、ISSR 带型表现出较高的多态性,多态性带型占 74.80%。可见草菇菌株之间虽然存在差异性,但是差异较小,缺少差异性较大的资源,因此今后应加强草菇种质资源的挖掘。本研究结果为草菇菌株聚类分析及品种选育提供了分子水平的依据。

参考文献:

[1] 黄 毅. 食用菌栽培[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2008: 10-22.

廉晓娟,王艳,梁新书,等. 不同施肥水平对设施番茄中微量元素吸收的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):197-200.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.038

不同施肥水平对设施番茄中微量元素吸收的影响

廉晓娟,王艳,梁新书,杨军,王正祥

(天津市农业资源与环境研究所,天津 300192)

摘要:通过田间小区试验的方法,研究不同施肥水平对设施番茄中微量元素吸收的影响,结果表明,不同处理中微量元素的吸收量总体表现为叶>茎>果,叶片的中微量元素的吸收量表现为 $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Cu}$,茎和果实的 Ca 、 Mg 吸收量较高,其次为 Zn 、 Fe 吸收量, Mn 、 Cu 吸收量较低。高肥力土壤,氮磷钾施用量低的处理 T1 茎、叶的中微量元素含量和吸收量大多明显高于施肥量高的处理 T2、处理 T3,不施肥处理 T4 的植株中微量元素含量较高,但由于干物质积累量较低,元素吸收量也低,因此施肥量过高或不施肥都会影响植株对中微量元素的吸收,应根据番茄吸肥特性和土壤肥力条件确定氮、磷、钾施用量。

关键词:番茄;施肥水平;中微量元素;土壤肥力;元素分配;元素吸收量

中图分类号: S641.206 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0197-04

番茄是人们喜爱的蔬菜品种,是目前设施栽培最广泛的蔬菜品种之一^[1],富含维生素和氨基酸等

人体必需的营养物质,其产量和品质与施肥密切相关^[2]。在实际生产中,由于缺乏合理的养分管理措施,过量施用氮磷钾肥料现象普遍,导致作物营养失调、果实品质和肥料利用率下降^[3-5],进而可能影响中微量元素的有效供应^[6]。微量元素在作物体内含量虽少,但它是植株体内酶或辅酶的组成部分,具有很强的专一性,是作物正常发育所不可缺少或不可替代的一部分。因此,当作物缺乏任何一种微量元素时,生长发育都会受到抑制^[7]。目前国内研究主要集中于不同施肥条件对番茄产量、品质

收稿日期:2019-10-11

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2015BAD23B01-5);天津市科技计划(编号:17YFZCNC00280)。

作者简介:廉晓娟(1977—),女,山西孝义人,硕士,副研究员,主要从事设施蔬菜水肥高效利用技术研究。E-mail: xiaojuan_lian@163.com。

通信作者:王艳,硕士,副研究员,主要从事设施蔬菜水肥高效利用技术研究。E-mail: wangyanzhs@sina.com。

[2]邓优锦,朱坚,谢宝贵. 图说草菇栽培关键技术[M]. 北京:中国农业出版社,2011:6-9.

[3]张树庭. 草菇[M]. 香港:香港中文大学出版社,1975:17-19.

[4]罗贵伦. 草菇的营养价值[J]. 四川食品工业科技,1995(3):49-53.

[5]熊芳,郑闽江,刘新锐,等. 鲍鱼菇种质资源 SCAR 标记的建立及其初步应用[J]. 中国农学通报,2010,26(11):330-335.

[6]傅俊生,刘新锐,谢宝贵,等. 草菇 SCAR 遗传标记建立及其杂种鉴定应用[J]. 中国农学通报,2010,26(17):41-46.

[7]江玉姬,邓优锦. 74 株草菇遗传多样性分析[J]. 核农学报,2015,29(11):2084-2092.

[8]龚利娟,李玉,刘淑艳. 香菇品种遗传多样性 RAPD 分子标记的研究[J]. 菌物研究,2005,3(1):17-21.

[9]王秀全,江玉姬,刘维侠,等. 利用 RAPD 标记金针菇的亲缘关系研究[J]. 菌物学报,2005,24(增刊1):142-146.

[10]辜运富,张小平,陈强袁,等. 双孢蘑菇种内多态性的 AFLP 分析[J]. 西南农业学报,2003,16(4):39-43.

[11]黄晨阳,张金霞,郑素月,等. 刺芹侧耳 rDNA 的 IGS2 多样性分析[J]. 农业生物技术学报,2005,13(5):592-595.

[12]唐利华,肖扬,边银丙. 中国黑木耳主要栽培菌株 ISSR 指纹分析及 SCAR 标记[J]. 菌物学报,2008,27(2):243-251.

[13]陈美元,廖剑华,王波,等. 中国野生蘑菇属 90 个菌株遗传多样性的 DNA 指纹分析[J]. 食用菌学报,2009,16(1):11-16.

[14]任广明,李镇华,郭兴,等. 黑木耳栽培菌株亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 东北林业大学学报,2011,39(5):99-101.

[15]吕长武,吕杰,陈恒雷,等. RAPD 分子标记在食用菌研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(1):77-80.

[16]冯伟林,蔡为明. ISSR 分子标记分析杏鲍菇菌株的遗传并差异研究[J]. 中国食用菌,2009,28(1):47-49.

[17]余志晟,吕作周. 草菇栽培菌株 DNA 多态性 PCR-RFLP 和 RAPD 分析[J]. 中国农学通报,2005,21(6):58-62.

[18]韦仕岩,吴圣进. 草菇菌株的 ISSR 遗传差异分析[J]. 热带作物学报,2013,34(11):2209-2213.

[19]孙勇,林芳灿. 中国香菇自然种质遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 菌物系统,2003,22(3):387-393.

[20]边银丙,宋小亚. 几种新型 DNA 分析标记及其在食用菌研究中的应用[J]. 食用菌学报,2006,13(1):78-81.