

白平菇不同菌株菌丝体的 RAPD 分析及系统进化关系的研究

宿红艳, 王磊*, 刘林德, 蔡德华
(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 本研究采用 RAPD 技术分析白平菇四个不同株系的 DNA 序列多态性, 用 15 个随机引物对菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 其中 3 个引物可以扩增出较好的多态性条带图谱, 共产生 66 条清晰稳定的带。通过对供试菌株遗传相似系数的计算和系统聚类分析, 构建了树状聚类图谱, 在分子水平上分析了白平菇的种质遗传学差异, 为白平菇菌株鉴定提供快速有效的技术和方法。

关键词: 白平菇; RAPD 分析; 遗传相似系数; 系统进化关系

RAPD Analysis and Phylogenetic Study of Cultivated Mycelia of *Pleurotus ostreatus*

SU Hong-yan, WANG Lei*, LIU Lin-de, CAI De-hua
(College of Life Sciences, Lu Dong University, Yantai 264025, China)

Abstract: Four strains of *Pleurotus ostreatus* were analysed by RAPD (random amplified polymorphic DNA) to investigate the polymorphism of their DNA sequences. The results showed that 3 of 15 arbitrary primers could produce 66 obvious and stable DNA bands. The dendrogram was constructed by the similarity coefficient calculation and phylogenetic analysis. This is a rapid and efficient technique to identify the strains of *P. floridaensis*, and analysis their genetic distance on molecular level.

Key words *Pleurotus ostreatus*; RAPD analysis; similarity coefficient; phylogenetic relationship

中图分类号: S646

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0283-03

白平菇(*Pleurotus ostreatus*)是我国栽培面积最广的食用菌品种, 属伞菌目(*Agaricales*), 多孔菌科(*Polyporaceae*), 侧耳属(*Pleurotus*)。白平菇肉白质嫩, 蛋白质、必需氨基酸含量高, 并含有多种维生素和人类必需的矿物元素。此外, 白平菇在抗肿瘤、降血压、降胆固醇等方面的作用也多有报道^[1]。因此, 白平菇是大众喜欢的保健食品, 具有较高的经济价值。但是由于白平菇种类多, 分布广泛, 菌种命名十分混乱, 同名异物、同物异名现象严重。而其子实体外部形态易受环境条件的影响, 使得传统上单纯以形态特征为依据进行分类比较困难, 这为产业技术的规范、新菌种的育种带来不便^[2]。

分子标记作为分子生物学的一个重要技术, 已广泛地应用于人类真菌性疾病病原菌的分型及检测鉴定、真菌分离培养菌株的鉴定分析、遗传图谱的构建、基因定位、基因克隆及遗传多样性分析等方面的研究。食

用菌是最早被人类开发和利用的一类真菌, 关于其分子标记的研究也越来越广泛, 其中以 RAPD、RFLPs、AFLPs 最多^[3]。

本研究应用分子生物学技术对液体培养的白平菇菌丝体基因组 DNA 进行 RAPD 分析, 并通过聚类探讨它们之间的亲缘关系, 为白平菇的菌种鉴别提供了分子水平的依据, 并为遗传学研究和育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

所有菌种均由鲁东大学食用菌研究室提供, 经过液体培养, 得到的菌丝体在 -20℃ 冰箱内保存待用。供试菌株及编号见表 1。

1.1.2 培养基

收稿日期 2007-05-17

*通讯作者

基金项目: 山东省农业良种工程项目(鲁科农字 2002228); 山东省教育厅科技计划项目(J06N02);

鲁东大学校基金项目(20063301)

作者简介: 宿红艳(1976-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为菌物分子生物学。

表1 供试菌株及编号
Table 1 Tested strains and their numbers

菌株名	烟白 PL818	yt-4(Co ⁶⁰ 辐射)	大白 P81	济白 P96
编号	1	2	3	4

固体培养基(PDA 培养基): 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 蛋白胨 2g, MgSO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 1g, KH₂PO₄ 0.46g, 琼脂 20g, H₂O 1L。不加琼脂即为液体培养基。

1.1.3 试剂

Taq DNA 聚合酶、10 × PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTP 和 DNA Marker (DL 2000) 大连宝生物工程有限公司 (Takara); RNaseA Promaga 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的液体培养

将适龄的斜面菌种接种到装有液体培养基的三角锥形瓶中, 25℃振荡培养 6~7d。将培养好的菌丝体用纱布过滤并挤干水分后, 收集到 10ml 的离心管中, 在无菌冰箱中低温保存以备用。

1.2.2 基因组 DNA 的提取

将菌种活化后接种于 PDA 液体培养基中, 于 25℃摇床中 150r/min 培养 10d, 用 400 目铜网收集菌丝, -70℃保存备用。DNA 提取采用 Lee & Taylor 法^[4], 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, -20℃保存备用。

RAPD 引物筛选及扩增体系优化。分别对模板浓度、dNTP 浓度、引物浓度和 Taq 酶浓度设置不同的浓度梯度进行优化。

引物 选用上海生物工程技术有限公司生产的随机引物 S21-S40(表 2)。通过对 20 条随机引物进行 PCR 反应, 根据扩增条带的有无、条带的数量、可重复性、特异性及谱带的强弱, 选择 3 个引物用于不同菌株的扩增。

表2 随机引物编号及序列
Table 2 List of arbitrary primers and their sequences

编号	序列(5'→3')	编号	序列(5'→3')
S21	CAGGCCCTTC	S31	CAATCGCCGT
S22	TGCCGAGCTG	S32	TCGGCGATAG
S23	AGTCAGCCAC	S33	CAGCACCCAC
S24	AATCGGGCTG	S34	TCTGTGCTGG
S25	AGGGGTCTTG	S35	TTCCGAACCC
S26	GGTCCCTGAC	S36	AGCCAGCGAA
S27	GAAACGGGTG	S37	GACCGCTTGT
S28	GTGACGTAGG	S38	AGGTGACCGT
S29	GGGTAACGCC	S39	CAAACGTCGG
S30	GTGATCGCAG	S40	GTTGCGATCC

扩增反应体系: 总体积为 25 μl, 其中 10 × PCR 缓冲液 2.5 μl、Mg²⁺ (2.5 mmol/L) 1.5 μl、dNTP (2.5 mmol/L each) 2.0 μl、随机引物 (2.0 μmol/L) 5.0 μl、Taq DNA 聚合酶为 1U (大连宝生物工程有限公司)、DNA 模板 10ng, 阴性

对照为 ddH₂O。

1.2.3 PCR 扩增程序及扩增产物检测

扩增程序为: 94℃预变性 5min, 94℃变性 1min, 36℃退火 1min, 72℃延伸 80s, 反应 45 个循环后, 72℃补平 10min 结束反应。扩增产物用 1.3% 琼脂糖凝胶 (西班牙产) 电泳分离, 以 DNA Marker (DL, 2000) 为标准分子量标记, 经 EB 染色, 用凝胶成像仪记录结果。

1.2.4 数据处理及聚类分析

根据某一条谱带在样品中的出现和不存在分别赋值为 1 和 0, 统计各菌株的扩增条带数, 按照 UPGMA 算法对 4 个菌株 RAPD 的综合统计结果进行聚类分析。

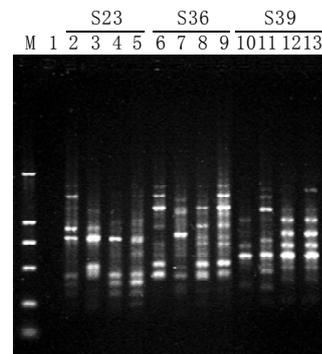
2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

本实验采用 SDS 法提取了白平菇四个株系的总 DNA, 经 1.3% 的琼脂糖凝胶、1 × TAE 缓冲液电泳检测, 发现 DNA 条带清晰、整齐、无拖尾现象。由此可见, 提取的四个株系的基因组 DNA 完整性较好、纯度较高, 可用于本实验的研究。

2.2 RAPD 扩增结果

15 条随机引物中有 3 条引物 S23、S36 和 S39 的 RAPD 图谱呈现明显的多态性 (见图 1), 共产生 66 条清晰、稳定的条带, 扩增片段集中分布在 0.2~2.0kb 之间, 表明供试菌株表现出丰富的遗传多样性。



M. 分子量标准 (DL 2000); 1. 为未加模板的空白对照。

图1 由引物 S23、S36、S39 扩增的 4 个供试菌株的 DNA 指纹图谱

Fig.1 DNA fingerprint profiles of 4 strains tested amplified by three arbitrary primers of S23, S36 and S39 respectively

2.3 聚类分析

用 Popgen32 软件对所得扩增图谱的统计数据进行处理, 得出白平菇 4 种株系之间的遗传相似系数矩阵 (见表 3)。由表 3 可以看出, 4 种菌株相互间的遗传相似系数在 0.4383~0.7778 之间, 其中 1 号和 3 号的相似系数最大, 为 0.7778, 说明它们之间的亲缘关系较近; 而 2 号

和4号的相似系数最低,为0.4383,亲缘关系最远。

表3 供试菌株基因间的相似性系数矩阵
Table 3 Similarity coefficient matrix based on RAPD of strains tested

菌株编号	1	2	3	4
1	1.0000			
2	0.4644	1.0000		
3	0.7778	0.5185	1.0000	
4	0.7407	0.4383	0.7526	1.0000

按照UPGMA法对供试菌株遗传多样性进行聚类分析,得到聚类分析图(图2)。从图中可以看出,当相性达到0.7407时,1号(烟白PL818)、3号(大白P81)、4号(济白P96)聚为一类,而经辐射育种的2号(yt-4)独立为一类。前者又可被分为2个亚组:1号和3号菌株聚为一亚组;而4号菌株独自为一亚组。以上分析结果表明,说明1号和3号菌株之间亲缘关系较近,而其余各菌株之间亲缘关系较远。

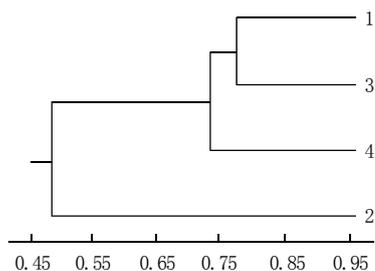


图2 供试菌株相似系数聚类分析图
Fig.2 Dendrogram generated from the similarity coefficient matrix of strains tested

3 讨论

食用菌菌株受环境条件等因素的影响,其大小、形状、颜色、质地往往具有一定的不确定性,这给鉴定和育种带来不便,而以遗传标记为手段的现代生物技术则能较好地克服上述弊端。RAPD技术是利用随机引物对不同生物种群基因组DNA进行扩增,由于不同物种或个体之间的总DNA序列由于插入、缺失、重组等突变产生差异,其与引物的结合位点以及结合位点之间的距离都会有所不同,因而经过PCR扩增后的DNA片

段具有多态性,能够从DNA分子水平反映出物种的遗传差异^[5]。RAPD技术已经成功地运用于一些真菌不同种的区分^[6-9],特别对于命名混乱、遗传背景知识缺乏的菌种的区分和鉴定是一种十分有效的手段。本研究采用RAPD技术,探讨白平菇*Pleurotus ostreatus*栽培菌株之间的遗传多样性以及它们相互之间的相似系数和遗传距离,研究结果表明RAPD技术可用于白平菇不同品种的快速区分和鉴定,三种引物的扩增图谱带形丰富、差异明显,尤其是引物S23和S36均有特异性条带,可以很好的将4个种区分开。通过聚类得到的进化树表明目前的当家品种大白P81和烟白PL818归为一类,表明它们的亲缘关系较近,它们可能与济白P96来源于一个共同的株系,而辐射品种yt-4则和它们亲缘关系较远。根据Kurtzman(1987)在进行研究时,相似系数在0.7以上的菌株同种的观点,并按照国际分类委员会的建议:DNA同源性70%作为定种的界线,即大于等于70%为同一个种群,小于70%为不同的种群^[10],可以推测yt-4(辐射品种)为白平菇的一个变种。

参考文献:

- 贾身茂. 中国平菇生产[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 1-210.
- 郑素月, 张金霞, 王贺祥, 等. 我国栽培平菇近缘种的多相分类[J]. 中国食用菌, 2003, 22(3): 3-6.
- 马富英, 罗信昌. 分子标记在食用蕈菌遗传育种中的应用[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 147-151.
- LEE S B, TAYLO J W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores[M]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR protocols: a guide to method and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 282-287.
- STOTT K, DESMERGER C, HOLFORD P. Relationship among *Lepista* species determined by CAPS and RAPD[J]. Mycological Research, 2005, 109(2): 205-211.
- ZHANG Y F, FRANCIS I M. Studies on the differentiation of *Lentinula edodes* strains by RAPD assay[J]. Acta Edulis Fungi, 1994(1): 22-27.
- 鲍大鹏, 王南, 陈明杰, 等. 同工酶和RAPD技术对柳松菇*Agrocybe aegerita*菌株遗传多样性的分析[J]. 农业生物技术学报, 2000(8): 284-285.
- 李三暑, 林新坚, 陈惠成, 等. 姬松茸与双孢蘑菇不同菌株的RAPD扩增研究[J]. 食用菌学报, 2002(9): 1-4.
- 王淑珍, 白晨, 范俊, 等. 灵芝与糙皮侧耳原生质体融合子基因组RAPD分析[J]. 食用菌学报, 2003, 10(1): 1-5.
- KURTZMAN C P, SMILEY M J, ROBBETT C J, et al. DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus-Flavus* group[J]. Mycologia, 1987, 78(6): 955-959.