

RAPD 分子标记在食用菌研究中的应用

[作者] 吕长武, 吕杰, 陈恒雷, 曾宪贤

[单位] 新疆大学离子束生物工程中心, 新疆大学物理系

[摘要] RAPD 分子标记以其简单、快速、经济等优点正在被广泛应用于食用菌的研究中。RAPD 分子标记克服了传统的标记手段和形态分类学的缺点, 在食用菌种质的鉴定和遗传多样性研究, 在亲本和杂交种的鉴别以及在基因克隆与分离和遗传图谱的建立等研究中都起着重要的作用。RAPD 分子标记为食用菌的深入研究提供了强有力的工具和手段, 其应用和发展前景广阔。

[关键词] 分子标记, RAPD, 食用菌

中图分类号 Q819

中国生物工程杂志 China Biotechnology, 2006, 26(1):77~80

*国家发改委高技术产业化示范工程资助项目([2004] 2077)

随着分子生物学的发展, 利用分子标记研究生物的系统进化、遗传变异、基因定位、分离与克隆等已成为近年来研究的热点。分子标记是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 是 DNA 水平遗传变异的直接反映。由于分子标记与以往的遗传标记相比有着许多优越性, 因此它们在食用菌的亲本鉴定、菌株及杂合子鉴定、遗传变异、基因分离与克隆等方面已得到了广泛的应用。目前已经开发了几十种基于 DNA 序列多态性的分子标记, 其中以 RFLP、RAPD 和 rDNA 标记较为广泛地应用于食用菌。本文综述了 RAPD 分子标记的原理及其在食用菌研究中的应用。

1RAPD 分子标记的原理及特点 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 即随机扩增多态性 DNA, 是 1990 年由 Williams [1] 和 Welsh [2] 领导的两个研究小组几乎同时独立发展起来的。它是建立在 PCR 基础之上, 使用一系列具有 10 个碱基的单链随机引物, 对整个基因组 DNA 进行 PCR 扩增以检测多态性。由于不同引物扩增出的 DNA 片段不同, 因此存在着大量的 RAPD 标记。由于整个基因组内存在众多反向重复序列, 因此需对每一随机引物单独进行 PCR, 单一引物结合在反向重复序列上, 在其之间的区域内, 若遗传特性发生变化, 经 PCR 扩增后, 则导致一系列 PCR 产物表现差异性, 由于使用一系列引物, 几乎整个基因组差异都会显露出来, 经聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离后, 通过 EB 染色或放射自显影就可检测出被扩增的 DNA 多态性。

与 RFLP、AFLP、微卫星标记相比, RAPD 标记具有操作简单、不需要放射性元素、DNA 需要量极少、无需知道 DNA 的序列信息以及技术成本低的优点。此外其优点还体现在: 具有极大的丰富性, 能反映整个基因组的变化; 极大的探测性, 无需合成特定序列引物; 高效性与灵敏性, 可在短期内获得大量多态 DNA 片段, 只要遗传特异性发生变化, 即使亲缘关系非常近的个体也能识别。由于 RAPD 具有简便、快速、费用低、分子识别率高、对环境污染小等优点, 因而它在食用菌研究中被广泛应用。

2RAPD 分子标记在食用菌研究中的应用

2.1 亲本菌株的鉴定及亲缘关系和遗传多样性研究

目前对多种食用菌的生活史和遗传背景还不十分清楚, 这给食用菌遗传研究工作带来很大困难。菌株的亲缘关系和食用菌遗传资源在以往的文献报道中通常以其地理位置、经济性状等进行收集, 利用传统的菌体形态、生长特性及生理生化反应特征加以区别不同亲本。这种方法受环境因素影响, 往往难以对形态差异较小的种间和种内菌株加以鉴别, 给杂交亲本

的选择带来很大困难。利用 RAPD 分子标记技术选择亲本可克服传统方法的缺点, 利用分子标记所揭示的多态性通过各种数量分析的方法计算相似系数, 进行聚类 and 排序分析, 确立供试菌株的亲缘关系或进行种内遗传多样性研究。有关这方面的研究报道较多。

物种间 DNA 相似性的高低, 决定其亲缘关系的远近。通过特定分子量大小的共迁移带的研究, 人们可能了解物种进化的历程, 以及物种在属、种水平上的亲缘关系。孙勇等 [3] 用 RAPD 技术分析了收集自中国 14 个省份、分属于 8 个不同植物区系的 53 个野生香菇菌株的 DNA 多态性, 研究表明中国香菇自然群体具有丰富的遗传多样性。李三暑等 [4] 以 4 个姬松茸菌株和 2 个双孢蘑菇菌株为材料, 用 20 个随机引物对它们进行 RAPD 扩增。结果表明, 进行 RAPD 扩增的 20 个随机引物中, 有 12 个能产生 3 种带型。当遗传相似系数升至 0.8713 时, 这 6 个菌株被分为 3 类。邓旺秋等 [5] 利用 RAPD 标记对广东省 8 个草菇主要栽培菌株的亲缘关系和遗传多样性进行研究, 获得了草菇不同菌株的 DNA 指纹图谱, 为草菇商业菌株的鉴别提供了快速有效的技术手段。闫培生等 [6] 利用 RAPD 标记以银耳属的 2 个种为外类群研究了木耳属 8 个种的分子系统发育关系。把木耳属的 8 个种分成 3 个明显不同的组, 种间发育关系表明角质木耳和毛木耳应是 2 个不同的种而非同种异名, 子实体横切面中髓层的有无并不表明不同种间亲缘关系的远近。陈作红等 [7] 对 26 种鹅膏菌属 (*Amanita*) 真菌进行了 RAPD 分析, 结果表明 RAPD 谱带能将 26 种鹅膏菌完全区分开, 与形态分类基本相吻合。Fukuda 等 [8] 对姬松茸 (*Agaricus blazei*) 的 7 个日本栽培种和 1 个巴西栽培种进行了 RAPD 和聚类分析, 结果与同工酶分析和 RFLP 分析的结果一致, 把 8 个种分成了两大类。Zervakis 等 [9] 用 RAPD 对刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*) 进行基因多样性的研究和分类。结果分析表明, 地中海的刺芹侧耳的物种演化是自身繁衍生殖和外在地理环境共同作用的结果。

2.2 杂交种和种质鉴定研究

种质鉴定和杂交种的鉴别是育种研究工作中的一个关键问题。食用菌的遗传育种方法通常有原生质体融合、杂交和双单核杂交。运用 RAPD 技术对融合子和其亲本进行聚类分析和相似系数分析, 可以判断原生质体融合是否成功, 染色体是否发生了交换。另外, 也可以对非对称杂交和普通杂交亲本和杂交后代进行 RAPD 分析, 用树状聚类分析图直观表明杂交菌株之间的相关性, 从而能更有效地选育优势杂交后代。

陈明杰等 [10] 应用 RAPD 技术对香菇细胞融合菌株和亲本菌株进行分析, 根据扩增的 DNA 指纹图谱, 估算了融合子与亲本的相似系数, 表明可用于香菇细胞融合菌株的遗传鉴定。赵勇等 [11] 采用 RAPD 技术对香菇 3 个亲本双核体 (苏香、野生 46# 和野生 80#) 及其 10 个单核体、以及它们的 10 个杂交后代进行了遗传差异和亲缘关系研究。结果表明, RAPD 标记检测的多态性要远远高于酯酶同工酶标记, 杂交子和以苏香为来源的单核体亲本之间 RAPD 标记遗传距离与香菇产量超亲优势也存在极显著正相关。王淑珍等 [12] 根据 RAPD 原理, 研究了 4 种随机引物共检查了灵芝的 52 个位点, 2 株融合子的 117 个位点 (平均每株 58.5 个), 糙皮侧耳的 40 个位点, 表明融合子与两亲本基因组中的遗传位点总数有差别。李荣春 [13] 利用 RAPD 技术研究自育的同核体菌株间的交配试验, 结果表明, 在检验人工杂交试验方面, 随机扩增多态 DNA 是一种非常有效的方法。覃琦 [14] 利用 RAPD 技术对香菇非对称杂交的亲本与后代之间的遗传相关性进行了分析。结果表明非对称杂交后代的遗传距离与单核受体较近而与双核供体遗传距离较远。闫培生等 [15] 利用 RAPD 技术对木耳属不同种和种内不同菌株进行了分子鉴定。结果表明 RAPD 技术可有效地用于木耳属种或菌株的快速准确鉴定。李荣春 [16] 研究了野生双孢蘑菇菌株 96.4 (*Agaricus bisporus*) 和它的 10 个单孢菌株的生长发育和遗传变异。结果表明在菌株 96.4 和它的单孢菌株之间, 在 10 个单孢菌株之间, 在菌丝生长速度和随机扩增多态 DNA (RAPD) 等方面都存在着明显的变异。RAPD 指纹揭示了 96.4 菌株通过有性生殖产生的丰富的生物学变异。因此, RAPD 分子

标记技术对食用菌优良菌株的鉴定以及种质资源的保护都有着重要的意义。

2.3 基因定位、分离与克隆研究

在染色体组学研究中,大量的分子标记已被构建,一批遗传基因正在被分离和克隆。上世纪80年代末,双孢蘑菇的基因分离便已开始,Loftus等[17]找到一个与双孢蘑菇子实体颜色、形状、强度连锁的RAPD标记。曾伟等[18]应用RAPD技术进行差异显示,克隆到一个与双孢蘑菇子实体品质相关的DNA片段。詹才新等[19]以传统的形态,生理生化分析和最新的DCS-PDMA性亲和性测定方法为基础,结合群体分离分析和RAPD技术对来源于同一双孢蘑菇异核体菌株的12个不育同核原生质体个体进行分析,筛选与性亲和性相关的分子标记,筛选到一个与性亲和性相关的分子标记OPA161500,从而为间接利用双孢蘑菇本身特有的交配型作标记指导杂交育种工作,及为进一步将其性亲和性基因定位分离克隆奠定了基础。此外,有关草菇的漆酶基因[20]、不饱和脂肪酸基因[21]、纤维素酶基因[22]、低温诱导基因[23],灰盖鬼伞的 $clp1$ 基因[24]和控制灰盖鬼伞开伞的 $ich1$ 基因[25]的定位及克隆也有大量报道。

毫无疑问,随着基因工程技术的不断完善,将会有更多的基因被分离,从而为食用菌育种转基因研究提供丰富的基因资源。

2.4 遗传图谱的建立

食用菌的遗传图谱相对植物、动物和其它微生物较为落后。近年来,分子标记已用于食用菌遗传图谱的构建,但仅构建了双孢蘑菇和糙皮侧耳的遗传连锁图。Kerrigan等[26]建立了包括同工酶、RFLP、RAPD、rDNA重复序列以及少量外部表型性状等多种标记的双孢蘑菇遗传连锁图。混合标记连锁图的建立为今后进一步分析双孢蘑菇的遗传行为,定位、克隆有关基因提供了一个很好的参照标尺。Larrya等[27]以RAPD标记为主,辅以RFLP、同工酶、表型交配因子标记,得到了189个位点的糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)遗传图谱,分属11个连锁群,该图谱覆盖的基因组总长度为1 000.7cM,标记间平均距离为35.1kb/cM。高密度的遗传连锁图可用于设计育种对策;定位感兴趣的基因,特别是控制数量性状的基因;分析在食用菌中普遍存在的染色体长度多态性的分子基础等。Larraya等[28, 29]在糙皮侧耳遗传图谱上研究了控制产量和质量的数量性状位点,为分子标记辅助育种提供了一种途径。随着新的DNA标记技术的发展,遗传图谱上的标记将不断增加,密度越来越高。

3 结语对于食用菌种质群鉴定和多样性评价,RAPD是一个简单、经济、快捷的技术工具。RAPD分析便于绘制简单的数量性状图谱,已经被用于分析这些基因,鉴定与性状相连锁的分子标记,这将对食用菌育种产生很大的作用。

RAPD标记的缺点是,它只是显性标记且存在重复性。对于RAPD标记的重复性问题,在实际应用中也表现出不足,如显隐位点性,在后代中不能区别是纯合体还是杂合体;还有一个问题是稳定性较差,由于单链引物随机结合在众多反向重复序列上,因而每次得到的实验结果不可能一致。此外, T_m 低的随机引物易受外界条件,如反应体系 Mg^{2+} 浓度等的影响。反应使用不同引物导致产物信号差异太大,无法进行分析。

对于RAPD标记的重复性问题可以通过优化实验参数、转化成SCAR引物、选择合适的引物以及用几个引物只扩增重复性DNA片段等手段来加以克服;对相当数量材料的DNA提取和RAPD分析实现自动化,并利用计算机技术处理DNA分析中得到的数据;采用多种分子标记相结合,优势互补,结合使用不同的分子标记如RFLP、AFLP和微卫星等,比只用一种标记更为有利,由一种标记表现出的缺陷能够通过其它标记来弥补。综上所述,RAPD分子标记为食用菌的研究提供了十分有利的工具和手段,在食用菌的应用及发展前景十分广阔。

参考文献

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531~6535
- [2] Welsh J, Honeycutt R J, McClelland M, et al. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *TAC*, 1991, 82: 473~475
- [3] 孙勇, 林芳灿. 中国香菇自然种质遗传多样性的 RAPD 分析. *菌物系统*, 2003, 22 (3): 387~393
- Sun Y, Lin F C. *Mycosystema*, 2003, 22 (3): 387~393
- [4] 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. *食用菌学报*, 2002, 9 (3): 1~4
- Li S SH, Lin X J, Chen H CH, et al. *Acta Edulis Fungi*, 2002, 9 (3): 1~4
- [5] 邓旺秋, 杨小兵, 李泰辉, 等. 广东省草菇栽培菌株 RAPD 多态性分析. *食用菌学报*, 2004, 1 (3): 1~6
- Deng W Q, Yang X B, Li T H, et al. *Acta Edulis Fungi*, 2004, 1 (3): 1~6
- [6] 闫培生, 蒋家慧, 王东昌, 等. 利用 RAPD 标记构建木耳属种间关系的研究. *菌物系统*, 2002, 21 (1): 47~52
- Yan P SH, Jiang J H, Wang D CH, et al. *Mycosystema*, 2002, 21 (1): 47~52
- [7] 陈作红, 张志光, 张天晓. 鹅膏菌属真菌 RAPD 分析及亲缘关系的研究. *菌物系统*, 2000, 19(1): 51~55
- Chen Z H, Zhang ZH G, Zhang T X. *Mycosystema*, 2000, 19(1): 51~55
- [8] Fukuda M, Ohno S, Kato M. Genetic variation in cultivated strains of *Agaricus blazei*. *Mycoscience*, 2003, 44: 431~436
- [9] Zervakis G I, Venturella G, Papadopoulou K. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology*, 2001, 147(Pt 11) : 3183~3194
- [10] 陈明杰, 谭琦. 应用 RAPD 对香菇融合菌株进行遗传鉴定. *食用菌学报*, 1997, 4(4) : 17~20
- Chen M J, Tan Q. *Acta Edulis Fungi*, 1997, 4(4) : 17~20
- [11] 赵勇, 贺冬梅, 温亚丽, 等. 酯酶同工酶及 RAPD 技术在香菇杂种优势研究中的应用. *菌物系统* 2003, 22 (4): 549~556
- Zhao Y, He D M, Wen Y L, et al. *Mycosystema*, 2003, 22 (4): 549~556
- [12] 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. *食用菌学报*, 2003, 10(1) : 1~5
- Wang SH ZH, Bai CH, Fan J, et al. *Acta Edulis Fungi*, 2003, 10(1) : 1~5
- [13] 李荣春. 随机扩增多态 DNA 在野蘑菇交配试验分析中的应用. *西南农业学报*, 2001, 14 (3): 44~47
- Li R CH. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2001, 14 (3): 44~47
- [14] 谭琦. 用 RAPD 技术对香菇非对称杂交后代遗传性状的分析. *食用菌学报*, 2001, 8(2): 10~14
- Tan Q. *Acta Edulis Fungi*, 2001, 8 (2): 10~14
- [15] 阎培生, 罗信昌, 周启. 利用 RAPD 技术对木耳属菌株进行分类鉴定的研究. *菌物系统*,

2000, 19(1): 29~33

Yan P SH, Luo X CH, Zhou Q. *Mycosystema*, 2000, 19(1): 29~33

[16] 李荣春. 双孢蘑菇 96.4 菌株和单孢后代间的遗传变异. *植物研究*, 2001, 21 (4): 605~610

Li R CH. *Bulletin of Botanical Research*, 2001, 21 (4): 605~610

[17] Loftus M G, Loddler S C, Legg E J, et al. Molecular mushroom breeding. In: Elliott T J ed. *Science and Cultivation of Edible Fungi*. The Netherlands: Balkmia, RchYadam, 1995. 3~9

[18] 曾伟, 宋思扬, 陈融, 等. 应用 RAPD 技术分析两个双孢蘑菇遗传家系. *微生物学通报*, 2000, 27(2) : 132~134

Zeng W, Song S Y, Chen R, et al. *Microbiology*, 2000, 27(2) : 132~134

[19] 詹才新, 凌霞芬, 杨家林. 双孢蘑菇性亲和性相关分子标记的初步筛选. *食用菌学报*, 2002 , 9 (4): 1~8

Zhan C X, Lin X F, Yang J L. *Acta Edulis Fungi*, 2002 , 9 (4): 1~8

[20] Chen S, Ge W, Buswell J A. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 230(2) : 171~176

[21] Sakai H, Kajiwara S. Cloning and functional characterization of a Delta12 fatty acid desaturase gene from the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Mol Genet Genomics*, 2005 , 273(4) : 336~341

[22] 潘迎捷. 国际食用菌研究进展. *吉林农业大学学报*, 1998, 20 (增刊): 64~66

Pan Y J. *Journal of Jilin Agricultural University*, 1998, 20 (suppl): 64~66

[23] 陈明杰, 谭琦, 严培兰, 等. 草菇低温诱导基因的分离. *菌物系统*, 1998, 17(4): 327~330
Chen M J, Tan Q, Yan P L, et al. *Mycosystema*, 1998, 17 (4): 327~330

[24] Inada K, Morimoto Y, Arima T, et al. The *clp1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for A regulated sexual development. *Genetics*, 2001, 157:133~140

[25] Muraguchi H , Kamada T. The *ich1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting. *Development* , 1998, 125 (16): 3133~3141

[26] Kerrigan R W, Royer J C , Baller L M, et al. Meiotic behavior and linkage relationship in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. *Genetics*, 1993, 133: 225~236

[27] Larraya L M, Perez G, Ritter E, et al. Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(12) : 2290~2300

[28] Larraya L M, Alfonso M, Pisabarro A G, et al. Mapping of genomic regions (quantitative trait loci) controlling production and quality in industrial cultures of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3617~3625

[29] Larraya L M, Idareta E, Arana D, et al. Quantitative trait loci controlling vegetative growth rate in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1109~1114

Application of RAPD Molecular Marker to Edible Fungi

L Chang wuL JieCHEN Heng leiZENG Xian xian

(1 Ion Beam Bio Engineering Center, Xinjiang UniversityUrumqi830008, China)

(2 Physics Department, Xinjiang University Urumqi 830046, China)

Abstract RAPD molecular marker was widely applied to the studies of edible fungi due to its simplicity, rapidity and economy. The principle of RAPD molecular marker and its applications to edible fungi were summarized. The applications of RAPD to edible fungi were introduced in species and parental strain identification, genetic diversity, gene clone, gene isolation and the construction of gene linkage map. RAPD molecular marker provides a powerful tool for the studies of edible fungi.

Key words Molecular marker RAPD Edible fungi.