

双孢蘑菇三种类型菌株的 RAPD 扩增研究

陈美元 廖剑华 王泽生
(福建省轻工业研究所, 福州, 350005)

摘要 使用 72 个随机引物, 对三种类型双孢蘑菇菌株 2796(杂交型), 8211(优质型), 01 等(高产型)进行 RAPD 扩增, 发现 26 个引物均产生三种不同的带型。进一步用该 26 个引物作三种类型 9 株双孢蘑菇白色菌株的 RAPD 扩增, 发现引物 U16、U20、B1、H4、H5、M7 可很好地区分三类菌株, 其中尤以 U20 和 H5 为佳, 其产生的三种带型稳定整齐, 差异带明显, 为双孢蘑菇菌株特性的早期预测提供了 DNA 水平的标记。

关键词 双孢蘑菇, RAPD, 菌株类型

继同核不育单孢分离物配对杂交育种、原生质体融合等细胞水平的育种技术之后, 双孢蘑菇的遗传育种已进入了分子水平, 其成果主要有同工酶电泳法鉴定种性^[1], 染色体混合标记连锁图的建立^[2], 纤维素酶、漆酶基因的克隆^[3,4], 性因子的定位^[5]等。而每个成果的取得, 都离不开各种遗传标记在该物种研究上的应用及不断更新。

随机扩增的多态性 DNA(RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA)技术在生命科学的许多研究领域已得到广泛的应用, 包括遗传多态性研究、分类研究、遗传关系分析、某些特定基因标记、作连锁图谱等。这种以 PCR 反应为基础的技术克服了同工酶和 RFLP 等技术的一些缺点, 具有快速、安全、简便、灵敏度高、需样量少的特点。在双孢蘑菇研究中, Xu 等人以 RFLP 和 RAPD 标记为辅助将性因子定位在染色体 I 上^[4], 美国 Amycel 公司找到了一个与双孢蘑菇子实体颜色性状强度连锁的 RAPD 标记^[6], Khush 等则用该技术作了双孢蘑菇遗传亲子的分析^[7]。但由于缺少合适的引物和系统的菌株, 至今在双孢蘑菇遗传育种上尚未得到更为有效的应用。本研究通过多个引物和菌株的 RAPD 试验, 以期找出一种适用于双孢蘑菇菌株种性预测的、操作快速准确的遗传标记。

1 材料与方法

1.1 菌株

双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)杂交菌株(同工酶表型^[1]HG4)2796、3003, 优质菌株(同工酶表型 G)8211、C1、福罐 4, 高产菌株(同工酶表型 H)01、02、沙洲 24-3、126 均由福建省蘑菇菌种研究推广站提供。

1.2 PCR 试剂

1.2.1 Taq 酶:promega 产品, 使用前稀释成 0.5U/ul

1.2.2 10×buffer:Promega 产品

1.2.3 MgCl₂:25mM, Promega 产品

1.2.4 随机引物:Sangon 产品, 稀释成约 3.7uM 使用, 其编号为 U1-U20, B1-B10, H1-H10, X1-X10, M1-M10, R1-R10, W1, W2

1.2.5 dNTPs:华美公司产品, 每种 2.5mM

1.3 总 DNA 模板的提取

按朱衡等的方法^[8]稍作改动。从 PDA 斜面上刮下蘑菇菌丝(约 0.1g), 冰冻后砸碎, 置 1.5ml eppendorf 管中, 加 500ul 提取缓冲液(100mM Tris-Cl, 40mM EDTA, pH8.0)混匀, 加 100ul 10%SDS, 300ul 氯化苄, 旋涡振荡成乳状, 50℃水浴 1hr(每隔 15 分钟颠倒混匀一次), 加 300ul 3M NaAc(pH5.2)混匀, 冰浴 1hr, 台式冷冻离心机上 10000rpm 4℃离心 10 分钟, 上清吸至另一离心管中, 加入等体积异丙醇室温沉淀 20 分钟, 台式离心机 13000rpm 10 分钟, 沉淀用 70%乙醇洗一次, 吹干后溶于 20ul TE(10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH8.0)。使用前用无菌去离子水稀释 5-15 倍(使 DNA 终浓度约为 15-20ng/ul)。

1.4 RAPD 扩增反应^[9]

采用 15ul 扩增体系:在 0.2ml PCR 管(PE 公司产品)中加入 7.3ul 纯水, 1.5ul 10×buffer, 1.2ul MgCl₂, 1ul dNTPs, 1ul 随机引物, 1ul 模板 DNA, 2ul Taq 酶, 混匀后置 PE9600 GeneAmp PCR System 上进行扩增反应:94℃2 分钟, 1Cycle; 94℃ 30 秒, 45℃30 秒, 72℃1 分钟, 42Cycle; 72℃5 分钟, 降至 4℃。PCR 产物加入 5ul 上样缓冲液(50%蔗糖, 0.2%溴酚蓝), 在 1.5%

琼脂糖凝胶上电泳分离，EB 染色照相。

2 结果与讨论

2.1 模板 DNA 的提取

用本方法提取蘑菇总 DNA，得率不太高，且混有一定量的杂蛋白，但这并不影响它成为 PCR 反应的良好模板，因该反应只需微量的 DNA 粗制品。而且因为是小量提取，并省去蛋白抽提步骤，故操作简便快速，可成批提取大量菌株，这对大量菌株(如成批的融合子再生株)的实验室早期 DNA 鉴定将十分有利。

2.2 RAPD 扩增反应

我们以代表双孢蘑菇三种类型的典型菌株 2796(杂交型或 HG4 型)，8211(优质型或 G 型)，SB65 或 01(高产型或 H 型)的总 DNA 为模板，使用 72 个随机引物进行 RAPD 扩增，发现结果不明朗(无带或带模糊)的引物 6 个，只产生一种带型的引物 10 个，产生两种带型的引物 30 个，产生三种带型的引物 26 个(结果未显示)。这 26 个引物为:U1, U7, U8, U10, U11, U12, U16, U18, U20, B1, B5, B8, B10, H1, H4, H5, H7, H8, X5, X7, X9, M2, M4, M5, M7, M8。进一步用这 26 个随机引物对三种类型 9 株双孢蘑菇白色菌株(2796, 3003; 8211, C1, 福罐 4; 01, 02, 沙洲 24-3, 126)进行 RAPD 扩增，发现有 6 个引物可很好地区分三种类型菌株，它们是 U16, U20, B1, H4, H5, M7，其核苷酸序列分别为 CTGCGTGGGA、ACAGCCCCCA、GTTTCGCTCC、GGAAGTCGCC、AGTCGTCCCC、CCGTGACTCA。

其中引物 U20 和 H5 产生的带型稳定清晰整齐，差异带明显，分型效果最好。U16 扩增带强弱差异显著，但位置相同；B1 与 H4 的带型不够清晰，希望通过扩增反应某些参数的变化能得以改善；M7 带型清晰，但 G 型菌株间带型不完全一致(图 1-6)。

3 讨论

在分子水平上，同工酶电泳技术已被成功地应用于双孢蘑菇的种性预测[1]。根据电泳带型可把双孢蘑菇分为高产、优质、杂交、不育四大类型。本文在同工酶分型的基础上，对双孢蘑菇三种类型菌株进行了 RAPD 研究，找到了能区分三种类型菌株的 6 个引物，并从另一个角度证实了同工酶分型的可靠性。

图中具相同带型的菌株并非同一菌株，而是同一类型菌株。这意味着，这几个引物扩增出的差异谱带与菌株的三种性状(高产、优质、杂交类型)可能具有相关性。我们将用这几个引物对更多的双孢蘑菇三种类型典型菌株及一些中间类型的菌株进行 RAPD 扩增试验，以期找出一种较同工酶更为准确、快速的双孢蘑菇实验室早期种性预测的遗传标记，更好地指导双孢蘑菇的育种工作。

另外，我们将肥克隆差异谱带制成探针，检测探针与性状的相关性。一旦证实这种相关性，就能建立一种基于特异探针的新的检测手段，可以对更大量的融合子、转化子再生株进行实验室早期预测。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

图 1 随机引物 U20 对 9 个双孢蘑菇菌株的 RAPD 扩增图谱

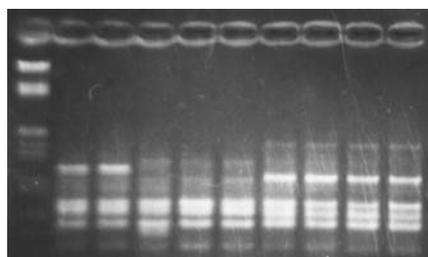


Fig.1 RAPD graph of 9 strains of *Agaricus bisporus* amplified by random primer U20

M 为 λ DNA/EcoRI+HindIII Marker, 1-9 的扩增模板分别为菌株 2796, 3003, 8211, C1, 福罐 4, 01, 02, 沙洲 24-3, 126 的总 DNA。下同。

Lane M: λ DNA/EcoRI+Hind III Marker; Lane 1-9: RAPD banding patterns of the total DNA of strain 2796, 3003, 8211, C1, Fuguan-4, 01, 02, Shazhou 24-3, 126. Similarly here in after.

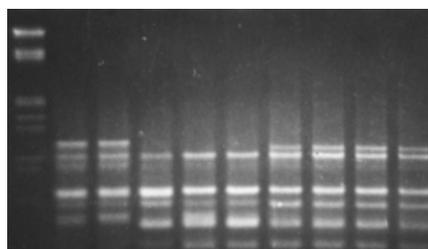


图 2 随机引物 H5 对 9 个双孢蘑菇菌株的 RAPD 扩增图谱

Fig.2 RAPD graph of 9 strains of *Agaricus bisporus* amplified

by random primer H5

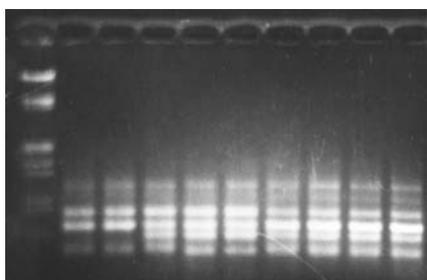


图3 随机引物 U16 对 9 个双孢蘑菇菌株的 RAPD 扩增图谱
Fig.3 RAPD graph of 9 strains of *Agaricus bisporus* amplified by random primer U16

图4 随机引物 B1 对 9 个双孢蘑菇菌株的 RAPD 扩增图谱

Fig.4 RAPD graph of 9 strains of *Agaricus bisporus* amplified by random primer B1

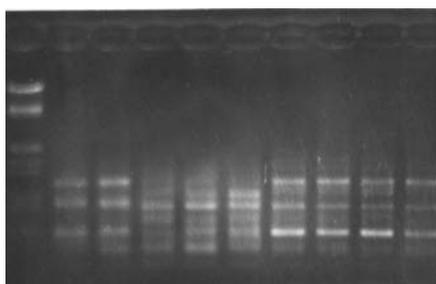


图5 随机引物 H4 对 9 个双孢蘑菇菌株的 RAPD 扩增图谱
Fig.5 RAPD graph of 9 strains of *Agaricus bisporus* amplified by random primer H4

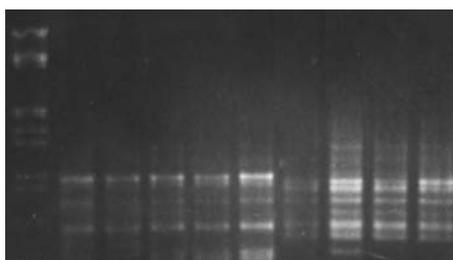
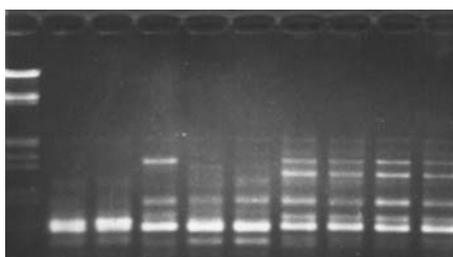


图6 随机引物 M7 对 9 个双孢蘑菇菌株的 RAPD 扩增图谱
Fig.6 RAPD graph of 9 strains of *Agaricus bisporus* amplified by random primer M7



参 考 文 献

- 1 H. C. Wang and Z. S. Wang. The prediction of strain characteristics of *Agaricus bisporus* by the application of isozyme electrophoresis. *Mushroom Science*, 1989. 12(1):87-100.
- 2 Kerrigan R.W.,P.A.Horgen & J.B.Anderson.A genetic linkage map for *Agaricus bisporus*.In L.J.L.D.van Griensven(ed.),*Genetics and breeding of Agaricus*. Pudoc., wageningen. The Netherlands,1991.31-36.
- 3 Chow,C.M. et al..The cel3 gene of *Agaricus bisporus* codes for a modular cellulase and is transcriptionally regulated by the carbon source.*Appl. Environ. Microbiol.*,1994(8):2779-2785.
- 4 Perry,C.R.,M.Smith,C.H.Britnell et al..Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.*, 1993(139): 1209-1218.
- 5 Xu.J.,Kerrigan R.W.,P.A.Horgen et al.. Localization of the mating type gene in *Agaricus bisporus*.*Appl.Environ.Microbiol.*, 1993(59):3044-3049.
- 6 Lottus M.G. et al..Molecular mushroom breeding.In T.J.Elliott (ed.), *Science and cultivation of edible*

- fungi. Baldema, Rotterdam, the Netherlands, 1995. 3-9
- 7 Khush R.S., Becker E. and M. Wach. DNA Amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992. 58:2971-2977.
- 8 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA. *真菌学报*, 1994. 13(1):34-40
- 9 J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京: 科学出版社, 1995. 672-683.

Study on the RAPD amplification of strains of three types of *Agaricus bisporus*

Meiyuan Chen Jianhua Liao Zesheng Wang
(Fujian Research Institute of Light Industry, Fuzhou, 350005)

Abstract Three types of *A. bisporus* strains including 2796 (Hybrid type), 8211 (Good-quality type) and SB65 or 01 (High-yield type) have been studied by RAPD amplification reaction with 72 random primers. It was found that 26 primers all presented three different banding patterns respectively. The further study was carried out with the 26 primers and 9 strains of three types of *A. bisporus*. As a result, 6 primers, U16, U20, B1, H4, H5 and M7, can distinguish the three types of strains very well. The primers U20 and H5 are the better for the banding patterns they produced are stable and regular, and the different bands are obvious. It may provide a marker at DNA level for the prediction of the strain characteristics of *A. bisporus*.

Key words *Agaricus bisporus*, RAPD, Strain type