

白黄侧耳 *Pleurotus cornucopiae* 微卫星间区 (ISSR) 分析¹

张金霞 黄晨阳 管桂萍 李辉平 张瑞颖 胡清秀

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要: 本试验对我国 1982 年至 2004 年 22 年间栽培的白黄侧耳 *Pleurotus cornucopiae* 30 个菌株进行了锚定 ISSR 分析, 试验表明, 引物 P₄ 和 P₅ 都能对白黄侧耳 *P. cornucopiae* 进行多态性扩增, P₄ 将供试菌株扩增出 45 个条带, 大小在 200~20 000 bp, P₅ 将供试菌株扩增出 39 个条带, 大小在 500~15 000 bp, 扩增出的条带 100% 具多态性。聚类分析在遗传相似性 61% 的水平下将 30 个供试菌株划分为 15 个类群, 即 15 个具有一定遗传差异的菌株; 具有相同 ISSR 图谱、遗传相似性程度 100% 的可能为同一菌株, 属于同物异名。试验表明我国的食用蕈菌野生环境面临人工栽培种质的污染, 采自河北、山东、云南自然环境下的白黄侧耳 *P. cornucopiae* 与此前大量栽培的一些商业品种具完全相同的 ISSR 指纹图谱, 聚类分析相似性系数 100%。

关键词: 锚定 ISSR, 商业菌株, 菌株鉴定, 遗传分析

中图分类号: Q939.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-6472(2007)01-0115-0121

Inter simple sequence repeat analysis for *Pleurotus cornucopiae*

ZHANG Jin-Xia HUANG Chen-Yang GUAN Gui-Ping LI Hui-Ping
ZHANG Rui-Ying HU Qing-Xiu

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The anchored ISSR analysis of *Pleurotus cornucopiae* was carried out for identification of the thirty cultures cultivated from 1982 to 2004 in China. The polymorphic DNA fragments could be produced by both of the primer P₄ and P₅ for the tested cultures of *P. cornucopiae*. Forty-five bands arose from primer P₄, 200~20000 bp in length and thirty-nine bands arose from primer P₅, 500~15000 bp in length. All of the bands brought polymorphic among the tested strains. The thirty cultures of *P. cornucopiae* were divided into 15 groups, i.e. 15 stains under similarity of 61% by cluster analysis. The cultures with the same ISSR profiles and 100% similarity of cluster analysis probably belong to the same strain. The results show that the environment of the wild mushrooms is faced with the contamination of germplasms from the commercial varieties. The ISSR profiles of wild *P. cornucopiae* in Hebei, Shandong and Yunnan are equal to those of commercial varieties cultivated before, and the similarity analyzed by UPGAMA is 100%.

Keywords: Anchored ISSR, commercial strains, strain identification, genetic analysis.

白黄侧耳 *Pleurotus cornucopiae* (Paulet:Pers.) Rolland 俗称姬菇、小平菇 (mini oyster), 也有人误称其为秀珍菇、珍珠菇, 是世界性分布的食用蕈菌, 我国河北、黑龙江、吉林、

基金项目: 科技部三峡移民科技开发专项 2004EP090020

收原稿日期: 2006-04-11, 收修改稿日期: 2006-06-19

山东、江苏、四川、安徽、江西、河南、广西、新疆、云南等地均有分布(卯晓岚, 1998), 是平菇(oyster)的主要栽培种, 我国主要栽培食用蕈菌之一, 也是全球性栽培的食用蕈菌。由于其栽培简便, 生物转化率高, 成为发展中国家重要蛋白质来源, 全球产量持续增长。

为了获得优良的农艺性状和商品性状, 育种者应用多种方法进行优良品种的选育。但是, 由于子实体分化程度远远低于绿色植物, 应用形态的多样性进行特异性、一致性和稳定性(DUS)的鉴定十分困难。美国、意大利、荷兰等国家对食用蕈菌商业菌株实行了专利和品种权保护, 然而在专利保护的实际应用上, 由于形态常受环境条件的影响, 也同样遇到了特有的困难。应用分子标记技术研究食用蕈菌的遗传多样性, 并应用于品种权保护, 已经成为近年的研究热点之一。分子标记具有稳定、迅捷、成本低等诸多优势, 但是, 不同的标记技术适宜的种类不同。目前在食用蕈菌中应用较多的有随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphisms, AFLP), 而应用微卫星间区(inter simple sequence repeat, ISSR)技术进行食用蕈菌的品种鉴定尚未见报道。

微卫星 DNA (microsatellite) 是短的、串联的简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR), 广泛存在于真核生物的基因组, SSR 在种内居群间、个体间存在高度多态性。以 SSR 为基础, 发展的 ISSR 指纹技术不需要事先知道 SSR 序列, 以 SSR 为引物进行 PCR 扩增, 电泳分析扩增产物的多态性。改进的锚定 ISSR-PCR, 在序列引物的 3' 或 5' 端添加 1~7 个兼并碱基, 将引物锚定在微卫星序列的 5' 或 3' 端, 有效防止扩增过程中引物的滑动, 使 ISSR 的稳定性和可重复性显著提高 (Grist et al., 1993; Zietkiewicz et al., 1994; Fisher et al., 1996)。ISSR 在柑橘 (Fang & Roose, 1994), 兰莓 (Levi & Towland, 1997) 等经济作物的品种鉴定和种质资源分析方面已取得良好的结果。

本研究对我国 1982 年以来栽培的白黄侧耳 *P. cornucopiae* 菌株进行了锚定 ISSR 分析, 目的在于探讨 ISSR 技术在食用蕈菌栽培菌株遗传分析中应用的可能性和可靠性, 为该种内菌株间遗传多样性分析、种质资源评价、育种和商业菌株的鉴定、为育种者的品种权保护提供快速鉴定技术。

1 材料和方法

1.1 供试菌株及其来源

30 个供试菌株中, 27 个为不同年代的商业栽培菌株, 主要来自国内食用菌科研单位, 2 个作者分别采自山东和云南 (序号 23、29), 1 个引自香港中文大学作为标准菌株 (序号 1), 所有菌株均保藏于中国农业微生物菌种保藏管理中心 (ACCC) (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取: 采用 CTAB 法。

1.2.2 引物: 5' 端锚定引物 P₄ 和 P₅。

1.2.3 扩增反应体系: PCR 反应体系的总体积为 25 μ L, 其中 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (10mmol/L) 为 2 μ L, 引物 (5 μ mol/L) 为 2 μ L, *Taq*DNA 聚合酶为 0.75U, 模板为 50ng。阴性对照中用 ddH₂O 代替模板。

1.2.4 扩增反应条件: 扩增反应在 iCycler 型 PCR 仪上进行, 预变性 92 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性 92 $^{\circ}$ C, 1 min; 复性 49 $^{\circ}$ C, 1 min; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 5 min; 30 个循环, 补平 72 $^{\circ}$ C, 7 min。

表 1 供试菌株及其来源

Table 1 Tested strains and their origin for *P. cornucopiae*

序号 No.	原号 Original No	ACCC No	来源 Origin
1	PI-30	51233	香港中文大学, 1991
2	姬菇	51350	北京市售商品组织分离物, 2001
3	西德 33	50429	河北省食用菌研究所, 1991
4	Pg2	51372	四川省农业科学院, 2003
5	Pg1	51371	四川省农业科学院, 2003
6	大姬菇	50397	辽宁省本溪农科所, 1988
7	白秀珍菇	51267	华中农业大学, 2001
8	日本姬菇	50340	辽宁省外贸公司, 1987
9	上海姬菇	50940	上海市农业科学院食用菌研究所, 1999
10	26	51263	华中农业大学, 2001
11	33	51268	华中农业大学, 2001
12	鸡汁菌	51018	华中农业大学, 2001
13	冈崎姬菇	50499	河北省微生物研究所, 1990
14	CCEF 89	50596	河北省食用菌研究所, 1992
15	珍珠菇	50941	上海市农业科学院食用菌研究所, 1999
16	玉蕈	50160	河北省农业科学院, 1982
17	PI-37A	50162	北京市海淀区外贸公司, 1982
18	29	51264	华中农业大学, 2001
19	30	51265	华中农业大学, 2001
20	31	51266	华中农业大学, 2001
21	P31	51369	四川省农业科学院, 2003
22	P33	51370	四川省农业科学院, 2003
23	野生 1	50994	山东省潍坊沂山野生子实体组织分离物, 1999
24	冀农 11	50495	河北省农业科学院, 石家庄郊区野生子实体组织分离物, 1991
25	黑姬菇	51423	江苏省农业科学院, 2004
26	9008	50524	日本, 1988
27	8603	50341	辽宁省外贸公司, 引自日本, 1987
28	姬菇 10	50316	辽宁省本溪市蔬菜办公室, 1987
29	野生 2	51455	云南昆明郊区野生子实体组织分离物, 2003
30	876	50339	辽宁省外贸公司, 引自日本, 1987

1.2.5 电泳及数据处理：扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离，以 λ DNA/*Hind* + *Eco*R 作标记，0.5 μ g/ml EB 染色后，用水冲洗后置凝胶成像仪上观察。应用 Gel-Pro Analyzer 软件，以凝胶 DNA 片段的有无分别记为 1 或 0。用统计软件计算菌株间遗传相似性系数，用 UPGAMA 法进行聚类分析，构建树状图，进行遗传相似性分析。

2 结果与分析

2.1 电泳图谱

试验表明, 5'端锚定引物 P₄ 和 P₅ 都能将供试菌株扩增出清晰的多态性 DNA 片段, 且分布均匀, 片段多态性 100%。P₄ 将供试菌株扩增出 45 个片段, 大小在 200~20 000 bp, 每个菌株扩增片段在 6~11 个, 平均 7 个; P₅ 将供试菌株扩增出 39 个片段, 大小在 500~15 000bp, 每个菌株扩增片段在 6~13 个, 平均 10 个。这两个引物的扩增结果都表明, 供试菌株间可能存在一定的重复, 表现为二引物的 ISSR 扩增图谱中菌株间的异同呈一致性, 如菌株 18~26 之间和菌株 27~29 之间 (图 3)。

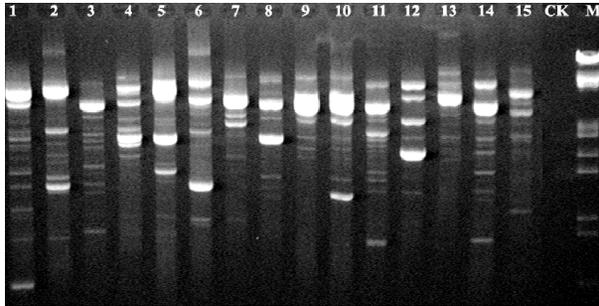


图 1 引物 P₄ 对白黄侧耳 *P. cornucopiae* 部分供试菌株扩增的 ISSR 图谱
 1~15: 菌株序号 1~7, 11~15, 17, 26, 29; CK: 阴性对照; M: 分子标记, ?DNA/Hind +EcoR
 Fig. 1 The ISSR profiles of partial strains of *P. cornucopiae* by primer P₄
 1~15: strain No. 1~7, 11~15, 17, 26, 29; CK: check; M: marker, ?DNA/Hind +EcoR

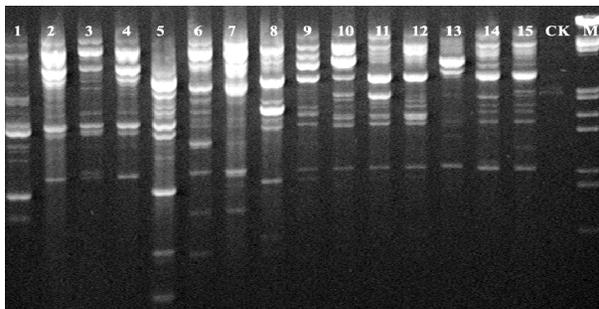


图 2 引物 P₅ 对白黄侧耳 *P. cornucopiae* 部分供试菌株扩增的 ISSR 图谱
 1~15: 菌株序号 1~7, 11~15, 17, 26, 29; CK: 阴性对照; M: 分子标记, ?DNA/Hind +EcoR
 Fig. 2 The ISSR profiles of partial strains of *P. cornucopiae* by primer P₅
 1~15: strain No. 1~7, 11~15, 17, 26, 29; CK: check; M: marker, ?DNA/Hind +EcoR

2.2 聚类分析

聚类分析在遗传相似性 17%的水平下将 30 个供试菌株划分为 2 大类群, 在遗传相似性 25%的水平下将 30 个供试菌株划分为 5 大类群, 在遗传相似性 40%的水平下将 30 个供试菌株划分为 12 大类群, 在遗传相似性 61%的水平下将 30 个供试菌株划分为 15 大类群, (表 2、图 4), 即 15 个具一定遗传差异的菌株。遗传相似性程度 100%的可能为同一菌株, 如菌株 18~26 之间和菌株 27~29 之间。

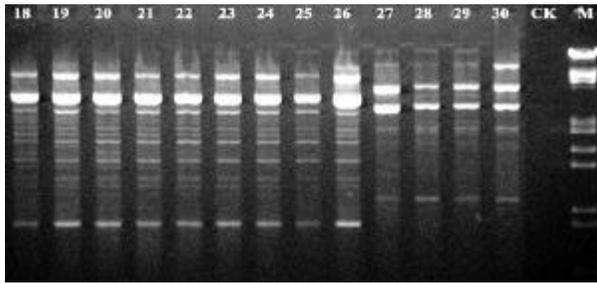


图 3 引物 P₅ 对白黄侧耳 *P. cornucopiae* 部分供试菌株扩增出相同的 ISSR 图谱
18~26 相同, 27~29 相同; CK: 阴性对照; M: 分子标记, ?DNA/*Hind* +*EcoR*

Fig. 3 The same ISSR profiles of partial strains of *P. cornucopiae* by primer P₅,
indicating the similar of No.18~26, the similar of No.27~29; CK: check; M: marker, ?DNA/*Hind* +*EcoR*

表 2 根据聚类分析白黄侧耳 *P. cornucopiae* 供试菌株的分组

Table 2 Groups divided by UPGAMA for tested cultures of *P. cornucopiae*

类别 group	包括菌株 including strains
I	1 (PI-30)
II	2 (北京市售商品子实体组织分离物)
III	3 (西德 33)
IV	4 (P2)
V	5 (P1)
VI	6(大姬菇), 8-10 (日本姬菇、上海姬菇、26)
VII	7 (白秀珍菇)
VIII	11 (33)
IX	12 (鸡汁菌)
X	13 (冈崎姬菇)
XI	14 (CCEF 89)
XII	15 (珍珠菇)
XIII	16 (玉蕈), 17 (PI-37A)
XIV	18-26 (29、30、31、P31、P33、野生 1、冀农 11、黑姬菇、日本 9008)
XV	27-30 (8603、姬菇 10、野生 2、876)

3 讨论

本试验表明, 虽然 ISSR 技术与 RAPD 技术相同, 都使用单引物对整个基因组进行随机扩增, 但 ISSR 的引物 (20nt) 较 RAPD (10nt) 长, 扩增过程中的退火温度高, 结果的严谨度大大提高, 稳定性和可重复性更好。与 RAPD、AFLP、RFLP 等比较, 锚定 ISSR 技术操作更为便利。

我国栽培的白黄侧耳商业菌株来源广泛, 特性多样, 栽培中不论色泽、质地, 还是子实体形成温度, 都有着显著的性状差异。本试验结果与栽培性状表现的多样性相符, ISSR 分析表现出了丰富的遗传多样性。但是, 也表明我国栽培菌株存在着严重的同物异名现象, ISSR 图谱完全相同的培养物栽培中没有肉眼可见的性状差别, 很可能是相同菌株, 属于同物异名。

本研究材料多为栽培的商业菌株, 其中 1991 年和 1999 年分别在河北石家庄郊区、山东

潍坊山区采集的野生菌株与 1988 年开始规模栽培的菌株 26 (9008) ISSR 图谱完全相同, 聚类分析遗传相似性 100%; 2003 年云南山区采集的菌株 29 (野生 2) 与辽宁省外贸公司 1987 年引进推广菌株 30 (876) ISSR 图谱完全相同, 聚类分析遗传相似性 100%, 这种结果与自然界生物发生规律不符, 因此, 我们推测, 这些所谓的野生菌株不是真正意义上的“土著”生物, 很可能是商业菌株的自然转移定植的结果, 且这种转移发生在基因自然变异发生之前, 完全是通过双核体传播的, 如仿野生栽培, 虽然它们发生于不同地理环境, 但是仍属于同一营养亲和群 (vegetative compatibility group, VCG), 即同一菌株。这种情况也警示我们, 在我国食用菌产业快速发展的同时, 自然种质环境正面临人工选育种质的侵蚀或污染, 自然界食用蕈菌野生种质面临着人工选育品种的生存竞争。对此, 我们应给予足够的重视。

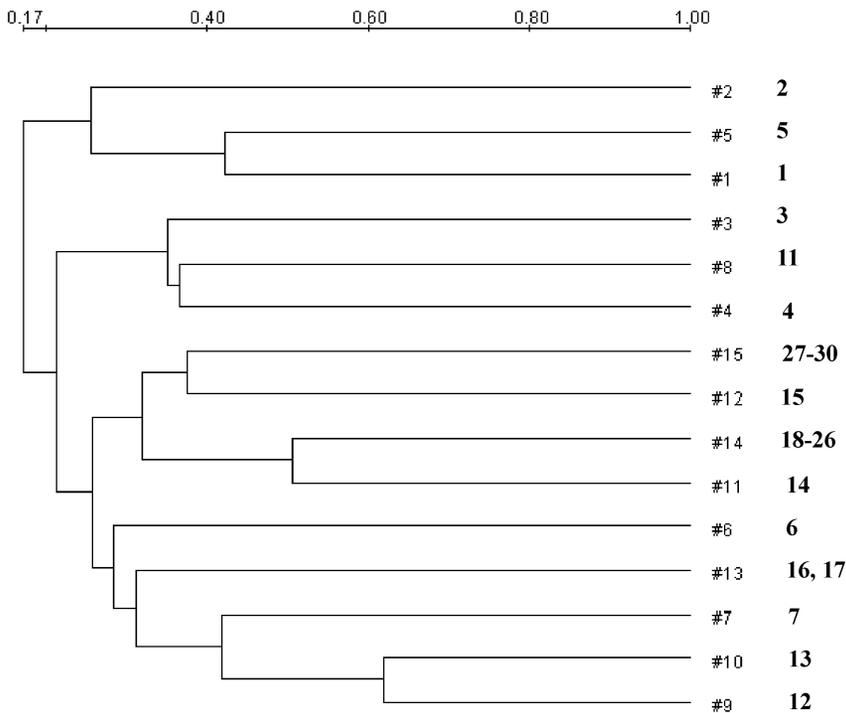


图 4 白黄侧耳 *P. cornucopiae* 供试菌株 UPGAMA 聚类分析 1-30 菌株序号

Fig. 4 The cluster analysis used UPGAMA for tested strains in *P. cornucopiae* 1-30 stands for strain no.

以 ISSR 为 DNA 指纹作为植物品种的特性之一已经被 UPOV 接受, 在小麦、大麦等作物上应用。中国制定了应用 ISSR 指纹方法进行大豆品种特异性鉴定的国家标准 (GB/T 19563-2004 大豆种子品种鉴定实验方法 简单重复序列间区法)。分子标记技术成为近年食用蕈菌品种权保护技术研究的重要方向。Moore *et al.* (2001) 用 20 个引物将栽培的双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* (Lange) Singer 的 14 个商业品种和 2 个野生菌株进行 RAPD 分析, 聚类分析结果可将任何一个菌株分开。Kazuhisa *et al.* (2002) 应用 AFLP 技术将日本栽培的 15 个香菇品种进行了有效的区别性鉴定, Saito *et al.* (2002) 应用 RFLP-PCR-RAPD 技术对香菇 *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 栽培品种 rDNA 的 IGS 区域进行分析, 可将 16 个商业品种完全区别开来。张金霞等 (2004) 以 IGS-RFLP 为分子标记分析了我国白灵侧

耳 *Pleurotus nebrodensis* (Inzenga) Quél 栽培种质, 黄晨阳等 (2005) 应用 RFLP 技术将我国刺芹侧耳 *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quél 鉴定为 9 个品种。

微卫星 (SSR) 的存在是 ISSR 技术应用的前提, 目前已有多种真核生物的微卫星 (SSR) 序列研究注册, 为 ISSR 技术的应用奠定了理论基础。和其它真核生物一样, 白黄侧耳 *P. cornucopiae* 也存在着丰富的微卫星 (SSR) 序列 (GenBank: AJ430509, AJ430506), 本试验获得的丰富的条带充分证明了这一点。锚定 ISSR 技术扩增出白黄侧耳 *P. cornucopiae* 的 DNA 片断有着丰富的多态性, 便于在商业品种快速鉴定中应用。

[REFERENCES]

- Fang DQ, Roose ML, 1994. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet*, **95**: 408-417
- Fisher PJ, Gardner RC, Richardson TE, 1996. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Res*, **24**: 4369-4371
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of The People's Republic of China, 2004. GB/T 19563-2004 Experimental identification method for variety of soybean seed-ISSR. Beijing, Standards Press of China
- Grist SA, Firgaira FA, Morley AA, 1993. Dinucleotide repeat polymorphisms isolated by the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, **15**: 304-309
- Huang CY, Zhang JX, Zheng SY, Guan GP, Zhang RY, 2005. Analysis of intergenic spacer 2 diversity of ribosome DNA for strains of *Pleurotus eryngii*. *J Agric Biotechnol*, **13**: 592-595(in Chinese)
- Kazuhisa T, Teruyuki M, Kobayashi H, Yukitaka FN, 2002. Genetic diversity and strain-typing in cultivated strains of *Lentinula edodes* (the shiitake mushroom) in Japan by AFLP analysis. *Mycol Res*, **106**: 34-39
- Levi A, Towland LJ, 1997. Identifying blueberry cultivars and evaluating their genetic relationship using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) anchored primers. *J Am Soc Hort Sci*, **122**: 74-78
- Mao XL, 1998. Economic fungi of China. 1-762. Science Press, Beijing
- Moore AJ, Challen MP, Warner PJ, Elliott TJ, 2001. RAPD discrimination of *Agaricus bisporus* mushroom cultivars. *Appl Microbiol Biotechnol*, **55**: 742-749
- Saito T, Tanaka N, Shinozawa T, 2002. Characterization of subrepeat regions with rDNA intergenic spacers of the edible basidiomycete *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**: 2125-2133
- Zhang JX, Huang CY, Zhang RY, Guan GP, 2004. RAPD and IGS analysis of *Pleurotus nebrodensis* cultivars in China. *Mycosystema*, **23**: 514-519 (in Chinese)
- Zietkiewicz E, Tafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176-183

[附中文参考文献]

- 黄晨阳, 张金霞, 郑素月, 管桂萍, 张瑞颖, 2005. 刺芹侧耳 (*Pleurotus eryngii*) rDNA 的 IGS2 多样性分析. 农业生物技术学报, **13**: 592-595
- 卯晓岚, 1998. 中国经济真菌, 北京: 科学出版社. 1-762
- 张金霞, 黄晨阳, 张瑞颖, 管桂萍, 2004. 中国栽培白灵侧耳的 RAPD 和 IGS 分析. 菌物学报, **23**: 514-519
- 中华人民共和国国家技术监督局, 2004. GB/T 19563-2004 大豆种子品种鉴定实验方法 简单重复序列间区法. 北京: 中国标准出版社