

4个香菇品种的 AFLP 分子标记研究

雷萍¹ 张文隽¹ 吴亚召^{1*} 王磊² 赵玉鹏² 任宏飞²

(¹陕西省微生物研究所,陕西西安 710043; ²杨凌玉鲲生物技术有限公司)

摘要 试验以香菇 LB-21、香菇 L808、香菇 215 和香菇 B15-1 等 4 个品种为研究材料,采用 AFLP 分子标记技术分析其遗传多样性。结果表明,4 个香菇品种之间的遗传相似性系数变化范围为 0.669 5~0.878 7;UPGMA 法聚类分析发现,4 个品种分为 2 组,香菇 LB-21 与香菇 B15-1 亲缘关系较近,遗传相似性系数为 0.874 5,香菇 L808 与香菇 215 亲缘关系较近,遗传相似性系数为 0.878 7。

关键词 香菇;AFLP 分子标记;遗传多样性;聚类分析

中图分类号 S646.12 文献标识码 A 文章编号 1007-5739(2019)09-0047-02

Study on AFLP Molecular Markers for Four *Lentinus edodes* Varieties

LEI Ping¹ ZHANG Wen-jun¹ WU Ya-zhao^{1*} WANG Lei² ZHAO Yu-peng² REN Hong-fei²

(¹ Microbiology Institute of Shaanxi, Xi'an Shaanxi 710043; ² Yang Ling Yu Kun Biological Technology Co., Ltd.)

Abstract The genetic diversity of LB-21, L808, 215 and B15-1 *Lentinus edodes* varieties was analyzed by AFLP molecular marker. The results showed that the variation range of genetic similarity coefficient among the four *Lentinus edodes* varieties was 0.669 5-0.878 7. UPGMA clustering analysis showed that the four varieties were divided into two groups, LB-21 and B15-1 were closely related, and the genetic similarity coefficient was 0.874 5. L808 and 215 were closely related, and the genetic similarity coefficient was 0.878 7.

Key words *Lentinus edode*; AFLP molecular marker; genetic diversity; clustering analysis

香菇(*Lentinus edodes* (Berk.)sing)又名香蕈、冬菇、花菇、椎茸等,在分类学上隶属于担子亚门层菌纲伞菌目侧耳科香菇属^[1]。其味道鲜美,营养丰富,药用价值较高,是世界第二大食用菌,也是世界真菌学家研究的热点。我国香菇栽培历史悠久,栽培面积逐年增加,菌种选育和栽培技术研究等工作受到了科研工作者的重视。香菇菌种是香菇产业化发展的重要基础,决定了其产量和质量。从分子生物学水平鉴定菌种和构建 DNA 指纹图谱有助于准确识别菌种,从而有效地利用不同香菇品种的优势,促进香菇生产的发展^[2]。

目前,应用于香菇种质资源研究的分子标记主要有 SSR、AFLP、RAPD、SCAR、SRAP^[3-7]。AFLP 分子标记技术具有模板量少、引物通用性高、多态检出率高、稳定性和重复性较强等优点,广泛应用于植物分子遗传图谱构建、遗传多样性及亲缘关系研究、基因定位和分子标记辅助育种等研究领域^[8-9]。本试验利用 AFLP 分子标记技术分析不同香菇品种的遗传多样性,从基因水平反应品种之间的关系,为进一步开展香菇生物学研究提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试香菇品种共 4 个,即香菇 LB-21、香菇 L808、香菇 215 和香菇 B15-1,均来自陕西省微生物研究所微生物菌种资源中心第三研究室。香菇 LB-21 是选育品种,抗霉菌能力强、产量高,经小面积栽培产量稳定;香菇 L808 是广温型品种,菇体中等偏大,菇形圆整、菇柄较短、菇质优、菌龄短,产量高;香菇 215 是中高温型品种,菌肉厚实,菌柄中长偏短,抗逆性强,产量高;香菇 B15-1 是野生香菇菌株,抗杂菌污染能力强,柄短肉厚。

1.2 主要试剂及引物

主要试剂有 Taq 酶(2 U/μL)、dNTP(10 mmol/L)、引物(10 mmol/L)(生工基因)、内切酶(10 U/μL)(NEB 公司)、T4 连接酶(5 U/μL)(NEB 公司)。Marker 为 DL2000、100 bp DNA Ladder。引物在北京六合华大基因科技有限公司合成。试验所用接头和引物信息见表 1,试验所用引物组合见表 2。

表 1 试验所用接头和引物信息

接头与引物	序列(5'-3')	接头与引物	序列(5'-3')
EcoR I 接头 1	CTCGTAGACTGCCGTACC	MseI 接头 1	GACGATGAGTCCTGAG
EcoR I 接头 2	AATTGGTACGCAGTCTAC	MseI 接头 2	TACTCAGGACTCAT
E00	GACTGCCGTACCAATTC	M18	GATGAGTCCTGAGTAACT
M00	GATGAGTCCTGAGTAA	M19	GATGAGTCCTGAGTAAGA
E11	GACTGCCGTACCAATTC	M20	GATGAGTCCTGAGTAAGC
E12	GACTGCCGTACCAATTCAC	M48	GATGAGTCCTGAGTAACAC
E15	GACTGCCGTACCAATTC	M50	GATGAGTCCTGAGTAACAT
E16	GACTGCCGTACCAATTC	M55	GATGAGTCCTGAGTAACGA
E17	GACTGCCGTACCAATTC	M66	GATGAGTCCTGAGTAAGAT
E18	GACTGCCGTACCAATTC	M72	GATGAGTCCTGAGTAAGGC
M16	GATGAGTCCTGAGTAACC	M85	GATGAGTCCTGAGTAATCG
M17	GATGAGTCCTGAGTAACC		

基金项目 陕西省科技厅农业领域重点研发计划项目(2017NY-010)。

作者简介 雷萍(1966-),女,陕西西安人,副研究员,从事食药真菌的研究与开发工作。

* 通信作者

收稿日期 2019-01-22

1.3 试验方法

1.3.1 样品 DNA 提取。采用改良 CTAB 法进行 DNA 提取,用 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 限制性内切及连接。对所选样品采用 EcoR I /Mse I

表2 试验所用引物组合

编号	引物组合	编号	引物组合
P1	E11M19	P7	E11M55
P2	E18M18	P8	E18M50
P3	E12M17	P9	E12M85
P4	E15M20	P10	E15M66
P5	E16M16	P11	E16M72
P6	E17M19	P12	E17M48

双酶切,酶切与连接反应同步进行。酶切与连接体系(20 μL)为:10×AFLP digest-ligation Buffer 2 μL,AFLP digest-ligation Enzyme Mix 1.8 μL,EcoR I Adaptor 1 μL (10 μmol/L),Mse I Adaptor 1 μL(10 μmol/L),模板 DNA 5 μL,用 ddH₂O 补至 20 μL。酶切-连接反应条件为 25 °C、5 h,1%琼脂糖电泳检测。

1.3.3 预扩增。预扩增反应体系:2×PCR Mix 10 μL,E00 1 μL(20 μmol/L),M00 1 μL(20 μmol/L),酶切-连接模板 DNA 4 μL,加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 扩增程序:94 °C预变性 3 min;94 °C变性 30 s;50 °C复性 30 s,72 °C延伸 1 min,30 个循环;将预扩增产物4 °C保存备用。

1.3.4 选择性扩增。将预扩增产物稀释后作为模板进行 PCR 扩增。反应体系:2×PCR Mix 10 μL,Eprimer 1 μL(20 μmol/L),Mprimer 1 μL(20 μmol/L),模板 DNA 5 μL(预扩产物稀释 20 倍),加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 扩增程序:95 °C预变性 5 min;95 °C变性 35 s,65 °C复性 35 s(每循环降低 0.7 °C),72 °C延伸 1 min,12 个循环;94 °C变性 30 s,56 °C复性 30 s,72 °C延伸 1 min,23 个循环。

1.3.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分析。选择扩增 PCR 产物和上样缓冲液比例 8:3,漩涡混匀,94 °C变性 10 min 后,于 6%变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳分析,银染后观察。利用 Quantity One 软件对 4 个样品、12 对引物组合扩增产物测序仪得到的原始数据进行分析,根据无带和有带情况转化为 0 和 1 数据矩阵。采用 NTSYSpc 2.11 软件包进行个体相似系数计算,并采用 UPGMA 法进行聚类分析,利用 popgene 和 NTSYS 软件对样品进行遗传多样性分析。

2 结果与分析

2.1 聚丙烯酰胺凝胶分析

利用 12 对随机引物组合对 4 个香菇品种的基因组 DNA 进行扩增,AFLP 扩增产物长度介于 100~500 bp 之间,条带清晰。扩增电泳图谱见图 1。

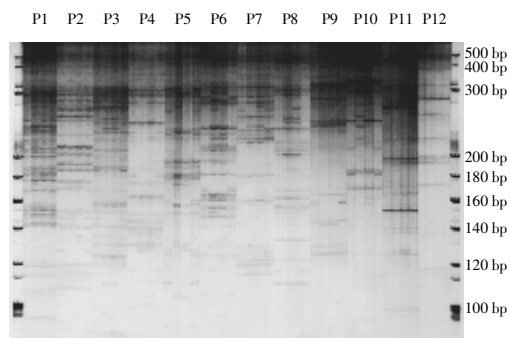


图1 样品 AFLP 引物扩增图谱

扩增条带总数为 239 条,其中多态性条带为 100 条;引物组合 P5 扩增出的多态性条带最多,多态百分比为

65.38%;引物组合 P9 扩增出的多态性条带最少,多态百分比为 15.38%。

2.2 品种多态性分析

由表 3 可知,香菇 LB-21 扩增出的条带总数为 180 条,其中多态性条带 41 条,多态比率最低,为 22.78%,特有条带 2 条;香菇 L808、香菇 215 分别扩增出 195、188 条,多态性条带分别为 52、49 条,其中特有条带分别为 12、2 条;香菇 B15-1 扩增出的条带总数为 196 条,多态性条带 57 条,多态比率最高,为 29.08%,含特有条带 7 条。

表3 不同香菇品种多态性分析

品种	条带总数/条	多态性带/条	多态比率/%	特有条/条
香菇 LB-21	180	41	22.78	2
香菇 L808	195	52	26.67	12
香菇 215	188	49	26.06	2
香菇 B15-1	196	57	29.08	7

2.3 遗传相似性系数分析

由表 4 可知,4 个香菇品种之间的遗传相似性系数变化范围为 0.669 5~0.878 7。香菇 LB-21 与香菇 L808、香菇 215 之间的遗传性系数较小,说明遗传距离较远;与香菇 B15-1 之间的遗传相似性系数较高,为 0.874 5。香菇 L808 与香菇 215 之间的遗传相似性系数较高,为 0.878 7;与香菇 B15-1 之间的遗传性系数较小,说明遗传距离较远。

表4 不同香菇品种之间遗传相似性系数

品种	香菇 LB-21	香菇 L808	香菇 215	香菇 B15-1
香菇 LB-21	1.000 0			
香菇 L808	0.669 5	1.000 0		
香菇 215	0.715 5	0.878 7	1.000 0	
香菇 B15-1	0.874 5	0.677 8	0.723 8	1.000 0

2.4 聚类分析

采用 UPGMA 法进行聚类分析,得到 4 个香菇品种的亲缘关系树状图。从图 2 可以看出,4 个香菇品种被分为了 2 组,其中香菇 LB-21 与香菇 B15-1 为一组,说明这 2 个品种亲缘关系相对较近,遗传相似性系数为 0.874 5;香菇 L808 与香菇 215 为一组,两者亲缘关系较近,遗传相似性系数为 0.878 7。

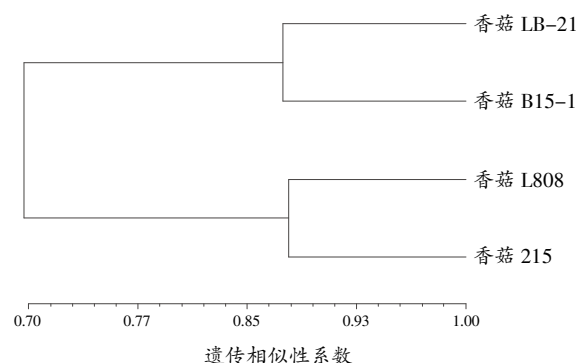


图2 样品间 UPGMA 聚类图

3 结论

试验结果表明,采用 12 对随机引物组合扩增 4 个香菇品种基因组 DNA,香菇 B15-1 扩增条带总数为 196 条,多态性条带 57 条,多态比率最高(29.08%),含有特有条带 7 条; (下转第 52 页)

表1 不同处理条件下番茄和西瓜性状表现

处理	番茄				西瓜			
	成熟期	口感	抗病性	个体长势	成熟期	口感	抗病性	个体长势
A	07-25	中上	强	繁茂	07-22	中上	强	繁茂
B	07-26	好	强	繁茂	07-22	中上	强	繁茂
C	07-25	中等	中等	极繁茂	07-24	中等	弱	极繁茂
D	08-02	好	中等	一般	07-29	好	中等	一般
CK	07-31	差	一般	极繁茂	07-27	一般	弱	繁茂

处理B>CK>处理D;西瓜表现为处理A=处理B>处理C>CK>处理D。处理A(有机肥+复合肥)较其他处理早熟,熟期提前1~2 d。

2.5 产量

番茄、西瓜的产量均以处理C(有机肥+尿素)最高(表2),番茄为55 027.5 kg/hm²,西瓜为73 186.5 kg/hm²。番茄的产量表现为处理C>处理A>处理B>CK>处理D,依次较CK增产8.6%、增产6.5%、增产1.6%、减产8.1%;西瓜的产量表现为处理C>处理A>处理B>CK>处理D,依次较CK增产6.9%、增产6.3%、增产3.8%、减产-14.0%。这说明有机肥与氮肥配施,可保障作物生长期内氮元素的充分供给,能够很好地发挥作物的生产潜力,获得较高的产量;同时也说明与其他肥料比较,增施氮肥能够提高作物产量。

表2 不同处理对番茄和西瓜产量的影响

处理	番茄		西瓜	
	产量/kg·hm ⁻²	较CK±/%	产量/kg·hm ⁻²	较CK±/%
A	53 964.0	6.5	72 774.0	6.3
B	51 511.5	1.6	71 038.5	3.8
C	55 027.5	8.6	73 186.5	6.9
D	46 596.0	-8.1	58 872.0	-14.0
CK	50 682.0		68 449.5	

3 结论与讨论

在我国推广应用有机肥料,符合“加快建设资源节约型、环境友好型社会”的要求,对促进农业与资源、农业与环境

(上接第48页)
香菇 L808、香菇 215 扩增条带总数分别为 195、188 条,多态性条带分别为 52、49 条,其中特有条带分别为 12、2 条;香菇 LB-21 扩增条带总数为 180 条,其中多态性条带 41 条,多态比率最低(22.78%),特有条带 2 条。

4 个香菇品种之间的遗传相似性系数变化范围为 0.669 5~0.878 7。采用 UPGMA 法进行聚类分析,结果发现,4 个品种被分成了 2 组,其中香菇 LB-21 与香菇 B15-1 为一组,说明这 2 个品种亲缘关系相对较近,遗传相似性系数为 0.874 5;香菇 L808 与香菇 215 为一组,两者亲缘关系较近,遗传相似性系数为 0.878 7。

4 参考文献

[1] 卯晓岚.中国大型真菌[M].郑州:河南科学技术出版社,2000.

(上接第50页)

时数与苹果花期影响不大,2—3 月日照时数是影响苹果花期的主要气象因子之一。

5 参考文献

[1] 中国气象局.地面气象观测规范[M].北京:北京气象出版社,2003.
[2] 刘义花,汪青春,王振宇,等.1971—2007 年青海省日照时数的时空分布特征[J].资源科学,2011,33(5):1010-1016.

以及人与自然和谐友好发展,从源头上促进农产品安全、清洁生产,保护生态环境都有重要意义。随着人们生活水平的提高,人们对安全、卫生、无污染的有机、绿色食品的需求不断增加,广大农民迫切需要施用有机肥来提高农产品的市场竞争力^[5]。

从试验结果看,在番茄和西瓜生产中,最好的施肥模式均为有机肥+复合肥。该施肥模式下,作物产量较高、具有较强的抗病性,果实适口性也较好,成熟期与其他施肥方式相当或略有提前,可提前上市,提高单位面积的经济效益;单独施用有机肥处理模式下,2 种作物口感最好,但产量偏低、熟期较长,从目前市场对绿色有机食品的需求来看,此施肥模式有一定的发展空间;有机肥+农家肥模式中,农家肥来自于畜禽粪便,几乎是无成本肥料,这一施肥模式比较经济。综上所述,上述几种施肥方式在阿勒泰地区均可行,可依据土壤肥力、市场需求、自身情况等诸多因素选用。

4 参考文献

- [1] 张成兰,刘春增,李本银,等.有机肥对大豆生产效应研究进展[J].安徽农业科学,2018,46(18):25-28.
- [2] 张勇,杨启港,郭祥.生物有机肥在烟草上的应用研究[J].安徽农业科学,2009,37(34):16835-16837.
- [3] 刘杰,张颖,曾宪锋,等.有机-无机复混肥对大豆产量和品质的影响[J].大豆通报,2002(1):10.
- [4] 原东,范继红.有机肥施用对土壤肥力影响的研究进展[J].中国农学通报,2013,29(3):12-16.
- [5] 吴金为,吴万军.有机肥不同用量对陆地蔬菜的影响[J].北京农业,2010(增刊1):54-58.
- [6] 卓英,谭琦,陈明杰,等.香菇主要栽培菌株遗传多样性的 AFLP 分析[J].菌物学报,2006,25(2):203-210.
- [7] 董慧,章炉军,张美彦,等.中国香菇主栽品种遗传多样性的 SSR 分析及指纹图谱构建[J].微生物学通报,2017,44(6):1427-1436.
- [8] 程水明,干建平,刘世旺,等.AFLP 分子标记在香菇 F₁ 代群体中的多态性及分离方式[J].湖北农业科学,2009,48(12):2922-2926.
- [9] 叶长文,谭海芹,吴应森,等.香菇 135 和 9015 品种遗传多样性的 RAPD 分子标记研究[J].浙江大学学报(理学版),2013,40(2):230-233.
- [10] 赵微微,李海波,付立忠,等.47 个香菇主栽菌株的 SCAR 标记分子鉴别[J].食用菌学报,2010,17(2):7-14.
- [11] 刘靖宇,宋秀高,叶夏,等.香菇菌株遗传多样性 ISSR、RAPD 和 SRAP 综合分析[J].食用菌学报,2011,18(3):1-8.
- [12] 陈立佼,柴红梅,黄兴奇,等.尖顶羊肚菌遗传多样性的 AFLP 分析[J].食用菌学报,2013,20(2):12-19.
- [13] 王晓英,郭廷松,王新花,等.4 个苹果品种的 AFLP 分子标记研究[J].山东农业大学学报(自然科学版),2018,49(1):90-93.
- [14] 范晓辉,郝智文,王孟本.山西省近 50 年日照时数时空变化特征研究[J].生态环境学报,2010,19(3):605-609.
- [15] 赵永强,王志伟,李海涛.山西省日照时数的时空变化特征[J].中国农学通报,2017,33(15):124-128.
- [16] 白洁,葛全胜,戴君虎.贵阳木本植物物候对气候变化的响应[J].地理研究,2009,28(6):1606-1614.
- [17] 金美玉,赵晶,付强.龙井市苹果梨始花期预报模型研究[J].安徽农业科学,2017,45(25):189-192.