

微卫星(TATG)_n 基序在香菇菌种中的验证

秦莲花^{1,2} 张 红³ 陈明杰² 谭 琦^{2*} 潘迎捷²

(¹ 南京农业大学生命科学院 南京 210095)

(² 上海市农业科学院食用菌研究所 农业部食用菌遗传育种重点开放实验室 上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海 201106)

(³ 上海市种子繁育中心 上海 201601)

摘 要 以(TATG)_n 重复序列为引物对香菇属的 3 个种 13 个菌株的微卫星区 DNA 进行 PCR 扩增,1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,获得了 25 个条带,并且在供试菌株上表现出多态性,可以实现遗传分类研究。为了验证微卫星分子标记实验准确性,又用 RAPD 技术对 13 个供试菌株进行了实验。7 个引物在 13 个菌株上共获得了 102 条多态性条带。通过聚类分析,RAPD 获得的分类结果与微卫星分子标记获得的结果一致。此外,为了证明微卫星分子标记获得的条带不是假阳性,在实验中回收了 No.10 菌株的 PCR 扩增产物,进行克隆测序。测序结果显示有(TATG)_n 基序存在,并且达到了微卫星基序重复数量的最低限度。通过本实验可知,香菇中是存在微卫星(TATG)_n 基序的,且基序的多态性可以用于香菇的遗传分类研究。

关键词 微卫星,香菇菌株,RAPD 验证

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)04-0474-05

香菇产业在农业中占有重要的地位。1994 年,我国食用菌产量为 264.1 万吨,占世界食用菌总产量的 53.8%,其中香菇产量为 63.2 万吨,占世界香菇产量的 76.5%;1997 年,我国食用菌总产量发展到 400 万吨,其中香菇为 80 万吨;1998 年,我国食用菌总产量为 437 万吨,香菇为 133.8 万吨;1999 年,我国食用菌产量达到 450 万吨,香菇产量上升到 154.3 万吨;到 2000 年,鲜香菇的产量已经超过 200 万吨,占全球香菇总产量的三分之二,是我国重要的出口创汇农产品之一^[1]。香菇菌种是香菇生产中最重要的基础生产资料,是香菇生产发展的前提、关键,菌种优劣决定产量和质量。因此,准确、有效的鉴定香菇菌株是香菇产业长足发展的重要条件之一。

现在用于香菇菌种鉴定的方法主要有 4 种:(1)经验型的外观观察,以菌丝生长速度,菌落形态,子实体的形成以及形态特征作为不同菌株区分的依据。(2)以香菇不同菌株间不亲和性为基础的拮抗反应。(3)基于“一个酶一个基因”学说上的同工酶差异区分法。(4)以 DNA 多态性为基础的分子检测技术。在食用菌遗传育种研究中应用较多的分子

检测技术主要是 RFLP 和 RAPD^[2]。近年来发展起来的建立在 PCR 基础上的第二代分子标记——SSR (Simple sequence repeats,简单序列重复)标记,又称微卫星(Microsatellite),是基因组研究中的一种主要的分子标记技术。由于该技术具有简便、快速、稳定性高和等位基因多样性高等特点,已经广泛地用于遗传图谱的构建^[3]、比较基因组研究、遗传多样性分析和系统分类学研究^[4]。在担子菌中,SSR 在外生菌根真菌和一些植物病原真菌中有过报道^[5,6]。对于目前的栽培食用菌,只有法国在双孢蘑菇上做过,并获得了栽培食用菌中的第一个微卫星基序(TATG)_n,同时将该基序在一些侧耳菌上进行了验证^[7]。

本文将这一微卫星基序在香菇属的 3 个种 13 个菌株中进行了验证,以探讨该基序是否同样存在于香菇中,且其多态性是否适用于香菇遗传多样性的研究。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

研究中所用菌株列于表 1。

基金项目:上海市农委重点攻关项目

* 通讯作者。Tel/Fax 86-21-62201337; E-mail: syj0@saas.sh.cn

作者简介:秦莲花(1975-),女,山东潍坊人,博士研究生,主要从事香菇分子标记方面的研究。E-mail: qllh1013@yahoo.com

收稿日期:2003-11-06,修回日期:2004-03-15

表 1 供试菌株	
Table 1 Strains used in the study	
Code	Remarks
No.1	<i>Lentinus lepideus</i>
No.2	<i>Lentinus lepideus</i>
No.3	<i>Lentinus tigrinus</i>
No.4	<i>Lentinus tigrinus</i>
No.5	<i>Lentinus edodes</i> ,commercial strain
No.6	<i>Lentinus edodes</i> ,commercial strain
No.7	<i>Lentinus edodes</i> ,wide strain
No.8	<i>Lentinus edodes</i> ,wide strain
No.9	<i>Lentinus edodes</i> ,wide strain
No.10	<i>Lentinus edodes</i> ,commercial strain long-vegetating period
No.11	<i>Lentinus edodes</i> ,commercial strain
No.12	<i>Lentinus edodes</i> ,commercial strain
No.13	<i>Lentinus edodes</i> ,commercial strain high-temperature

1.2 主要试剂和仪器

Unit-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 :由上海生工生物技术服务有限公司提供 ;随机引物 S40-S60 :来自上海生工生物技术服务有限公司合成的随机引物 S1-S60 系列 ;PCR 仪器 :PTC-100。

1.3 菌丝培养

将低温保藏的香菇菌种转接到 PDA 斜面上 ,25℃ 下培养。14d 后接到 100mL PD 液体培养基中 ,25℃ 下 100r/min 振荡培养 14d ,收集菌丝 ,放入 -20℃ 冰箱保藏备用。

1.4 基因组 DNA 的提取

用改进的 CTAB 法提取基因组 DNA。 - 20℃ 冷冻干燥的香菇菌丝研磨成粉末 ,加入 65℃ 预热的 2 × CTAB 抽 提 液 [2% (W/V) CTAB ; 100mmol/L Tris · HCl , pH8.0 ; 20mmol/L EDTA , pH8.0 ; 1.4mol/L NaCl] , 65℃ 保温 45min 以上 , 间或轻摇混匀 , 然后 12000r/min 室温离心 20min ; 取上清加入等体积的氯仿 : 异戊醇 (24:1) , 轻轻混匀 30min 以上 , 12000r/min 室温离心 20min ; 上清夜移入新离心管中 , 加入 2/3 体积的 - 20℃ 预冷的异丙醇 , 轻轻摇动 5min , 8000r/min 室温离心 10min ; 去掉上清 , 用 75% 乙醇 10mmol/L KAC 抽提 2 ~ 3 次 , 每次 8000r/min 室温离心 10min , 再加入预冷的 95% 的乙醇 , 轻轻上下颠倒 , 12000r/min 室温离心 20min ; 弃去乙醇 , 真空抽干或自然晾干 , 加入 200μL TE buffer , 轻轻敲打使沉淀溶解 , 加入 1μL 10mg/mL RNase (由 Boudder 公司提供) 37℃ 水浴 , 保温 1h , 去除 RNA。 DNA 提取物于 - 20℃ 冰箱贮藏备用。

1.5 (TATG)_n 序列的验证

以 5'-TATGTATGTATGTATG-3' 序列设计引物 (上

海生工生物技术有限公司合成)。 PCR 扩增体系 : 10 × PCR buffer 2.5μL , 25mmol/L MgCl₂ 2μL , 10mmol/L dNTP 0.2μL , 5U/μL Taq DNA 酶 0.5μL , 20μmol/L SSR 引物 2μL , 模板 DNA 1μL (浓度 20 ~ 30ng/μL) , ddH₂O 16.8μL。 PCR 反应条件 : 94℃ 3min , 94℃ 1min , 38℃ 1min , 72℃ 2min , 40 个循环 ; 72℃ 5min。

1.6 (TATG)_n 序列分析

琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 , 用切胶铲从琼脂糖凝胶上切割目标条带 (大约 400bp) , 然后用 Unit-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒快速回收目标条带。 PCR 纯化产物送于上海生工生物技术有限公司进行克隆测序。

1.7 RAPD 扩增

PCR 扩增体系 : 10 × PCR buffer 2.5μL , 25mmol/L MgCl₂ 2μL , 10 mmol/L dNTP 0.25μL , 5U/μL Taq DNA 酶 0.2μL , 33ng/μL 随机引物 (S40-S60) 0.2μL , 模板 DNA 1μL (浓度 20 ng ~ 30ng/μL) , ddH₂O 18.85μL。 PCR 反应条件 : 92℃ 1min , 35℃ 1min , 72℃ 2min , 45 个循环 , 72℃ 5min。

琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。 将在琼脂糖凝胶上出现 DNA 片段的计为 1 , 不出现的计为 0 , 统计后输入电脑 , 用 NT-SYS 聚类分析软件体系进行聚类分析 , 构建遗传相关聚类图谱。

2 结果和分析

2.1 菌丝培养和 DNA 的提取

香菇菌种在液体振荡培养条件下 , 培养时间要比虎皮和豹皮菇的时间长。 香菇一般为 20 ~ 25d , 而虎皮和豹皮菇一般为 7d 左右。 由于香菇多糖含量比较多 , 用一般的氯仿苯酚法抽提不容易去除 , 本实验采用改进的 CTAB 法提取时 , 获得了质量比较高的总 DNA (略)。

2.2 微卫星核心序列区 DNA(DAMD) PCR 扩增

本试验最初是以法国做双孢蘑菇的 PCR 反应体系进行扩增的。 该体系只在香菇的某些菌株上扩出条带 , 且泳道上弥散严重。 优化反应条件 , 在 dNTP 浓度降为 50μmol/L 时 , 香菇菌种有良好的多态性条带扩出 , 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳共获得了 25 个条带 , 经过多次实验表现出很好的重复性和多态性 (图 1)。 由图 1 可看出 , 以 (TATG)_n 重复序列为引物对香菇微卫星区 DNA(DAMD) 直接 PCR 扩增 , 可在这 13 个供试菌株上获得多态性条带 , 其中 No. 1、

No.2、No.3 各有 1 个条带 ;No.4 没有 ;No.5、No.8、No.9、No.11、No.12、No.13 各有 2 个条带 ;No.6、No.7、No.10 各有 3 个条带。由电泳图谱还可看出 ,No.2与 No.3 的条带位置相似 ,都在 400bp 左右 ;No.5、No.8、No.9、No.12、No.13 的条带位置相似 ,两个条带的位置都分别在大于 2kb 处和 1kb 左右处 ;No.1、No.4、No.6、No.7、No.10、No.11 的条带位置与其他菌株条带位置差异性比较大。由此可见 (TATG)_n 基序的多态性可以用作香菇的遗传分类研究。

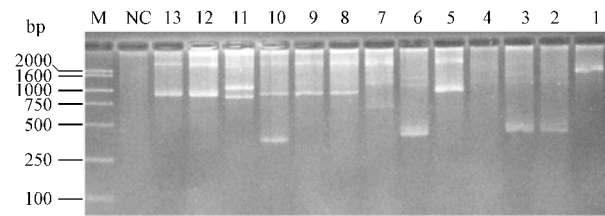


图 1 香菇 DAMD-PCR 电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoretic analysis of DAMD-PCR
M. 100bp DNA ladder ; 1.DAMD-PCR product from No. 1 strain ; 2.DAMD-PCR product from No. 2 strain ; 3.DAMD-PCR product from No.3 strain ; 4.DAMD-PCR product from No. 4 strain ; 5.DAMD-PCR product from No. 5 strain ; 6.DAMD-PCR product from No. 6 strain ; 7.DAMD-PCR product from No. 7 strain ; 8.DAMD-PCR product from No.8 strain ; 9.DAMD-PCR product from No.9 strain ; 10.DAMD-PCR product from No.10 strain ; 11.DAMD-PCR product from No.11 strain ; 12.DAMD-PCR product from No. 12 strain ; 13.DAMD-PCR product from No.13 strain .

2.3 测序

从 No.10 菌株回收到 380bp 长度的核酸片段 (图 2)。由测序结果可知 ,PCR 扩增产物不是假阳性的,香菇中有 (TATG)_n 基序存在。根据微卫星基序允许有一个碱基突变的特性^[8],统计可知 ,在 380bp 长度的核酸序列中该基序一共出现了 23 次 ,约占 24%。



图 2 从 No.10 菌株回收到的 380bp 片段序列

Fig.2 The 380bp nucleotide sequences of No.10 strain

2.4 RAPD 扩增

本实验用 S40-S60 共 21 个随机引物对供试菌

株进行 RAPD 扩增 ,其中 S58、S56、S53、S51、S48、S47、S42 等 7 个引物在所有供试菌株上都有多态性条带扩出 ,其它的只是在某些菌株上有条带扩出 ,多态性不高。图 3 显示的是引物 S53 对 13 个菌株扩增出的 DNA 片段。

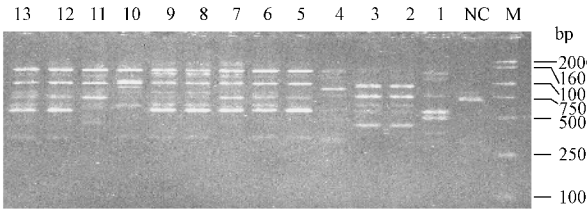


图 3 随机引物 S53 扩增结果

Fig.3 DNA fragments amplified by random primer S53
M. 100bp DNA ladder ; 1.PCR product from No.1 strain ; 2.PCR product from No.2 strain ; 3.PCR product from No.3 strain ; 4.PCR product from No. 4 strain ; 5.PCR product from No. 5 strain ; 6.PCR product from No. 6 strain ; 7.PCR product from No. 7 strain ; 8.PCR product from No. 8 strain ; 9.PCR product from No. 9 strain ; 10.PCR product from No.10 strain ; 11.PCR product from No.11 strain ; 12.PCR product from No.12 strain ; 13.PCR product from No.13 strain .

根据 PCR 扩增结果获得 RAPD 聚类图谱 (图 4)。从图谱可以看出 ,在 0.560 水平上 ,这 13 个菌株可分为 3 个大类群。No.1 自成一类 ;第二类为 No.4、No.2 和 No.3 ;其他的 9 个菌株为第三类 ,包括 No.5、No.6、No.7、No.8、No.9、No.10、No.11、No.12、No.13。除 No.2 外 ,由 RAPD 获得的其他菌株的分类情况与菌株来源处提供的分类信息基本一致。此外 ,由图谱我们还可知 ,第二类中 No.2 与 No.3 相似系数为 84.3% ;第三类中 ,No.5 与 No.12 的相似系数为 81.9% ,No.8 与 No.9 相似系数达 93.1% ,No.12 和 No.13 相似系数达到了 95.1% ,No.8 和

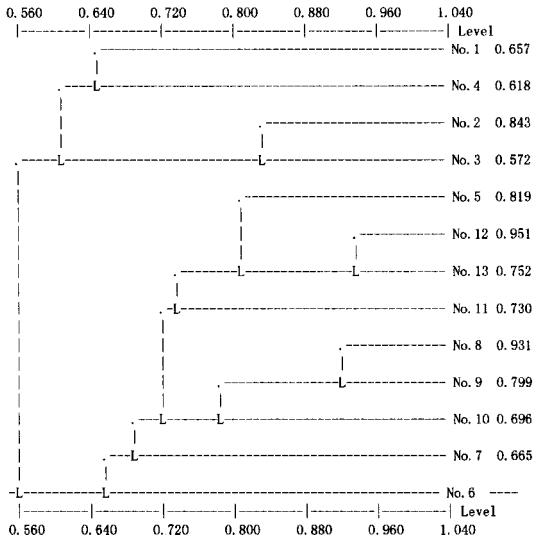


图 4 RAPD 聚类分析图谱

Fig.4 Dendrogram of 13 strains based on RAPD technology

No.9 与 No.12 和 No.13 之间的相似系数都在 70% 以上, No.5 与 No.13 的相似系数为 79.4%, 其他的菌株之间相似系数比较低, 一般在 60% ~ 70% 之间。RAPD 的实验结果与微卫星扩增获得的结果一致, 由此可知, 微卫星分子标记是适用于香菇的遗传分类研究的。

3 讨论

香菇的遗传育种研究一直是香菇产业的重要内容之一, 获得优良的菌种是香菇生产的重中之重。但是由于香菇多为无性繁殖, 菌种出现不少同一菌株而不同编号或同一编号而实为不同菌株的现象, 这不仅极大损害了育种者和广大菇农的利益, 也加速了我国香菇生产菌种的退化, 极大地阻碍了我国香菇产业的发展。在此情况下, 从分子水平上建立科学可靠、简便快速的菌种鉴定体系, 解决香菇的种间分类问题, 获得准确的分类关系, 以便于远缘杂交育种获得具有更好性状的香菇菌种, 就显得尤为重要。

微卫星标记是目前发展迅速的分子标记中比较有用的一个。它相较于目前使用比较广泛的分子标记 RFLP 和 RAPD 来说, 有着很多优越之处。它随机、均匀、广泛地存在于真核基因组中, 侧面特异序列在属内保守, 呈孟德尔式遗传, 多样性指数比 RFLP 和 RAPD 要高。RAPD 标记虽然简单, 但其稳定性差; RFLP 标记虽然稳定性好, 但需要转膜、标记探针, 且需要大量的模板 DNA。SSR 由于基序在每个位点的重复数量不同而表现出大量的长度多态性, 而且是特异扩增, 具有良好的稳定性, 且所需 DNA 的数量少、质量要求低, 实验过程不需要标记探针和转膜等繁琐的过程, 可以快速、简便、有效地对供试材料进行鉴定^[2,10~12]。已经证明, SSR 引物不仅在同一属内的不同种间能扩增出重复序列, 而且在同一种的不同个体间也存在着多态性^[9]。SSR 最早是在人类基因组研究中发现的^[11~13], 及其丰富地分布在整个基因组中, 后来在一些植物基因组研究中也筛选出 SSR 序列。现在这一技术已广泛地用于包括人类、其他哺乳动物、植物、某些丝状真菌的遗传研究中^[7,12]。本实验首次将这一技术用于香菇的遗传分类研究中, 通过用(TATG)₄ 引物对香菇 13 个菌株的微卫星区 DNA 直接进行扩增, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析获得了 25 个条带, 若用分辨率更高的聚丙烯酰胺电泳分析, 将获得更多的 SSR 多态性条带。由此, 可以看出 SSR 技术是可

以用于香菇的遗传分类研究的。

在本实验研究过程中, 我们先用(TATG)₄ 引物在本研究所提供的双孢蘑菇菌株上进行了 PCR 扩增, 重复了法国 Gérard B 博士的实验, 然后在香菇菌株上进行扩增。通过对反应体系的多次优化, 最终在 13 个供试菌株上获得了多态性条带, 并通过回收扩增产物克隆测序, 证明获得的多态性条带不是假阳性的。通过实验结果可看出, 该微卫星基序在 13 个供试菌株上存在着多态性, 而且不仅不同的香菇菌种如豹皮菇、虎皮菇和香菇种之间的菌株存在着明显的差异, 同一种内的菌株如 No.2 和 No.1、No.4 和 No.3 以及香菇菌株之间也存在着明显的多态性。为了进一步说明该结果的可靠性, 我们又用 RAPD 技术进行了分析。将 RAPD 实验结果与微卫星实验结果比较可知: 13 个供试菌株由 RAPD 分析分为的 3 大类中, 第一类中的 No.1 菌株在微卫星电泳图谱中只有一条特异性条带, 且位置显著不同于其他的菌株, 第二类中的 No.2 和 No.3 菌株相似系数达到 80% 以上, No.4 菌株与两者之间的相似系数相对较低, 在微卫星电泳图谱中表现为 No.2 和 No.3 菌株具有 1 条相近位置的多态性条带, 且条带位置与第三类中的菌株条带位置不同, No.4 菌株没有条带, 第三类中 No.5、No.8、No.9、No.12、No.13 等菌株之间的相似系数在 70% 以上, 而 No.6、No.7、No.10、No.11 等菌株与该类中的其他菌株之间的相似系数在 70% 以下, 在微卫星电泳图谱中表现为 No.5、No.8、No.9、No.12、No.13 具有 2 条相近位置的条带, No.6、No.7、No.10、No.11 各自具有一条或多条特异性条带。由此可见, 由 RAPD 确定的供试菌株的多态性与由该微卫星重复序列确定的多态性一致, 这也从侧面进一步说明了微卫星分子标记是可以用于香菇的遗传分类研究的。本实验是在香菇中建立 SSR 分子标记体系的初步性实验, 是对 SSR 标记用于香菇遗传育种研究可行性的初步探索。

参 考 文 献

- [1] 谭 琦, 杨建明, 陈明杰, 等. 用 RAPD 技术对香菇非对称性杂交后代遗传性状的分析. 食用菌学报, 2001, 8(2): 10-14.
- [2] 马福英, 罗信昌. 分子标记在食用蕈菌遗传育种中的应用. 菌物系统, 2002, 21(1): 147-151.
- [3] Heame C, Ghosh S, Todd J. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, 1993, 8: 288-294.
- [4] Dayanadan S, Bawa K S, Kesseli R. Conservation of microsatellites among tropical tree(*Leguminosae*). *American Journal of Botany*, 1997, 84(12): 1658-1663.

[5] Gerbi H , Delaruelle C , Selosse M , *et al.* High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old forest. *Mol Ecol* , 1999 **8** :2003 – 2013.

[6] Kretzer A M , Molina R , Spatafora J W. Microsatellite markers for the ectomycorrhizal *Rhizopogon vinicolor* . *Mol Ecol* , 2000 , **9** :1190 – 1191.

[7] Gérard B , Anton S M , Sonnenberg L J L D , *et al.* Molecular cloning of a widely distributed microsatellite core sequence from the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* . *Fungal Genetics and Biology* , 2000 , **31** :115 – 123.

[8] Chakraborty R , Kimmel M , Stivers D N , *et al.* Relative mutation rates at di- , tri- and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1997 , **94** :1041 – 1046.

[9] Groppe K , Sanders I , Wiemken A , *et al.* A microsatellite marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes(*Epichloë* spp.) in grasses. *Appl Environ Microbiol* , 1995 , **61** :3946 – 3949.

[10] Primmer C R , Ellegren H. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Mol Biol Evol* , 1998 , **15** (8) :997 – 1008.

[11] Litt M , Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* , 1989 , **44** :397 – 401.

[12] Beckman J S , Weber J L. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* , 1992 , **12** :627 – 631.

[13] Wyman A R , White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Nat Acad Sci USA* , 1980 , **77** :6754 – 6758.

Microsatellite Motif (TATG)_n in *Lentinula edode*

QIN Lian-Hua^{1 2} ZHANG Hong³ CHEN Ming-Jie² TAN Qi^{2*} PAN Ying-Jie²

(¹ College of Life and Sciences , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 ,China)

(² Key Laboratory of Edible Fungus Genetic and Breeding , Ministry of Agriculture , The People ' s Republic of China ; Key Laboratory of Agriculture Genetics and Breeding of Shanghai ; Edible Fungi Institute , Shanghai Academy of Agricultural Sciences , Shanghai 201106 ,China)

(³ Shanghai Breeding and Propagating Center , Shanghai 201601 ,China)

Abstract : The first microsatellite motif (TATG)_n in cultivated edible fungi from *Agaricus bisporus* was tested in *Lentinula edode* strains. A 16-mer oligonucleotide (TATG)₄ was synthesized and used as primer in PCR with the DNA of 13 *Lentinula edode* strains as template. 25 DNA fragments were amplified , and the strains were identified according to their polymorphs. Bands of No. 10 strain were obtained from 1.5% agarose gel , sequenced , indicating that (TATG)₄ repeats are present in *Lentinula edode* . The strains were also tested by RAPD technique and 102 DNA fragments were amplified by 7 random primers. The cluster-analysis results proved the results by Microsatellite. The variability found within closely related strains indicates that such microsatellites are useful in studying genetic variability in wild and cultivated *Lentinula edode* .

Key words : Microsatellite , *Lentinula edode* , RAPD technique

Foundation item : Research Projects Supported by Shanghai Municipal Committee of Agriculture
* Corresponding author. Tel/Fax 86-21-62201337 ; E-mail :syj0@saas.sh.cn
Received date :11-06-2003

本 期 广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
镇江东方生物机电设备技术有限公司	封底	香港徕卡仪器有限公司	文中彩插 I
安玛西亚(GE Healthcare Bio-sciences)	封二	扬中市威柯特生物机电设备公司	文后黑白插 I
岛津(香港)有限公司	封三	镇江达森发酵设备有限公司	文后彩插 I
北京陆桥技术有限责任公司	文前彩插 I	南京宁和生化设备有限公司	文后彩插 II
上海联环生物机电设备有限公司	文前彩插 II		