

应用 RAPD 鉴定红菇组织分离菌株的探索试验*

Identification of *Russula* s Isolates with RAPD

孙文波 李海鹰 王桂文 范嘉晔

Sun Wenbo Li Haiying Wang Guiwen Fan Jiaye

(广西科学院生物研究所 南宁市大岭路 2号 530003)

(Institute of Biology, Guangxi Academy of Sciences, 2 Dalinglu, Nanning, Guangxi, 530003, China)

摘要 用组织分离技术从野生红菇 (*Russula* sp.) 子实体中分离得 3 个菌株。用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 对红菇子实体和分离菌株的 DNA 多样性进行分析, 以确定 3 个分离菌株与子实体之间的亲缘关系。实验使用 16 个随机引物检测 40 多个位点, 计算它们之间的相似性。实验结果表明 3 个分离菌株和红菇子实体之间的 DNA 相似性非常高, 红菇子实体和对照菌株 [凤尾菇 (*Pleurotus sajor-eaju*) 和金针菇 (*Flammulina velutipes* (Fr) Sing)] 之间的 DNA 相似性差距基本上反映了红菇与对照菌株之间的种属差距。推测 3 个红菇分离菌株同一种。

关键词 红菇 分离菌株 亲缘关系 随机扩增多态性 DNA

中图法分类号 S 646.190.37

Abstract Three strains were obtained from the sporocarp of wild *Russula* using tissue culture isolation. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to approach genetic diversity of wild *Russula* and three strains, so as to decide the relation between three strains and sporocarp. Over forty genetic sites were checked by using sixteen random primers, and the genetic similarity between three strains and *Russula* sporocarp was studied. The result showed that they were greatly similar and the similarity gap of DNA between *Russula* sporocarp and the checked strains showed the interspecies distance. A preliminary conclusion can be drawn from the experiment that the three strains were isolates of *Russula*.

Key words *Russula*, strain, relative, random amplified polymorphic DNA

许多珍稀、名贵的食用菌绝大多数属外生菌根真菌, 目前人工培养子实体尚未成功^[1], 因此对用组织分离获得的食用菌菌根真菌的菌株, 尚难以用经典回接的试验方法验证其真伪。分子生物技术的深入发展, 使得对大型真菌进行分子水平的研究成为可能。

DNA 作为遗传物质, 要比表型特征更能真实地反映真菌的系统发育及其血缘关系。而由 PCR 技术发展而来的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 适用于种下水水平的分类研究。RAPD 具有用量小、鉴定迅速、可重复性等特点^[2]。因此 RAPD 在大型真菌分离菌株的鉴定、大型真菌之间的种群关系等研究中具有广阔的应用前景。本实验采用 RAPD 技术对食用菌菌根真菌红菇子实体和其通过组织分离得到的菌株的 DNA 进行分析, 以探讨通过组织分离得到的菌株与红菇子实体之间的亲缘关系。以期为外生食用菌菌根真菌的

组织分离菌株找到一个快速、方便而又科学的分析鉴别实验方法

1 材料与方法

1.1 材料与菌种

野生红菇 (*Russula* sp.) 子实体于 1998 年 9 月采自广西浦北山区, 经鉴定为鳞盖红菇 (*Russula lepida* Fr) 3 个实验菌株是本实验室组织分离纯化得到, 分别编为 1 号、2 号、3 号菌株, 对照菌株凤尾菇 (*Pleurotus sajor-eaju*)、金针菇 (*Flammulina velutipes* (Fr) Sing) 是本实验室保存菌种。RAPD 所用引物为华美公司产品, 编号为 S1-S80 PCR 仪为美国 PE 公司产品。

1.2 DNA 的制备与保存

按文献 [3] 的方法提取总 DNA, 260 nm/280 nm 检测纯度, 以一定比例稀释, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.3 RAPD 分析

按文献 [4, 5] 方法, PCR 扩增总体积为 25 μl,

1999-07-29 收稿, 2000-03-02 修回。

* 国家自然科学基金资助项目 (3945005)、广西自然科学基金资助项目 (桂科配 9618005)。

反应液组成: 10× buffer 2.5 μl, 2.5 mmol的 dNTP 2 μl, 4 μmol的随机引物 1 μl, 1 μ的 Tag 酶, 15 ng模板 DNA, 用重蒸馏水补足最终体积为 25 μl

PCR扩增程序反应设制 35个循环, 每个循环包括 94℃变性 1 min, 37℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min 30 s, 在循环之前加 94℃ 5 min的预变性, 循环结束后, 72℃延伸 5 min

扩增产物在 0.5倍 TBE缓冲液中进行电泳, 琼脂糖凝胶浓度为 1.2%, 电泳结束后溴化乙锭染色, 然后拍照分析

1.4 数据分析

根据扩增带的有无作二项级统计, 有 DNA谱带的用“1”表示, 无谱带用“0”表示, 记录那些谱带清晰的 RAPD标记, 采用 Nei-Li (1979) 方法^[6]计算百分相似性

百分相似性 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 其中 N_{xy} 为两个个体共享的 RAPD标记, N_x, N_y 为个体 x 和个体 y 拥有的 RAPD标记

2 结果与分析

2.1 DNA的提取与检测

采用液氮研磨和酚氯仿抽取法获得的总 DNA片段, 经紫外光吸收测量结果显示, 样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀值为 1.6左右, 这说明 DNA样品仍存在少量的蛋白质和 RNA, 但实践证明用于 RAPD分析对实验结果影响不大

2.2 引物的筛选

本实验使用长度为 10bp的随机引物进行扩增, 表 1 样品之间的相似性矩阵系数

Table 1 The similarity coefficient between samples

	红菇子实体 <i>Russula</i> sporocarp	1号菌株 Strain 1	2号菌株 Strain 2	3号菌株 Strain 3	金针菇 <i>Flammulina</i> <i>velutipes</i> (Fr) Sing	凤尾菇 <i>Pleurotus</i> <i>sajor-caju</i>
红菇子实体 <i>Russula</i> sporocarp	1					
1号分离菌株 Strain 1	0.988	1				
2号分离菌株 Strain 2	0.977	0.976	1			
3号分离菌株 Strain 3	0.930	0.930	0.930	1		
金针菇 <i>Flammulina</i> <i>velutipes</i> (Fr) Sing	0.307	0.307	0.282	0.256	1	
凤尾菇 <i>Pleurotus</i> <i>sajor-caju</i>	0.341	0.341	0.318	0.273	0.375	1

从这 80个随机引物中筛选出 16个扩增带型清晰明亮, 产物相对稳定, 重复性好的引物进行实验

2.3 DNA的多态性分析

使用 16个随机引物进行扩增, 平均每个样品共扩增得到 44.8条多态性标记, 平均每个引物扩增出 2.8条带, 扩增片段长度在 546 bp~ 4361 bp之间, 统计样品之间的 N_x, N_y, N_{xy} , 它们之间的相似性列于表 1

从结果来看, 3个分离菌株及红菇子实体之间的相似性都很高, 均在 0.90以上, 而它们之间的差异很小, 这种差异可能是同种内不同个体之间的差异。本实验选用的参考菌株 (金针菇, 凤尾菇) 和红菇是不同的属, 它们之间相似性相对较低, 均在 0.40以下, 这个差距反映了它们的属间差距。3个分离菌株和红菇子实体之间的 DNA相似性很高, 差距不大; 而且它们和参照菌株之间的距离基本一致, 从这可以分析出 3个分离菌株是鳞盖红菇

2.4 图谱分析

本实验采用 Nei-Li方法对扩增图谱进行分析, 统计图谱上相同和不同的谱带, 以此计算样品间的相似值, 分析它们之间的种缘关系。如图 1(A-B)所示, 3个分离菌株和红菇子实体的谱带基本一致, 而图 1(A)中的第 1条谱带 (参考菌株凤尾菇), 图 1(B)中的第 2条谱带 (参考菌株金针菇) 都和相应引物扩增出的红菇子实体谱带基本一致, 造成此原因可能是: (1)由于参照菌株和样品之间是属间差距, DNA序列相差较大, 容易造成用相同引物扩增出的 DNA片段分子量相同, 而序列不同的情况, 这种情况会使图

谱上的条带电泳结果相同,带来实验误差^[7]; (2) 由于引物作用位点正好是样品间相同的 DNA 区域,所以扩增出的结果一样,这说明该引物作用在该样品的 DNA 片段不存在多态性。为了减少误差,参照菌株最好是在种的水平上选择^[8],同时要对引物进行严格筛选,以使实验结果更能反映出物种间 DNA 多态性。

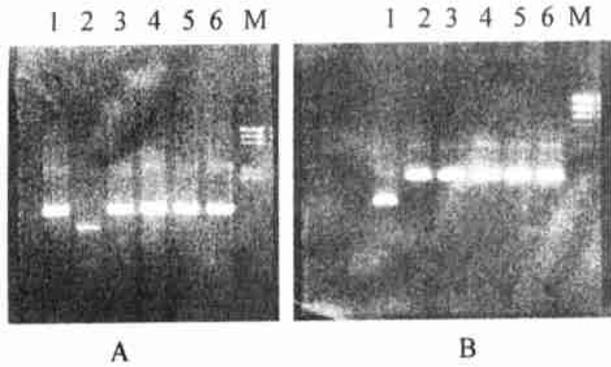


图 1 引物 S₈₈ (A) 和 S₁₆ (B) 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 1 The RAPD patterns generated by primers S₈₈ (A) and S₁₆ (B)
M 为分子量标准 (DNA/HindIII), 1~6 依次为凤尾菇, 金针菇, 菌株 1 号、2 号、3 号, 红菇子实体 Lane M: DNA/HindIII markers, Lanes from 1 to 6 *Pleurotus sajor-aju*, *Flammulina velutipes* (Fr) Sing, strains 1 to 3, *Russula sporocarp*.

3 讨论

RAPD 技术现在已发展到一个相当成熟的阶段,虽然其作为一种生物分类手段还存在一些缺陷^[9],但作为一种鉴定手段却广泛应用于疾病鉴定,物种亲缘关系分析等方面。本实验应用 RAPD 技术鉴定大型

真菌的分离菌株,结果表明已达到了分离鉴定的目的。为了使该实验手段更完善,可以用 RAPD 对待检测的大型真菌基因组进行检测,构建基因组指纹图谱库,找出代表种间差异的特异性谱带,再对其进行测序,并在此基础上设计出特殊引物,用标准 PCR 扩增来达到更快速、准确鉴定大型真菌分离菌株的目的。

致谢

本实验在广西大学农业分子遗传农业部重点开放实验室进行,得到冯家勋、唐东阶等老师的帮助与指导,在此致以衷心感谢。

参考文献

- 1 李海鹰,范嘉晔,王桂文等. 广西浦北鳞盖红菇的形态与生态环境. 广西科学, 1995, 2 (2): 33~ 35.
- 2 惠东威. 遗传学报, 1996, 23 (6): 460~ 468.
- 3 弓明钦等. 菌根研究及应用. 北京: 中国林业出版社, 1997. 152~ 153.
- 4 朱沛轩. PCR 检验技术. 成都: 四川大学出版社, 1995.
- 5 萨姆布鲁克 J 等. 分子克隆实验指南. 金冬雁等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1989.
- 6 Nei M, Li W H. Proc Natl Sei USA, 1979, 76 5269~ 5278.
- 7 曾伟等. 双孢蘑菇及大肥菇的种内及种间多态性 RAPD 分析. 菌物系统, 1999, 18 (1): 55~ 60.
- 8 陈春涛等. 香菇栽培种线粒体 DNA 和核糖体 DNA 多态性研究初探. 微生物学杂志, 1997, 23~ 26.
- 9 喻盛甫,王杨,胡先奇等. 种常见根结线中基因组 DNA 的 RAPD 分析. 植物生理学报, 1998, 28 (4): 359~ 365.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 20 页 Continue from page 209)

198 年天然林优良种源为佛罗里达的 2 号 (爱斯基比亚)、11 号 (利维)、16 号 (Pensacole), 阿拉巴马州 14 号 (Galewood), 路易斯安那州 17 号 (泉山)。因它们来源于天然林, 未经遗传改良, 与台山湿地松种子园相比, 增益不显著。

4 结语

湿地松种源间生长、冠幅、干形、结实等性状差异显著, 种源的生长性状的变异属地理渐变型, 其它性状多表现为随机型。影响湿地松生长量的主导气象因子是热量, 随种源原产地年平均气温升高而下降, 以北部种源生长较好, 南部种源较差。优良种源分布在东南部沿海的佛罗里达州、佐治亚州、南卡罗来那

州、北卡罗来那州和阿拉巴马州等 5 个州。湿地松种源间生长差异稳定, 年度的重复试验表明无交互作用, 早晚相关显著, 因此, 在中国南方低丘台地发展湿地松, 选择美国东南部沿海的优良种源, 将比广东台山湿地松在单株材积上获得 23.38% 的增益。

参考文献

- 1 潘志刚等. 湿地松、火炬松种源试验研究. 北京: 北京科学技术出版社, 1992.
- 2 吴中伦等. 国外树种引种概论. 北京: 科学出版社, 1983.
- 3 郝克编. 美国南方松区内外选择气象台站 1921~ 1950 年气候资料. 美国林务局试验站, 1955.
- 4 潘志刚, 游应天. 湿地松、火炬松、加勒比松引种栽培. 北京: 北京科学技术出版社, 1991.

(责任编辑: 蒋汉明)