

SCoT 和 ISSR 分析金针菇单核体遗传差异的研究

张斌 (西南林业大学林学院云南省森林灾害预警与控制重点实验室云南省森林保护重点学科, 云南昆明 650224)

摘要 [目的]研究金针菇单核体的遗传差异。[方法]采用常规稀释分离法分离获得金针菇 F1 代 20 个单核体, 对 15 条 scot 和 9 条 ISSR 引物进行了筛选, 根据扩增结果采用软件 NTsys 2.10e 计算菌株间的遗传相似系数, 并对供试菌株进行聚类分析。[结果]有 6 条引物能扩增出条带清晰且具丰富多态性的带谱, 共计扩增出 327 条清晰易辨的 DNA 片段条带, 其中多态性条带 287 条, 占总条带数的 87.77%。菌株的 SCoT 分析一致度 GI 值为 0.187 5~0.937 5, 其中 W2 和 W3, W11 和 W12 的一致度最大, 为 0.937 5; W15 和 W18 的一致度最小, 为 0.187 5。菌株的 ISSR 分析一致度 GI 值为 0.250 0~1.000 0, W3、W4 和 W9, W15 和 W17, W16 和 W19 的一致度最大, 为 1.000 0; W14 和 W18 的一致度最小, 为 0.250 0。这种低的遗传一致度充分表明了金针菇菌株系列单核体间具有的较大遗传差异。聚类分析结果表明, 当相似性达到 0.55 的水平时, SCoT 标记的 20 个菌株可以明显地分为 3 组; 当相似性达到 0.66 的水平时, ISSR 标记的 20 个菌株也可以分为 3 组, 其中 W11、W18、W20 3 个菌株是 1 组里共有的菌株。当聚到亚组时, W15 和 W17 是共有的 1 组。[结论]该方法采用 2 种标记对单核体菌株进行遗传多样性分析, 对金针菇育种中杂交亲本的选择具有重要的科研以及实践意义。

关键词 SCoT; ISSR; 单核体; 遗传差异

中图分类号 S646.1¹5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)30-11947-03

Analysis of Genetic Variation of *Flammulina velutipes* Strains by SCOT and ISSR Marker

ZHANG Bin (Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Key Subject of Forest Protection in Yunnan Province, College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract [Objective] To study genetic variation of *Flammulina velutipes* strains. [Method] 20 sporulated monokaryon have been developed from F1 generation of *Flammulina velutipes*. 15 SCoT primers and 9 ISSR primers were screened. According to the results of amplification using NTsys software 2.10 e to calculate the genetic similarity coefficient between strains. [Result] There are 6 primers could amplify the stripe clear and rich polymorphism band spectrum. A total of 327 fragments were amplified, among them 287 (accounting for 87.77% of the total) were polymorphic. Strains SCoT analysis consistent GI value is 0.187 5-0.937 5, W2 and W3, W11 and W12 consistent GI value is maximum, 0.937 5; W15 and W18 consistent GI value is minimum, 0.187 5. Strains ISSR analysis consistent GI value is 0.250 0-1.000 0, W3, W4 and W9, W15 and W17, W16 and W19 consistent GI value is maximum, 1.000; W14 and W18 consistent GI value is minimum, 0.2500. This low genetic consistency fully shows that the *Flammulina velutipes* strains series Sporulated monokaryon with large genetic differences. Strains for clustering analysis, the results showed that when the similarity at 0.55 level, 20 strains of SCoT markers can be clearly divided into three groups, when similarity at 0.66 level, 20 strains of ISSR markers can also be divided into three groups, including W11, W18 and W20 three strains is a set of shared strains. When together into subgroups, W15 and W17 is shared by a group. [Conclusion] The genetic diversity analysis was conducted with 2 markers in the study, which has important scientific and practice meaning in selection of hybrid parents in *Flammulina velutipes* breeding.

Key words SCoT; ISSR; Monokaryon; Genetic variation

SCoT(start codon targeted polymorphism)分子标记被广泛开发应用。SCoT引物长为 18 bp, 建立技术体系比较容易, 同时克服了 RAPD 标记的重复性差和 RFLP 标记的操作繁杂的缺点, 根据基因起始密码子的保守性设计引物^[1-3], 在不知道基因组序列的情况下也可以开发应用, 所以通用性强。Collard 和 Mackill 2 位科学家对水稻的遗传多样性分析和对水稻回交群体进行验证^[4], 发现 SCoT 标记能检测出基因型不同的水稻间的微小差异, 并能准确反映供试材料间的亲缘关系。SCoT 标记还能分析不同品种的龙眼、葡萄的遗传多样性^[5-6], 可以准确反映品种间的亲缘关系, 同时可以显示出品种的地理来源^[7-8]。SCoT 标记已在多种植物的遗传差异性分析中得到应用, 能分析玄参种质资源和牡丹的遗传差异性^[9-10]。在食用菌上标记了野生白灵菇^[11], 但是关于金针菇的相关研究鲜有报道。ISSR 标记多与其他分子标记结合使用, 已广泛应用于遗传多样性分析研究^[12-13]。在单核体的研究中, ISSR 分子标记分析了香菇和黑木耳单孢杂交后代和单核体遗传差异^[14-16]。笔者利用 SCoT 和 ISSR 分子标

记技术, 分别对金针菇单核体进行遗传差异分析, 在金针菇杂交育种选择中可以以 2 个标记分别选择单核体亲本, 以期优良杂交亲本单核体的选择奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。供试栽培菌株 F3W4(川金 11), 由四川省农业科学院微生物室提供, 经栽培获得子实体, 采用常规稀释分离法分离获得 F1 代 20 单核体(记为 W1~W20)。

1.1.2 主要仪器。PCR 仪 C1000™, 购自 BIO-RAD Laboratories - Segrate (milan) Italy。

1.1.3 主要试剂。扩增反应液为 2 × PCR Master Mix [Taq DNA Polymerase 0.05 U/μl; MgCl₂ 4 mmol/L; 4 mmol/L dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)], 购自 MBI Fermentas 公司; 引物, 均购自上海生工生物工程有限公司(如表 1~2)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取。使用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 然后进行 ITS 扩增, 最后用 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 质量和浓度, 于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 PCR 反应。PCR 反应体系(20 μl)为: PCR 10 μl, 双蒸水 8 μl, 基因组 DNA 1 μl, 引物 1 μl。扩展程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 51 °C (温度随引物变化) 退火 1

作者简介 张斌(1988-), 男, 甘肃陇南人, 硕士研究生, 研究方向: 资源微生物。

收稿日期 2013-09-23

min, 72 °C 复性 2 min, 36 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 100 V, 1.5 凝胶成像系统拍照记录。

表 1 SCoT 引物序列

引物名称	引物序列(5' - 3')	退火温度/°C
Sp5	CAACAATGGCTACCACGA	50.5
Sp13	ACGACATGGCGACCATCG	50.5
Sp14	ACGACATGGCGACCACGC	50.5
Sp15	ACGACATGGCGACCGCGA	50.5
Sp16	ACCATGGCTACCACCGAC	50.5
Sp17	ACCATGGCTACCACCGAG	50.5
Sp20	ACCATGGCTACCACCGCG	50.5
Sp23	CACCATGGCTACCACCGAG	50.5
Sp26	ACCATGGCTACCACCGTC	50.5
Sp27	ACCATGGCTACCACCGTG	50.5
Sp29	CCATGGCTACCACCGGCC	50.5
Sp31	CCATGGCTACCACCGCCT	50.5
Sp32	CCATGGCTACCACCGCAC	50.5
Sp33	CCATGGCTACCACCGCAG	50.5
Sp34	ACCATGGCTACCACCGCA	50.5

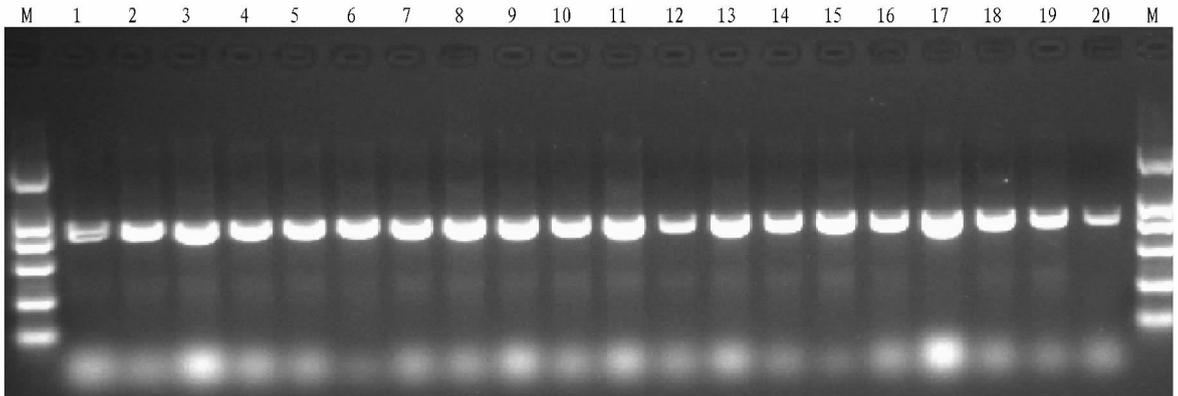
1.2.3 数据处理。电泳结果采取 0/1 赋值记带方法, 将在琼脂糖凝胶上出现 DNA 片段的记为数字 1, 不出现的记数字 0, 统计后输入电脑, 用分析软件 NTsys 2.10e 进行聚类分析, 最后自动生成相似性系数矩阵和树状图。

表 2 ISSR 引物序列

引物名称	引物序列(5' - 3')	退火温度/°C
18	CACACACACACACACAG	54.6
26	ACACACACACACACACC	54.6
27	ACACACACACACACACG	54.6
34	ATGATGATGATGATGATG	49.0
P2	BDBACAACAACAACAACA	49.0
P4	CACCACCACCACSC	47.0
P13	GAGAGAGAGAGAGAGA	54.6
P14	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	53.0
P15	AGAGAGAGAGAGAGAG	53.0

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 的制备 采用 DNA 基因组试剂盒提取的 DNA, 对其进行 ITS 扩增, 扩增出的条带清晰, 无污染, 纯度较高, 所以能满足分子标记分析的要求(图 1)。

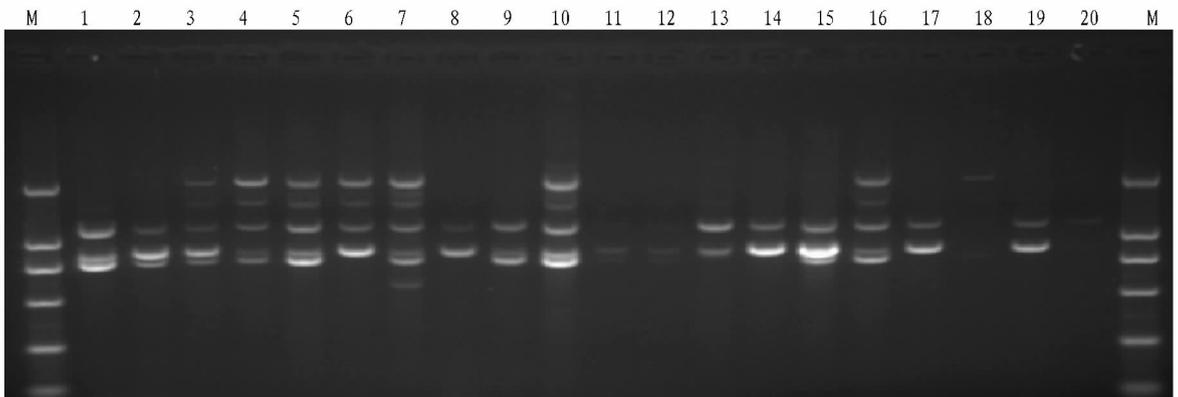


注: 1 ~ 20 分别表示 W1 ~ W20。

图 1 基因组 DNA 的 ITS 检测

2.2 标记分析 对 15 条 scot 和 9 ISSR 引物进行了筛选, 其中有 6 条引物能扩增出条带清晰且具多态性的带谱, 共计扩增出 327 条清晰易辨的 DNA 片段条带, 其中多态性条带 287

条, 占总条带数的 87.77%。扩增出的 DNA 片段条带的大小在 200 ~ 2 000 bp(图 2 ~ 3)。



注: M. DL2000 (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100)。

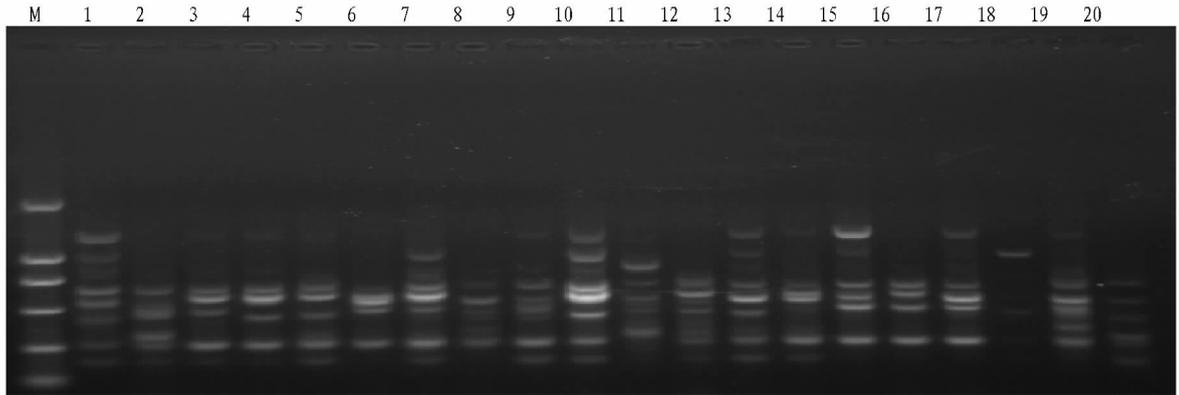
图 2 Scot 引物 sp33 的扩增图谱

2.3 样本间遗传一致度分析 基于 SCoT 分析,供试菌株的一致度 GI 值为 0.187 5~0.937 5,表明金针菇单核体具有丰富的遗传多样性。在 20 个金针菇单核体中,W2 和 W3,W11 和 W12 的一致度最大,为 0.937 5;W15 和 W18 之间一致度最小,为 0.187 5。这种低的遗传一致度充分表明了金针菇菌株系列单核体间具有的较大遗传差异。

基于 ISSR 分析,供试菌株的一致度 GI 值为 0.250 0~1.000 0,表明金针菇单核体具有丰富的遗传多样性。在 20 个金针菇单核体中,W3、W4 和 W9,W15 和 W17,W16 和 W19

的一致度最大,为 1.000 0;W14 和 W18 之间一致度最小,为 0.250 0。这种低的遗传一致度充分表明了金针菇菌株系列单核体间具有的较大遗传差异。

2.4 聚类分析 图 4~5 表明,当相似性达到 0.55 的水平时,SCoT 标记的 20 个菌株可以明显地分为 3 组,当相似性达到 0.66 的水平时,ISSR 标记的 20 个菌株也可以分为 3 组,其中 W11、W18、W20 3 个菌株是 1 组里共有的菌株。当聚到亚组时,W15 和 W17 是共有的 1 组。



注:M: DL2000 (2000、1000、750、500、250、100)。

图 3 ISSR 引物 26 的扩增图谱

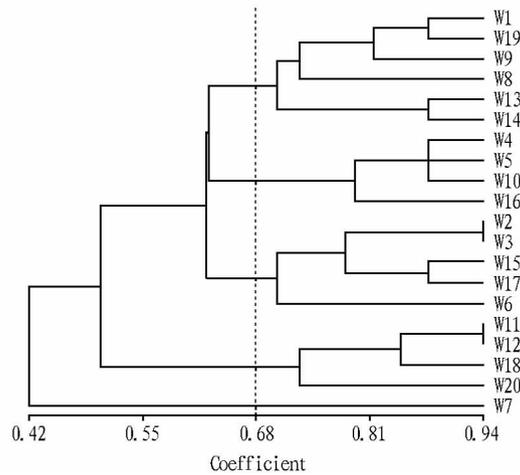


图 4 金针菇 SCoT 分子标记的聚类分析

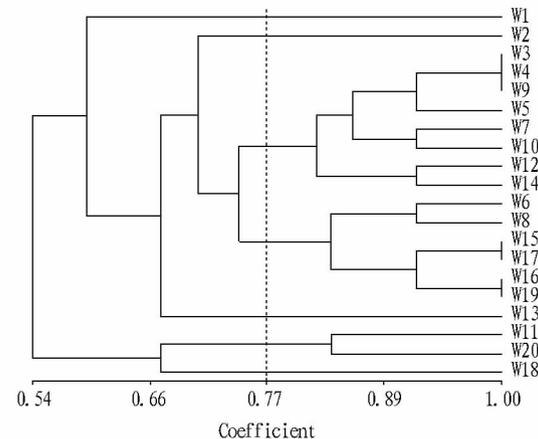


图 5 金针菇 ISSR 分子标记聚类分析

3 结论与讨论

亲本单核体 W15 和 W18,W14 和 W18 的 GI 值最小,遗传相似程度最低,可能是因为 2 个单核体菌株各自具有自己的基因组,共同存在于菌丝细胞中。W2 和 W3,W11 和 W12,W3、W4 和 W9,W15 和 W17,W16 和 W19 的 GI 值最大,其他单核体菌株的 GI 值介于 0.250 0~1.000 0,这可能是由于金针菇子实体的担子在发生减数分裂时,细胞内的 2 个核经过染色体的交换以及随机重组的过程,因染色体在交换重组过程中的差异,担子上各个担孢子就会表现出差异,这种差异会体现出充分杂交或类似于某一亲本的现象,就会通过分子标记分析而表现出来。

在 SCoT 分子标记和 ISSR 标记试验中可以看到,前者比后者的遗传差异更稳定,试验依据 2 种标记所进行的聚类分析结果显示,反映出不同分子标记的结果是可以不同的。在选择杂交育种的单核体中,要结合几种分子标记选择出确定的差异菌株,这样可以更科学的为杂交育种选择材料。亲本单核体遗传距离愈大,杂交获得优良菌株的几率就愈大。目前,我国已经选择遗传背景差异较大的优良品种进行亲本选育,或者进行杂交选育,已获得综合了不同品种优势的新品种,所以这种方法是育种专家广为采用的方法之一。通过 2 种标记对单核体菌株进行遗传多样性分析,对金针菇育种中杂交亲本的选择具有重要的科研以及实践意义,值得深入研究。

参考文献

[1] JOSHI C P,ZHOU H,HUANG X Q,et al. Context sequences of translation initiation codon in plants[J]. Plant Molecular Biology,1997,35 (6) :993 - 1001.

浓度为 3.0 mg/L 时,接种的蓝莓新芽在培养 30 d 时开始逐渐长出愈伤组织,进而形成不定芽(图 1),且增殖倍数平均达到了 4.3 倍;当处理中的玉米素(ZT)浓度为 2.0 mg/L 时,增殖倍数为 2.8 倍;当处理中玉米素浓度为 1.0 mg/L 时,产生的愈伤组织较少,不定芽分化数量也较少,其芽的增殖倍数较处理 ZZ3 下降了 50%,只有 2.1 倍,而不加玉米素的对照其不定芽几乎不分化。对表 3 数据经方差分析可知,各处

表 2 不同玉米素浓度对蓝莓增殖效率结果

处理 组合	I	II	III	平均丛 生芽数	5% 显	
					著水平	1% 极显 著水平
ZZ3	131	123	131	128.3	a	A
ZZ2	84	81	90	85.0	b	B
ZZ1	66	63	66	65.0	c	C
CK	29	30	31	30.0	d	D



图 1 蓝莓丛生苗

理组间增殖效果达到极显著的差异($P < 0.05$)。由此可见,随着玉米素浓度的降低不定芽分化数量逐渐减少,当培养基中不添加玉米素(ZT)时,不定芽几乎不分化,生长不良。

3 结论

3.1 玉米素浓度对蓝莓诱导分化的影响 试验结果表明,玉米素不同浓度处理对蓝莓诱导分化具有明显的促进作用,其中以在 WPM 培养基中加入 2.0 mg/L 玉米素(LM2)的处理效果最好。

3.2 玉米素浓度对蓝莓不定芽增殖生长的影响 试验结果表明,蓝莓不定芽增殖生长的培养过程中,在 WPM 培养基中加入 3.0 mg/L 的玉米素(ZT)最为适宜,其次是在在 WPM 培养基中加入 2.0 mg/L 的玉米素。

参考文献

- [1] 李丽容,金开正. 兔眼蓝莓组培快繁试验[J]. 中国南方果树,2010(1): 71-72.
- [2] 王宏航,李朝森,刘慧琴. 观赏蕨类植物组培快繁及其移栽技术[J]. 江西农业学报,2006(5):125-126.
- [3] 顾娟,贺善安. 蓝浆果与蔓越桔[M]. 北京:中国农业出版社,2001:1-24.
- [4] 王清连. 植物组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2002:261.
- [5] 刘庆忠,赵红军. 高灌蓝莓的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2002,8(3):253.
- [6] 李亚东. 越橘(蓝莓)栽培与加工利用[M]. 长春:吉林科学技术出版社,2001:1-5.
- [7] 王连润,杨松光,刘家迅,等. 接种与非接种菌根菌条件下蓝莓扦插苗生长差异比较[J]. 西南农业学报,2012(5):1823-1826.
- [8] 秦兴川. 蓝莓适生环境与栽培技术研究[J]. 园艺与种苗,2012(4):37-39.

(上接第 11949 页)

- [2] HAWKINS J D. A survey on intron and exon lengths[J]. Nucleic Acids Research,1998,16(21):9893-9905.
- [3] SAWANT S V, SINGH P K, GUPTA S K, et al. Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants[J]. Journal of Genetics,1999,78(2):123-131.
- [4] COLLARD B C Y, MACKILL D J. Start codon targeted(SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plant, plant[J]. Mol Biol Rep,2008,27(1):86-93.
- [5] 张君玉,郭大龙,龚莹,等. 葡萄目标起始密码子多态性反应体系的优化[J]. 果树学报,2011(2):209-214.
- [6] 陈虎,何新华,罗聪,等. 龙眼 SCoT-PCR 反应体系的优化[J]. 基因组学与应用生物学,2009(5):970-974.
- [7] 陈虎,何新华,罗聪,等. 龙眼 24 个品种的 SCoT 遗传多样性分析[J]. 园艺学报,2010,37(10):1651-1654.
- [8] GUO D L, ZHANG J Y, LIU C H. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses[J]. Molecular Biology Reporter,2012,39(5):5307-5313.
- [9] 陈大霞,张雪,王钰,等. 应用 SCoT 标记分析玄参种质资源的遗传多样

- 性[J]. 中国中药杂志,2012(16):2368-2372.
- [10] 侯小改,王娟,贾甜,等. 牡丹 SCoT 分子标记正交优化及引物筛选[J]. 华北农学报,2011(5):92-96.
- [11] 赵梦然,陈强,黄晨阳,等. 中国野生白灵菇遗传多样性的 SCoT 分析[J]. 园艺学报,2012(12):2475-2482.
- [12] 陈世通,李梦杰,蒲敏,等. ISSR 分子标记鉴定香菇单孢杂交后代的研究[J]. 江苏农业科学,2012(11):35-37.
- [13] FERNANDEZ E, FIGUEIRAS M, BENITO C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin[J]. Theor Appl Genet,2002,104(5):845-851.
- [14] ESTRADA M E, CAMACHO M V, BENITO C. The molecular diversity of different isolates of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellites (ISSR(s)) [J]. Cell Mol Biol Lett,2007,12(2):240-252.
- [15] 谭琦,杨建明,陈明杰,等. 香菇孢子单核体与原生质体单核体遗传差异分析[J]. 中国食用菌,2001,20(6):3-5,25.
- [16] 宋小亚,肖扬,边银丙. ISSR 标记在黑木耳单核体遗传分析中的应用[J]. 菌物学报,2007(4):528-533.