

利用 RAPD 和 SRAP 建立快速鉴定 凤尾菇菌株的 SCAR 标记

熊芳, 郑闽江, 刘新锐, 谢宝贵*

(福建农林大学 菌物研究中心, 福建 福州 350002)

摘要:为建立一套基于 DNA 分子标记技术快速鉴定凤尾菇菌株的有效方法, 首先对生产上常用的 9 个凤尾菇菌株进行 RAPD 和 SRAP 多态性分析, 从巴西凤平、高温凤尾菇、327 和凤尾菇 4 个菌株中分别获得了片段长度为 1 760 bp、356 bp、1 113 bp 和 400 bp 的 4 条特异片段, 将其克隆、测序、引物设计, 成功转化为 4 个稳定的 SCAR 标记。试验结果表明, 利用这些特异 SCAR 标记, 能在 1 d 内有效地解决 9 个凤尾菇菌株中的“同名异物”和“同物异名”现象, 快速鉴定凤尾菇菌株, 最终证实 SCAR 标记在凤尾菇菌株快速鉴定上的可行性和可靠性。

关键词:凤尾菇; 分子标记; RAPD; SRAP; 多态性; SCAR 标记

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2286(2010)03 - 0601 - 07

Development of SCAR Markers Based on RAPD and SRAP for Rapid Identification of *Pleurotus sajor - caju* Strain

X D N G Fang, Z H E N G M in - jiang, L U X in - rui, X I E B ao - gui*

(Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: This study was designed for the purpose of establishing an effective way for rapid identification of *Pleurotus sajor - caju* strains based on DNA molecular marker. The RAPD (random amplified polymorphic DNA) and SRAP (sequence - related amplified polymorphism) analysis were conducted on 9 cultivated strains of *Pleurotus sajor - caju*. Four specific fragments with a length of 1 760 bp, 356 bp, 1 113 bp and 400 bp could be generated from the Brazilian Ping Pong, Temperature Pleurotus, 327 strain, Pleurotus. Subsequently, they were converted into more stable SCAR (sequence characterized amplified region) markers by cloning, sequencing and primer design. The results showed that these SCAR markers acquired based on this study could be used as a specific DNA fingerprint to identify the homonym and synonym in *Pleurotus sajor - caju* within one day. The feasibility and reliability of adopting strain - specific SCAR markers for the rapid identification of *Pleurotus sajor - caju* strains were confirmed.

Key words: *Pleurotus sajor - caju*; molecular marker; RAPD; SRAP; polymorphism; SCAR marker

凤尾菇 (*Pleurotus sajor - caju*) 是一种热带和亚热带林区常见的野生食用菌, 1974 年在印度首次驯化栽培成功, 1980 年前后, 张树庭、刘中柱和费孝通等先后将印度凤尾菇经香港和澳大利亚引入中国。由于它适应性和抗逆性强, 成本低产量高, 味道鲜美, 营养丰富, 很快便成为全国广泛栽培的食用菌^[1]。

收稿日期: 2010 - 03 - 16 修回日期: 2010 - 05 - 12

基金项目: 福建省科技重大专项资助项目 (2008SZ0002)

作者简介: 熊芳 (1983 -), 女, 硕士, 主要从事食用菌研究, E-mail: kitty830515@sina.com; * 通讯作者: 谢宝贵, 教授, E-mail: mrcfafu@163.com。

由于凤尾菇和侧耳属其他菇的形态和生物学特性相近,再加上各栽培区菌种相互串引,栽培出菇后冠以新名又使得凤尾菇同种异名或同名异种的现象十分严重。不但给科学研究和学术交流带来障碍,而且对规范生产和产品质量标准的制定带来很大困难。因此,必须采用客观、快速、稳定可靠并有较高区分能力的鉴定技术用于菌种鉴定。分子标记技术能够直接反映 DNA 水平上的差异,不受环境因素影响,具有高度的特异性,因而成为当今较先进的种质鉴定技术^[2]。目前,尚未见利用 RAPD、SRAP 及 SCAR 标记对中国凤尾菇主要栽培菌株进行菌株鉴定的报道。

本试验选用生产上常用的 9 个凤尾菇栽培菌株,在 RAPD 和 SRAP 指纹图谱分析的基础上,筛选得到 4 条特异性条带,并将其转化成稳定的 SCAR 标记。SCAR 标记一般表现为扩增片段的有无,是一种显性标记,可以使不同材料的 DNA 差异通过单一条带的出现与否加以判断,检测方便、快捷,可用于快速检测大量个体。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 用于制备感受态的菌株: *Escherichia coli* DH-5。9 株凤尾菇菌株均为福建省食用菌种质资源库(福建农林大学菌物研究中心)收集保藏菌种。试验编号、菌株名称、菌种来源列于表 1。

表 1 供试凤尾菇菌株

Tab 1 Strains of *Pleurotus sajor-caju* used in the study

菌株编号 Strain No	菌株名称 Strain name	来源 Origin
Pl p 0001	凤杰 1号 Feng Jie No. 1	福建省轻工业研究所 Fujian light industry research institute
Pl p 0002	凤尾菇 <i>Pleurotus sajor-caju</i>	福建农林大学 Fujian agriculture and forestry university
Pl p 0003	凤 831 Feng831	福建农林大学 Fujian agriculture and forestry university
Pl p 0004	凤尾 PF1 <i>Pleurotus</i> PF1	贵州习酒食用菌研究所 Guizhou Xijiu mushroom institute
Pl p 0005	凤尾 5号 <i>Pleurotus</i> No. 5	贵州习酒食用菌研究所 Guizhou Xijiu mushroom institute
Pl p 0006	巴西凤平 Brazilian Ping Pong	福建省轻工业研究所 Fujian light industry research institute
Pl p 0007	高温凤尾菇 Temperature <i>Pleurotus</i>	贵州习酒食用菌研究所 Guizhou Xijiu mushroom institute
Pl p 0008	327	福建三明真菌所 Fujian Samning mycological institute
Pl p 0009	凤尾菇 <i>Pleurotus sajor-caju</i>	福建省农科院植保所 FASI

1.1.2 供试引物 引物通过前期试验筛选得到,选取的是扩增结果多态性高,具有丰富多态性位点的引物。所有引物均由上海闪晶生物公司合成。引物编号及序列见表 2。

表 2 供试引物

Tab 2 The primers used in the study

编号 No	RAPD引物的碱基序列 (5'-3')	编号 No	SRAP引物的碱基序列 (5'-3')
No	The base sequence of RAPD primer (5'-3')	No	The base sequence of SRAP primer (5'-3')
S10	CTGCTGGGAC	me5	TGA GTCCAAACCGGAAG
S22	TGCCGAGCTG	me6	TGA GTCCAAACCGGTAG
S23	AGTACGCCAC	em8	GACTGCGTACGAA TTAGC
S62	GTGAGGCGTC	em6	GACTGCGTACGAA TTGCA

1.1.3 生化试剂 使用 UN Q-10 柱式回收试剂盒回收特异条带,购自上海 Sangon; pMD18-T 载体、Taq 酶、dNTPs 等均购自 TaKaRa 公司(大连);其它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝培养及 DNA 提取 改良 CTAB 法^[3]。

1.2.2 凤尾菇菌株差异性片段的获得及其序列测定 使用表 2 中的 RAPD 和 SRAP 引物,对供试的凤

尾菇菌株进行 PCR 扩增,并对 DNA 指纹图谱进行分析,筛选出特异性 DNA 片段。以 pMD 18 - T Vector 为连接载体转化于 *E. coli* DH - 5,并委托大连宝生物公司进行序列测定。

1.2.3 SCAR - PCR 分析 根据特异性 DNA 片段的测序结果,用 Primer5.0 设计出 SCAR 引物 SCAR₁ 和 SCAR₂。选取特异片段的原菌株和 2 个阴性菌株进行 SCAR - PCR 扩增,以验证 SCAR 标记的真实性并对 SCAR 引物的退火温度进行优化。

利用 SCAR 引物在最适退火温度下对 9 个凤尾菇菌株进行扩增。SCAR 反应体积 25 μ L,其中 2.5 μ L 10 \times buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 2 μ L 12.5 mmol/L dNTPs, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.5 μ L 10 μ mol/L 上、下游引物, 20 ng 基因组 DNA,用 ddH₂O 补足体积。SCAR - PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,复性 1 min (退火温度根据所设计的 SCAR 引物而定),延伸 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环: 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统拍照并分析 (泳道和菌株编号一一对应)。

2 结果与分析

2.1 RAPD - PCR 和 SRAP - PCR 指纹图谱分析

使用扩增重复性好、多态性明显的 S₁₀、S₂₂、S₆₂ 引物和 me6 - em6 引物对供试的 9 个凤尾菇菌株分别进行 RAPD - PCR 和 SRAP - PCR 扩增。其中,引物 S₁₀ 在 6 号巴西凤平菌株中扩增出 1 760 bp 的特异性条带 (图 1),引物 S₂₂ 在 9 号凤尾菇菌株中获得 356 bp 的特异性条带 (图 2)、引物 S₆₂ 在 8 号 327 菌株中获得 1 113 bp 的特异性条带 (图 3),引物对 me3 - em6 在 7 号高温凤尾菇菌株中获得 400 bp 的特异性条带 (图 4),将这四条特异性 DNA 片段,用 UN Q - 10 柱式回收试剂盒进行回收纯化。

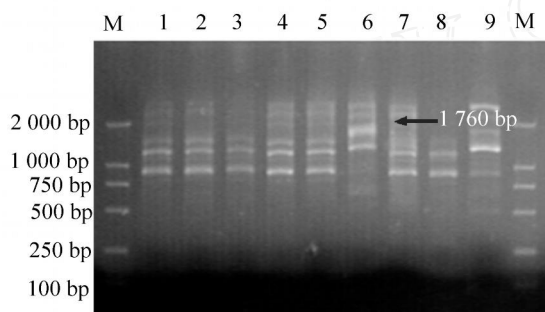


图 1 引物 S₁₀ 对 9 个凤尾菇菌株的扩增结果

Fig 1 Amplification result of the 9 strains of *Pleurotus sajor-caju* by primer S₁₀

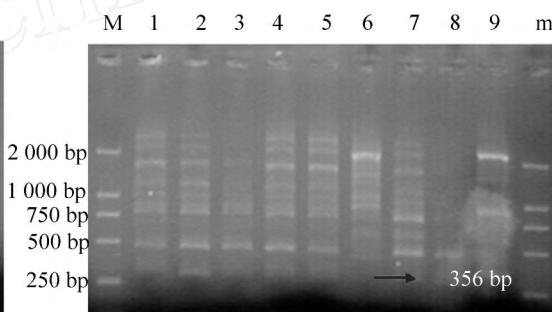


图 2 引物 S₂₂ 对 9 个凤尾菇菌株的扩增结果

Fig 2 Amplification result of the 9 strains of *Pleurotus sajor-caju* by primer S₂₂

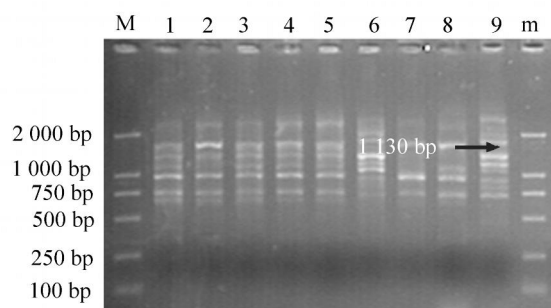


图 3 引物 S₆₂ 对 9 个凤尾菇菌株的扩增结果

Fig 3 Amplification result of the 9 strains of *Pleurotus sajor-caju* by primer S₆₂

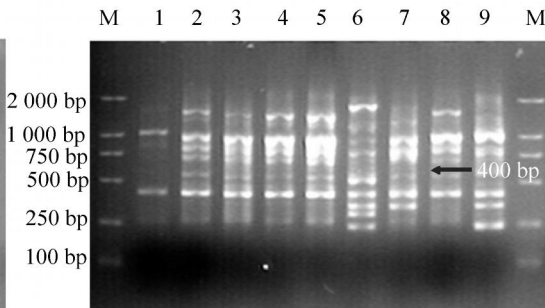


图 4 引物 me3 - em6 对 9 个凤尾菇菌株的扩增结果

Fig 4 Amplification result of the 9 strains of *Pleurotus sajor-caju* by primer me3 - em6

2.2 特异性片段的序列测定及 SCAR 标记的建立

特异性片段经克隆并进行阳性重组体鉴定后,即用于测序。采用 DNAMAN 软件均能找到用于扩增多态性片段所用的引物 (图 5 - 图 8 加方框部分),进一步证实了扩增片段的正确性。根据 SCAR 引物设计原则和原来引物序列,利用 Primer Premier5.0 软件设计了 4 对 SCAR 引物 (表 3)。

CGGCCA GTGCCA GCTTGCA TGCC TGCA GGTC GACGA TT **CTGCTGGGAC** GGGG GTGGGTGTTTGGGTAAA TGTCTTC
AA GGAA TCGAA GAA TCTTGCAACCCCTTCA GCCTTTGCAAACTTGCGCCA GGCAA TAA CAACTCCACA TGGGGCA
CA GA GTGTC TCCACA CA GTA GAACCTGGGGGCA GA GAA GTA GTTGTGTGTA CTGGTGCCA CTGACCTCTTCA TTCTC
TTGCTCCTCCA GGTGTGCA TGTTCGA GTTCTCTGCTTCTCCACCA GCA GGCAACCACTCC TGCCCTCTCTTCTTGA GC
TCTTCTCAACA TCCCTGAACTCC TAA GA GTGA GGA GTTGGCA TA GCGTCTGCGGAA TTTGGCCCA CTGTGGCTGA T
GCTCTTACA GGCCTGA GTA TCA CCAA CTTGTCTTCA TGACA GTTCTTCA TCCGACACTTCTTCCA TA GCCTCTT
CA TGC TCTCGCA GAACACCCCA GTTTGTGCA TTAA GAA GTGCCCTTCTCA CACCCCTCA TGGCA CAA TGGC GTGGT
CCCA TGACAA TACCA TCAA TGACGACCA TGC GAA CA TCTGCTGCA TTA TTGGCA GGA TCAA TA GGACCA GCA GGTT
AACCACA TCA GCA GGGTGTGTGTC AACCTGCA TTGCGTCTGGA TCCACA TTA GGA CCC TCA TA GTCTGGCA CAACA T
GA TTCTCA TCA TGGCCA ACCGCA GCA GCA GGA TCA TTGGGCTGCC TTGGAA TGACA TCGGCAACA TCTTTGAA TGCA
TGGCAACA TTCA TCACAA GA GTGCCAACTGCGCTGCGAA CAA TTCTCCA TCTCCAA GTTCAACA TA GGCA GCA G
CCACCA GA GCA TCAA TGGA GA GGTTCCTCTCAAA CACGA TTTCCCGTTGTGTA GCTGGCCA TGTGACGGA TA GA
CTCTGCAACAAA GCCTTCCA GACCTGGCGACGACTGA GTTTGAA GGTACCCCACTTGGCTGCACAAA GA GGA
GTGCCA GAA TTCGGTAA TGGCGGCA GTCGAA GCGTGGA GCTGTAA TTGGCA TTGACAA TA GCTCTGGA GACCA GG
CGGTCAACCCA GACACTTTTGCCAA CTTGA GA TACTTGGA TCA TTGA GA TACA GGCA TACGTCGTCGCCA TTGTTC
TGA GTAAA GTGCTCA TGA TCCGCCA GTAAA GTGA GTTGCAAA CAA GGCA GCGTCCA GCCA GAA CA GGGACA TTC
AA GTGGCAC TGGCTCCCTGAA GCA GA GTGACCTTGGG GGTAA TCCCGTTCGCGAA GCTCTTGA GTGA GGTGTGTT
TGTTGCAA GTCA GA GTGGGACAA GCCA TGACCA TGGGTGTGA TGA GAA TGACA GGTGGACA GAA GTGGTA GA GA
TGGGCCGAA GTTTGCGCTTGA GTACTCTTA TGC TGGTA TGC GAA GCAA GA GA GA GA GCGACTGAA CCTGCTCA G
TTCTTGCCA GCCA TGGTAA TA TGCTGCTGTGGTGTGTTGTA CA GCCTCA GCTTCA TGCTGGGTGAACAAA GA TGCAA
AGTCA TGC TCA GA GA GCTTGACTTTGA TGGTGC GGACCA GA GCA GCCA TCCA GCTA GTA GA TTCTGTCCGGGA GGA
TGCCCCCTGTTGTCCGTGAA GGTGTA GAA GA TCTGTGTTGTTGACCA GA GTCA TCA GAA GCA TCAA GACA GTA GAC
AACTTAA TTTTGGGACAAA GTTGTCTCGGA TGC TCTGA GCAAAC TAA TGAA TA GCA TA TTA GGAAA TGTA TCTTGT
TTA GGTGCTGCA GCAACACA TGGAACA **GTCCCA GCA C** AA TCTCTA GA GGA TCCCGGGTACC GA GCTCGAA TTCG
TA

图 5 特异性片段核苷酸序列 (S₀)

Fig 5 Nucleotide sequence of the specific DNA (S₀)

TGCCAA GCTTGCA TGCC TGCA GGTC GACGA TT **TGCCGA GCTC** A TGGCCGTTGTA GCAC
GGGTACGGA CC GTTTA TAAACGA TAA TACGGCTGTA GAA TAA TGACCCA TA TTTGTGC
TTCTA GA TTA TACCGTA TTTGCA TTCGAA GTCA TACGAAACGCGAAACGCTGCA TCTAA T
GCTTTGTGCAAAA TA TTCCTGTTGGTCCCA GTC TGGCA GCCA TCGTCGCA GA GTA GCCC
ATTAACCGGCAAA GAAAAA TCA GAA GAA CAA TGCGCCGTACCGGA GTTCTCTCGTTC
TCTGTGCAA GAAC TCA TACTTCAA GGGAAA C TCC TCC TGGCGTCA TCCGGCAA GGA GT
TTA TCAAACCTACTGGTA TCTTGTGTC **CA GCTCGGCA** AA TCTCTA GA GGA TCCCGGGTAC
CGA GCTCGAA TTCGTAA TCA TGGTCA TA GCTGTTTCTGTGTGAAA TTGTIA TCCGCTCA
CAA TTCCACACAACA TACGA GCCGGAA G

图 6 特异性片段核苷酸序列 (S₂)

Fig 6 Nucleotide sequence of the specific DNA (S₂)

GCA GCTTGA TGCCTGCA GGTTCACGA TT **GTGAGGCGTC** TCCGA TGTCGGTGTGGCG
 CTGACA TTTGAACGGACTTCTGTCCCACTACCA TCCCCGTGGCCCA TCGCTAA TCAA TAT
 CAA TA TCCACCA TCAAA TCAA TACCCGCCCTCGCTCTGGCTCA GCTA TACAA TA TACACC
 GCACTGTCAACTGAAA GAA GCCGTCTTCCGAAA GACGCGGGCGCACGCTCGCGAACA T
 CCTCAA GTTACGCCTGGA GACGGGGCTGCTCACACGCTCCTCA TCGC GGTTCCA GA TG
 GCGCTCA TGCTGCA GCCGCTCGCCGCGCACGCCGACGGCGGGTCCGA GC GCA GA TGG
 CGCTGCA TTTTGTGA GCTGCTTGCCCCGCTCTTCGCCGGGTGCC TTTCTAA TGGTGA CT
 TGTGCTGTTGTGTTGTGCTGTTGTTGTGTTCTTGTGCTGTTGTGTTGTGGTGTGTTGTGGT
 TTGTGGTGTGTTGTGGTGTGTTGTGGTGTGTTGTGGTGTGTTGTGGTGCACCGCA GCTT
 TTA TCCGA CGGGCGTCTGTGA GCTCTGCGCGCA TA TACC GA TAA TA TGACA GGGTTT
 AGCGCA TCTCTGA TTCAA TTTACGGGA TA TTTA TA GGTACTCGTGTGGCTCCTCGCG
 TCTCTCAACGCCGCTCGTCTGTTGCA GACGGCGACACGTTCA TCGTGA GTTCCGTCT
 CAGGCC TTCCAACAACCA CCCGTCCGA GCTCCGCGCACGCCGAA TCGCGTACCTCACA
 ACA GACCCAA TTGGTCTGCA GCAACGCAACA GTGGACAA GCCAACGGTACGTTCCCC
 CTTTTGCTACGA TTGA TTGTGTTGAA TGCTCC TCA GCGGGGACTCCCTGTGAA CA GC
 GCGGCTAA GGGTTAACGTTA GA TGGTGA CTGGTTGGTTA GCTCA GGA GGCTGAACGGA
 GTCTTGTA CTGGTAAA TGGACACCA TGTTTCGTA GA TTGGGCA CACGCTTTGGGGGCC
 ACACACCAA GTTACGTGCGTGACA GACGGAA TCGCGAA TTTGA TCGCA GGCA TGCGA
 CTTGCAAAA GCA GACGACGA TCGTCA TTGA GA TTTCGACCA TCGGGA GCGTGA TACA G
 GTAACCGGGGA GA GA TGTGT **GACGCCTCAC** AA TCTCTA GA GGA TCCCCGGGTACCGA G
 CTCGAA TTCG

图 7 特异性片段核苷酸序列 (S_2)Fig 7 Nucleotide sequence of the specific DNA (S_2)

CGGCCA GTGCCAA GCTTGA TGCCTGCA GGTTCACGA TT **GACTGCGTACGAA TTGCA** T
 TGCGGTA GCTTCCCA GCAAA GTGTA TCCTGCCA GCCTCAA TCCA GTAA TTGCTTACCA T
 CGGTTA GTTTCA TAACGA TA GGCCAA GTCTGCAA GACCCA TGCTTCTGAAACCA GCTC
 GCGGGA TA GA GAA GGCA GTTA TA TAAA GACGCCGCAC TCCCA GCGACTGCCAA TCA TT
 GTCCC GCC TCTCAA TCTTTCGGCAA TCA GCA TA GACA TA GCAACA TAACAACA TTGAA T
 A TCA TA TTCCACAA TTGTTA GAAA TAACA GTA TACGA GAA GA GT **ATTCCGGTTTGGACT**
 CAAA TCTCTA GA GGA TCCCCGGGTACCGA GCTCGAA TTCGTAA TCA TG

图 8 特异性片段核苷酸序列 (me3 - em6)

Fig 8 Nucleotide sequence of the specific DNA (me3 - em6)

2.3 SCAR 标记真实性验证

为了进一步验证获得的 SCAR 标记,了解其在凤尾菇菌株鉴定中的可行性和可靠性,用获得的 4 对引物对来自全国的 9 个凤尾菇主要栽培菌株进行 SCAR 扩增,扩增结果显示,引物 SCAR₁ 和 SCAR₂ 都在对应的菌株中扩增出单一的条带(图 9,图 10),而引物 SCAR₃除了在对应的 P1 p 0008 菌株中扩增出单一的条带外,还能在 P1 p 0001、P1 p 0002、P1 p 0003、P1 p 0004、P1 p 0005 菌株中扩增出相应大小的条带(图 11);引物 SCAR₄ 还能在 P1 p 0001 菌株中扩增出相应大小的条带(图 12)。说明 SCAR₁ 和 SCAR₂ 是针对单一菌株的特异性分子标记,可以直接应用到相应栽培菌株的准确鉴定,而 SCAR₃ 和 SCAR₄

表 3 SCAR引物
Tab 3 The primers of SCAR

引物名称 Primer name	片段来源 Fragment origin	引物序列 Sequence	
SCAR ₁	Plp - s10 - 6 - 1 760	F: 5' - GTGGGTGTTTGGGTAAA TGTC - 3'	(21 bp)
		R: 5' - GTCTACTGTCTTGA TGCTTCTGA - 3'	(23 bp)
SCAR ₂	Plp - s22 - 9 - 356	F: 5' - CGGCTGTGA GAA TAA TGACCCA - 3'	(21 bp)
		R: 5' - CGA GCGA GCTGGACAA GA TA - 3'	(20 bp)
SCAR ₃	Plp - s62 - 8 - 1113	F: 5' - TTCTGTCCCACTACCA TCC - 3'	(19 bp)
		R: 5' - TGTCCACTGTTGCGTTGC - 3'	(18 bp)
SCAR ₄	Plp - me3 - em6 - 7 - 400	F: 5' - ATTGCA TTGGCGTA GCTT - 3'	(18 bp)
		R: 5' - ACCGGAA TACTCTTCTCGTA - 3'	(20 bp)

是针对多个菌株的特异性分子标记。4对 SCAR 引物都能扩增出产物长度略小于原特异条带的单一条

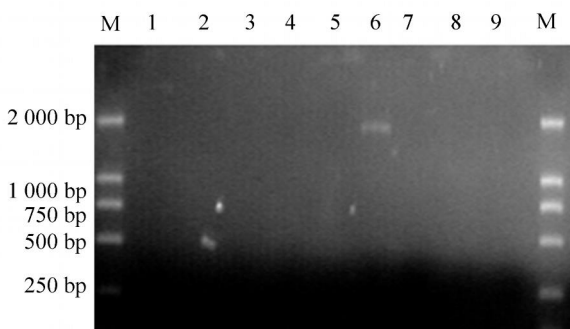


图 9 引物 SCAR₁ 对 9 个凤尾菇菌株的扩增结果

Fig 9 Amplification result of primer SCAR₁ for 9 cultivated strains of *Pleurotus sajor-caju*

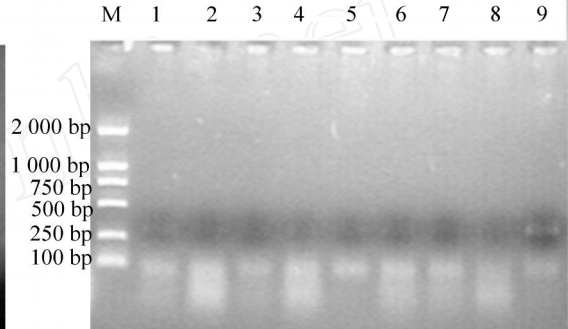


图 10 引物 SCAR₂ 对 9 个凤尾菇菌株的扩增结果

Fig 10 Amplification result of primer SCAR₂ for 9 cultivated strains of *Pleurotus sajor-caju*

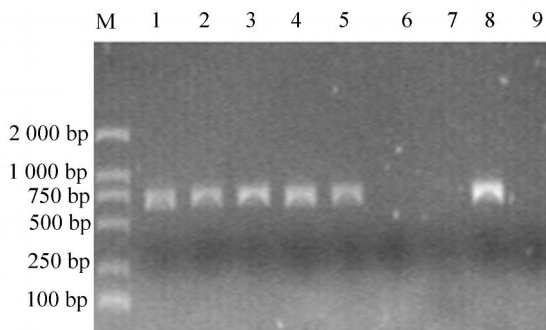


图 11 引物 SCAR₃ 对 9 个凤尾菇菌株的扩增结果

Fig 11 Amplification result of primer SCAR₃ for 9 cultivated strains of *Pleurotus sajor-caju*

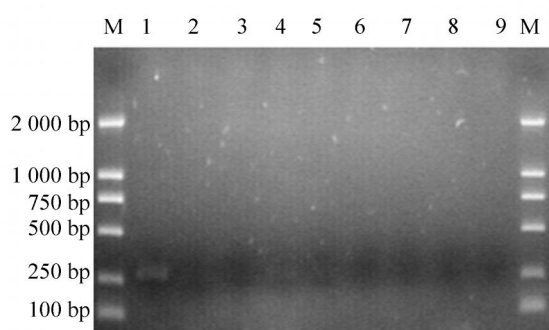


图 12 引物 SCAR₄ 对 9 个凤尾菇菌株的扩增结果

Fig 12 Amplification result of primer SCAR₄ for 9 cultivated strains of *Pleurotus sajor-caju*

2.4 9 个凤尾菇菌株的 SCAR 标记鉴定结果

9 个菌株通过 4 个 SCAR 标记,可分为 5 大类,包括 3 个单一群体和 2 个复合群体(图 13)。其中:p1 p0006、p1 p0007、p1 p0009 各为一独立栽培种;p1 p0001 和 p1 p0004 属于同一栽培种;p1 p0002、p1 p0003、p1 p0005 和 p1 p0008 属于同一栽培种。

3 讨论

当前食用菌市场上,食用菌菌种的鉴定和保护是一个重要的问题。特别对于凤尾菇等这类大面积

栽培的一些常用菌种,常常会由于生产者在不同地区间相互引种,出菇后又冠以新名称,而导致出现“同种异名、同名异种”的现象。目前已有多种分子标记技术(RAPD、ISSR、SRAP)用于食用菌的分类鉴定。以 RAPD 为分子标记,张金霞等^[4]研究了中国栽培白灵侧耳 *Pleurotus nebrodensis* 菌株的遗传多样性。张介驰等^[5]利

用 ISSR 分子标记对东北地区黑木耳生产菌株进行了分子鉴别,有 10 个引物能对供试的 27 个黑木耳菌株基因组 DNA 进行扩增,获得的指纹图谱清晰稳定、多态性强,可将 27 个供试黑木耳菌株分为 3 个组群。徐晓燕等^[6]利用 AFLP 和 SRAP 标记对 19 株毛木耳进行遗传多样性分析。12 对 AFLP 引物扩增得到 624 条片段,14 对 SRAP 引物扩增得到 459 条片段,采用聚类分析都供试材料被分为 4 个群。结果表明,AFLP 和 SRAP 标记均适合毛木耳遗传多样性分析,而 SRAP 标记较 AFLP 标记简便,更适于大规模的遗传多样性分析。

但 RAPD、ISSR 和 SRAP 扩增易受反应条件影响,结果存在重复性差的问题,而且由于有的图谱条带数多,背景模糊,给判断条带有无带来了一定的困难,不清晰条带的记录与否,分子量相近的条带肉眼难以区分,分析相对复杂的缺点,都会对实验结果产生较大的影响。而 SCAR 标记一般表现为扩增片段的有无,是一种显性标记,当扩增区域内部发生少数碱基的插入、缺失、重复等变异时,表现为共显性遗传的特点。若待检 DNA 间的差异表现为扩增片段的有无,则可直接在 PCR 反应管中加入溴化乙锭,通过在紫外灯下观察有无荧光来判断有无扩增产物,检测 DNA 间的差异,从而省去电泳的步骤,使检测变得更方便、快捷,可用于快速检测大量个体。相对于 RAPD 标记,SCAR 标记所用引物较长且引物序列与模板 DNA 完全互补,可在严谨条件下进行扩增,因此结果稳定性好、可重复性强^[7]。

本研究分别从 RAPD、SRAP 标记获得了 4 条特异片段,并成功转化 4 个 SCAR 标记。利用所设计的 4 对 SCAR 引物将 9 个凤尾菇栽培种分为 5 大类,包括 3 个单一群体和 2 个复合群体。从鉴定结果可以看出,同样命名为“凤尾菇”的 p1 p0002 和 p1 p0009 分别属于不同的类群,它们之间具有较远的亲缘关系;而命名为“凤杰 1 号”和“凤尾 PF1”的 p1 p0001 和 p1 p0004 菌株属于同一类群,它们之间具有较近的亲缘关系。本研究所建立的 SCAR 标记能够有效地解决当前凤尾菇市场上出现的“同名异物”和“同物异名”现象。在本试验基础上,还可通过大量的 RAPD、ISSR、SRAP 等引物筛选获得每个有代表性的凤尾菇菌株的特异 SCAR 标记,获得更多的针对单一菌株的特异性分子标记,从 DNA 水平上评价我国凤尾菇资源的多样性,为中国凤尾菇种质资源的保护利用、菌株鉴定和分类提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 黄龙花,吴清平,杨小兵,等.基于 ITS 序列分析探讨我国栽培凤尾菇的分类地位[J].食用菌学报,2009,16(2):30-35
- [2] 马庆芳,张丕奇,肖戴东,等.黑木耳 Au185 菌株一个 SCAR 标记的建立[J].菌物研究,2009,7(2):104-108
- [3] 莎姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M].3 版.黄培堂,译.北京:科学出版社,2003:26-30
- [4] 张金霞,黄晨阳,张瑞颖,等.中国栽培白灵侧耳的 RAPD 和 IGS 分析[J].菌物学报,2004,23(4):514-519
- [5] 张介驰,马庆芳,张丕奇,等.用 ISSR 分子标记鉴别东北地区黑木耳生产菌株的研究[J].菌物系统,2007,26(4):534-538
- [6] 徐晓燕,余梦瑶,罗霞,等.利用 AFLP 和 SRAP 标记分析 19 株毛木耳的遗传多样性[J].西南农业学报,2008,21(1):121-124
- [7] 应正河. RAPD、ISSR 和 SRAP 分子标记在香菇种质资源的应用及其 SCAR 标记的建立[D].福州:福建农林大学,2006:50-57.

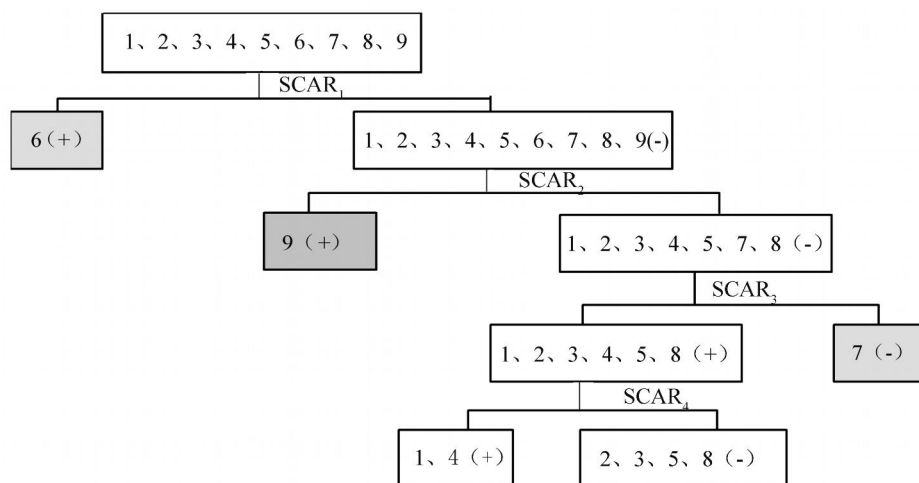


图 13 9 个凤尾菇菌株的 SCAR 标记鉴定结果

Fig 13 Identification result of primer SCAR for 9 cultivated strains of *Pleurotus sajor-caju*