

文章编号 :1003-8701(2006)03-0038-03

应用 RAMP 技术对猴头菌属菌种鉴定

谭旭华^{1,2},高明²,宋慧^{1*},张明²

(1.吉林农业大学生物技术学院,长春 130118;2.吉林省农业科学院)

摘要:采用 RAMP 技术对 6 个猴头菌株 DNA 进行 PCR 扩增,发现各菌株在图谱上均有丰富的表达,并呈现很强的特异性,其差异程度也各不相同。且在 Rf=0.63 处出现一条稳定一致的基本条带,进一步采用模糊聚类分析法进行数量分析表明,各菌株间隶属度在 0.50~0.83。通过对亲缘关系树状图进行分析,得出各菌株的遗传相似性。以期为我省猴头菌的种质保藏、栽培和开发利用提供参考依据。

关键词:猴头菌;RAMP;亲缘关系;模糊聚类

中图分类号:S646

文献标识码:A

1994年我国食用菌产量为264.1万t,占世界食用菌总产量的53.8%,到1999年食用菌产量发展到450万t。我国食用菌栽培品种是从国外引进或科研单位选育而成,但日趋退化,且引种混乱。为此,对食用菌进行菌种鉴定,比较品种特性和遗传相似程度,以期指导杂交育种和生产栽培。

猴头菌(*Hericium erinaceus*)在分类学上隶属菌物界,担子菌门,担子菌纲,猴头菇目,猴头菇科,猴头菇属^[1-2]。我国猴头菌属有4个菌种^[1],除猴头菌外,还有小刺猴头菌、假猴头菌和珊瑚状猴头菌3个近缘种。

RAMP(Random amplified microsatellite polymorphism)是Wu^[3-4]等1994年提出的一种分子标记技术,它利用5'端锚定的与SSR引物互补的寡核苷酸和随机引物的组合,对基因组DNA中的微卫星进行随机扩增。与RAPD相比,RAMP更能真实反映物种的亲缘关系^[5],而且更适合遗传背景尚不太清楚的物种。目前,RAMP仅见应用于转基因水稻^[6]和甘蔗^[7]等种质鉴定以及大麦^[8]、桃^[9]、鱼腥草^[10]、黑麦^[11]、仲彬草^[12]及葡萄^[13]等植物资源的遗传多样性的研究中。本文主要利用RAMP技术对猴头菌属菌种鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料共6种,均由吉林农业大学宋慧博士提供,包括小刺猴头、猴头(王柏)、珊瑚猴头、双猴、猴2-3、猴头8号。

1.2 基因组 DNA 的提取

每个菌种选3~4管,刮取表面菌丝,于液氮中研磨,加入8 mL细胞提取液65℃水浴20 min,转到30 mL冷冻离心管中,加5 mol/L KCl 8 mL冰浴20 min,其间来回颠倒数次,取出离心管4 000 r/min离心20 min,取出上清液向其中加入等体积酚-氯仿,轻轻混匀后4 12 000 r/min离心5 min,向上清液中加入等体积氯仿混匀后4 12 000 r/min离心5 min,向上清液中加入等体积异丙醇混匀后4 12 000 r/min离心5 min,弃上清空气中干燥,用70%乙醇洗3次,干燥后用50 μL TE溶解^[14],加入RNAase 10 μL 37℃水浴0.5~1 h,加TE至500 μL,再加等体积酚-氯仿室温抽提10 min,上清液中加入等体积氯仿室温离心10 min,小心取出上清加2倍体积无水乙醇沉淀DNA,离心弃上清沉淀室温干燥后溶于40 μL TE-20℃保存。

1.3 PCR 扩 增

收稿日期:2006-01-20

作者简介:谭旭华(1977-),女,吉林省长春人,硕士,研究方向:生物化学。

* 通讯作者:宋慧

应用RAMP技术对所提基因组DNA进行PCR扩增,用5'端锚定的低聚核苷酸GC(CA)₄、GT(CA)₄、GC(TG)₄和GT(TG)₄与20个随机引物组合对材料进行扩增筛选,PCR扩增参照Cheng等^[15]方法。反应总体积25 μL,其中含1U Taq酶、1 xbuffer、1.5 mmol/L MgCl₂、200 μmol/L dNTPs、200 nmd/L引物和25 ng模板DNA。上面覆盖22 μL液体石蜡油后,按照如下程序进行PCR反应:94 预变性2 min,每个循环94 1 min、45 1 min、72 2 min,共进行45个循环,循环完成后,在72 延伸10 min。

1.4 电泳检测

扩增产物经2%的琼脂糖凝胶电泳检测,电极缓冲液为0.5 xTBE(pH8.0),稳压80V。将琼脂糖凝胶放入凝胶成像仪中照相保存。

2 结果与分析

2.1 RAMP 技术图谱分析比较

猴头菌各菌株 PCR 图谱如图 1 所示,6 个猴头菌株在 RAMP 图谱上均有丰富的表达,且条带分布比较均匀。在整个条带分布区内各菌株产生条带的数量和强弱有一定的差异,这表明各菌株之间还是存在一定的遗传距离。图谱上 Rf=0.63 处,各菌株拥有同一条带,虽然条带强弱不同,但仍可看作能够表现猴头菌属基本特征的基础条带。

2.2 猴头菌丝图谱模糊聚类分析

根据所得图谱资料绘制图表,利用 ntsys 软件处理数据,获得不同菌丝相似系数 S_j 矩阵(表 2)。把 S_j 矩阵转换为模糊等价矩阵后,进行模糊聚类得出 6 个猴头菌株亲缘关系树状图(图 2)。模糊聚类结果显示,6 个猴头菌株间隶属度为 0.50~0.83,变异较大。6 个猴头菌株大致可聚为 3 类。由树状图可看出:a(小刺猴头)与 f(猴头 8 号)在 0.75 处相聚为第 1 类;d(双猴)与 e(猴 2-3)在 0.83 处相聚后与 b[猴头(王柏)]在 0.67 处相聚为第 2 类;c(珊瑚猴头)与其他菌株遗传距离最远为第 3 类。

2.3 物种间遗传关系

根据对酶谱的直观分析和模糊聚类分析,6 份材料可聚为 3 类,珊瑚猴头与其他物种间的遗传距离较大,单独为一类,属珊瑚状猴头菌。小刺猴头 a 和猴头 8 号两个菌株聚在一起,同属小刺猴头菌,它们分布在长白山较为潮湿的地方,形态上较为相近,在形态学试验上两者产生的拮抗线较为模糊。猴头(王柏)、猴 2-3、双猴菌株聚为第 3 类,同属猴头菌。该类物种在形态学试验上相互之间产生的拮抗线也较为模糊,而且在同工酶电泳试验中聚类的结果相同,在形态上也非常相似,株高、颜色、子实体的大小也是极其相近。本研究与形态学和同功酶电泳的分析结果完全一致。

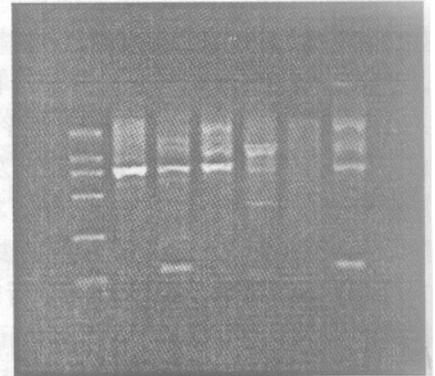


图 1 6 个猴头菌株电泳图谱
电泳条带从右至左依次是: 小刺猴头(a)、猴头(王柏)(b)、珊瑚猴头(c)、双猴(d)、猴 2-3(e)、猴头 8 号(f)

表 1 6 个猴头菌电泳图谱分析数据

a	b	c	d	e	f
1	0	0	0	0	1
0	1	1	0	0	0
1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	1
0	0	1	1	1	0
0	0	1	0	0	0
0	0	0	1	1	0
1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0
0	0	1	0	0	1

表 2 猴头菌株相似系数 s_j 矩阵

	a	b	c	d	e	f
a	1.000 000 0					
b	0.666 666 7	1.000 000 0				
c	0.416 666 7	0.583 333 3	1.000 000 0			
d	0.666 666 7	0.666 666 7	0.583 333 3	1.000 000 0		
e	0.500 000 0	0.666 666 7	0.416 666 7	0.833 333 3	1.000 000 0	
f	0.750 000 0	0.583 333 3	0.500 000 0	0.583 333 3	0.416 666 7	1.000 000 0

3 讨 论

同属不同种的猴头菌图谱之间既具有某些相同的特点,又各自具有自身的特征,反映出了猴头菌属间的相互联系与区别。

猴头菌种间虽然有丰富的种质变异,但其共同的属性表达在图谱 $R_f=0.63$ 处,此处条带在图谱上表现得比较稳定、一致。它是亲缘关系的纽带,揭示了猴头菌的共同起源。

我国猴头菌人工栽培始于1959年,到70年代开始推广。猴头菌的奇特功效,使其栽培发展迅速。目前,在食用、制药和栽培方面已有的品种可达几十种,其营养成分和药效成分各不相同,对生长环境的要求也有所差异,而且名称较混乱,其特征也各说不一。这给引种、栽培和开发利用均带来较大的困难^[16]。到目前为止,利用RAMP技术对猴头菌属菌种进行聚类分析尚未见报道,本试验参考了前人在其他真菌方面所作的研究,根据我省真菌的发酵工艺现状和长白山地区野生菌株生长情况,扩大了选材范围,从长白山地区共收集了6个菌株。本文应用RAMP技术及模糊聚类分析的方法对其亲缘关系进行鉴定,在结果分析上采用了较先进的模糊聚类分析方法,提高了结果的准确性。遗传相似系数和聚类分析表明,猴头菌属菌种的遗传变异与形态和地理分布相关,利用RAMP技术对猴头菌属菌种鉴定与形态学、生化技术研究的结论一致。由此可见,RAMP标记是评价猴头菌属种间关系和遗传多样性的一种很有效的分子标记技术。

参考文献:

- [1] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社,1997.
- [2] 兰海燕,等. 蛋白质凝胶电泳技术在作物品种鉴定中的应用[J]. 中国农业科学,2002,35(8):916-920.
- [3] Wu K-S, et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. Nucleic Acids Res, 1994, 22(15):3257-3258.
- [4] Sanchez de la Hoz M-P, et al. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. Genome, 1996, 39:112-117.
- [5] Davila J-A, Loarce Y, et al. Comparison of RAMP and SSR markers for the study of wild barley genetic diversity. Hereditas, 1999, 131:5-13.
- [6] Sala F, et al. Somaclonal variation in transgenic plants. Acta Horticulturae, 2000, 530:411-419.
- [7] Arencibia A-D, et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation. Transgenic Res, 1999, 8:349-360.
- [8] Davila J-A, et al. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA and coefficients of parentage to determine genetic relationships in barley. Genome, 1998, 41:477-486.
- [9] Cheng H-Y, et al. Genetic diversity and relationship among peach cultivars based on random amplified microsatellite polymorphism. Bot Bull Acad Sin, 2001, 42:201-206.
- [10] Wu W. Studies on germplasm resources researches of *Houttuynia Thunb.* Dissertation for Ph.D. of Sichuan Agriculture University, 2002.
- [11] 尚海英,等. 应用 RAMP 标记研究黑麦属遗传多样性[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(6):566-571.
- [12] 张利,等. 应用 RAMP 分子标记探讨仲彬草属的种间关系[J]. 高技术通讯, 2003, (4):28-33.
- [13] 吕秀兰,等. 葡萄品种遗传关系的 RAMP 分析[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(2):133-137.
- [14] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2003,69-70.
- [15] Arencibia A-D, et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation. Transgenic Res, 1999, 8:349-360.

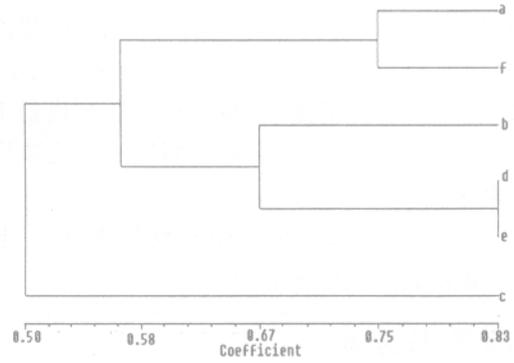


图2 6个猴头菌株亲缘关系聚类