

黑木耳栽培菌株的 ISSR 分析

李辉平, 黄晨阳, 陈 强, 张金霞*

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘 要: 应用锚定 ISSR 技术对 21 个栽培黑木耳 (*Auricularia auricula*) 菌株进行了遗传多样性研究。从 20 个引物中选出 10 个 ISSR 引物, 扩增得到 185 个扩增位点, 大小分布在 200 ~ 3 000 bp 之间, 其中多态性位点 181 个, 多态性位点占 97.84%, 表明 ISSR 标记的多态性非常高。平均每个位点的观察等位基因数 (N_a) 为 1.9784, 每个位点的有效等位基因数 (N_e) 为 1.2396; 菌株间平均 Nei 基因多样性 (h) 为 0.2732, Shannon 信息指数 (I) 为 0.4278。Nei (1972) 遗传距离矩阵分析表明 21 个黑木耳菌株间遗传距离在 0.36 到 0.55 之间, 基因流 (N_m) 达到 2.7528, 表明我国栽培黑木耳的遗传背景十分丰富, 遗传多样性很高, 同时表明我国各地域间栽培黑木耳菌株存在着很大的菌种交流。

关键词: ISSR; 胶质菌; 遗传多样性; 遗传标记

中图分类号: S 646.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-0935-06

ISSR Analysis of Cultivated *Auricularia auricula*

LI Hui-ping, HUANG Chen-yang, CHEN Qiang, and ZHANG Jin-xia*

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Genetic diversity was assessed in 21 cultivated strains of *A. auricula* by ISSR (inter simple sequence repeats). Ten primers were screened out from twenty ISSR primers in this study. One hundred and eighty five loci were produced from the primers, of which 181 loci (97.84%) were polymorphic in the organism. The size of these loci ranged from 200 bp to 3 000 bp. High genetic diversity of *A. auricula* in China was detected: the observed number of alleles (N_a) averaged 1.9784 and the effective number of alleles (N_e) was 1.2396, for every locus; Nei's genetic diversity (h) was estimated to be 0.2732, while Shannon's information index (I) was 0.4278, on average. The Nei's (1972) genetic distance among strains ranged from 0.36 to 0.55, but the gene flow (N_m) was 2.7528. Analysis showed that there were high genetic diversity and large spawns exchange among provinces for *A. auricula* in China.

Key words: ISSR; Jelly fungus; Genetic diversity; Genetic marker

黑木耳 [*Auricularia auricula* (L. ex Hook.) Underwood] 在我国已有 1 400 多年的栽培历史, 目前其栽培遍布 20 多个省 (市、区)。经历长期的栽培, 黑木耳在人工和自然的双重选择下, 形成了不同农艺性状的栽培菌株, 但与绿色植物和伞菌类食用菌相比较, 黑木耳子实体形态差异小, 以形态辨别栽培菌株相当困难。

近年来随着分子生物技术的发展, 已有很多分子标记方法运用到木耳属的遗传分析中。边银丙等 (1998, 2000) 利用脉冲场凝胶电泳对 3 株木耳染色体 DNA 进行分析, 认为双核体菌株间染色体大小存在着多样性; 后来对 10 株木耳栽培菌株酯酶同工酶的分析也表明其酶谱存在丰富的多样性。阎培生等 (1999) 对木耳属 8 个种 rDNA 的 ITS 和 28S 区域的 RFLP 研究表明, 这个区域种间有较强的保

收稿日期: 2006 - 12 - 30; 修回日期: 2007 - 03 - 12

基金项目: 科技部资助项目 (2004EP090020)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangjx1210@yahoo.com.cn)

守性; Yan等 (2002) 利用 RAPD 标记探讨了木耳属 8个种的分子系统发育关系, 将 8个种分为 3组。对于我国黑木耳的主要栽培菌株尚未见到较全面的种质分析和分子遗传学评估的报道。

微卫星在真核基因组中广泛分布 (Roder et al, 1998), 使得在此基础上建立的 ISSR 技术 (Zietkiewicz et al, 1994) 具有丰富的扩增多态性 (Nagaoka & Ogihara, 1997), 在作物品种鉴定 (Fang & Roose, 1997) 和多样性分析 (Joshi et al, 2000; 杜金昆 等, 2002) 中应用日益广泛。

本研究中收集了我国黑木耳主产区 46个栽培菌株, 经栽培性状观察、对峙反应、酯酶同工酶分析等多种方法进行区别性鉴定, 剔除了同物异名菌株 25个, 将具区别性的栽培菌株进行了 ISSR 分析, 目的在于调查我国黑木耳栽培菌株的多样性, 为黑木耳菌株的鉴定鉴别和种质资源的评价提供技术和方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株 21个 (表 1), 主要收集于我国的湖北、陕西、吉林和黑龙江等黑木耳主产区, 分别保藏于中国农业微生物菌种保藏管理中心 (ACCC) 和本实验室。

表 1 供试菌株

Table 1 Tested strains of *A. auricula*

编号 Code	菌株 Strain	来源 Origin	保藏号 Conservation No.
1	薛平 10 Xueping 10	湖北南漳 Nanzhang, Hubei	ACCC 51019
2	793	湖北房县 Fangxian, Hubei	ACCC 51023
3	沪耳 3 Hu'er 3	陕西北强 Ningqiang, Shaanxi	ACCC 51025
4	黄天菊花 Huangtian Juhua	湖北南漳 Nanzhang, Hubei	ACCC 51027
5	97-1	陕西西乡 Xixiang, Shaanxi	ACCC 51043
6	97-4	陕西留坝 Liuba, Shaanxi	ACCC 51045
7	26	湖北 Hubei	ACCC 51048
8	9703	陕西留坝 Liuba, Shaanxi	ACCC 51049
9	97-2	陕西留坝 Liuba, Shaanxi	ACCC 51050
10	延 7 Yan 7	吉林延边 Yanbian, Jilin	ACCC 51051
11	天桥岭 Tianqiaoling	吉林天桥岭 Tianqiaoling, Jilin	ACCC 51083
12	长城 1号 Changcheng 1	吉林延吉 Yanji, Jilin	ACCC 51086
13	草优 1号 Caoyou 1	黑龙江 Heilongjiang	ACCC 51087
14	Au 004	黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang	ACCC 51089
15	8712	黑龙江 Heilongjiang	ACCC 51092
16	88016	内蒙古 InnerMongolia	ACCC 51094
17	9910	黑龙江 Heilongjiang	ACCC 51095
18	长白山 7号 Changbaishan 7	吉林延边 Yanbian, Jilin	Lab 00070
19	176	黑龙江牡丹江 Mudanjiang, Heilongjiang	Lab 00082
20	RF 172	陕西 Shaanxi	Lab 00069
21	A5	黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang	Lab 00075

1.2 DNA的提取

用马铃薯葡萄糖液体培养基, 25℃避光培养, 纱布过滤收集菌丝体。采用 CTAB 法提取基因组 DNA (Lee & Taylor, 1990), 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 紫外分光光度计检测 DNA 浓度, 于 -20℃保存。

1.3 ISSR扩增

ISSR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列参照加拿大哥伦比亚大学 (UBC) 公布的 ISSR 引物序列, 确定了重复单元后自主设计锚定碱基序列。

PCR反应体系：约 50 ng DNA 模板，1 \times *Ex Taq* buffer，4种 dNTP各 0.2 mmol/L，0.4 μ mol/L 引物，1 U *Ex Taq*（大连宝生物），双蒸水补充到 20 μ L。使用 Biorad iCycler（Biorad，USA）循环扩增仪，94 预变性 4 min；94 变性 1 min，55 复性 1 min，72 延伸 2 min，35个循环；72 10 min；4 终止反应。

1.4 电泳和染色

电压 4 V/cm，1.4%琼脂糖凝胶电泳，EB（溴化乙锭，0.5 μ g/mL）染色，凝胶成像系统（Biorad，USA）照相、记录并观察。

1.5 数据处理

重复试验中稳定出现的条带用于数据分析，根据各分子标记的迁移率及其有无统计二元数据，染色结果中条带的有无分别记为 1和 0。由 POPGENE 1.32计算平均每个位点的观察等位基因数（*N_a*）、平均每个位点的有效等位基因数（*N_e*）、*Nei*平均基因多样性（*h*）和 Shannon's信息指数（*I*）（Lewontin，1972；*Nei*，1973；Yeh et al，1997）。由 NTSYSpc 2.10e按 *Nei*计算菌株间遗传距离，基于此遗传距离再按算数平均数的非加权成组配对法（UPGMA 方法）聚类分析（*Nei*，1972；Rohlf，1998）。

按地理区域来源将菌株分组，数据利用 POPGENE 1.32计算各组之间 *Nei*的遗传距离和基因流（*N_m*）。

2 结果与分析

2.1 扩增图谱

本试验使用了 20个引物，其中 10个引物扩增条带清晰，反应稳定，多态性丰富（图 1）。将其用于供试菌株 DNA 样品的扩增，每个引物均多次重复，以保证数据采集和分析的准确。结果表明，10个引物将供试菌株共扩增出 185个位点，大小分布在 200 ~ 3 000 bp 之间，其中多态性位点 181个，占 97.84%，有 6个引物多态性达到 100%，其他 4个引物的扩增多态性也都在 85%以上（表 2）。

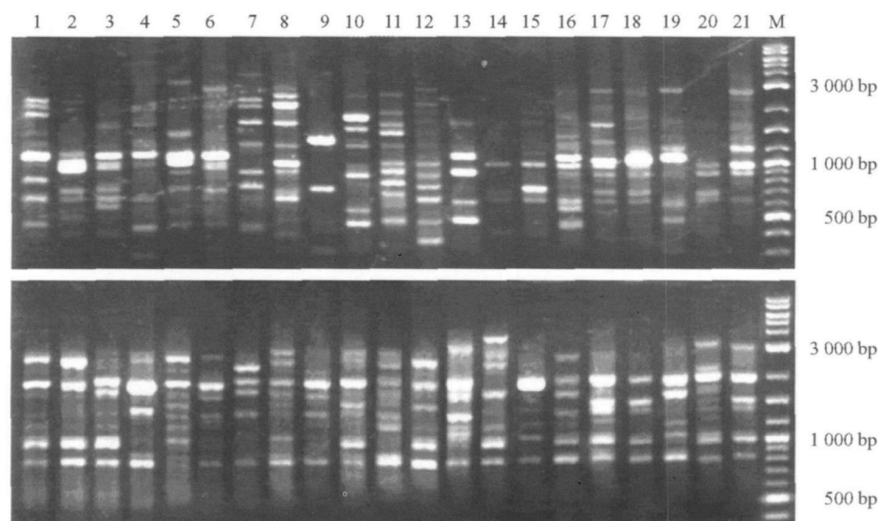


图 1 引物 P9和 P8对 21个黑木耳（*A. auricula*）菌株的扩增图谱

上：P9扩增图谱；下：P8扩增图谱。1~21：菌株编号；M：2-Log DNA ladder（NEB）。

Fig 1 ISSR profiles from P9 and P8 for 21 strains of *A. auricula*

Up: Profiles from P9; Below: Profiles from P8. 1 - 21: Code of strains; M: 2-Log DNA ladder (NEB).

表 2 ISSR引物序列和扩增位点统计
Table 2 Sequence of ISSR primers and their number of amplified loci

引物 Primer	序列 Sequence	扩增位点数 Number of amplified loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性比例 Percentage of polymorphic loci(%)
P1	TGC (AC) ₆	12	12	100
P2	GTG (AC) ₆	7	7	100
P6	A (GT) ₇	7	7	100
P7	CCA (GTG) ₄	23	22	95.65
P8	GGA (GTG) ₄	19	18	94.73
P9	(AG) ₈ G	37	37	100
P12	(AG) ₈ GC	16	15	93.75
P14	(AC) ₈ CG	24	24	100
P17	(AC) ₈	9	8	88.89
P18	(AC) ₈ C	31	31	100
总计 Total		185	181	97.84

2.2 遗传分析

由 POPGENE 1.32 计算得到平均每个位点的观察等位基因数 (N_a) 为 1.9784 ($SD = 0.1458$), 平均每个位点的有效等位基因数 (N_e) 为 1.2396 ($SD = 0.2517$), Nei's 基因多样性 (h) 平均为 0.2732 ($SD = 0.1340$), Shannon's 信息指数 (I) 为 0.4278 ($SD = 0.1789$), 表现出较高的遗传多样性水平。

应用 NTSYSpc 2.10e 软件计算菌株间的 Nei 遗传距离为 0.36 ~ 0.55。应用 UPGMA 方法进行的遗传距离聚类分析结果见图 2。

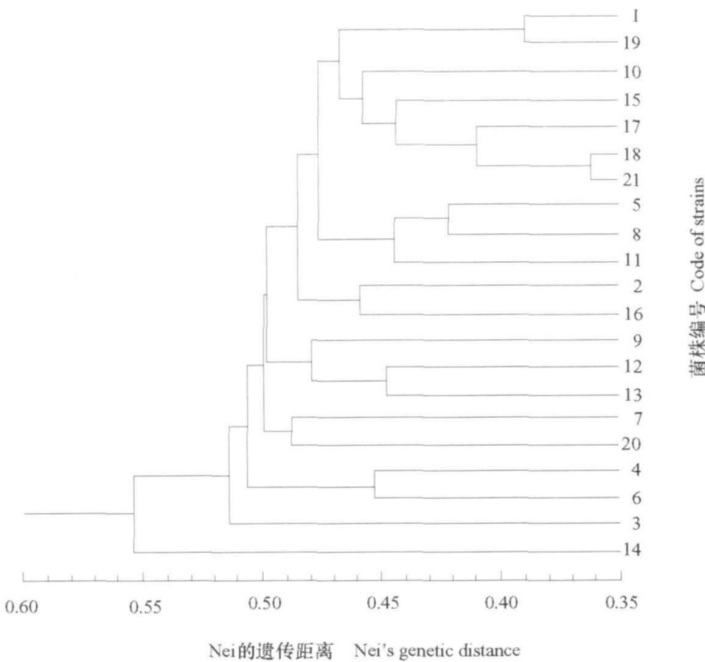


图 2 21 个黑木耳 (*A. auricula*) 菌株 UPGMA 树状图
Fig 2 Dendrograms of UPGMA analysis of 21 *A. auricula* strains

总体看来, 各产区都有各自的主栽菌株类型, 但是也显然存在着产区间菌种的交换和交流。菌株之间尽管有按产区分组的趋势, 如来自地理位置相近的黑龙江和吉林的菌株大部分分布在同组中, 陕

西和湖北菌株也大部分在同一组中，但并不完全吻合。

人为地将各地菌株分成小组作为群体，用 POPGENE 1.32 进行遗传关系和基因交流，结果表明，各省之间菌株的遗传距离很小，全部小于 0.1，在 0.01 ~ 0.05（表 3）；而各省之间菌株基因流（ N_m ）值较大，为 2.7528。

表 3 黑木耳各省 N_e 的遗传距离

Table 3 Nei's genetic distances among groups of *A. auricula*

组 Group	湖北 Hubei	陕西 Shaanxi	吉林 Jilin
陕西 Shaanxi	0.0265		
吉林 Jilin	0.0490	0.0464	
黑龙江 Heilongjiang	0.0283	0.0107	0.0305

3 讨论

本试验结果表明，ISSR 在黑木耳栽培菌株中扩增多态性高，用较少的引物即可得到多态性丰富的条带，可用于黑木耳栽培菌株种质遗传多样性分析和种质评价。

食用菌栽培菌株的遗传学研究主要集中在香菇、双孢蘑菇、金针菇和糙皮侧耳，而黑木耳栽培菌株遗传多样性研究较薄弱，目前尚未见到相关报道。龚利娟等（2005）对 32 个中国栽培香菇（*Lentinula edodes*）品种进行 RAPD 分析，结果表明栽培菌株间的遗传距离在 0.3 ~ 0.5。詹才新等（1998）对我国 9 个主栽双孢蘑菇（*Agaricus bisporus*）菌株 RAPD 分析表明其遗传距离相似性为 85%。詹才新等（1995）对 9 个金针菇（*Flammulina velutipes*）菌株的 RAPD 分析表明菌株间遗传距离在 0.11 ~ 0.71。孟宇等（2003）对 14 株产自不同地区的糙皮侧耳（*Pleurotus ostreatus*）的 AFLP 分析表明其遗传距离差异较大，为 0.19 ~ 0.75。

本研究与此类研究结果相似，我国栽培黑木耳菌株间 N_e 遗传距离在 0.36 ~ 0.55 之间。这表明虽然黑木耳子实体形态分化的多样性远低于各种伞菌类食用菌，但是其遗传背景也是非常丰富的。

黑木耳在我国分布广泛，目前只有青海、内蒙古、宁夏未有野生分布的记载（卯晓岚，1998），这表明黑木耳种群具有广泛的适应性。据此，我们推测，黑木耳虽然形态差异相对较小，但是遗传学的差异应该是显著的，这种差异可能更多地体现在生理学特性上，如色素的形成、对环境条件的反应等。

我国黑木耳主要栽培菌株几乎完全来自野生样本的分离驯化，具有野生样本特有的群体地域性。黑木耳主产区与野生分布基本一致，传统的黑木耳主产区基本都是黑木耳野生分布较多的地区，如湖北、陕西、四川、吉林和黑龙江等。这种地域性也可从子实体的形态得以表现：中部地区野生子实体色泽较浅，从浅黄褐色到红褐色，耳片较薄且柔软；东北产区的子实体色泽较深，呈黑褐色，耳片较厚。

但是，本试验没有得出菌株完全按产区聚类的结果，这可能与栽培菌株的跨省区交流有关。20 世纪 90 年代中期，中国黑木耳代料栽培技术成熟后，传统的黑木耳栽培区域被打破，栽培区域迅速扩大，目前已扩大到全国 20 多个省（市、区）。随着栽培的不断扩大，栽培者对新品种的需求加大，为了获得更好的栽培效益，栽培者常多方购种，增加了黑木耳种质的基因交流。

References

- Bian Yin-bing, Luo Xin-chang, Zhou Qi, Wang Bin. 1998. Chromosome DNA length polymorphisms in *Auricularia auricula*. Journal of Jilin Agricultural University, 20 (Supplement): 84. (in Chinese)
- 边银丙, 罗信昌, 周 启, 王 斌. 1998. 木耳染色体 DNA 长度多型性分析. 吉林农业大学学报, 20 (增刊): 84.
- Bian Yin-bing, Luo Xin-chang, Zhou Qi. 2000. Esterase isozyme zymogram polymorphisms of cultivated strains in *Auricularia auricula*. Mycosystema, 19 (1): 87 - 90. (in Chinese)
- 边银丙, 罗信昌, 周 启. 2000. 木耳栽培菌株酯酶同工酶的酶谱多样性研究. 菌物系统, 19 (1): 87 - 90.
- Du Jin-kun, Yao Ying-yin, Ni Zhong-fu, Peng Hui-ru, Sun Qi-xin. 2002. Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat,

- spelt, compactum and progeny of recurrent selection. *Acta Genetica Sinica*, 29 (5): 445 - 452. (in Chinese)
- 杜金昆, 姚颖垠, 倪中福, 彭惠茹, 孙其信. 2002 普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 SSR 分子标记遗传差异研究. *遗传学报*, 29 (5): 445 - 452.
- Fang D Q, Roose M L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 408 - 417.
- Gong Li-juan, Li Yu, Liu Shu-yan. 2005. Study on genetic diversity of *Lentinula edodes* by RAPD analysis. *Journal of Fungal Research*, 3 (1): 17 - 21. (in Chinese)
- 龚利娟, 李 玉, 刘淑艳. 2005. 香菇品种遗传多样性 RAPD 分子标记的研究. *菌物研究*, 3 (1): 17 - 21.
- Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, Ranjekar P K, Brar D S. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter sequence repeat (SSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1311 - 1320.
- Lee S B, Taylor J W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J eds. *PCR protocols: a guide to method and applications*. San Diego: Academic Press.
- Lewontin R C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 6: 381 - 398.
- Mao Xiao-lan. 1998. *Economic fungi of China*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 卯晓岚. 1998. *中国经济真菌*. 北京: 科学出版社.
- Meng Yu, Jiang Chang-shun, Liao Wen-tao, Zhang Yi-zheng. 2003. AFLP fingerprinting map analysis of *Pleurotus ostreatus*. *Acta Genetica Sinica*, 30 (12): 1140 - 1146. (in Chinese)
- 孟 宇, 蒋昌顺, 廖问陶, 张义正. 2003. 糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 的 AFLP 指纹图谱分析. *遗传学报*, 30 (12): 1140 - 1146.
- Nagaoka T, Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 597 - 602.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 70: 3321 - 3323.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283 - 292.
- Roder M S, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M H, Leroy P, Ganal M W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149 (4): 2007 - 2023.
- Rohlf F J. 1998. NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.10e. New York: Setauket.
- 颜沛生, 江家辉, 王东生, 罗新昌, 周 启. 2002. Molecular taxonomic relationships of *Auricularia* species inferred from RAPD markers. *Mycosystema*, 21 (1): 47 - 52.
- Yan Pei-sheng, Luo Xin-chang, Zhou Qi. 1999. RFLP analysis of amplified nuclear ribosomal DNA in the genus *Auricularia*. *Mycosystema*, 18 (2): 206 - 213. (in Chinese)
- 颜培生, 罗信昌, 周 启. 1999. 木耳属真菌 rDNA 特异性扩增片段的 RFLP 研究. *菌物系统*, 18 (2): 206 - 213.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T. 1997. POPGENE, version 1.32: A Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Edmonton: University of Alberta.
- Zhan Cai-xin, Zhang Yin-fang, Ling Xia-fen, He Dong-mei, Yan Pei-lan, Gao Hong-liang. 1998. DNA polymorphism of major cultivation strains of *Agaricus bisporus* in China. *Acta Edulis Fungi*, 5 (2): 1 - 7. (in Chinese)
- 詹才新, 张引芳, 凌霞芬, 贺冬梅, 严培兰, 高红亮. 1998. 中国主栽双孢蘑菇菌株的 DNA 多态性. *食用菌学报*, 5 (2): 1 - 7.
- Zhan Cai-xin, Zhu Lan-bao, Yang Xin-mei. 1995. Application of genetic distance evaluation in crossbreeding of *Flammulina velutipes*. *Acta Edulis Fungi*, 2 (2): 1 - 8. (in Chinese)
- 詹才新, 朱兰宝, 杨新美. 1995. 遗传距离测定在金针菇杂交育种中的应用. *食用菌学报*, 2 (2): 1 - 8.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2): 176 - 183.