

11 个灵芝菌株的分子 ID 构建

张肖雅 许修宏* 刘华晶

(东北农业大学 资源与环境学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 【目的】收集 11 株灵芝菌种为材料, 在分子水平上对其进行分类鉴定, 并构建分子 ID。【方法】采用 ITS 和 SSR 分子标记技术, 对 11 株灵芝进行分子鉴定分析。【结果】通过内转录间隔区(ITS)序列测定分析表明, 与 GenBank 上登录的灵芝(*Ganoderma lucidum*)菌株 ITS 序列相似度达到 99%, 在种的水平上证明实验所采用的供试菌株均属灵芝种(*Ganoderma lucidum*)。利用 SSR 分子标记技术对菌株进行引物扩增, 综合多态性条带, 用 NTSYS 软件进行聚类分析, 相似度在 0.62 水平上, 11 个灵芝菌种被分成 4 个类群, 其中 GL-2 与 GL-4 各自聚为一类。用 ID Analysis 1.0 软件进行数据分析表明, 用 5 对 SSR 引物可将 11 株灵芝供试菌种完全区分开, 并构建其分子身份证。【结论】基于 SSR 分子标记构建灵芝菌属的分子 ID 是可行的。

关键词: 灵芝, 内转录间隔区(ITS), 简单重复序列(SSR), 分子身份证

Establishment of molecular ID in 11 *Ganoderma lucidum* strains

ZHANG Xiao-Ya XU Xiu-Hong* LIU Hua-Jing

(College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University,
Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] Eleven *Ganoderma lucidum* strains were collected as materials for classifying them at the molecular level and establishing the molecular ID. [Methods] Internal

基金项目: 科技部十一五科技支撑项目(No. 2008BADA1B01); 林业公益性行业科研专项(No. 201104048)

*通讯作者: Tel: 86-451-55191137; 信箱: howard2857@hotmail.com

收稿日期: 2012-05-06; 接受日期: 2012-09-03

transcribed spacer (ITS) and simple sequence repeat (SSR) markers were used for the molecular identification of eleven *Ganoderma lucidum* strains. **[Results]** 99% similarity in ITS sequence between the tested strains and the *Ganoderma lucidum* registered in GenBank, meaning that the tested strains were *Ganoderma lucidum* species. The cluster analysis by NTSYS revealed that eleven *Ganoderma lucidum* strains were divided into four groups at similarity coefficients of 0.62. GL-2 and GL-4 were in two clades respectively. According to fragment size of allele variation, the agarose gel electrophoresis bands were analyzed by the software ID Analysis 1.0. Five primer pairs could be used to identify all the tested strains and accomplish the establishment of molecular ID. **[Conclusion]** Establishment of molecular ID in *Ganoderma lucidum* based on SSR were feasibly.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, Internal transcribed spacer (ITS), Simple Sequence Repeat (SSR), Molecular identity

灵芝[*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.]是一种名贵的药用真菌,属于担子菌纲多孔菌目灵芝科灵芝属(*Ganoderma* P. Karste)。灵芝属 P. Karsten 于 1881 年建立,并以灵芝 *G. lucidum* 作为本属的模式种^[1-2]。由于其具有悠久的药用历史,人们开始越来越重视灵芝产品的开发。然而,灵芝生长环境的差异,加上长期人工栽培、杂交等因素,导致灵芝品种的分类出现许多同名异种或同种异名的现象。因此,无论是在生产上需要确保灵芝子实体分类的安全可靠性,还是在科研上对灵芝遗传资源评价和品种权益保护等方面,科学准确地鉴定灵芝种质资源遗传特征具有十分重要的意义。

近年来,随着分子生物学的不断发展,不受环境条件影响的分子标记技术可以从分子水平上对品种的遗传特性进行快速、准确的鉴定,克服了传统形态标记鉴定误差大、性状差异小的缺点。目前对于灵芝种质资源的研究大多集中于遗传多样性的分析和亲缘关系的鉴定,如唐传红等^[3]利用拮抗试验和 RAPD 分子标记对 10 株灵芝属代表菌进行了分类研究;苏春丽等^[4]利用 ITS 序列分析鉴定了 34 株中国栽培灵芝菌株之间的亲缘关系;郑林用等^[5]利用 AFLP 及 ITS

PCR-RAPD 分子标记对 39 株灵芝菌种进行了遗传多样性研究。而且大部分采用具有技术简单、成本较低、可随机设计引物等优点的 RAPD 分子标记法对灵芝菌株进行探究,但由于 PCR-RAPD 体系不稳定,扩增产物重复性较差等因素也导致研究结果带有一定的不稳定性^[6]。本研究所采用的 SSR 分子标记其 PCR 产物在进行电泳分离时具有单碱基的高分辨率,共显性标记遗传信息量大;呈孟德尔式遗传,这些特点使研究结果具有很好的稳定性和可靠性^[7]。结合 ITS (内转录间隔区)这一段保守特点表现为种内相对一致,种间差异较明显的保守序列进行分析,将研究材料在种的水平上进行分类。

分子身份证是将品种特征数字化,得出字符串形式的结果,这种结果可以简单明了地体现品种间的差异。目前分子身份证的构建已经在甜高粱^[8]、大豆^[9-10]、水稻^[11]、红麻^[12]、甘蔗^[13]、桃^[14]等作物中展开研究,但未见灵芝在这方面的报道。本研究拟在 ITS 序列进行菌株鉴定的基础上,利用 SSR 分子标记对 11 种灵芝菌株进行分类并构建特异的分子身份证,从而为灵芝科学分类鉴定、合理利用灵芝种质资源提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株: 供试菌株的实验编号及相关信息见表 1。

1.1.2 培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, KH₂PO₄ 3, MgSO₄ 2, 蛋白胨 3, pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝体培养: 将供试菌株接种于固体 PDA 培养基上, 25 °C 培养 10 d 后转接于液体 PDA 培养基, 26 °C、130 r/min 摇瓶培养 12–15 d, 收集菌丝, –20 °C 保存备用。

1.2.2 基因组 DNA 提取: 采用 CTAB 法提取灵芝基因组 DNA, 其质量和浓度经 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后, –20 °C 保存备用。

1.3 rDNA-ITS 序列扩增

采用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对供试菌株的 ITS 序列进行扩增。

PCR 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.3.1 扩增片段的回收与克隆: PCR 扩增产物经 DNA 凝胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit, OMEGA) 纯化后, 按照 pMD18-T Vector (TaKaRa) 试剂盒说明进行载体连接, 转化于大肠杆菌

(*E. coli*) JM109 感受态细胞中, 挑取阳性转化子委托北京华大基因中心进行测序。

1.3.2 数据分析: 测序获得的序列在 GenBank 上进行 BLAST 比对, 对获得的同源序列进行分析。

1.4 SSR 扩增

从 20 对 SSR 引物中筛选出 8 对扩增条带清晰、引物多态性好、反应体系稳定的引物。

SSR-PCR 反应体系为 25 μL, 反应体系包含: 10×PCR Buffer 2 μL, MgCl₂ 2 mmol/L, dNTPs 400 μmol/L, 上下游引物各为 0.8 μmol/L, 模板 DNA 50 ng, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 用双蒸水调整体系至 25 μL。反应程序如下: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 40 °C–51 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物于 4 °C 保存。

1.5 数据统计与分析

电泳图谱中每一条扩增条带均代表了引物与模板 DNA 互补的一对结合位点, 可记为一个分子标记。根据电泳图谱结果直接记录带型, 扩增出强带或可分辨/重复性好的弱带均视为扩增阳性赋值“1”, 其余为扩增阴性赋值“0”。利用 NTSYS-pc^[15] 软件进行聚类分析并构建系统聚类图。

根据扩增片段的大小, 对应的分子量从大到小, 依次记录为 1, 2, 3, …, N, 进行数据统计。采用东北农业大学开发的遗传统计分析软件

表 1 供试菌株及来源					
Table 1 Tested strains of <i>Ganoderma lucidum</i> and their origins					
编号 No.	菌株 Strains	来源 Origins	编号 No.	菌株 Strains	来源 Origins
1	GL-2	东北农业大学	7	GL-6	上海
2	灵芝 G (GG)	上海	8	泰山一号(Tai-1)	黑龙江微生物研究所
3	GL-3	东北农业大学	9	GT	黑龙江大兴安岭
4	GL-4	黑龙江伊春	10	韩灵芝(Han G)	黑龙江微生物研究所
5	GL-5	上海	11	吉林灵芝(Jilin G)	吉林
6	灵芝(GL)	上海农业科学食用菌研究所			

Genetics Statistics 3.0 (登记号为 2007SR11872) 分析品种特异性指数、引物多样性指数和多态信息含量。采用软件 ID Analysis 1.0 (登记号为 2007SR11870) 建立品种分子 ID^[16]。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列比对

测序结果表明: 序列包括部分 18S rDNA

(30–54 bp)、ITS1 (196 bp)、5.8S rDNA (159 bp)、ITS2 (191 bp) 和部分 28S rDNA (56–65 bp)。测得的菌株序列提交到 GenBank 并获得登录号(表 2)。供试菌株的序列经与 GenBank 数据库比对发现, 11 个菌株的 ITS 序列与 GenBank 中已登录的灵芝(*Ganoderma lucidum*)菌株 ITS 序列相似度达到 99% 以上, 在种的水平上证明本实验所收集的菌株均为灵芝(*Ganoderma lucidum*)菌株。

表 2 11 株灵芝 ITS 序列的登录号
Table 2 GenBank accession numbers of ITS sequences of 11 *Ganoderma lucidum* strains

菌株编号 No.	GenBank 登录号 GenBank accession number	菌株编号 No.	GenBank 登录号 GenBank accession number
1	JX162755	7	JX162761
2	JX162756	8	JX162762
3	JX162757	9	JX162763
4	JX162758	10	JX162764
5	JX162759	11	JX162765
6	JX162760		

2.2 SSR 分析

2.2.1 引物分析: 以 8 对引物对 11 个灵芝菌株进行扩增, 每对引物检测到的等位基因数量在 2–6 之间, 平均每对引物能检测到的等位基因数为 4.3 个, 高于平均数的引物共有 5 对: p1s-1x、pS1-S2、pS9-S10、p8s-8x 和 p9s-9x。图 1 为 p9s-9x 引物扩增的电泳图, 有 6 个等位基因。引物等位基因越多, 其在资源鉴别中的作用就越

大, 表明本实验所筛选的大部分 SSR 引物能够有效鉴别灵芝菌种。

2.2.2 聚类分析: 综合 8 对引物扩增的多态性条带, 利用 NTSYS 软件^[15]对 11 个灵芝菌株进行聚类分析, 得出菌株间的聚类图(图 2)。从聚类图中可以看出: 各菌株间的相似水平在 0.57–0.88 之间。GT 和吉林灵芝虽来源地不同, 但表现出亲缘关系较近的趋势, 相似系数达到 0.74, 而 ITS 序列分析已证明所有供试菌株均为同一种, 说明这对菌株很有可能由同一母种分化。相似系数为 0.62 水平上, 11 个灵芝菌种被分成 4 个类群, 第 I 类群只有菌株 GL-2; 第 II 类群有 GT 和吉林灵芝; 第 III 类群有灵芝 G、GL-3、泰山一号、GL-5、灵芝、GL-6、韩灵芝; GL-4 独自聚为第 IV 类群。

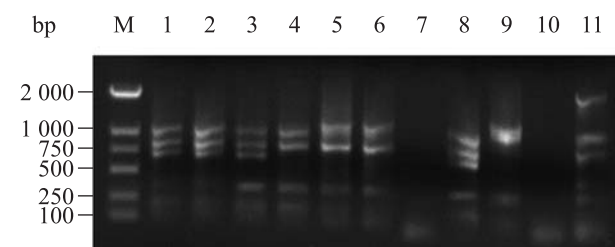


图 1 对 11 个灵芝菌株采用 p9s-9x 引物扩增的产物电泳图

Fig. 1 The primer p9s-9x electrophoretogram of 11 *Ganoderma lucidum* strains

2.3 分子 ID 构建

11 个灵芝菌株经 8 对引物扩增后, 虽条带清晰、稳定性好, 但由于检测出菌株间相似系数过

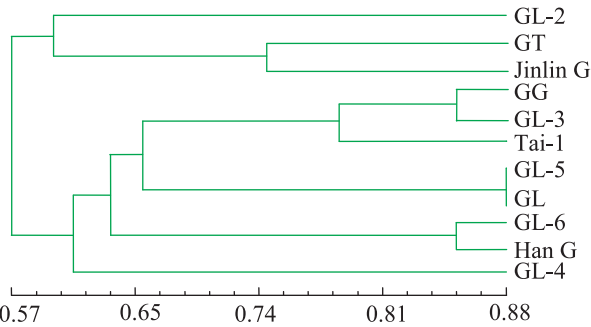


图 2 11 个灵芝菌株基于 SSR 遗传关系的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 11 *Ganoderma lucidum* strains generated by SSR marker based on genetic similarity

注: 刻度上的数字代表相似系数.

Note: The numbers on the scale represent similarity coefficients.

高, 因此 8 对引物中仅有 5 对引物能有效地进行分子身份证的构建。利用 Genetics Statistics 3.0 软件和 ID Analysis 1.0 软件分析获得菌种的特异性指数和分子 ID (表 3), 由表 3 可以看出, 特异性指数介于 55.725–87.712 之间, 平均 70.00。高

于平均特异性指数值的菌株有 GL-2、GL-4、GL-5、吉林灵芝, 其中特异性指数最高的菌株是 GL-4, 最低的是灵芝 G。特异指数越高表示该品种在检测的位点中含有的特异等位基因数目越多, 越具有保存价值, 也可为种质资源鉴定提供参考。

经软件分析得出字符串式灵芝菌种的分子 ID (表 3), 意为在 p74、p61、p72、p42、p84、p75、p52 (“p52”表示第五对引物第二个等位基因位点) 等位基因位点的顺序下, 等位基因位点显性为“1”, 隐性为“0”。以吉林灵芝为例, 其分子 ID 为 0110010, 表示在 p74 等位基因位点隐性, p61、p72 等位基因位点显性, p42、p84 等位基因位点隐性, p75 等位基因位点显性, p52 等位基因位点隐性。以此类推, 由这些引物特异等位基因所组合的字符串就可以代表相应品种。部分品种 ID 扩增图片见图 3。

表 3 灵芝菌种的分子 ID 及特异性指数					
Table 3 Molecular ID and specific index of <i>Ganoderma lucidum</i>					
编号 No.	分子 ID Molecular ID	特异性指数 Specific index	编号 No.	分子 ID Molecular ID	特异性指数 Specific index
1	0010010	85.630	7	1000011	63.481
2	0010011	55.725	8	0000001	66.070
3	1010011	58.457	9	0010110	62.154
4	0000111	87.712	10	0010111	69.239
5	0011111	72.190	11	0110010	87.419
6	0001111	61.923			

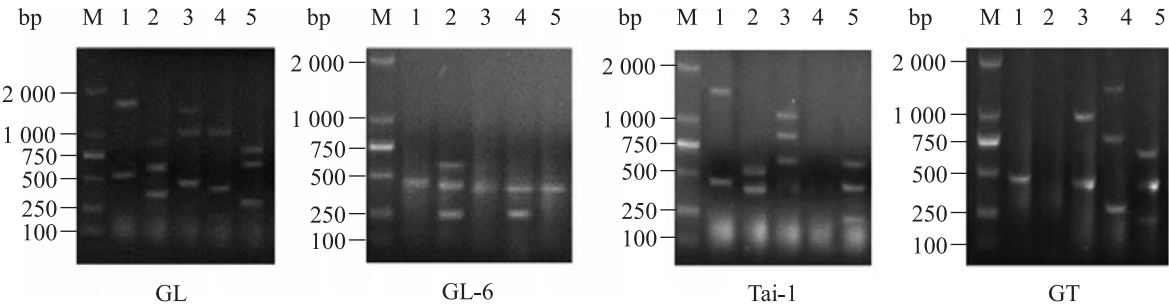


图 3 部分菌株分子特征图

Fig. 3 Molecular ID of partial strains

3 结论与讨论

由于灵芝生长环境的差异,长期人工栽培、杂交等因素,使灵芝菌种的分类出现混乱状况。传统的分类方法是以灵芝形态特征为依据,其结果受环境影响较大,不能有效区分菌种种类。因此,学者们更热衷于利用分子标记法来鉴别菌种。分子标记法是以菌株的遗传物质为依据,鉴别上更具有可靠性。本研究采用 ITS 序列与 GenBank 中序列进行比对,首先在种的水平上鉴定供试菌株,再利用 SSR 分子标记在分子水平上对 11 个灵芝菌株进行聚类分析。在相似系数为 0.62 水平上,11 个菌株聚为 4 类,遗传背景具有较大的差异性。说明 SSR 分子标记能够有效地用于灵芝菌种鉴定,可以为灵芝菌种分类提供参考。

目前,基于 SSR 分子标记法的分子 ID 构建已经成功的应用于作物当中,如颜静宛等^[1]利用 24 对 SSR 引物区分 139 份杂交水稻品种,并构建其分子身份证;高运来等^[9]利用 9 对 SSR 引物区分 83 份大豆品种,并构建了一套黑龙江省大豆品种的分子 ID。本研究通过 SSR 分子标记技术,用 5 对引物区分所有供试菌株,并对这 5 对引物共同扩增同一菌株进行电泳检测、照相获得菌种 ID 照片。采用资源特征分析软件(ID Analysis 1.0)对 11 个灵芝菌株进行分析,构建其分子 ID,得出字符串式的供试菌株分子身份证。分子身份证将供试菌株的遗传特征数字化,能够简单明了地体现菌种间的遗传差异,区分带有特异性等位基因的菌种,更具有直观性,为菌种的鉴别提供了科学的依据。

参 考 文 献

- 学出版社,2001: 1-327.
- [2] 赵明文,陈明杰,王南,等. 灵芝生产用种的亲缘关系研究[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(3): 60-63.
- [3] 唐传红,张劲松,陈明杰,等. 利用拮抗试验和 RAPD 对灵芝属菌株进行分类研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(5): 72-76.
- [4] 苏春丽,唐传红,张劲松,等. 基于 rDNA ITS 序列探讨中国栽培灵芝菌株的亲缘关系[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 11-16.
- [5] Zheng LY, Jia DH, Fei XF, et al. An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP [J]. Microbiological Research, 2009, 164(3): 312-321.
- [6] Yamagishi M, Abe H, Nakano M, et al. PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily[J]. Scientia Horticulturae, 2002, 96(1/4): 225-234.
- [7] Kishorea G, Guptab S, Pandeya A. Assessment of population genetic diversity of *Fagopyrum tataricum* using SSR molecular marker[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, 43: 32-41.
- [8] 王黎明,焦少杰,姜艳喜,等. 142份甜高粱品种的分子身份证构建[J]. 作物学报, 2011, 37(11): 1975-1983.
- [9] 高运来,朱荣胜,刘春燕,等. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建[J]. 作物学报, 2009, 35(2): 211-218.
- [10] 赵洪锟,李启云,王玉民,等. 吉林省大豆骨干亲本及主推品种 DNA 指纹图谱的构建[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(4): 12-16.
- [11] 颜静宛,田大刚,许彦,等. 杂交稻主要亲本的 SSR 分子身份证数据库的构建[J]. 福建农业学报, 2011, 26(2): 148-152.
- [12] 郑海燕,栗建光,戴志刚,等. 利用 ISSR 和 RAPD 标记构建红麻种质资源分子身份证[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3499-3510.

[1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 北京: 北京医科大

- [13] Piperidis G, Rattey AR, Taylor GO, et al. DNA markers: a tool for identifying sugarcane varieties [J]. *Austral Sugarcane*, 2004, 8(S1): 1-8.
- [14] 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 等. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(10): 2081-2093.
- [15] Rohlf FJ. *NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*[M]. New York: Exeter Publications, 2000: 189.
- [16] Chen QS. Comparative analysis of specialty index and genetic similarity on soybean germplasm with resistance to *Cercospora soja* Hara[J]. *China Biotechnology*, 2005, 25(S1): 155-158.

~~~~~  
(上接 p.227)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>