

# 用 AFLP 分析珍稀食用菌—松茸遗传特性的初步研究

陈 强<sup>1</sup>, 廖德聪<sup>1</sup>, 张小平<sup>1</sup>, 张昌兵<sup>2</sup>, 李登煜<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 四川农业大学资源环境学院微生物学系, 雅安 625000; <sup>2</sup> 四川省草原研究所, 成都 611731)

**摘要:** 采用 3 对 AFLP 引物组合, 研究了从四川省雅江县黄背高山栎林下采集的 10 株松茸菌根菌基因组的遗传特性。结果表明, AFLP 图谱能较好地反映测试菌株的遗传特性, 10 株供试菌间具有高度的遗传相似性; 10 株供试菌株全部在 90% 相似性处聚在一起; 在 92% 相似性水平上被分为 3 个群。AFLP 扩增引物 Eco + 1/Mse + 1, Eco + 2/Mse + 2 及 Eco + 3/Mse + 3 的最佳用量分别为 1 pmol/5 pmol, 0.6 pmol/10 pmol 和 0.1 pmol/8 pmol。

**关键词:** 松茸; 遗传特性; AFLP

5646 A

## Preliminary Analysis of Genetic Aspects of Edible Fungi *Tricholoma matsutake* Isolated from Yajiang, Sichuan, by AFLP Technique

CHEN Qiang<sup>1</sup>, LIAO De-cong<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-ping<sup>1</sup>, ZHANG Chang-bing<sup>2</sup>, LI Deng-yu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Microbiology, Sichuan Agricultural University, Yuan 625000;

<sup>2</sup> Institute of Sichuan Grassland Science, Chengdu 611731)

**Abstract:** A total of 10 *Tricholoma matsutake* strains isolated from Yajiang, Sichuan, were analyzed by using AFLP technique. The results showed that the genetic characteristics of *Tricholoma matsutake* strains can be properly revealed by AFLP. Among the 10 *T. matsutake* strains, the genetic aspects were very similar. At the level of 90% similarity, all strains collected together, and at the similarity of 92%, three AFLP groups formed. Simultaneously, the effects of quantity of the primer pairs used in the AFLP PCR were determined. The optimized quantity of Eco + 1/Mse + 1, Eco + 2/Mse + 2 and Eco + 3/Mse + 3 primer pairs used in the AFLP was 1 pmol/5 pmol, 0.6 pmol/10 pmol and 0.1 pmol/8 pmol, respectively.

**Key words:** *Tricholoma matsutake*; Genetic aspects; AFLP

松茸 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing] 是一种名贵的食、药兼用菌。在分类上, 属担子菌门 (Basidiomycota)、担子菌纲 (Agaricales)、伞菌目 (Agaricales)、白蘑科 (Tricholomataceae)、白蘑属 (*Tricholoma*)。产于欧洲、美洲、大洋洲及亚洲的朝鲜半岛、日本和我国。由于其独特的食用及药用价值, 国际上对松茸的特性进行了大量的研究<sup>[1-4]</sup>。在我国, 松茸主产于东北、四川、云南、广西、西藏和台湾省。每年我国内地都有大量的松茸出口到日本和韩国, 成为这些地区重要的出口创汇产品。据统计, 1994 年仅四川省出口的松茸就达 2 800 t, 创汇 5 600 万美

元<sup>[5]</sup>。但因过度采集, 松茸资源受到严重破坏<sup>[5, 6]</sup>, 由于松茸属于菌根真菌, 只能与松树、高山栎类、栲树等几类树木共生, 生态环境特殊, 因此有必要对我国的松茸资源进行系统收集和研究, 以保护这一宝贵的资源。自 20 世纪 80 年代起, 我国学者在松茸的分离纯化、生态分布、生物资源的研究方面开展了大量的工作<sup>[7-10]</sup>, 但这些工作主要限于形态、生理学方面。国内很少有人研究松茸的遗传特性, 仅见曾东方等用 RADP 技术研究松茸的报道<sup>[11]</sup>。

近年来, AFLP 技术<sup>[12]</sup>以其稳定性好、获得的信息量大的特点, 被广泛用于研究动、植物<sup>[13-15]</sup>和微

收稿日期: 2002-04-24

基金项目: 四川农业大学科研基金资助项目和“973”重点资助项目(2001CB108905)

作者简介: 陈 强(1965-), 男, 四川平昌人, 副教授, 博士研究生, 主要从事根瘤菌分类及分子生物学研究。Tel: 0835-2882185; Fax: 0835-2882182;

E-mail: qiangchenq@yahoo.com.cn

生物<sup>[16,17]</sup>的遗传特性。但至今未见用 AFLP 研究松茸的报道。笔者首次报告了对分离自四川省甘孜州雅江县的 10 株松茸子实体的菌丝 DNA 用 AFLP 分析的结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 松茸菌的分离

1.1.1 松茸的采集 1999年8月,从四川省甘孜州雅江县海拔 3 200 m 的黄背高山栎林下采集松茸子实体,带回实验室分离。

1.1.2 松茸菌的分离 研究中采用了改良滨田氏

培养基,配方为:葡萄糖 20 g,酵母浸膏 10 g,  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 1.6 ml,琼脂 20 g, pH 6.0。将配制好的培养基分装于 100 ml 的三角瓶,每瓶 20 ml,  $115^\circ\text{C}$  灭菌 30 min,冷却备用。取菌幕未破的松茸子实体,用无菌医用棉签蘸无菌蒸馏水清洗子实体表面,75% 的酒精表面消毒后,用无菌镊子撕去菌幕,用无菌解剖刀切取黄豆粒大小的菌褶,放置于三角瓶内的培养基上,  $20^\circ\text{C}$  培养。由于国内无专门的松茸菌保藏机构,笔者未能得到参考菌株用于本研究中,试验的菌株情况及编号见表 1。

表 1 供试菌株

Table 1 Strains used in the study

| 编号<br>Code | 菌株号<br>Strain | 属、种<br>Genus and species  | 寄主植物<br>Host plant          | 土壤类型<br>Soil type     |
|------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 1          | F2            | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 2          | F4            | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 3          | F7            | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 4          | F11           | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 5          | E3            | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 6          | E4            | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 7          | E5            | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 8          | E6            | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 9          | E7            | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |
| 10         | E15           | <i>Tricholoma matsuke</i> | 黄背高山栎 <i>Quercus paunos</i> | 黄棕壤 Yellow-brown soil |

### 1.2 松茸菌丝 DNA 的提取

从培养好的松茸菌落中取菌丝 1 g,置于经灼烧灭菌的研钵中,加入液氮,研磨成粉状,转移到 1.5 ml 的 Eppendorf 管中,用 CTAB 法提取供试材料的 DNA<sup>[18]</sup>。以已知浓度的 (DNA 为标准,各取待测 DNA 样品  $1 \mu\text{l}$ , 0.8% 的琼脂糖电泳确定样品 DNA 的浓度。全部 DNA 样品贮藏于  $-20^\circ\text{C}$ 。

### 1.3 AFLP 分析

选用 EcoRI 和 MseI 2 种限制性内切酶对样品进行酶切,Eco 和 Mse 连接头连接酶切片段,分别用具有 1 个、2 个和 3 个选择性碱基的引物对酶切连接产物进行 PCR 扩增。连接头和选择性碱基引物的序列(“+”后的数字为选择性碱基数,引物序列中黑体为选择性碱基)为:

Eco 连接头:  $5' \text{-CTCCTAGACTGCGTACC-3'}/3' \text{-CATCTGACCCATGGTTAA-5'}$ ;

Mse 连接头:  $5' \text{-GACGATGAGTCCTGAG-3'}/3' \text{-TA-CTCAGCACTCAT-5'}$ ;

Eco + 1 引物:  $5' \text{-GACTGCGTACCAATTC-G-3'}$ ;

Mse + 1 引物:  $5' \text{-GATGAGTCCTGAGTAACT-G-3'}$ ;

Eco + 2 引物:  $5' \text{-GACTGCGTACCAATTC-GC-3'}$ ;

Mse + 2 引物:  $5' \text{-GATGAGTCCTGAGTAACT-CG-3'}$ ;

Eco + 3 引物:  $5' \text{-GACTGCGTACCAATTC-GAG-3'}$ ;

Mse + 3 引物:  $5' \text{-GATGAGTCCTGAGTAACT-CTG-3'}$ 。

1.3.1 酶切连接 酶切连接反应液为: T4 DNA 连接酶缓冲液 ( $10 \times$ )  $2.0 \mu\text{l}$ , EcoRI ( $2 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )  $2.0 \mu\text{l}$ , MseI ( $4 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{l}$ , EcoRI 连接头 ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.5 \mu\text{l}$ , MseI 连接头 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{l}$ , T4 DNA 连接酶 ( $4 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{l}$ , 松茸菌丝 DNA 300 ng, 用超纯水补充至总体积  $20.0 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  保温过夜,用 0.8% 琼脂糖凝胶检测酶切连接结果,酶切连接液置  $-20^\circ\text{C}$  保存。

1.3.2 预扩增 预扩增采用 1 个选择性碱基的引物,反应液组成: Dynazyme ( $10 \times$ ) 缓冲液  $2.0 \mu\text{l}$ , dNTP ( $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $2.0 \mu\text{l}$ , Eco + 1/Mse + 1 引物对的用量为  $1.0 \text{ pmol}/5 \text{ pmol}$ , Dynazyme DNA 聚合酶 ( $2 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{l}$ ,  $1.0 \mu\text{l}$  酶切连接混合液作为模板,再用超纯水补充至总体积  $20.0 \mu\text{l}$ ,置 PTC-200 PCR 仪中扩增。扩增程序为:在  $95^\circ\text{C}$  预变性 3 min,  $95^\circ\text{C}$  变

性 30 s, 59.5℃ 退火 30 s, 72℃ 延长 1 min, 循环 30 次, 最后 72℃ 延伸 3 min, 扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶检测, 并保存于 -20℃, 并作为第二次扩增时的模板 DNA。

**1.3.3 二次扩增所用引物对最佳浓度的确定** 以预扩增产物为模板, 分别用具有 2 个选择性碱基的引物对 Eco + 2/Mse + 2 和 3 个选择性碱基的引物对 Eco + 3/Mse + 3 进行二次扩增。在预备试验中, 笔者发现引物浓度对第二次扩增影响很大, 因此对 PCR 所需引物对的最佳用量进行了探讨。

(1) Eco + 2/Mse + 2 引物对最佳用量的确定: PCR 反应液组成: Dynazyme (10 ×) 缓冲液 2.0 μl,

dNTP (2 μmol · L<sup>-1</sup>) 2.0 μl, 预扩增产物 1.0 μl, Dynazyme DNA 聚合酶 (2 U) 1.0 μl, Eco + 2/Mse + 2 引物对的用量按表 2 各处理的数量加入, 用超纯水补充至总体积 20.0 μl。置 PTC-200 型 PCR 仪中扩增, 扩增程序同 Vos<sup>[12]</sup>, 扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。最后根据 PCR 结果确定 Eco + 2/Mse + 2 引物对的最佳用量。

(2) Eco + 3/Mse + 3 引物对最佳用量的确定: 确定 Eco + 3/Mse + 3 引物对的用量时, 按照表 3 所列处理进行。PCR 反应液组成、反应条件及结果检测与上述处理相同, 并最终确定出 Eco + 3/Mse + 3 引物对的最佳用量。

表 2 不同处理 Eco + 2/Mse + 2 引物对用量

Table 2 Quantity of Eco + 2/Mse + 2 primer pairs used in different treatments

| 引物对<br>Primer pairs | 不同处理引物对的用量 (pmol) <sup>1)</sup> |     |     |     |     |     |     |     | Quantity of Eco + 2/Mse + 2 primer pairs used |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                     | A1                              | A2  | A3  | A4  | B1  | B2  | B3  | B4  | C1  | C2  | C3  | C4  | D1  | D2  | D3  | D4  |
| Eco + 2             | 2.5                             | 2.0 | 1.5 | 1.0 | 2.5 | 2.0 | 1.5 | 1.0 | 2.5   | 2.0 | 1.5 | 1.0 | 2.5 | 2.0 | 1.5 | 1.0 |
| Mse + 2             | 30                              | 30  | 30  | 30  | 25  | 25  | 25  | 25  | 20  | 20  | 20  | 15  | 15  | 15  | 15  | 15  |

<sup>1)</sup> A1 ~ A4, B1 ~ B4, C1 ~ C4, D1 ~ D4 为不同处理。下同

A1 ~ A4, B1 ~ B4, C1 ~ C4 and D1 ~ D4 were different treatments. The same as below

表 3 不同处理 Eco + 3/Mse + 3 引物对用量

Table 3 Quantity of Eco + 3/Mse + 3 primer pairs used in different treatments

| 引物对<br>Primer pairs | 不同处理引物对的用量 (pmol) <sup>1)</sup> |      |      |      |      |      |      |      | Quantity of Eco + 3/Mse + 3 primer pairs used |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------------|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|---|------|------|------|------|------|------|------|
|                     | E1                              | E2   | E3   | E4   | F1   | F2   | F3   | F4   | G1  | G2   | G3   | G4   | H1   | H2   | H3   | H4   |
| Eco + 3             | 0.25                            | 0.20 | 0.15 | 0.10 | 0.25 | 0.20 | 0.15 | 0.10 | 0.25  | 0.20 | 0.15 | 0.10 | 0.25 | 0.20 | 0.15 | 0.10 |
| Mse + 3             | 20                              | 20   | 20   | 20   | 15   | 15   | 15   | 15   | 10  | 10   | 10   | 10   | 5    | 5    | 5    | 5    |

<sup>1)</sup> E1 ~ E4, F1 ~ F4, G1 ~ G4, H1 ~ H4 为不同处理。下同

E1 ~ E4, F1 ~ F4, G1 ~ G4 and H1 ~ H4 were different treatments. The same as below

**1.3.4 第二次扩增** 根据上述实验的结果, 得到 Eco + 2/Mse + 2 和 Eco + 3/Mse + 3 引物对的最佳用量后, 分别采用各引物对的最佳用量, 进行松茸 DNA 的第二次扩增, 扩增条件同上。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并保存于 -20℃ 冰箱。

**1.3.5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染** 分别取扩增产物 4.0 μl 与等体积变性载样缓冲液混匀, 在 95℃ 变性 3 min 立即用冰水冷却, 各取 2.5 μl 变性样品, 用 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 恒定功率 23 W, 持续电泳 2.5 h。取下胶板用 10% HAC 洗涤, 再银染、固定, 并于 60℃ 烘干胶板<sup>[12]</sup>。

**1.3.6 电泳结果处理** 将 AFLP 图谱用 HP 扫描仪扫描, 以 TIFF 文件格式保存, 用 Gelcompar 4.1 分析软件, 用平均连锁法 (UPGMA) 聚类分析, 得出树状图谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 松茸菌根菌纯菌丝的分离

许多研究表明, 用松茸子实体菌褶分离纯菌丝的成活率比用子实体和菌柄分离成活率高, 因此笔者采用了菌褶分离法。分离培养时, 松茸菌丝生长很慢, 60 d 后菌落直径约 2 ~ 3 cm, 菌落高突起, 草帽状, 表面菌丝粗短、刚直, 菌丝具有松茸香味。从采集的子实体中, 获得了 10 株松茸子实体纯培养分离物, 松茸菌丝生长情况与谭伟<sup>[6]</sup>、廖树云<sup>[7]</sup>等的描述一致, 因此笔者认为获得的分离物是纯的松茸菌丝。

松茸属于菌根真菌, 具有很强的寄主专一性, 尽管许多学者在这方面已经进行了大量的研究工作, 但是采用合成或半合成培养基分离获得松茸纯培养菌丝的难度大。根据已有的文献, 笔者应用改良滨

田氏培养基,采用子实体菌褶分离技术,虽然有效地避免了污染以及伴生菌的出现,但如何提高所分离松茸菌丝的生长速度,仍值得研究。

2.2 二次扩增所需引物对最佳用量的确定

2.2.1 Eco + 2/Mse + 2 引物对的用量 图 1 结果显示,不同 Eco + 2/Mse + 2 引物对用量对扩增结果有明显的影响。4 个不同处理中,随着引物对用量的减少,弥散型条带也减少,其中 A4、B4、C4、D4 的结果分别是同一处理中较好的,而 D4 结果是 4 个不同处理中最佳的,说明 D4 处理 Eco + 2/Mse + 2 引物对的用量已接近最佳值。在此基础上,经过进一步试验,得到 Eco + 2/Mse + 2 引物对的最佳用量为 0.6 pmol/10 pmol。图 2 是用 Eco + 2/Mse + 2 引物对组合的最佳用量进行第二次扩增的产物,PCR 条带已完全清晰。由于检测 PCR 产物时用 0.8% 琼脂糖凝胶,分辨率低,加之电泳时间较短,因而图 2 中 PCR 条带未完全分离开,但 PCR 产物片段大小已经集中在 100 ~

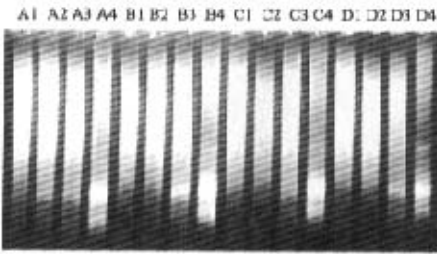


图 1 Eco + 2/Mse + 2 引物对的用量对第二次 PCR 的影响 (不同处理 Eco + 2/Mse + 2 引物的用量见表 2)

Fig.1 Effects of quantity of Eco + 2/Mse + 2 primer pairs to the 2nd PCR (the quantity of Eco + 2/Mse + 2 primer pairs used in different treatment showed in Table 2)

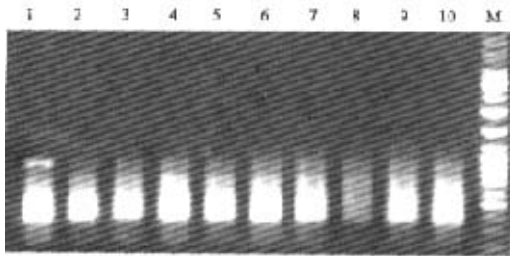


图 2 用 Eco + 2/Mse + 2 引物对最佳用量二次 PCR 的结果 (Eco + 2/Mse + 2 最佳用量为 0.6 pmol/10 pmol)

Fig.2 Patterns of the 2nd PCR using optimized quantity of Eco + 2/Mse + 2 primer pairs (the optimized quantity of Eco + 2/Mse + 2 primer pairs used was 0.6 pmol/10 pmol)

2 000 bp 之间,符合 AFLP 扩增片段大小范围<sup>[12]</sup>。

2.2.2 Eco + 3/Mse + 3 引物对的最佳用量 图 3 是用不同 Eco + 3/Mse + 3 引物对用量进行二次扩增的结果。结果表明,供试的 4 个处理大多得到了较清晰的条带,进一步试验后确定出 Eco + 3/Mse + 3 引物对组合的最佳用量为 0.1 pmol/8 pmol。用该引物对组合的最佳用量对 10 株松茸菌进行第二次 PCR 扩增(图 4),10 个供试菌株均得到了理想的条带。

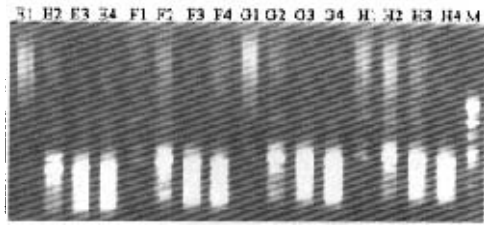


图 3 Eco + 3/Mse + 3 引物对的用量对二次 PCR 的影响(不同处理 Eco + 3/Mse + 3 引物对的用量见表 3)

Fig.3 Effects of quantity of Eco + 3/Mse + 3 primer pairs to the 2nd PCR (the quantity of Eco + 3/Mse + 3 primer pairs used in different treatment showed in Table 3)

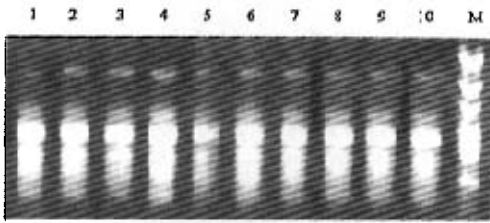


图 4 用 Eco + 3/Mse + 3 引物对进行二次扩增的结果 (Eco + 3/Mse + 3 引物的最佳用量为 0.1 pmol/8 pmol)

Fig.4 Results of the 2nd PCR using optimized quantity of Eco + 3/Mse + 3 primer pairs (the optimized quantity of Eco + 3/Mse + 3 primer pairs used was 0.1 pmol/8 pmol)

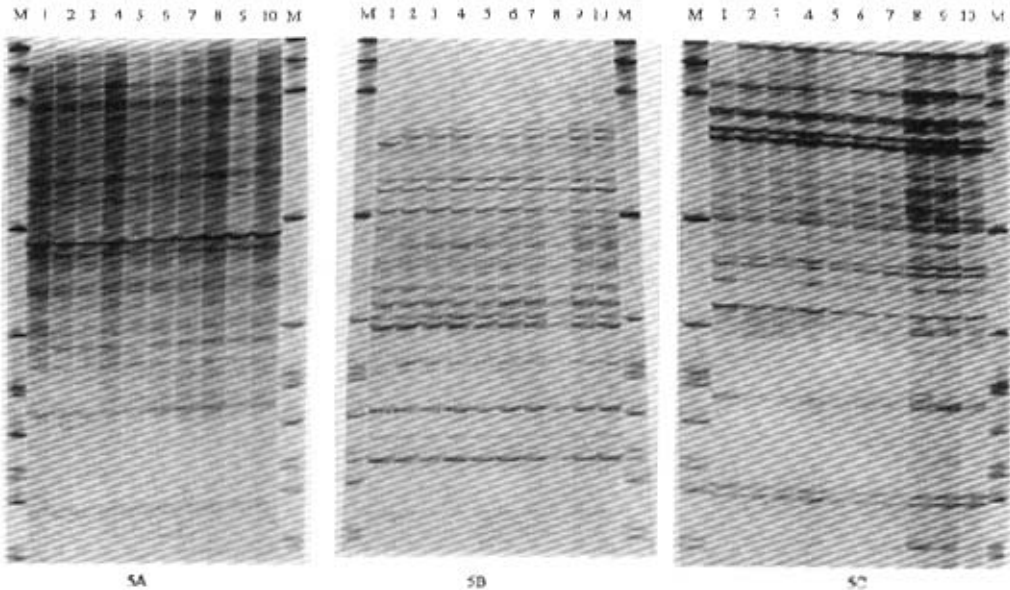
由于真核生物的基因组较大,为了获得清晰的 AFLP 带谱,通常采用二次扩增法,即酶切连接物经预扩增后,再用具有 2 个或 3 个选择性碱基的引物进行扩增。酶切连接反应中,EcoRI 为寡位点限制性内切酶,酶切后的片段较大而数量少;而 MseI 为多位点限制性内切酶,酶切获得的片段小而数量多,因而 PCR 反应中所需的 Eco 引物和 Mse 引物的用量会有差异。结果表明,用 AFLP 研究松茸基因组特性时,Eco 和 Mse 引物对的最佳用量分别为:预扩增时,Eco + 1/Mse + 1 为 1 pmol/5 pmol,第二次扩增时,

Eco + 2/Mse + 2 为 0.8 pmol/10 pmol, 而 Eco + 3/Mse + 3 用量为 0.1 pmol/8 pmol。因此, 用 AFLP 研究真核生物基因组的遗传特性时, 应根据研究对象适当调整引物对的最佳用量, 以获得最佳结果。

2.3 松茸 AFLP 聚丙烯酰胺电泳及聚类分析

图 5 是 10 株松茸菌 AFLP 指纹图谱, 5A、5B、5C

分别为采用 Eco + 1/Mse + 1、Eco + 2/Mse + 2、Eco + 3/Mse + 3 引物对扩增的结果。图中可见, 每种引物对均得到了清晰的带谱, 其中以 Eco + 1/Mse + 1 和 Eco + 3/Mse + 3 引物对扩增出的片段较大些。随着选择性碱基数量的增加, Eco + 2/Mse + 2 及 Eco + 3/Mse + 3 引物对进行二次扩增后, 产物片段的数量逐渐减少。



5A、5B、5C 分别为 Eco + 1/Mse + 1、Eco + 2/Mse + 2、Eco + 3/Mse + 3 引物对扩增的结果; 1 ~ 10 的菌株号分别为: F2、F4、F7、F11、E3、E4、E5、E6、E7 和 E15。M: pGEM 分子量标记

5A, 5B and 5C: the AFLP patterns amplified by Eco + 1/Mse + 1, Eco + 2/Mse + 2, Eco + 3/Mse + 3 primers, respectively; 1 - 10: the strain is F2, F4, F7, F11, E3, E4, E5, E6, E7 and E15; M: pGEM Marker

图 5 松茸菌丝 DNA 的 AFLP 指纹图谱

Fig.5 AFLP fingerprinting of genomic DNA isolated from *Tricholoma matsutake*

从图 5 可以看出, 3 种引物对组合中, Eco + 3/Mse + 3 更能反映出菌株间微小的遗传差异, 因此, 笔者对图 5C 的带谱用 Gelcompar4.1 软件进行了聚类分析(图 6)。结果表明, 10 个菌株在 90% 相似水平处聚在一起, 在 92% 相似性处分为 3 个群, 构成 3 个群的菌株数分别是: 群 I 为 7 个、群 III 为 2 个; F2 单独构成群 II。

松茸菌基因组 DNA 的 AFLP 指纹图谱及聚类结果均表明这 10 个松茸菌株有高度的遗传相似性, 说明是同一种松茸菌根菌的不同菌株。即在四川雅江县取样地内, 侵染黄背高山栎根系的松茸菌丝属于同一个种菌的根真菌。由于菌根真菌能够在不同植株间形成菌丝桥, 或者松茸子实体孢子弹射、野生小

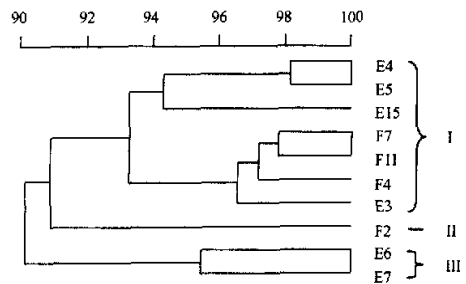


图 6 用 Eco + 3/Mse + 3 引物对扩增的松茸菌丝 AFLP 聚类结果

Fig.6 Dendrogram of *T. matsutake* obtained from AFLP patterns amplified by Eco + 3/Mse + 3 primer pairs

动物以及人类活动的影响,同一种松茸菌根菌可以在一定范围内扩展,与该区域内的共生寄主植物(如栎类、松类)形成共生体系。高明文<sup>[9]</sup>等对川西高原特殊的松茸生态区研究后发现,该区域内松茸的主要共生树种为黄背高山栎、川滇高山栎,高山栎类可以形成面积达 666.6 万 m<sup>2</sup>(6 km<sup>2</sup>)的栎林,而笔者的采样地面积约 100 万 m<sup>2</sup>(约 1 km<sup>2</sup>),因此在该范围内同一种松茸菌根菌完全可能侵染寄主植物——黄背高山栎的根系。

曾东方<sup>[11]</sup>等用 RAPD 技术分析了采自云南、吉林、四川等省松针林下的 20 个松茸子实体的遗传特性。结果显示,这些松茸具有很高的遗传相似性,他们的结果支持中国的松茸应为同一物种的观点。但谭伟<sup>[6]</sup>的报道则指出,日本真菌学家富永保人对产自四川马尔康青冈林下松茸的形态、生理及香味等特性研究后定名为: *T. matsutake* (Ito et I mai) var. *oinggang tominag*; 臧穆<sup>[19]</sup>等也认为,从四川、云南一带收购的松茸应包括松茸[*T. matsutake* (Ito et I mai sing)]、粗壮松茸[*T. robustum* (Alb. Et schw.: Fr)]、假松茸(*T. matsutake* Hongo)、青冈蕈(*T. quarcila* Zang)等种类。川西高原、云南具有独特的松茸生态环境,包括共生树种、海拔高度;廖树云<sup>[8]</sup>等报道,采自四川西北小金县的松茸有 6 种类型,形态差异大。笔者仅采集了 1 个地方的松茸菌株,也未能得到其它的松茸菌株作参考,因此,中国的松茸菌是否属于同一物种还值得进一步研究。

总之,笔者认为,AFLP 能够准确地反映出松茸的遗传特性,这对于进一步研究、开发和保护我国宝贵的松茸资源,寻找松茸菌的特殊功能基因、以及研究松茸菌根菌与共生植物间的相互作用具有积极的意义。

致谢:本研究的遗传特性分析在芬兰赫尔辛基大学应用化学与环境微生物学系 Kristina Lindström 教授实验室完成;研究工作得到四川农业大学微生物学系梁如玉副教授、廖树云副教授支持;陈文新院士在百忙中审阅文稿,特此致谢。

## References

- [1] Mankel A, Kost G, Kothe E. Re-evaluation of the phylogenetic relationship among species of the genus *Tricholoma* *Microbiology Research*, 1999, 153(4):377 - 388.
- [2] Hwang S K, Kim J G. Small-subunit ribosomal DNA of an ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*: sequence, structure and phylogenetic analysis. *Molecular and Cells*, 1998, 30;8(3):251 - 258.
- [3] Hwang S K, Kim J G. Secondary structural and phylogenetic implications of nuclear large subunit ribosomal RNA in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. *Current Microbiology*, 2000, 40(4): 250 - 256.
- [4] Murata H, Yamada A. marY1, a member of the gypsy group of long terminal repeat retroelements from the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8):3 642 - 3 645.
- [5] 谭伟,郑林用,彭卫红,刘本洪,黄忠乾. 四川松茸资源分布及开发利用. *西南农业学报*, 2000, 13(1): 118 - 121.  
Tan W, Zheng L Y, Peng W H, Liu B H, Huang Z Q. Resources distribution and sustainable exploitation and Utilization of *Tricholoma matsutake* in Sichuan Province. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2000, 13(1): 118 - 121. (in Chinese)
- [6] 谭伟. 松口蘑栽培理论及方法. *食用菌学报*, 1994, (1):53 - 63.  
Tan W. Theory and method of cultivation of *Tricholoma matsutake*. *Acta Edible Fungi*, 1994, (1):53 - 63. (in Chinese)
- [7] 廖树云,朱继熹,张永泉. 松口蘑菌种的分离与扩大培养. *中国食用菌*, 1994, 13(6):9 - 10.  
Liao S Y, Zhu J X, Zhang Y Q. Isolation and cultivation of *Tricholoma matsutake* in Sichuan. *Edible Fungi of China*, 1994, 13(6):9 - 10. (in Chinese)
- [8] 廖树云,冷怀群,刘彬. 四川松茸的特殊生态研究. *四川农业大学学报*, 1991, 9(2):297 - 302.  
Liao S Y, Leng H Q, Liu B. Study on particular ecology of *Tricholoma matsutake* in Sichuan. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 1991, 9(2): 297 - 302. (in Chinese)
- [9] 高明文,代贤才. 川西高原的松茸生态. *中国食用菌*, 1996, 15(6):34.  
Gao M W, Dai X C. Ecology of *Tricholoma matsutake* in west plateau of Sichuan Province. *Edible Fungi of China*, 1996, 15(6): 34. (in Chinese)
- [10] 刘培贵,袁明生,王向华,孙佩琼,杨雪. 松茸群生物资源及其合理利用与保护. *自然资源学报*, 1999, 14(3): 245 - 252.  
Liu P G, Yuan M S, Wang X H, Sun P Q, Yang X. Notes on the resources of *Tricholoma matsutake* group and their reasonable utilization as well as effective conservation in China. *Journal of Natural Resources*, 1999, 14(3): 245 - 252. (in Chinese)
- [11] 曾东方,罗信昌,陈升明. 珍稀共生食用菌真菌松茸 DNA 指纹研究. *园艺学报*, 2000, 27(3):223 - 225.  
Zeng D F, Luo X C, Chen S M. Study on DNA polymorphisms of symbiotic edible fungi *Tricholoma matsutake*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(3):223 - 225. (in Chinese)
- [12] Vos P R, Hogers M, Reijmans T, Van de Lee M, Hopmes A, Frijters J, Peleman Pot J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1997, 23: 4 407 - 4 414.
- [13] 房经贵,章镇,马正强,刘大钧,王三红, Lavi U. AFLP 标记在两个芒果品种间杂交 F<sub>1</sub> 代的多态性及分离方式. *中国农业科学*, 2000, 33(3):19 - 24.  
Fang J G, Zhang Z, Ma Z Q, Liu D J, Wang S H, Lavi U. The

- polymorphism and segregation patterns of AFLP markers in the  $F_1$  progenies from the cross of two mango cultivars. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33(3):19-24. (in Chinese)
- [14] Thoquet P, Cherardi M, Jourmet E P, Kereszt A, Ane J M, Proserpi J M, Huguet T. The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biology*, 2002, 2(1):1-13.
- [15] Zawko G, Krauss S L, Dixon K W, Sivasithamparam K. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Molecular Ecology*, 2001, 10(10):2 389-2 396.
- [16] Terefework Z, Kajjalainen S, Lindstrom K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91(2-3):169-80.
- [17] 张小平, 陈 强, 李登煜, Kristina Lindström. 用 AFLP 技术研究花生根瘤菌的遗传多样性. *微生物学报*, 1999, 39(6):483-488.
- Zhang X P, Chen Q, Li D Y, Kristina Lindström. The use of AFLP technique for the study of genetic diversity of peanut brayrhizobia. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999, 39(6):483-488. (in Chinese)
- [18] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D P, Seidman J C, Smith J A, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1990.
- [19] 臧 稼, 松茸群及其近缘种的分类地理研究. *真菌学报*, 1990, 9(2): 113-127.
- Zang M. Study on the taxonomic geography of *matsutake* group and its homologous species. *Journal of Mycology*, 1990, 9(2): 113-127. (in Chinese)

(责任编辑 孙雷心)