

琼脂固体培养基培养蜜环菌菌索总 DNA 的提取

邓艳芹^{1,2}, 李作洲^{1*}, 王传华³, 黄宏文^{1*}

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;

3. 三峡大学化学与生命科学学院, 湖北宜昌 443002)

摘要: 野外采集的蜜环菌 [*Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr.) Quel] 在提取 DNA 前需要分离获得纯化的菌丝体。常规液体培养获得菌丝团的方法感杂率较高, 采集固体培养基表面 cellophane 膜上形成的菌丝则难以获得足量的 DNA 提取材料。蜜环菌细胞内含有大量多醌类物质, 也使得蜜环菌高质量 DNA 的提取存在一定的困难。本研究通过改进试验, 提供一个直接从琼脂固体培养基培养的蜜环菌菌索中提取高质量 DNA 的方法。其中样品的预先冻融处理方法可以促使蜜环菌菌索与琼脂分离; 而在裂解提取缓冲液裂解材料细胞后加入 1.25 mol/L KAc 溶液, 则有利于除去蜜环菌细胞内的多醌类物质以及残留的少量琼脂。通过琼脂糖电泳、紫外分光光度计对 DNA 浓度及 OD 值的测定、ISSR 引物的 PCR 扩增以及酶切产物的 PCR 扩增等方法的检测, 结果均表明该方法提取的 DNA 质量较好, 符合进一步进行分子生物学研究的要求。

关键词: 蜜环菌; 菌索; DNA 提取; 琼脂固体培养基; 多醌

中图分类号: Q523

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)04-0371-06

DNA Extraction from Rhizomorph of *Armillaria mellea* Cultured by Solid Agar Medium

DENG Yan-Qin^{1,2}, LI Zuo-Zhou^{1*}, WANG Chuan-Hua³, HUANG Hong-Wen^{1*}

(1. Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. College of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

Abstract: To obtain pure mycelia before DNA extraction, *Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr.) Quel collected from the field need to be isolated. Traditional liquid culture purifying method has the disadvantage of low efficiency. Although pure mycelia can be collected from cellophane film on solid medium, it is difficult to obtain sufficient materials for DNA extraction. We therefore put forward a modified method that is extracting DNA from rhizomorph of *A. mellea* cultured by solid agar medium. The results show that agar around the rhizomorph materials can be mostly removed when samples were pretreated via freezing-melting. DNA extraction buffer mixed with KAc solution (1.25 mol/L) can effectively eliminate agar and other polysaccharid residuals. The quality of extracted DNA was then tested by a series of measures, including ultraviolet absorption test, agarose gel electrophoresis, amplification by using ISSR primers and digestion by restriction endonuclease *Mse* I. The results confirmed that the quality of extracted DNA using this modified method is very high, and proven to be suitable for further molecular analysis.

Key words: *Armillaria mellea*; Rhizomorph; DNA extraction; Solid agar culture; Polysaccharid

蜜环菌 [*Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr.) Quel] 属于伞菌目口蘑科 (Tricholomataceae) 蜜环菌属 [*Armillaria* (Fr.) Staude], 是一个包含多个生物种 (bio-species) 的真菌类群, 常称为蜜环菌复合种 (*A. mellea* complexes)^[1-3]。蜜环菌属真菌子实体形态变异较大, 寄主广泛, 具有根状菌索是其区别于其它属真菌的典型特征^[4]。不同于其它担子菌类真菌的双核菌丝, 蜜环菌属真菌在营养体阶段呈现单

核双倍体化, 可能有利于其高度分化的菌索的功能发挥^[5], 使得其成为世界温带和寒温带森林林木根腐病或干基腐病的重要病原菌, 造成大量林木死亡腐烂, 带来了重大经济损失, 引起了病理学家的关注, 对蜜环菌的综合防治和有效生物控制是亟待解决的问题^[6]。蜜环菌具有一定的药效^[7], 具有重要经济价值, 同时蜜环菌还是著名中药天麻和猪苓的共生菌和营养源^[8], 蜜环菌与天麻、猪苓间的共生

收稿日期: 2006-12-12, 修回日期: 2007-02-12。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370145)。

作者简介: 邓艳芹 (1980-), 女, 硕士, 从事植物共生真菌分子生态学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: hongwen@wbgcas.cn; lizz@rose.whiob.ac.cn)。

协同进化关系也引起了学者的关注,如天麻表皮细胞与蜜环菌真菌相互作用的光学显微结构或电子显微结构及放射自显影观察^[9],但其协同进化的遗传分子机理研究较缺乏。相关研究的开展需获取大量的野外共生菌株样本进行遗传多样性和遗传分化分析,但样本菌株的分离纯化,并获得高质量的蜜环菌 DNA 是必备的前提。

目前多采用从蜜环菌子实体中刮取孢子接种在固体培养基上或 SR 液体培养基中振荡培养,获得蜜环菌菌落或菌丝团后提取蜜环菌 DNA^[3,10,11]。但是子实体只在特定季节发生,采集困难,而且与共生天麻一一对应采样时,只能采集共生菌索或就近感染同一蜜环菌菌株的树根来培养分离。我们的前期研究改进了蜜环菌菌索分离培养的方法^[12],提高了分离培养效率。但是由于其培养基含玉米和黄豆等植物材料^[12],而且往往与蜜环菌菌索或菌丝紧密结合在一起,所提取的 DNA 将包含玉米等植物材料的 DNA。解决这个问题的办法是将分离纯化后的蜜环菌菌索或菌丝转接进行液体培养或转接到琼脂固体培养基培养。由于蜜环菌菌丝或菌索易受霉菌或细菌寄生感染^[13],不适于在常规条件下大量接种液体培养来提取 DNA。采用琼脂培养基培养蜜环菌方法可以避免外源 DNA 干扰,同时利用蜜环菌向培养基内部生长的特性可以避免霉菌和细菌的二次感染,可在常规培养条件下高效培养。但琼脂和菌索粘在一起,会干扰 DNA 的提取,同时蜜环菌自身细胞内含有较多多醣类和其他次生代谢物质^[14],也使得采用常规 DNA 提取方法难以从蜜环菌中提取出质量较好的 DNA。为了获得高质量的蜜环菌 DNA 用于相关研究,本研究对琼脂培养基培养蜜环菌菌索或菌丝团的 DNA 提取方法进行了探讨,旨在寻求一种以野外采集蜜环菌菌索为原始材料分离纯化后提取高质量 DNA 的方法,为进一步开展蜜环菌分子生态学、植物-真菌协同进化等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以采自野外野生蜜环菌 [*Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr.) Quel] 菌索作为试材,采用玉米-黄豆培养基对其进行初步分离纯化后^[12],通过琼脂固体培养基或液体培养基对其进行纯培养,培养到一定量的菌索或菌丝团再用于 DNA 提取。以液体培养基材料提取的 DNA 作为对照。

1.2 方法

1.2.1 蜜环菌的纯培养

培养基配方:琼脂固体培养基参照杨新美的配方^[15]将琼脂量减为 0.8%,即:蛋白胨 2 g,硫酸镁 0.5 g,葡萄糖 20 g,琼脂 8 g, KH_2PO_4 0.46 g, K_2HPO_4 1 g,水 1000 mL。液体培养基在以上配方中减去琼脂即可。

接种培养:在无菌条件下,用 70% 的酒精将分离纯化后的试管菌株的试管表面进行消毒,用无菌小锤击碎试管底部,再用无菌接种针挑取约 1 mm³ 的蜜环菌菌索或菌丝组织,转接至三角瓶琼脂固体培养基或液体培养基中,置于培养箱中 20~30℃ 避光培养,相对湿度约 30% 左右,液体培养置于 95~115 r/min 的摇床避光培养,培养 7~14 d,蜜环菌菌索或菌丝球的生长量即可达到提取 DNA 所需样品量。将带琼脂的菌索从三角瓶中用小刀划割后,用镊子取出包裹在琼脂中生长良好的浅色菌索,装入保鲜膜中,4℃ 保存。

1.2.2 DNA 的提取

提取液体培养蜜环菌菌丝团 DNA:采用常规的提取微生物 DNA 的 SDS-CTAB 方法^[16],并在秦国夫等方法^[4,10,17]的基础上稍加改进,记作方法 A。具体操作为:①将适量纯化培养的蜜环菌菌球或菌丝团用蒸馏水冲洗干净,并用滤纸轻轻挤压吸干水分后放入研钵,在液氮下迅速研磨成粉末;②将粉末转移到预先加有 800 μL 2% SDS 裂解缓冲液(含 5% 巯基乙醇)的 2 mL 离心管中,65℃ 温浴 30~40 min;③13000 r/min 离心 10 min,取上清液转入新离心管中,加入 1.25 mol/L NaCl 溶液和 1/10 体积的 10% CTAB 缓冲液,摇匀,置 65℃ 恒温浴 15 min;④13000 r/min 离心 10 min,取上清液至新离心管中,冰浴 5 min 后,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),轻摇 30 min 充分混匀;⑤13000 r/min 离心 10 min,取上清液转入新离心管,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻轻摇匀,13000 r/min 离心 10 min,取上清,重复抽提 2 次至界面清晰;⑥加入 2.5 倍体积预冷无水乙醇,轻轻颠倒摇匀,置 -20℃ 30 min,沉淀 DNA;⑦ 4℃ 条件下 12000 r/min 离心 15 min,去上清液;⑧将 DNA 沉淀用含 70% 乙醇的脱盐液洗 2 遍,除去盐等可溶性小分子杂质,于室温下晾干;⑨用 100 μL × TE 溶液溶解。按 Ausubel 等的方法^[18],采用 RNase A 消化除去 RNA。

琼脂固体培养基培养菌索 DNA:为了去除菌索

表面残余琼脂及蜜环菌多醣类物质等的干扰影响,在上述液体培养蜜环菌 DNA 提取方法 A 的基础上作了进一步改进:

(1) 对琼脂固体培养基蜜环菌菌索样品进行冻融预处理。具体参照王利民和唐建国从琼脂糖中回收 DNA 的冻融法^[19],在提取 DNA 前,将琼脂固体培养基培养菌索样品放在 -20°C 温度下,使带琼脂的样品完全冻结,然后放在 37°C 恒温水浴中温浴,使琼脂与菌索分离。将菌索在蒸馏水中冲洗干净,再用滤纸吸收干净菌索表面的水分,以备提取 DNA。仅作此处理而其余操作同方法 A 时,记为 B。

(2) 在离心去掉蜜环菌残体前加入 $1/3$ 体积 5 mol/L KAc 溶液,充分混匀。不做冻融预处理而仅作此改进,记为 C;在冻融预处理基础上,结合此改进,记为 D。

(3) 将方法 A 的第②、③步合并:即在液氮研磨样品后,同时加入 $800\ \mu\text{L}$ 2% SDS 裂解缓冲液(含 5% 巯基乙醇)、 1.25 mol/L NaCl 溶液和 $1/10$ 体积的 10% CTAB 缓冲液,再 65°C 温浴 $40\sim 60\text{ min}$,以缩短提取周期。该改进为单独实验,与前两项改进同时进行,记为 E。

1.2.3 DNA 质量检测及 PCR

DNA 质量初步检测:采用含 $0.5\ \mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭(EB)的 0.8% 琼脂糖凝胶在 $1\times\text{TAE}$ 电泳缓冲液中 120 V 稳压电泳 40 min ,然后在紫外灯下观察结果,照相。同时采用紫外分光光度计测定 DNA 的 OD 值。

ISSR 引物 PCR 检测:以筛选的 $(\text{AC})_8\text{C}$ 为引物对 6 个样品 DNA 进行 PCR 扩增,反应体系为:引物 $0.5\ \mu\text{mol/L}$, $1\times\text{Taq}$ 聚合酶 buffer, $0.4\ \mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.2 U Taq 聚合酶, 4.7 mmol/L MgCl_2 , 45 ng DNA,总体积为 $25\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应的程序确定为: 94°C 5 min (预变性),然后, 4°C 45 s ; 49°C 45 s ; 72°C 2 min ,共 35 个循环, 72°C 10 min ,降至 4°C 结束。PCR 产物采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

DNA 的限制性酶切检测:①选用限制性内切酶 *Mse* I 对基因组 DNA 充分酶切。酶切反应体积为 $25\ \mu\text{L}$,内含 DNA 250 ng , 2.5 U 限制性内切酶和 $1\times$ 限制性内切酶反应 buffer, 37°C 酶切 3 h 。②连接 *Mse* I 接头 ($5'$ -TACTCAGGACTCAT- $3'$ / $5'$ -GACGATGAGTCCTGAG- $3'$)。连接反应体系为 $30\ \mu\text{L}$,包括酶切产物 $15\ \mu\text{L}$, T_4 DNA 连接酶 5 U , $1\times T_4$ buffer, *Mse* I 接头 $0.33\ \mu\text{mol/L}$, 37°C 连接 2 h 后, 65°C 10 min 灭活。③PCR 扩增。连接产物稀释 10 倍

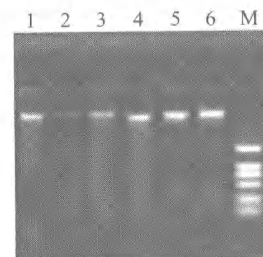
后,以 *Mse* I-N ($5'$ -GATGAGTCCTGAGTAAN- $3'$, N = A, T, C, G) 为引物进行 PCR 扩增,反应总体积为 $20\ \mu\text{L}$,包括稀释的连接 DNA 模板 $5\ \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 0.4 U , dNTPs $200\ \mu\text{mol/L}$, *Mse* I-N 引物 120 ng , $1\times$ PCR 反应缓冲液(含 MgCl_2)。PCR 扩增程序为: 94°C 30 s , 53°C 60 s , 72°C 1 min , $18\sim 19$ 个循环。PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。所有标准 DNA 都采用大连宝生物工程公司生产的 DL 2000。

2 结果与分析

2.1 不同改进方法提取蜜环菌 DNA 的质量

前期我们采用液体培养蜜环菌用来提取 DNA,对秦国夫等的方法^[4,10,17]稍加改进(方法 A),提取到较好质量的蜜环菌 DNA,但在提取琼脂固体培养基培养的蜜环菌菌索 DNA 时,使用该方法无法获得高质量的蜜环菌 DNA。我们在方法 A 的基础上进行了多种改进尝试:方法 B(A + 冻融处理)、方法 C(A + 1.25 mol/L KAc)、方法 D(A + 冻融处理 + 1.25 mol/L KAc),并在 D 的基础上合并了提取方法 A 的第②、③步,最后形成了改进新方法 E。

通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测发现,采用未改进方法 A 提取琼脂固体培养基培养菌索 DNA 条带微弱(图 1),紫外分光光度计检测其 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值较低 (1.57), $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 比值低于 1.0 (表 1),说明所提取 DNA 中蛋白质和盐类及其它小分子杂质较多,质量低。从凝胶电泳结果看,各种改进处理(B、C、D、E)所提取琼脂固体培养菌索 DNA



1. 对照,方法 A 提取液体培养菌丝团 DNA; 2. 方法 A 提取琼脂固体培养菌索 DNA; 3. 单冻融改良(B)提取琼脂固体培养菌索 DNA; 4. 单 KAc 改良(C)提取琼脂固体培养菌索 DNA; 5. 冻融 + KAc 改良(D)提取琼脂固体培养菌索 DNA; 6. 改进的新方法(E)提取琼脂固体培养菌索 DNA; M. 参照标记
1. DNA extracted from liquid cultured mycelia using method A; 2-6. DNA extracted by method A (2) and advanced methods B-E (3-6) from PDA cultured rhizomorph; M. Standard DNA

图 1 各种改良方法提取琼脂固体培养蜜环菌 DNA 的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Total DNA extracted from the rhizomorph of *A. mellea* cultured in PDA culture medium by different advanced methods on 0.8% agarose gel

均有明显改善, 均可看到较明亮 DNA 条带, 且方法 D 和方法 E 所提取 DNA 条带最清晰明亮, 无 DNA 降解现象。采用方法 D 所提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.69, OD_{260}/OD_{230} 比值为 1.70, 好于其它单项改良的方法 (B 和 C), 也略好于作为对照的液体培养菌丝团所提取的 DNA 质量 (图 1)。紫外分光光度计检测表明发现采用改进的新方法 (E) 所提取 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.79 接近 1.80, OD_{260}/OD_{230} 比值在 2.0 以上 (表 1), 质量最好, DNA 浓度也最高。以上结果表明采用 D、E 这两种方法均能获得较高质量的蜜环菌 DNA。

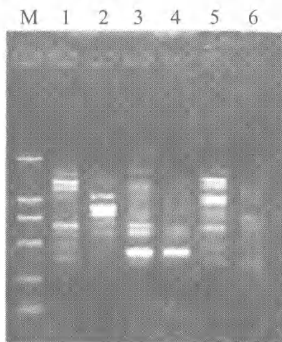
表 1 不同改进方法提取琼脂固体培养基培养蜜环菌 DNA 质量

Table 1 The quality of the DNA extracted from the rhizomorph of *A. mellea* cultured in PDA culture medium by different advanced methods

DNA 提取方法 DNA extraction method	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	DNA 浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
未改进原方法 (A) Primary method	1.57	0.96	678
仅样本预冻融处理改进 (B) Samples pretreated via freezing-melting	1.59	1.09	787
仅加 1.25 mol/L KAc (C) 溶液 Add 1.25 mol/L KAc solution	1.65	1.14	810
预冻融 + 1.25 mol/L KAc (D) Samples frozen-melt pretreated, add 1.25 mol/L KAc solution	1.69	1.70	890
改良后的新方法 (E) Advanced new method	1.79	2.32	930
对照 (原方法 A 提取液体培养 菌丝团) Control (liquid medium cultured mycelia, primary method)	1.66	1.58	870

2.2 ISSR 扩增结果

采用 ISSR 引物对采用改进新方法 E 所提取的蜜环菌 DNA 进行 PCR 扩增检测, 通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可以检测到清晰明亮的 PCR 扩增条带 (图 2)。



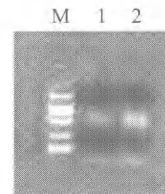
M. 标准分子量; 1-6. 个体 PCR 扩增产物
M. Standard DNA; 1-6. Individual PCR products

图 2 以 ISSR 引物扩增样品 DNA 的电泳结果
Fig. 2 Electrophoresis of PCR products that were amplified with ISSR primers

这表明改进方法 E 提取琼脂固体培养基培养蜜环菌 DNA 的质量能满足 ISSR 等分子标记 PCR 扩增的要求。

2.3 琼脂固体培养基培养菌索基因组 DNA 限制性酶切、接头连接后 PCR 扩增结果

为了进一步检测改进方法提取琼脂糖固体培养基培养蜜环菌 DNA 的质量, 采用 *Mse* I 酶切对基因组 DNA 进行了酶切, 然后连接 *Mse* I 接头, 并以 *Mse* I-N 为引物作 PCR 扩增, 结果见图 3。扩增产物带较明亮, 且片断大小适中, 成为弥散状, 表明所提 DNA 能够被限制性内切酶 *Mse* I 酶很好地酶切消化, 并能与 *Mse* I 接头顺利连接, 开展 PCR 扩增; 说明改良方法 E 从琼脂固体培养基培养蜜环菌菌索中提取的 DNA 质量较高, 可用于 AFLP 等高要求分子标记的研究。



M. 标准分子量; 1, 2. PCR 扩增产物
M. Standard DNA; 1, 2. PCR products

图 3 *Mse* I 酶切后 PCR 扩增产物
Fig. 3 PCR products of DNA fragment digested by *Mse* I

3 讨论

真菌大多都可以在培养基表面生长大量的菌丝, 这些菌丝可直接用于提取 DNA, 但蜜环菌主要形成菌索向培养基内部生长, 获得的蜜环菌材料往往粘附许多培养基物质, 真菌的一些常用的 DNA 提取方法^[3,10,11]可能不适用于蜜环菌。一些学者采用 cellophane 膜进行表面培养来提取 DNA^[3,4,10,17], 但对培养环境无菌级别要求高, 对于大样本的居群研究, 存在一定难度。在常规条件下, 采用固体培养基有利于蜜环菌的纯化培养并可以提高培养效率^[12], 特别是琼脂固体培养基可以实现无外源 DNA 的纯培养。琼脂是从石花菜、江篱及紫菜等红藻类植物中提取而制成的一种藻胶, 为琼脂糖和琼胶质所组成的长链多糖复合体^[20]。琼脂固体培养基培养的蜜环菌材料可能粘附大量琼脂, 在 DNA 提取缓冲液中这些琼脂往往与其它多糖物质一起漂浮在水相中, 将 DNA 缠绕包裹, 影响 DNA 的提取。曾尝试采用恒温水浴, 微波炉加热, 但与菌索紧密结合的残余琼脂的去除效果不理想, 无法提取较好的 DNA

(图1,表1)。借鉴王利明和唐建国^[19]在琼脂糖凝胶中采用冰冻融解法获得回收DNA的经验,对样品预先进行冻融处理,通过冷热交替膨胀收缩产生的机械力破坏琼脂胶的结构,使其与菌索或菌丝分离,减少蜜环菌材料中残余琼脂的含量,使得所提取DNA的质量得以明显提高(图1,表1),但与高质量DNA的要求依然存在差距。

CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)为阳离子去污剂,在高盐浓度下与蛋白质和非酸性多聚糖形成复合物沉淀,与DNA形成复合物在溶液中保持稳定而不沉淀;在低盐浓度下,则沉淀DNA和酸性多糖,将蛋白质和中性多糖留于溶液中。因而常规CTAB方法难以将DNA与酸性多糖分开。蜜环菌含有大量酸性多糖^[21],同时琼脂中的琼脂胶也为酸性多糖,因此采用原先的SDS与CTAB联合的方法^[3,4,10,17]难以从琼脂固体培养基培养的蜜环菌材料中提取高质量的DNA(图1,表1)。

有研究表明加入高浓度的醋酸盐有利于除去DNA提取过程中的多糖成分,对于含较高多糖成分材料DNA的提取有较好的效果^[22,23],因此在加入2% SDS裂解缓冲液温浴后,离心去残渣前,加入1.25 mol/L KAc溶液对原方法进行了改进。实验结果表明,该改进使得从蜜环菌材料(未经预冻融处理以及经过冻融处理的样品)中提取的DNA质量有明显的提高。样品预冻融与加入KAc溶液相结合处理后DNA提取的效果更好(图1,表1)。其原因可能是由于添加了KAc溶液后,一是大幅提升了游离阳离子的量,可以通过影响多糖分子内和分子间的相互作用而改变多糖分子的行为(Axelos, 1998)^[24],可能更有利于多糖与DNA分离;二是KAc水解后呈碱性,可以与酸性多糖作用使其成为中性,使其在CTAB的作用下不再与DNA共溶解或共沉淀,而与DNA分离开来,获得高质量的DNA。冻融处理可以除去大量的残余琼脂,减少了提取液中多糖总量和酸性多糖的含量,有利于KAc和CTAB的效率提升,使提取的DNA质量更高。

秦国夫的原方法^[4,10,17]将SDS裂解缓冲液和CTAB提取缓冲液分两步进行,耗时较长,我们对其作了改进:同时加入SDS裂解液和CTAB提取缓冲液,并适当延长温浴时间。由于SDS(十二烷基硫酸钠)为阴离子去污剂,能溶解细胞膜和核膜蛋白,使核蛋白解聚,DNA得以游离出来,因此延长温浴时间可使细胞裂解更为完全,CTAB与DNA分子更早地形成复合物,有利于DNA的稳定,所提取的

DNA质量进一步提高(表1,图1)。

本研究中,蜜环菌材料的老嫩程度对DNA的质量有一定影响,表现为幼嫩的初生菌索所提取DNA的质量较好,老化的菌索由于外围革质化且细胞内次生代谢物质增多,不利于DNA的提取。另外,菌索表面残留的少量琼脂和蜜环菌细胞内多糖类物质等在高盐条件下会形成白色的沉淀,在吸取上清液时应避免吸入,以保证提取高质量DNA。

参考文献:

- [1] Guillaumin J J, Lung B, Romagnesi H, Marxmuller H, Lamoure D, Durrieu G, Berthelay S, Mohammed C. The systematic of the *Armillaria mellea* complex phytopathological consequences[J]. *Eur J Forest Pathol*, 1985, **15**: 268 - 277.
- [2] Guillaumin J J. The *Armillaria mellea* complex [A]. In: Smith I M, Dunez J, Phillips D H, Lelliot R A, Archer S A eds. *European Handbook of Plant Diseases* [C]. Oxford: Blackwell, 1988. 520 - 523.
- [3] 孙立夫. 黑龙江省蜜环菌生物种的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2003. 2 - 171.
- [4] 秦国夫, Hantula J. 同宗配合蜜环菌与欧美异宗配合蜜环菌狭义种的分子系统学关系[J]. *菌物系统*, 2002, **21** (3): 346 - 355.
- [5] Korhonen K, Hintikka V. Simple isolation and inoculation method for fungal cultures[J]. *Karstenia*, 1980, **20**: 19 - 22.
- [6] Schwarze FW, Baum S, Fink S. Resistance of fibre regions in wood of *Acer pseudoplatanus* degraded by *Armillaria mellea* [J]. *Mycol Res*, 2000, **104**: 1126 - 1132.
- [7] 邹容, 康冀川. 蜜环菌研究进展[J]. *山地农业生物学报*, 2005, **24** (3): 260 - 264.
- [8] 徐锦堂. 天麻栽培学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993. 1 - 294.
- [9] 徐锦堂, 范黎. 天麻种子/原球茎和营养繁殖茎被菌根真菌定殖后的细胞分化[J]. *植物学报*, 2001, **43** (10): 1003 - 1010.
- [10] 秦国夫, 贺伟, 沈瑞祥. 中国蜜环菌生物种的RAPD分析[J]. *真菌学报*, 1996, **15** (1): 26.
- [11] Shaw III C G, Rath L F. Persistence and distribution of a clone of *Armillaria mellea* in a ponderosa pine forest [J]. *Phytopathology*, 1976, **66**: 1210 - 1213.
- [12] 王传华, 王义敏, 暴朝霞, 李作洲. 一种优化的蜜环菌分离与纯化方法[J]. *武汉植物学研究*, 2005, **23** (5): 478 - 481.
- [13] Dumas M T, Boyonosi N W. Scanning electron microscopy of mycoparasitism of *Armillaria* rhizomorphs by species of *Trichoderma* [J]. *European Journal of Forest Pathology (Germany)*, 1992, **22** (6-7): 379 - 383.
- [14] 沈业寿, 洪毅. 蜜环菌多糖分离纯化及其部分理化性质[J]. *中国食用菌*, 1999, **18** (1): 38 - 40.
- [15] 杨新美. 食用菌栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 211.
- [16] 刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 沈瑞祥. 提取植物和微生物DNA的SDS-CTAB改进法[J]. *北京林业大学学报*, 1997, **19** (3):

- 100-103.
- [17] 秦国夫,赵俊,田淑敏,Hantula J. 北半球高卢蜜环菌的遗传多样性与分子鉴定[J]. 林业科学,2001,37(2):61-68.
- [18] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1[M]. Brooklyn, New York: John Wiley & Sons Inc, 1994 - 2005. 3. 13. 1 - 3. 13. 3.
- [19] 王利民,唐建国. 从琼脂糖电泳凝胶中回收 DNA 的几种简便方法[J]. 生命科学研究,1999,3(2):128-132.
- [20] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 中国农业出版社, 1995. 275-288.
- [21] 孔小卫,沈业寿,王满朝,洪登华. 蜜环菌多糖 Am-I 的部分理化性质及结构研究[J], 食品科学,2003,24(7):23-26.
- [22] 杨君,王茜,刘美华,安利佳. 一种简便的海藻 DNA 提取方法[J]. 生物技术,1999,9(4):39-42.
- [23] 王经源,郭明亮,林文雄,吴锦忠. 高多糖含量植物:莲 DNA 的提取方法[J]. 福建稻麦科技,2004,22(1):8-9.
- [24] Axelos M A V. Polysaccharide-metal interactions[A]. In: Walter R H ed. Polysaccharide Association Structures in Food[C]. New York:Marcel Dekker. 1998. 273-288.

《西北农林科技大学学报(自然科学版)》2008 年 征 订 启 事

《西北农林科技大学学报(自然科学版)》是国内外公开发行的综合性农业科学学术期刊,创刊于 1936 年,是西北地区创办最早的农业学术期刊,其前身是《西北农业大学学报》。本刊立足学校,面向社会,主要刊登农业科学、林业科学、植物保护、资源与环境科学、园艺科学、动物科学与动物医学、食品科学、农业水利与建筑工程、农业机械与电子工程、生物技术与基础学科等方面具有创新性或适用性的学术论文、研究简报、文献综述以及反映最新科研成果的快报。读者对象为国内外农林科技工作者、高等院校教师、研究生和农林管理干部。

本刊主办单位西北农林科技大学为国家“985 工程”和“211 工程”建设大学,是教育部直属综合性全国重点大学。本刊为中国自然科学核心期刊、全国综合性农业科学核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊和中国科技核心期刊,论文被国内外多家权威性数据库和文摘期刊固定转载和收录。1994 年以来,本刊连续进入“被引频次最高的中国科技期刊 300 名排行榜”,在全国和陕西省科技期刊综合质量评比中,先后 20 余次获奖,其中 1997 年获第二届全国优秀科技期刊二等奖,1999 年获全国优秀自然科学学报及教育部优秀科技期刊一等奖、陕西省高校“十佳学报”及陕西省科技期刊“十佳期刊”,2001 年入选“中国期刊方阵”,2004 年获第四届全国优秀农业期刊一等奖,2006 年获“百种中国杰出学术期刊”和“首届中国高校优秀科技期刊”。在促进学术交流、发展学科理论、推动科技进步等方面做出了较大贡献。

《西北农林科技大学学报(自然科学版)》为月刊,A4,234 页,每月 10 日出版。每期定价 10 元,全年 120 元。邮发代号为 52-82,全国各地邮局均可订阅,亦可直接向本刊编辑部订阅。国外总发行为中国出版对外贸易总公司。

编辑部地址:陕西杨凌 西北农林科技大学西农校区 40 号信箱 邮编:712100

电话:029-87092511; E-mail: xb2511@yahoo.com.cn

网址: <http://XBNY.chinajournal.net.cn>; <http://xbnydxsb.periodicals.net.cn>