

洪森荣,邓雨晴,张 玲,等. 江西铅山红芽芋抗病蛋白基因克隆和表达分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(9):21–27.

doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2022.09.004

# 江西铅山红芽芋抗病蛋白基因克隆和表达分析

洪森荣<sup>1,2,3,4</sup>, 邓雨晴<sup>1</sup>, 张 玲<sup>1</sup>, 张 妮<sup>1</sup>, 张雯齐<sup>1</sup>, 张新语<sup>1</sup>, 赵若雅<sup>1</sup>, 郑潘鸯<sup>1</sup>, 郑紫娟<sup>1</sup>, 周融冰<sup>1</sup>

(1. 上饶师范学院生命科学学院, 江西上饶 334001; 2. 上饶市药食同源植物资源保护与利用重点实验室, 江西上饶 334001;

3. 上饶市薯芋类作物种质保存与利用重点实验室, 江西上饶 334001; 4. 上饶农业技术创新研究院, 江西上饶 334001)

**摘要:**对江西铅山红芽芋抗病蛋白基因进行克隆和表达分析,以期解析江西铅山红芽芋的抗病机制奠定基础,同时为江西铅山红芽芋的遗传改良提供候选基因。通过江西铅山红芽芋试管苗转录组数据库筛选到江西铅山红芽芋抗病蛋白基因的核心片段,利用 RT-PCR 技术克隆江西铅山红芽芋抗病蛋白基因,并用生物信息学方法和实时定量 PCR 进行序列分析和器官表达分析。结果表明,江西铅山红芽芋抗病蛋白基因 cDNA 总长度为 264 bp, G + C 含量为 46.59%;江西铅山红芽芋抗病蛋白由 88 个氨基酸组成,分子量为 10 116.53 u,等电点为 6.42,为亲水性蛋白;二级结构由  $\alpha$ -螺旋(23.68%)、 $\beta$ -片层(14.77%)、无规则卷曲(61.36%)构成;三级结构为单体;江西铅山红芽芋抗病蛋白主要存在于叶绿体和细胞核中;江西铅山红芽芋抗病蛋白在进化上与芋(*Colocasia esculenta*)的亲缘关系较近,尤其是与芋的 hypothetical peotein Taro\_046555 (MQM13626.1)、hypothetical peotein Taro\_046554 (MQM13625.1)和 hypothetical peotein Taro\_046553 (MQM13630.1)在进化上具有最高的亲缘关系。实时定量 PCR 结果显示,抗病蛋白基因在江西铅山红芽芋中的表达存在器官特异性,在叶片和球茎膨大初期的表达量最高。综合分析可知,江西铅山红芽芋抗病蛋白具有典型的抗病蛋白结构,在进化上高度保守。

**关键词:**江西铅山红芽芋;抗病蛋白;基因克隆;表达分析

**中图分类号:** S632.301 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2022)09–0021–06

江西铅山红芽芋(*Colocasia esculenta* L. Schoot var. *cormosus* ‘Hongyayu’)是江西省知名名优特农产品和国家地理标志农产品<sup>[1]</sup>,属天南星科本草植物,药食兼优<sup>[2–3]</sup>。自然界的各种微生物会对植物的生长发育造成一定的威胁,在与病原菌的长期共进进化过程中,植物为免受病原微生物侵害形成了一套保护自身的免疫应答调控机制<sup>[4]</sup>。病原微生物分泌的效应蛋白可被抗病蛋白特异识别,从而触发免疫响应,产生或激活能够特异识别效应因子的抗性蛋白,从而减少病原微生物对植物的侵扰<sup>[5]</sup>。抗病蛋白可分为跨膜受体蛋白、蛋白激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶、毒素还原酶、核苷酸结合富含亮氨酸重复序列(nucleotide binding–leucine rich repeat, NB–LRR)抗病蛋白等 5 种;目前克隆到的抗病蛋

白编码基因大多属于 NB–LRR 类,同属于 NB–LRR 类抗病蛋白对应的编码基因还有 *TNL*(*TIR–NB–LRR*)和 *CNL*(*CC–NB–LRR*)2 类<sup>[6]</sup>。因此,克隆江西铅山红芽芋抗病蛋白编码基因并检测其组织表达特异性,对了解江西铅山红芽芋抗病品种选育具有重要意义。目前关于抗病蛋白(disease resistance protein)编码基因的研究尚少见。Pit 是一种对稻瘟病具有抗性的 NLR 蛋白,水稻 GTPase OsRac1 直接与 Pit 相互作用,Pit 的活性形式诱导了质膜上 OsRac1 的激活,OsRac1 参与了 Pit 介导的活性氧(ROS)产生和过敏反应(HR)过程,是水稻 Pit 介导的抗病性所必需的<sup>[7]</sup>。烟草花叶病毒抗性 *N* 基因是烟草花叶病毒复制酶中识别解旋酶结构域的 Toll 白细胞介素受体(*TIR*)–NBS–LRR 类植物抗病基因的成员,*N* 蛋白在诱导子的作用下发生寡聚,但 P–环基序突变可消除寡聚作用。RNBS–A 基序和 *TIR* 结构域的功能缺失突变保留了寡聚的能力,寡聚是 *N* 介导抗烟草花叶病毒(TMV)的一个早期事件<sup>[8]</sup>。植物免疫系统对病原菌的识别受抗病基因结构相关的多态产物控制。RAR1 和/或 SGT1b 介导许多 R 蛋白的功能,RAR1 通过一种未

收稿日期:2021–07–05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31960079、32060092);上饶市科技局平台载体建设项目(编号:20201001、20191017);上饶师范学院校级科研自选课题(编号:202031);国家级大学生创新创业训练计划(编号:202110416008)。

作者简介:洪森荣(1974—),男,江西永新人,硕士,教授,主要从事植物生物技术研究。E–mail:hongsenrong@163.com。

知的机制控制前激活 R 蛋白的积累;拟南芥 SGT1b 在植物免疫系统中具有 2 种不同的、在遗传上可分离的功能:SGT1b 拮抗 RAR1,在感染前负调控 R 蛋白的积累;SGT1b 具有 RAR1 独立的功能,在感染过程中能够调节细胞的程序性死亡;RAR1 和 SGT1 的平衡活性与胞浆 HSP90 共同调节活化前 R 蛋白的积累和信号传导能力<sup>[9]</sup>。拟南芥 NPR1 蛋白是调节水杨酸依赖性基因表达的关键蛋白,NPR1 与基本结构域/亮氨酸(Leu)拉链转录因子 TGACG 基序结合因子(TGA)类成员有差异的相互作用,并调节其 DNA 的结合活性。*TGA1* 基因中 Cys - 260 和 Cys - 266 的定点突变使其能与酵母、拟南芥中的 NPR1 相互作用,TGA1 依赖于 Cys 残基的氧化状态来介导与 NPR1 的相互作用。TGA1 的分子内二硫键包括与 NPR1 的相互作用,NPR1 只能刺激 TGA1 还原态的 DNA 结合活性。与动物、酵母不同,TGA1 的 DNA 结合活性不受氧化还原作用调节<sup>[10]</sup>。目前,对红芽芋的研究主要集中在脱毒快繁<sup>[1]</sup>、微芋诱导<sup>[2]</sup>、下游加工<sup>[3]</sup>、成分分析<sup>[11]</sup>等方面,关于红芽芋抗病蛋白方面的研究尚未见报道。本研究利用 RT-PCR 技术克隆江西铅山红芽芋抗病蛋白基因,并用生物信息学方法和实时定量 PCR 方法进行序列分析和组织表达分析,为揭示江西铅山红芽芋抗病蛋白的生物学功能提供理论依据,为从分子水平选育江西铅山红芽芋抗病品种提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

江西铅山红芽芋试管苗。

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 用 TRIzol 试剂提取江西铅山红芽芋试管苗的总 RNA,提取步骤参照说明书,使用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和完整性。以提取获得的 RNA 为模版,按照 M-MLV cDNA 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。逆转录引物采用 Oligo(dT)18 Primer:5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTT-3',具体步骤参考说明书。

1.2.2 抗病蛋白基因的克隆 根据转录组组装的 Unigene 序列信息(TRINITY\_DN15482\_c0\_g1),用 Primer Premier 5.0 设计引物(F:5'-CGAGGATACA CAGGTCACGG-3';R:5'-GAATTCTAACTTCTGG AGTTCTGGG-3')。PCR 扩增条件:95 ℃ 2 min;

95 ℃ 30 s,54.1 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。将 PCR 产物回收,使 pMD19-T 载体与条带(含有目的基因)连接,并用热激法转化感受态细胞大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ ,提取阳性转化子(鉴定正确)中的质粒,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 抗病蛋白基因的生物信息学分析 氨基酸序列用 BioEdit 软件分析,酶的理化性质用 ProtParam 预测,酶的疏/亲水性用 ProtScale 预测。使用 GOR I 软件在线预测酶的二级结构。使用 SWISS-MOLD 在线预测酶的三级结构。采用 WoLF PSORT 在线预测基因的表达部位。通过 DNAMAN 和 BioEdit 软件进行氨基酸序列比对,利用 MEGA 5.0 进行系统进化树的构建。

1.2.4 抗病蛋白基因的组织表达分析 分别取 500 ng 江西铅山红芽芋试管苗根、茎、叶、试管球茎(初期、中期和末期)的 RNA,将其反转录为 cDNA。荧光定量 PCR(qRT-PCR,SYBR Green I)检测的内参基因为 *GAPDH*。设计的引物序列如下:F,5'-TGTGTCTCCCTCCAGTGCTCA-3';R,5'-TTTCTC GCCCCCCTGTTCA-3';目标基因片段大小 145 bp;变性温度( $T_m$ )53.6 ℃。qRT-PCR 检测采用 20  $\mu$ L 反应体系,PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 复性 34 s,72 ℃ 延伸 15 s,40 个循环。用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算基因表达水平。试验重复 3 次,所有数据表示为“平均值  $\pm$  标准差”,并用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验抗病蛋白基因组织表达的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 江西铅山红芽芋抗病蛋白基因的 cDNA 序列

RT-PCR 扩增结果显示,江西铅山红芽芋抗病蛋白基因 cDNA 总长度为 264 bp,G+C 含量为 46.59%(图 1、图 2、图 3)。

### 2.2 江西铅山红芽芋抗病蛋白的氨基酸序列

用 ProtParam 预测的江西铅山红芽芋抗病蛋白的氨基酸序列见图 4。江西铅山红芽芋抗病蛋白由 88 个氨基酸组成,分子量为 10 116.53 u,等电点为 6.42,为亲水性蛋白。各氨基酸的数目和比例:丙氨酸(Ala,A)(5 个,5.7%)、精氨酸(Arg,R)(7 个,8.0%)、天冬氨酸(Asp,D)(3 个,3.4%)、半胱氨酸

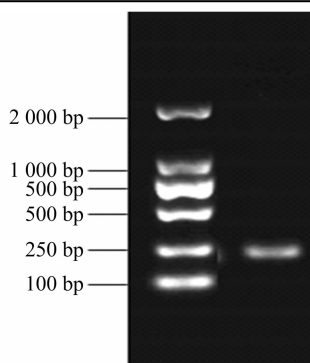


图1 江西铅山红芽芋抗病蛋白基因的 PCR 扩增

5' -CGAGGATACACAGGTTACGGTTTGCCAGTTGGTATGCATATTTTTC  
CGCACTGACTTCTTCAGTAGATTATCCTGTGTCTCCCTCCAGTGCTCAAAAT  
GTGAAATCCTTCCACCACTCGGCCAATTGTGCTTCTCAAGGAGCTCATTGT  
GGAAGGGGCAAGTAGTCTGCAAACTTTTGCACAGGATTATGACATTCTGAA  
CAGGGGGGCGAGAAACGAACTCGCATTGCTTCCAGAATCCAGAAGT  
TAGAATTC-3'

图2 江西铅山红芽芋抗病蛋白基因的碱基组成

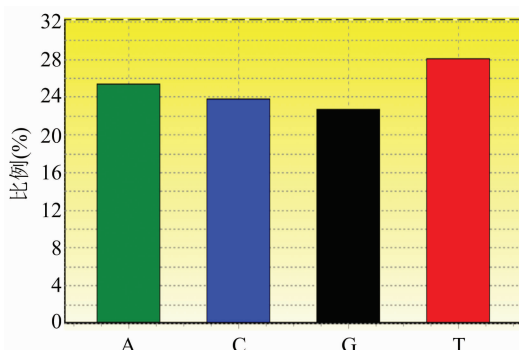


图3 江西铅山红芽芋抗病蛋白基因各碱基的比例

(Cys, C) (4 个, 4.5%)、谷氨酰胺 (Gln, Q) (6 个, 6.8%)、谷氨酸 (Glu, E) (7 个, 8.0%)、甘氨酸 (Gly, G) (6 个, 6.8%)、异亮氨酸 (Ile, I) (4 个, 4.5%)、亮氨酸 (Leu, L) (11 个, 12.5%)、赖氨酸 (Lys, K) (3 个, 3.4%)、苯丙氨酸 (Phe, F) (8 个, 9.1%)、脯氨酸 (Pro, P) (3 个, 3.4%)、丝氨酸 (Ser, S) (9 个, 10.2%)、苏氨酸 (Thr, T) (5 个, 5.7%)、色氨酸 (Trp, W) (1 个, 1.1%)、酪氨酸 (Tyr, Y) (4 个, 4.5%)、缬氨酸 (Val, V) (2 个, 2.3%)。带负电荷氨基酸残基总数 (Asp + Glu) 为 10 个, 带正电荷氨基酸残基总数 (Arg + Lys) 为 10 个。失稳指数 (II) 计算为 50.84, 表明该蛋白属于不稳定蛋白。

5'-RGYTGSRFASWYAYFLRTDFFSRLSCVSLQCSKCEILPPLGQLCFLKE  
LIVEGASSLQTFAQDYDISEQGGRETRTRIAFPPELQKLEF-3'

图4 江西铅山红芽芋抗病蛋白的氨基酸序列

### 2.3 江西铅山红芽芋抗病蛋白的亲疏水性分析

疏水区域用高峰值区域表示, 其数值一般为正值; 而亲水区域用低谷区域表示, 其数值一般为负值。

从图 5 可以看出, 最大疏水值为 2.00 左右, 说明相应位点的疏水性最强; 最大亲水值为 -2.5 左右, 说明相应位点的亲水性最强。江西铅山红芽芋抗病蛋白表现出高度亲水性, 说明该蛋白为亲水性蛋白。

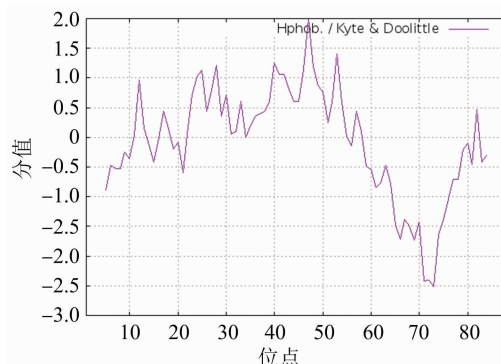


图5 江西铅山红芽芋抗病蛋白亲疏水值的分布

### 2.4 江西铅山红芽芋抗病蛋白的二级结构分析

由图 6、图 7 可见江西铅山红芽芋抗病蛋白的二级结构预测结果。GOR 预测结果显示, 其二级结构由  $\alpha$  螺旋 (Hh, 23.86%)、 $\beta$ -片层 (Ee, 14.77%)、无规则卷曲 (Cc, 61.36%) 构成。从分布位点上看, C 端、N 端主要含有  $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲和  $\beta$ -片层, 且无规则卷曲、 $\beta$ -片层和  $\alpha$ -螺旋散布于整个蛋白中。

### 2.5 江西铅山红芽芋抗病蛋白三级结构的分析

SWISS-MODEL 预测结果 (图 8) 显示, 江西铅山红芽芋抗病蛋白的三级结构为单体, 多由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲组成, 与二级结构预测结果一致。

### 2.6 江西铅山红芽芋抗病蛋白的亚细胞定位

用 WoLF POSRT 在线软件对江西铅山红芽芋抗病蛋白基因的表达部位进行预测, 结果显示, 定位于叶绿体中的蛋白质数量为 9 个, 定位于细胞核中的蛋白质数量为 3 个, 定位于线粒体中的蛋白质数量为 1 个, 定位于细胞质中的蛋白质数量为 1 个, 表明江西铅山红芽芋抗病蛋白基因主要存在于叶绿体和细胞核中 (图 9)。

### 2.7 江西铅山红芽芋抗病蛋白的系统进化分析

由构建的进化树可以看出, 江西铅山红芽芋与芋 (*Colocasia esculenta*) 在一个大分支下, 说明江西铅山红芽芋抗病蛋白在进化上与 *C. esculenta* 的亲缘关系较近, 尤其是与 *C. esculenta* hypothetical peotein Taro\_046555 (MQM13626.1)、hypothetical peotein Taro\_046554 (MQM13625.1) 和 hypothetical peotein Taro\_046553 (MQM13630.1) 在进化上具有较高的亲缘关系 (图 10)。



图6 江西铅山红芽芋抗病蛋白的二级结构

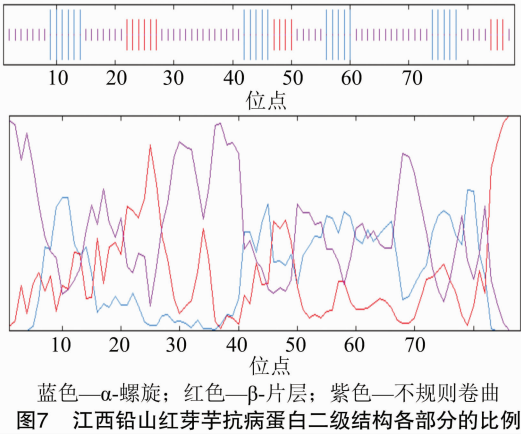


图7 江西铅山红芽芋抗病蛋白二级结构各部分的比例

id	site	distance	identity	comments
At5g25390.1	nucl	264.951	13.4409%	[Arath]
RBS_SACHY	chlo	269.501	17.2619%	[Uniprot] SWISS-PROT45:Chloroplast.
At5g65165.1	mito	273.293	8.73786%	[Arath]
At4g24930.1	chlo	276.459	11.5556%	[Arath] Subclass:thylakoid
At1g14150.1	chlo	286.298	13.6842%	[Arath] Subclass:thylakoid
RBS_BATOE	chlo	300.354	10.8571%	[Uniprot] SWISS-PROT45:Chloroplast.
FER1_ORYSA	chlo	300.375	13.6691%	[Uniprot] SWISS-PROT45:Chloroplast.
RBS1_ACEME	chlo	306.831	8.79121%	[Uniprot] SWISS-PROT45:Chloroplast.
RBS2_ORYSA	chlo	315.796	10.8571%	[Uniprot] SWISS-PROT45:Chloroplast.
RBS3_ACEME	chlo	317.115	10.4396%	[Uniprot] SWISS-PROT45:Chloroplast.
RBS_BETVE	chlo	317.138	10.4396%	[Uniprot] SWISS-PROT45:Chloroplast.
DET1_ARATH	nucl	318.277	6.4695%	[Uniprot] SWISS-PROT45:Nuclear.
At1g12840.1	plas	320.441	8.53333%	[Arath]
At4g10180.1	nucl	321.121	6.44567%	[Arath]

chlo—叶绿体; nucl—细胞核; mito—线粒体

图9 江西铅山红芽芋抗病蛋白的亚细胞定位

2.8 江西铅山红芽芋抗病蛋白同源蛋白的序列比对信息

江西铅山红芽芋抗病蛋白同源蛋白的序列比对信息见图 11,其中※号区域是该蛋白家族的保守结构域。氨基酸同源性、保守区域及进化关系显示,芋抗病蛋白家族成员之间的氨基酸序列一致性较高,进一步证实:江西铅山红芽芋抗病蛋白在进化



图8 江西铅山红芽芋抗病蛋白的三级结构

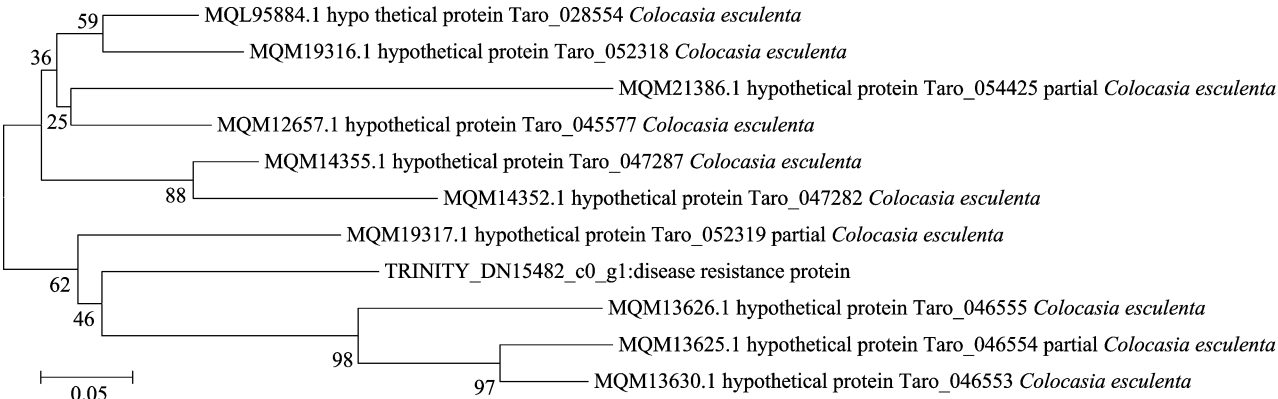


图10 江西铅山红芽芋抗病蛋白的系统进化分析

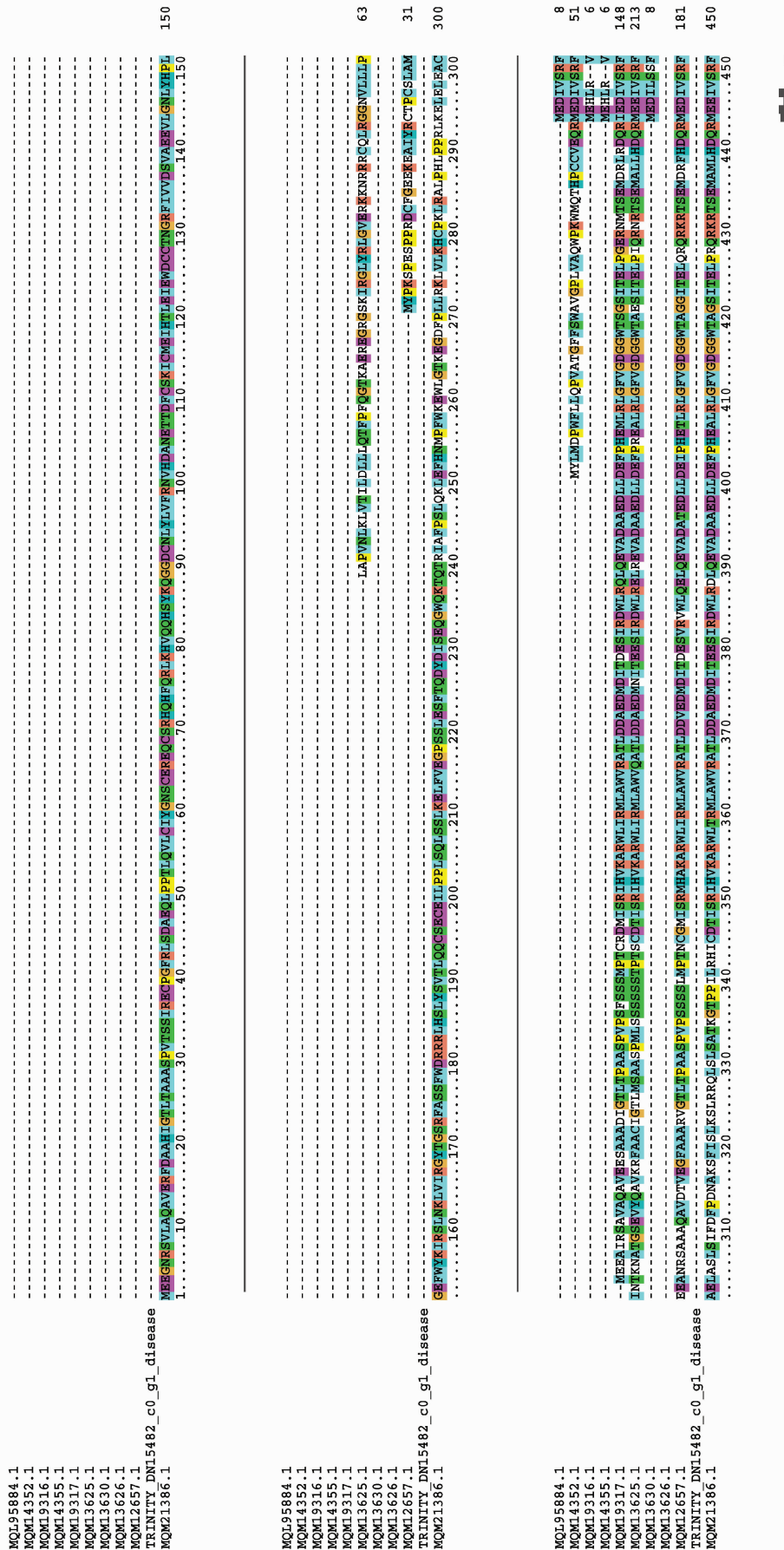
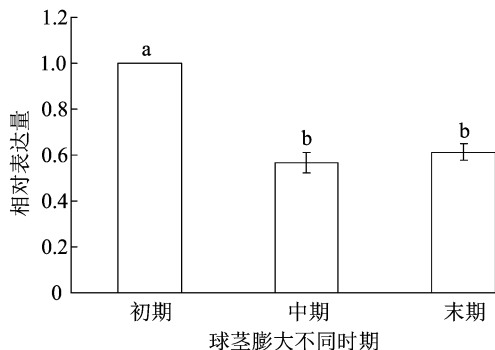


图11 江西铅山红芽芋抗病蛋白基因氨基酸序列的同源性比较



上与 *C. esculenta* 的亲缘关系较近,尤其是与 *C. esculenta* hypothetical peotein Taro\_046555 (MQM13626.1)、hypothetical peotein Taro\_046554 (MQM13625.1) 和 hypothetical peotein Taro\_046553 (MQM13630.1) 在进化上具有较高的亲缘关系。

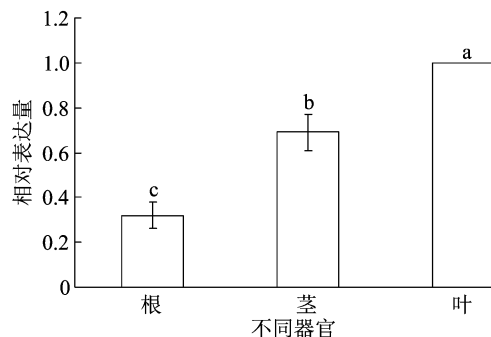
## 2.9 江西铅山红芽芋不同器官及球茎膨大不同时期



a. 江西铅山红芽芋球茎膨大不同时期抗病基因相对表达量

## 期抗病蛋白基因的表达分析

由图 12 可以看出,江西铅山红芽芋抗病蛋白基因在根、茎、叶中及在球茎膨大初期、中期、末期中均有表达,但在根、茎、叶中及球茎不同膨大期中的表达情况差异显著,其中江西铅山红芽芋抗病蛋白基因在叶、球茎膨大初期的表达量最高。



b. 江西铅山红芽芋不同器官抗病基因相对表达量

不同时期、不同器官间标有不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

图12 江西铅山红芽芋不同器官及球茎膨大不同时期抗病蛋白基因的相对表达量分析

## 3 结论与讨论

为了应对复杂多变的环境,植物在生长发育过程中构建了不同层级(初级、次级)的免疫反应。初级免疫反应是指宿主细胞膜可以识别病原微生物的相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMP), PAMP 触发的免疫反应(PAMP triggered immunity, PTI)被激活<sup>[12-14]</sup>。次级免疫反应是指微生物为了应对植物的初级免疫反应,注入一些毒性因子(即效应因子)到植物细胞内,抑制 PAMP 触发的免疫反应;为了避免感病,植物进化出抗病蛋白,抗病蛋白可特异性识别效应因子,效应因子触发的免疫反应(effectors triggered immunity, ETI)被激活<sup>[15-16]</sup>。ETI 比 PTI 更强烈和迅速,引起植物局部的程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),导致植物发生超敏反应(hypersensitive response, HR),有效遏制病原菌进一步扩散<sup>[17]</sup>。本试验利用同源克隆技术成功克隆了江西铅山红芽芋的抗病蛋白基因序列,江西铅山红芽芋抗病蛋白基因的 cDNA 总长度为 264 bp, G + C 含量为 46.59%;江西铅山红芽芋抗病蛋白由 88 个氨基酸组成,分子量为 10 116.53 u,等电点为 6.42,为亲水性蛋白;二级结构由  $\alpha$ -螺旋(23.68%)、 $\beta$ -片层(14.77%)、无规则卷曲(61.36%)构成;三级结构为单体;江西铅山红芽芋抗病蛋白主要存在叶绿体和细胞核中;江西铅山红芽芋抗病蛋白在进化上与

芋的亲缘关系较近,尤其是与芋的 hypothetical peotein Taro\_046555 (MQM13626.1)、hypothetical peotein Taro\_046554 (MQM13625.1) 和 hypothetical peotein Taro\_046553 (MQM13630.1) 在进化上具有较高的亲缘关系。实时定量 PCR 结果显示,抗病蛋白基因在江西铅山红芽芋中的表达存在器官特异性,在叶片、球茎膨大初期的表达量最高。由此可见,江西铅山红芽芋抗病蛋白基因的克隆和表达分析,可为解析江西铅山红芽芋的抗病机理奠定基础,同时为江西铅山红芽芋遗传改良提供候选基因。

## 参考文献:

- [1] 周庆红,刘星月,王葡萄,等. 脱毒红芽芋不同世代生长特性及产量分析[J]. 种子,2020,39(2):96-98.
- [2] 刘星月,朱强龙,李慧英,等. 红芽芋脱毒试管芋诱导及植株再生[J]. 园艺学报,2020,47(12):2427-2438.
- [3] 李云,牛丽亚,涂瑾,等. 亲水胶体对红芽芋全粉理化特性和消化特性的影响[J]. 中国粮油学报,2020,35(2):12-17.
- [4] 房卫平,谢德意,李志芳,等. NBS-LRR 类抗病蛋白介导的植物抗病应答分子机制[J]. 分子植物育种,2015,13(2):469-474.
- [5] 闫佳,刘雅琼,侯岁稳. 植物抗病蛋白研究进展[J]. 植物学报,2018,53(2):250-263.
- [6] Bemoux M, Ve T, Williams S, et al. Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation[J]. Cell Host Microbe, 2011,9(3):200-211.
- [7] Kawano Y, Akamatsu A, Hayashi K, et al. Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein pit plays a

刘晓雪,王 强,张彬彬,等. 基于酯酶和 ISSR 技术的平菇单核菌株遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(9):27-32.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.09.005

# 基于酯酶和 ISSR 技术的平菇单核菌株遗传多样性分析

刘晓雪,王 强,张彬彬,王春霞,郭金英,郑素月

(河北工程大学园林与生态工程学院,河北邯郸 056000)

**摘要:**应用酯酶同工酶和 ISSR 分子标记技术对 69 个野生平菇单核菌进行遗传多样性研究。结果表明,69 个单核菌株的酯酶同工酶酶谱共检出 6 条酶带,多态性带型占 83.3%;ISSR 分子标记技术从 7 个 ISSR 引物中扩增出 56 条清晰的 DNA 片段,多态性位点占 87.5%;2 种方法的聚类结果显示,当 GS 值为 0.67 左右时,根据样本量的多少均可将 69 个单核菌株依此划分为 A、B、C、D 等 4 个类群;将交配型、酯酶同工酶和 ISSR 分子标记 3 种分类结果进行对比后发现,交配型为 A2B2 的 P11、P12、P34、P59、P73、P85 和 P90 这 7 个单核菌株均同属于一类,分类结果并没有严格按照交配型来进行归类。说明酯酶同工酶和 ISSR 分子标记技术可用于平菇单核菌株的遗传多样性研究,并可作为交配型鉴定的辅助手段,为平菇杂交育种过程中优良亲本单核体的选择提供理论依据。

**关键词:**平菇;单核菌株;酯酶同工酶;ISSR 分子标记

**中图分类号:**S646.1+40.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)09-0027-06

平菇(*Pleurotus ostreatus*)是一种物美价廉、高蛋白低脂肪的健康食品,因其栽培技术简单、适应性强而成为担子菌中广泛栽培的品种之一<sup>[1-2]</sup>。研究表明,平菇是标准的四极性异宗结合菌,同一菌株

产生的担孢子有 4 种交配型即 AxBx、AyBy、AxBy、AyBx<sup>[3]</sup>,而目前食用菌的交配型鉴定通常采用单核体两两交配后镜检观察锁状联合的方式进行,该方法工作量大、耗时长,且易产生人为误检。因此,寻找一种更快速、准确地挑选出优良的单核菌株并鉴定出其交配型因子类型的方法尤为必要。

酯酶同工酶是从蛋白质水平上研究生物群体遗传差异的重要方法之一<sup>[4-5]</sup>,在食用菌种类遗传多样性分析方面应用广泛<sup>[6-10]</sup>。但同工酶谱的差异是由编码同工酶基因决定的,不能直接反映出菌种在 DNA 水平上的差别,另一方面,同工酶试验容

收稿日期:2021-08-27

基金项目:河北省重点研发计划现代种业科技专项(编号:19222903D);河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队建设专项(编号:HBCT2018050202)。

作者简介:刘晓雪(1994—),女,河北省邯郸人,硕士研究生,主要从事食用菌遗传育种研究。E-mail:1592256563@qq.com。

通信作者:郑素月,博士,教授,主要从事食用菌遗传育种等研究。E-mail:zhengsuyue@sina.com。

- critical role in rice innate immunity[J]. Cell Host & Microbe,2010,7(5):362-375.
- [8] Mestre P, Baulcombe D C. Elicitor-mediated oligomerization of the tobacco N disease resistance protein[J]. Plant Cell,2006,18(2):491-501.
- [9] Holt B F, Belkhadir Y, Dangl J L. Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system[J]. Science,2005,309(5736):929-932.
- [10] Despres C, Chubak C, Rochon A, et al. The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1[J]. The Plant Cell,2003,15(9):2181-2191.
- [11] 姜绍通,程元珍,郑 志,等. 红芽芋营养成分分析及评价[J]. 食品科学,2012,33(11):269-272.
- [12] Monaghan J, Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes

- at the plasma membrane[J]. Current Opinion in Plant Biology,2012,15(4):349-357.
- [13] Schwessinger B, Ronald P C. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures[J]. Annual Review of Plant Biology,2012,63(1):451-482.
- [14] Dangl J L, Horvath D A, Staskawicz B J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment[J]. Science,2013,341(6147):746-751.
- [15] Tsuda K, Katagiri F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity[J]. Current Opinion in Plant Biology,2010,13(4):459-465.
- [16] Howden A J M, Huttema E. Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity[J]. Frontiers in Plant Science,2012(3):160.
- [17] Jones J D G, Dangl J L. The plant immune system[J]. Nature,2006,444(7117):323-329.