

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^[1-2]。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^[3],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^[4-5],在食用菌种类遗传多样性分析方面应用广泛^[6-10]。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.

易受到培养方式、时间等因素影响^[11-12]。因此,在酯酶同工酶分析的基础上结合更加稳定的遗传标记方法去分析植株的遗传多样性是非常必要的。简单重复间序列(ISSR) 是 DNA 分子标记方法之一,呈孟德尔式遗传,能从基因水平揭示菌株间的亲缘关系和遗传差异,具有良好的稳定性和多态性^[13-14],其检测手段简单、高效,已经大量应用于不同品种和食用菌菌株间的遗传差异分析中^[15-19]。宋小亚等以黑木耳单核菌株为试验材料分析了 ISSR 标记在其育种过程中的应用价值^[20];努尔孜亚·亚力买买提等通过 ISSR 标记技术对 15 株野生平菇菌株的遗传多样性进行了分析,当遗传相似系数在 0.60 水平上时,将供试菌株分为了 5 个类群^[21];陈小敏等利用 ISSR 技术鉴别了从全国各地收集的 75 份香菇种质资源的遗传多样性^[22];叶

海丹研究了 ISSR 分子标记技术在桑黄、黑木耳遗传分析上的应用^[23]。本研究在 1 个野生平菇单核菌株交配型已确定的基础上(已另文发表),通过酯酶同工酶和 ISSR 分子标记技术对该平菇的 69 个孢子单核菌株进行遗传分析和分类鉴定,探讨单核菌株的遗传差异和交配型之间的关系,以期育种时亲本单核体的筛选提供重要的基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本试验于 2021 年 3 月 5 日至 6 月 20 日在河北工程大学食用菌研究室完成。试验所需野生平菇 4 种交配型孢子单核体(A₁B₁、A₂B₂、A₁B₂、A₂B₁),由河北工程大学食用菌研究室鉴定、保藏(表 1)。

表 1 平菇单核菌株交配型及菌株编号

交配型	单核菌株编号
T ₁ :A ₁ B ₁	P1、P2、P16、P18、P20、P40、P42、P46、P50、P51、P52、P54、P66、P70、P74、P79、P80、P82、P93、P94
T ₂ :A ₂ B ₂	P8、P11、P12、P13、P15、P19、P22、P23、P27、P28、P30、P32、P33、P34、P35、P38、P39、P43、P48、P55、P56、P57、P58、P59、P60、P72、P73、P76、P77、P78、P83、P84、P85、P86、P87、P89、P90
T ₃ :A ₁ B ₂	P9、P10、P14、P26、P31、P41、P53、P64、P75
T ₄ :A ₂ B ₁	P17、P21、P62

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝体培养 将供试平菇单核菌株活化后,转接至铺有玻璃纸的培养基上隔膜培养,菌丝长满平板后刮取菌丝备用。

1.2.2 酯酶同工酶分析 取 0.5 g 样品用液氮研磨之后加入 700 μL 磷酸缓冲液(pH 值=7.5),4℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液备用。试验采用聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳法^[24-25],电泳设备为 DYC2-24EN 型双垂直电泳仪(北京六一生物科技股份有限公司),试验具体步骤参照文献[26]。

1.2.3 ISSR 分子鉴定 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取单核菌株 DNA。采用 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 的质量和浓度。所用 ISSR 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,ISSR 扩增结合李辉平等的方法^[27-28]筛选出最佳程序及电泳条件,ISSR 电泳设备采用 DYY-6C 电泳仪(北京六一生物科技股份有限公司)。扩增体系(20 μL):2×Taq PCR Mix 10 μL,引物 1 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 8 μL。

1.3 数据处理

电泳结果均采用凝胶成像分析系统(北京君意

东方电泳设备有限公司)拍照记录并进行条带分析。采取 0/1 赋值记带,构建数据矩阵,用聚类分析软件 NTSYSpc Version 2.10e 计算菌株间的遗传相似系数,并根据结果采用 SAHN 程序,以不加权算数平均组对法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 酯酶同工酶结果

2.1.1 酯酶同工酶酶谱 部分孢子单核菌株酯酶同工酶电泳图见图 1。由图 1 可知,根据酯酶同工酶的电泳结果显示,69 个平菇孢子单核菌株共检测到 6 条酶带;各菌株酶带数目为 3~5 条;迁移率(R_f) 在 0.16~0.78 之间,多态性带型占 83.3% (表 2)。其中,E4、E5、E6 颜色最深,最为明显,并且 R_f 为 0.42 的 E4 酶带为 69 个单核菌株所共有,可认为是野生平菇单核体的特征谱带。

2.1.2 酯酶同工酶聚类分析 聚类分析树状图见图 2。由图 2 可知,69 个孢子单核菌株间的遗传相似系数(GS)变化范围为 0.38~1.00。当 GS 值约为 0.665 时,可将菌株分为 4 组。根据组内样本量依此分为 A、B、C、D 等 4 个类群,A 组为 P1、P2 等

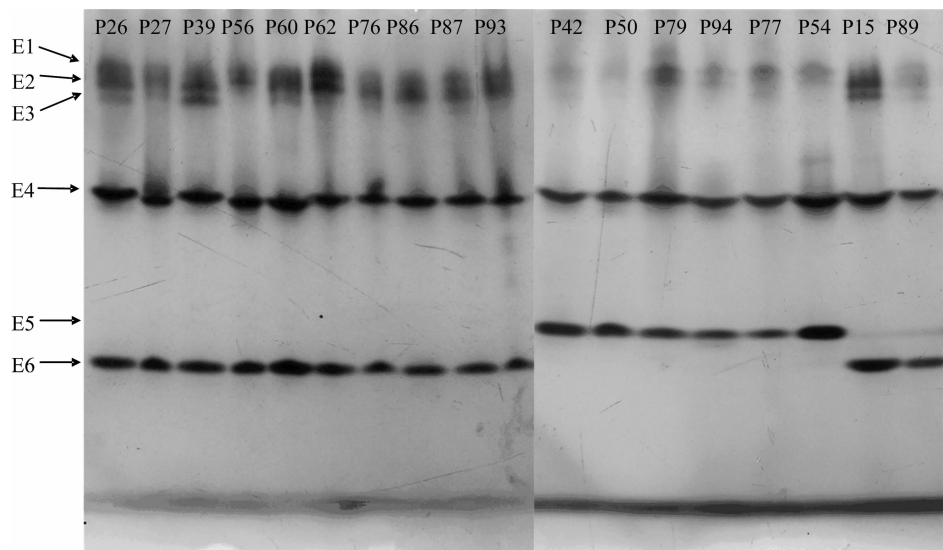


图1 部分单核菌株的酯酶同工酶谱

表 2 平菇单核菌株酯酶酶带分布频率

酶带	迁移率 (R_f)	分布频率 (%)
E1	0.16	38
E2	0.11	33
E3	0.24	23
E4	0.42	100
E5	0.73	53
E6	0.78	46

31 个菌株;B 组为 P14、P15 等 21 个菌株;C 组为 P17、P28 等 10 个菌株;D 组为 P9、P38 等 7 个菌株。

2.2 ISSR 引物筛选及聚类分析

2.2.1 DNA 质量检测 部分 DNA 电泳检测结果见图 3。由图 3 可知,在凝胶成像仪下呈现的 DNA 条带清晰,杂质较少,纯度高,可用于后续 PCR 扩增。

2.2.2 ISSR 扩增图谱 本试验从 28 个 ISSR 引物中筛选出 7 个对野生平菇孢子单核体扩增条带清

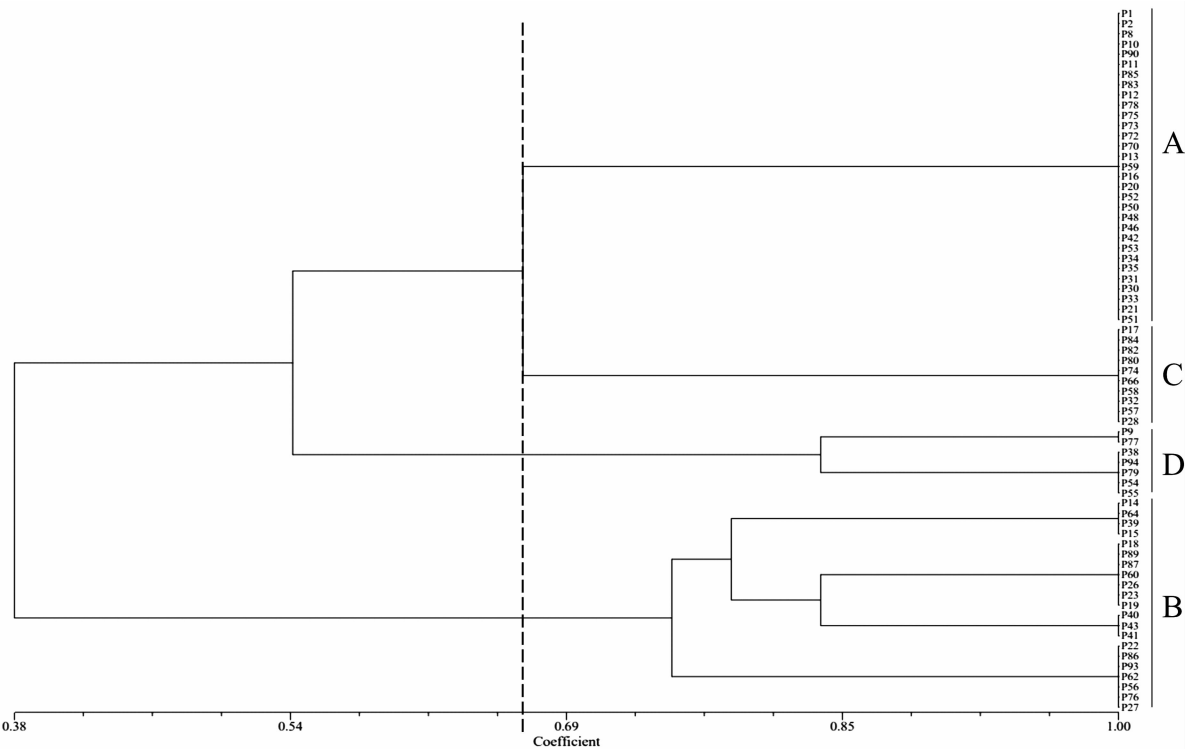


图2 根据酯酶同工酶谱构建的 UPGMA 树

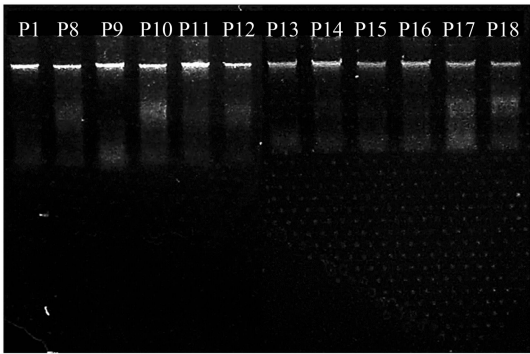
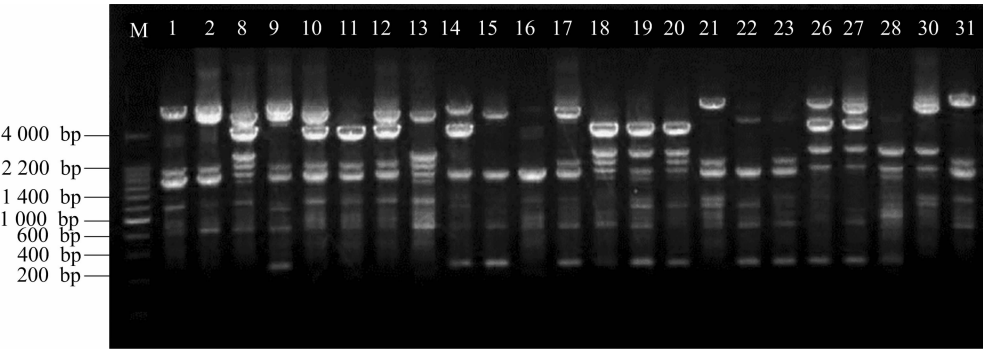


图3 部分单核菌株基因组 DNA 的电泳检测结果

晰、多态性丰富、重复性好的引物,分别是 P2、P5、P7、P11、P19、P24、P26,部分引物扩增图谱见图 4、图 5。由图 4、图 5 可知,7 个引物共扩增出 56 条条带,条带扩增最多的是引物 P2、P19 和 P26,均扩增出 10 条;最少的为引物 P5 和 P11,均扩增出 6 条。平均每个 ISSR 引物扩增出 8 条,其中多态性位点 49 个,占 87.5%。

此外,试验根据单核菌株的 4 种交配类型,每个类型随机抽取 1 个单核体进行 ISSR 扩增(图 6 - A、图 6 - B)中分别代表引物 P7、P24 对 4 种交配型的



M—200 bp DNA Ladder; 泳道 1~31 分别代表 P1~P31, 下同
图4 引物 P7 对部分单核菌株的 ISSR 扩增效果

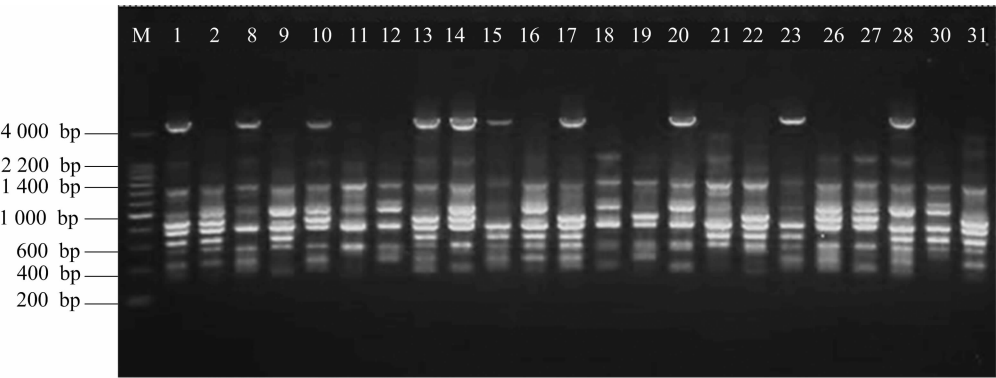
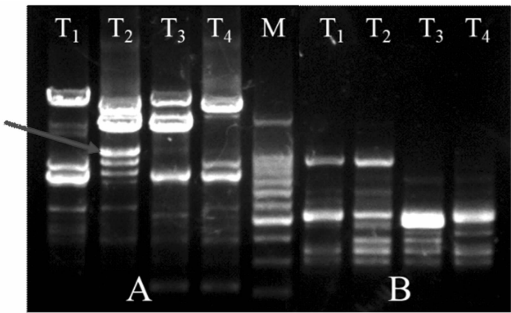


图5 引物 P19 对部分单核菌株的 ISSR 扩增效果

扩增图谱,可明显看出每个交配类型扩增出来的条带均不同,如图 6 - A 中 T₂ 扩增出的第 3 条 ISSR 条带是不同于 T₁、T₃ 和 T₄ 的特异性条带。因此,ISSR 分子标记技术可作为该孢子单核体交配型鉴定的有效工具。

2.2.3 ISSR 聚类分析 利用 ISSR 标记计算供试菌株之间的 GS 值矩阵,采用 UPGMA 法构建了野生平菇单核菌株的遗传关系聚类图(图 7)。由图 7 可知,69 个菌株间的 GS 值变化范围为 0.60 ~ 0.88。其中,单核 P8 和 P35、P59 和 P75 间的 GS 值最大,遗



M—200 bp DNA Ladder; 泳道 T₁~T₄ 分别代表 4 种交配型
图6 引物 P7、P24 对四种交配型的 ISSR 扩增效果

传相似程度最高,遗传距离最近,GS 值达到 0.88。

由图 7 可知,当 GS 值约为 0.648 时,将可将菌株分为 4 类。再依据样本量依此划分为 A、B、C、D

4 个类群,其中,A 组由 P10、P11 等 35 个菌株组成; B 组由 P1、P8 等 22 个菌株组成;C 组由 P9、P21 等 8 个菌株组成;D 组由 P2、P14 等 4 个菌株组成。

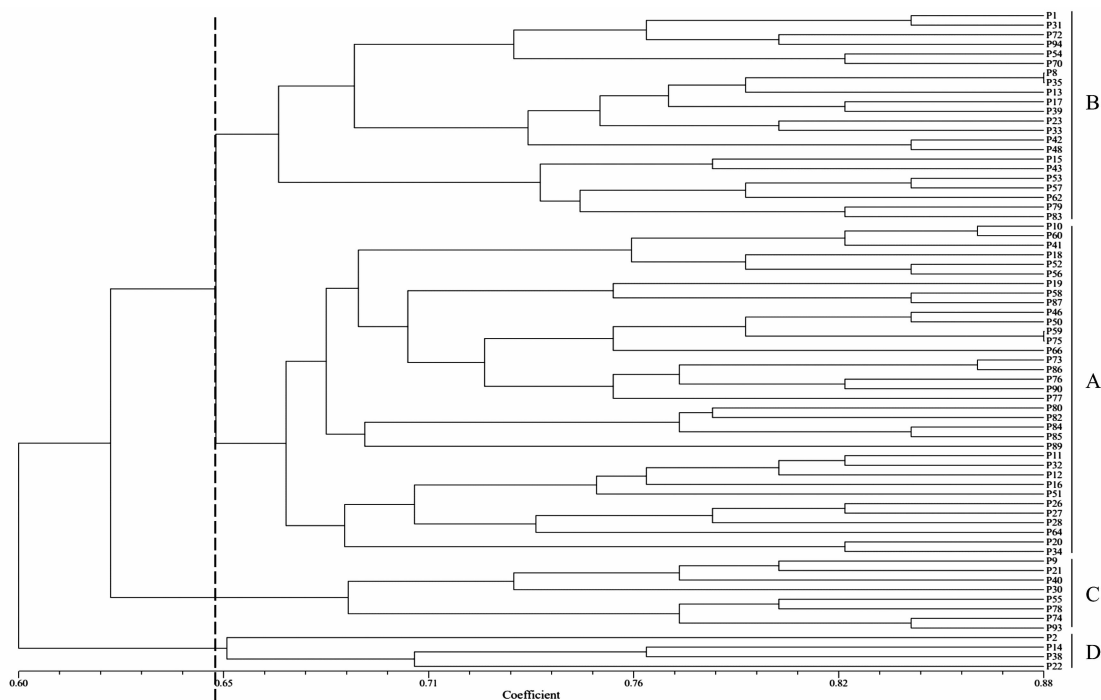


图7 根据 ISSR 构建的 UPGMA 树

3 结论与讨论

笔者所在课题组前期采集到 1 株野生平菇菌株,经过 ITS 鉴定和交配型分析后,将获得的 69 株可用孢子单核体的交配型进行了准确鉴定(已另文发表)。本试验在此基础上采用酯酶同工酶和 ISSR 分子标记技术对其进行进一步分析,探讨单核菌株的交配型和遗传差异之间的联系,以便更快捷、准确地挑选交配型相配的优良单核菌株用于育种工作。本试验单从聚类图的分类趋势看来,这 2 种聚类图大致呈一种趋势,研究表明,酯酶同工酶试验在 69 个单核菌株中检测出 6 条酶带,多态性带型占 83.3%,GS 值为 0.665 时将其归为 4 个类群,A 组为 P1、P2 等 31 个菌株,B 组为 P14、P15 等 21 个菌株,C 组为 P17、P28 等 10 个菌株,D 组为 P9、P38 等 7 个菌株;ISSR 分子标记技术用筛选出的 7 条引物对 69 个野生平菇单核菌株的 DNA 进行 ISSR 扩增,共扩增出 56 条条带,多态性位点占 87.5%,当 GS 值为 0.684 时分为 4 个类群,A 组由 P10、P11 等 35 个菌株组成;B 组由 P1、P8 等 22 个菌株组成;C 组由 P9、P21 等 8 个菌株组成;D 组由 P2、P14 等 4 个

菌株组成。所以本研究表明,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态性研究,并可作为交配型鉴定的辅助手段,为其优良菌株的筛选及交配型鉴定提供参考。

观察相同交配型间的单核菌株可发现,相同交配型间单核菌株遗传多态性较低。例如数量居多、占优势的交配型 A2B2 的 37 个单核菌株与酯酶聚类 A 组对比,有 P8、P11、P12 等 16 个菌株同属一类;与 ISSR 聚类 A 组对比,有 P11、P12、P19 等 20 个菌株同属一类。与酯酶同工酶和 ISSR 聚类结果同时对比后发现,有 P11、P12、P34、P59、P73、P85、P90 这 7 个交配型相同的单核菌株同属为一类^[20],这与谭琦等对香菇同种交配型孢子单核体的研究结果^[29]相符。宋小亚等以黑木耳单核体为材料,研究了 ISSR 分子标记技术在其遗传分析中的应用,试验中 F₁ 代的 33 个孢子单核菌株中有 24 个菌株与 T₁ 聚为一类,剩余 9 个与 T₂ 聚为一类。徐凯等更是采用了 SRAP、ISSR 和 RAPD 等 3 种方法对 37 个灵芝的单核体多态性进行了研究,结果表明,试验菌株 130-29、130-33 等 7 株交配型为 A₂B₂ 的单核体聚为一类,其余 29 个既有 A₁B₁ 也有 A₂B₂ 的单

核体聚为一类^[30]。

但以上结果均未严格按照交配型来进行归类,造成此现象原因极有可能与交配型的控制因子 A、B 有关。张美彦在对香菇 135 菌株的遗传规律研究中发现,特异 SCAR 标记与交配因子 A 和 B 均不存在连锁关系,标记是随机的,这是基因组内部减数分裂结果,并且交配型因子在其基因组中所占比例极小,所以即使其交配型因子相同,也不能代表其它核苷酸序列相同^[31]。因此,若要准确鉴定某种食用菌的交配型还需与其他方法联合使用。

参考文献:

- [1] El - Batal A I, Mosallam F M, Ghorab M M, et al. Factorial design - optimized and gamma irradiation - assisted fabrication of selenium nanoparticles by chitosan and *Pleurotus ostreatus* fermented fenugreek for a vigorous *in vitro* effect against carcinoma cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 1584 - 1599.
- [2] Kumar K. Nutraceutical potential and processing aspects of oyster mushrooms (*Pleurotus Species*) [J]. Current Nutrition & Food Science, 2020, 16(1): 3 - 14.
- [3] 程 莉. 平菇交配型因子组合的准确鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 8.
- [4] 傅安涛, 宋爱荣, 田雪梅, 等. 同工酶技术及其在我国食用菌研究中的应用[J]. 菌物研究, 2006, 4(4): 57 - 61.
- [5] 孔祥会, 姚方杰, 王 鹏. 食用菌种质资源评价方法及在品种选育上的应用实践[J]. 中国食用菌, 2019, 38(12): 8 - 10.
- [6] 隋玉龙, 宋 慧, 杜 金, 等. 灵芝栽培菌株酯酶同工酶的酶谱多样性[J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 136 - 140.
- [7] 张欣悦, 王鸿磊, 丁 强, 等. 国外引进双孢菇菌种与国内栽培菌种的 RAPD 和酯酶同工酶指纹图谱分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 254 - 256.
- [8] 高 锋, 何明霞, 刘 静, 等. 基于酯酶同工酶的暗褐网柄牛肝菌遗传多样性分析[J]. 中国食用菌, 2021, 40(2): 47 - 53, 61.
- [9] 钱雪婷, 陈文强, 彭 浩, 等. 秦巴山区黑木耳菌株酯酶同工酶的分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 269 - 272.
- [10] Wang H C, Wang Z S. The prediction of strain characteristics of *Agaricus bisporus* by the application of isozyme electrophoresis[J]. Mushroom Science, 1989, 12(1): 87 - 100.
- [11] 梁建光, 杨立红, 王晓洁, 等. 不同条件对食用菌酯酶同工酶谱多态性的影响[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, 27(4): 500 - 504.
- [12] 李守勉, 李 明, 田景花. 不同培养时间对杏鲍菇酯酶同工酶酶

- 谱的影响[J]. 北方园艺, 2014(14): 98 - 100
- [13] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related *Citrus cultivars* with inter - simple sequence repeat markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95(3): 408 - 417.
 - [14] 史灵燕, 刘保卫, 顾新颖, 等. 生化和 ISSR 分子标记在黑木耳品种鉴定中的应用[J]. 北方园艺, 2019(9): 136 - 141.
 - [15] Sudupak M A. Inter and intra - species Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) variations in the genus *Cicer*[J]. Euphytica, 2004, 135(2): 229 - 238.
 - [16] 孟 虎, 孙国琴, 睢 犇, 等. ISSR 技术在食用菌研究上的应用[J]. 北方园艺, 2016(5): 207 - 210.
 - [17] 刘志曦, 李志强, 魏海莲, 等. 平菇 ISSR 遗传多样性分析[J]. 北方园艺, 2014(12): 94 - 99.
 - [18] Nazrul M I, Bian Y B. ISSR as new markers for identification of homokaryotic protoclones of *Agaricus bisporus*[J]. Current Microbiology, 2010, 60(2): 92 - 98.
 - [19] 张金霞, 黄晨阳, 管桂萍, 等. 白黄侧耳 *Pleurotus cornucopiae* 卫星间区 (ISSR) 分析[J]. 菌物学报, 2007, 26(1): 115 - 121.
 - [20] 宋小亚, 肖 扬, 边银丙. ISSR 标记在黑木耳单核体遗传分析中的应用[J]. 菌物学报, 2007, 26(4): 528 - 533.
 - [21] 努尔孜亚·亚力买买提, 贾文捷, 郝敬喆, 等. 野生平菇菌株的培养特征及遗传多样性分析[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(1): 143 - 150.
 - [22] 陈小敏, 吴海冰, 辜运富. 香菇种质资源遗传多样性研究[J]. 四川农业科技, 2019(12): 40 - 44.
 - [23] 叶海丹. ISSR 分子标记技术在桑黄、黑木耳遗传分析上的应用研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017: 55.
 - [24] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 84 - 88.
 - [25] 郭尧君. 蛋白质电泳试验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 3.
 - [26] 史灵燕. 不同黑木耳品种种质鉴定及优良菌株筛选研究[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2019: 21 - 23.
 - [27] 李辉平. ISSR 在食用菌遗传多样性研究中的应用[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007: 26 - 27.
 - [28] 郑 伟. 平菇优良菌株的选育及评价[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2017: 14 - 16.
 - [29] 谭 琦, 杨建明, 陈明杰, 等. 香菇孢子单核体与原生质体单核体遗传差异分析[J]. 中国食用菌, 2001, 20(6): 3 - 5, 25.
 - [30] 徐 凯, 唐传红, 王天娇, 等. 基于 SRAP、ISSR 和 RAPD 分析灵芝 G0130 菌株单核体多态性[J]. 工业微生物, 2014, 44(4): 39 - 45.
 - [31] 张美彦. 香菇 135 菌株特异 SCAR 标记的遗传规律[D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 5 - 6, 40.