

七个不同鸡腿菇菌株的酯酶同工酶和 ISSR 分析

郑素月, 李云梦, 邢志伟, 郑伟

(河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056038)

摘要:以生产上栽培的 7 个鸡腿菇为试材,采用酯酶同工酶和 ISSR 方法,对 7 个鸡腿菇的遗传多样性进行了研究。结果表明:7 个鸡腿菇酯酶同工酶表现出 2 种不同酶谱类型;ISSR 分析在遗传相似系数为 0.75 处将 7 个鸡腿菇菌株划分为两大类,与酯酶同工酶结果一致。

关键词:鸡腿菇;酯酶同工酶;ISSR

中图分类号:S 646.1⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0085-03

鸡腿菇(*Coprinus comatus*)又名毛头鬼伞,因形如鸡腿而得名,是近年来人工开发的具有商业潜力的珍稀食用菌新品,具有极高的营养和保健价值,深受消费者欢迎。随着栽培规模的增加,生产上品种混杂,老化退化现象严重。因此,有必要对栽培菌株进行鉴别,研究其遗传多样性,为鸡腿菇生产提供优良菌株。目前许多生化及分子生物学方法在食用菌种质鉴别及遗传多样性研究中得到了广泛应用。其中酯酶同工酶^[1-4]及 ISSR^[5-10](inter simple sequence repeat)分子标记技术以其稳定性好、操作简单等特点在食用菌遗传多样性研究中应用较多。该试验利用酯酶同工酶和 ISSR 技术对鸡腿菇菌株进行分析,研究其遗传多样性,以期为鸡腿菇选育育种亲本选配提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 7 个菌株见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 酯酶同工酶分析 将菌种活化后接种于 PDA 固体平板培养基中,隔膜培养,取菌丝体,称重后液氮研磨。每克湿菌丝加入 2 mL pH 7.5 的磷酸缓冲液,于 12 000 r/min、4℃离心 5 min,取上清液备用。电泳条件及染色方法参照文献^[11]。

第一作者简介:郑素月(1969-),女,河北石家庄人,博士,教授,研究方向为食用菌新品种选育及菌种生产。E-mail:zhengsuyue@sina.com。

基金项目:河北省现代农业产业技术体系食用菌产业创新团队建设专项资金资助项目;河北省支撑计划资助项目(15226404D)。

收稿日期:2015-05-20

表 1 供试菌株

序号 No.	菌株编号 Strain No.	菌株名称 Strain name	来源 Origin
1	Cc1	“92”	中国农业科学院
2	Cc2	“96”	中国农业科学院
3	Cc3	“CC77”	河北省农业科学院
4	Cc4	“特白 33”	河北省农业科学院
5	Cc5	“宫丰 1 号”	河北省农业科学院
6	Cc6	“白鸡腿 3 号”	河北省农业科学院
7	Cc7	“农大白鸡腿”	北京吉草园

1.2.2 DNA 提取 PDA 培养基平板铺玻璃纸隔膜培养菌丝,液氮研磨后用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,紫外分光光度计上测定其 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀,去离子水稀释到 20 ng/μL 左右,-20℃保存备用。

1.2.3 引物筛选 所用引物及扩增程序参考李辉平^[12]方法,均由上海生物工程公司合成,引物序列见表 2。

表 2 ISSR 引物序列

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
P1	TGCACACACACAC	P10	ACACACACACACACC
P2	GAGAGAGAGAGAGAAC	P11	GGAGTGGTGGTGGT
P3	GGATGCAACACACACAC	P12	ACACACACACACACCT
P4	AGAGAGAGAGAGAGGGC	P13	AGAGAGAGAGAGAGAGG
P5	CGTGTGTGTGTGTGT	P14	CTCTCTCTCTCTCTA
P6	ACACACACACACACCG	P15	GAGAGAGAGAGAGAGAC
P7	AGTGTGTGTGTGTGT	P16	CACACACACACACAT
P8	ACACACACACACACAC	P17	CACGAGAGAGAGAGAGA
P9	CCAGTGGTGGTGGT		

1.2.4 PCR 反应体系 25 μL 反应体系:DNA 模板 2 μL(约 50 ng),10×Taq PCR buffer 2.5 μL,dNTPs(各

0.25 mmol/L)0.8 μ L,引物(10 μ mol/L)1 μ L,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.2 μ L,双蒸水 18.5 μ L。

1.2.5 扩增程序 94℃预变性 4 min,94℃变性 30 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 2 min,共 35 个循环,72℃延伸 10 min;4℃终止反应。

1.2.6 琼脂糖凝胶电泳 1.4%的琼脂糖凝胶;缓冲液 1×TAE;电压 100 V,电泳 70 min。

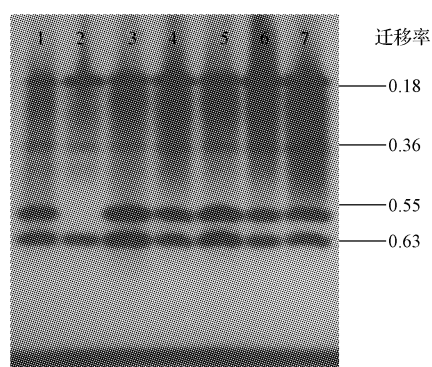
1.3 数据分析

以凝胶 DNA 片段的有无分别记为 1 或 0,用统计软件 NTSYS pc 2.10e 计算菌株间的遗传相似性系数,进行遗传相似性分析。

2 结果与分析

2.1 酯酶同工酶结果

由图 1 可知,7 个菌株共表现出了 2 种不同酶谱类型,4 条不同迁移率酶带,分别为 0.18、0.36、0.55、0.63。



注:1~7 为表 1 中 7 个不同鸡腿菇菌株,下同。

Note:1-7 represent 7 different *C. comatus* strains of Table 1,the same below.

图 1 7 个菌株的酯酶同工酶酶谱

Fig.1 The esterase isozyme zymograms of 7 strains

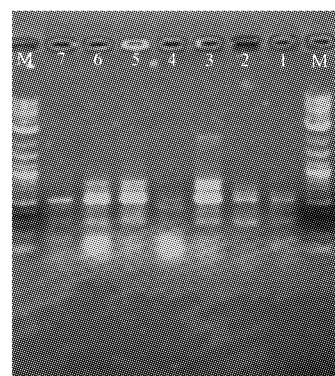
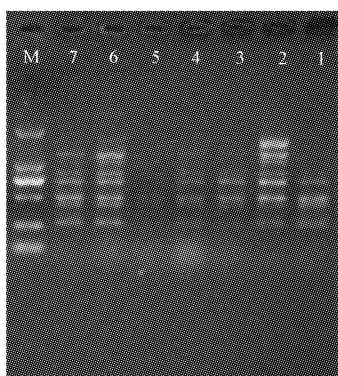
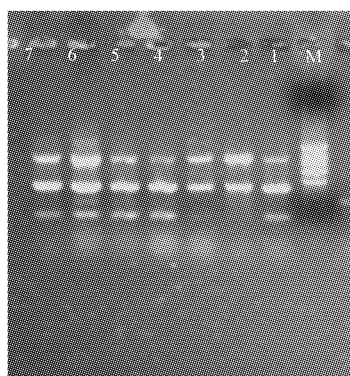


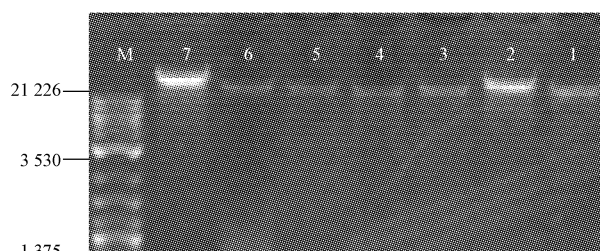
图 3 引物 P3、P4、P13 对供试菌株的 ISSR 扩增图谱

Fig.3 ISSR profiles from P3,P4 and P13 for 7 strains of *C. comatus*

其中 Cc1、Cc3、Cc4、Cc5、Cc6、Cc7 酶谱相同与 Cc2 有差异。

2.2 ISSR 分析结果

2.2.1 DNA 提取结果 由图 2 为 7 个菌株基因组 DNA 提取结果,紫外分光光度计上测定其 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀。计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.8~2.0,可用于 PCR 扩增。



注:M, λ DNA/*Eco*R I+*Hind* III。下同。

Note:M, λ DNA/*Eco*R I+*Hind* III. The same below.

图 2 7 个菌株基因组 DNA 电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis profiles of genome DNA of 7 strains

2.2.2 引物的筛选 该试验从供试的 17 条 ISSR 引物中筛选出 11 条引物扩增效果较好,可扩增出所有供试菌株的 DNA 条带,且条带清晰、稳定、分布合理、重复性好,而在对照中没有扩增出 DNA 条带。这些引物分别为 P1、P2、P3、P4、P5、P11、P12、P13、P15、P16、P17,引物序列见表 2。

2.2.3 ISSR 扩增图谱分析 用筛选出的 11 个引物对 7 个鸡腿菇菌株进行 ISSR 扩增,共扩增出 37 个多态性位点,部分图谱见图 3。由图 4 可知,遗传相似水平在 0.75 左右,7 个菌株分为两大类,第 1 类包括编号“96”菌株;第 2 类包括其余 6 个菌株。

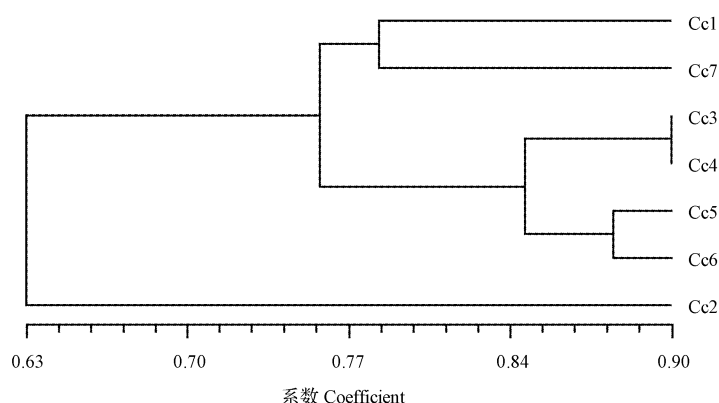


图4 鸡腿菇7个菌株的聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram of 7 *C. comatus* strains

3 结论与讨论

同工酶作为基因编码的产物,是从蛋白质分子水平上研究生物遗传多样性的重要手段之一,尤其是酯酶同工酶稳定性好,多态性高,被广泛应用于各种食用菌的鉴别和遗传多样性研究。ISSR 分子标记技术是一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记,其技术原理是在 SSR 序列的 3' 端或 5' 端加锚 1~4 个随机的碱基为引物,对两侧具有反向排列的简单序列间的基因片段进行扩增,操作简单、快速、通用性好、稳定性高,因此近年来代替 RAPD 标记在食用菌种质资源研究中应用广泛。该试验通过酯酶同工酶和 ISSR 分子标记技术对生产上 7 个鸡腿菇菌株进行了种质鉴定和遗传多样性研究。研究结果表明,2 种方法结果存在高度一致性,均将 7 个鸡腿菇菌株分为了两大类群,其中“特白 33”、“CC77”、“宫丰 1 号”、“白鸡腿 3 号”、“农大白鸡腿”5 个菌株与“92”菌株亲缘关系较近,说明鸡腿菇生产上菌株遗传距离较近。若通过杂交选育鸡腿菇优良菌株,尚需进一步开发野生鸡腿菇种质资源,为生产上优良菌株选育提供亲本材料。

参考文献

- [1] 何燕,曾晓丽,汪思迪,等. 黑木耳菌株酯酶同工酶酶谱多样性研究[J]. 生物技术,2009,19(6):8-10.
- [2] 王波,彭卫红,甘炳成. 金针菇 33 个菌株遗传多样性与组织分离菌株鉴定的酯酶同工酶分析[J]. 西南农业学报,2008(2):448-450.
- [3] 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.
- [4] 韦仕岩,王灿琴,覃晓娟,等. 金福菇菌株的酯酶同工酶分析[J]. 基因组学与应用生物学,2014,33(5):1025-1030.
- [5] 张金霞,黄晨阳,管桂萍,等. 白黄侧耳 *Pleurotus cornucopiae* 微卫星间区 (ISSR) 分析[J]. 菌物学报,2007,26(1):115-121.
- [6] 马志刚,吕作舟,郑和斌,等. ISSR 标记在侧耳属菌株分类学中的初步应用[J]. 华中农业大学学报,2006,25(1):55-59.
- [7] 李辉平,黄晨阳,陈强,等. 黑木耳栽培菌株的 ISSR 分析[J]. 园艺学报,2007,34(4):935-940.
- [8] 戴肖东,马银鹏,张介驰,等. 黑龙江省木耳主栽品种遗传多样性分析[J]. 生物技术,2014,24(5):86-89.
- [9] 李莹,李莉,刘艳玲,等. 杏鲍菇菌株遗传多态性的 ISSR 分析[J]. 微生物学杂志,2014,34(2):24-28.
- [10] 秦莲花,宋春艳,谭琦,等. 用 ITS 和 ISSR 分子标记技术鉴别香菇生产用种[J]. 菌物学报,2006,25(1):94-100.
- [11] 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,1985:52-58.
- [12] 李辉平. 应用 ISSR 标记对食用菌的遗传多样性分析[D]. 北京:中国农业科学院,2007.

Analysis of Esterase Isozyme and ISSR of Seven Different *Coprinus comatus*

ZHENG Suyue, LI Yunmeng, XING Zhiwei, ZHENG Wei

(College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038)

Abstract: The genetic diversity of 7 *Coprinus comatus* strains was analyzed by esterase isozyme and ISSR technique. The results showed that all of the 7 strains of *Coprinus comatus* could be divided into 2 distinct groups at the the genetic similarity coefficient of 0.75 by ISSR, and this was consistent with the results of esterase isozyme.

Keywords: *Coprinus comatus*; esterase isozyme; ISSR