

ISSR 技术在食用菌研究上的应用

孟 虎^{1,2}, 孙国琴², 睢 韡³, 石爱霞³

(1. 内蒙古大学 物理学院, 内蒙古 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010030;

3. 包头市园林科技研究所, 内蒙古 包头 014010)

摘 要:ISSR 分子标记是一种基于 SSR 基础上发展起来的新技术, 具有很好的稳定性和多态性, 且有操作简便、安全, 成本低等特点。该研究回顾了 ISSR 分子标记在食用菌的遗传多样性、杂交育种、品种鉴定等方面的研究进展, 指出其对菌种改良、保护菌种资源、规范食用菌市场管理等有重要的作用。在未来的工作中, 不断改进现有的 ISSR 技术, 并与其它分子标记技术结合应用, 是发展食用菌分子水平研究的需要。

关键词:分子标记技术; 遗传多样性; 杂交育种; 品种鉴定

中图分类号:S 646.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)05-0207-04

我国拥有丰富的食用菌资源, 是世界上栽培食用菌种类最多的国家, 但长期以来菌种生产分散, 引种频繁, 加之食用菌无性繁殖和外观形态分化较少, 导致冠名随意, 出现了大量同名异物、同物异名的现象, 严重影响了我国食用菌资源的有效管理及开发利用^[1]。DNA 分子标记(DNA molecular marker)是 DNA 水平上遗传多样性的常规分析手段之一, 它较形态学和生理生化指标更为客观准确, 已广泛应用于生物 DNA 相关多种领域的研究。简单重复间序列(inter simple sequence repeat, ISSR)是 DNA 分子标记方式之一, 大量应用于食用菌分子水平方面的分析与研究, 拥有广阔的应用前景^[2], 该研究将简要介绍目前 ISSR 技术在食用菌遗传多样性、杂交育种、品种鉴定等方面的研究情况。

1 ISSR 技术简介

ISSR 也称微卫星间隔, 是 ZIETKIEWICZ 等^[3]科学家在 SSR 技术基础上发展起来的一种新型的 DNA 分子标记技术, 利用 SSR 引物来扩增在植物基因组中常出现的重复序列之间的区域, 实际上就是在 SSR 的 3' 或 5' 端锚定 1~4 个碱基, 作为引物, 对两侧具有反向排列 SSR 间的一段 DNA 进行 PCR 扩增, 然后进行电泳、染色, 根据谱带的有无及相对位置, 来分析不同样品间 ISSR 标记

的多态性^[4-5]。

ISSR 呈孟德尔式遗传, 具有很好的稳定性和多态性^[6], 它综合了其它分子标记技术的优势, 且 SSR 广泛分布在基因组中, 等位变异特别丰富, 所以 ISSR 具有很高的多态性^[7]。与 RAPD 相比, ISSR 的引物设计简单, 引物的碱基长度更长(16~25 bp), 拥有更高的退火温度(45~60℃), 因此, 标记结果更可靠, 重复性高; 与 RFLP、AFLP 相比, ISSR 操作更简单、更安全, 所需 DNA 模板的量少, 成本更低^[8]; 与 SSR 相比, ISSR 不需要预先获知序列信息, 程序更加简化^[9]。不足之处在于, ISSR 大部分为显性标记, 不能区分纯合体和杂合体^[10]。

2 ISSR 技术在食用菌研究上的应用

2.1 遗传多样性与 ISSR 分析

遗传多样性是生命系统的基本特性, 是物种适应自然和发生进化的遗传基础, 是生物多样性的的重要组成部分^[11]。从理论上讲, 表型变异的不同个体只有通过遗传分析认证, 才能确认其物种间的遗传多样性^[12]。ISSR 检测手段简单、高效, 在揭示食用菌遗传多态性方面, 已被证明是一种快速、可靠的工具, 大量应用在不同品种食用菌菌株间的遗传差异分析中^[13]。

食用菌在栽培过程中, 常常会受到温度、湿度、光照等因素的影响, 外观形态差异较大, 传统的子实体形态、菌丝生长特征、生理生化反应特征等条件易受环境因素影响, 周期长, 不易辨别, 已然无法作为严格的鉴别依据; 依赖 ISSR 等 DNA 分子技术直接从 DNA 水平检测菌株基因组的遗传多态性, 可以对菌株间的遗传差异进行快速、简易的鉴定, 重复性好。刘文从等^[14]对滇西北地区 56 个羊肚菌样品进行了遗传多样性研究, 亲缘关

第一作者简介:孟虎(1986-), 男, 博士研究生, 研究方向为生物信息。E-mail:381521602@qq.com.

责任作者:孙国琴(1964-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向为食用菌生产与推广。E-mail:sgq9648@126.com.

基金项目:农牧业科技合作与交流资助项目(20131202); 内蒙古农牧业创新基金资助项目(2011CXJJM01-5)。

收稿日期:2015-10-21

系分析结果将居群分为两大类,且与地理距离有明显的相关性。宫志远等^[15]利用 16 个引物对 35 个山东主栽的平菇菌株的 DNA 进行 ISSR-PCR,共扩增出 259 条清晰的 DNA 片段,大小在 0.3~4.2 kb,聚类分析结果在遗传系数 0.66 处,分为黑色、灰黑色和白色子实体 3 个组群。冯伟林等^[16]将 12 个杏鲍菇菌株基因组 DNA 进行 ISSR 分析,结果表明这些杏鲍菇菌株遗传相似系数为 0.68~1.00,采用平均分类法 UPGMA 分析表明,在遗传相似系数为 0.83 处可将这 12 个杏鲍菇菌株分成 3 类。肖自添等^[17]通过聚类结果分析,将供试的 24 株灵芝菌株在遗传系数 0.71 处分为四大类,这四大类在栽培外形上也有明显区别,并发现供试菌株 H3 与 H4、“红芝”与“甜芝”遗传相似系数在 0.95 以上,可能是同株异名。此外,还有学者对金针菇^[18-19]、银耳^[20]、黑木耳^[21]、双孢菇^[22]、白灵菇^[19]、灰树花^[19]、滑菇^[19]、鸡腿菇^[19]等方面进行了 ISSR 遗传多样性研究,这不仅为食用菌遗传信息库的建立及遗传育种工作的开展提供理论依据,也为避免重复引种提供有益参考。

2.2 杂交育种与 ISSR 聚类分析

我国近年来食用菌生产发展迅猛,特别是香菇、平菇等大众化菌种栽培区域的不断扩大,对优良品种的需求量亦不断增大,新品种的选育在我国食用菌栽培产业可持续健康发展过程中占有举足轻重的作用。

选育优良的菌种需要数年时间。目前,杂交育种是世界各国食用菌新品种选育中应用最普遍的手段,而杂合子的鉴定是杂交育种中的关键步骤^[23],鉴定杂交是否成功就是看 2 个亲本的 DNA 是否组合到后代的细胞中,从 ISSR 标记分析看就是杂交菌株应同时拥有 2 个亲本单孢菌株的特异性条带,且对应于同一水平线上,如陈世通等^[24]以香菇栽培品种“大山 18”和云南野生菌株“11-1”作为亲本,采用单孢杂交技术初步获得 84 个杂交菌株,用筛选的 ISSR 引物对这些杂交菌株及其亲本进行鉴定,得到 45 个含有这 2 个亲本特异条带的菌株,推断这 45 个菌株就是真正的杂合子,与拮抗试验的结果完全一致。另外,王卓仁等^[25]对香菇栽培菌株的 21 个亲本菌株及其杂合子后代进行 DNA 多态性聚类分析,结果发现单孢杂交后代具有十分显著的遗传分化现象,同一类群的杂交子在子实体形态、生物学性状、菌丝生长等方面表现相似,表明 ISSR 标记来筛选与鉴定杂合子是可行的,准确的。刘晓红^[27]比较了由 3 个优良的杏鲍菇菌株两两配对产生的系列杂交后代与亲本之间的亲缘关系,ISSR 分析聚类结果显示,这 3 种杏鲍菇的杂交后代表现出了很强的杂交变异性,在平均遗传距离 0.73 处可分为 7 类具有不同杂交 DNA 基因型的种群子代,有的甚至变异形成了单独的种群,具有形成新的优良品种的潜力,表明可以通过 ISSR 标记在分子水平上

了解食用菌杂交后代进化的历程和与亲本之间的亲缘关系,为食用菌的品种鉴定和杂交育种提供确凿的依据^[8]。而且,对杂交菌株的 ISSR 分析,还可为筛选优良杂交菌株提供高价值参考,减少初筛栽培试验的工作量^[26]。

菌种是开展食用菌科学研究和生产的基础材料,而某些品种的食用菌或由于其次级同宗配合的遗传方式比较保守,或由于其匮乏的野生种质资源,且商品化菌种资源极少,育种过程非常艰难^[28]。因此,引进国外抗逆性强、亲缘关系远、品质好的优良菌种,对丰富我国种质资源,拓宽遗传基础,改善菌种质量具有重要的作用。王鸿磊等^[22]通过 ISSR 聚类关系分析发现,我国 2 个双孢菇主栽品种之间遗传相似系数为 0.96,说明目前双孢菇菌种来源单一,遗传多样性很低;与国外引进的 8 个菌种的亲缘关系较远,相似性只有 0.61,为菌种的培育和改良带来契机。

2.3 品种鉴定与 DNA 指纹图谱

优良品种是食用菌生产的基础,品种混杂和纯度降低会明显降低其品质,DNA 指纹图谱(DNF finger printing)就是鉴别品种、品系的有力工具,ISSR 技术在种质资源鉴定方面显示出比其它方法更高的优越性^[29]。DNA 指纹,是指在同一物种不同品种(品系)间存在的大量的多态性 DNA 片段组合,这些组合能使不同品种(品系)有效区别开来^[11-12],其个体识别能力足以与手指指纹相媲美。ISSR 分子标记直接比对不同品种(品系)菌株的特异性 DNA 片段,分析菌株的遗传本质,克服了传统鉴定方法的弊端,快速获得分析结果。王立枫等^[30]将黑龙江省各地区的 24 个野生黑木耳菌株分为 4 个组群,区域分布明显,与东北主栽品种“黑 29”的基因相似度为 0.55 左右,证明野生菌种与栽培菌种之间的差异明显。秦莲花等^[31]应用 ITS 与 ISSR 相结合,成功地对亲缘关系较近的“豹皮香菇”(*Lentinus lepideus*)和“虎皮香菇”(*Lentinus tigrinus*)完成了种间水平对比,认为 ITS 与 ISSR 技术结合是快速、准确鉴别香菇菌株的有效方法,这一点也在刘华晶等^[32]对野生黑木耳的遗传多样性分析上得到了验证。

鉴于 ISSR 标记具有重复性好的特点,用其转化的 SCAR 标记也更加可靠,可以作为相应栽培菌株的特征性 DNA 指纹,用于对栽培菌株的快速准确鉴定,已在黑木耳^[21]、香菇^[33-35]、灵芝^[36]等方面得到应用,其中黑木耳 34 个主栽品种的标准化 DNA 指纹图谱已初建完成,为我国食用菌种质资源的保护和利用提供技术支撑。

3 不同分子标记技术在食用菌遗传学研究中的评价

ISSR 分子标记是一项较先进的分子技术,与之相关的 RFLP、RAPD、AFLP、SCAR 等技术也发挥着越来越

重要的作用。不同的技术源于不同的检测的基因组区域,即不同的引物扩增的 DNA 基因组片段,所以若某一位点发生变异或进化得过于保守,可能不是所有的分子标记技术都能检测到差异,直接影响试验结果的评价^[33];将获得的不同的分子标记数据整合,构建样本亲缘关系树,利用不同标记技术的优势互补,得到更为准确、可靠的遗传学分析结果^[40]。

稳定性是各类分子标记的关键问题,越来越多的学者也应用多种不同的分子标记技术对不同品种的食用菌进行 DNA 水平的研究,以对这些技术进行全面、客观的评价。应正河^[33]应用 RAPD、SRAP、ISSR 分别对 8 株香菇菌株进行 PCR 扩增,发现 ISSR-PCR 的稳定性和重复性均高于 SRAP-PCR 和 RAPD-PCR,且不同批次下提取的 DNA 模板 PCR 产物、同一批次下提取的 DNA 模板不同时期扩增的 PCR 产物、同一批次下提取的 DNA 模板不同 Mg^{2+} 浓度等都会成为影响结果的因素;基因组 DNA 提取时间上的差异会对 RAPD-PCR 的条带数量有一定影响,PCR 体系中 Mg^{2+} 的浓度会导致 SRAP-PCR 的副带在明亮程度上不一致。王子迎^[37]对安徽香菇的遗传多样性的分析中也认为,ISSR-PCR 的稳定性要优于 RAPD-PCR。张瑞颖^[38]同样在对不同香菇菌株遗传多样性分析中发现,ISSR 技术的分辨力、稳定性和重复性均优于 RAPD,略劣于 IGS1、IGS2 和 SR1。

每种分子标记技术都有其优缺点,应针对不同目的、不同对象而有所选择,随着杂交育种技术的不断改良,新品种不断出现,某个单独的标记技术已不易于准确鉴别所有菌株,几种技术的组合应用可以明显提高菌株的鉴别能力^[33]。张瑞颖^[38]认为,虽然 ISSR 的分辨力 ($D=0.942$) 在应用的 6 种技术中最高,但结合起来的分辨力达到最高 ($D=0.967$),而没有达到 1.000 的原因是香菇栽培菌株存在一定的同物异名现象。此外,由于不同的分子标记技术的设计原理不同,主要区别于扩增的 DNA 片段不同,就会得到不同的聚类分析图;PCR 扩增易受环境影响,得到的图谱条带不能保证被完全辨识,都会对研究结果产生较大的影响^[39]。所以通过不同标记技术的组合应用,综合获得的多态性位点就可能分散在基因组上的多个部分,获得了更为丰富的扩增区域,可以更准确地进行菌株间的遗传多样性分析^[40];基于不同分子标记技术遗传聚类图上的异同,还可进一步开发序列特异性扩增区(sequence characterized amplified region, SCAR),为建立优良菌株的快速鉴定技术平台奠定良好的基础^[40-41],在近几年 ISSR 向 SCAR 转化的实践中,也得到了很好的验证。

4 展望

ISSR 以其简单、快速、稳定性高等优点,受到众多科研工作者的欢迎,已被广泛应用于食用菌遗传多样

性、杂交育种、品质鉴定等方面的研究中。ISSR 标记大多为显性标记,在解决交配系统、计算杂合度和父系分析等问题上效果不佳^[42],相对其它分子标记技术起步较晚,但随着生物信息学的不断发展,数据分析方法会不断改进。

平菇、香菇等大众型食用菌栽培规模和面积很大,互相引种现象很多,遗传背景很复杂,仅依靠单一的分子标记技术还不能满足各类食用菌信息库的建立和遗传育种的需要。相信 ISSR 技术凭借其多态性高、稳定性强、节省时间、物力和财力等优势,必定在区分亲缘关系很近品种、鉴定争议品种方面发挥重要的作用,为培育新的优良品种提供有利的技术支持。

任何分子标记方法都不是十全十美的,任何一种单一的技术都不能解决所有的问题,应该以发展的观念来看待问题^[4]。在今后的食用菌研究工作中,应根据既定的研究目的或对象,选择合适的分子标记方法,或将不同的标记技术有机结合起来,为食用菌产业的健康发展提供可靠的保障。

参考文献

- [1] 张金霞,黄晨阳. 植物新品种保护与食用菌品种权[C]//首届全国食用菌中青年专家学术交流会议论文集,2006.
- [2] 陈龙,王家良,杨贤松. ISSR 分子标记及其在植物分子生物学中的应用[J]. 种子,2007,26(10):49-52.
- [3] ZIETKIEWICZ E,RAFALSKI A,LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics,1994,20:176-183.
- [4] 罗海燕,陈业渊. ISSR 分子标记及其应用[J]. 安徽农学通报,2008,14(19):45-46.
- [5] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传,2002,24(5):613-616.
- [6] FANG D Q,ROOSE M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. Theor Appl Genet,1997,95:408-417.
- [7] 赵谦,杜虹,庄东红. ISSR 分子标记及其在植物研究中的应用[J]. 分子植物育种,2007,5(6S):123-129.
- [8] 余艳,陈海山,葛学军. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报,2003,11(1):15-19.
- [9] 张青林,罗正荣. ISSR 及其在果树上的应用[J]. 果树学报,2004,21(1):54-58.
- [10] QIAN W,GE S,HONG D. Genetic variation with in and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers [J]. Theor Appl Genet,2001,102:440-449.
- [11] 杨玉玲,马祥庆,张木清. ISSR 分子标记及其在树木遗传育种研究中的应用[J]. 亚热带农业研究,2006,2(1):18-24.
- [12] 莫文娟. 泡桐种质资源遗传多样性的 ISSR 研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2010.
- [13] SUDUPAK M A. Inter and intra-species inter-simple sequence repeat (ISSR) variations in the genus *cicer* [J]. Euphytica,2004,135(2):229-238.
- [14] 刘文从,张建博,桂明英. 滇西北地区种羊肚菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国食用菌,2011,30(4):38-42.
- [15] 官志远,任海霞,姚强,等. 35 个山东主栽平菇菌株的 ISSR 遗传差异

- 分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 507-512.
- [16] 冯伟林, 蔡为明, 金群力, 等. ISSR 分子标记分析杏鲍菇菌株遗传差异研究[J]. 中国食用菌, 2009, 28(1): 47-49.
- [17] 肖自添, 何焕清, 曾振基, 等. 24 个灵芝菌株 ISSR 遗传差异分析[J]. 食用菌, 2014(1): 21-22.
- [18] 杨成香, 张瑞颖, 左雪梅, 等. 金针菇遗传多样性初步分析[J]. 中国食用菌, 2007, 26(4): 37-39.
- [19] 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.
- [20] 曲绍轩, 高山, 黄晨阳. SRAP、ISSR 和 RAPD 分子标记技术在银耳菌株鉴别上的应用[J]. 食用菌学报, 2007, 14(3): 1-5.
- [21] 唐利华, 肖扬, 边银丙. 中国黑木耳主要栽培菌株 ISSR 指纹分析及 SCAR 标记[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 243-251.
- [22] 王鸿磊, 丁强, 吕蔚, 等. 我国双孢菇菌株与国外引进菌株间亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 北方园艺, 2014(11): 96-99.
- [23] 任轩, 贾乐, 杨风苓, 等. 食用菌原生质体融合育种研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(2): 42-44.
- [24] 陈世通, 李梦杰, 蒲敏, 等. ISSR 分子标记鉴定香菇单孢杂交后代的研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 35-37.
- [25] 王卓仁, 刘启燕, 肖扬, 等. 香菇单孢杂交子代群体灰色关联度和 ISSR 分析[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 267-272.
- [26] 刘启燕. 香菇杂交亲本选择及优良杂交菌株选育的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [27] 刘晓红. ISSR 辅助杏鲍菇常规杂交育种研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [28] ROYSE D J, MAY B. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens* [J]. Mycologia, 1982(14): 93-102.
- [29] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. 遗传, 2002, 24(5): 613-616.
- [30] 王立枫, 许修宏, 刘华晶. 黑龙江地区野生黑木耳菌株的 ISSR 指纹分析[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(2): 109-114.
- [31] 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.
- [32] 刘华晶, 许修宏, 李春艳, 等. ISSR 和 ITS 分子标记在黑龙江省野生黑木耳遗传多样性上的应用[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(8): 94-100.
- [33] 应正河. RAPD、SRAP 和 ISSR 标记在香菇种质资源的应用及其 SCAR 标记的建立[D]. 福州: 福建农林大学, 2006.
- [34] 宋春燕, 谭琦, 陈明杰. 香菇 135 菌株 SCAR 标记的验证[J]. 食用菌学报, 2006, 13(3): 1-7.
- [35] QIN L H, TAN Q, CHEN M J, et al. Use of inter simple sequence repeats markers to develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 257(1): 112-116.
- [36] 许美燕, 唐传红, 张劲松, 等. 利用 SRAP 和 ISSR 建立快速鉴定灵芝属菌株的 SCAR 标记[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 707-717.
- [37] 王子迎. 安徽野生香菇 ISSR 和 RAPD 分析的比较[J]. 安徽教育学院学报, 2005, 23(6): 94-96, 105.
- [38] 张瑞颖. 香菇菌株多相鉴定鉴别技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [39] 朱岩芳, 祝水金, 李永平, 等. ISSR 分子标记技术在植物种质资源研究中的应用[J]. 种子, 2010, 29(2): 55-59.
- [40] 刘靖宇, 宋秀高, 叶夏, 等. 香菇菌株遗传多样性 ISSR、RAPD 和 SRAP 综合分析[J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 1-8.
- [41] WU X Q, LI H B, ZHAO W W, et al. SCAR makers and multiplex PCR-based rapid molecular typing of *Lentinula edodes* strains [J]. Curr Microbiol, 2009, 61: 381-389.
- [42] 李海生. ISSR 分子标记技术及其在植物遗传多样性分析中的应用[J]. 生物学通报, 2004, 39(2): 19-21.

The Application of ISSR in Edible Fungi Research

MENG Hu^{1,2}, SUN Guoqin², SUI Wei³, SHI Aixia³

(1. Physics Department, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010020; 2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Hohhot, Inner Mongolia 010030; 3. Plant Science & Technology Research Institution of Baotou, Baotou, Inner Mongolia 014010)

Abstract: ISSR molecular marker is a new technology based on the micro-satellite technique, which takes great advantages of stability, polymorphism, simple experimental operation, security, low cost, and so on. The research advances in genetic diversity, cross breeding, variety identification of edible fungi was revealed in this paper, as well as the important effect on strain improvement, culture resources protection, standardization of market management of fungi. In the future, it would be required improvement and incorporation with other molecular markers of present ISSR for the development of molecular research of fungi.

Keywords: molecular marker technology; genetic diversity; cross breeding; variety identification