

食用菌分子生物学研究进展

李永江, 张盼, 张晓辉, 张莹莹, 宋俊乔, 卢道文* (安阳市农业科学院, 河南安阳 455000)

摘要 分子生物技术是食用菌研究的一个重要手段, 在食用菌中的应用已经相当广泛。根据近年来国内外文献报道, 综述了分子生物学在食用菌品种选育、菌种鉴定、食用菌遗传多样性、功能基因定位、基因编辑等方向的应用, 为进一步促进食用菌产业发展提供了参考。

关键词 分子生物技术; 品种选育; 菌种鉴定; 遗传多样性; 功能基因定位; 基因编辑

中图分类号 S646 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)14-0004-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.14.002



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

A Review for Molecular Biology of Edible Fungi

LI Yong-jiang, ZHANG Pan, ZHANG Xiao-hui et al (Anyang Academy of Agricultural Sciences, Anyang, Henan 455000)

Abstract Molecular biology technique is a vital tool for edible fungi, which has been extensively applied in edible fungi. Based on domestic and foreign literature in recent years reported, we focused on application of molecular biology in edible fungi breeding, variety identification, edible fungi genetic polymorphism, gene mapping, gene editing technologies, which provided reference for further promoting the development of edible fungi industry.

Key words Molecular biology techniques; Variety breeding; Variety identification; Genetic polymorphism; Gene mapping; Gene editing

食用菌是一类具有巨大经济效益的大型真菌, 我国是食用菌栽培种类和产量最多的国家^[1], 自 Devries 1972 年第一次分离出裂褶菌(*Schizophyllum commune* Franch) 的原生质体以来, 分子生物学在食用菌研究中的应用已经相当广泛^[2]。分子生物学作为遗传领域的一种强有力工具, 克服了传统育种易受环境影响的缺陷, 为食用菌产业发展开拓了更广阔的前景。笔者综合近年来分子生物学在食用菌研究中的相关报道, 分析其在食用菌品种选育、菌种分类鉴定、食用菌遗传多样性、食用菌基因定位、基因编辑等方向的应用, 以期促进食用菌产业发展。

1 食用菌品种选育

品种是食用菌产业发展的关键, 我国食用菌菌种大规模自主选育是从 20 世纪 70 年代末 80 年代初发展起来的, 育种方法主要有自然选育、人工驯化、杂交育种、诱变育种和原生质体技术育种等^[3], 其中杂交育种在食用菌育种中应用最广、效果最显著, 分子标记辅助育种是食用菌杂交育种的重要手段, 应用较广泛的标记有随机扩增多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)、内部简单重复序列(inter simple sequence repeats, ISSR)、特征序列扩增区域标记(sequence characterized amplified region, SCAR)。

白灵菇, 学名白灵侧耳(*Pleurotus nebrodensis*), 是一种营养价值极高的食药两用真菌, 近年来菌种退化、生产周期和育种时间长阻碍了白灵菇产业的发展。李莎^[4]利用原生质体单核化技术处理白灵菇菌株, 通过拮抗试验将得到的 39 个单核菌株分为 24 个正极性菌株和 15 个负极性菌株, 利用 ISSR 和 SRAP 标记单核菌株和亲本, 根据不同极性菌丝的特异片段, 开发 SCAR 标记, 设计特异引物, 在白灵菇育种中可

以快速筛选出不同极性单核菌株, 提高育种效率, 使育种工作更精确; 同样通过 ISSR 和 SRAP 技术对白灵菇亲本和单孢杂交获得的杂交子标记, 聚类分析构建 UPGMA 树, 选取遗传距离与亲本较远和较近的杂交子进行栽培试验, 初步推断杂交子与亲本遗传距离越近则表现型越近, 利用分子标记快速筛选与亲本性状相似的杂交子。

草菇属于同宗结合的菌丝, 菌丝多核且无锁状联合^[5], 杂交种鉴定缺乏切实可行的方法^[6], 随着分子生物学的发展, 分子标记逐渐应用在草菇杂交后代鉴定, 陈剑等^[7]通过 RAPD 技术对草菇亲本和杂交后代标记, 成功鉴定出杂交产物; 傅俊生等^[8]通过 SRAP 标记筛选亲本单 26 和亲本单 28 的 4 条差异条带, 转化为 SCAR 标记, 设计特异 SCAR 引物, 成功鉴定了草菇 2628 的杂种性。草菇喜温, 菌丝生长最适温度为 32~35 ℃, 较高的温度要求限制了自然条件下草菇的生产周期, 选育耐低温草菇菌种是一个研究方向, 赵妍等^[9]利用 RAPD 标记选出与低温菌株遗传距离较远的草菇菌种作为亲本, 单孢杂交配对, 温度试验淘汰不耐低温的菌株, 通过特异性交配型分子标记判断杂交子的真实性, 出菇试验选育出耐低温草菇杂交菌株。谭伟等^[10]利用 ISSR 标记单孢杂交得到侧耳菌株, 结果显示杂交菌株与亲本具有遗传差异。

2 菌种鉴定

食用菌生产中, 由于部分从业者缺乏菌种保护意识或为了经济利益随意冠名品种, 导致菌种管理混乱, 同名异物现象严重, 对于菌种快速准确鉴定势在必行。由于形态学鉴定易受生长环境影响, 亲缘关系相近的品种拮抗试验无差异, 菌种不同生长时期同工酶试验结果是不一样的, 因此同工酶分析不准确, 而分子生物学能直接反映菌种 DNA 序列遗传关系, 不受环境和生育时期的影响, 较传统方法更加准确和客观, 已经广泛应用于菌种分类鉴定, 常用的分子标记有简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)、单核苷酸多态性(single nucleotide-polymorphism, SNP)、内转录间隔

作者简介 李永江(1987—), 男, 河南濮阳人, 研究实习员, 硕士, 从事食用菌的栽培与育种工作。* 通信作者, 副研究员, 从事玉米育种研究。

收稿日期 2019-03-06

区(internal transcribed space, ITS)、细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(cytochrome c oxidase subunit I gene, COI)。

2.1 SSR SSR 标记因其数量多、基因组内分布均匀、多态性丰富、易于检测和共显性标记等优点,被作为优良的遗传标记应用到遗传连锁图谱构建、遗传多样性分析、分子生态学和进化学等研究领域^[11-13]。叶翔等^[14]利用 SSR 标记商业栽培的 25 份香菇品种,除了申香 10 号和申香 12 号不能区分,通过 SSR 条带可以清晰鉴定出其余 23 个品种,为构建香菇主栽品种特异指纹图谱提供了依据;董慧等^[15]选取 51 株香菇为供试菌株,通过 24 对 SSR 引物标记供试菌株,筛选出 9 对 SSR 引物构建指纹图谱,实现了 45 株商业菌株的鉴定,结果表明 SSR 标记能够准确鉴定香菇品种。

2.2 SNP SNP 是第三代分子标记,具有数量多、突变率低,在基因组中稳定存在,分布密度高的优点。王大莉等^[16]通过 SNP 标记实现了对香菇菌种的快速鉴定,根据香菇 *uck*、*mapk* 和 *exg1* 功能基因序列,设计 SNP 引物,对 15 个香菇 3 个功能基因 PCR 扩增,扩增序列测序比对分析,综合分析 3 个基因的 SNP 类型可以完全区分开 15 个香菇栽培菌株,SNP 能够实现香菇的快速鉴定。

2.3 ITS ITS 是核糖体 DNA 序列,具有序列小、种间变异率低、应用范围广等优点,在真菌分类鉴定上起到了重要作用。2011 年第四届国际生命条形码大会上正式将其推荐为真菌的首选 DNA 条形码,在随后的 2012 年 12 月美国真菌研讨会上,进一步确立了 ITS 作为真菌 DNA 条形码的研究任务^[17-18]。王晓娥等^[19]对 22 株木耳菌种 ITS 序列测序,以木耳为外群构建系统发育树,结果显示 ITS 序列能够区分不同木耳属菌种;黄晨阳等^[20]采用形态学鉴定新疆采集的野生真菌阿魏蘑,结果显示符合刺芹侧耳托里斯变种的特征,ITS 序列分析进一步验证了该菌株与欧洲已报道的 *Pleurotus nerbrodensis* 为不同种,该野生菌株是刺芹侧耳独立进化的一支,学名为刺芹侧耳托里斯变种 *P. eryngii* var. *tuoliensis*;黄晨阳等^[21]对侧耳属 16 个种 38 个菌株的 ITS 序列扩增测序,分析不同菌种的趋异度,说明 ITS 序列可以完成大多数侧耳属种类的鉴定工作;ITS 序列被广泛应用于香菇^[22-23]、灵芝^[24-25]、双孢蘑菇^[26-27]、虫草^[28]等菌种鉴定。

2.4 COI 2003 年加拿大分类学家 Hebert 等^[29]首次提出利用 COI 基因作为条形码进行动物物种的快速鉴定,COI 基因在动物和红藻物种分类鉴定中被广泛应用^[30],但在食用菌研究中报道较少。宋驰等^[31]以 15 个侧耳属菌种为材料,在 GenBank 中查询菌种 COI 序列信息,设计引物,经过 2 轮 PCR 扩增,根据扩增条带的大小和有无实现了 15 个侧耳属菌种的快速鉴定。

3 食用菌遗传多样性

种质资源是食用菌产业发展的基础,丰富多样的种质资源决定着优良菌株和高效功能基因的开发,分子生物技术是食用菌遗传多样性研究的重要工具。近年来应用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、靶位区域扩增多态性(target region amplified polymorphism,

TRAP)、目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT)等分子技术研究食用菌遗传多样性成为热点。

3.1 AFLP AFLP 是一种可以检测整个基因组多态性的标记,具有分辨率高、重复好、可靠性强等特点。陈立佼等^[32]利用 AFLP 标记分析了羊肚菌分离的 49 个单孢菌株的 DNA 多态性,为更深入的分子研究提供了理论基础;许晓燕等^[33]对 19 株毛木耳进行 AFLP 标记,将菌株聚类为 4 组,揭示了毛木耳遗传多样性;李荣春^[34]应用 AFLP 标记,分析了双孢蘑菇的 20 个野生菌株和 5 个栽培菌株的遗传多样性,结果表明 20 个野生菌株具有丰富的遗传多样性,其遗传变异大于栽培菌株。

3.2 TRAP TRAP 是 2003 年由 HU 等^[35]从 SRAP 技术改进而来的新型分子标记,邱成书^[36]通过筛选的 28 组 TRAP 引物对 20 株真姬菇菌株分析,揭示了菌株间具有丰富的遗传多样性;TRAP 标记在香菇种质资源遗传多样性研究中也应用^[37];李黎^[38]将 TRAP 标记应用到我国主栽的 32 个木耳菌株遗传多样性研究中。

3.3 SCoT SCoT 标记是 2009 年 Collard 等^[39]新开发的一种目的基因分子标记,该标记能够获得与性状相关的目的基因,赵梦然等^[40]首次利用 SCoT 标记分析我国不同地理来源的 63 株野生白灵菇的遗传多样性,表明白灵菇遗传多样性与地理位置分布密切相关。

4 功能基因定位

食用菌大多数重要的农艺性状如菌丝生长速度、酶活性、质量以及产量等都是数量性状,表现为连续变异,是由多个数量基因座位(quantitative trait loci, QTL)和环境控制的,食用菌育种都是以获得优良农艺性状为目标的,常规育种方法难以实现数量性状遗传改良,构建遗传连锁图谱,寻找与数量性状位点紧密连锁的分子标记,是 QTL 研究的基本方法^[41]。龚文兵等^[42]根据香菇全基因组序列开发出 InDel 标记,结合 SRAP 和 TRAP 分子标记,构建香菇遗传连锁图谱,定位了 6 个与香菇双核体菌丝生长速度相关的 QTLs,为香菇分子辅助育种和菌丝生长速度调控研究提供了依据;GAO 等^[43]根据双孢蘑菇全基因组序列,开发出 SNP 标记,构建了 SNP 标记遗传连锁图谱,定位了双孢蘑菇抗机械损伤的关键因子,为抗褐变双孢蘑菇分子育种提供了依据。

5 基因编辑

生命科学的迅速发展将人们带到了后基因组时代,基因编辑成为了生命科学重要的研究领域,人们发明了第一代锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)^[44]、第二代类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALEN)^[45]、第三代 CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9)^[46]基因编辑技术,与 ZFNs 和 TALEN 相比,CRISPR/Cas9 设计简单、操作方便、靶向效率高,被广泛用于拟南芥、玉米、水稻、土豆^[47]基因组定向编辑,在食用菌研究中报道较少。多酚氧化酶(PPO)是引起蘑菇褐化的一种酶类,Yangyi Nong 课题组利用基因编辑技术,敲除了双孢蘑菇 6 个 PPO 基因中的 1

个,使多酚氧化酶活性降低了30%,抑制了蘑菇的褐化,这是首次利用CRISPR/Cas9系统对大型真菌基因编辑的报道^[48];灵芝能够合成多种抗菌、抗肿瘤的活性物质,但灵芝中URA3基因阻碍了灵芝酸的合成;2017年HAO等^[49]成功构建了CRISPR/Cas9基因编辑系统,在灵芝的基因组中形成双链断裂,诱导非同源末端连接,促进了URA3基因的破坏,产生了更多灵芝酸。

6 小结与展望

随着分子生物学和基因组学的迅速发展,DNA分子标记正由随机标记(RDMs, random DNA markers)如RFLP、RAPD、AFLP向目的基因标记(GTMs, gene targeted markers)和功能性标记(FMs, functional marker)如SCoT、SRAP、SNP发展^[50],由对功能基因的测序、定位、克隆到对目标基因定向删除、替换、插入的基因编辑,食用菌基础科学研究进入了新的时代,越来越简单、低价、高效的分子标记被开发出来,更多重要功能基因被定位、克隆,基因编辑技术研究更加深入,将为整个食用菌产业发展带来崭新的一页。

参考文献

[1] 张瑞颖,胡丹丹,左雪梅,等.分子标记技术在食用菌遗传育种中的应用[J].中国食用菌,2011,30(1):3-7.

[2] COMBIER J P, MELAYAH D, RAFFIER C, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* [J]. FEMS Microbiol Letters, 2003, 220(1): 141-148.

[3] 谭琦,潘迎捷,黄为一.中国香菇育种的发展历程[J].食用菌学报,2000,7(4):48-52.

[4] 李莎.白灵菇杂交育种快速筛选体系的构建[D].保定:河北农业大学,2015.

[5] CHANG S T, YAU C K. *Volvvariella volvocea* and its life history [J]. American journal of botany, 1971, 58(6): 552-561.

[6] 谢宝贵,羿红,黄志龙,等.草菇杂交育种及同工酶分析[J].福建农业大学学报(自然科学版),2001,30(3):372-376.

[7] 陈剑,林原,谢宝贵,等.利用RAPD技术鉴定草菇杂交后代[J].食药菌,2011,19(2):21-23.

[8] 傅俊生,刘新锐,谢宝贵,等.草菇SCAR遗传标记建立及其杂种鉴定应用[J].中国农学通报,2010,26(17):41-46.

[9] 赵妍,颜素雅,林锋,等.利用分子标记辅助育种技术选育低温高产草菇菌株[J].分子植物育种,2017,15(8):3153-3159.

[10] 谭伟,周洁,曹雪莲,等.侧耳属种间杂交选育白色高产菌株[J].食用菌学报,2015,22(2):20-24,95.

[11] KAYE C, MILAZZO J, ROZENFELD S, et al. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map [J]. Fungal Genet Biol, 2003, 40(3): 207-214.

[12] JANY J L, BOUSQUET J, GAGNE A, et al. Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications [J]. Mycol Res, 2006, 110: 51-59.

[13] ROY M, DUBOIS M P, PROFFIT M, et al. Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont [J]. Mol Ecol, 2008, 17(12): 2825-2838.

[14] 叶翔,黄晨阳,陈强,等.中国主栽香菇品种SSR指纹图谱的构建[J].植物遗传资源学报,2012,13(6):1067-1072.

[15] 董慧,章炉军,张美彦,等.中国香菇主栽品种遗传多样性的SSR分析及指纹图谱构建[J].微生物学通报,2017,44(6):1427-1436.

[16] 王大莉,边银丙,黄晨阳,等.功能基因SNP标记在香菇品种鉴别中应用[C]//中国菌物学会第五届会员代表大会暨2011年学术年会论文摘要集.北京:中国菌物学会,2011:2.

[17] 张宇,郭良栋.真菌DNA条形码研究进展[J].菌物学报,2012,31(6):809-820.

[18] SCOTT T B, STEVEN A, HOLLY M B. Meeting report: Fungal ITS workshop (October 2012) [J]. Stand Genomic Sci, 2013, 8(1): 118-123.

[19] 王晓娥,姚方杰,张友民,等.木耳属菌株ITS序列作为DNA条形码的

可行性[J].东北林业大学学报,2013,41(7):111-114.

[20] 黄晨阳,陈强,邓旺秋,等.中国栽培白灵菇学名的订正[J].植物遗传资源学报,2011,12(5):825-827,832.

[21] 黄晨阳,陈强,高山,等.侧耳属主要种类ITS序列分析[J].菌物学报,2010,29(3):365-372.

[22] 杨永彬,林远崇,兰家细,等.香菇菌株ITS序列分子检测[J].中国食用菌,2008,27(2):37-38.

[23] 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.

[24] 刘雪莹,韩玉立,司静,等.基于ITS序列的灵芝遗传多样性与群体遗传分化研究[J].菌物学报,2018,37(5):565-575.

[25] 袁滨,严俊杰,柯丽娜,等.基于ITS序列分析鉴定野生灵芝属菌种[J].中国食用菌,2018,37(2):62-66.

[26] 刘明军,杨琴,张桂香,等.野生双孢蘑菇菌株的ITS鉴定及生物学特性研究[J].林业科技通讯,2018(2):53-56.

[27] 张健,康曼,韩建荣.一株野生蘑菇的鉴定[J].山西农业科学,2015,43(11):1421-1423.

[28] 王薇,王利丽,熊莉丽,等.ITS序列作为DNA条形码在虫草鉴定及系统发育关系中的研究与应用[J].江苏农业学报,2012,28(3):680-682.

[29] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences, 2003, 270: 313-321.

[30] SAUNDERS G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: A preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences, 2005, 360: 1879-1888.

[31] 宋驰,陈强,徐璟煜,等.CO1在侧耳属物种快速鉴定中的应用[J].菌物学报,2011,30(4):663-668.

[32] 陈立俊,柴红梅,黄兴奇,等.尖顶羊肚菌遗传多样性的AFLP分析[J].食用菌学报,2013,20(2):12-19.

[33] 许晓燕,余梦瑶,罗霞,等.利用AFLP和SRAP标记分析19株木木耳的遗传多样性[J].西南农业学报,2008,21(1):121-124.

[34] 李荣春.双孢蘑菇遗传多样性分析[J].云南植物研究,2001,23(4):444-450.

[35] HU J G, VICK B A. Target region amplification polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping [J]. Plant Mol Bio Rep, 2003, 21(3): 289-294.

[36] 邱成书.栽培性状和分子标记在中国真姬菇遗传多样研究中的应用[D].广州:华南理工大学,2013.

[37] 肖扬.几种新型分子标记技术在中国香菇种质资源遗传多样性研究中的应用[D].武汉:华中农业大学,2009.

[38] 李黎.中国木耳栽培种质资源的遗传多样性研究[D].武汉:华中农业大学,2011.

[39] COLLARD C Y, MACKILL D J. Start codon target (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants [J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27(1): 86-93.

[40] 赵梦然,陈强,黄晨阳,等.中国野生白灵菇遗传多样性的SCoT分析[J].园艺学报,2012,39(12):2475-2482.

[41] 龚文兵,肖扬,周雁,等.食用菌QTL定位研究进展[J].园艺学报,2011,38(9):1800-1806.

[42] 龚文兵,刘伟,卢颖颖.基于F2群体的香菇遗传图谱构建及其在QTL定位中的应用[J].菌物学报,2014,33(2):297-311.

[43] GAO W, WEIJN A, BAARS J J P, et al. Quantitative trait locus mapping for bruising sensitivity and cap color of *Agaricus bisporus* (button mushrooms) [J]. Fungal genetics and biology, 2015, 77: 69-81.

[44] URNOV F D, REBAR E J, HOLMES M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases [J]. Nature reviews genetics, 2010, 11(9): 636-646.

[45] BEDELL V M, WANG Y, CAMBELL J M, et al. In vivo genome editing using a high efficiency TALEN system [J]. Nature, 2012, 491(7422): 114-118.

[46] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science, 2013, 6121: 823-826.

[47] 张梦娜,柯丽萍,孙玉强.基因编辑新技术最新进展[J].中国细胞生物学学报,2018,40(12):2098-2107.

[48] WALTZ E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation [J]. Nature, 2016, 532(599): 293.

[49] HAO Q, XIAO H, ZOU G, et al. CRISPR-Cas9 assisted gene disruption in the higher fungus *ganoderma* species [J]. Process biochemistry, 2017, 56: 57-61.

[50] 龙治坚,范理璋,徐刚,等.SCoT分子标记在植物研究中的应用进展[J].植物遗传资源学报,2015,16(2):336-343.