

蔡志欣, 陈美元, 廖剑华, 等. 双孢蘑菇不同交配型同核不育单孢的基因组文库构建 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (12): 1327—1331.
CAI Z-X, CHEN M-Y, LIAO J-H, et al. Genomic Library Construction of Monokaryons with Different Mating Type of *Agaricus bisporus* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 32 (12): 1327—1331.

双孢蘑菇不同交配型同核不育单孢的基因组文库构建

蔡志欣, 陈美元*, 廖剑华, 李洪荣, 郭仲杰, 王泽生

(福建省农业科学院食用菌研究所/特色食用菌繁育与栽培国家地方联合工程研究中心, 福建 福州 350014)

摘要: 对 24 个双孢蘑菇不育单孢进行两两杂交配对, 以菌株 9608 为基准, 获得了 2 种不同交配型的不育单孢菌株 A+: 9601、9608、9609、9612、AgQG841-1、AgLH830-4、AgLH830-6、AgQL8125-5; A-: 9602、9603、9604、9607、Ag2k811-1、M7206-1、M7206-2、M7206-11、M7206-13。将这 2 种菌株进行 DNA 提取, 并构建 DNA 文库, 对文库进行酶切验证, 用 Sal I 酶切, 可切出 20、14、9 kb 等 3 个片段, 其中 20、9 kb 为 λ 载体的左右臂, 插入片段为 14 kb, 与预期相符, 说明文库的质量较高。

关键词: 双孢蘑菇; 不育单孢; 交配型因子; 基因组文库

中图分类号: S 646.1

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2017) 12—1327—05

Genomic Library Construction of Monokaryons with Different Mating Type of *Agaricus bisporus*

CAI Zhi-Xin, CHEN Mei-Yuan*, LIAO Jian-Hua, LI Hong-Rong, GUO Zhong-Jie, WANG Ze-Sheng

(Institute of Edible Fungi, Fujian Academy of Agricultural Sciences/National and Local Joint

Engineering Research Center for Breeding & Cultivation of Featured Edible Fungi,

Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350014, China)

Abstract: In this study, twenty-two *Agaricus bisporus* monokaryons strains were pairwisely paired. Based on strain 9608, two different mating types of monokaryons were obtained. A + strains: 9601, 9608, 9609, 9612, AgQG841-1, AgLH830-4, AgLH830-6, AgQL8125-5. A-: 9602, 9603, 9604, 9607, Ag2k811-1, M7206-1, M7206-2, M7206-11, M7206-13. The genomic DNA of two strains were extracted and DNA library were constructed. The library was verified by restriction enzyme digestion with SalII. The 20 kb, 14 kb and 9 kb 3 fragments were cut out, of which 20 kb and 9 kb were inserted into the left and right arms of lambda vector and the fragment of 14kb, was the insertion genomic DNA fragments. Enzyme digestion result was in line with expectations, indicating the higher quality of the library.

Key words: *Agaricus bisporus*; monokaryons; mating type factor; genomic library

双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* 是世界上栽培最为广泛的食用菌, 具有非常重要的经济价值。2015 年, 我国双孢蘑菇的鲜菇年产量达 340 万 t 左右, 已成为我国农业重要的支撑产业^[1]。然而, 有限的高产优质双孢蘑菇品种严重地阻碍了双孢蘑菇生产的发展, 虽然菌类遗传育种专家作出了巨大的努力, 但是采用常规的杂交育种技术还是很难获得新的优良菌种, 这主要是由于双孢蘑菇属二极性次级同宗结合的单因子交配型系统, 大多数担孢子是异核可育的, 不能用于杂交, 只有同核不育孢子才能

用于杂交。此外, 双孢蘑菇菌丝细胞呈多核状态, 缺乏锁状联合^[2-3]。这就造成了鉴定单核体或同核体间杂交的困难, 常常盲目地进行杂交, 严重阻碍了杂交育种工作的进行。

目前, 我们的研究团队能够应用同工酶标记, 在菌丝阶段可以对异核体和同核体进行区分和鉴定, 大大提高了双孢蘑菇杂交育种效率^[4]。但不同的同核体菌株仍存在相同或不同的交配型, 只有具不同交配型因子的同核体之间才有可能配对成功, 随机配对获得杂交子的成功率仍然很低。前人研究表

收稿日期: 2017—10—11 初稿; 2017 年—12—20 修改稿

作者简介: 蔡志欣 (1983—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事食用菌遗传育种研究 (E-mail: 181351945@qq.com)

* 通讯作者: 陈美元 (1972—), 男, 博士, 教授级高工, 主要从事食用菌遗传育种研究 (E-mail: cmy1972@gmail.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2015R1020-1); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS20); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STIT2017-1-6); 福建省种业创新产业化工程项目 (fjzycxny2017009)

明, 双孢蘑菇是单因子交配型系统, 由单个 A 位点控制($A+/A-$)且交配型基因 A 因子与 mip 基因紧密连锁, 但 A 因子的序列尚未见报道^[5-6]。为了更有效地开展育种工作, 必须开展对双孢蘑菇交配型 A 因子的研究。本研究对课题组长期以来获得的双孢蘑菇不育单孢菌株进行杂交配对, 对不同交配型的不育单孢进行分组, 并构建基因组文库, 为下一步进一步克隆交配型 A 因子基因鉴定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

供试菌株及来源见表 1。

表 1 供试菌株编号及来源

Table 1 Strains tested number and Origin

编号	菌株	来源
1	9601	分离自 As2796
2	9602	分离自 As2796
3	9603	分离自 As2796
4	9604	分离自 As2796
5	9605	分离自 As2796
6	9606	分离自 As2796
7	9607	分离自 As2796
8	9608	分离自 As2796
9	9609	分离自 As2796
10	9612	分离自 As2796
11	AgQG841-1	分离自野生菌株 AgQG841
12	AgQG841-3	分离自野生菌株 AgQG841
13	AgQG841-9	分离自野生菌株 AgQG841
14	Ag2k811-1	分离自野生菌株 Ag2k811
15	Ag2k811-3	分离自野生菌株 Ag2k811
16	AgLH830-4	分离自野生菌株 AgLH830
17	AgLH830-6	分离自野生菌株 AgLH830
18	AgLH830-7	分离自野生菌株 AgLH830
19	AgQL8125-3	分离自野生菌株 AgQL8125
20	AgQL8125-5	分离自野生菌株 AgQL8125
21	M7206-1	分离自 M7206
22	M7206-2	分离自 M7206
23	M7206-11	分离自 M7206
24	M7206-13	分离自 M7206

1.2 试验方法

1.2.1 同核不育株间配对杂交 不同菌株分离的同核不育体配对接种在 PDA 平板上, 置 24℃条件下进行培养, 观察配对菌丝间的接触点是否有融合, 把菌丝接触点间恢复正常生长的菌丝体转接到 PDA 试管中进行纯化培养。

1.2.2 同核不育菌株同工酶谱的电泳分析 按王贤樵等的方法进行^[4]。

1.3 DNA 提取方法

参照参考文献[7]的方法。

1.4 基因组文库的构建

采用上述方法所提的 50 μg DNA 溶解在 500 μL 的 *Sal* I 的酶切缓冲液中, 加入 0.25 U *Sal* I, 在 30℃下酶切 30 min。0.4% 低熔点琼脂糖 (1 × TAE 缓冲液) 电泳分离 DNA 片段, 回收 9~23 kb 基因组片段。将基因组 DNA 片段 (3 μg) 与 *Bam* H I 消化的 λ 载体 (5 μg) 用 T4 DNA 连接酶在 25℃连接 4 h。取连接产物与包装蛋白混和, 22℃反应 4 h。包装产物梯度稀释后侵染感受态 *E. coli* C600hfl。铺平板培养进行文库的滴度测定。以上详细步骤参照文献^[8-9]。

2 结果与分析

2.1 同核不育单孢菌株的生物学鉴定

同核不育单孢菌株通常是生长速度慢、紧贴培养基表面生长的匍匐型, 菌丝弱细, 部分菌株会分泌出褐色色素, 在 PDA 培养基的生长情况见图 1~3。



图 1 As2796 分离的同核不育株

Fig. 1 Monokaryons obtained from As2796



图 2 AgQL8125 分离的同核不育株

Fig. 2 Monokaryons obtained from AgQL8125



图 3 AgQG841 分离的同核不育株

Fig. 3 Monokaryons obtained from AgQG841

2.2 同核不育单孢菌株的酯酶同工酶谱鉴定

同核不育单孢在酯酶同工酶的带型上表现为特殊的 S 型 (图 4)。

2.2 同核不育单孢间的杂交配对

将表 1 中的 24 个不育单孢菌株进行两两间的杂交配对, 再根据同种交配型因子交配不亲和性原

理, 将获得的不育单孢进行分组。部分杂交配对结果如图 5 所示。两两间杂交配对的结果见表 2。

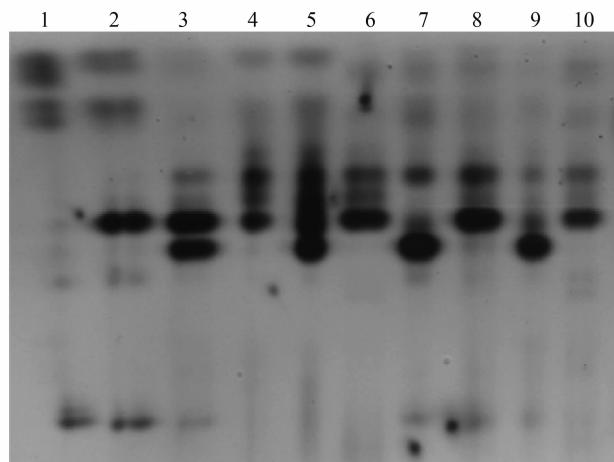


图 4 同核不育单孢的酯酶同工酶带型

Fig. 4 Esterase isoenzyme patterns of monokaryons

注: 洋道 1 为对照菌株 As2796, 洋道 2~10 为表 1 中对应的 1~9 号菌株。

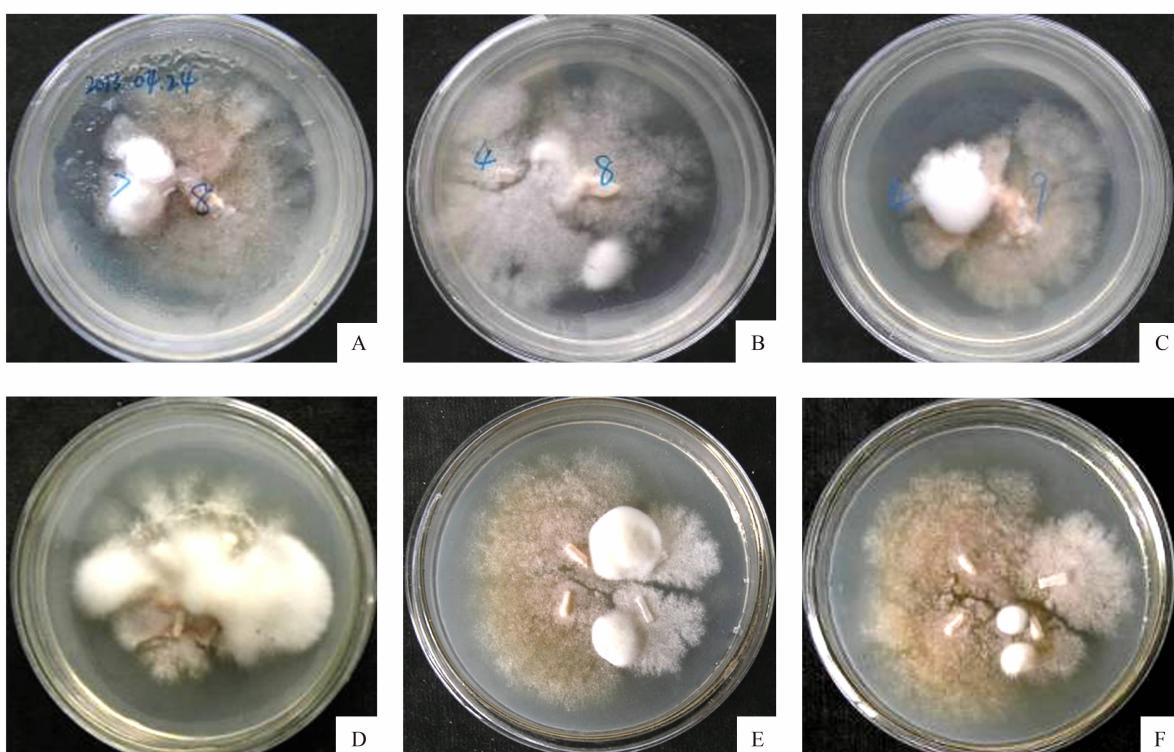


图 5 两两杂交配对结果

Fig. 5 Pair-wise cross of monokaryons

注: A 为 9607×9608 杂交, B 为 9604×9608 杂交, C 为 9604×9609 杂交, D 为 9604×AgQL8125-5 杂交, E 为 M7206-1×AgQG841-1 杂交, F 为 M7206-1×AgLH830-6 杂交。

从配对结果可以看出来自不同的菌株的分离的不育单孢可杂交的概率也是不一样, 其中菌株编号

4 号、8 号, 21 号可杂交的概率较高, 其他的不育单孢可杂交的概率较低。其中以 8 号菌株为例, 菌

株 2 号、4 号、7 号、21 号、22 号可以与 8 号菌株杂交，根据同种交配型因子杂交不亲和性，将 8 号菌株定为菌株 A+，那么菌株 2 号、4 号、7 号、21 号、22 号为 A-。其余的菌株，根据不同交配型可性亲和原则，可将上述的供试菌株分为 A+：1、8、9、10、11、16、17、20。对应菌株编号为：9601、9608、9609、9612、AgQG841-1、AgLH830-4、AgLH830-6、AgQL8125-5。A-：2、3、4、7、14、21、22、23、24。对应菌株编号为：9602、9603、9604、9607、Ag2k811-1、M7206-1、M7206-2、M7206-11、M7206-13。

表 2 供试菌株两两配对杂交

Table 2 Two - pair hybridization of the tested strains

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1		+														+								
2																+	+							
3																+	+							
4	+															++				+	+			
5		+																						
6																								
7																++								
8	+	+	+	+																				
9		+	+																					
10		+														+		+						
11																		+						
12	+																							
13																								
14	+															+								
15																+								
16																	+							
17		+																+						
18																								
19																								
20	+																							
21																++	++	+						
22																+								
23	+																							
24																		+						

注：“+”表示菌株间可以杂交配对。

2.3 基因组文库的构建

将上述获得的 A+ 菌株：9601、9608、9609、9612、AgQG841-1、AgLH830-4、AgLH830-6、AgQL8125-5 行基因组 DNA 的提取，并将这些 DNA 混合成 A+ DNA 池。同样将 A- 菌株：9602、9603、9604、9607、Ag2k811-1、M7206-1、M7206-2、M7206-11、M7206-13 进行基因组 DNA

的提取，并混合 A- DNA 池。

将 A+DNA 池和 A-DNA 池进行酶切，用 Sal I 酶切，电泳。酶切前和酶切后的电泳图谱见图 6。

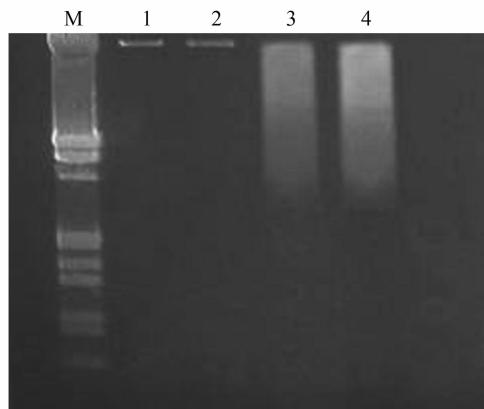


图 6 双孢蘑菇基因组 DNA 酶切前和酶切后的电泳结果

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of *A. bisporus* genome DNA sample before

注：M 为 λDNA/Eco RI+ Hind III Markers. 1 为未酶切的双孢蘑菇基因组 A+DNA；2 为未酶切的双孢蘑菇基因组 A-DNA；3 为 Sal I 酶切后的双孢蘑菇基因组 A+ DNA；4 为 Sal I 酶切后的双孢蘑菇基因组 A-DNA；酶切条件：酶量为 0.4 U·mg⁻¹ DNA，37℃ 反应 1 h。

参照上述基因组文库的构建方法，将酶切后的基因组 DNA 和酶切后的噬菌体 λDNA，进行连接、包装、侵染、铺平板及滴度测定。从平板上随机挑取分隔良好的几个噬菌斑，提取重组后的噬菌体 λDNA，并进行酶切验证（图 7）。

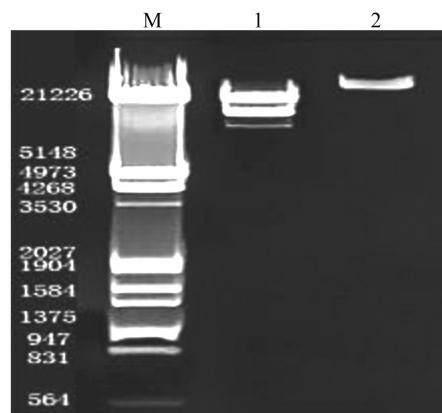


图 7 转化子 DNA 的 Sal I 酶切电泳结果

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of recombinant phage DNA sample before and after Sal I digestion

注：1 为 Sal I 酶切后的重组子 λDNA，2 为转化子 λDNA；M 为 λDNA/EcoRI+ HindIII Markers。

结果可以看出, 经 *Sal* I 酶切, 可切出 20 kb、14 kb 和 9 kb 3 个片段, 其中 20 kb 和 9 kb 为 λ 载体的左右臂, 插入片段为 14 kb, 与预期相符, 说明文库的质量较高。

3 结果与讨论

3.1 高分子质量的 DNA 对构建基因组文库尤为重要。如果小片段多, 会导致 DNA 转化噬菌体的效率低。在研究中发现, 在高浓度钾离子存在下, SDS 与多糖或蛋白质结合生成复合物, 能有效除去多糖, 所得 DNA 易溶解。DNA 提取过程中只使用 SDS, 而不使用 CTAB, 减少了对 DNA 的损害。另外我们用 30% 乙醇溶解 DNA 后, 于 4℃ 放置过夜, 能进一步去除多糖和其他杂质, 提高所提取的 DNA 纯度。

3.2 本研究中所提的双孢蘑菇大片段 DNA 经 *Sal* I 部分酶切, 低熔点琼脂糖电泳回收 9~23 kb 的片段, 回收的 DNA 片段与 *Bam*H I 消化的 λ 载体连接, 获得了 2×10^5 个转化子。在真菌的基因组为 $10^7 \sim 10^8$ bp, 当重组转化子为 $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 时, 可保证 99 % 的基因存在于基因组文库中, 说明了构建的文库基因覆盖率较全。

3.3 本研究通过单孢菌株间的两两配对杂交, 获得了 2 种不同交配型的双孢蘑菇不育单孢菌株, 并构建了这 2 种不同交配型的不育单孢的基因组文库, 这为下一步克隆双孢蘑菇的交配型基因以及研究不

同交配型的不育单孢的基因组成差异奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王泽生, 蔡丹凤, 谢宝贵, 等. 福建省食用菌学科发展研究报告 [J]. 海峡科学, 2016, (1): 119—127.
- [2] RAPER CA, RAPER JR, MILLER RE. Genetic Analysis of the Life Cycle of *Agaricus bisporus* [J]. Mycologia. 1972, 64 (5): 1088—1117.
- [3] RAPER CA, KAYE G. Sexual and Other Relationships in the Genus *Agaricus* [J]. J Gen Microbiol. 1978, 105(1): 135—151.
- [4] 王贤樵, 王泽生. 同工酶技术及其在双孢蘑菇选育中的应用——I. 双孢蘑菇同工酶标记筛选研究 [J]. 中国食用菌, 1989, (6): 7—12.
- [5] XU J, KERRIGAN RW, HORGAN PA, et al. Localization of the mating type gene in *Agaricus bisporus* [J]. Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59 (9): 3044—3049.
- [6] LI Y, CHALLEN MP, ELLIOTT TJ, et al. Molecular Analysis of Breeding Behavior in *Agaricus* species [J]. Mushroom Sci. 2004, 16: 103—109.
- [7] 陈美元, 廖剑华, 李洪荣, 等. 双孢蘑菇栽培菌株遗传多样性的 DNA 指纹分析 [J]. 中国农学通报, 2009, 25 (4): 149—156.
- [8] 王泽生, 陈美元, 廖剑华, 等. 双孢蘑菇部分 cDNA 文库的构建及筛选 [J]. 菌物学报, 2004, (1): 63—65.
- [9] J·萨姆布鲁克, EF·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南: 第 2 版 [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 1—1062.

(责任编辑: 柯文辉)