

香菇 *B* 交配型位点的分子遗传学结构研究 II. 一个香菇单核体的 *B* 位点结构的分子解析

陈明杰^{1,2} 宋文华^{1,2} 宋春艳¹ 张美彦¹ 陈祥¹ 林楠¹ 鲍大鹏^{1*}

¹ 国家食用菌工程技术研究中心 农业部应用真菌资源与利用重点开放实验室 上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201106

² 上海海洋大学食品学院 上海 201306

摘 要: 在先前的工作中, 曾经运用简并 PCR 和染色体步行的方法从香菇中获得了 1 个信息素受体编码基因和 1 个信息素前体编码基因。根据香菇 135 菌株的原生质体单核体的全基因组测序信息, 设计了 4 对引物, 用于扩增香菇苏香菌株的原生质体单核体 SUP2 中的信息素受体编码基因 *STE-3* 的同源物及其侧翼保守基因。实验结果共获得了 33,655bp 的 DNA 序列, 运用 BlastX 搜索对所获得的序列进行同源性分析后, 发现了 7 个推定基因, 其中有 3 个为信息素受体编码基因。再根据信息素前体所具有的保守基序特征, 在 2 个信息素受体编码基因附近发现了 4 个信息素前体编码基因。首次对香菇的 *B* 交配型位点的分子遗传学结构有了比较全面的了解。

关键词: 香菇, *B* 交配型基因, 信息素受体, 信息素前体

Molecular genetic structure of the *B* mating-type locus of *Lentinula edodes* II. Molecular organization of the *B* mating type locus of a *L. edodes* monokaryon

CHEN Ming-Jie^{1,2} SONG Wen-Hua^{1,2} SONG Chun-Yan¹ ZHANG Mei-Yan¹ CHEN Xiang¹
LIN Nan¹ BAO Da-Peng^{1*}

¹ National Engineering Research Center of Edible Fungi; Key Laboratory of Applied Mycological Resources and Utilization, Ministry of Agriculture; Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

² College of Food Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

基金项目: 上海市浦江人才 (No. 08PJ14087); 农业部公益性行业科研专项 (No. nyhyzx07-008); 上海市农业科学院资助项目 (No. 农科发 2007-07、农科发 2007-24)

*Corresponding author. E-mail: baodp@hotmail.com

收稿日期: 2010-08-15, 接受日期: 2010-10-11

Abstract: In our previous work, degenerate PCR and chromosome walking technologies were used to obtain one pheromone receptor gene and one pheromone precursor gene from *Lentinula edodes*. In this study, four pairs of specific primers were designed according to the whole genome sequencing of the protoplast monokaryon of *Lentinula edodes* strain 135, to amplify *STE3*-like pheromone receptor gene and its flanking conserved genes in the protoplast monokaryon strain SUP2 derived from *Lentinula edodes* strain Suxiang and 33,655bp DNA sequence was obtained. By BlastX search, seven putative genes were identified, and three of them are pheromone receptor encoded genes. Furthermore, near to two pheromone receptor genes, four genes encoding proteins with conserved motifs of pheromone precursors were found. This study firstly reveals the molecular organization of the *B* mating type locus of *Lentinula edodes*.

Key words: *Lentinula edodes*, *B* mating type locus, pheromone receptor, pheromone precursor

在我国蓬勃发展的食用菌产业中,香菇是生产区域最广泛、总产量最高、经济效益最大的主要栽培菇类。2008 年我国香菇总产量在 309 万吨以上。香菇栽培业的快速发展促使人们投入越来越多的科研力量开展香菇的栽培、生理、育种、遗传等方面的研究工作,以希望能够对香菇这种与人类生活密切相关物种有越来越深入地了解。

交配型基因是高等担子菌的一个重要功能基因,交配型基因的多态性是异宗结合食用菌杂交育种的理论基础。香菇是一种典型的四极性异宗结合的高等担子菌。围绕香菇的交配型和交配型基因已经开展了较多的研究。本实验室在先期的工作中,通过简并 PCR 和染色体步行的方法从香菇中获得了 1 个信息素受体编码基因 *LErcb1-B1* 和 1 个信息素前体编码基因 *LEphb1-B1* (李苏等 2009)。灰盖鬼伞的 *B* 交配型位点含有 3 个亚单位,每个亚单位至少含有 1 个信息素编码基因和 2 个信息素受体编码基因 (John *et al.* 1999)。裂褶菌的 *B* 位点中有 2 个信息素编码基因和 6 个信息素受体编码基因 (Fowler *et al.* 2001)。近来对菌根菌双色蜡膜的 *B* 位点研究表明,其含有 3 个信息素编码基因和 3 个信息素受体编码基因 (Niculita-Hirzel *et al.* 2008)。根据上述多个担子菌的 *B* 交配型位点的分子遗传学结构可以推测,香菇的 *B* 位点也可能含有多个信息素和信息素受体编码基因。

实验采用 454 高通量测序技术对香菇 135 单核体菌株的全基因组进行了 6 倍覆盖率的测序,根据

所获得的序列信息,对香菇苏香菌种的 1 个单核体中的 *B* 位点的分子遗传学结构进行了全面的研究。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养方法

香菇苏香菌株的原生质体单核体菌株 SUP2 由上海市农业科学院食用菌研究所保藏。香菇菌丝体采用 PDY 液体培养基 (马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 酵母提取物 0.2%), 于 25℃ 培养。

1.2 DNA 提取

采用改进的 CTAB 法 (张红等 2006) 提取香菇基因组 DNA, 具体操作参见鲍大鹏等 (2007) 的方法。

1.3 PCR 引物设计和 PCR 反应条件

本实验室在香港中文大学完成了香菇 135 菌株的单核体的全基因组测序,测序深度为 6 倍覆盖率,拼接后获得总长度为 28.7M 的 contig 序列。经过同源搜索,在 contig212 和 contig213 中找到了担子菌信息素受体编码基因 *STE-3* 的同源物。根据 contig212 和 contig213 序列以及其上下游序列设计了 PCR 引物 (表 1), 用于扩增苏香单核体菌株 SUP2 中的 *B* 交配型位点序列。

本研究采用长片段 PCR 扩增香菇 *B* 交配型位点序列。100μL PCR 反应体系包含有: 200ng DNA, 1×LA PCR 反应缓冲液, 2.0mmol Mg²⁺, 0.4mmol dNTP, 引物各 0.4μmol, 和 5U TaKaRa LA Taq (宝生物工程有限公司)。反应条件为: 94℃ 预变性

5min; 94℃变性 1min, 55℃退火 1min, 72℃延伸 (延伸时间由片段大小而定: 1kb/1min), 共 35 个循环; 最后于 72℃补平 10min。PCR 反应在 TaKaRa TP650 PCR 仪上进行。

表 1 用于扩增香菇苏香 SUP2 菌株中 *B* 交配型位点的引物

Table 1 Primers used for amplification of the *B* mating type locus of *Lentinula edodes* strain Suxiang SUP2

引物名称 Primer	引物序列 Sequence (5'-3')
LErcb-F1	GCTGGGTTCTTGGCCTTGCTCCTT
LErcb-F2	ACGAGGAATGACTTGATGGGCACA
LErcb-F3	TGAGCAGCTCATGCAGTGTGGTCC
LErcb-F4	AGCCAGGCAAGAAGTGGCAAGAGAC
LErcb-R1	AGTTACGCCTTCCATGCTACTGTA
LErcb-R2	GATGGAACACGACGAGATAGCGGC
LErcb-R3	GTCCTCCCTTGATCAATAAACCAT
LErcb-R4	GGAAGATGAAAACCCATGCGATGA

1.4 DNA 序列的测定

PCR 反应产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (美国 Axygen Bio Sciences 公司) 纯化目的条带, 将纯化后的反应产物委托生工生物工程 (上海) 有限公司进行测序。

1.5 DNA 序列分析

用 DNASTAR 软件包中的 SepMan 程序对实验中所获得的 DNA 序列进行拼接。获得的 DNA 全长序列在 NCBI 中的 BlastX 程序搜索同源序列。Genetyx4.0 软件对测序获得的 DNA 序列进行翻译等分析。信息素受体的同源序列的二级结构分析分别通过 PHOBIUS 程序 (<http://phobius.sbc.su.se/>) 和 TMHMM 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 来完成。多序列的比对由在线程序 ClusterW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/Clustalw/>) 完成。

2 结果

2.1 长片段 PCR 扩增获得苏香原生质体单核体菌株 SUP2 的 *B* 交配型位点的序列

以香菇苏香原生质体单核体菌株 SUP2 的基因组 DNA 为模板, 经过长片段 PCR 扩增, 共获得了

4 个 DNA 长片段, 经过测序测定其长度分别为 7,400bp、5,400bp、9,300bp、13,400bp。运用 seqMan 程序将所获得的 DNA 序列拼接后, 获得了总长度为 33,655bp 的序列 (GenBank No.: HQ130487) (图 1-A)。

2.2 苏香 *B* 交配型位点中的基因及其顺序

将上述所获得的 33,655bp 的 DNA 在 NCBI 网站中, 运用 BlastX 进行搜索, 根据搜索结果中氨基酸序列的相似性和相同性, 以及内含子保守的连接序列 (GT-AG 原则), 初步可以推断所获得的 33,655bp 的 DNA 序列中至少包含有 7 个完整的基因 (表 2, 图 1-B)。

2.3 苏香 *B* 交配型位点中信息素受体和信息素前体的数量和位置

通过对所获得的序列进行的 BlastX 分析, 在苏香的 *B* 位点中发现有 3 段 DNA 序列编码的氨基酸序列分别与双色蜡蘑和灰盖鬼伞的信息素受体有同源性, 相应的比特分数 (bits score) 和 E 值 (E values) 见表 2 所示。依据这些比对结果进行进一步生物信息学分析, 推断出在苏香的 *B* 位点中存在 3 个信息素受体编码基因, 分别命名为 *LErcb1-SUP2*, *LErcb2-SUP2* 和 *LErcb3-SUP2*, 其编码的蛋白质序列的长度分别为 198, 205 和 226 个氨基酸残基。PHOBIUS 程序和 TMHMM 程序的分析结果显示, 苏香 *B* 位点中的 3 个信息素受体 *LErcb1-SUP2*, *LErcb2-SUP2* 和 *LErcb3-SUP2* 均具有 7 次跨膜结构域, 这种蛋白质二级结构是高等真菌信息素受体的共同特性 (Kothe 1996), 3 个信息素受体均含有担子菌的信息素受体的保守片断 PWHQAW 和 VQGHFR。

担子菌的信息素前体一般由 20 多个氨基酸残基构成, 但是编码信息素前体的基因序列很短, 且变异性很高, 因此很难通过 BlastX 方法找到该基因的同源物。但是信息素前体的氨基酸序列有一些非常保守的功能基序 (CaaX 基序、EA 基序和 AF 基序) (Meritxell *et al.* 2005), 通过寻找这些基序将有助于判定信息素前体的编码基因。借助寻找基序序列, 我们在苏香 *B* 位点中共确定了 4 个信息素前体的编码基因, 其中两个位于信息素受体编码基因

表 2 香菇苏香 SUP2 菌株的 *B* 交配型位点及其上下游区域中的同源基因

Table 2 Putative homologue genes identified at the *B* mating type locus of *Lentinula edodes* strain Suxiang SUP2

基因 Gene	位置 Position	同源基因 Homologue gene			
		编码蛋白 Protein encoded	GenBan 登录号 GenBank accession No.	E 值 E value	比特分数 Bits score
<i>LEB-up1</i>	296-1344	<i>Laccaria bicolor</i> predicted protein	EDR12739.1	9e ⁻⁵³	193
<i>LEphb1-SUP2</i>	5835-5987	/	/	/	/
<i>LEphb2-SUP2</i>	7221-7400	/	/	/	/
<i>LErcb1-SUP2</i>	7951-9140	<i>Laccaria bicolor</i> STE3-like pheromone receptor	EDR00817.1	6e ⁻⁶⁶	141
<i>LErcb2-SUP2</i>	11843-13032	<i>Laccaria bicolor</i> STE3-like pheromone receptor	EDR00817.1	7e ⁻⁷³	124
<i>LEphb3-SUP2</i>	13685-13867	/	/	/	/
<i>LEphb4-SUP2</i>	15069-15224	/	/	/	/
<i>LEB-m1</i>	17088-18863	<i>Laccaria bicolor</i> predicted protein	EDR06343.1	1e ⁻¹⁴²	513
<i>LEB-m2</i>	23724-25244	<i>Laccaria bicolor</i> predicted protein	EDR00821.1	6e ⁻³⁹	168
<i>LErcb3-SUP2</i>	29812-31031	<i>Coprinopsis cinerea</i> pheromone B alpha 1 receptor	EAU87392.2	8e ⁻¹⁰²	208
<i>LEB-dn1</i>	31733-33318	<i>Schizophyllum commune</i> hypothetical protein	EFI99211.1	8e ⁻⁵⁷	166

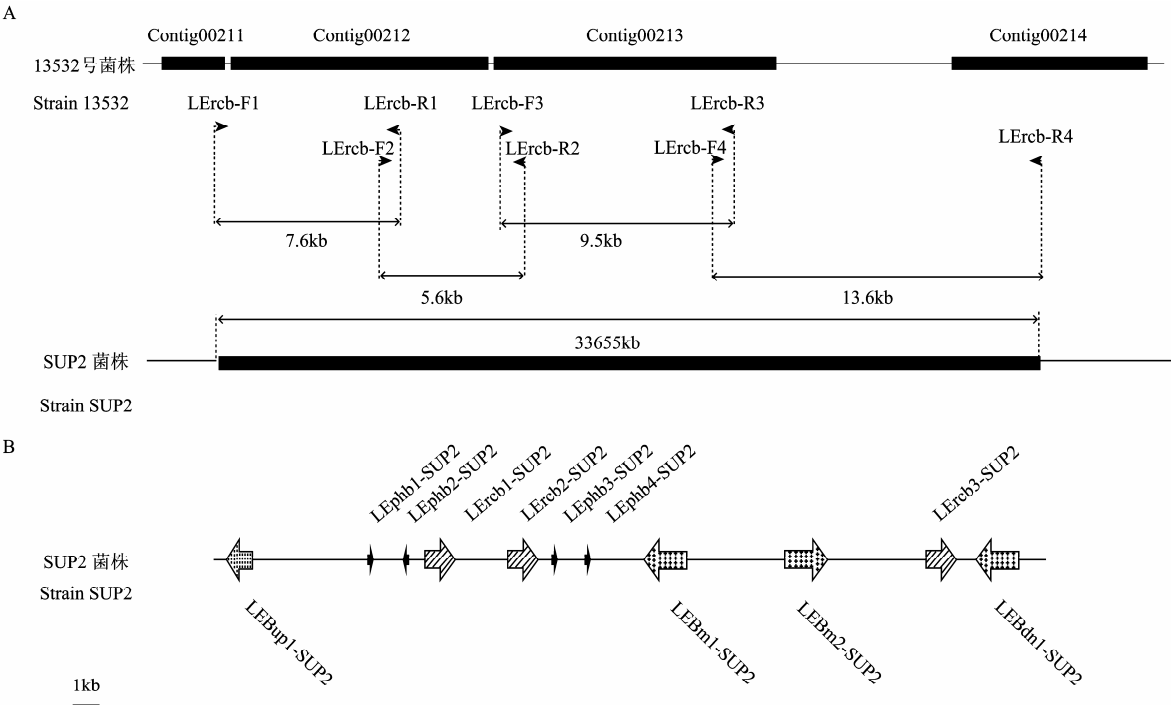


图 1 香菇苏香 *B* 交配型位点分子遗传学结构示意图 A: 本研究中所设计的引物以及扩增片段的相对位置; B: 苏香 *B* 交配位点及其上下游区域中的基因的相对位置和编码方向.

Fig. 1 Schematic for molecular genetic structure of the *B* mating type locus of *Lentinula edodes* strain Suxiang. A: Relative positions of designed PCR primers and amplified DNA fragments in this study; B: Order and orientation of genes at the *B* mating type locus region.

LErcb1-SUP2 的上游, 命名为 *LEphb1-SUP2* 和 *LEphb2-SUP2*, 分别编码含有 50 个氨基酸残基和 59 个氨基酸残基的多肽。另外两个位于 *LErcb2-SUP2*

的下游, 命名为 *LEphb3-SUP2* 和 *LEphb4-SUP2*, 分别编码 60 个氨基酸残基和 51 个氨基酸残基的多肽 (图 2)。

```

LEphb1-SUP2  MDSFTSFEALISTSTST-----DDSSLA-LNDVEHHP---SVPVNSEAGG--GDAIAF-CVIS 51
LEphb2-SUP2  MDSFTLFQAPCSTTSSTLNHGSLDDAALPPIPNEDGSPL--SLPVDSEAVGS-GDIIGF-CVIL 60
LEphb3-SUP2  MDVFISLDLPSLTLTH----AVESVAADEISPFTSPASDAVPVAMEHDTSDSGYTG-CVVA 59
LEphb4-SUP2  MDVFEPFESVA-----ELSATKCTHISVAVD--TIPIDMEHDTADSTNIGYACVVA 59
          ** *   : :           . :           : : * : *   .   . : ** :

```

图 2 苏香菌株 *B* 交配型位点中编码的 4 个信息素前体的氨基酸序列的比对 斜体字母显示担子菌信息素前体中的保守基序。

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of pheromone precursor at the *B* mating type locus of *Lentinula edodes* strain Suxiang. Italic letters show conserved motifs of pheromone precursor of basidiomycetes.

在所发现的 4 个信息素前体序列 (GenBank No.: HQ130487) 中, C 末端均存在 CaaX 基序 CVVA/CVIL/CVIS, 该基序在蛋白质翻译后的异戊二烯化修饰作用中作为识别信号 (Suzanne *et al.* 1998)。在 4 个 CaaX 基序的上游都紧密连着两个保守的氨基酸残基 YA/GY/GF/AF, 这是由脂肪簇氨基酸残基和芳香簇氨基酸残基构成的 AF 基序, 这个基序被认为可能决定信息素成熟多肽的特异性 (John *et al.* 1999)。在 CaaX 基序上游 9-12 的位置存在 EH/EA 基序, 该基序一般由酸性氨基酸残基和碱性氨基酸残基组成, 该位置认为是由信息前体生成成熟信号肽的分裂位点 (Casseltan & Olesnicky 1998)。在分裂位点上游-4 位置上一般存在一个 P, 在-2 位置上存在 D/N, 这些保守位点在信息素成熟多肽的加工过程中作为标志位点 (Meritzell *et al.* 2005)。

3 讨论

本实验室在前期的研究中采用染色体步行的方法克隆香菇 *B* 交配型位点的序列, 虽然该技术路线被证明可行, 并成功地获得了一个信息素受体和一个信息素前体编码基因 (李苏等 2009), 但是该方法耗时费力, 很难在短时间里获得大量未知 DNA 序列的信息, 因而不是非常适用于研究长片段 DNA 序列。担子菌的 *B* 交配型位点的长度通常大于 15kb, 如灰盖鬼伞至少有 17kb (Kothe 1996), 双色蜡膜至少有 20kb (Niculita-Hirzel *et al.* 2008)。为了尽快了解香菇 *B* 交配型位点的分子遗传学结

构, 本实验室对香菇 135 菌株的单核体进行了全基因组测序, 在所获得的 DNA 序列中搜索担子菌 *STE-3* 的同源序列, 然后根据所得到的 contig 序列设计合适的引物, 再从另外一种常见的香菇菌株苏香的单核体中扩增 *B* 交配型位点序列。从本研究所获得的结果来看, 该技术路线是成功的, 在较短时间就可以对苏香的单核体 *B* 交配型位点的分子遗传学结构有了很明确的了解, 所采用的技术路线和所设计的 PCR 引物可以再运用于其他香菇菌株的相关研究中。

担子菌的 *B* 交配型位点是一个非常大的基因簇, 包含有多个信息素受体编码基因和多个信息素前体编码基因, 在分子遗传学结构上常常表现为一个信息素受体编码基因和 2-3 个信息素前体编码基因构成一个亚位点, 如灰盖鬼伞、裂褶菌和双色蜡膜。对香菇苏香菌株 *B* 位点的研究表明, 两个信息素受体编码基因 (*LErcb1-SUP2*, *LErcb2-SUP2*) 附近分别有两个信息素前体编码基因 (*LEphb1-SUP2* 和 *LEphb2-SUP2*, *LEphb3-SUP2* 和 *LEphb4-SUP2*), 从而构成两个非常典型的担子菌 *B* 交配型位点的亚单位。这说明香菇的 *B* 交配型位点具有担子菌的 *B* 交配型位点的共同结构特性。

本研究的结果还表明, 香菇 *B* 交配型位点的分子遗传学结构虽然有着典型的担子菌 *B* 交配型位点结构, 但是还是具有一些异常的结构特点。如信息素受体编码基因不是连续排列的, 而是在其串联结构中插入了一些其他基因 *LEBm1-SUP2* 和 *LEBm2-SUP2*。这说明香菇 *B* 交配型位点在进化中

可能发生过较大的基因转座或者基因插入等染色体变异。在我们先前对香菇 *A* 交配型位点的研究中, 同样发现香菇 *A* 交配型位点周边的基因也存在染色体变异现象, 导致 *A* 交配型位点附近的基因顺序与其他担子菌的相应结构有很大不同(张美彦等 2009)。这些结果暗示香菇可能与灰盖鬼伞、裂褶菌等担子菌在进化过程中分化的年代比较久远, 因而有足够的时间进化出不同的交配型位点的分子遗传学结构。再如, 在香菇 *B* 位点中, 有一个信息素受体 *LErcb3-SUP2* 周边没有找到信息素前体编码基因, 这与担子菌 *B* 交配型位点中的典型结构(信息素受体编码基因和信息素前体编码基因配套存在)是不一致的, 而这种典型结构正是 *B* 交配型因子起调控作用的物质基础。我们推测, 一个信息素受体如果没有与之配套的信息素前体, 那么这个信息素受体可能在进化中已经失去相应的功能, 对 *B* 交配型因子的类型不起决定作用。

本研究首次从香菇中获得了比较完整的 *B* 交配型位点的分子遗传学结构。这是在分子水平上了解香菇交配型基因的一次飞跃。这将为进一步阐明香菇交配型多样性的分子机制, 以及利用香菇交配型的多样性来鉴定香菇菌种奠定了物质基础。

[REFERENCES]

- Bao DP, Chen MJ, Zhang MY, 2007. Cloning and sequencing of a putative mitochondrial intermediate peptidase gene fragment from the edible fungus *Lentinula edodes*. *Acta Edulis Fungi*, 14(4): 1-4 (in Chinese)
- Casselton LA, Olesnick NS, 1998. Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 55-70
- Fowler TJ, Mitton MF, Vaillancourt LJ, Raper CA, 2001. Changes in mate recognition through alterations of pheromones and receptors in the multisexual mushroom fungus *Schizophyllum commune*. *Genetics*, 158: 1491-1503
- John RH, Michael JM, Lorna AC, 1999. Three subfamilies of pheromone and receptor genes generate multiple *B* mating specificities in the

mushroom *Coprinus cinereus*. *Genetics*, 154: 1115-1123

- Kothe E, 1996. Tetrapolar fungal mating types: sexes by thousands. *FEMS Microbiology Reviews*, 18: 65-87
- Li S, Bao DP, Zhang MY, Chen MJ, 2009. Molecular genetic structure of the *B* mating-type locus of *Lentinula edodes* I. Cloning and sequence analysis of pheromone receptor gene and pheromone precursor gene. *Mycosystema*, 28(3): 422-427 (in Chinese)
- Meritxell R, Michael PC, Lorna AC, Andrew JB, 2005. The origin of multiple *B* mating specificities in *Coprinus cinereus*. *Genetics*, 170: 1105-1119
- Niculita-Hirzel H, Labbe J, Kohler A, le Tacon F, Martin F, Sanders IR, Kues U, 2008. Gene organization of the mating type regions in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* reveals distinct evolution between the two mating type loci. *New Phytologist*, 180: 329-342
- Suzanne FO, Pushpalata TC, John RH, 1998. A large pheromone and receptor gene complex determines multiple *B* mating type specificities in *Coprinus cinereus*. *Genetics*, 148: 1081-1090
- Zhang H, Qin LH, Tan Q, 2006. Extraction of genomic DNA from *Lentinula edodes* using the CTAB method. *Journal of Shanghai University (Natural Science Edition)*, 12: 547-550 (in Chinese)
- Zhang MY, Bao DP, Chen MJ, Shang XD, Tan Q, 2009. Cloning of a mitochondrial intermediate peptidase gene and closely linked genes from *Lentinula edodes*. *Acta Edulis Fungi*, 16(2): 21-25 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 鲍大鹏, 陈明杰, 张美彦, 2007. 香菇编码线粒体中间肽酶的基因片段的克隆及序列测定. 食用菌学报, 14(4): 1-4
- 李苏, 鲍大鹏, 陈明杰, 2009. 香菇 *B* 交配型位点的分子遗传学结构研究 I. 信息素受体和信息素前体编码基因的克隆和序列分析. 菌物学报, 28(3): 422-427
- 张红, 秦莲花, 谭琦, 2006. 用改进的 CTAB 法提取香菇基因组 DNA. 上海大学学报(自然科学版), 12(5): 547-550
- 张美彦, 鲍大鹏, 陈明杰, 尚晓东, 谭琦, 2009. 香菇编码线粒体中间肽酶 *le-mip* 基因及其紧密连锁基因的克隆. 食用菌学报, 16(2): 21-25