

猪肚菇担孢子交配型的分析

董洪新^{1,2} 蔡德华^{1*} 李玉²

(1. 鲁东大学生命科学学院 山东 烟台 264025)

(2. 吉林农业大学菌物研究所 吉林 长春 130118)

摘要: 以 3 个不同的猪肚菇菌株为材料, 采用三轮杂交系统研究了其担孢子的交配型。显微镜观察表明, 1 个担子上着生有 4 个担孢子。交配型测定结果表明, 猪肚菇属四极性异宗结合。 χ^2 测验结果显示, 2 个菌株的 4 种交配型孢子单核体的比例符合 1:1:1:1 的分离规律, 1 个菌株的担孢子交配型不呈预期的分离比。

关键词: 猪肚菇, 担孢子, 交配型, 四极性

Analysis of Mating Types of Basidiospores in *Panus giganteus*

DONG Hong-Xin^{1,2} CAI De-Hua^{1*} LI Yu²

(1. College of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China)

(2. Institute of Mycology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: Four mating types of basidiospores were determined by using three-cycle mating system, three strains of *Panus giganteus* were used as test materials. Microscopical examination revealed that basidia of *P. giganteus* produced four basidiospores. The results of mating tests showed that *P. giganteus* has a tetrapolar heterothallism mating system. χ^2 tests indicated that the distribution of the four mating types among spore monokaryons was in accordance with the 1:1:1:1 law of segregation in two strains, but one strain did not display the expected segregation ratio of basidiospores.

Keywords: *Panus giganteus*, Basidiospores, Mating type, Tetrapolar

猪肚菇 [*Panus giganteus* (Berk.) Corner] 又名巨大革耳、大杯香菇, 隶属于担子菌门 (Basidiomycota)、担子菌纲 (Basidiomycetes)、多孔菌目 (Polyporales)、多孔菌科 (Polyporaceae)、革耳属 (*Panus*)^[1]。猪肚菇是国内近年来新开发的一种珍稀食用菌, 其口感风味独特, 有猪肚般的滑腻, 猪肚菇营养丰富, 其生长条件粗犷, 适用原料广泛, 且在夏季出菇, 对于解决食用菌生产淡季和调节市场供应很有意义, 具有广阔的开发应用前景^[2]。

关于猪肚菇的生物学特性、营养价值和栽培技术等方面的研究有一定的报道^[3-5], 但对其遗传育种方面的研究近乎空白。交配型研究是食用菌育种研究的重要遗传基础, 了解食用菌交配系统的特性在遗传和育种上有着重要实际意义。近年来, 许多珍稀栽培食用菌的交配型相继得到了研究, 如杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*)^[6]、黄伞 (*Pholiota adiposa*)^[7]、白灵菇 (*Pleurotus nebrodensis*)^[8]、大球盖菇 (*Stropharia rugosoannulata*)^[9]、金福菇 (*Macrocybe gigantea*)^[10]、

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (No. 2008BADA1B04); 山东省农业良种工程项目 (No. 2008LZ-008)

* 通讯作者: Tel: 86-535-6672736; E: caidehua007@163.com

收稿日期: 2010-03-10; 接受日期: 2010-08-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*)^[11]、鸡腿菇(*Coprinus comatus*)^[12]、长根菇(*Oudemansiella radicata*)^[13]等,为进一步深入开展食用菌的遗传育种研究提供了依据。本研究采用交配型分析的常规程序鉴定猪肚菇的交配系统,旨在为今后猪肚菇的遗传基础研究和育种工作提供相应的参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

猪肚菇菌株 LD-1、LD-2、LD-3 均由鲁东大学食用菌工程技术研究中心提供。

1.2 培养基

斜面培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA);栽培培养料配方:棉籽壳 83%,麸皮 15%,石灰 2%,含水量 63%,pH 自然。

1.3 子实体培养

将培养料按照常规方法拌料、装袋,灭菌、接种和培养至菌丝满袋后移入栽培室,采用袋内覆土出菇,覆土厚度 3 cm–4 cm。栽培室温度控制在 23°C–32°C,空气相对湿度控制在 90%–92%之间。

1.4 担孢子着生形态的观察

采用徒手切片的制作方法,用显微镜观察菌褶边缘担孢子的着生情况^[14]。

1.5 担孢子的收集和单核体分离

每种供试菌株分别挑选一个新鲜成熟的子实体,采用孢子弹射法收集担孢子,常规稀释法制备孢子悬浮液^[15],采用倒置显微镜单孢分离法分离单孢^[16]。将分离的单孢转至 PDA 斜面,培养 1 周后,挑取前端菌丝镜检,无锁状联合者即为单核菌丝体。将 LD-1、LD-2 和 LD-3 3 种菌株的单核体分别记为 I 组、II 组和 III 组并分别编号。

1.6 交配型分析

采用 3 轮杂交系统试验^[7],以 LD-1 菌株的 I 组单核体为材料进行交配试验。第 1 轮:从 I 组单核体中挑出一株表现正常的 T₂ 菌株与其余单核体菌株交配,得到与 T₂ 交配亲和的第 1 组单核体和其余不亲和的单核体;第 2 轮:从第 1 组单核体中随机挑选出一株 T₁ 菌株与第 1 轮中不亲和的单核体交配,得到与 T₁ 亲和的第 2 组单核体(以菌株 T₂ 为代表)和其余不亲和的单核体;第 3 轮:从第 2 轮与 T₁ 不亲和的一组菌株中随机挑选出菌株 T₄ 与这一组其余的单核体进行交配,得到与 T₄ 亲和的第 3 组单核体和其

余不亲和的第 4 组单核体。上述的第 1、2、3、4 组单核体分别是经过有性世代后具有不同交配型因子的孢子单核体组群。以 I 组获得的 T₁、T₂ 和 T₄ 单核体作为标准菌株与 II 组和 III 组的单核体分别进行杂交,同样得到 II 组和 III 组的 4 种孢子单核体数目。

1.7 交配型测定结果的验证

从 I 组的第 3 组单核体中随机挑出一株 T₃ 菌株,与获得的 T₁、T₂ 和 T₄ 单核体进行两两交配;II 组和 III 组的 4 组单核体菌株中分别随机选出一株进行两两交配,做进一步的验证^[17]。

1.8 单核体菌株交配型的确定

根据标准型四极性交配反应的特点,让 T₁、T₂、T₃ 和 T₄ 进行两两配对,再根据交配反应类型(亲和反应-形成锁状联合、平贴反应和栅栏反应),来确定单核体的交配型。拟定 T₁ 交配型为 A₁B₁,则 T₂ 的交配型为 A₂B₂,与 T₁ (A₁B₁)交配形成平贴菌落的菌株,交配型为 A₁B₂,与 T₁ (A₁B₁)交配形成栅栏菌落的菌株,交配型为 A₂B₁;反之,与 T₂ (A₂B₂)交配形成平贴菌落的菌株,交配型为 A₂B₁,与 T₂ (A₂B₂)交配形成栅栏菌落交界的菌株,交配型为 A₁B₂^[18]。

1.9 交配型实测比例的 χ^2 测验

确定担孢子 4 种交配型是否符合预期的 1:1:1:1 之比,用公式进行 χ^2 测验,式中 *O* 和 *E* 分别代表担孢子 4 种交配型试验观测值和理论预期值^[19]。

2 结果与分析

2.1 担孢子着生方式的观察

将猪肚菇菌褶的徒手切片置于光学显微镜下观察,发现猪肚菇 1 个担子上着生有 4 个孢子梗(图 1A),从孢子梗上弹射下来的担孢子呈现椭圆形或卵圆形(图 1B)。

2.2 单核体的检出

猪肚菇的双核菌丝具有典型的锁状联合(图 2A)。以锁状联合为标记,从 I 组孢子萌发菌丝体中获得 22 株单核体;从 II 组孢子萌发菌丝体中获得 65 株单核体;从 III 组孢子萌发菌丝体中获得 91 株单核体。根据经典四极性异宗配合理论,每一菌株都可产生 4 种不同极性的担孢子,只要供试单核体的数量大于 21,即可保证 4 种交配型全部出现的概率为 99%以上^[7]。以上供试 3 种菌株的孢子单核体数量均大于 21,能够保证 4 种交配型全部出现的概率。

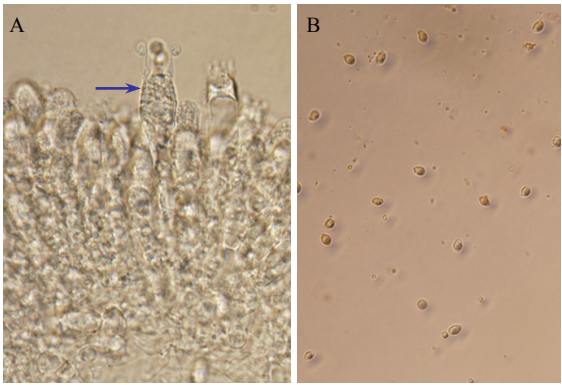


图1 猪肚菇的担子和担孢子($\times 400$)
Fig. 1 Basidia and basidiospores of *P. giganteus* ($\times 400$)
注: A: 担子; B: 担孢子.
Note: A: Basidia; B: Basidiospores.

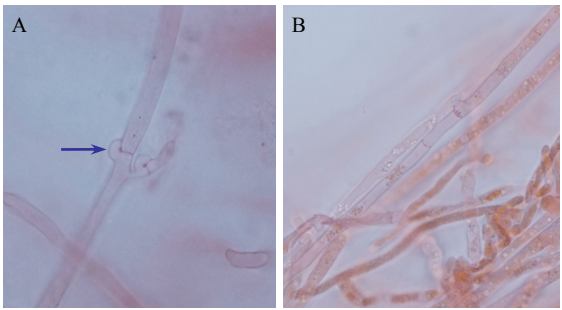


图2 猪肚菇菌丝的显微特征($\times 1000$)
Fig. 2 Mycelia micromorphology of *P. giganteus* ($\times 1000$)
注: A: 双核菌丝(箭头示锁状联合); B: 单核菌丝.
Note: A: Dikaryotic hypha (arrow showing clamp connection); B: Monokaryotic hypha.

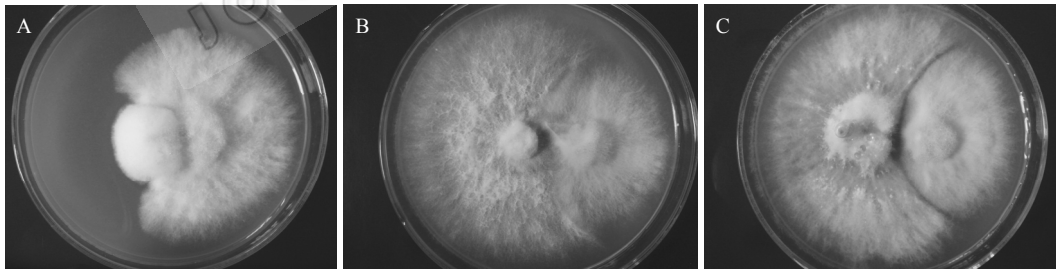


图3 不同孢子单核体配对的反应类型

Fig. 3 Mating type reactions of basidiospore monokaryons

注: A: 亲和反应; B: 平贴反应; C: 栅栏反应.
Note: A: "Compatible" reaction; B: "Flat" reaction; C: "Barrage" reaction.

3 结论与讨论

四极性异宗结合交配系统是由2对性因子(A因子和B因子)所控制。2对交配因子在减数分裂时独立分离和自由组合,每个担子仅产生4个担孢子,其中2个担孢子的交配型是 A_1B_1 ,另外2个则是 A_2B_2 ;或者2个担孢子是 A_2B_1 ,另外2个是 A_1B_2 。

2.3 交配结果分析

拟定 T_1 交配型为 A_1B_1 ,则 T_2 的交配型为 A_2B_2 ,根据3轮交配和 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 两两配对所形成的亲和反应、平贴反应和栅栏反应(图3)的结果,推定 T_3 交配型为 A_2B_1 , T_4 交配型为 A_1B_2 ,试验证明猪肚菇的交配型受A和B双因子控制,属于四极性异宗结合交配系统。

2.4 担孢子交配型的种类和比例

供试3种菌株孢子单核体交配型比例见表1。经 χ^2 测验显示,在经过有性生殖减数分裂后形成的担孢子中,LD-1与LD-3这2个菌株实际得到的 A_1B_1 、 A_2B_2 、 A_2B_1 和 A_1B_2 4种交配型的比例与预期的1:1:1:1比例基本相符,符合孟德尔的分离规律。但是LD-2菌株的实测比例与预期比例相比则出现了严重的偏离($\chi^2 = 20.72$)。

表1 孢子单核体交配型分析					
Table 1 Mating type analysis of spore monokaryons					
菌株 Strains	$T_1 (A_1B_1)$	$T_2 (A_2B_2)$	$T_3 (A_2B_1)$	$T_4 (A_1B_2)$	χ^2
LD-1	3	5	6	8	2.36
LD-2	22	28	5	10	20.72
LD-3	31	24	13	23	7.24

Note: $\chi^2_{0.05,3} = 7.81$.

一个子实体弹射的担孢子的交配型有4种,即 A_1B_1 、 A_2B_2 、 A_2B_1 和 A_1B_2 。只有A、B两个因子均不相同,才能完成有性生殖。其中A因子控制菌丝的融合,B因子控制核的迁移^[20]。具锁状联合的菌落由已在常规交配型分析中探明的可亲和组合产生,其交配反应为 $A \neq B \neq$ 。形成无锁状联合的栅栏型菌落,具有通常标志核迁移受阻的“栅栏”状形态,可以推断

其交配反应为 $A \neq B$ 。本研究通过交配反应菌落类型初步鉴定了猪肚菇担孢子的 4 种不同交配型, 林芳灿等^[15]用核迁移的方法研究过香菇(*Lentinula edodes*)的交配型的准确鉴定问题, 程莉等^[19]用橡树木屑浸汁琼脂-榨桔汁琼脂培养基转换技术(OWE-SOJ)鉴定了糙皮侧耳交配型, 这两种方法在猪肚菇中应用是否可行有待于今后继续探讨。

单核单倍体的担孢子是有性生殖过程中减数分裂的自然产物, 这一过程没有人为因素的介入, 4 种不同交配型担孢子的预期比例应为 1:1:1:1。本文确证猪肚菇担孢子中 4 种交配型的实得比例与理论比例普遍存在偏分离现象, χ^2 测验的结果表明, 担孢子 4 种交配型实际比例与预期比例偏离的菌株有 1 个, 这种担孢子中不同程度地存在交配型偏分离的现象在其他食用菌中也有报道^[7,19], 其机理有待进一步研究。

本研究还发现, 猪肚菇担孢子不同单核体之间在菌丝生长速度和菌丝生长势等培养性状方面存在一定程度的多态性, 有的菌丝生长速度较快, 菌落表现为气生菌丝多; 有的相对较慢, 菌丝贴壁性强。由于担孢子单核体是减数分裂的产物, 经过亲本 DNA 的交换和重组, 菌株之间会产生较明显的遗传差异, 这种菌丝生长速度和菌落表型的差别是否与其交配型有关尚有待研究, 今后进一步研究孢子单核体之间遗传性状的多态性和探讨这些遗传性状在杂交育种理想亲本选择上的应用, 具有重要的理论意义和实际意义。

参 考 文 献

- [1] 邓旺秋, 李泰辉, 陈枝南, 等. 栽培食用菌猪肚菇的学名考证. 食用菌学报, 2006, 13(3): 71-74.
- [2] 黄年来等编著. 18 种珍稀美味食用菌栽培. 北京: 中国农业出版社, 1997: 121.
- [3] 曾金凤. 大杯伞生物学特性研究. 食用菌学报, 1996, 3(1): 13-20.
- [4] 彭智华, 龚敏方. 大杯蕈的营养价值及生物学特性研究. 浙江农业学报, 1994, 6(3): 165-170.
- [5] 吴少凤, 陈琦辉, 袁兰. 大杯蕈生物学特性及标准化栽培技术研究. 菌物学报, 2005, 24(增刊): 260-263.
- [6] Yasushi O, Shigeyuki M, Teruyuki M, et al. The mating system and analysis of incompatibility factors in *Pleurotus eryngii*. *Bulletin of the Nara Forest Research Institute*, 2004(33): 1-5.
- [7] 季哲, 李玉祥, 薛淑玉. 黄伞的交配型性状研究. 菌物学报, 2004, 23(1): 38-42.
- [8] 尚晓冬, 李明容, 邢增涛, 等. 白灵侧耳交配型遗传研究. 食用菌学报, 2006, 13(2): 1-4.
- [9] 汪虹, 曹晖. 大球盖菇交配系统的研究. 食用菌学报, 2006, 13(2): 9-11.
- [10] 傅俊生, 蔡衍山, 柯丽, 等. 金福菇的交配型研究. 食用菌学报, 2007, 14(3): 10-12.
- [11] 刘明广, 冯志勇, 霍光华, 等. 真姬菇交配型研究. 食用菌学报, 2008, 15(1): 11-13.
- [12] 尹清玉, 李林辉. 鸡腿菇交配型的初步研究. 中国食用菌, 2008, 27(2): 13-15.
- [13] 王守现, 刘宇, 耿小丽, 等. 长根菇交配系统研究. 安徽农业科学, 2009, 37(26): 12547-12548.
- [14] 杨新美主编. 食用菌研究法. 北京: 中国农业出版社, 1998: 6-8.
- [15] 林芳灿, 张树庭. 中国香菇栽培菌株不亲和性因子的分析. 华中农业大学学报, 1995, 14(5): 459-466.
- [16] 谢宝贵. 倒置显微镜单孢分离法. 中国食用菌, 1997, 16(1): 35.
- [17] 姚方杰, 张友民, 李玉. 白灵侧耳交配系统特性的研究. 菌物学报, 2005, 24(4): 69-72.
- [18] 吕作舟主编. 食用菌栽培学. 北京: 高等教育出版社, 2006: 67.
- [19] 程莉, 李安政, 林范学, 等. 糙皮侧耳担孢子交配型的鉴定. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1086-1089.
- [20] 张树庭, 林芳灿. 蕈菌遗传与育种. 北京: 中国农业出版社, 1997: 72-74.