

利用 SSR 标记鉴定香菇单核体及杂交后代

巫萍^{1,2} 章炉军² 张丹² 尚晓冬² 谭琦² 宋春艳^{2*}

(1. 南京农业大学生命科学学院 江苏 南京 210095)

(2. 上海市农业科学院食用菌研究所 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 国家食用菌工程技术研究中心
国家食用菌加工技术研发分中心 上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海 201403)

摘要:【目的】研究简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR)分子标记方法用于香菇原生质体单核体、孢子单核体及其杂交后代的分离和鉴定。【方法】利用基于香菇全基因组序列信息开发的 SSR 标记,分析由香菇品种“L808”双核菌丝制备的原生质体单核体、孢子单核体及其杂交后代的 SSR 指纹。【结果】对制备的原生质体单核体的鉴定中,在未经过杂交配对的情况下,鉴定出“L808”的两种不同极性的原生质体单核体,其分离比例为 191:1,该鉴定结果得到 SSR 标记、随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)标记及传统方法的验证。另外,开发的香菇 SSR 标记还能以多位点组合的方式,用于对孢子单核体及其杂交后代的鉴定。【结论】应用 SSR 标记可加快香菇单核体的制备进程,并提高鉴定单核体及相关杂交菌株的准确性,促进香菇遗传育种研究。

关键词: 简单重复序列, 香菇, 原生质体单核体, 随机扩增多态性 DNA, 孢子单核体, 杂交子鉴定

Identification of Xianggu (*Lentinula edodes*) monokaryons and hybrid progenies using SSR markers

WU Ping^{1,2} ZHANG Lu-Jun² ZHANG Dan² SHANG Xiao-Dong² TAN Qi²
SONG Chun-Yan^{2*}

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agriculture University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(2. Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, P. R. China; National Engineering Research Center of Edible Fungi, National R&D Center for Edible Fungi Processing, Key Laboratory of Agriculture Genetics and Breeding of Shanghai, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)

Foundation item: Modern Agriculture Industry Technical System, Ministry of Agriculture of China (No. CARS-24); The Seed Special Program, Shanghai Municipal Agriculture Commission (No. 6-2012); Shanghai Scientific and Technological Talents Program (No. 13XD1424700)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-62209760; E-mail: s62209760@163.com

Received: April 20, 2015; **Accepted:** July 17, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 14, 2015

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(No. CARS-24); 上海市农委种业专项项目(No. 沪农科种字(2012)第 6 号); 上海市科技人才计划项目(No. 13XD1424700)

***通讯作者:** Tel: 86-21-62209760; E-mail: s62209760@163.com

收稿日期: 2015-04-20; **接受日期:** 2015-07-17; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-14

Abstract: [Objective] Simple sequence repeat (SSR) molecule markers were used to separate and identify protoplast monokaryons, sporulated monokaryons and their hybrid progenies of two Xianggu (*Lentinula edodes*) strains. [Methods] SSR primers developed from the whole genome sequence of Xianggu were used to identify the genotypes of different monokaryons and hybrids, and then to separate them according different genotype information. [Results] Employing Lefp-55 SSR markers, we obtained both protoplast monokaryons of strain “L808” without matching crossing of monokaryons, and we found the segregation ratio of both protoplast monokaryons was high to 191:1. This result was confirmed by other SSR markers, random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and traditional method. In the identification of sporulated monokaryons and their hybrid progenies, cooperation of several SSR markers was able to identify numerous hybrids, and it was useful in genetic and breeding research. [Conclusion] Protoplast monokaryons separation would be fast and accurate by using SSR markers, which also can be used in identification of sporulated monokaryons and their hybrid progenies of Xianggu in relevant genetic and breeding research.

Keywords: Simple sequence repeat, *Lentinula edodes*, Protoplast monokaryons, Random amplified polymorphic DNA, Spore monokaryons, Identification of hybrids

在食用菌的遗传和育种研究中, 单核体的获取是一项重要的基础工作, 通常用分离单核担孢子和原生质体单核化的方法分别获得孢子单核体和原生质体单核体。原生质体单核体不经过有性生殖过程, 直接将双核体亲本的两个核通过物理手段和酶处理的方式进行分离, 更好地保持了亲本的性状, 其作为重要的遗传和育种材料, 在食用菌研究中运用广泛^[1-3]。目前食用菌原生质体单核体制备中的筛选环节, 通常都是通过光学显微镜观察锁状联合来排除双核体菌丝, 再通过单核体菌丝间配对杂交, 观察出现锁状联合来确定获得了双核体中的两个不同极性的原生质体单核体^[4]。在整个制备过程中, 配对杂交和显微观察环节耗时最长、投入工作量最多, 并且容易出现误检, 且该方法仅对香菇、平菇等双核体菌丝具有锁状联合的食用菌有效, 应用范围受到限制。用一种快速、准确的方法取代原来的显微观察方法将大大缩短原生质体单核体制备的时间并提高其准确性^[5]。孢子单核体由于经过染色体的交换和重组, 亲本的性状在后代中分离变异, 形成带有亲本基因型各种组合的众多后代, 对其逐一鉴定的难度相对较大^[6], 可采用共显性分子标记对某些位点进行标记的方法研究其在后代中的分布规律及对杂交后代的影响。许占伍等证实特异 SSR 标记 H35 在真姬菇“SIEF3133”及其原生质体单

核体(交配型 A2B2)、部分孢子单核体中有分布, 并能追踪具有该标记单核体的杂交子^[7]。

SSR 标记可根据不同单核体相同位点扩增片段的大小差异或有无, 准确地将单核体及其双核体亲本分开。本文的 SSR 标记开发自香菇(*Lentinula edodes*)全基因组序列, 均匀分布于整个基因组中, 对香菇的基因组具有广泛的代表性, 并且具有共显性、稳定性、易操作性、多态性高的特点, 用于菌种鉴定具有较大的优势^[8-9]。本文利用 SSR 分子标记方法鉴定不同核型的香菇原生质体单核体; 此外, 还研究了 SSR 标记对孢子单核体及其杂交后代的鉴定, 监测多个位点在杂交后代中的传递等方面的内容, 并对 SSR 标记在香菇遗传和育种工作中的作用和前景进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 菌株

香菇(*L. edodes*)栽培菌株“L808”和“18”, 保藏于上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心, 菌种保藏编号分别为 4627 和 4659。

“L808”的 7 个孢子单核体 L808SM-9、L808SM-34、L808SM-46、L808SM-52、L808SM-58、L808SM-91 和 L808SM-120 以及“18”的 7 个孢子单核体 18SM-9、18SM-34、18SM-46、18SM-52、18SM-58、18SM-91 和 18SM-120 来自上海市农业

科学院食用菌研究所育种室。

1.2 引物

SSR 引物开发自香菇全基因组序列，经过多个香菇栽培及野生菌株的多态性检验后选取具有多态性且多拷贝的 15 对引物^[9]，RAPD 引物来自上海生工生物股份有限公司合成的随机引物 S1 系列，本文所用引物序列见表 1。

1.3 “L808”原生质体单核体的制备

原生质体的制备参考文献[10]的方法，并做以下修改：将制备好的原生质体悬液涂布在 PDMS 培养基(g/L, 土豆 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, 蔗糖 200,

定容至 1 L)上，25 ℃ 遮光培养 5 d。待 PDMS 培养基上长出微小的(直径 1–2 mm)星芒状菌落，则将整个菌落挑至 PDA 培养基(g/L, 土豆 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20，定容至 1 L)上培养。菌落扩大到直径为 2–3 cm 时进行单核体显微鉴定，将没有观察到锁状联合的菌株当作待鉴定的原生质体单核菌株，以 L808PM-X 的形式编号备用。

1.4 SSR 引物筛选

选取两株制备好的待鉴定原生质体单核体 L808PM-1、L808PM-203 及其亲本“L808”菌株，采用 DNA 快速制备法获得用于 PCR 反应的 DNA 样

| 表 1 引物信息 Table 1 Primers used in this study | | | |
|--|------------|----------------------|---|
| 引物类型 Primer type | 名称 Name | 重复碱基 Repeat motif | 引物序列 Primer sequence (5'→3') |
| SSR | Lefp-41-1 | AGGAT | TCCTTGAAGTTCGGGTCG TGCCAGGTTGTGGTCTAGC |
| | Lefp-56-1 | AGGAT | CATTTGAGGTCTGCGCCTG GGTGTGAAGACCCAGTGATG |
| | Lefp-95-1 | AAATAG | CACCGGTCCGCAAACATTC CGGAAACACCCTCGAAAGG |
| | Lefp-7 | AAC | TCATTACAAGCCCCGATAG TCATTACAAGCCCCGATAG |
| | Lefp-8 | CATC | GAAATTTGCCCAAACGAGA AGGACATTTTCGGATGACTCG |
| | Lefp-43 | ATGGTG | CTCTTTGCACCCTCAACCTC CAGCAGTCTCCTCTTGCTC |
| | Lefp-55 | TCC | AAACACAAGGACAAGGGCAG AACGCCAAAACGTACATTCC |
| | Lefp-56 | TGT | TCGAACGACCAAACCTCTCCT GCCTCGCATTCGTAGACTTC |
| | Lefp-76 | GA | AAGCAGGTCAGAGCAGGTTT ACCGAGAGCAGAGTCGAGAG |
| | Lefp-83 | GA | GGTACGGAGGTCCAAGACAA AGCTTTGATCATCGCATTCA |
| | Lefp-95 | GAA | CAATCATCTGTCGTGAACCG CGAACTCGACGTACCCTCTC |
| | Lefp-116 | TGA | ACCCGGGGGAATCTATAGTG GCGCTGAGATTCTGAATCC |
| | Lefp-126 | AT | GAGCGCTAGCTTCGACATTC TCGCCTTCTCTCTTTTGG |
| | Lefp-157 | TCT | GCGGAGCGATCTTCAGTTAC CAGGAAAAGTACCTTGCGGA |
| | Lefp-167 | AT | TATGTGCTGACAGCCTCCAG TGACATTCGGGTCCTCCTC |
| RAPD | S1456 | | AACGGGCGTC |
| | S1480 | | TTGACCCAG |

品^[11]。采用 14 对具多态性的 SSR 引物进行引物筛选,以选择在“L808”两个核中具有多态性的引物用于单核体的鉴定,供筛选引物包括 Lefp-41-1、Lefp-56-1、Lefp-95-1、Lefp-8、Lefp-43、Lefp-55、Lefp-56、Lefp-76、Lefp-83、Lefp-95、Lefp-116、Lefp-126、Lefp-157 和 Lefp-167。PCR 扩增体系: ddH₂O 3.7 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 0.2 μ L, Taq DNA 酶(Promega) 0.1 μ L, 10 μ mol/L SSR 正向和反向引物各为 1 μ L, DNA 模板 2 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。将 10 μ L PCR 产物与 6 μ L 1 \times 加样缓冲液混匀,置于 95 $^{\circ}$ C 水浴中变性 5 min,变性结束后迅速置于冰水混合物中冷却 5 min,随后取 3 μ L 变性产物于 6%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳。电泳缓冲液为 1 \times TBE,电压 1 000 V,电流 120 mA,电泳时间 45 min。电泳结束后将胶板置于 0.1% AgNO₃ 溶液中染色 8 min,随后于 4% NaOH 和甲醛溶液中显色至条带清晰可见,清水冲洗晾干后用于带型统计。原生质体单核体与亲本“L808”带型可区分的引物对即可用于单核体的鉴定。

1.5 “L808”原生质体单核体的鉴定

将 1.4 中筛选获得的多态性 SSR 引物中的 Lefp-55 作为原生质体单核体鉴定用引物,对所有待鉴定原生质体单核体菌株进行快速 DNA 制备后进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系和反应程序同 1.4 中描述。对扩增结果进行条带统计,计算经显微鉴定后的原生质体单核体菌株中误检的双核体菌株所占的比例以及两种单核体菌株之间的比例。

1.6 “L808”原生质体单核体的验证

为了验证 SSR 分子标记方法鉴定结果的准确性,以及能否采用其他分子标记进行单核体鉴定工作,从经鉴定的原生质单核体菌株中选取鉴定结果为双核体以及两个不同核的单核体菌株,以亲本“L808”为对照进行多个 SSR 标记、RAPD 标记以及传统方法的验证。SSR 标记选用 9 对经过多态性验证的引物对,PCR 扩增及电泳方法同 1.4; RAPD

标记选取两个引物(S1456 和 S1480)进行 PCR 扩增,反应体系包括 ddH₂O 4.7 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 0.2 μ L, Taq DNA 酶(Promega) 0.1 μ L, 10 μ mol/L RAPD 引物 1 μ L, DNA 模板 2 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 92 $^{\circ}$ C 1 min, 37 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min,电泳方法同 1.4 中描述。通过传统镜检、对峙培养方法对 SSR 标记鉴定的原生质体单核体进行验证。

1.7 “L808”和“18”孢子单核体杂交后代鉴定

分别将“L808”和“18”的一个孢子单核体菌块相距 1 cm 接种到同一 PDA 平皿中央,待两者菌落长到一起,并显微观察到锁状联合后,分别在“L808”与“18”孢子单核体菌落的两个外侧各挑出一个菌块转接到新的培养皿上,分别将两个杂交后代命名为 L18-X 和 18L-X,部分平皿因只在“L808”或“18”的一侧观察到锁状联合,因此只挑取了一个杂交后代,命名方式同上。如“L808”孢子单核体 L808SM-9 与“18”孢子单核体 18SM-9 进行配对杂交,在平皿的 L808SM-9 侧挑取到具锁状联合的杂交子编为 L18-9,在 18SM-9 侧挑取的杂交子则编为 18L-9。对挑取的杂交子与其两个孢子单核体亲本,以及孢子单核体获得的亲本“L808”和“18”菌株用随机挑选的 3 个 SSR 标记进行 1.4 所述方法的 PCR 扩增及扩增产物的凝胶电泳,对电泳结果进行统计分析。鉴定杂交后代是否完成对应孢子单核体的杂交过程,观察 SSR 标记在亲本到孢子再到杂交子中的传递,并用 SSR 标记的带型组合来区分不同的杂交子。

2 结果与分析

2.1 “L808”原生质体单核体的制备

“L808”原生质再生菌株经纯化培养与显微观察,将无锁状联合的菌株编号备用,共得到了 203 株待鉴定的原生质体单核体候选菌株,命名为 L808PM-1—L808PM-203。

2.2 SSR 引物筛选

所用的 14 对 SSR 引物对“L808”与其原生质体

单核体 L808PM-1、L808PM-203 扩增结果显示(图 1),除引物 Lefp-167 以外,其余 13 对引物在单核体上只扩增出“L808”的部分条带,可以推测“L808”的另一个细胞核携带了剩余部分的 SSR 谱带,这种存在差异的引物代表着“L808”的两个核上在该 SSR 位点存在多态性,可用于原生质体单核体的鉴定,如两个原生质体单核体 L808PM-1 和 L808PM-203 均扩增出其双核体亲本一条相同的谱带,可以判断这两个单核体来源于“L808”中的同一个细胞核。因此,供筛选的 14 对引物中,有 13 对在“L808”的两个核上均存在多态性,多态性比例达到 92.9%。另外,不能排除引物 Lefp-167 在另一核上没有条带而形成的多态性,但为了确保单核体鉴定的成功,不选用此引物。

2.3 “L808”原生质体单核体的 SSR 鉴定

在筛选的 SSR 引物中,所有引物的扩增条带都很清晰、单一,选取其中的引物对 Lefp-55 对获得

的 203 株待鉴定单核体菌株及对照“L808”进行基因型鉴定,图 2 为一部分菌株的扩增图谱,该引物在对照“L808”上能扩增出两个条带 55-1 和 55-2。其中 L808PM-2 只扩增出 55-1 条带; L808PM-22、L808PM-45、L808PM-47、L808PM-48、L808PM-49 和 L808PM-57 能扩增出与对照“L808”相同的两条条带;其他多数菌株则只能扩增出 55-2 条带;极少数菌株未扩增出条带(快速制备的 DNA 含量低),重新检测扩增出 55-2 条带。因此可以初步确定, L808PM-22、L808PM-45、L808PM-47、L808PM-48、L808PM-49 和 L808PM-57 为显微误检的双核体菌株,再次镜检确定这些菌株为双核体菌株;只有扩增出条带 55-1 的 L808PM-2 菌株为含有“L808”其中一个核的原生质体单核体;大部分菌株具有条带 55-2 的则为含有“L808”另一个核的原生质体单核体。

利用引物 Lefp-55 对“L808”的 203 株候选原生

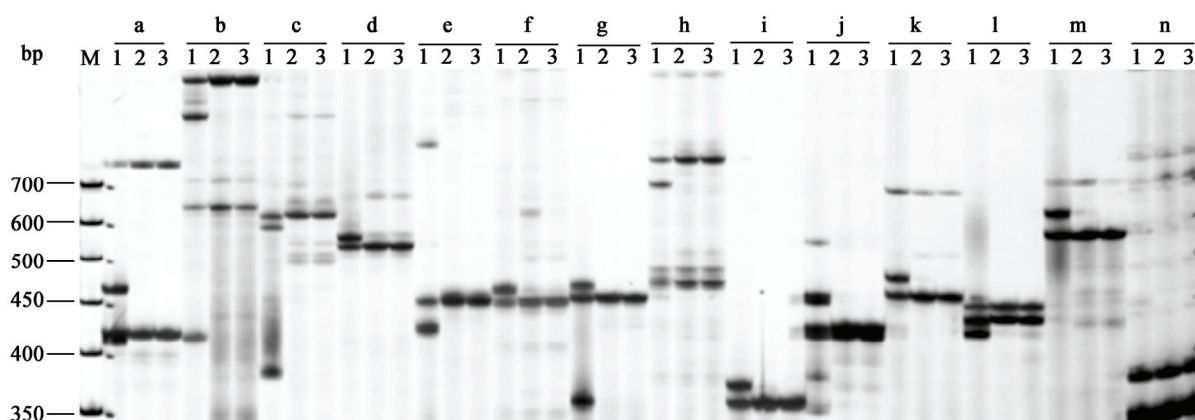


图 1 SSR 引物在“L808”与原生质体单核体上的筛选

Figure 1 Screening of SSR primers on “L808” and its protoplast monokaryons

Note: M: 50 bp ladder DNA marker. a-n: SSR primer pairs Lefp-41-1, Lefp-56-1, Lefp-95-1, Lefp-8, Lefp-43, Lefp-55, Lefp-56, Lefp-76, Lefp-83, Lefp-95, Lefp-116, Lefp-126, Lefp-157 and Lefp-167. 1: Strain “L808”; 2: L808PM-1; 3: L808PM-203.

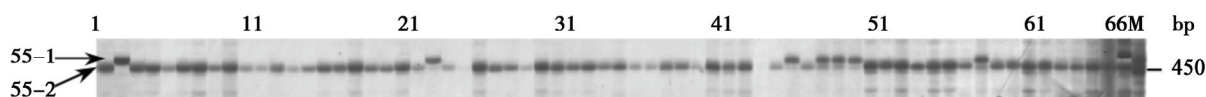


图 2 SSR 引物 Lefp-55 对部分菌株的鉴定图谱

Figure 2 SSR profile of partial monokaryons using primer pair Lefp-55

Note: 1-65: L808PM-1-L808PM-65; 66: Strain “L808”; M: 50 bp ladder DNA marker.

质体单核体的鉴定中, 191 株为含有“L808”的一个相同核(命名为 A 核)的单核体菌株, 有 11 株为显微误检的双核体菌株, 仅 L808PM-2 为“L808”另一核(命名为 B 核)的单核体菌株。SSR 鉴定结果表明, 在本试验中将双核体显微观察误检为单核体的比率为 5.42%, 而“L808”两个不同核的原生质体单核体偏分离比率高达 191:1。在如此高的偏分离比率下, 用传统的配对杂交方法从众多 A 核的单核体中鉴定出 B 核比采用分子标记的方法困难很多, 并且还存在误检的双核体干扰。

2.4 原生质体单核体鉴定的 SSR 标记验证

为了进一步用更多 SSR 引物验证单核体的鉴定结果, 选取 L808PM-6、L808PM-35、L808PM-53 (3 个 A 核)、L808PM-2 (1 个 B 核)以及误检的双核体菌株 L808PM-22 和 L808PM-45, 以“L808”为对照, 用另外 9 对 SSR 引物 Lefp-8、Lefp-43、Lefp-56、Lefp-76、Lefp-83、Lefp-95、Lefp-116、Lefp-126 和 Lefp-157 进行验证。结果如图 3 所示, 误检的双核菌株 L808PM-22 和 L808PM-45 扩增出的带型均与“L808”完全相同; A 核的 L808PM-6、L808PM-35 和 L808PM-53 菌株均扩增出“L808”的一部分条带, B 核的 L808-PM2 菌株则扩增出“L808”的另一部分条带, 这两部分条带重叠在一起即为完整的“L808”扩增带型。因此, 通过 9 个 SSR 标记的验证可以确定菌株 L808PM-22 和 L808PM-45 为双核体; 菌株 L808PM-6、L808PM-35 和 L808PM-53 含有“L808”

的 A 核; 菌株 L808-PM2 则含有“L808”的 B 核。

2.5 原生质体单核体鉴定的 RAPD 标记验证

为了排除同一分子标记方法对原生质体单核体鉴定的局限性及增加鉴定的准确性, 取 A 核的菌株 L808PM-6 和 B 核的菌株 L808PM-2 及对照“L808”, 采用 RAPD 分子标记的方法进行验证, 选用的引物为 S1456 和 S1480, 是从上海生工生物股份有限公司随机引物 S1 系列中筛选出的对“L808”扩增效果较稳定的 RAPD 引物。鉴定结果如图 4 所示, 菌株 L808PM-2 和 L808PM-6 各自具有“L808”的一部分扩增条带, 两者叠加可组成“L808”的带型, 从基因型上可将 L808PM-2 和 L808PM-6 确定为“L808”的两个不同核的原生质体单核体。

2.6 原生质体单核体鉴定的传统方法验证

为进一步确定 SSR 标记鉴定不同核型原生质体的可靠性, 选 L808PM-2、14 株含 A 核的原生质体单核体(以下统称 L808PM-A)、L808 进行传统方法验证。将 16 株菌株转接到琼脂糖培养皿上(L808PM-2、L808 各接 3 个培养皿, L808PM-A 各接一个培养皿), 待菌落生长 14 d 时进行镜检观察是否存在锁状联合, 并记录菌落大小、菌落特征。将 L808PM-1、L808PM-2 分别与 L808PM-A 对峙培养, 镜检检验 L808PM-2 与 L808PM-A 的核型。

图 5 为部分菌株在培养皿上的形态, 表 2 为菌落长 14 d 的半径记录。由图 5 和表 2 可知, L808PM-A 平均生长速度明显快于 L808PM-2, 而

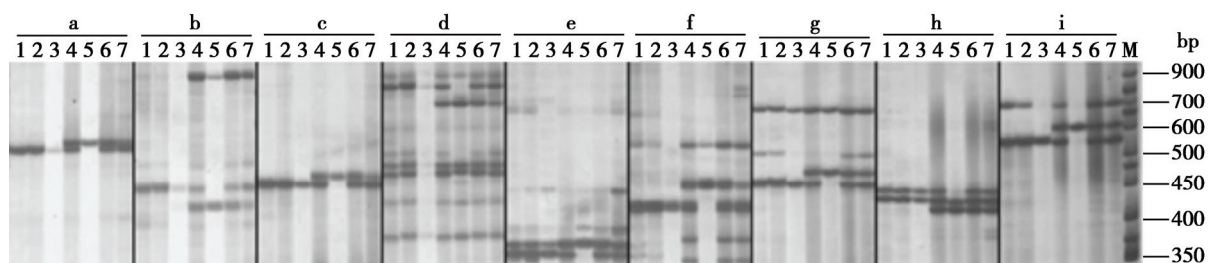


图 3 鉴定结果的 SSR 标记验证图谱

Figure 3 SSR profile of partial tested strains using 9 primer pairs

Note: M: 50 bp ladder DNA marker. a-i: SSR primer pairs Lefp-8, Lefp-43, Lefp-56, Lefp-76, Lefp-83, Lefp-95, Lefp-116, Lefp-12 and Lefp-157. 1-7: L808PM-6, L808PM-35, L808PM-53, “L808”, L808PM-2, L808PM-22, L808PM-45.

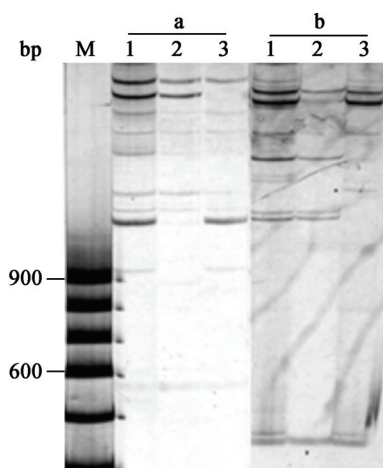


图4 鉴定结果的 RAPD 标记验证图谱

Figure 4 RAPD profile of partial tested strains using 2 random primers

Note: a: S1456; b: S1480. 1: “L808”; 2: L808PM-6; 3: L808PM-2; M: 50 bp ladder DNA marker.

L808 比两者更快, 14 d 已经长满整个平板, 差异显著 ($P < 0.01$)。在琼脂糖培养皿上, L808PM-2 菌落稀薄, 颜色浅; L808PM-A 气生菌丝旺盛, 菌落浓密、较白; L808 菌落不及 L808PM-A 浓密, 菌落有明显的纹理。

图 6 为部分菌株电镜显微图片, L808PM-2 和 L808PM-A 均未观察到锁状联合, 而 L808 在显微视野中观察到较多的锁状联合(箭头所指), 说明 L808PM-2 和 L808PM-A 确为单核体(图 6A)。L808PM-2 和 L808PM-A 对峙培养均出现锁状联合, 可知 L808PM-2 与 L808PM-A 是不同核型的单核体(图 6B)。L808PM-1 与其余 L808PM-A 对峙培养不能产生锁状联合, 为同一核型单核体(图 6C)。经过传统方法验证, 可确定 L808PM-2 是含有 B 核的 L808 单核体, 其余大部分为含 A 核的原生质体单核体, 进一步验证了 SSR 标记鉴定原生质体单核体的准确性。

2.7 SSR 标记对孢子单核体及杂交后代的鉴定

分别用 7 个“L808”和“18”的孢子单核体进行杂交, 获得了 12 个杂交子, 其中 L18-9 与 18L-9、18L-46 与 L18-46、18L-58 与 L18-58、18L-91 与

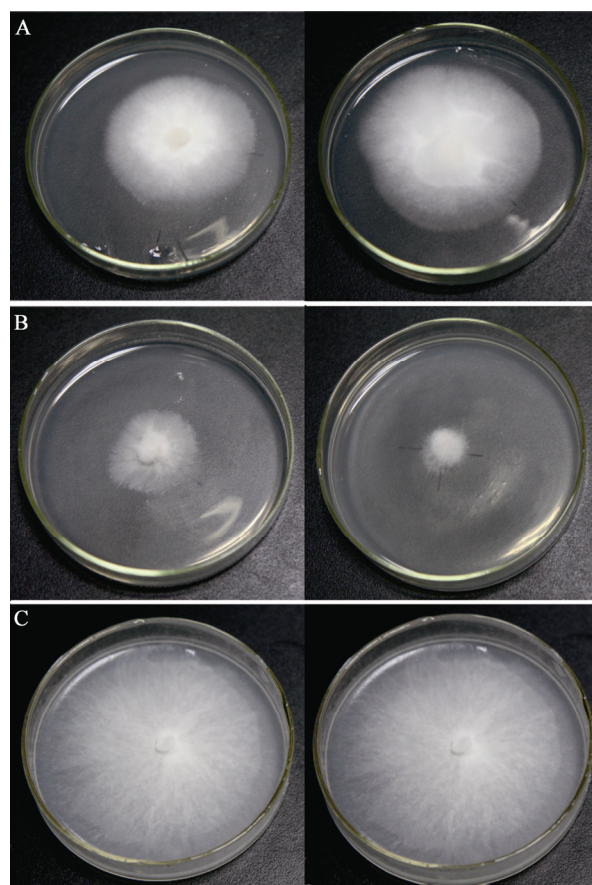


图5 L808PM-A、L808PM-2、L808 在琼脂糖培养基上菌落形态

Figure 5 Colony morphologies of L808PM-A, L808PM-2 and L808 on the agarose medium

Note: A: L808PM-A; B: L808PM-2; C: L808.

L18-91、18L-120 与 L18-120 为 5 对选自配对单核体两侧的杂交后代, 在杂交的过程中, 通过核迁移使两侧的杂交后代拥有相同的两个细胞核但其细胞质与挑取侧一方的亲本相同, 另外 2 个菌株 18L-34 和 L18-52 则是只选自一侧的杂交后代。

选取了 3 对 SSR 引物对孢子单核体亲本及其杂交后代进行 PCR 扩增, 以“L808”和“18”菌株为对照, 电泳结果如图 7 所示。以引物 Lefp-7 对孢子单核体 L808SM-9 和 18SM-9 及其杂交后代 18L-9 和 L18-9 的扩增结果为例, “L808”扩增出的 2 个位点的条带编为 7-L-1 与 7-L-2, 孢子单核体 L808SM-9 只含有“L808”的其中一个位点条带 7-L-2; 相同的,

表 2 L808PM-A、L808PM-2、L808 生长速度
Table 2 Growth rates of L808PM-A, L808PM-2 and L808

| 菌株 Strains | 菌落半径 Radius of the colonies (cm) | | | | 平均半径 Mean radius (cm) |
|---------------|-------------------------------------|------|------|------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| L808PM-19 | 2.00 | 2.60 | 2.70 | 2.60 | 2.50 |
| L808PM-21 | 0.45 | 0.65 | 0.70 | 0.55 | 0.59 |
| L808PM-22 | 1.20 | 1.10 | 1.10 | 1.00 | 1.10 |
| L808PM-27 | 2.50 | 2.60 | 2.60 | 2.40 | 2.50 |
| L808PM-37 | 3.30 | 3.20 | 3.50 | 3.50 | 3.40 |
| L808PM-41 | 2.00 | 2.00 | 1.90 | 2.00 | 2.00 |
| L808PM-53 | 2.80 | 2.50 | 2.60 | 2.50 | 2.60 |
| L808PM-64 | 2.40 | 2.50 | 2.60 | 2.40 | 2.50 |
| L808PM-78 | 1.90 | 1.80 | 1.70 | 1.70 | 1.80 |
| L808PM-85 | 1.70 | 1.70 | 1.50 | 1.80 | 1.70 |
| L808PM-133 | 1.80 | 1.70 | 1.60 | 1.70 | 1.70 |
| L808PM-145 | 2.90 | 2.80 | 3.20 | 3.10 | 3.00 |
| L808PM-158 | 2.80 | 3.20 | 2.90 | 2.90 | 3.00 |
| L808PM-161 | 2.80 | 2.70 | 2.80 | 2.80 | 2.80 |
| L808PM-2 | 1.00 | 0.98 | 0.89 | 0.92 | 0.95 |
| L808PM-2 | 0.84 | 0.88 | 0.92 | 0.95 | 0.90 |
| L808PM-2 | 0.60 | 0.53 | 0.57 | 0.54 | 0.56 |
| L808 | 4.30 | 4.20 | 4.20 | 4.20 | 4.20 |
| L808 | 4.20 | 4.30 | 4.30 | 4.40 | 4.30 |
| L808 | 4.20 | 4.30 | 4.30 | 4.30 | 4.30 |

注：1-4：菌落 4 个相互垂直方向的半径。
Note: 1-4: The radius of the colonies' four perpendicular directions.

“18”也扩增出两个位点的条带编为 7-18-1 与 7-18-2, 孢子单核体 18SM-9 也只含有“18”的一个位点条带 18-7-1; 杂交后代 18L-9 和 L18-9, 都扩增出了 18-7-1 和 L-7-2 两个位点的条带, 因此可以确定菌株 18L-9 和 L18-9 为 L808SM-9 和 18SM-9 杂交子, 杂交成功, 并且杂交后代拥有不同于亲本“L808”和“18”的新的基因型。同理, 通过同样的带型分析, 所有杂交后代都能成功杂交, 并能追溯到相对应的孢子单核体亲本及孢子单核体产生的菌株。因为细胞核迁移速度远大于细胞质迁移速度, 所以理论上取自同一杂交配对两侧的成对杂交后代的核遗传物质相同, 细胞质不同。本实验取自同

一杂交配对两侧的成对杂交后代用这 3 对 SSR 引物不能作区分, 都扩增出了相同的带型, 这也证明了所用的 SSR 标记只能用于区分核基因组有差异的菌株, 不能用于反应细胞质的遗传差异。

另外对于同一对引物而言, 不同杂交子的带型可能会相同, 比如引物 Lefp-7 对 18L-9、18L-46 和 18L-34, 引物 Lefp-43 对 18L-9、18L-34 和 L18-52 等的扩增带型都相同, 表明这些不同杂交子之间在同一个 SSR 位点有相同的基因型, 因此一个 SSR 位点不足以将众多杂交子都区分开来, 但用几个位点的带型组合就能加以区分, 如上述 Lefp-7 对 18L-9、18L-46 和 18L-34 不能区分时, Lefp-43 位

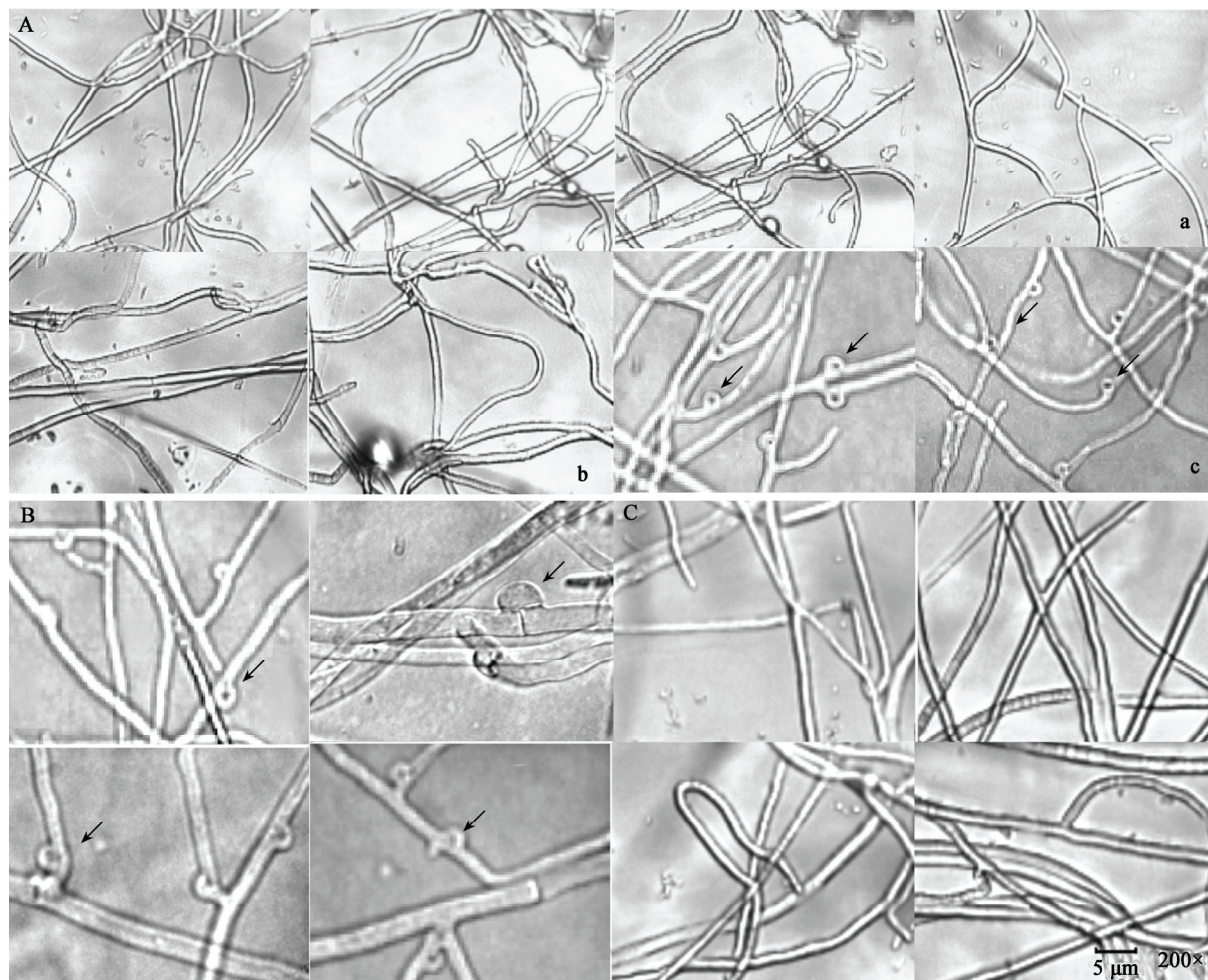


图6 L808PM-A、L808PM-2、L808 及对峙培养菌丝的电子显微结构

Figure 6 Mycelial structure of L808PM-A, L808PM-2, L808 and Hybrids under electron microscope

注: A: L808PM-A、L808PM-2、L808 菌丝的电子显微结构, a 为 L808PM-A, b 为 L808PM-2, c 为 L808; B: L808PM-A 与 L808PM-2 对峙培养菌丝的电子显微结构; C: L808PM-1 与其余 L808PM-A 对峙培养菌丝的电子显微结构。

Note: A: Electron microscopic structure of L808PM-A, L808PM-2, L808, a belongs to L808PM-A, b belongs to L808PM-2, c belongs to L808; B: Confront culture results of L808PM-A and L808PM-2; C: Confront culture results of L808PM-1 and other L808PM-A.

点能用于区分 18L-9 和 18L-46, Lefp83 位点都能区分 18L-9 和 18L-34; Lefp-43 对 18L-9、18L-34 和 L18-52 不能区分时, Lefp83 位点都能区分 18L-9 和 18L-34, Lefp-7 位点能区分 18L-9 和 L18-52。因此在选用的 SSR 位点足够多的时候就能用不同位点组合的方式将绝大多数杂交后代鉴定和区分。

3 讨论

在原生质体单核体的制备中, 单核体的鉴定常采用显微观察锁状联合的方式进行, 虽然可根据生

长速度和显微观察淘汰双核体, 但部分双核体菌株也存在生长速度较慢、锁状联合形成较晚的现象, 导致发生误检的可能。另外, 镜检过程耗时、费力, 并且在确认单核体后需要经过配对杂交来确定两个不同的亲本核型, 尤其是在两个核出现严重偏分离的菌株中, 杂交配对的工作将会大量增加。本文选用的香菇品种“L808”两个原生质体单核体的偏分离比率高达 191:1, 在前人的研究中也出现过类似的高比例^[12], 造成这种结果的原因可能是带有 A 核的原生质体单核体萌发速度、生长速度快, 掩

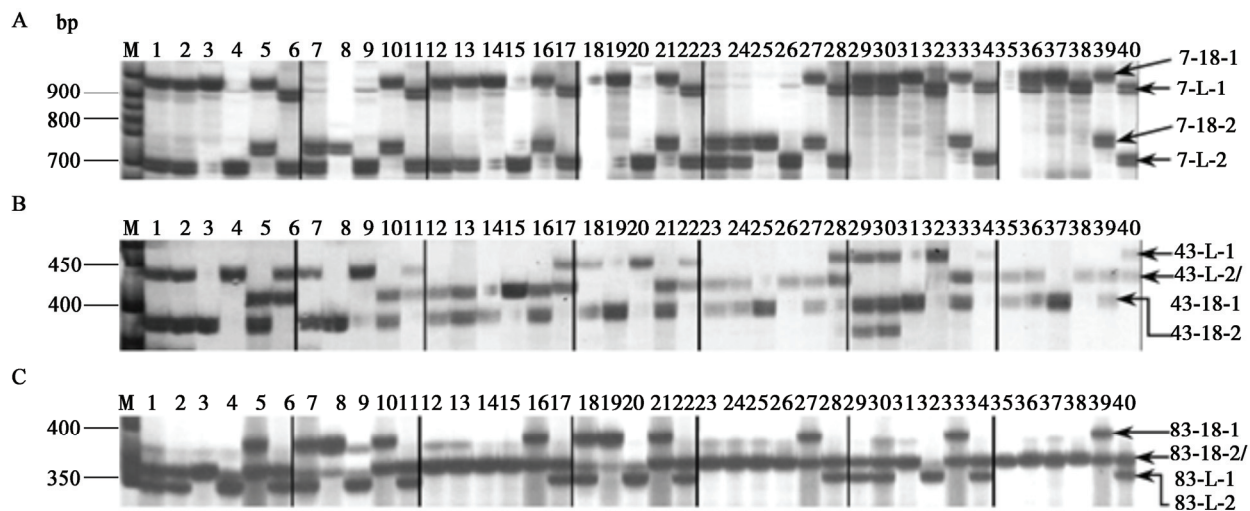


图 7 SSR 标记对“L808”和“18”孢子单核体及其杂交子的扩增图谱

Figure 7 SSR profile of sporulated monokaryons of L808 and 18 and their hybrids by 3 primer pairs

Note: M: 50 bp ladder DNA marker; A: Primer pair Lefp-7; B: Primer pair Lefp-43; C: Primer Lefp-83; 1–40 are strains: 18L-9, L18-9, 18SM-9, L808SM-9, “18”, “L808”, 18L-34, 18SM-34, L808SM-34, “18”, “L808”, 18L-46, L18-46, 18SM-46, L808SM-46, “18”, “L808”, L18-52, 18SM-52, L808SM-52, “18”, “L808”, 18L-58, L18-58, 18SM-58, L808SM-58, “18”, “L808”, 18L-91, L18-91, 18SM-91, L808SM-91, “18”, “L808”, 18L-120, L18-120, 18SM-120, L808SM-120, “18”, “L808”.

盖了萌发慢、生长速度慢的 B 核原生质体单核体。在这种情况下,以配对杂交的方式进行无疑将事半功半,需探索新的原生质体鉴定方法。

目前,在食用菌中对于单核体及杂交子的鉴定,在香菇中曾用 ITS 序列分析进行鉴定^[13],在黑木耳中采用荧光核染和酯酶同工酶技术来进行^[14],在草菇中利用核特征 SCAR 标记对双核体的 2 个核进行鉴定^[15],上述 4 种方法中,ITS 序列分析对种内不同菌株分辨率低,荧光核染通过观察菌丝形态与核的分布规律来区分不同的单核体,这种方法容易受菌丝表型的影响,并且在经过重组的孢子单核体后代中很难采用,酯酶同工酶技术则存在多态性低的问题,而核特异性 SCAR 标记的开发难度较大,并且同样对经过重组的孢子后代利用价值不大。因此,采用分子标记的方法进行单核体的区分既经济又高效,Kazuhiro 等采用 RAPD 标记对孢子单核体后代进行了筛选,在 56 对引物中获得了 135 个用于区分单核体后代的标记^[16]。

利用分子标记技术进行单双核区分及两个不同核型的鉴定具有优势和实用价值。操作简单、带

型稳定的分子标记结合快速的 DNA 制备方法^[11]可实现对两种原生质体单核体及孢子单核体的快速、准确鉴定,与传统的镜检再杂交的方法相比,可缩短鉴定时间,提高鉴定的准确率,并且在利用这些单核体进行遗传或育种研究时还能用相同的分子标记来追踪相关基因型在后代中的传递。本研究用 16 株原生质体进行传统方法验证时共用了 15 d 检测出不同核型的 L808 原生质体单核体,而采用 SSR 分子标记结合快速 DNA 提取法(仅需 0.01 g 菌丝),可在 1 d 内完成 DNA 制备、PCR 扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。当待测原生质体数量提高时,优势更加明显。在分子标记的选择上,本文用 SSR 标记以及 RAPD 标记同时进行了验证,都能准确地将亲本和两个核区分开来,SSR 标记较 RAPD 标记带型稳定,成功率高,且操作相对简单^[17]。在应用前景上,部分二极性和绝大多数四极性的食用菌种类都是杂交种,两核之间的遗传差异较大,因此大多数分子标记都能容易地将两个核以及众多的孢子单核体区分开来,自交育种在食用菌中虽有应用,但总体数量少,且自交一二代也仅仅使一部分

位点发生纯合,用分子标记来区分的可能性还是相当大。

单核体在食用菌育种的应用中,杂交是最常用的方法,常用的对称杂交(单单杂交)与不对称杂交(单双杂交)中都要用到单核体,获得的杂交后代中同时具有两个亲本的部分遗传物质,这些遗传物质从亲本到单核体,再到杂交后代中的传递也有采用分子标记进行研究的报道^[7],本文所用的 SSR 标记证实其能准确地追踪多个位点在各代中的传递,可在育种工作中发挥重要的作用。育种中常使用原生质体融合技术进行新品种选育^[18-19],在原生质体融合前,对原生质体进行遗传标记是融合后检测融合是否成功的最有效方式,在分子标记没有被广泛使用前,选用营养缺陷型或代谢突变型原生质体或采用原生质体失活^[20]的方法进行,本文在使用多个 SSR 标记进行原生质体鉴定的同时也对该原生质体进行了标记,可使后续的遗传、育种研究顺利进行。另外,Kwan 等^[3]与 Au 等^[21]分别用 RAPD 分子标记方法、低密度测序方法,以香菇菌株“L-54”的孢子单核体群体构建了遗传连锁图谱,本文采用的 SSR 标记在香菇“L808”两个核上具有丰富的多态性,也可用于遗传连锁图谱的构建,并且 SSR 标记的稳定性和准确性在连锁图谱的应用以及重要性状的定位上具有较大的优势。

本文采用的开发自香菇全基因组测序的 SSR 标记在前期的研究中显示,具有扩增产物的 SSR 引物在香菇群体中具有多态性的比例高达 93.7%^[9],其中单拷贝位点的居多,本文考虑到进行原生质体单核体鉴定的工作中,选用多拷贝位点的 SSR 引物能提高鉴定的成功率,最终选取的 14 对 SSR 引物中有 13 对都能将“L808”的两个核区分开来,多态性比例达到 92.9%,这一方面说明“L808”两核之间的遗传差异较大,另一方面也间接地反映出 SSR 位点的多态性在香菇菌株中丰富的分布。

参考文献

[1] Ke Y, Zeng SR, Fang BY, et al. Breeding of *Lentinus edodes*

- Yuebei No. 1 by single-single hybridization technique[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2009, 21(1): 89-90 (in Chinese)
- 柯野, 曾松荣, 方白玉, 等. 利用单单杂交技术选育粤北香菇1号[J]. *江西农业学报*, 2009, 21(1): 89-90
- [2] Ikegaya N. Breeding and cultivation of shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms[J]. *Food Reviews International*, 1997, 13(3): 335-343
- [3] Kwan HS, Xu HL. Construction of a genetic linkage map of Shiitake mushroom *Lentinula Edodes* strain L-54[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 35(5): 465-471
- [4] Tan Q, Pan YJ, Wang ZY, et al. The breeding of *Lentinula edodes* Shenxiang No. 8 through protoplasted monokaryon technique[J]. *Acta Edulis Fungi*, 1999, 6(2): 1-4 (in Chinese)
- 谭琦, 潘迎捷, 汪昭月, 等. 用单核原生质体杂交育成香菇新菌株申香8号[J]. *食用菌学报*, 1999, 6(2): 1-4
- [5] Li DJ, Liu Y, Wang P, et al. Development of SCAR markers to determine the mating types of *Lepista nuda* protoplast monokaryons[J]. *Current Microbiology*, 2014, 68(4): 536-542
- [6] Ratanatrakooldech S, Hui C, Kitamoto Y, et al. The constitution of incompatibility factor and mating characteristics of spore isolates in a bipolar mushroom, *Pholiota nameko*[J]. *Mycoscience*, 2002, 43(2): 113-117
- [7] Xu ZW, Chen H, Feng ZY, et al. Transmissibility of a specific SSR marker in *Hypsizygus marmoreus*[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2010, 26(2): 42-45 (in Chinese)
- 许占伍, 陈辉, 冯志勇, 等. SSR 特异标记在真姬菇中的可传递性[J]. *上海农业学报*, 2010, 26(2): 42-45
- [8] Ye X, Huang CY, Chen Q, et al. Making SSR fingerprint profile for commercial cultivars of *Lentinula edodes*[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(6): 1067-1072 (in Chinese)
- 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
- [9] Zhang D, Wu P, Zhang LJ, et al. Polymorphism of SSR markers based on the whole genome sequence of *Lentinula edodes* and use in strain identification[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2012, 19(4): 1-6 (in Chinese)
- 张丹, 巫萍, 章炉军, 等. 基于香菇全基因组序列开发的部分 SSR 标记多态性分析与品种鉴定初探[J]. *食用菌学报*, 2012, 19(4): 1-6
- [10] Pan YJ, Liao HQ, Zhang ST, et al. A study on monokaryotization by protoplasting of heterokaryotic mushrooms[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 1993, 9(2): 1-5 (in Chinese)
- 潘迎捷, 廖汉泉, 张树庭, 等. 异宗结合食用菌的原生质体单核化[J]. *上海农业学报*, 1993, 9(2): 1-5
- [11] Izumitsu K, Hatoh K, Sumita T, et al. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR[J]. *Mycoscience*, 2012, 53(5): 396-401
- [12] Cheng SM. Study on the phenomenon and genetic basis of segregation distortion of mating-type factors in *Lentinula edodes*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2005 (in Chinese)
- 程水明. 香菇交配型偏分离现象及其遗传基础研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2005
- [13] Zhang HT, Li L, Chen F, et al. Preliminary identification of *Lentinus edodes* hybrid Strain Liao 1[J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 32(2): 54-59 (in Chinese)
- 张海涛, 李莉, 陈飞, 等. 香菇杂交菌株辽香1号的初步鉴定[J]. *微生物学杂志*, 2012, 32(2): 54-59
- [14] Han ZH, Zhang PQ, Dai XD, et al. Study on identification of parent monokaryon and hybrid stains in *Auricularia auricula*[J]. *Journal of Fungal Research*, 2009, 7(2): 99-103 (in Chinese)
- 韩增华, 张丕奇, 戴肖东, 等. 黑木耳亲本、单核、杂交菌株鉴定的研究[J]. *菌物研究*, 2009, 7(2): 99-103

- [15] Fu JS, Deng YJ, Xie BG, et al. The split and reconstruction of *Volvariella volvacea* mycelium cells[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(16): 36-39 (in Chinese)
傅俊生, 邓优锦, 谢宝贵, 等. 草菇菌丝细胞的拆分与重建[J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 36-39
- [16] Miyazaki K, Maeda H, Sunagawa M, et al. Screening of heterozygous DNA markers in shiitake (*Lentinula edodes*) using de-dikaryotization via preparation of protoplasts and isolation of four meiotic monokaryons from one basidium[J]. Journal of Wood Science, 2000, 46(5): 395-400
- [17] Fang XJ, Wu WR, Tang JL. DNA Markers-assisted Breeding of Plan[M]. Beijing: Science Press, 2000: 17-25 (in Chinese)
方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 17-25
- [18] Xing ZN, Zang HL, Li DH, et al. Breeding of *Lentinula edodes* strains by protoplast fusion technology[J]. Edible Fungi, 2012(4): 16-18 (in Chinese)
邢振楠, 臧海莲, 李滇华, 等. 原生质体融合技术选育香菇菌株[J]. 食用菌, 2012(4): 16-18
- [19] Kim C, Choi EC, Kim BK. Generation of nuclear hybrids overcoming the natural barrier of incompatibility: transfer of nuclei from *Lentinula edodes* into protoplasts of *Coriolus versicolor*[J]. Archives of Pharmacal Research, 2000, 23(1): 79-86
- [20] Pan YJ, Chen JM, Wang ZY, et al. Fusion of inactive protoplasts in *Lentinula edodes*[J]. Edible Fungi, 1991(4): 7-8 (in Chinese)
潘迎捷, 陈明杰, 汪昭月, 等. 香菇的失活原生质体融合[J]. 食用菌, 1991(4): 7-8
- [21] Au CH, Cheung MK, Wong MC, et al. Rapid genotyping by low-coverage resequencing to construct genetic linkage maps of fungi: a case study in *Lentinula edodes*[J]. BMC Research Notes, 2013, 6: 307

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012、2013、2014年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续获得“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选300种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助;2015年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2016年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413