

应用 RAPD 技术分析两个双孢蘑菇遗传家系*

曾伟^{1,2} 宋思扬¹ 陈融¹ 王泽生² 苏文金¹(厦门大学生物学系 厦门 361005)¹ (福建省轻工业研究所 福州 350005)²

摘要:应用 RAPD 技术分析两个由同工酶为遗传标记建立的典型双孢蘑菇遗传家系中各亲菌株间的遗传相关性,结果表明,单孢同核体的 RAPD 图谱较异核体而言有单一化的倾向;同时,随着遗传代数的增加,杂种子代与出发异核亲本间的遗传差异逐渐增大;研究结果还进一步印证同核单孢杂交比传统的单孢、多孢筛选更易产生优势明显的杂种。

关键词:双孢蘑菇, RAPD, 遗传家系分析

中图分类号: Q939.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0132-03

RAPD ANALYSIS OF TWO GENETIC FAMILIES OF *AGARICUS BISPORUS*ZENG Wei^{1,2} SONG Si-Yang¹ CHEN Rong¹ WANG Ze-Sheng² SU Wen-Jin¹(Department of biology, Xiamen University, Xiamen 361005)¹(Fujian Research Institute of Light Industry, Fuzhou 350005)²

Abstract: Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique, the genetic relationship of the strains of two genetic families of *Agaricus bisporus*, which had been founded based on the genetic marker of isozyme, was examined. The results showed that there was obvious decreasing tendency of DNA amplification polymorphism in homokaryons; as the number of genetic generation increases, the genetic distance between progenise and the original parents from which hybrids derived increased; hybrids had more advantageous characters than those isolates obtained by traditional multi-spore or single-spore screening.

Key words: *Agaricus bisporus*, RAPD, Genetic Family

双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. 是一种较为特殊的二极性次级同宗配合的高等担子伞菌。其子实体产生的孢子大多数为自身可育的异核单孢,不育同核或单核孢子为数很少,而且同、异核菌丝在生理形态上没有明显差别,给双孢蘑菇的遗传分析和杂交育种取材造成了很大困难。此外,双孢蘑菇的生活周期较长,对杂种性状进行早期预测是提高育种工作效率的重要手段。因此,遗传标记的研究在双孢蘑菇的基础遗传研究及育种实践中的地位尤为突出。80年代

末,王泽生等人应用同工酶为遗传标记对同核及异核菌株进行了有效的分离,总结了不同生产性状菌株的特征同工酶谱带,并从我国双孢蘑菇种质库中选择了两类性状互补且具不同同工酶表型(高产低质型, H型及低产优质型, G型)的菌株为出发亲本进行杂交,培育出了一系列结合了双亲优点的杂种菌株^[1]。

* 福建省自然科学基金资助项目 (No.C9820005)

收稿日期: 1999-05-10, 修回日期: 1998-08-01

本文报道应用 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 技术^[2]对两个已由同工酶为遗传标记建立的典型遗传家系进行分析,从 DNA 分子水平上进一步调查两家系中各亲代及子代菌株间的遗传相关性。探讨今后在杂交育种中发展并应用比蛋白质分子水平标记更稳定的 DNA 分子标记进行跟踪筛选的可行性,从而进一步提高杂种菌株种性早期预测的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:双孢蘑菇菌株 11 株,菌号分别为 02、5426、8213、5179、W95-2、2796、4607、5425、8211、5412、2987。其中 02 为 H 型(高产型)亲本,8213 和 8211 为 G 型(优质型)亲本,5426、5179、5425、5412 为 S 型(同核不育菌株),其余为 HG 型(H 型和 G 型菌株的杂种)。以上菌株均为福建省蘑菇菌种研究推广站提供。菌株培养应用常规 PDA 培养基。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取:参照文献^[3]介绍的方法进行。

1.2.2 随机引物 PCR:参照文献^[4]。随机引物购自中科院遗传所,核苷酸序列见表 1。

表1 随机引物编号及核苷酸序列

编号	核苷酸序列(5'-3')
OPU01	ACGGACGTCA
OPU03	CTATGCCGAC
OPU06	ACCTTTGCGG
OPU12	TCACCAGCCA
OPU15	ACGGGCCAGT
OPU16	CTGCGCTGGA
OPU17	ACCTGGGGAG
OPU18	GAGGTCCACA
OPU19	GTCATTGCGG

1.2.3 电泳:采用 TAE 缓冲系统,琼脂糖凝胶浓度 1.4%,电压 8v/cm,电泳结果由 EB 染色得到。

2 结果

本实验应用 9 种随机引物对 11 株双孢蘑菇基因组 DNA 进行扩增,均得到阳性结果,扩增带的分子量分布从约 500bp 至 3kb 不等,平均每种引物可扩增出 8~9

个条带。对两个家系各成员间的电泳图谱进行统计,其

表2 以02及8211为出发亲本的遗传家系中的各菌株间Nab/Na+Nb统计数据表*

Nab/Na+Nb	02	5425	8211	5412	2987
02					
5425	34/91				
8211	32/93	31/105			
5412	23/86	20/89	36/100		
2987	16/72	17/70	22/88	15/72	

* 表2及表3中,Nab为两菌株间的相同带数,Na、Nb分别为它们的总带数

表3 以02及8213为出发亲本的遗传家系中的各菌株间Nab/Na+Nb统计数据表*

Nab/Na+Nb	02	5426	8213	5179	W95-2	2796	4607
02							
5426	33/98						
8213	31/97	31/107					
5179	21/79	25/89	25/89				
W95-2	27/87	28/98	35/96	20/78			
2796	27/91	32/101	32/100	35/82	35/90		
4607	27/90	29/100	31/99	23/81	32/89	39/93	

* 表中Nab、Na及Nb含义同表1

结果分列于表 2、表 3。

聚类分析各菌株间的遗传相似值,根据公式^[5],相似值 $S = 2Nab / Na + Nb$ 将表 2 及表 3 中数据换算为遗传相似值分列于两家系的遗传构成,见图 1、图 2。

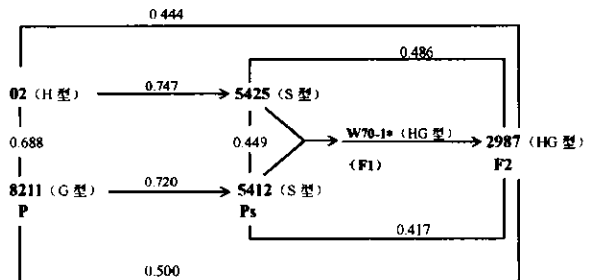


图1 以02、8211为出发亲本的遗传家系构成及各菌株间的遗传相似值

P、Ps、Fn 分别代表异核亲本、不育同核亲本及子 N 代

注:该菌株未保存,故本实验未能选用

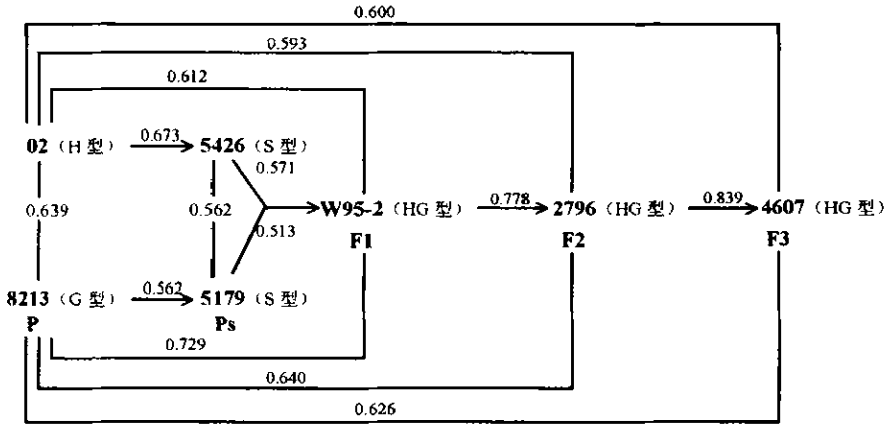


图2 以02,8213为出发亲本的遗传家系构成及各菌株间的遗传相似值

注:图中符号意义同图1

3 讨论

本实验利用 RAPD 技术分析了两个双孢蘑菇的遗传家系各组成成员间的遗传相关性,结果显示,从总体上看,同核体 RAPD 电泳图谱的多态性不如异核体的显著;同时,同核体中也出现一些未在异核体中出现的新带。这种电泳带型单一化现象在同工酶谱中表现更为明显^[6]。两个配对同核亲本之间的遗传相似值较相应异核亲本之间的遗传相似值有很大降低,这可能说明,双孢蘑菇单倍体核间存在较大的差异,但相互之间又有一定的互补性,提示异核间的基因功能互补是菌丝正常生长的前提。通常,同核菌丝生活力较低弱。

从图 2 所示的遗传品系中可以看出,随着遗传代数的增加,杂种子代与出发异核亲本间的遗传差异越来越大。在图 1 所示的遗传品系中,尽管由于少了 F1 代菌株,品系构成不太完整,但子二代与亲本间的遗传相似值也相对较低。另外,我们还注意到,子代杂种有更多地承袭同工酶表型为 G 型菌株的遗传倾向,子代与 G 型亲本的遗传相似值均比与 H 型间的遗传相似值大。这与在生产中观察到的杂种菌株的诸多农学性状与 G 型亲本间有较多的相似性这一现象相吻合。

从图 1、2 中,我们还发现单孢筛选的异核子代与其来源株间(即 F2 与 F1, F3 与 F2 之间)的遗传相似值普遍高于单孢杂交子一代与其亲本(F1 与 P)之间的遗传

相似值,由此进一步印证同核单孢杂交育种可产生优势明显的杂种,而传统的单孢、多孢筛选则由于依赖原菌种的自然变异,很难产生新品种。

RAPD 图谱产生多态性的特征是遗传家系同核或异核子代新标记带的产生以及亲本原有标记带的消失。在双孢蘑菇菌丝营养生活阶段,两个单倍核是相互独立存在的,直至形成子实体后,两核在担孢子中才发生融合,再行减数分裂,产生四个单倍体核,两两分配到双孢中。这一系列有性行为的发生是亲菌株间产生带型差异的内在原因。应用 DNA 分子水平的遗传标记对这一内在遗传机理的研究将是今后研究的一个主要方向。

参 考 文 献

- [1] Wang Z S, Wang H C. *Micol Neotrop Apl*, 1990, 3: 19~29
- [2] 刘 钢,周与良. *微生物学通报*, 1995, 22(6): 362~365.
- [3] 朱 衡,翟 峰,朱立煌. *真菌学报*, 1994, 13: 34~40.
- [4] Khush R S, Becker E, Wach M. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 5: 2971~2977.
- [5] Nei M, Li W H. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1979, 76: 5269~5273.
- [6] Wang H C, Wang Z S. *Mushroom Science*, 1989, XII (Part 1): 98~100.