

# 利用 RAPD 技术检测香菇双-单杂交后代

叶明<sup>1\*</sup> 潘迎捷<sup>2</sup> 陈永萱<sup>3</sup> 马桂荣<sup>1</sup>

(山东大学生命科学院 济南 250100)<sup>1</sup>

(上海农业科学院食用菌研究所 上海 201106)<sup>2</sup>

(南京农业大学微生物学系 南京 210095)<sup>3</sup>

**摘要:** 利用 RAPD 技术对香菇 6 个双单杂交菌株及其两个双核体基因组 DNA 进行了检测,结果显示: 1~3 号杂交菌株之间的相似系数为 0.893~0.962,它们与其亲本 S 之间的相似系数为 0.842~0.859; 4~6 号杂交菌株之间的相似系数 0.857~0.925,与其亲本 SSO1 之间相似系数为 0.708~0.902;表明杂交菌株与其双核体亲本基因组具有较大差异,杂交菌株之间存在着不同程度差异,6 个杂交菌株是真正的杂交后代,聚类分析树状图直观地表明了菌株间的遗传相关性,认为菌株间 DNA 的相似系数值可以作为杂交育种选择亲本的辅助的遗传标记。

**关键词:** 香菇, 双单杂交, RAPD, 相似系数值, 聚类分析

**中图分类号:** Q93-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-04-0283-04

## DETECTION OF DI-MON MATING HYBRIDS OF *LENTINULA EDODES* BY RAPD TECHNIQUES

YE Ming<sup>1</sup>, PAN Ying-Jie<sup>2</sup>, CHEN Yong-Xuan<sup>3</sup>, MA Gu-Rong<sup>1</sup>

(Life Science College, Shandong University, Jinan 250100)<sup>1</sup>

(Laboratory of Genetic and Breeding of Mushroom, Agricultural Ministry of China; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106)<sup>2</sup>

(Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)<sup>3</sup>

**Abstract:** In the present paper, RAPD techniques were used to detect genomes DNA of 6 dimon mating hybrids and their parents. The results showed that the similarity coefficients varied within 0.842~0.859 among the hybrids from 1 to 3 and within 0.893~0.962 between they and their parent S; The similarity coefficients among the

\* 现工作单位: 安徽机电学院生化系

收稿日期: 1999-05-24, 修回日期: 1999-10-13

hybrids from 4 to 6 and between they and their parent SSO1 were respectively 0.857~0.925 and 0.708~0.902, suggesting obvious difference at genome DNA level of hybrids and their dikaryonic parent, genetic variation at different DNA level among the hybrids and 6 strains of hybrids that are true. Dendrogram of cluster analysts on DNA similarity coefficient of strains showed directly genetic relationships among them and the value of similarity coefficient between strains is taken for a supplementary genetic marker of selecting parents and mating breeding.

**Key words:** *Lentinula edodes*, Di-mon mating, RAPD, Value of similarity coefficient, Cluster analysis

香菇属于四极性异宗结合的高等担子菌<sup>[1]</sup>,其性不亲和性是由两个独立分配(通常用 A 和 B 表示)的因子所控制的,只有当 A 因子和 B 因子都不同时,才能形成有真正锁状联合的双核菌丝。自从 1931 年加拿大真菌学家布勒发现“双-单交配”这一现象<sup>[2]</sup>以来,虽然人们有过关于香菇双-单杂交的报道<sup>[3,4]</sup>,但对双-单杂交菌株及其与亲本之间的遗传差异还没有 DNA 分子水平上的证据。RAPD 技术是一个备受人们青睐的应用于 DNA 鉴定的技术,具有简单,快速,灵敏等优点,已被广泛应用于物种的分类、鉴定及种质资源的评估方面<sup>[5,6]</sup>。本研究选用香菇的栽培种苏香(S)及其孢子单核体自交后代(SSO1)与杂交菌种农 1 的孢子单核体进行双-单杂交,以 RAPD 技术对杂交菌株之间及其杂交菌株与亲本间 DNA 相似系数进行了聚类分析研究,以期高效、准确检测香菇双-单杂交种,探索香菇菌株间的 DNA 基因组的相似性,提高香菇遗传育种效率。

**1 材料与方**

**1.1 供试菌株**

具有交配基因型的遗传标记的香菇栽培株苏香(S)及其与杂交种农 1(N1)孢子单核体,由上海农科院食用菌研究所提供。

**1.2 供试培养基**

**1.2.1 PDA 培养基:** 马铃薯(去皮)200g 煮汁,葡萄糖 20g,琼脂 20g,蒸馏水定容至 1000mL。

**1.2.2 PDY 培养基:** 马铃薯(去皮)200g 煮汁,葡萄糖 20g,酵母膏 2g,蒸馏水定容至 1000mL。

**1.3 试验方法**

**1.3.1 双-单杂交及其杂交后代的初步鉴定:** 参照文献[7]方法进行。

**1.3.2 液体培养基出菇试验:** 参照文献[8]方法进行。

**1.3.3 DNA 的提取及 RAPD 反应**参照文献[8]所述方法进行,略作修改。引物选自 OPAKit A(Opera 公司产品);RAPD 此外产物于 1.4% 琼脂糖凝胶上电泳分离,

以 PGEM 为标准分子量;EB 染色,透过式紫外灯检测,照相。

**2 结果与分析**

**2.1 双-单杂交后代**

将每一杂交组合内所得的双核体经拮抗试验初步鉴定的 F<sub>1</sub> 代进行彼此拮抗试验,发现全为阴性(即无拮抗现象),说明每一杂交组合只产生一个杂交后代,6 个杂交组合仅得 6 个杂交后代,依次编号为 1, 2, 3, …6, 见表 1。

**表1 杂交后代及其来源**

菌号	来源	亲本交配型
1	S×N1m01	(A1B1+A2B2)×A3B5
2	S×N1m02	(A1B1+A2B2)×A3B5
3	S×N1m03	(A1B1+A2B2)×A3B5
4	SSO1×N1m01	(A1B1+A2B2)×A3B5
5	SSO1×N1m02	(A1B1+A2B2)×A3B5
6	SSO1×N1m03	(A1B1+A2B2)×A3B5

注: S 为栽培种苏香, SSO1 为苏香孢子单核体的自交后代, N1m 为农 1 孢子单核体。

**2.2 结实试验**

6 个杂交菌株与其 2 个双核体亲本液体出菇试验结果如表 2 所示。

**表2 杂交后代结实性**

菌号	原基	菌号	原基
1	+-+	4	+++
2	+++	5	+-+
3	+-+	6	+-+
S	+-+	SSO1	+-+

注: + 表示有原基, - 表示无原基。

可见, 6 个杂交后代与其双核体亲本都长出了菇蕾, 具有结实性, 说明它们都是真正的双核体。

**2.3 RAPD 分析**

**2.3.1 扩增图谱:** 选用 OPAKitA(美国 Operon 公司产

品的20个随机产物,对8个供试菌株(6个杂交菌株及2个亲本双核体)进行随机扩增,其中8个引物扩增效果较好,能扩增出全部供试菌株,且重复性好,可以获得稳定的DNA片段,这些引物为: OPA03, OPA05, OPA09, OPA10, OPA14, OPA15, OPA18, OPA20。八个引物扩增8个供试菌株,共获得441条DNA片段,片段大小在0.27~3.67Kb之间,不同菌株不同引物扩增的DNA谱带谱幅差异较大,如 OPA03的谱幅为10~13,而 OPA09的谱幅为6~8。同一引物扩增的不同菌株其DNA谱带不尽相同,说明供试菌株间基因组DNA呈多态性。

**2.3.2 相似系数与聚类分析:**具8个引物扩增的8个供试菌株的扩增结果(1或0)输入电脑,利用NTSYS软件计算两两菌株之间的相似系数,组成相似系数矩阵。结果显示:1~3号杂交菌株之间的相似系数为0.893~0.962,它们与其亲本S之间的相似系数为0.842~0.859;4~6号杂交菌株之间的相似系数0.857~0.925,与其亲本SS01之间相似系数为0.708~0.902;表明杂交菌株与其双核体亲本基因组具有较大差异,杂交菌株之间存在着不同程度差异,其相似系数聚类图见图1。

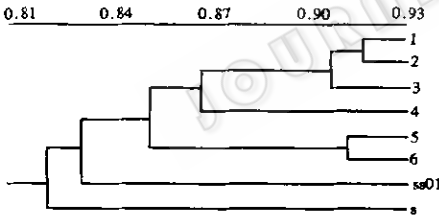


图1 杂交菌株DNA相似系数聚类图

如图1所示,供试菌株在81.6%相似水平上聚为一类,在85.1%相似水平上聚为三类,I类为所有杂交菌株,II类仅为SS01 1个菌株,III类仅为S1个菌株。表明杂交菌株与其双核体亲本的基因组存在较大差异,杂交菌株是真正的杂交后代。

在I类中根据系统聚类的单调性性质即每次聚合的相似系数由大到小划分为2个复合组(5号、6号菌株)、(1、2、3号菌株)及一个独立组即4号菌株。

4、5、6号菌株为SS01 × N1m(A3B5)的杂交菌株,虽然供体相同,但受体是交配型相同的三个不同单核体,因此三个杂交菌株存在着一定的遗传差异,4号菌

株与5、6号菌株遗传差异较大。然而1、2、3号菌株为N1m(A3B5)的杂交菌株,其遗传差异较小,一方面说明了香菇孢子单核体的同源性和多样性,另一方面也说明了香菇双单杂交菌株DNA的多态性。

### 3 讨论

拮抗试验是鉴别香菇菌株的传统方法,然而这种方法只是从菌株菌落间的形态(表型)变化来予以鉴定,不能反映菌株间的遗传物质的差别,特别是杂交菌株与其双核体之间拮抗性很弱时,往往会对杂交菌株的鉴定工作带来困难,甚至会把伪杂种(如双核体亲本)当作杂种,严重妨碍了育种工作进程和质量。RAPD作为一项现代分子生物学技术在食用菌遗传学上应用十分广泛。该技术能简单、快速、灵敏地反映香菇不同菌株间的基因组差异。本试验RAPD分析表明:获得的6个杂交菌株与其双核体亲本DNA基因组存在较大差异,6个杂交菌株是真正的杂交后代,且6个杂交后代之间其遗传差异程度不等,其中以1号与2号菌株遗传差异最小,同源性最大;5号与6号菌株遗传差异也较小,同源性较大。

将RAPD结果进行聚类分析,直观地展示了菌株间的遗传差异与亲缘关系。国内有学者曾用聚类分析选择杂交亲本,并以品比试验验证预测的结果,证明了利用聚类分析法选择杂交亲本组合是可行的<sup>[1]</sup>。譬如:若从本研究8个供试菌株选择亲本回交,可以选择彼此遗传距离大的S与1号菌株杂交,这样的组合其杂交后代杂种优势强,而不应选择彼此遗传距离较小的5号与6号菌株杂交。聚类分析的结果还可以为香菇的杂交亲本选择提供科学依据。同样我们可以选择与亲本遗传距离较大的菌株作为一个参考指标进行筛选,有目的地进行选育菌种与进行遗传相关研究。因此,我们提出食用菌菌株间的DNA相似系数值可以作为杂交育种的辅助的遗传标记。

总之,RAPD技术研究表明香菇双-单杂交菌株与其双核体亲本DNA相似性差异明显,而且能筛选到香菇RAPD扩增的适宜引物,就可能应用用来区分香菇不同菌株,进而以DNA指纹图谱进行香菇的分类、鉴定等研究。

### 参 考 文 献

[1] 黄年来主编. 中国香菇栽培学. 上海:上海科技文献出

- 出版社, 1994, 1~477.
- [2] Buller A H R. *Research on Fungi*. Vol. 4, Longmans, Green, and Co. London, 1931, 20~80.
- [3] Kl. Mori., 杨庆尧译. 国外食用菌研究, 1983, 1: 188~195.
- [4] 叶明, 潘迎捷, 陈永萱. 中国食用菌, 1999, 18(4), 14~16.
- [5] Strongman D B. *Mycologia*, 1993, 85:65~70.
- [6] 刘学敏, 惠东威, 张明厚等. 菌物系统, 1997, 16(2): 128~133.
- [7] 叶明, 潘迎捷, 陈永萱. 安徽机电学院学报, 1999, 1:49~54.
- [8] 叶明, 潘迎捷, 陈永萱. 南京农业大学学报, 1999, 22(3):37~40.
- [9] 陆准. 食用菌, 1986, 2:11~15.