

双孢蘑菇分子标记研究进展*

李荣春

(云南农业大学食用菌研究所 昆明 650201)

摘要: 双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 是世界上最重要的人工栽培的食用菌, 近 20 年来双孢蘑菇分子标记研究发展迅速, 取得了许多阶段性成果。本文简要地对双孢蘑菇同工酶标记, 电泳核型, RFLP, RAPD, AFLP 等分子标记研究的发展状况进行了综述。

关键词: 双孢蘑菇, 同工酶标记, 电泳核型, DNA 分子标记

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0064-03

双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) 是全球栽培面积最大, 产量、产值最高的食用菌。双孢蘑菇是一种单因子次级同宗配合方式进行遗传的食用真菌, 这种生

* 云南农业大学校长基金资助项目

收稿日期: 2000-12-27, 修回日期: 2001-03-20

活史是一种强制自交的生活史,这是双孢蘑菇育种研究(特别是杂交育种研究)进展比较缓慢的主要原因。

在双孢蘑菇生物学研究中,早期主要是应用形态学特征和生理学特征。Tim Elliott 应用形态特征和营养缺陷型标记的生理学特征对双孢蘑菇的性特征及生活史进行了研究,得出了次级同宗配合的生活史的结论^[1]。但是形态特征和生理特性标记由于受环境条件的影响很大,这类标记往往不够稳定,或者变异幅度较大,因而无法作为一个高标准的标记,再加上双孢蘑菇形态和生理上的特殊性,所以较少使用。这些特殊性主要表现为:

双孢蘑菇的同核体菌丝和异核体菌丝无明显形态学差异,不象其它多数担子菌的菌丝有无锁状联合,可用于区别;双孢蘑菇同核体菌丝和异核体菌丝每个细胞的核都是多数,不象其它大多数担子菌具有单核和双核之分;Anderson (1993)报道双孢蘑菇的基因组中,有许多 DNA 序列足以超过一个以上拷贝形式存在。这使得我们可利用的营养缺陷型的标记的数目大为减少。

随着分子生物学的发展,运用分子标记的理论和技术开展对双孢蘑菇的研究在世界范围广泛地开展起来。这不仅因为双孢蘑菇是经济价值较大的物种,而且是因为应用分子标记的理论和技术来研究双孢蘑菇的生活史,遗传变异,以及育种具有重要的学术意义和应用前景。所以经过几十年的发展,取得了不少成果。本文将简要地总结应用同工酶技术,电泳核型技术,RFLP, RAPD 和 AFLP 等分子标记技术在双孢蘑菇生物学研究中取得的研究进展。

1 同工酶技术

同工酶标记,既是一种生化标记,还由于同工酶的氨基酸取代作用为相应 DNA 所编码,因此可以看作是一种分子标记。利用同工酶技术,可以鉴定出特定酶的不同等位基因形态,同时同工酶标记以孟德尔遗传方式进行遗传,所以是一种比较方便的分子标记。

应用同工酶标记技术,人类对双孢蘑菇的分子生物学研究取得的主要进展如下:

H 型(高产型),G 型(优质型)和 S 型(低产或不产)标记^[2]性因子复等位基因的发现^[3];与褐变相关的生化标记位点^[5];荷兰的 NEUT (1991)应用酯酶同工酶把双孢蘑菇分为白色品系,米色品系,Horrouda 杂交品系和 Houwitu 杂交品系的酶标记^[6];同工酶连锁群遗传图的建立 (Royse & May 1993);检测常规和原生质体杂交育种过程,并检验杂合子^[4]。

2 电泳核型标记技术

电泳核型又称为染色体组型分析,利用脉冲凝胶电泳将一个物种的整套染色体在凝胶上分离成可分辨的谱带,然后根据染色体的多态性来鉴别不同材料的遗传差异的一种技术。Sonnenberg (1996)利用电泳核型技术观察到了双孢蘑菇 13 条染色体中的 11 条^[5],并发现不同菌株的染色体长度有所不同,即染色体本身是多态性的。rDNA 的拷贝数变异较大。Royse 等 (1992)也应用电泳核型技术对双孢蘑菇的核型进行了分析。

3 DNA 分子标记技术

进入 80 年代后以 Southern 杂交和 PCR 为代表的两大分子生物学新技术的出现,促

进了 DNA 分子标记技术和分子生物学的突飞猛进。基于 Southern 杂交的 RFLP 技术和 PCR 的 RAPD 等技术以及综合了 Southern 杂交技术和 PCR 技术为一体的 AFLP 技术,使双孢蘑菇遗传标记及分子生物学研究进入了新时代,经过近 20 年的发展,在双孢蘑菇的遗传标记和分子生物学方面取得了很多成果。大量的基因被定位 如交配类型基因 (Mtg) 被定位于 1 号最大连锁群即 I 染色体上^[6]。担子产生担孢子的基因 (BSN) 被证明与 Mtg 是连锁的,仍被定位于 I 染色体上^[7]。酪氨酸基因酯酶 EstA, B 和 C 的定位, ATP 合成酶的定位。大量复等位基因的发现 (基因的多态性) 如 1972 年 Tim Elloitt 报道的双孢蘑菇是单因控制的次级同宗配合的生活史,具有 A1A2 的性因子基因^[1]。后来, Castle (1987) 报道性因子的等位基因不少于 3 个, 1995 年 Inbernon 又报道了一些新的性因子等位基因^[8]。现在共发现 14 个性因子等位基因,且出现的概率均一。

减数分裂后核迁移分析 担子减数分裂后的 4 个核如何迁移到两个担孢子中是双孢蘑菇基础研究中倍受重视的问题,它直接关系到该物种生活史的理解和描述。早期 Tim Elloitt 利用营养缺陷型标记和细胞学观察,提出了非随机迁移的结论^[1]。后来 Rayse 和 May 等通过细胞学观察和同工酶标记。Kerrigan^[9]用 RFLP 标记。Khush^[10]用 RAPD 标记。Xu 等用 MtDNA 的 RFLP 标记。Summerbell 等^[11]对 7 个亲本及其 367 个单孢后代的 RFLP 分析。所有上述研究都表明双孢蘑菇减数分裂后形成的 4 个单倍体核确实是非姐妹核进入同一孢子的非随机迁移的。并且减数分裂是在低水平重组的背景下进行。重组率低于 4%。遗传连锁图的建立 Kerrigan^[12]建立了一个集同工酶标记, RFLP 标记, RAPD 标记, rDNA 重复序列以及少量外部表型性状等多种标记的遗传连锁图。这个连锁图的建立,为进一步分析双孢蘑菇的遗传行为,定位和克隆有关基因提供了一个很好的参照系。杂交育种研究发展迅速 由于采用 DNA 分子标记技术,使得人们对杂交后杂合子的检出方便了,从而促进了双孢蘑菇杂交育种研究的迅速发展。如 Summerbell (1989) 等研究了双孢蘑菇的遗传特性; Sommerberg 等^[13]研究了线粒体 DNA 的基因型和其遗传特征。这些研究巨大地丰富和发展了双孢蘑菇杂交育种的理论和实践知识。

种质资源研究成果丰富 Xu 等应用 RFLP 标记,分析了全球 400 多个菌株的线粒体 DNA 的差异,把环球菌株划分为 4 大类,其中有中国福建的菌株 4 个。Bastide^[14]研究线粒体 DNA 对菌丝生长影响,把 MtDNA 作用机制划分为温度依赖型和非温度依赖型。Kerrigan^[15]研究了环球野生资源,依据 DAN 的相似度而分全球资源为 2 个亚种 (*Agaricus bisporus* var. *bisporus* 和 *Agaricus bisporus* var. *burnettii*) 的 5 大类型。本文作者利用 RAPD 标记研究了采自英国牛津的野生菌株 96. 4 和它的单孢后代的遗传变异^[16,17],利用 AFLP 标记研究了美洲和欧洲的 22 个野生菌株和 5 个商业品种的遗传多态性^[18]。

大量的基因被克隆或正在克隆 如: ATP 合成酶基因,漆酶基因,纤维素酶基因等都被克隆并测序。其它许多基因正在被克隆,如子实体启动基因 (FBS) 正在英国进行克隆,这个基因位点是本文作者发现的。

4 结语

综上所述,经过几十年的发展,双孢蘑菇分子标记研究已取得巨大的成果,对这个人类已栽培 300 多年并且现在还广泛栽培的物种的研究和认识已达到前所未有的高度。但是这些研究主要集中在双孢蘑菇的基础研究领域。可以预见随着分子标记技术和双孢蘑菇基础研究的深入,更多的基因将被标记,更高密度、实用有效的遗传连锁

图将被建立, 大量的重要基因将被定位、分离和克隆, 这将促进双孢蘑菇分子生物学的研究在培育更优质、更高产的新品种, 在病虫害防治, 高效栽培和产后保鲜等应用领域取得更大的突破。

参考文献

- [1] Elliott T J. *Mushroom Sci.* 1972, 11 ~ 18.
- [2] Wang H C, Wang Z S. *Mushroom Sci.* 1989, 12 (1): 87 ~ 100.
- [3] Royer J C, Hintz W E, Kerrigan R W, *et al.* *Genome* 1992, 35: 694 ~ 698.
- [4] May B, Royse D J. *Exp Mycol.*, 1982, 6: 283 ~ 292.
- [5] Sonnenberg A S M, Groot P W J, Schaa P J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1996, 12: 4542 ~ 4547.
- [6] Xu J, Kerrigan R W, Horgen P A and Anderson J B. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 3044 ~ 3049.
- [7] Imbermon M, Callac P, Gasqui P, *et al.* *Mycologia*, 1996, 88 (5): 749 ~ 761.
- [8] Imbermon M, Callac P, Granit S *et al.* in Elliott T J eds: *Science and cultivation of edible fungi*. Rotterdam. 1995, 11 ~ 19.
- [9] Kerrigan R W, Royer J C, Baller L M *et al.* *Genetics*, 1993, 133: 225 ~ 236.
- [10] Khush R S, Becker E, Wach M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58: 2971 ~ 2977.
- [11] Summerbell R C, Castle A J, Horgen P A, *et al.* *Genetics*, 1989, 123: 292 ~ 300.
- [12] Kerrigan R W, Royer J C, Baller L M, *et al.* *Genetics*, 1993, 133: 225 ~ 236.
- [13] Sonnenberg A S M, Von Loon P C C, Van Griensven L J L D. in: Van Griensven, L. J. L. D. ed. *Genetics and breeding of Agaricus Wageningen*, 1991, 42 ~ 51.
- [14] Bastide P Y, Sommerberg A S, Van Griensven L J L D *et al.* *Appl Environ Microbiol* 1997, 63 (9): 3426 ~ 3431.
- [15] Kerrigan R W. *Can. J. Bot.* 1995, 73 (Suppl. 1): S973 ~ S979.
- [16] 李荣春. 云南大学学报, 2001, 23 (植物学专辑): 21 ~ 27.
- [17] 李荣春. 植物研究, 2001, 21 (4): 210 ~ 216.
- [18] 李荣春. 云南植物研究, 2001, 23 (4): 444 ~ 450.