

高等真菌细胞遗传学研究进展

边银丙 罗信昌

(华中农业大学应用真菌研究所 武汉 430070)

细胞遗传学的主要内容是研究生物在染色体形态、结构、功能和行为等方面的特点,以及这些特点与生物遗传变异和进化的关系^[1]。大多数真菌的细胞核较小,许多种群的染色体数目不清楚,真菌细胞遗传学的研究远远落后于动植物细胞遗传学的研究水平。随着各种显微技术、生物化学技术和分子生物学技术的发展,真菌细胞遗传学的研究近年来取得了显著进展。

1 染色体组型研究的发展

早期对染色体的研究受技术上的限制,主要局限于

少数染色体粗大的动植物材料。五十年代以后,先后诞生了低渗处理技术、秋水仙素处理技术和高分辨显带技术^[2],一些子囊菌和担子菌的染色体组型开始被研究报道^[3]。真菌的染色体不仅小,而且染色困难,用染色压片的方法进行光镜观察,常因为染色体分散不够或所用材料取样时期掌握得不够合适,从而造成染色体计数上的误差^[8,9]。通过电镜观察联会复合体(synaptonemal complex)来核计真菌染色体数目,所得结论均与光镜观察结果一致。连锁群分析是估计真菌染色体数目的另

表1 某些高等真菌染色体组型的研究结果

真菌种类	光镜观察	电镜观察	连锁群分析	PFGE 分析
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$n=17^{[3]}$		$n=17^{[3]}$	$n=16^{[4]}$
裂殖酵母 <i>Schizosaccharomyces cerevisiae</i>	$n=3^{[3]}$		$n=3^{[3]}$	$n=3^{[15]}$
粗糙链孢菌 <i>Nearospora crassa</i>	$n=7^{[3]}$		$n=7^{[3]}$	$n=7^{[16]}$
构巢曲霉 <i>Aspergillus nidulans</i>			$n=8^{[3]}$	$n=8^{[17]}$
灰盖鬼伞 <i>Coprinus cinereus</i>	$n=13^{[2]}$	$n=13^{[2]}$		$n=13^{[5]}$
香菇 <i>Lentinula edodes</i>	$n=8^{[6,7]}$	$n=8^{[11]}$		$n=8^{[14]}$
草菇 <i>Volvariella volvaria</i>	$n=9^{[8]}$			$n=9^{[18]}$
双孢蘑菇 <i>Agaricus bisporus</i>	$n=11^{[9]}$			$n=11^{[19]}$
裂褶菌 <i>Schizophyllum commune</i>	$n+n=12^{[10]}$	$n+n=9^{[10]}$		$n+n=13^{[10]}$
平菇 <i>Pleurotus ostreatus</i>	$n=7^{[3]}$	$n=7^{[3]}$	$n=7^{[3]}$	$n+n=11^{[19]}$
				$n=6^{[4]}$

一个有效方法,细胞学和遗传学研究表明,连锁群数目与单倍体染色体数目相同,每个连锁群对应一个可识别的染色体,连锁群分析方法所确定的真菌染色体数目与光镜及电镜观察的结果基本一致。

脉冲场凝胶电泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)是近年来迅速发展起来的新型电泳技术,可

用于分离分子量达 10Mb(1Mb=10³kb) 的巨型染色体 DNA 分子^[12,13]。自 1984 年以来,已有许多真菌的电泳核型被研究报道(见表 1)。除酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)之外,单倍体菌株的 PFGE 分析结果均与细胞学观察和连锁群分析的结果一致,而双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)同核体菌株和裂褶菌(*Schizophyllum commune*)双核体菌株所分离到的染色体 DNA 数目均大于细胞学观察和连锁群分析所估计的染色体数目^[10,19],这可能是由于同核体或双核体中同源染色体非同步迁移所致。PFGE 分析技术与分子杂交技术相结合,不仅为各种真菌的核型分析,而且为染色体作图和染色体长度多型性(Chromosomal Length Polymorphisms, CLP)的遗传变异研究开辟了新的途径。

2 染色体长度多型性及其遗传变异

Iwaguchi 等人研究表明^[20],白假丝酵母(*Candida albicans*) 27 个菌株在脉冲电场中均分离到 8 条染色体 DNA,同源基因探针 MGL₁能与核型图谱中的 2 条染色体 DNA 进行分子杂交,其中有 1 条染色体 DNA 的分子量在菌株间非常保守,而另 1 条染色体 DNA 的分子量在菌株间变异极大。由于白假丝酵母供试菌株均是双倍体,菌株间的 CLP 现象被认为是同源染色体之间存在广泛异质性所致。Kim 等人对西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.nievum) 7 个不同地理来源的菌株进行了 PFGE 分析^[21],确定其染色体 DNA 数目为 5~10 条不等,最大的两条染色体 DNA(4600kb, 3600kb)在 7 个供试菌株中总是同时存在或至少存在 1 条,而其它染色体 DNA 的情形存在极大的变化。

异宗结合担子菌单倍体菌株之间亦存在显著的染色体长度多型性。香菇(*Lentinula edodes*)菌株 JSM 4H-1 和 CH-26 在第 3 条和第 7 条染色体 DNA 的分子量上存在差异,而其它 6 条染色体 DNA 的分子量相同^[11]。D' Souza 等在木材白腐菌(*Phanerochaete chrysosporium*)菌株 ME-446 基因组中不仅分离到与菌株 BKMF-1767 相同的 10 条染色体 DNA,还分离到介于 BKMF-1767 第 IV 条和第 V 条染色体 DNA 之间的第 IV(i) 条染色体 DNA,同源基因 CLG₅ 探针能与 BKMF-1767 的第 IV 条和第 V 条染色体 DNA 杂交,但不能与 ME-446 的第 IV 条和第 V 条染色体 DNA 杂交,却能与 ME-446 的第 IV(i) 条染色体 DNA 杂交^[22]。据此推测,菌株 ME-446 的第 IV(i) 条染色体可能是由于第 V 条染色体上含 CLG₅ 基因的 DNA 片段插入到第 IV 条染色体中形成的额外染色体。

Niwa 和 Yanagida 等人研究发现^[23],粟酒裂殖酵母

(*Schizosaccharomyces pombe*) 三倍体减数分裂(单倍体与二倍体之间)仅产生一类易变的非整倍体,其中第 3 条染色体是双倍体(disomic)。对粟酒裂殖酵母非整倍体菌株 HM₂₄₈ 进行脉冲电泳分析,发现它不仅含有 3 条野生型的染色体 DNA,还含有 1 条分子量约 500kb 的极微染色体(mini-chromosome)DNA,揭示了菌株 HM₂₄₈ 是一个部分非整倍体(partial aneuploid)。Smith 等人的分子杂交试验表明^[24],靠近第 3 条染色体着丝粒的同源基因 ADE₆ 和 PEE105 探针,能与菌株 HM₂₄₈ 第 3 条染色体 DNA 和极微染色体 DNA 杂交,而存在于第 3 条染色体 DNA 末端的 100 个 rDNA 拷贝在极微染色体上却不存在,证实了极微染色体起源于第 3 条染色体。

Royer 等人的研究表明^[10],双孢蘑菇异核体菌株 Ag936 的电泳核型图谱是两个同核体亲本菌株 Ag1-1 和 Ag89-65 电泳核型图谱的混合型,其中 Ag1-1 的核型占优势。Arima 和 Morinaga 研究发现,灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)两个可亲和的单倍体菌株 5302 和 Dd13 之间存在染色体长度多型性,这种多型性随机地遗传给 F₁ 代单核体菌株。在 F₁ 代单核体电泳核型中,不仅存在两种亲本类型,还出现了一些新的类型^[11]。

曾荣等人用电场诱导灰盖鬼伞 Co5104 his⁻ 菌株与佛罗里达侧耳(*Pleurotus florida*) Pf67 ade⁻ 菌株进行原生质体融合^[25],采用 PFGE 分析比较融合子与两亲本的电泳核型图谱,结果表明融合子的染色体变异以整条染色体丢失为主,来自亲本 Pf67 ade⁻ 的染色体不断丢失,最后融合子的组成以来自 Co 5140 his⁻ 的染色体为主,反映出担子菌远缘原生质体融合子具有不稳定性。

3 种间及种内异核体中的细胞核行为

几种异宗结合子囊菌和担子菌的交配型基因已分别被克隆,研究表明它们既有性的功能,又控制营养体的亲合性^[26]。灰盖鬼伞和裂褶菌等双因子四极性异宗结合担子菌交配型因子(基因)的结构和功能的研究亦取得了重要进展^[27,28],交配型因子 A 和 B 能对许多调节基因和结构基因的表达起直接或间接的调控作用,不仅影响着异核体的形成,而且影响着异核体内核的迁移、减数分裂和子实体发育。对交配型基因结构与功能的深入研究,不仅有助于揭示种内性亲和的机制,而且将为克服种间生殖隔离奠定坚实的理论基础。

科学家们曾试图通过原生质体融合实现食用担子菌的种间或属间杂交,但由于种间或属间生殖隔离机制依然存在,在原生质体发生融合后,两个亲本的细胞核并不一定能发生融合,且原生质体融合子在有丝分裂过程中亦会发生染色体丢失^[25]。国内外大量研究已

表明,通过原生质体融合来实现担子菌远缘杂交是不可行的,在食用担子菌育种方面亦没有现实意义。

4 染色体作图与基因定位

长期以来真菌染色体作图的方法与植物染色体作图一样,亦通过连锁分析、三点测交和四分体分析等方法进行,一些真菌的染色体作图已取得较大进展^[1]。随着分子生物学研究技术的发展,从丝状真菌中已克隆到的基因达230个以上,克隆到的基因主要包括如下几种类型^[26~30]:(1)酿酒酵母染色体上的着丝粒(CEN)基因,自主复制序列(ARS)和端粒(TEL)基因;(2)交配型基因;(3)结构基因;(4)重复序列和内含子(intron);(5)某些基因表达的调控基因。

随着PFGE技术被广泛应用于分离真菌的染色体DNA,真菌的染色体作图已能通过Southern杂交将克隆基因定位到染色体DNA上,并借助于分子杂交试验的结果判断基因之间是否存在连锁关系。采用同源基因探针或cDNA探针与染色体DNA进行杂交,Asgeirsdottir等人将裂褶菌的交配型因子A定位到分子量最大的染色体DNA(4700kb)上,将交配型因子B定位到分子量最小的染色体DNA(1600kb)上,而受交配型因子调控的5个发育调节基因分别定位到5条染色体DNA上^[19]。Lodder等人将双孢蘑菇的纤维素酶基因和漆酶基因分别定位到4条不同的染色体DNA上。D'Souza等人将木材白腐菌木质素过氧化物酶5个同工酶基因或cDNA探针定位到5条染色体DNA上^[22]。

综上所述,高等真菌细胞遗传学已取得了令人鼓舞的成果,为进一步开展真菌遗传育种和分子生物学研究奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] 黎中明,林文君. 细胞遗传学. 成都:四川大学出版社, 1988, 1~12.
- [2] 虞世嘉. 生物学通报, 1987, 3: 13~16.
- [3] 俞大绛. 真菌遗传学节要. 北京:北京农业大学出版社, 1987, 25~156.
- [4] Sagawa I, Nagata Y J. Gen. Microbiol, 1992, 38: 47~52.
- [5] Arima T, Morinaga T. Mycoscience, 1995, 36: 9~15.
- [6] 吕作舟. 华中农业大学学报, 1982, 2: 28~40.
- [7] 田中隆庄. Jour Jap Bot, 1972, 47 (10): 289~295.
- [8] Chang S T, Chu S S. Cytologia (Tokyo), 1969, 34: 293~299.
- [9] 李秀玉, 颜耀祖, 申荣段. 真菌学报, 1991, 10 (1): 72~78.
- [10] Royer J C, Hintz W E, Horgen P A. Genome, 1992, 35: 694~698.
- [11] Arima T, Morinaga T. Trans Mycol Soc. Japan. 1993, 34: 481~485.
- [12] Lai E, Birren B W, Clark S M. et al. Biotechniques, 1989, 7 (1): 34~42.
- [13] 边银丙, 罗信昌. 食用菌学报, 1996, 3 (2): 45~50.
- [14] Carle G F, Olson M V. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 3756~3760.
- [15] Smith C L, Matsumoto T, Niwa O et al. Nucleic Acid Research 1987, 15 (11): 4481~4489.
- [16] Orbach, M J, Vollrath D. Molecular and cellular Biology, 1988, 4: 1469~1472.
- [17] Brody H, Carbon J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, 86: 6260~6263.
- [18] 陈明杰, 赵绍惠, 张树庭. 食用菌学报, 1995, 2 (1): 1~6.
- [19] Asgeirsdottir S A, Schuren F H J, Wessels J G H. Mycol Res. 1994, 98: 689~693.
- [20] Iwaguchi S T, Homma M, Tanaka K. Journal of General Microbiology. 1990, 136: 2433~2442.
- [21] Kim D H, Martyn R D, Magill C W. Phytopathology, 1993, 83 (11): 1209~1216.
- [22] D'Souza T M, Dass S B, Rossoly A et al. Molecular Microbiology. 1993, 8 (5): 803~807.
- [23] Niwa O, Yanagida M. Curr Genet 1985, 9: 463~470.
- [24] Smith C L, Matsumoto T, Niwa O et al. Nucleic Acids Research 1987, 15 (11): 4481~4489.
- [25] 曾荣, 张树庭, 刘祖同等. 微生物学报, 1996, 36 (3): 213~219.
- [26] Kues U, Casselton L. Mycol Res, 1992, 96 (12): 993~1006.
- [27] May G, Chevanton L L, Pukkila P J. Genetics, 1991, 128: 529~538.
- [28] Kues I, Tymon A M, Richardson W V J. et al. Mol Gen Genet, 1994, 245: 45~52.
- [29] Glass N L, Volimer S J, Staben C et al. Science, 1988, 241: 570~573.
- [30] 盛祖嘉, 陈永青主编. 微生物遗传学综述文集. 上海: 复旦大学出版社, 1991, 21~34.