

高效草菇分子标记辅助杂交育种方法的建立与应用

赵妍^{1Δ} 林锋^{1,2Δ} 颜素雅^{1,3} 汪虹¹ 陈明杰^{1,2,3*}

- (1. 国家食用菌工程技术研究中心 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 上海市农业遗传育种重点开放实验室
室 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201403)
(2. 上海海洋大学 食品学院 上海 201306)
(3. 南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】建立一种高效草菇分子标记辅助杂交育种方法,并将其应用于选育低温高产草菇的单孢杂交中。【方法】通过出菇试验筛选获得高产草菇菌株,与低温出菇菌株 VH3 一同作为杂交亲本;采用交配型基因分子标记区分草菇单孢子的交配型,并完成杂交配对工作;最后结合快速筛选耐低温草菇菌种技术与杂交子真实性的鉴定方法,在栽培出菇试验前剔除部分不耐低温的草菇杂交子。【结果】出菇试验表明,屏优 1 号的生物转化率最高,用作杂交育种的高产亲本菌株。单孢杂交配对后,最初的 496 株草菇可能杂交菌株经初筛后,只剩余 172 株较耐低温的杂交菌株,使后期出菇试验的工作量减少了 65%;杂交子出菇试验表明,在 28 °C 出菇温度下, VV093 杂交菌株的生物转化率显著高于两个亲本菌株,且农艺性状较好。【结论】建立了一种高效草菇分子标记辅助杂交育种的方法,包括亲本菌株的筛选、单孢交配型的区分、单孢杂交、杂交子的鉴定和筛选等,并在低温高产草菇单孢杂交育种中成功应用。

关键词: 草菇, 杂交育种, 分子标记, 低温筛选

Establishment and application of an efficient cross breeding method assisted by molecular markers of *Volvariella volvacea*

ZHAO Yan^{1Δ} LIN Feng^{1,2Δ} YAN Su-Ya^{1,3} WANG Hong¹ CHEN Ming-Jie^{1,2,3*}

- (1. National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, P. R. China, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China)
(2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)
(3. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] In order to establish an efficient cross breeding method assisted by molecular

基金项目: 上海市农业基础性研究项目[沪农科攻字(2014)第 7-1-5 号]; 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2011)第 1-2 号]; 上海市市级农口系统青年人才成长计划[沪农青字(2014)第 1-17 号]

***通讯作者:** Tel: 86-21-62200747; 邮箱: mjchen@saas.sh.cn

Δ共同第一作者

收稿日期: 2014-08-18; **接受日期:** 2015-01-07; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-02-10

markers of *Volvariella volvacea* and apply it to monospore cross breeding for the cold-tolerant and high-yield *Volvariella volvacea* strain. **[Methods]** In this study, the high-yield strain Pingyou No. 1 tested by cultivation experiment and the cold-tolerant strain VH3 were chosen as crossing parent strains. Then used the molecular marker of mating-type genes in *Volvariella volvacea* to verify mating-type of *Volvariella volvacea* monospore strain and completed the cross breeding. At last part of the cold-intolerant hybrids were eliminated before cultivation experiment using techniques of fast screening of the cold-tolerant *Volvariella volvacea* strain and identification of the hybrid strains. **[Results]** The result of cultivation experiment showed that the strain Pingyou No. 1 got the highest biological efficiency, which would be chosen as the high-yield parent strain. The 172 cold-tolerant hybrid strains were screened out from the original 496 possible hybrid strains so that the workload of cultivation experiment in the late would get a 65% reduction. The result of hybrid strains cultivation experiment showed that VV093 got higher biological efficiency than Pingyou No. 1 or VH3 at 28 °C. **[Conclusion]** Establishment of an efficient cross breeding method assisted by molecular markers of *Volvariella volvacea* included selection of parental strains, identification of monospore strains' mating-type genes, monospore cross breeding, screening and identification of possible hybrid strains, and it was applied to monospore cross breeding for the cold-tolerant and high-yield *Volvariella volvacea* strain successfully.

Keywords: *Volvariella volvacea*, Cross breeding, Molecular markers, Low temperature screening

草菇[*Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing]又名稻草菇、中国菇,在分类学上属真菌界(Fungi),担子菌门(Basidiomycota),伞菌纲(Agaricomycetes),伞菌目(Agaricales),光柄菇科(Pluteaceae)、小包脚菇属(*Volvariella*)^[1],是一种原产自中国热带与亚热带地区的栽培食用菌,距今已有 300 多年的栽培历史^[2]。目前草菇广泛种植于中国台湾、福建、湖南、广东、广西等地,2010 年仅中国大陆的产量就占到全球草菇总产量的 80%^[3]。草菇不仅味道鲜美^[4]、营养丰富^[5],更重要的是草菇作为一种草腐性的食用真菌,能够利用稻草、麦秸、废棉、蔗渣等农业废弃物作为生产栽培原料,且其栽培下脚料还可以被制成有机肥料供农业生产使用^[6],真正实现了农业固废循环的高效利用。

近年来草菇相关产业发展迅速,拥有良好的市场前景,但仍存在诸多问题阻碍了其产业的快速发展,如生产能耗高(通常需要在 30–32 °C 下出菇),生物转化率低(只有 20%左右),常规冷藏温度(4 °C)会引起菌丝体发生自溶、子实体也会液化变软(即子实体表面有液体渗出),菌种易变异退化等,因此草菇栽培用种的改良与替代成为学者们十分关注的研究课题。由于草菇在实际生产中需要高温高湿的

生长环境,因此利用自然环境进行草菇生产主要集中在高温季节,其他季节则需要对栽培设施进行加温管理实现草菇生产,这就使得低温高产草菇新菌株的选育工作显得尤为重要。传统的草菇育种方法多为人工选择育种,主要借助自然变异进行人为选择,获得良种的概率较小,且较为费时费力。杂交育种作为食用菌育种中最重要、最有效的育种方法,为中国食用菌产业的迅猛发展和跃居世界领先水平做出了卓越的贡献。但由于草菇被认为是一种初级同宗结合的真菌,其菌丝细胞多核且无锁状联合,使得育种者无法从形态上区分同核与异核菌丝或亲本与杂交种^[7],因此一直以来草菇育种发展非常缓慢。随着草菇全基因组测序的完成与框架图的组装^[8],分子标记技术与传统育种方法的结合,将为草菇新菌株的选育提供一条有效的途径。本研究拟利用交配型基因作为分子标记,建立一种高效的草菇杂交育种技术体系,并将其应用到低温高产草菇新菌株的定向选育中。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

屏优 1 号、3560、427-434、Z-V23、A8、泰国

No. 1、Vb1、泗联草菇 4 号、0229、Z-VH3、VH3、托 31、大菇托 34、WG、V23、Vn-1、Vn-3, 均由上海市农业科学院食用菌所提供。

1.2 主要仪器及试剂

VS-15000CFN II 高速冷冻离心机、手动移液器, 德国 Eppendorf 公司; HWS12 型电热恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; ABI 9700 型 PCR 扩增仪, Applied Biosystems 公司; JY600+型电泳仪, Bio-Rad 公司; EC3 Imaging System 凝胶成像系统, SYNGENE 公司; 琼脂粉, 基因科技(上海)有限公司; 酵母浸出粉, 北京鼎国生物技术有限公司; 氨苄青霉素、TaKaRa Ex Taq Kit, 宝生物工程(大连)有限公司; D2000 DNA ladder, 天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 供试培养基

PDA 培养基、PDY 培养基参照文献[9]; 栽培培养基: 棉籽壳 95%, 生石灰 5%, 含水量约 70%, 培养料堆制发酵 3 d, 发酵结束后装筐移至室内床架上, 65℃巴氏灭菌 8–10 h, 冷却至 30℃左右备用。

1.4 实验方法

1.4.1 草菇育种亲本菌株的筛选: 供试草菇菌株共 17 个, 每个菌株设 3 个平行, 将发酵好的培养料置于规格为 42 cm×42 cm×9 cm 的培养筐内, 每筐装有 6.5 kg 含水量约为 70%的培养料, 按照常规管理

方法进行草菇的栽培出菇试验^[10]。统计各个菌株的产量, 并计算生物转化率(子实体鲜重与培养料干重的百分比), 获得高产菌株亲本。在草菇子实体完全开伞之前, 用孢子收集器采集高产菌株与 VH3 菌株的孢子备用。

1.4.2 草菇单孢交配型的鉴定: 以高产菌株与 VH3 菌株作为杂交亲本, 选取两者已收集好的孢子, 采用平板稀释涂布法分离获得单孢菌株^[11]。采用改进的 CTAB 法^[12]提取草菇单孢菌株的全基因组 DNA, 根据草菇 A 因子特异性分子标记设计引物(表 1), 借助常规 PCR 检验分离到的草菇单孢菌株 A 位点上的交配型基因类型(高产菌株的单孢定为 A1、A2; VH3 菌株的单孢定为 A3、A4), 所有 PCR 均设置无菌双蒸水代替模板作为阴性对照。

1.4.3 草菇单孢杂交: 将两亲本的单孢菌株按照 A1A3、A1A4、A2A3、A2A4 组合配对方式接种于 PDA 平皿上, 32℃培养至两亲本菌丝交叉生长在一起^[13], 挑取菌丝交接处及两侧的菌块, 转接至 PDA 斜面上, 置于 32℃培养箱中继续培养 1–2 d, 在超净工作台中肉眼观察, 每次挑取尖端菌丝继代培养 2 次, 得到可能的草菇杂交菌株。

1.4.4 低温初筛及可能杂合子的真实性鉴定: 按照陈明杰等^[14]的草菇耐低温菌株的快速筛选方法, 在可能杂交菌株的菌丝生长阶段初步筛选出具有耐

表 1 草菇亲本菌株中交配型 A 位点特异分子标记的引物
Table 1 Primers used for amplification of A loci in parent strains of *Volvariella volvacea*

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')	退火温度 <i>T_m</i> (°C)	交配型基因 Mating-type gene
A1F	GCTGGTTTGATGTAAGCAGAGGG	53	A1
A1R	GTGTTGGAAAGACGCTCTGCTGT		
A2F	GGCTTTGAATGGCAATCGCTCCT	60	A2
A2R	CGTGAAAGGCGTCCAGTTTATGC		
A3F	AGGGCATTCACCTATTCGCTTTC	51	A3
A3R	AATGTGAACAGTTTGAGCGGAGT		
A4F	GTGGTTGGGATGGAAGGTTGTGA	55	A4
A4R	CTGTGAGGGTTTGTGGTGGGATA		

低温特性的可能杂交子。初筛后采用常规 PCR 扩增交配型基因分子标记, 鉴定可能的杂交菌株是否为真正的杂合子。

1.4.5 杂交子出菇筛选: 按照 *A1A3*、*A1A4*、*A2A3*、*A2A4* 交配型组合以及低温筛选中恢复长速比亲本 VH3 表现突出, 选取部分杂交子与亲本一起进行 28 °C 的低温出菇试验, 以期筛选到低温高产的草菇新菌株, 并对筛选得到的优良新菌株进行子实体的交配型鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同草菇菌株的生物转化率

从表 2 可以看出, 17 个草菇菌株的生物转化率

存在较大差异, 其中屏优 1 号的生物转化率最高, 达到 21.73%。根据栽培出菇的试验结果, 最终选择高产菌株屏优 1 号作为杂交的亲本菌株之一。

2.2 亲本单孢交配型统计

应用平板稀释涂布法, 共获得屏优 1 号孢子分离菌株 27 株, VH3 孢子分离菌株 18 株。单孢菌株的交配型通过交配型基因特异分子标记进行鉴定 (图 1、2), 其中图 1 显示的是亲本菌株屏优 1 号和 VH3 的交配型基因特异性扩增片段。图 2A 和图 2B 是对 10 株屏优 1 号单孢菌株交配型的鉴定结果, 可知 p1、p4、p7、p8 为 *A1* 单孢, p2、p3、p9、p10 为 *A2* 单孢, 而 p5、p6 为异核型菌株; 同理图 2C 和图 2D 是对 10 株 VH3 单孢菌株交配型的鉴定结

表 2 不同草菇菌株生物转化率				
Table 2 Biological efficiency of different <i>Volvariella volvacea</i> strains				
菌株 Strains	生物转化率			
	Biological efficiency (%)			
	平行 1 Repetition 1	平行 2 Repetition 2	平行 3 Repetition 3	平均值 Average
屏优 1 号 Pingyou No. 1	13.80	22.37	29.02	21.73±4.41 a
3560	2.99	1.95	0.92	1.95±0.60 f
427-434	3.62	4.62	11.64	6.63±2.52 ef
Z-V23	13.37	17.34	17.26	15.99±1.31 abc
A8	11.45	15.53	14.32	13.77±1.21 bcd
泰国 No. 1 Thailand No. 1	6.81	12.98	13.36	11.05±2.12 cde
Vb1	17.22	12.10	14.86	14.72±1.48 bcd
泗联草菇 4 号 Silian No. 4	7.10	5.65	8.37	7.04±0.79 ef
0229	17.58	21.49	16.68	18.58±1.48 ab
Z-VH3	9.83	5.77	10.95	8.85±1.57 de
VH3	5.42	14.63	13.92	11.32±2.96 cde
托 31 Tuo 31	6.52	8.77	11.43	8.91±1.42 de
大菇托 34 Dagutuo 34	8.84	9.23	7.98	8.68±0.37 de
WG	9.87	11.61	10.02	10.50±0.56 cde
V23	13.70	10.44	14.04	12.73±1.15 bcde
Vn-1	20.13	14.92	14.03	16.36±1.90 abc
Vn-3	16.95	9.43	15.75	14.04±2.33 bcd

注: 不同小写字母表示 $P=0.05$ 水平上差异显著。
Note: Different lower case letters indicate significant differences at $P=0.05$ level.

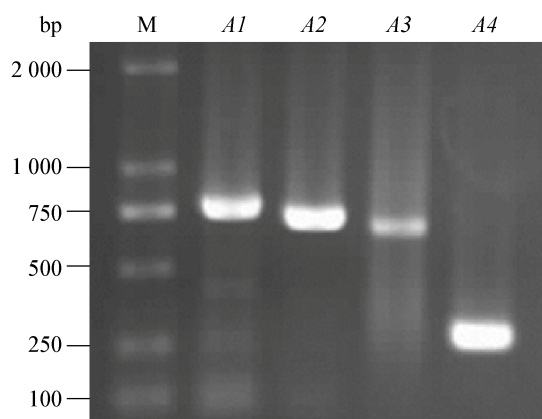


图1 4种草菇交配型基因特异性扩增片段

Figure 1 Specific DNA bands of four kinds of *Volvariella volvacea* mating-type genes

注: 条带 A1-A4 分别代表 4 种不同的交配型基因扩增片段。

Note: Bands A1-A4 represent four kinds of mating-type genes amplified fragment.

果。最终鉴定得到屏优 1 号的 27 株孢子分离菌株中含有 23 株同核体单孢菌株(其中 15 株 A1、8 株 A2), VH3 的 18 株孢子分离菌株全部为同核体单孢菌株(其中 7 株 A3、11 株 A4)。

2.3 草菇单孢杂交

按照 A1A3 (20 组)、A1A4 (95 组)、A2A3 (20 组)、A2A4 (44 组)配对方式, 将屏优 1 号与 VH3 的同核体单孢菌株接种到 PDA 平皿上, 32 °C 下恒温培养, 待两亲本同核体单孢菌丝生长到一起时, 挑取菌丝两侧与交接处的菌块, 转接至 PDA 试管斜面上, 32 °C 下继续恒温培养 1-2 d, 并继代培养 2 次。在单孢杂交试验中, 共获得单孢杂交配对 179 组, 为了提高每组杂交成功的概率, 并依据前人挑取杂交子的经验^[15], 每组挑取菌丝交接处及两侧合计 3 块菌块而获得可能杂交子, 去除生长缓慢的菌株后得到 496 株可能的杂交子。

2.4 低温初筛及可能杂合子的真实性鉴定

将可能的杂交菌株与 VH3 菌株一同放置于 0 °C 进行低温处理。与 VH3 菌株相比, 选择恢复生长速度相同或者较快的菌株作为初步筛选出的具有耐低温特性的可能杂交子, 共获得耐低温特性优良的可能杂交菌株 235 株(图 3)。

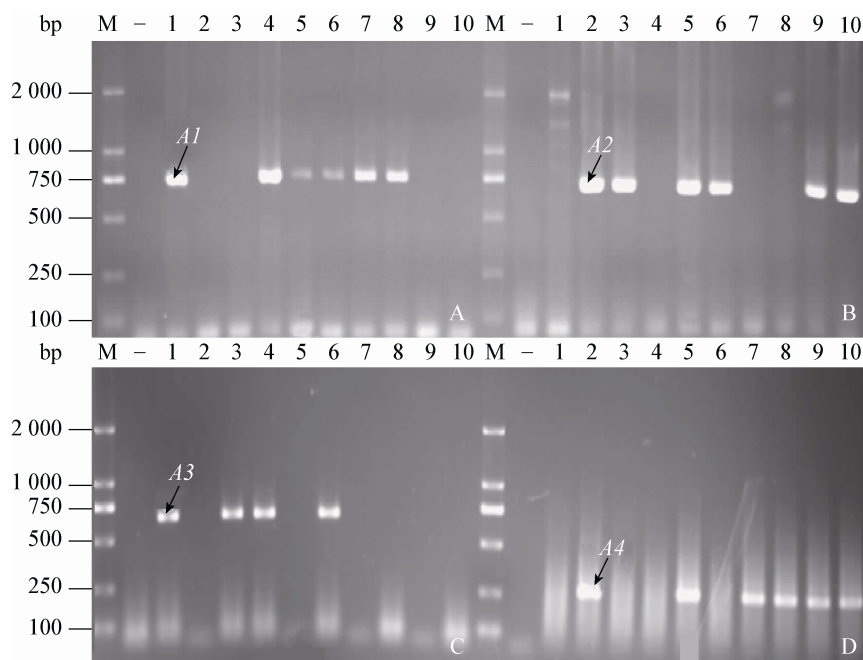


图2 草菇单孢菌株交配型鉴定

Figure 2 Mating-type genes identification in monospore strains of *Volvariella volvacea*

注: -: 阴性对照; A 和 B 中 1-10 分别为屏优 1 号的单孢菌株 p1-p10; C 和 D 中 1-10 分别为 VH3 的单孢菌株 v1-v10.

Note: -: Negative control. 1-10 of A and B represent monospore strains p1-p10 of Pingyou No. 1. 1-10 of C and D represent monospore strains v1-v10 of VH3.

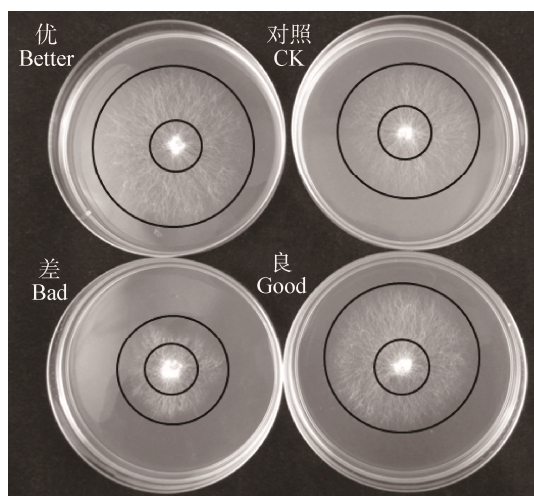


图3 草菇可能杂交菌株的低温筛选

Figure 3 Low temperature screening for possible hybrid strains of *Volvariella volvacea*

注: 对照为草菇耐低温菌株 VH3.

Note: The cold-tolerant strain VH3 as the control strain.

可能杂交子经过两次挑取尖端菌丝继代培养后, 尽可能排除了亲本双方菌丝混合生长的情况, 然后利用交配型基因分子标记从分子水平上鉴定杂合子的真实性, 只有当可能杂交菌株同时具有两亲本的特异性交配型基因分子标记时, 才初步判断其为真正的杂合子, 而不能同时具备双亲特异性交配型分子标记的菌株为非杂交子将被剔除, PCR 结果表明初筛后的 235 株可能杂交菌株只有 172 株为真正的杂合子。图 4 所示是利用屏优 1 号的 A1 型

单孢菌株与 VH3 的 A3 型单孢菌株杂交组合后所挑取的可能杂交子的 PCR 鉴定电泳图, 其中 pv2、pv3、pv4、pv6、pv7、pv8 菌株同时具有两亲本的特异性交配型基因分子标记, 判断其为真实的杂交子; 而 pv1 和 pv5 只检测出某一条特异性交配型基因分子标记条带, 判断其为非杂合子。

2.5 杂交子栽培出菇试验

选取的 16 个杂交子的栽培出菇相关农艺性状如表 3 所示。原基出现时间、采收时间以及生物转化率各不相同, 其中杂交子 VV093 的生物转化率最高, 达到 37.47%, 与除 VV052 (生物转化率为 31.51%) 之外的其他菌株 (包括亲本菌株) 具有 $P=0.05$ 水平上的显著性差异。在原基形成时间和采收时间方面, VV093 和 VV052 均继承了亲本屏优 1 号出原基早、采收时间早的优良性状。图 5 为亲本菌株和杂交子 VV093、VV051 的子实体照片。由于亲本屏优 1 号正常的出菇温度为 30–32 °C, 在 28 °C 相对低温的出菇温度条件下, 其最早形成的子实体易出现畸形 (图 5A), 而亲本 VH3 则具有较好的菇型, 杂交子 VV093 同时继承了亲本屏优 1 号子实体个头大和 VH3 菇型好的优良性状。杂交子 VV051 原基出现时间和采收时间更接近于 VH3, 并且原基较为密集、单个子实体个头不及屏优 1 号和 VV093; 同时如表 3 所示, VV051 的生物转化率标准误差较大, 说明其平行间生物转化率波动较大。

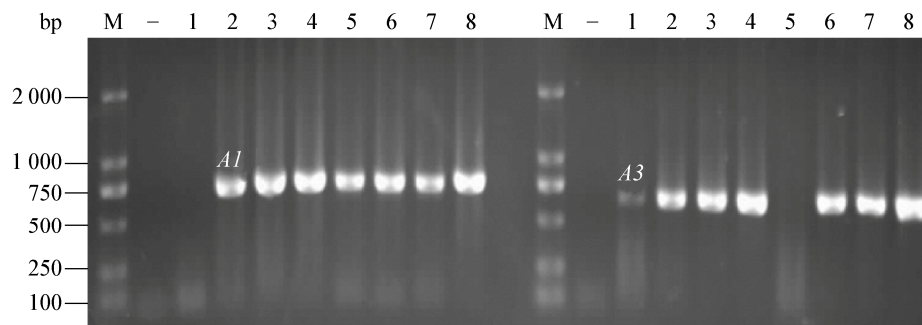


图4 杂交菌株真实性鉴定

Figure 4 Identification of true hybrid strains of *Volvariella volvacea* with A1 and A3 mating-type genes

注: -: 阴性对照; 1–8 分别为可能杂交菌株 pv1–pv8.

Note: -: Negative control; 1–8 represent possible hybrid strains pv1–pv8.

表3 不同草菇杂交子的原基形成时间、开始采收时间及生物转化率

Table 3 Time of primordia initiation, time of first harvest and biological efficiency of different *Volvariella volvacea* hybrid strains

菌株 Strains	交配型基因 Mating-type gene	原基出现时间 Time of primordia initiation (d)	采收时间 Time of first harvest (d)	生物转化率 Biological efficiency (%)
屏优1号 Pingyou No. 1	A1A2	5	8	24.05±3.43 bc
VH3	A3A4	10	12	15.58±2.54 cdef
VV001	A2A3	12	14	13.35±0.63 defg
VV002	A2A3	11	12	12.26±1.73 defg
VV003	A2A3	12	13	11.55±1.61 efg
VV006	A2A3	10	12	11.07±0.54 efg
VV018	A1A4	11	13	12.75±1.85 defg
VV038	A1A3	12	13	4.27±1.95 g
VV041	A1A3	9	11	17.67±0.79 cde
VV043	A1A3	9	11	9.16±1.89 efg
VV049	A2A4	11	12	6.17±1.91 fg
VV050	A2A4	11	12	16.06±4.51 cdef
VV051	A2A4	11	13	22.20±9.74 bcd
VV052	A2A4	5	9	31.51±2.65 ab
VV062	A2A4	9	12	10.21±0.55 efg
VV063	A2A4	8	12	8.81±1.88 efg
VV093	A1A4	5	8	37.47±2.51 a
VV097	A1A4	11	13	14.63±0.43 cdefg

注: 不同小写字母表示 $P=0.05$ 水平上差异显著。

Note: Different lower case letters indicate significant differences at $P=0.05$ level.

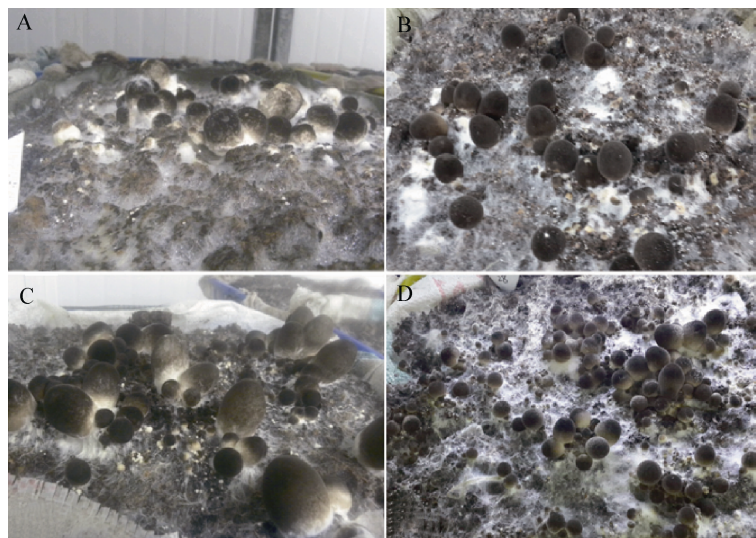


图5 草菇亲本菌株及部分杂交菌株子实体照片

Figure 5 Fruiting bodies of parent and several hybrid strains of *Volvariella volvacea*

注: A-D: 屏优1号、VH3、VV093、VV051子实体。

Note: A-D: Fruiting bodies of Pingyou No. 1, VH3, VV093 and VV051.

根据杂交子出菇试验结果,选取农艺性状较好的杂交子 VV051、VV052 及 VV093 的子实体提取全基因组 DNA,再次采用交配型基因分子标记进行杂合子真实性鉴定,结果都为真实杂交子。如图 6 所示,提取 VV093 的子实体 DNA,使用相应的 A1/A4 引物进行扩增,再次确认 VV093 为真实的杂交子。

3 讨论

杂交育种作为食用菌育种中的常用方法之一,其预见性与方向性较好^[16]。香菇、杏鲍菇、金针菇等食用菌能够成为全球商业化生产的食用菌品种,与杂交育种的成功应用密不可分。研究报道草菇为初级同宗结合真菌^[17],其菌丝细胞多核且无锁状联合,因此很难从形态上区分同、异核菌丝或亲本、杂交种,导致草菇遗传育种研究进展十分缓慢,只能借助传统的驯化、组织分离、孢子分离等人工选择方法进行选育^[18]。若能将杂交育种方法应用到草菇育种中,将会极大地推动草菇产业的快速发展。目前草菇杂交育种的研究工作尚处于探索性阶段,由于草菇无锁状联合现象,杂交育种的难点在于获得真实且高效的杂交子鉴定技术。除形态学鉴定的

探索外,研究者也曾试图利用生化标记来区分杂交种,如营养缺陷型、同工酶等,但生化标记存在获得较难、受环境影响较大等缺陷。近年来随着分子生物学技术在食用菌领域内不断发展与应用,新型的分子标记不断涌现^[19-20]。傅俊生等^[21]采用 SRAP 法筛选亲本单孢菌株的遗传差异条带进而将其转化为 SCAR 标记进行杂种鉴定,这种方法可靠稳定,但其缺点也较为明显,该方法是针对独立的单孢菌株亲本建立的,而单孢杂交往往会有很多不同的单孢亲本组合,不同的单孢菌株存在遗传差异性^[22],导致了这种杂种鉴定方法较为繁琐。陈剑等^[23]成功利用 RAPD 技术鉴定草菇的杂交后代,该技术利用亲本的特异性条带在杂交后代中均能出现的现象来鉴定杂种的真实性,但该方法与傅俊生等的研究一样,只是针对单一的亲本组合,并不能将其简单的应用于其他亲本组合,不同的亲本组合需要重新筛选出特异性条带标记而使得该方法不能被广泛应用。随着基因组测序技术的日趋成熟,草菇全基因组测序工作也已完成^[8],使得研究者能够开发更多有效的分子标记,与传统育种方法相结合后,高效的分子标记辅助杂交育种技术将成为替代与改良草菇生产用种的重要育种手段。

本研究以交配型基因作为分子标记,在建立草菇分子标记辅助杂交育种技术体系的同时,着重用于培育低温高产的优良草菇新菌株。与此同时,我们还采用了一种快速筛选耐低温草菇菌种的方法,在草菇菌丝生长阶段初步筛选出耐低温的可能杂交菌株,去除了大量的非目的菌株;再借助交配型特异分子标记鉴定杂合子真实性,进一步剔除了部分非杂交菌株。整个实验过程将最初的 496 株草菇可能杂交菌株,经筛选后只剩余 172 株耐低温的杂交菌株,在进行低温栽培出菇之前已减少了 65%的工作量。草菇的遗传模式较为复杂,早期 Zhang 等^[24-25]的研究推断草菇属初级同宗结合真菌。随着分子生物学的发展,尤其是草菇全基因组序列的获取^[8],为草菇遗传育种的研究奠定了良好的基础。在此基础上,傅俊生^[26]的研究认为草菇属于二级性

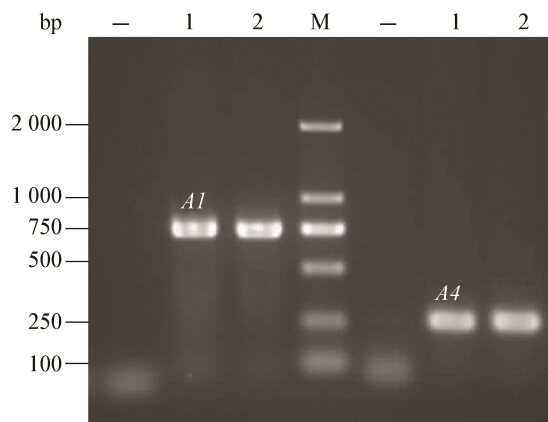


图 6 VV093 子实体杂交真实性鉴定

Figure 6 Identification of true hybrid strains of VV093 fruiting body

注: -: 阴性对照; 1、2 表示两个平行。

Note: -: Negative control; 1 and 2 represent repetitions.

异宗结合为主的真菌, 并指出只有异核体的草菇菌丝才有可能出菇, 单孢能够出菇本身是来自一个异核担孢子(同宗结合), 而单核体或者同核体的草菇菌丝需要交配后才可能出菇(异宗结合)。二级性异宗结合的交配型受到一对不亲和的 A 因子控制, 其子实体担孢子仅存在 2 种交配型, 只有 A 因子不同的 2 个单孢菌丝才能成功交配并且形成可育的草菇菌株。理论上成功交配的概率应该为 50%, 然而复等位基因的存在将会提高这个概率^[27]。本研究选用的亲本菌株屏优 1 号具有 A1、A2 交配型, VH3 菌株具有 A3、A4 交配型。采用不同交配型基因作为分子标记进行单孢杂交与鉴定, 在理论上提高了成功交配并且形成可育草菇菌株的概率。同时从杂交子栽培出菇试验结果来看, VV051、VV052 及 VV093 都是综合性状表现较好的杂交菌株, 尤其是 VV093 具有出菇早、产量高且菇型好的优点。与 RAPD、SCAR 等分子标记相比, 本研究所建立的交配型基因分子标记更具通用性, 同时与常规草菇杂交育种方法^[15,28]相比, 该技术体系能够有效地提高成功交配并且获得可育草菇菌株的概率(常规杂交育种中有较多杂交子不出菇^[15]), 加上快速筛选耐低温草菇菌种的方法, 在低温栽培出菇前已剔除了大量非目的菌株, 因此应用本技术体系可大幅度提高草菇杂交育种的工作效率。

参 考 文 献

- [1] Chang ST. *Volvariella volvacea*[M]. Hongkong: The Chinese University Press, 1975: 27 (in Chinese)
张树庭. 草菇[M]. 香港: 香港中文大学出版社, 1975: 27
- [2] Chang ST. The origin and early development of straw mushroom cultivation[J]. *Economic Botany*, 1977, 31(3): 374-376
- [3] Bao DP, Gong M, Zheng HJ, et al. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58294
- [4] Mau JL, Chyau CC, Li JY, et al. Flavor compounds in straw mushroom *Volvariella volvacea* harvested at different stages of maturity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(12): 4726-4729
- [5] Han JG. *Straw Mushroom Production Encyclopedia*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 4-6 (in Chinese)
韩继刚. 草菇生产全书[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 4-6
- [6] Lin F, Li GX, Zhao Y, et al. Research progress on breeding methods and related molecular markers of *Volvariella volvacea*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(3): 609-615 (in Chinese)
林锋, 李国贤, 赵妍, 等. 草菇育种方法及相关分子标记研究进展[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(3): 609-615
- [7] Fu JS, Zhu J, Xie BG, et al. Identification of hybrid strain 2628 on *Volvariella volvacea* and its variety test[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(14): 48-53 (in Chinese)
傅俊生, 朱坚, 谢宝贵, 等. 草菇杂交菌株2628的鉴定与品种试验[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(14): 48-53
- [8] Bao DP, Zhao GP, Tan Q, et al. Draft sequence of the *Volvariella volvacea* genome[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2010, 17(1): 1-2 (in Chinese)
鲍大鹏, 赵国屏, 谭琦, 等. 草菇全基因组框架图[J]. *食用菌学报*, 2010, 17(1): 1-2
- [9] Jiang L, Huang JW, Ci LK, et al. Protoplast fusion and regeneration of *Agrocybe aegerita* and *Coprinus comatus*[J]. *Food Science*, 2011, 32(1): 141-144 (in Chinese)
江力, 黄健威, 慈凌坤, 等. 茶树菇与鸡腿菇原生质体融合及再生[J]. *食品科学*, 2011, 32(1): 141-144
- [10] Cao XW, Cao YH, Cao ZC, et al. Indoor cultivation techniques of *Volvariella volvacea*[J]. *Edible Fungi*, 2005, 27(1): 36-37 (in Chinese)
曹学文, 曹裕汉, 曹湛才, 等. 草菇室内栽培技术[J]. *食用菌*, 2005, 27(1): 36-37
- [11] Yang XM. *Cultivation of Chinese Edible Fungi*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1988: 221 (in Chinese)
杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1988: 221
- [12] Zhang H, Qin LH, Tan Q, et al. Extract genomic DNA from *Lentinula edodes* using CTAB method[J]. *Journal of Shanghai University (Natural Science Edition)*, 2006, 12(5): 547-550 (in Chinese)
张红, 秦莲花, 谭琦, 等. 用改进的 CTAB 法提取香菇基因组 DNA[J]. *上海大学学报: 自然科学版*, 2006, 12(5): 547-550
- [13] Xie BG, Huang ZL, Jiang YJ. A preliminary study on the hybridization of *Volvariella volvacea* strains the hybridization between abnormal single-spore isolates[J]. *Acta Edulis Fungi*, 1997, 4(2): 5-10 (in Chinese)
谢宝贵, 黄志龙, 江玉姬. 草菇杂交研究初报不正常类型单孢菌株之间的交配[J]. *食用菌学报*, 1997, 4(2): 5-10
- [14] Chen MJ, Zhao Y, Jiang W, et al. Techniques of fast screening of the cold-tolerant *Volvariella volvacea* strain: China, CN103081721A[P]. 2013 (in Chinese)
陈明杰, 赵妍, 姜威, 等. 一种快速筛选耐低温草菇菌种的方法: 中国, CN103081721A[P]. 2013
- [15] Lai JZ. Screening of new superior strains of *Volvariella volvacea* by hybridization[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2013 (in Chinese)
赖佳忠. 草菇自交和杂交菌株筛选[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2013
- [16] Chen HL, Zeng XX. Research progress on breeding methods of edible fungi[J]. *Edible Fungi*, 2005, 27(3): 5-7 (in Chinese)
陈恒雷, 曾宪贤. 食用菌育种方法的研究进展[J]. *食用菌*, 2005, 27(3): 5-7
- [17] Chang ST, Yan CK. *Volvariella volvacea* and its life history[J]. *American Journal of Botany*, 1971, 58(6): 552-561

- [18] Zou BQ, Cao YH. Research on single spore breeding of *Volvaria volvacea*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2001, 28(4): 23-24 (in Chinese)
邹伯琼, 曹裕汉. 草菇单孢子选育种研究[J]. 广东农业科学, 2001, 28(4): 23-24
- [19] Wang DD, Li LQ, Ma LY, et al. Progress in development and applications of SSR molecular marker in macrofungi[J]. Microbiology China, 2013, 40(4): 646-654 (in Chinese)
王东东, 李良秋, 马连营, 等. 大型真菌中 SSR 分子标记的开发与应用进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(4): 646-654
- [20] Wang H, Chen MJ, Bao DP, et al. Acquisition and application of a specific molecular marker in V23 strain of *Volvariella volvacea*: China, CN102220320[P]. 2011 (in Chinese)
汪虹, 陈明杰, 鲍大鹏, 等. 一种草菇 V23菌株的特异分子标记及其获得方法与应用: 中国, CN102220320[P]. 2011
- [21] Fu JS, Liu XR, Xie BG, et al. Establishment of SCAR genetic marker on *Volvariella volvacea* and its application of hybrid identification[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(17): 41-46 (in Chinese)
傅俊生, 刘新锐, 谢宝贵, 等. 草菇 SCAR 遗传标记建立及其杂种鉴定应用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 41-46
- [22] Ahlawat OP, Gupta P, Kamal S, et al. Variability in intra-specific and monosporous isolates of *Volvariella volvacea* based on enzyme activity, ITS and RAPD[J]. Indian Journal of Microbiology, 2010, 50(2): 192-198
- [23] Chen J, Lin Y, Xie BG, et al. Identification of *Volvaria volvacea* filial generation using RAPD[J]. Edible and Medicinal Mushrooms, 2011, 19(2): 21-23 (in Chinese)
陈剑, 林原, 谢宝贵, 等. 利用 RAPD 技术鉴定草菇杂交后代[J]. 食药菌, 2011, 19(2): 21-23
- [24] Chang ST, Li SX, Mather MJ. Genetical studies on the sexuality pattern of *Volvariella volvacea*[C]. Science and Cultivation and Edible Fungi, 1991: 119-122
- [25] Li SX, Chang ST. Selection and characterization of crystalviolet-and malachite-green-resistant mutants in *Volvariella volvacea*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1991, 7(5): 541-550
- [26] Fu JS. Research of genetic model on *Volvariella volvacea*[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2010 (in Chinese)
傅俊生. 草菇遗传规律研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2010
- [27] Brown AJ, Casselton LA. Mating in mushrooms: increasing the chances but prolonging the affair[J]. Trends in Genetics, 2001, 17(7): 393-400
- [28] Zhao GH. *Volvariella volvacea* breeding research[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2011 (in Chinese)
赵光辉. 草菇杂交育种研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2011

科技信息摘录

人体微生物可用于身份识别

姑且叫它“肠道印章”吧——研究人员发现, 人体内的微生物脱氧核糖核酸(DNA)能够用来识别一个人的身份, 当然这里还涉及一些隐私问题。

研究人员在 5 月 11 日出版的美国《国家科学院院刊》上报告了这一研究成果。这一发现意味着它能够在—项匿名的有关人体微生物组的研究中鉴别参与者, 并揭示一个人的健康、饮食或种族的详细信息。

近些年来, 微生物组对人类健康和行为的影响逐渐成为热点研究领域。来自人类微生物组研究的数据最终往往会储存于公共数据库中, 但尚不清楚这些微生物组是否能够被用来永久识别这些个体。

这项研究的第一作者、哈佛大学生物学家 Eric A. Franzosa 和同事开发出一种电脑算法, 为美国“人类微生物组计划”招募的 120 人建立粪便、唾液和皮肤等样本的微生物个人识别码, 即所谓微生物“指纹”, 并将其与跟踪随访中获得的样本及另外一组志愿者的样本进行比较。结果发现, 每个人都拥有独特的微生物“指纹”, 而且大部分人的微生物“指纹”在为期一年的调查期间保持稳定。

研究人员发现, 粪便样本的微生物“指纹”尤其可靠, 即便时间过去一年, 仍能正确识别约 80% 的志愿者, 这显示肠道微生物组比较稳定。皮肤样本则较不可靠, 时隔一年后只能正确识别约三分之一人的身份。

Franzosa 在一份声明中说: “把人类 DNA 样本与人类 DNA ‘指纹’ 数据库进行关联, 是法医鉴定遗传学的基础。我们的研究显示, 无需人类 DNA, 利用人体微生物的 DNA 序列也有可能形成同样的关联。”

——摘自《科学网》2015-06-02

<http://paper.sciencenet.cn/htmlpaper/20156211375222136407.shtm>