

研究报告

香菇单核体交配型及杂交后代的等位基因特异性
PCR 鉴定

张芳芳, 陈雪凤, 张雯龙, 刘增亮, 赵承刚, 吴圣进*

广西壮族自治区农业科学院微生物研究所, 广西 南宁 530007

张芳芳, 陈雪凤, 张雯龙, 刘增亮, 赵承刚, 吴圣进. 香菇单核体交配型及杂交后代的等位基因特异性 PCR 鉴定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1741-1753.

ZHANG Fangfang, CHEN Xuefeng, ZHANG Wenlong, LIU Zengliang, ZHAO Chenggang, WU Shengjin. Identification on mating types of monokaryons and their hybrids of *Lentinula edodes* by AS-PCR[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1741-1753.

摘要:【背景】食用菌交配型和单核体杂交合子的鉴定通常采用显微镜检测观察是否具有锁状联合的方式进行, 存在耗时长、工作量大且易出现误检等问题。【目的】建立一种鉴定香菇单核体交配型和单核体杂交后代的分子辅助育种技术, 为提高育种效率提供技术支撑。【方法】利用交配型因子保守序列单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)位点设计分型引物, 建立等位基因特异性 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) 技术, 鉴定香菇 L808 和 YX7 的单孢分离株交配型及其杂交后代。【结果】AS-PCR 鉴定结果表明, L808 的 38 个单孢分离株中, 交配型为 A1B1、A2B2、A1B2 和 A2B1 的单核体分别有 6、13、8 和 11 个; YX7 的 45 个单孢分离株中, 交配型为 A3B3、A4B4、A3B4 和 A4B3 的单核体分别有 15、8、8 和 12 个, 交配型为 A3A4B3B4 的异核体 2 个; 12 个单核体杂交菌株中, 10 个为真正的杂合子, 2 个为非杂合子。传统方法与 AS-PCR 分子鉴定结果完全一致, 但前者容易将异核体误判为单核体。【结论】基于 SNP 位点的 AS-PCR 技术能有效鉴别香菇单核体交配型和单核体杂交后代, 区分单核体与异核体, 具有精准、高效的特点, 是一种香菇分子辅助育种的理想工具。

关键词: 香菇; 交配型; 杂交后代; 单核苷酸多态性; 等位基因特异性 PCR

资助项目: 广西壮族自治区重点研发计划(桂科 AB21196069); 广西壮族自治区科技基地和人才专项(桂科 AA21196003); 广西特色作物试验站建设专项(TS202115); 国家现代农业产业技术体系广西食用菌创新团队建设专项(Nycytxgx-cxtd-2021-07-02); 广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科 2021YT096)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AB21196069), the Special Fund for Scientific Base and Talent of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AA21196003), the Guangxi Special Crop Experimental Station Building Project (TS202115), the National Modern Agriculture Industrial Technology System Guangxi Edible Fungi Innovation Team Building Project (Nycytxgx-cxtd-2021-07-02), and the Basic Research Project of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (2021YT096).

*Corresponding author. E-mail: gxwusj@126.com

Received: 2023-10-10; Accepted: 2023-11-25; Published online: 2024-01-15

Identification on mating types of monokaryons and their hybrids of *Lentinula edodes* by AS-PCR

ZHANG Fangfang, CHEN Xuefeng, ZHANG Wenlong, LIU Zengliang, ZHAO Chenggang, WU Shengjin*

Institute of Microbiology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: [Background] The mating types and mon-mon hybrids of edible mushrooms are usually identified based on the presence of clamp connections or not as observed by microscopy, which is time-consuming, labor-costing, and prone to false results. **[Objective]** A molecular-assisted breeding technique was established for identifying the monokaryon mating type and mon-mon hybrids of *Lentinula edodes*, aiming to provide technical support for improving the breeding efficiency. **[Methods]** Typing primers were designed based on the SNP loci in the conserved sequence of mating-type factors, and then allele specific (AS)-PCR was employed to identify the mating type of the single spore isolates of *L. edodes* strains L808 and YX7 and their mon-mon hybrids. **[Results]** Among the 38 single spore isolates of L808, there were 6, 13, 8, and 11 monokaryons of mating types A1B1, A2B2, A1B2, and A2B1, respectively. Among the 45 single spore isolates of YX7, there were 15, 8, 8, and 12 monokaryons of mating types A3B3, A4B4, A3B4, and A4B3, respectively, and 2 heterokaryons of the mating type A3A4B3B4. The 12 mon-mon hybrids included 10 heterozygotes and 2 non-heterozygotes. The identification results obtained based on the conventional method were consistent with those obtained by AS-PCR, except that the former was prone to misjudging heterokaryons as monokaryons. **[Conclusion]** The AS-PCR based on SNP loci can identify the monokaryon mating type and mon-mon hybrids of *L. edodes* and distinguish between monokaryons and heterokaryons, with high precision and efficiency. It serves as an ideal tool for molecular-assisted breeding of *L. edodes*.

Keywords: *Lentinula edodes*; mating types; hybrids; single-nucleotide polymorphism; allele-specific PCR

香菇(*Lentinula edodes*)是隶属于担子菌门(*Basidiomycota*)蘑菇纲(*Agaricomycetes*)蘑菇目(*Agaricales*)类脐菇科(*Omphalotaceae*)的一种食药菌^[1],其肉质肥厚、味道鲜美、营养物质丰富,具有提高免疫力、降血压、降低胆固醇、抗肿瘤等功效^[2-3],是我国栽培规模和销量最高的食用菌^[4]。

选育香菇新品种对香菇产业的发展发挥着决定性作用^[5]。单单杂交是常用的香菇育种方

法之一,它通过不同来源的优异单核体两两配对形成杂交后代。单核体是香菇杂交育种的基础材料,根据获得方法的不同可分为原生质体单核体和孢子单核体^[6]。单核体和杂交后代的鉴定是香菇杂交育种过程中的主要限速步骤,传统鉴定方法通过显微镜观察菌丝是否具有锁状联合结构来判定,单核体交配型的鉴定则需要多次的配对和显微镜镜检工作。但是,传统方法在对数量庞大的单核体及其杂交后代的鉴

定中存在效率低下和人为误检率高等不足^[6-7]。

等位基因特异性 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) 又称作扩增受阻突变体系^[8] (amplification refractory mutation system, ARMS) 或者特异性等位基因 PCR^[9] (PCR amplification of specific allele, PASA), 是一种能区分具有单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 位点的等位基因的分型技术, 其基本原理为: 根据等位基因 SNP 位点设计特异引物对, 其中两条引物 (特异链) 的 3' 末端与 SNP 位点重叠且分别与 2 个等位基因在该位点的碱基互补 (或相同), 另一条引物 (普通链) 按常规方法设计在等位基因的非变异位点, 一个特异性引物只在一种基因型中有扩增产物, 在另一种基因型中无扩增产物, 从而达到基因分型的目的^[10]。AS-PCR 技术已逐渐应用到食用菌单核体交配型和单杂杂交后代的鉴定中, 与其他鉴定方法相比, 具有操作简便、稳定性好、准确率高等特点。AS-PCR 技术在二极性交配系统的食用菌品种上的运用效果最理想, 果禹鑫等^[11]运用该技术成功鉴定了来自同一羊肚菌菌株的 100 个单孢的交配型, 并成功对获得的 90 个单孢杂交菌株进行了鉴定; Xiang 等^[12]借助 AS-PCR 技术, 仅用 2 对引物就实现了同时对 2 个茯苓菌株的自交子和杂交子进行确认。AS-PCR 技术对四极性交配系统的食用菌品种交配型和杂交后代的鉴定相对复杂些, 张美彦等^[6]设计了 4 对引物, 才成功实现对单一香菇菌株“申香 215”孢子单核体交配型的测定。目前, 采用 AS-PCR 技术对四极性交配系统的食用菌品种不同菌株间的杂交后代的鉴定研究尚未见报道。

本研究以香菇菌株 L808 和 YX7 为研究对象, 将 AS-PCR 技术用于分别鉴定 L808 和 YX7 两个香菇菌株的孢子单核体交配型, 排除双核体, 同时进一步运用该技术鉴定两菌株间的单

杂杂交后代, 以期香菇杂交选育提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试香菇亲本菌株 L808 和野香七号 (YX7) 由广西农业科学院微生物研究所提供。菌株 L808 是广西商品栽培品种, 具有栽培产量高、农艺形状好等优点; 菌株 YX7 为分离驯化成功的广西野生香菇种质资源, 具有香味浓郁、耐高温、出菇早等优点。

1.2 培养基

PDA 培养基参考文献^[13]配制。

1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖和琼脂粉 (国产分析纯), 北京索莱宝科技有限公司; 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒, 江苏康为世纪生物科技股份有限公司。

超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 恒温培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司; 尼康显微镜, 尼康仪器 (上海) 有限公司; PCR 仪, 苏州东胜兴业科学仪器有限公司。

1.4 单孢分离株的获得

亲本香菇菌株 L808 和 YX7 栽培出菇后, 选择菇型好且未完全成熟的子实体, 分别在无菌环境下收集孢子。将收集到的孢子与 1 000 μ L 无菌水混合于 1.5 mL 离心管中, 制成孢子悬液, 再用无菌水进行梯度稀释, 直至镜检时每个视野内有 20–30 个孢子, 在无菌条件下将孢子悬液涂布到 PDA 培养基中, 25 $^{\circ}$ C 培养 10–15 d 至孢子萌发^[13], 在萌发的单菌落处挑取菌丝接种于新的 PDA 培养基上进行纯化培养并编号, 待菌株将长满平皿表面时用显微镜检测是否具有锁状联合, 3 次检测无锁状联合结构的单孢分离株于 PDA 试管斜面培养基 4 $^{\circ}$ C 保种备用。

1.5 SNP 位点开发及分型引物特异性分析

将 4 °C 保存的单孢分离株接种到新的 PDA 培养基中, 25 °C 培养至菌丝长满培养基表面, 刮取菌丝, 按照新型植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取供试菌株 L808 和 YX7 及其单孢分离株的基因组 DNA, 于 -20 °C 冰箱保存备用。根据张美彦等^[6]鉴定香菇交配型时采用的 A、B 因子保守序列设计引物, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成, 利用设计好的引物对香菇菌株 L808 和 YX7 基因组 DNA 进行 PCR 扩增和重测序。PCR 反应体系(25 µL): 2×*SanTaq* PCR Mix 12.5 µL, 上、下游引物(10 µmol/L)各 1 µL, 模板 DNA (150 ng/µL) 1 µL, 灭菌 ddH₂O 9.5 µL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 供试退火温度下复性 30 s, 72 °C 50 s, 共 30 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 终止反应。寻找和统计各菌株 A、B 因子序列片段的 SNP 位点, 采用张美彦等^[6]的方法设计交配型分型引物, 并委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成。

利用设计好的引物对菌株 L808 和 YX7 及部分单孢分离株进行 AS-PCR 扩增, AS-PCR 反应体系和反应条件同前述, 扩增产物采用含有 GelRed 染料的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 于凝胶成像系统中观察拍照, 根据扩增结果筛选合适的交配型鉴定引物, 并确定适宜退火温度, 用于 L808 和 YX7 单孢分离株交配型鉴定。

1.6 单孢分离株交配型 AS-PCR 鉴定

用筛选出的分型引物分别对相应亲本菌株及其单孢分离株进行 AS-PCR 扩增(反应体系和反应条件同 1.5), 记录单孢分离株交配型 A1、A2、B1、B2 和 A3、A4、B3、B4 的扩增结果, 确定每个单孢分离株的交配型。如果同一菌株的两对 A 因子分型引物均存在扩增产物, 则该分离株记为双核体; 同理, 同一菌株的两对 B

因子分型引物均存在扩增产物, 则该分离株记为双核体; 标记为双核体的分离株需再次镜检验证。如果交配型因子 A 或 B 的两对引物均无扩增产物, 则记为缺失, 重新提取 DNA 后扩增。

1.7 单孢分离株交配型的常规鉴定及与分子鉴定结果的对比

采用三轮配对杂交试验进行单孢分离株交配型的常规鉴定^[14-15]。参考李安政等^[16]和余梅等^[17]的核迁移试验方法验证第三轮配对鉴定的交配型假设结果。同时, 将单孢分离株的传统鉴定结果与分子鉴定结果进行对比。

1.8 香菇单孢杂交及杂交后代的鉴定

选取 4 个交配型分别为 A3B3、A4B4、A3B4、A4B3 的 YX7 孢子单核体菌株和 4 个交配型分别为 A1B1、A2B2、A1B2、A2B1 的 L808 孢子单核体菌株, 将 YX7 和 L808 进行单核体配对杂交, 于 PDA 培养基上 25 °C 对峙培养 15 d 后从母本菌株菌落中取菌块接种至新的 PDA 培养基上, 纯化培养 2 次获得杂交菌株, 对杂交菌株进行编号, 保存备用。采用镜检观察菌丝是否有锁状联合从而初步鉴定杂交菌株是否为真正的杂合子。同时, 按照 1.5 的方法提取杂交菌株基因组 DNA, 于 -20 °C 冰箱保存备用。按照 1.5 的方法对菌株 L808 和 YX7 及其杂交菌株进行 AS-PCR 扩增, 分析扩增图谱, 判断杂交菌株是否为真正的杂合子。

2 结果与分析

2.1 SNP 位点开发及分型引物特异性分析结果

根据张美彦等^[6]鉴定香菇交配型时采用的位点序列, 设计引物 MatAF (5'-CTACACCTGG CTCCTCTCCAAC-3')和 MatAR (5'-TATCCCGA TAAAGCATCCGCGC-3'), 以及 MatBF (5'-GTC TATCTCGCCTGTACT-3')和 MatBR (5'-CTCGA

GACTAGTTGAGAA-3')。分别在退火温度 60 °C 和 52 °C 下扩增供试香菇菌株 L808 和 YX7 交配型 A 因子 HD1 保守区和 B 因子 RCB2-PHB3-PHB4 与 RCB4 之间串联区域的保守序列,通过定位和筛选两个菌株分别在保守序列上的 SNP 杂合位点,设计出两个供试菌株交配型 A 因子和 B 因子的分型引物对共 8 对,具体引物序列见表 1。

采用菌株 L808 交配型分型引物对 14 个 L808 的单孢分离株及双核亲本 L808 和 YX7 进行 AS-PCR 扩增,扩增产物的电泳图谱如图 1 所示。其中,分型引物 808-AF1/AR 仅对双核亲本 L808 及其 7 个单孢分离株(分别为 808-349、808-223、808-230、808-235、808-241、808-341 和 808-367)有扩增条带,而 808-AF2/AR 仅对双核亲本 L808 及其另外 7 个单孢分离株(分别为 808-204、808-207、808-214、808-243、808-249、808-294 和 808-389)有扩增条带。可见,

808-AF1/AR 和 808-AF2/AR 两对引物可有效将菌株 L808 的前后 7 个单孢分离株分型为 A1 和 A2 两种交配型。分型引物 808-BF1/BR 和 808-BF2/BR 则分别仅对 808-349、808-241、808-243、808-249、808-294、808-367、808-389 和 808-204、808-207、808-214、808-223、808-230、808-235、808-341 两组单孢分离株有扩增条带。可见,其能有效将这两组单孢分离株分型为 B1 和 B2 两种交配型。图 1 还显示,808-AF1/AR 和 808-BF1/BR 两对引物对亲本菌株 L808 和 YX7 均有扩增条带,但 808-AF2/AR 和 808-BF2/BR 两对引物则仅对亲本菌株 L808 有扩增条带而对 YX7 无扩增条带,说明菌株 YX7 与 L808 在交配型 A、B 因子的相应片段具有相同保守序列,但菌株 L808 在其分型引物所在位点序列上存在 SNP 杂合位点,而 YX7 在对应序列上不存在 SNP 杂合位点,相对两个亲本菌株而言,

表 1 菌株 L808 和 YX7 的交配型分型引物

Table 1 Typing primers for identifying mating types of strains L808 and YX7

菌株 Stain	交配型 Mating type	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增片段大小 Amplified fragment length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
L808	A1	808-AF1: CCCCCGAACCCGATAAATAGCC 808-AR: CTACATCACTCGTATCAACCAC	127	63
	A2	808-AF2: CCCCCGAACCCGATAAATAGCT 808-AR: CTACATCACTCGTATCAACCAC	127	59
	B1	808-BF1: GTCTATCTCGCCTGTAATT 808-BR: CTCGAGACTAGTTGAGAATC	1 383	54
	B2	808-BF2: GTCTATCTCGCCTGTAATG 808-BR: CTCGAGACTAGTTGAGAATC	1 383	55
YX7	A3	YX7-AF3: ACCTGGCTCCTCTCCAAGCTA YX7-AR: GTCTGATTCTCCGACGCACTC	419	66
	A4	YX7-AF4: ACCTGGCTCCTCTCCAATCTG YX7-AR: GTCTGATTCTCCGACGCACTC	419	67
	B3	YX7-BF3: GTCTGATTCACTGGACGAACGT YX7-BR: GCAGCCACCTCGTTGAGAATTG	616	63
	B4	YX7-BF4: GTCTGATTCACTGGACGAACAC YX7-BR: GCAGCCACCTCGTTGAGAATTG	619	63

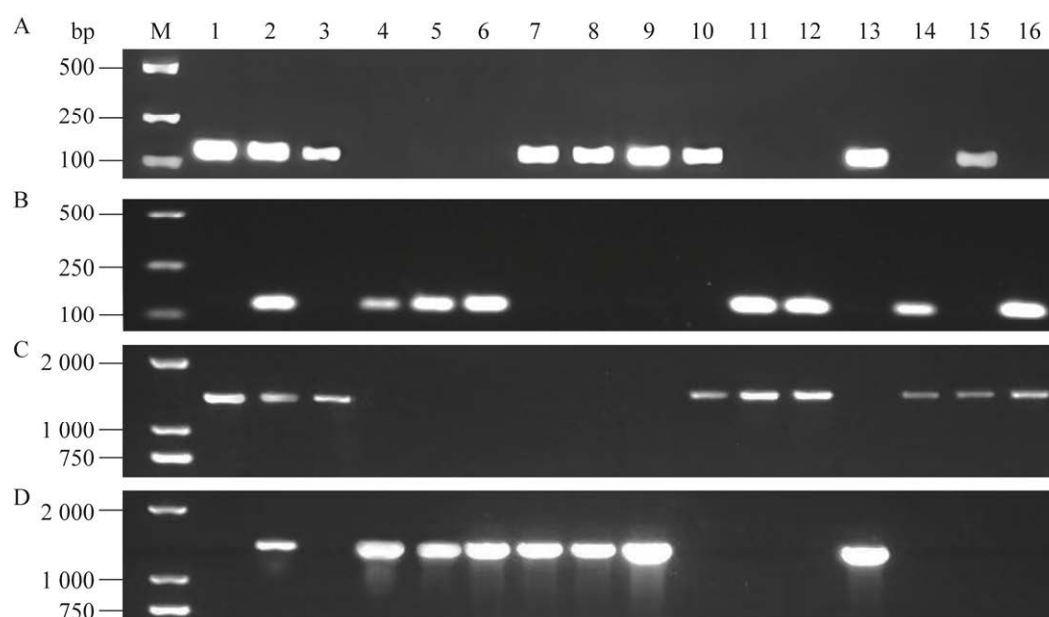


图 1 分型引物对菌株 L808 不同单孢分离株 A、B 因子的 PCR 扩增结果 A、B、C 和 D 分别表示 808-AF1/AR、808-AF2/AR、808-BF1/BR 和 808-BF2/BR 引物对的扩增结果；M: DNA Marker；1 和 2: 亲本菌株 YX7 和 L808；3-16: 菌株 L808 的单孢分离株 349、204、207、214、223、230、235、241、243、249、341、294、367 和 389

Figure 1 Results of PCR amplification using typing primer on A and B factor of different single spore isolate from the strain L808. A, B, C and D represent the amplification results of primer pairs 808-AF1/AR, 808-AF2/AR, 808-BF1/BR, and 808-BF2/BR, respectively; M: DNA Marker; 1 and 2 were parent strains of YX7 and L808, respectively; 3-16 were single spore isolate 349, 204, 207, 214, 223, 230, 235, 241, 243, 249, 341, 294, 367 and 389 from the strain L808, respectively.

808-AF2/AR 和 808-BF2/BR 属于亲本菌株 L808 交配因子的特异性分型引物。

采用菌株 YX7 交配型分型引物对 11 个 YX7 的单孢分离株及双核亲本 L808 和 YX7 进行 AS-PCR 扩增，扩增产物的电泳图谱如图 2 所示。与 L808 交配型分型引物鉴定原理相同，YX7-AF3/AR 和 YX7-AF4/AR 两对引物可有效将菌株 YX7 的 11 个单孢分离株分型为 A3 (YX7-201、YX7-202、YX7-206、YX7-207、YX7-208、YX7-210、YX7-214、YX7-215 和 YX7-230) 和 A4 (YX7-211 和 YX7-213) 两种交配型。YX7-BF3/BR 和 YX7-BF4/BR 两对引物可有效将菌株 YX7 的 11 个单孢分离株分型为 B3

(YX7-201、YX7-202、YX7-207、YX7-210、YX7-214、YX7-215、YX7-230) 和 B4 (YX7-206、YX7-208、YX7-211、YX7-213) 两种交配型。图 2 还显示，YX7-AF4/AR 和 YX7-BF4/BR 两对引物对亲本菌株 YX7 和 L808 均有扩增条带，但 YX7-AF3/AR 和 YX7-BF3/BR 两对引物则仅对亲本菌株 YX7 有扩增条带而对 L808 无扩增条带，说明菌株 L808 与 YX7 在交配型 A、B 因子的相应片段具有相同保守序列，但菌株 YX7 在其分型引物所在位点序列上存在 SNP 位点，而 L808 在对应序列上不存在 SNP 位点，相对两个亲本菌株而言，YX7-AF3/AR 和 YX7-BF3/BR 属于亲本菌株 YX7 交配因子的特异性分型引物。

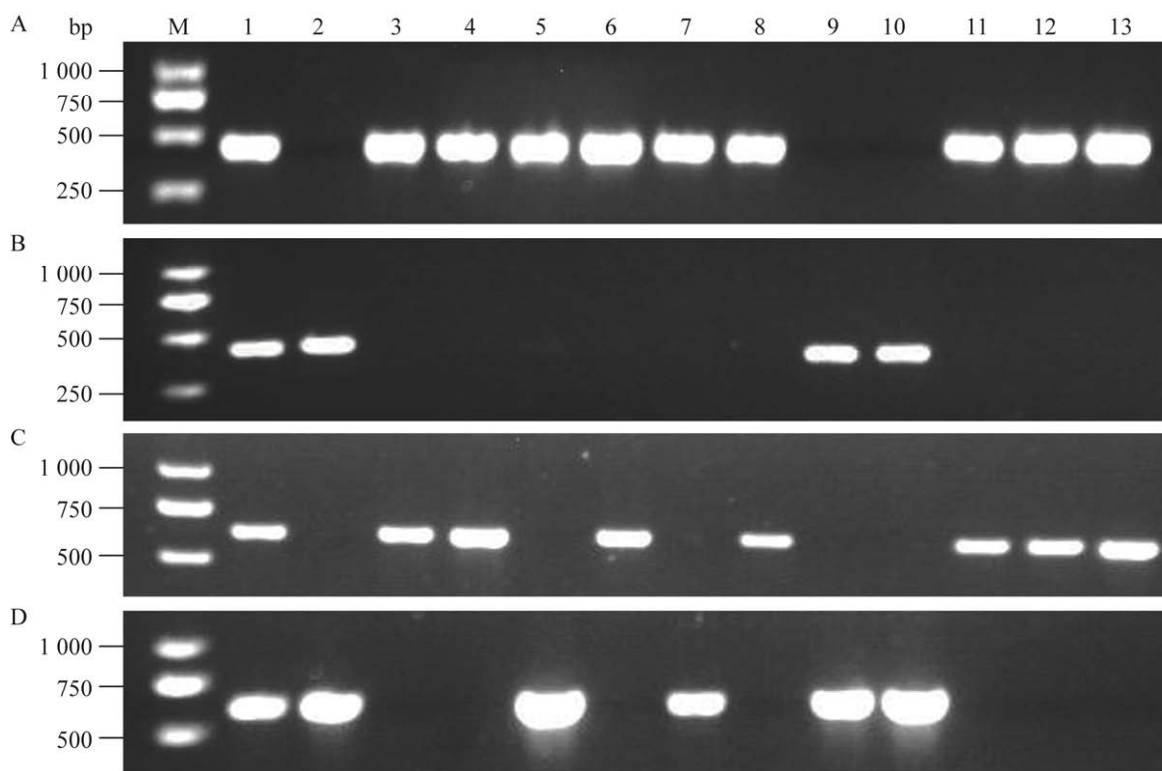


图 2 分型引物对菌株 YX7 不同单孢分离株 A、B 因子的 PCR 扩增结果 A、B、C 和 D 分别表示 YX7-AF3/AR、YX7-AF4/AR、YX7-BF3/BR 和 YX7-BF4/BR 引物对的扩增结果；M: DNA Marker, 1 和 2: 亲本菌株 YX7 和 L808, 3–13: 菌株 YX7 的单孢分离株 201、202、206、207、208、210、211、213、214、215 和 230

Figure 2 Results of PCR amplification using typing primer on A and B factor of different single spore isolate from the strain YX7. A, B, C and D represent the amplification results of primer pairs YX7-AF3/AR, YX7-AF4/AR, YX7-BF3/BR and YX7-BF4/BR, respectively; M: DNA Marker; 1 and 2 were parent strains of YX7 and L808, respectively; 3–13 were single spore isolates 201, 202, 206, 207, 208, 210, 211, 213, 214, 215 and 230 from the strain YX7, respectively.

2.2 单孢分离株交配型的 AS-PCR 鉴定

采用菌株 L808 的 4 对分型引物分别对 L808 的 38 个单孢分离株交配型进行综合分析, 结果如表 2。菌株 L808 的 38 个单孢分离株中, 交配型为 A1B1 的单核体共 6 个, 交配型为 A2B2 的有 13 个, 交配型为 A1B2 的有 8 个, 交配型为 A2B1 的有 11 个; 38 个单孢分离株均为真正的孢子单核体, 不存在异核体或多孢共存情况; 其交配型 A1B1、A2B2、A1B2、A2B1 的比例为 6:13:8:11。

采用菌株 YX7 的 4 对分型引物对其 45 个单孢分离株交配型进行综合分析, 结果见表 3。菌株 YX7 的 45 个单孢分离株中, 交配型为 A3B3 的单核体有 15 个, 交配型为 A4B4 的有 8 个, 交配型为 A3B4 的有 8 个, 交配型为 A4B3 的有 12 个, 交配型为 A3A4B3B4 的有 2 个, 分别为 YX7-21 和 YX7-26; YX7-21 和 YX7-26 两个菌株同时具有 2 类 A 因子和 2 类 B 因子, 可见它们属于异核体而不是真正的单核体, 可能是单孢分离时误挑取多孢菌落所致或少量的

表 2 菌株 L808 的 38 个单孢分离株交配型的 AS-PCR 鉴定结果

Table 2 Mating types of 38 single spore isolate from the strain L808 identified by AS-PCR

单孢分离株 Single spore isolate strains	808-AF1/AR	808-AF2/AR	808-BF1/BR	808-BF2/BR	交配型 Mating type
241, 349, 367, 470, 509, 576	+	-	+	-	A1B1
8, 46, 204, 207, 214, 344, 432, 434, 455, 468, 479, 480, 598	-	+	-	+	A2B2
223, 230, 235, 341, 372, 421, 459, 546	+	-	-	+	A1B2
3, 243, 249, 294, 389, 409, 412, 505, 561, 572, 574	-	+	+	-	A2B1

+: 有扩增条带; -: 无扩增条带

+: Having bands; -: No bands.

表 3 菌株 YX7 的 45 个单孢分离株交配型的 AS-PCR 鉴定结果

Table 3 Mating types of 45 single spore isolate from the strain YX7 identified by AS-PCR

单孢分离株 Single spore isolate strains	YX7-AF3/AR	YX7-AF4/AR	YX7-BF3/BR	YX7-BF4/BR	交配型 Mating type
2, 3, 6, 7, 12, 17, 20, 28, 201, 202, 207, 210, 214, 215, 230	+	-	+	-	A3B3
22, 29, 33, 35, 38, 60, 211, 213	-	+	-	+	A4B4
4, 24, 27, 30, 36, 49, 206, 208	+	-	-	+	A3B4
1, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 31, 37, 232	-	+	+	-	A4B3
21, 26	+	+	+	+	A3A4B3B4

+: 有扩增条带; -: 无扩增条带

+: Having bands; -: No bands.

异核担孢子萌发所致; 其余 43 个单核体均属于真正的孢子单核体, 其交配型 A3B3、A4B4、A3B4、A4B3 比例为 15:8:8:12。

2.3 单孢分离株交配型的常规鉴定及与分子鉴定结果的对比

交配型常规鉴定结果如表 4 所示。菌株 L808 的 38 个单孢分离株中, 交配型为 A1B1 的单核体有 6 个, 交配型为 A2B2 的单核体有 13 个, 交配型为 A1B2 的单核体有 8 个, 交配型为 A2B1 的单核体有 11 个, 常规方法与 AS-PCR 分子方法对全部 38 个孢子单核体的鉴定结果完全一致。菌株 YX7 的 45 个单孢分离株中, 交配型为 A3B3 的单核体有 15 个, 交配型为 A3B4 的单核体有 8 个, 交配型为 A4B3 的单核体有 12 个, 交配型为 A4B4 的单核体有

10 个, 其中有 43 个孢子单核体的交配型常规鉴定与 AS-PCR 分子鉴定结果完全一致, 但有 2 个单孢分离株(YX7-21 和 YX7-26)的交配型被常规鉴定为 A4B4, 而 AS-PCR 分子鉴定为 A3A4B3B4 异核体, 重新对 YX7-21 和 YX7-26 两个菌株进行多次显微镜镜检发现它们的菌丝存在锁状联合, 确实属于异核体。

可见, AS-PCR 分子技术能有效对菌株 L808 和 YX7 的所有单孢分离菌株的交配型进行准确分型, 可避免常规鉴定方法对交配型的误判, 同时还能有效区分双核体和真正的单核体。

2.4 香菇单孢杂交及杂交后代的 AS-PCR 分子鉴定

对菌株 L808 与 YX7 间的 12 个单单杂交组合(表 5)进行 AS-PCR 分子鉴定, 结果如表 6 所

表 4 常规方法与 AS-PCR 法的交配型鉴定结果对比

Table 4 Comparison on mating types identified by conventional method and AS-PCR method

交配型	常规鉴定	AS-PCR 鉴定	一致性
Mating type	Conventional identification	AS-PCR identification	Consistency
A1B1	808-241, 349, 367, 470, 509, 576	808-241, 349, 367, 470, 509, 576	Consistent
A1B2	808-223, 230, 235, 341, 372, 421, 459, 546	808-223, 230, 235, 341, 372, 421, 459, 546	Consistent
A2B1	808-3, 243, 249, 294, 389, 409, 412, 505, 561, 572, 574	808-3, 243, 249, 294, 389, 409, 412, 505, 561, 572, 574	Consistent
A2B2	808-8, 46, 204, 207, 214, 344, 432, 434, 455, 468, 479, 480, 598	808-8, 46, 204, 207, 214, 344, 432, 434, 455, 468, 479, 480, 598	Consistent
A3B3	YX7-2, 3, 6, 7, 12, 17, 20, 28, 201, 202, 207, 210, 214, 215, 230	YX7-2, 3, 6, 7, 12, 17, 20, 28, 201, 202, 207, 210, 214, 215, 230	Consistent
A3B4	YX7-4, 24, 27, 30, 36, 49, 206, 208	YX7-4, 24, 27, 30, 36, 49, 206, 208	Consistent
A4B3	YX7-1, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 31, 37, 232	YX7-1, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 31, 37, 232	Consistent
A4B4	YX7-21, 22, 26, 29, 33, 35, 38, 60, 211, 213	YX7-22, 29, 33, 35, 38, 60, 211, 213	Inconsistent
A3A4B3B4	None	YX7-21, 26	Inconsistent

示。结果发现, 杂交菌株 1、2、3、4、6、8 能同时被菌株 L808 和 YX7 两个亲本的特异性引物扩增, 说明这 6 个菌株均同时存在来自两个亲本的细胞核, 为真正的杂合子。杂交菌株 5

表 5 菌株 YX7 和 L808 的孢子单核体间的杂交配对组合

Table 5 Mating combination of spore monokaryons from strain YX7 and strain L808

亲本菌株(交配型)	杂交菌株编号	杂交组合
Parent strain (mating type)	Hybrid strain code	Hybrid combination
YX7-2 (A3B3)		
808-372 (A1B2)	1	2×372
808-455 (A2B2)	2	2×455
808-505 (A2B1)	3	2×505
YX7-15 (A4B3)		
808-505 (A2B1)	4	15×505
808-576 (A1B1)	5	15×576
808-455 (A2B2)	6	15×455
YX7-27 (A3B4)		
808-372 (A1B2)	7	27×372
808-455 (A2B2)	8	27×455
808-576 (A1B1)	9	27×576
YX7-33 (A4B4)		
808-372 (A1B2)	10	33×372
808-455 (A2B2)	11	33×455
808-505 (A2B1)	12	33×505

能同时被引物 YX7-BF4/BR 和 YX7-BF3/BR 扩增, 该杂交菌株来自 YX7-15 和 808-576 配对组合, 因 YX7-15 单核体只能被 YX7-BF3/BR 扩增, 非特异引物 YX7-BF4/BR 的扩增条带只能来自 808-576, 可见该杂交菌株同时拥有 YX7-15 和 808-576 两个单核体, 说明它是真正的杂合子; 同理杂交菌株 9、10 和 11 也是杂交成功的杂合子。杂交菌株 7 的预期交配型为 A1A3B2B4, 但是检测结果缺少 B2 因子, 说明该杂交菌株未接受到亲本 L808 的单核体, 引物对 808-AF1/AR 的扩增条带应该是其对 YX7 单核体亲本非特异性扩增所致, 并不是 A1 因子的条带, 可见该菌株不是真正的杂合子; 同理杂交菌株 12 也不是真正的杂合子。采用传统镜检鉴定方法对上述 10 个杂交菌株进行验证, 结果发现, 7 和 12 两个杂交菌株无锁状联合, 不是真正的杂合子, 其余 8 个菌株均有锁状联合, 为真正的杂合子, 镜检结果与分子鉴定结果一致。

由表 6 可知, A3 交配型的 YX7 孢子单核体与 A1 和 A2 交配型的 L808 孢子单核体均能杂交形成杂合子(杂交菌株 1 和 2), A4 交配型

表 6 分型引物对 10 个杂交菌株的 AS-PCR 扩增结果

Table 6 Results of AS-PCR amplification on 10 hybrid strains using typing primers

菌株编号 Strain No.	YX7- AF3/AR	YX7- AF4/AR	YX7- BF3/BR	YX7- BF4/BR	808- AF1/AR	808- AF2/AR	808- BF1/BR	808- BF2/BR	预期交配型 Expected mating type	是否是杂合子 Heterozygote or not
1	+	+	+	+	+	-	+	+	A1A3B2B3	Yes
2	+	+	+	+	+	+	+	+	A2A3B2B3	Yes
3	+	+	+	+	+	+	+	-	A2A3B1B3	Yes
4	-	+	+	+	+	+	+	-	A2A4B1B3	Yes
5	-	+	+	+	+	-	+	-	A1A4B1B3	Yes
6	-	+	+	+	+	+	+	+	A2A4B2B3	Yes
7	+	-	-	+	+	-	+	-	A1A3B2B4	No
8	+	+	-	+	+	+	+	+	A2A3B2B4	Yes
9	+	+	-	+	+	-	+	-	A1A3B1B4	Yes
10	-	+	-	+	+	-	+	+	A1A4B2B4	Yes
11	-	+	-	+	+	+	+	+	A2A4B2B4	Yes
12	-	+	-	+	+	-	+	-	A2A4B1B4	No

+: 有扩增条带; -: 无扩增条带

+: Having bands; -: No bands.

的孢子单核体与 A1 和 A2 交配型孢子单核体也均能杂交形成杂合子(杂交菌株 5 和 4), B3 交配型的孢子单核体与 B1 和 B2 交配型的孢子单核体均能杂交形成杂合子(杂交菌株 3 和 1), B4 交配型的孢子单核体与 B1 和 B2 交配型的孢子单核体也均能杂交形成杂合子(杂交菌株 9 和 8)。可见, 菌株 YX7 和 L808 具有完全不同的交配因子。

3 讨论与结论

香菇是四极性食用菌, 同一菌株出菇后产生 4 种交配型的担孢子, 交配型分型较为复杂。张美彦等^[6]设计了 4 对引物才能实现 AS-PCR 技术对“申香 215”号香菇菌株 4 种交配型的区分。前人对香菇的交配型 A 因子和 B 因子遗传背景已经有较为详尽的研究^[18-20], 这为不同香菇菌株交配型的 AS-PCR 鉴定中引物设计提供了便利。本研究直接采用张美彦等^[6]设计交配型分型引物位点的保守序列, 据此重测序供试

菌株 L808 和 YX7 的 A、B 因子相应部分保守序列片段, 就获得了该保守序列上的大量 SNP 位点, 而无须对 A、B 因子全序列进行重测序。根据获得的 SNP 位点, 本研究分别设计出菌株 L808 和 YX7 的各 4 对交配型分型引物。基于菌株 L808 的 4 对分型引物的 AS-PCR 技术准确鉴定出了该菌株的全部 38 个单核体的交配型, 且鉴定结果与常规鉴定结果一致; 基于菌株 YX7 的 4 对分型引物的 AS-PCR 技术则准确鉴定出菌株 YX7 的 43 个单核体的交配型, 且鉴定结果与常规鉴定结果一致, 同时 AS-PCR 技术还鉴定出 YX7-21 和 YX7-26 的交配型为 A3B3A4B4, 重新镜检发现其存在锁状联合结构, 为双核菌株。单孢分离时挑取的单菌落无法排除是多个孢子一起萌发形成的菌落, 或存在少量的异核担孢子萌发所致, 常规镜检法鉴定单孢分离株时, 会因为菌丝锁状联合形成较慢、数量少难以判定观测到的情况, 因此存在将异核体误判为单核体的可能性^[7]。AS-PCR 技

术则可准确鉴定香菇单核体的交配型,还能精准区分单核体和异核体,从而排除单孢分离时误取到的多孢分离物。需要指出的是,香菇担子细胞在减数分裂时若发生染色体交换,可能会导致交配型因子内的次级重组而产生有别于该菌株原有的 4 种交配型担孢子的新交配型担孢子^[20],本研究 AS-PCR 技术对此类新交配型尚无法区分鉴别,张美彦等^[6]也指出了该技术的这一不足。可见,AS-PCR 交配型鉴定技术仍需进一步完善和发展。本研究鉴定出的 38 个 L808 单核体和 43 个 YX7 单核体中,经常规交配型鉴定,未发现能与同菌株的 2 种以上交配型单核体均能配对杂交的新型交配型单核体,说明发生新的交配型单核体的变异不高,本研究的 AS-PCR 鉴定结果准确无误。

张美彦等^[6]认为一种交配因子的快速鉴定方法可以应用于与之相同或者有一半相同的一类菌株,菌株 L808 与 YX7 的分型引物相互之间不能通用,这可能与两个菌株的交配因子完全不同有关。有研究表明,香菇的交配因子类型非常多^[21],不同菌株的交配因子可能完全不同。菌株 L808 与 YX7 的 12 个单单杂交组合试验也显示,L808 的每一交配类型单核体均可与 YX7 的所有 4 种交配类型单核体杂交成功,说明两个香菇菌株具有完全不同的交配因子类型。

鉴于菌株 L808 与 YX7 的分型引物相互之间不能通用,因此基于这些分型引物的 AS-PCR 技术还可以用于鉴别 L808 与 YX7 两菌株间单单杂交后代是否为真正的杂合子。12 个单单杂交组合的杂交菌株的 AS-PCR 鉴定结果表明,7 号和 12 号杂交菌株为非杂合子,其余 10 个杂交菌株均为真正的杂合子。镜检结果与 AS-PCR 鉴定结果一致,说明鉴定结果准确无误。7 号和 12 号组合未杂交成功是挑取了尚未

接受供体核的单核体菌丝部位所致,因为不同配对组合的核迁移速度和方向差异较大^[22]。AS-PCR 鉴定时,菌株 L808 和 YX7 的 A 因子分型引物中均各只有 1 对特异性引物,另外 1 对非特异性分型引物则不仅扩增本菌株对应的 1 种交配型 A 因子,还可非特异性扩增另一亲本菌株的 2 种 A 因子;两菌株的 B 因子分型引物也有相同情况。这使得部分杂交组合仅能被 1 个亲本的特异性分型引物扩增,有时甚至 2 个亲本的特异性分型引物均不能扩增,只能被非特异性的分型引物扩增,从而增加了杂交菌株鉴定的烦琐度。今后有待选取更合适的 SNP 位点,使得设计出的分型引物均仅对目标菌株能特异性扩增,以简化单单杂交后代的 AS-PCR 鉴定程序。

总而言之,对于未因次级重组形成新交配型的单核体,基于香菇交配型因子保守序列 SNP 位点的 AS-PCR 技术可有效鉴定单核体菌株交配型和单核体真实性,还可准确鉴别不同菌株单单杂交后代是否为杂合子,它具有简单、快速、精准等优点,解决了传统鉴定方法周期长、效率低、易出错的问题,是一种提高香菇育种效率的理想辅助工具。

REFERENCES

- [1] 李玉,李泰辉,杨祝良,图力古尔,戴玉成. 中国大型菌物资源图鉴[M]. 郑州: 中原农民出版社, 2015.
LI Y, LI TH, YANG ZL, BAU T, DAI YC. Atlas of Chinese Macrofungi Resources[M]. Zhengzhou: Central China Farmers Press, 2015 (in Chinese).
- [2] JIN XM, LIU Y, VALLEE I, KARADJIAN G, LIU MY, LIU XL. Lentinan-triggered butyrate-producing bacteria drive the expulsion of the intestinal helminth *Trichinella spiralis* in mice[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 926765.
- [3] WU F, ZHOU LW, YANG ZL, BAU T, LI TH, DAI YC. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species[J]. Fungal Diversity, 2019, 98(1): 1-76.

- [4] 赵春艳, 陈旭, 董娇, 邵丽梅. 2015–2018 年我国食用菌产量和品种概况分析[J]. 中国食用菌, 2021, 40(2): 101-105.
ZHAO CY, CHEN X, DONG J, TAI LM. Analysis on Chinese edible fungi yield and varieties distribution from 2015 to 2018[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(2): 101-105 (in Chinese).
- [5] 谭琦, 潘迎捷, 黄为一. 中国香菇育种的发展历程[J]. 食用菌学报, 2000, 7(4): 48-52.
TAN Q, PAN YJ, HUANG WY. The development process of *Lentinula edodes* breeding in China[J]. Acta Edulis Fungi, 2000, 7(4): 48-52 (in Chinese).
- [6] 张美彦, 宋春艳, 于海龙, 谭琦, 徐珍, 王瑞娟, 章炉军, 尚晓冬. 基于 SNP 分型的香菇交配型 AS-PCR 鉴定[J]. 食用菌学报, 2019, 26(2): 1-9.
ZHANG MY, SONG CY, YU HL, TAN Q, XU Z, WANG RJ, ZHANG LJ, SHANG XD. Mating-type identification of *Lentinula edodes* based on SNP genotyping by AS-PCR[J]. Acta Edulis Fungi, 2019, 26(2): 1-9 (in Chinese).
- [7] 巫萍, 章炉军, 张丹, 尚晓冬, 谭琦, 宋春艳. 利用 SSR 标记鉴定香菇单核体及杂交后代[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 444-455.
WU P, ZHANG LJ, ZHANG D, SHANG XD, TAN Q, SONG CY. Identification of Xianggu (*Lentinula edodes*) monokaryons and hybrid progenies using SSR markers[J]. Microbiology China, 2016, 43(2): 444-455 (in Chinese).
- [8] KALENDAR R, SHUSTOV AV, AKHMETOLLAYEV I, KAIROV U. Designing allele-specific competitive-extension PCR-based assays for high-throughput genotyping and gene characterization[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2022, 9: 773956.
- [9] EL GATAA Z, SAMIR K, TADESSE W. Genetic dissection of drought tolerance of elite bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using genome wide association study in Morocco[J]. Plants, 2022, 11(20): 2705.
- [10] 林世锋, 王仁刚, 潘飞, 王自力, 元野, 李尊强, 任学良, 龙明锦, 张吉顺, 曾吉凡, 史跃伟. 双向等位基因特异性 PCR 技术在烟草 SNP 分型中的应用[J]. 中国烟草科学, 2022, 43(1): 6-13.
LIN SF, WANG RG, PAN F, WANG ZL, YUAN Y, LI ZQ, REN XL, LONG MJ, ZHANG JS, ZENG JF, SHI YW. Application of bi-directional PCR amplification of specific alleles in single nucleotide polymorphism genotyping of tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2022, 43(1): 6-13 (in Chinese).
- [11] 果禹鑫, 陈青君, 张国庆, 王贺祥, 秦勇. 运用交配型基因分子标记辅助羊肚菌单孢杂交育种[J]. 分子植物育种, 2022, 20(12): 4067-4074.
GUO YX, CHEN QJ, ZHANG GQ, WANG HX, QIN Y. Application of mating type gene molecular markers in *Morchella* single-spore cross breeding[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(12): 4067-4074 (in Chinese).
- [12] XIANG XZ, WANG XX, BIAN YB, XU ZY. Development of crossbreeding high-yield-potential strains for commercial cultivation in the medicinal mushroom *Wolfiporia cocos* (Higher Basidiomycetes) [J]. Journal of Natural Medicines, 2016, 70(3): 645-652.
- [13] 吴圣进, 陈雪凤, 刘增亮, 张雯龙. 利用 SCAR 分子标记鉴别香菇双单杂交后代[J]. 南方农业学报, 2022, 53(10): 2868-2875.
WU SJ, CHEN XF, LIU ZL, ZHANG WL. Identification of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler hybrid progenies from dikaryon-monokaryon mating using SCAR molecular marker[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(10): 2868-2875 (in Chinese).
- [14] 董洪新, 蔡德华, 李玉. 猪肚菇担孢子交配型的分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1617-1620.
DONG HX, CAI DH, LI Y. Analysis of mating types of basidiospores in *Panus giganteus*[J]. Microbiology China, 2010, 37(11): 1617-1620 (in Chinese).
- [15] 季哲, 李玉祥, 薛淑玉. 黄伞的交配型性状研究[J]. 菌物学报, 2004, 23(1): 38-42.
JI Z, LI YX, XUE SY. Mating system of *Pholiota adiposa*[J]. Mycosystema, 2004, 23(1): 38-42 (in Chinese).
- [16] 李安政, 林芳灿. 核迁移试验在香菇交配型分析中的应用[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2013, 31(3): 289-291, 342.
LI AZ, LIN FC. The mating type analysis in *Lentinula edodes* using nuclear migration test[J]. Journal of Hubei University for Nationalities (Natural Science Edition), 2013, 31(3): 289-291, 342 (in Chinese).
- [17] 余梅, 杜军华, 张宝静, 陈群. 真姬菇交配型的遗传学鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(7): 1905-1910.
YU M, DU JH, ZHANG BJ, CHEN Q. Genetic determination of mating type in *Hypsizygus*

- marmoreus*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(7): 1905-1910 (in Chinese).
- [18] PARK MJ, KIM E, JEONG YS, SON MY, JANG Y, KA KH. Determination and analysis of hyper-variable A mating types in wild strains of *Lentinula edodes* in Korea[J]. Mycobiology, 2023, 51(1): 26-35.
- [19] 鲍大鹏. 担子菌类食用菌交配型位点结构的研究进展[J]. 菌物学报, 2019, 38(12): 2061-2077.
- BAO DP. Research progress on the mating-typing locus structures of basidiomycete mushrooms[J]. Mycosystema, 2019, 38(12): 2061-2077 (in Chinese).
- [20] 李安政, 林芳灿. 香菇交配型因子次级重组体的鉴定[J]. 菌物研究, 2006, 4(3): 20-26.
- LI AZ, LIN FC. Identification of secondary recombinants for mating type factors in *Lentinula edodes*[J]. Journal of Fungal Research, 2006, 4(3): 20-26 (in Chinese).
- [21] 胡建平. 我国香菇杂交育种相关技术发展[J]. 中国食用菌, 2022, 41(10): 96-100.
- HU JP. Development of cross breeding related technologies of *Lentinula edodes* in China[J]. Edible Fungi of China, 2022, 41(10): 96-100 (in Chinese).
- [22] 宋晓霞, 章炉军, 赵妍, 宋春艳, 李传华, 陈明杰, 谭琦, 黄建春. 香菇单杂过程中核迁移和细胞质遗传规律[J]. 食用菌学报, 2021, 28(1): 16-21.
- SONG XX, ZHANG LJ, ZHAO Y, SONG CY, LI CH, CHEN MJ, TAN Q, HUANG JC. Nuclear migration and cytoplasmic inheritance during mon-mon crossing of *Lentinula edodes*[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(1): 16-21 (in Chinese).