

随机扩增多态 DNA (RAPD) 在野蘑菇 杂交育种中的应用

李荣春 张丽梅

(云南农业大学食用菌研究所 昆明 650201)

摘要: 野蘑菇 (*Agaricus arvensis* Schaeff ex. Fr.) 是蘑菇属 (*Agaricus*) 又一种近年来广泛栽培的食用菌。由于它的菌丝细胞具有多核, 无锁状联合, 以及人们对它的繁殖模式和生生活史认识的不足, 给杂交育种工作造成了较多困难。运用随机扩增多态 DNA 遗传标记技术, 结合拮抗试验和核相分析, 对自育的单孢菌株之间的杂交试验进行分析研究。结果表明: 两个相互亲合的同核体菌株被配对培养时, 交配反应出现, 并形成异核体的后代。可能野蘑菇具有双重的交配繁殖系统——同宗配合和异宗配合。在食用菌杂交育种研究中, 随机扩增多态 DNA (RAPD) 是一种非常有效和方便的检验杂合子的方法。

关键词: RAPD, 野蘑菇, 杂交育种

中图分类号: S646.19, S603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0052-04

RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) REVEALED THE HETEROKARYON OF *AGARICUS ARVENSIS* PRODUCED BY MATING REACTIONS

LI Rong-Chun ZHAN Li-Mei

(*Institute of Edulis Fungi Yunnan Agricultural University, Kunming 650201*)

Abstracts: The horse mushroom (*Agaricus arvensis* Schaeff ex Fr.) is one of most excellent edible mushroom, and was cultivated in world at resent year. But up to now, the breeding systems and life-cycle of horse mushroom has been poorly know. In this study, the random amplified polymorphic DNA was employed to analyse the mating reaction between self-fertile homokaryonic isolates by paired. The results demonstrated: (1) the mating reaction happened and the heterokaryonic offspring formed when the intercompatible self-fertile homokaryonic isolates were paired; (2) perhaps the horse mushroom is possessed of double breeding systems-homothallism and heterothallism; (3) RAPD is very effective method for verifying artificially synthesized heterokaryons and monitoring the transmission of genetic loci in mating of fungi.

Key words: RAPD, *Agaricus arvensis*, Mating reaction.

为了栽培更多种类的蘑菇以适应不断变化的市场, 为了寻找新的遗传资源以改良双孢蘑菇商业菌种的品质, 人们投入了巨大的精力, 其中野蘑菇 (*A. arvensis*) 引起了人们广泛的兴趣。Jahn^[1]认为野蘑菇是世界优秀的食用菌之一。Fritsche^[2]认为野蘑菇的担子产生 4 个担孢子, 因此它的担孢子是同核体, 适应于进行杂交育种。同时她还报导了她的栽培技术。

但是直到现在, 人们对野蘑菇的繁殖方式和生生活史的认识还是非常贫乏, 有些报道是相互矛盾的。例如 Elloit^[3]报道它是有两极性的异宗配合的性系统。Raper 和 Kaye^[4]发现两个菌种在它们的单孢子后代之间能产生明显的交配反应, 但另外两个菌株则不能。Anderson^[5]报道, 野蘑菇的单孢菌株之间不能产生交配反应, 所以对其性模

式是不清楚的。Fristche 发现具有亲合性的单孢发育形成的同核体菌株之间是可以进行交配并产生异核体菌株的, 这些异核体菌株是可育的。Noble (英国, 私人通讯, 1998) 认为单孢菌株是可育的。

出现上述矛盾报道的可能原因之一是由于野蘑菇的异核体菌株的菌丝细胞是多核且无锁状联合的结构, 由单孢子萌发形成的同核体菌丝细胞也是多核且无锁状联合, 这就造成了区分两者的困难, 也造成了杂交试验中区分亲本和杂合子的困难。

幸运的是近年来分子生物学技术的发展, DNA 指纹技术被广泛应用到各个生物学研究领域。其中随机扩增多态 DNA 技术由于它的方便, 有效低耗而被大量使用。Khush 等^[6]报道, RAPD 标记能适用于① 区分不同的双孢蘑菇菌株; ② 证明异核体菌株中的核项组成; ③ 检验人工杂交的杂合子; ④ 跟踪遗传过程中遗传位点的转移。

在本研究中, 作者选用不同地理菌株的自育的单孢菌株进行杂交试验, 利用 RAPD 分子标记技术, 核项和拮抗试验对杂交亲本和杂交子进行分析研究, 发现杂合子的 RAPD 标记明显地表现出两个亲本的 RAPD 标记之合。

1 材料与方法

1.1 同核体菌株

单孢子萌发形成的同核体菌株全部来自英国国际园艺研究 (HRI) 中心菌种中心, 它们的亲本采集者和产地见表 1。

表 1 菌株及其来源

菌 株	亲 本	亲本收集者	收集地	
93. 9. 11	93. 9	H. M. Grogan	West Sussex	England
AA0390. 12	AA0390	L. Gai	California	USA
AA0373. 15	AA0373	M. Loftus	California	USA
AR1. 2	AR1	C. Ducatillon	Anibes	France
A158	W6I	T. Elliot	West Sussex	England
A174	W6I	T. Elliot	West Sussex	England
94. 22. 15	94. 22	J. F. Smith	Warwick	England

1.2 杂交试验

杂交组合见表 2。配对的两亲本被接种在有 CYM + CE 培养基的培养皿内, 置于 25℃ 的培养箱中培养, 当两菌落相连时如果出现白色绒毛状的异样菌丝体 (见图 1), 初步认为杂合菌丝及杂交成功, 其配对的菌株之间是亲合的。反之则为不亲合, 不能杂交, 结果见表 2。取相互亲合的两亲本和它们的杂合子进行转培养, 得到的菌株为下面进行细胞学, 拮抗试验和 RAPD 分析的材料。

表 2 同核体菌株的配对交配反映情况

	93. 9. 11	AA0390. 12	AA0373. 15	AR1. 2	A158	A174	94. 22. 15
93. 9. 11	-	+	-	-	-	-	+
AA0390. 12			+	-	-	-	-
AA0373. 15				-	-	-	+
AR1. 2					+	+	-
A158						+	+
A174							+
94. 22. 15							

注: - 交配反应为阴性, + 交配反应为阳性

1.3 亲本和杂合子的细胞学观察

采用 Sonnenberg 和 Fristche^[7]描述的方法，荧光染色，Leitz Dialux20 显微镜观察并照像。

1.4 RAPD 分析

1.4.1 总 DNA 的制取：应用 Miniprapare 参照 Challen^[8]的方法。

1.4.2 RAPD 反应：扩增 PCR 反应液总体积 40μL，其中 4μL 10xPCR 缓冲液，29.85μL PCR 水，0.4μL dNTP（混合，浓度为 100μmol/L），0.5μL Dynazame II（2 个单位），0.25μL 引物（0.1mmol/L）和样品 5μL DNA（大约 25ng），PCR 扩增反应在 OmniGene thermal cycler 上进行，扩增条件及程序如下：94℃，1min，1 次；92℃，1min，35℃，1min 和 72℃，2min，循环 35 次。扩增产物在 1.4% 的琼脂上电泳分离，经 EB 染色后，紫外光下观察并照像。

2 结果与分析

2.1 杂交试验

结果见表 2 和图 1，可以看出亲本之间有的亲合，有的不亲合，这可能是由于它们的交配基因具有多个等位基因形成。

2.2 细胞学观察

我们只选取了 6 组（两个亲本和它们的杂交后代为 1 组）进行细胞学观察。观察表明无论是同核体菌株（亲本），还是杂合体菌株（杂交后代）的菌丝细胞都是多核的，两者都无锁状联合。只是杂合体菌株每细胞的核数目略高于同核体菌株（见图 2），这个结果与 Sonnenberg 和 Fristche 的研究结果一致。在 6 组观察的样品中，只有 1 组（93.9.11 X AA0373.15）的结果与上述不一致。

2.3 拮抗试验

在选出的 6 组中的拮抗试验表明 5 组的杂合体菌株的菌落和他们各自的亲本菌落之间都形成了明显的拮抗线，表明它们在生理上与亲本发生了差异。

2.4 RAPD 分析

在本研究中，评价两亲本是否亲合，杂交是否成功的唯一指标是 RAPD 标记指标。因为 RAPD 标记是 DNA 水平上的指标，杂交是否成功就是看两亲本的 DNA 是否组合到后代的细胞中，所以 RAPD 指标比形态指标（白色绒毛状异样菌丝），细胞学指标和拮抗试验的指标更准确可靠。在 93.9.11 X AA0373.15 的 RAPD 指纹都只出现单一亲本（AA0373.15）的指标，未发现任何双亲组合的痕迹。结合拮抗试验和细胞学观察结果，可以断定 93.9.11 X AA0373.15 并不是 93.9.11 和



图 1 同核体菌株间配对杂交反应

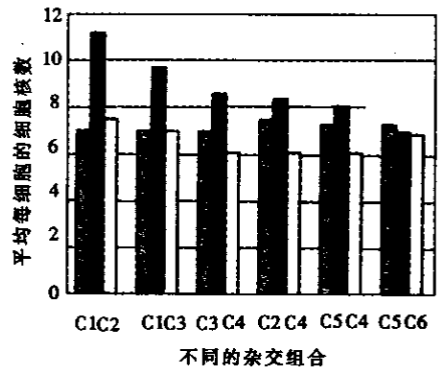


图 2 杂合子和它们的双亲的每个细胞的平均核数目

C1: AR1.2, C2: A158, C3: A174, C4: 94.22.15, C5: AA0373.15, C6: 93.9.11

AA0373.15的杂交菌株。这可能是由于杂交试验时出现形态学假象或者是由于杂交出现后转培养时没有选择到杂交菌丝,而是选取了亲本AA0373.15的菌丝。其它5组的RAPD分析都表明它们都具有两个亲本的DNA指纹的复合指纹,说明它们是真正的杂交后代,尽管它们有的是由一个引物就揭示了它们具有两个亲本的结合而成的RAPD指纹(见图3),有的是由两个引物所揭示。

3 讨论

野蘑菇的栽培面积在不断扩大,对其进行杂交育种研究不仅对于培育优质、高产、抗病新品种具有重大意义,而且对于丰富野蘑菇的基础生物学知识,搞清楚它的繁殖模式和生活史都有非常重要的意义。本研究通过单孢子萌发形成的同核体菌株间的杂交实验,利用RAPD分子标记技术,细胞学观察和拮抗试验,对杂交后代进行DNA分析鉴定。研究表明,能自育的野蘑菇同核体菌株间也可能实现相互交配,并且可能是两极性的具有多个等位基因的异宗配合模式。由此可见,野蘑菇可能具有同宗配合和异宗配合的两种交配类型的特殊生物类群。被广泛应用的随机扩展多态DNA分子标记技术,在野蘑菇杂交育种研究中具有方便,有效,低耗的特点,它能清楚地鉴定出杂交后代和亲本的相似度,是一种切实可行的方法。特别对于这些同核体,异核体都能产生子实体,同核体和异核体菌丝体和子实体在形态上都没有明显差异的菌株间的杂交后代的鉴定方面其意义更加重大。

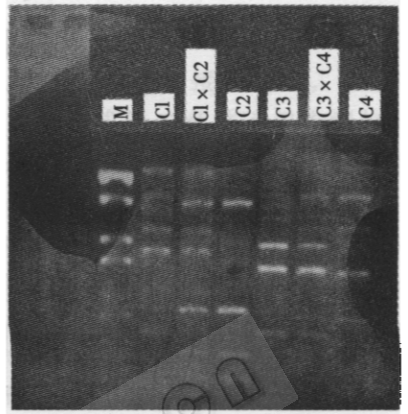


图3 RAPD 增扩产物(引物:OP-A17)的1.4%琼脂电泳图
M: DNA 分子量标记, C1: ARI.2, C2: A158, C3: A174, C4: 94.22.15

参 考 文 献

- [1] Jahn H. Pilze rundum. Park-Verlag Hamburg, Claassen and Goverts. 1949.
- [2] Fritsche G. Mushroom Science X (part 1), 1978, 91 ~ 101.
- [3] Elliott T J. Annual report of the Glasshouse Crops Research Institute, 1974, 40 ~ 41.
- [4] Raper C A, Kaye G. Journal of general microbiology, 1978, 105: 135 ~ 151.
- [5] Anderson J B, Petsche D M, Herr F B, et al. Can. J. Bot., 1984, 62: 1884 ~ 1889.
- [6] Khush R S, Becker E, Wach M, Applied and environment microbiology 1992, 58 (9): 2971 ~ 2977.
- [7] Sonnenberg A S M, Fritsche G. Mushroom Science XII, 1989, 101 ~ 107.
- [8] Challen M P, Moore A J, Martinez-Carrera D. BioTechniques, 1995, 18 (6): 975 ~ 978.