

糙皮侧耳担孢子交配型的鉴定*

程 莉¹ 李安政¹ 林范学^{1,2} 林芳灿^{1,*}

(华中农业大学应用真菌研究所 武汉 430070) (济宁学院生物系 济宁 273155)

摘要 以3个糙皮侧耳菌株为材料,用核迁移试验和 OWE-SOJ 技术对担孢子的4种交配型进行了鉴定。核迁移试验表明,核迁移仅出现于 $A = B \neq$ 交配反应而不出现于 $A \neq B =$ 反应中。而在 OWE-SOJ 试验中,发生核迁移的 $A = B \neq$ 交配反应形成无锁状联合的绒毛状菌落,而不发生核迁移的 $A \neq B =$ 反应形成无锁状联合的栅栏型菌落,两种菌落可以清楚地区别开来。核迁移试验的结果与 OWE-SOJ 试验的结果是一致的,可以相互印证。因此,将两者用于糙皮侧耳交配型的准确鉴定是可行的。

关键词: 糙皮侧耳, 交配型, 四极性, 核迁移, OWE-SOJ

中图分类号: S646.1⁺4 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1086-04

Accurate Determination of Mating Type of Basidiospores in *Pleurotus ostreatus**

CHENG Li¹ LI An-Zheng¹ LIN Fan-Xue^{1,2} LIN Fang-Can^{1,*}

(The Institute of Applied Mycology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

(Department of Biology, Jining College, Jining 273155)

Abstract Four mating types of basidiospores in 3 strains of *Pleurotus ostreatus* were determined using a nuclear migration test and an OWE-SOJ technique. The nuclear migration test showed that nuclear migration only occurred in $A = B \neq$ mating interaction but did not in $A \neq B =$ interaction. In OWE-SOJ test, a fluffy colony without clamp connection formed in the $A = B \neq$ mating interaction where nuclear migration occurs, while a barrage colony without clamp connection formed in $A \neq B =$ interaction where nuclear migration do not occur. The two colonies could be distinguished clearly each other. The result of the nuclear migration test is consistent with that of OWE-SOJ, which could be corroborated each other. Therefore it is feasible to apply the two to accurate determination of mating types in *Pleurotus ostreatus*.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, Mating Type, Tetra polarity, Nuclear migration, OWE-SOJ

在四极性食用菌中,利用交配型分析的常规程序,可以较方便地将 $A_x B_x$ 、 $A_y B_y$ 、 $A_x B_y$ 和 $A_y B_x$ 等4种不同交配型的担孢子区分开来^[1]。对于孢子比例测定之类的课题,这已能满足工作的需要。但是,由于在分析过程中,第3种担孢子(T_3)是随机抽取的,而且其交配型 $A_x B_y$ 是指定的而非实测的,因而,并不一定与真实情况相符,所以对于需要确知4种孢子的真实交配型的研究而言,进一步对检出的4种交配型进行准确鉴定是十分必要的。

林芳灿等已用核迁移等方法研究过四极性异宗结合菌香菇(*Lentinula edodes*)的交配型的准确鉴定

问题^[2]。与香菇一样,糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)也是一种四极性蕈菌,但是,虽然在国外相关英文专著中对于核迁移试验在交配型鉴定中的应用已作过介绍^[3],但是其在糙皮侧耳中的应用,国内至今尚未见报道。橡树木屑浸汁琼脂-榨桔汁琼脂培养基转换技术(OWE-SOJ)是美国研究者上世纪90年代开发的一种用于蜜环菌(*Armillaria mellea*)交配型鉴定的新技术^[4],其在糙皮侧耳中应用是否可行尚不得而知。本文将探讨这两种方法在糙皮侧耳交配型分析中的应用,以期对糙皮侧耳交配型的准确鉴定提供一种行之有效的方法。

*教育部高校博士点专项基金(No.20020204021),华中农业大学科研基金(No.2006073)

**通讯作者 E-mail: linfangcan@mail.hzau.edu.cn

收稿日期:2007-01-25,修回日期:2007-04-23

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:3个糙皮侧耳菌株平佛诱1号、华平49和平963-1,均由华中农业大学菌种实验中心提供。

1.1.2 培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA);完全培养基(CM);马铃薯葡萄糖酵母膏培养基(PDY);麦芽浸汁琼脂培养基(MYG);橡树木屑浸汁琼脂培养基(OWE);5%栎树木屑浸汁200mL,琼脂20g,加蒸馏水至1000mL;榨桔汁琼脂培养基(SOJ):鲜榨桔汁200mL,琼脂20g,加蒸馏水至1000mL。

1.2 方法

1.2.1 单孢分离:采用孢子弹射法收集担孢子,常规稀释法分离单孢^[1]。

1.2.2 原生质体制备:参考香菇原生质体制备的方法^[5],稍有修改。

1.2.3 交配型的常规鉴定:根据锁状联合的有无判断交配反应是否亲和,凡出现锁状联合者即为交配单核体两个交配型因子均不相同($A \neq B \neq$)的可亲和反应。交配型定为 $A_x B_x$ 的测交菌株 1(T_1)及交配型定为 $A_y B_y$ 的测交菌株 2(T_2)来源于一对可亲和的菌丝原生质体单核体。将 T_1 和 T_2 分别与所有的孢子配对,与 T_1 亲和的孢子,其交配型为 $A_y B_y$,与 T_2 亲和的孢子,其交配型为 $A_x B_x$ 。在剩下的既不与 T_1 亲和,也不与 T_2 亲和的孢子中,任选一个作为测交菌株 3(T_3),指定其交配型为 $A_x B_y$,将 T_3 与其余的孢子配对,与 T_3 亲和的为 T_4 ,交配型为 $A_y B_x$,不亲和的为 T_3 。

1.2.4 核迁移试验:取 T_1 在完全培养基上与 T_3 、 T_4 进行2组第1次配对,待菌丝交接后,在 $T_1 \times T_3$ 左右外侧各取一菌块分别与 T_4 和 T_2 进行第2次配对。若第2次配对可亲和则 T_1 和 T_3 间发生了核迁移, T_1 和 T_3 的 B 因子不同, T_3 为 $A_x B_y$, T_4 即为 $A_y B_x$;反之,若第2次配对不亲和, T_1 和 T_3 间无核迁移, T_1 和 T_3 的 B 因子相同, T_3 为 $A_y B_x$, T_4 为 $A_x B_y$ 。

1.2.5 OWE-SOJ 试验:将 T_3 、 T_4 分别与 T_1 、 T_2 交配,接种于 OWE 培养基上,两接种块相距 0.5cm,25℃ 对峙培养 7d~10d,两接种块菌丝接触后,沿与反应

区相垂直的方向穿过两菌落切取约 2mm 宽、1cm 长的琼脂条,转移至 SOJ 培养基上培养 15d~20d 观察菌落形态。

1.2.6 交配型实测比例的 χ^2 测验:确定两种菌丝原生质体单核体交配型是否符合预期比例 1:1 及四种孢子单核体是否符合预期比例 1:1:1:1,分别用公式 $\chi^2 = \frac{(|A-a|-1)^2}{n}$ 和 $\chi^2 = \sum_1^k \frac{(O-E)^2}{E}$ (A 和 a 分别代表两种核型单核体的实验观测值, $n = A + a$)对两种菌丝原生质体单核体及 4 种孢子的交配型比例进行 χ^2 测验。

2 结果与分析

2.1 菌丝亲本单核体交配型的比例

供试菌株两种菌丝亲本单核体比例如表 1 所示,可以看出,原来两种核处于 1:1 平衡状态的双核菌丝体经过原生质体化后,原生质体单核体交配型比例出现偏离,3 个供试菌株实得比例与预期 1:1 比例都不相符,其中平 963-1 只得到一种交配型,可能是一种极端偏离的类型。

表 1 两种菌丝原生质体单核体的比例

菌株	T_1 $A_x B_x$	T_2 $A_y B_y$	两种单核体的比例	χ^2
平佛诱 1 号	20	1	20:1	15.43
华平 49	31	3	31:3	21.44
平 963-1	22	0	22:0	20.05

注: $\chi_{0.05,1}^2 = 3.84$

2.2 担孢子交配型的种类和比例

各菌株孢子单核体交配型比例见表 2。从表 2 中可以看出,在经过减数分裂后形成的孢子中,实际得到的 4 种交配型的比例与预期的 1:1:1:1 比例基本相符的有 1 个菌株平佛诱 1 号,华平 49 与平 963-1 这 2 个菌株的实测比例与预期比例相比则出现了严重的偏离。

表 2 孢子单核体交配型分析

菌株	T_1	T_2	T_3	T_4	χ^2
平佛诱 1 号	13	15	15	11	0.81
华平 49	13	8	28	13	14.51
平 963-1	4	53	7	0	115.63

注: $\chi_{0.05,3}^2 = 7.81$

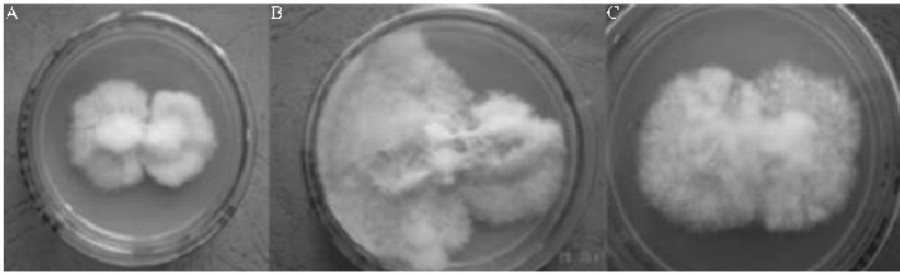


图1 采用 OWE-SOJ 技术时糙皮侧耳单孢分离物间对峙培养的典型反应

2.3 OWE-SOJ 试验确定交配型

以菌株平佛诱 1 号为例,用分属于 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 的 7 号、52 号、35 号及 22 号等 4 个担孢子进行所有组合的配对,结果在应用 OWE-SOJ 技术进行培养基转换培养的条件下,观察到了 3 种不同的菌落形态,交配反应的类型及菌落特征如图 1 及表 3 所示。

表 3 交配型反应的类型及菌落特征

菌落类别	菌落特征	配对组合	推断的交配反应
a	无锁状联合的栅栏型菌落 ¹⁾	7 × 35	$A \neq B =$
	A barrage colony without c. c ²⁾	52 × 22	
b	无锁状联合的绒毛状菌落	7 × 22	$A = B \neq$
	A fluffy colony without c. c ²⁾	52 × 35	
c	具锁状联合的绒毛状菌落	7 × 52	$A \neq B \neq$
	A fluffy colony with c. c ²⁾	22 × 35	

注: 1) 有时可见假锁状联合 2) c. c 即锁状联合

具锁状联合的菌落由已在常规交配型分析中探明的可亲和组合 7 × 52 及 22 × 35 产生,其交配反应为 $A \neq B \neq$ 。7 × 35 及 52 × 22 形成无锁状联合的栅栏型菌落,具有通常标志核迁移受阻的“栅栏”状形态,有时还可观察到只有 $A \neq B =$ 形成的假锁状联合,因此可以推断,他们的交配反应为 $A \neq B =$ 。

据此,可判断出各菌株的交配型,如表 4。

表 4 孢子单核体的交配型

菌株	T_1	T_2	T_3	T_4
平佛诱 1 号	$A_x B_x$	$A_y B_y$	$A_y B_x$	$A_x B_y$
华平 49	$A_x B_x$	$A_y B_y$	$A_x B_y$	$A_y B_x$
平 963-1	$A_x B_x$	$A_y B_y$	$A_y B_x$	$A_x B_y^*$

注: * 推断的结果

从表 4 可以看出,在常规交配型分析中,华平 49 的 T_3 的交配型指定为 $A_x B_y$ 凑巧与真实情况相符;平佛诱 1 号和平 963-1 的 T_3 的实际交配型均为 $A_y B_x$,原来指定的情况与真实情况刚好相反。这充分表明,对检出的 4 种担孢子的交配型进行准确鉴

定是十分必要的。

2.4 核迁移试验确定交配型

以菌株平佛诱 1 号为例,用分属于 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 的 7 号、52 号、35 号及 22 号等 4 个担孢子进行核迁移试验。先用 7 × 35 及 7 × 22 进行第 1 次配对,再在这两组配对的外侧取菌块分别与 22、52、35、52 进行第 2 次配对。如图 2 将 7 × 35 的第 1 次配对对外侧菌块分别与 22 和 52 配对,不能形成锁状联合,说明 7 和 35 之间没有发生核迁移,将 7 × 22 的第 1 次配对对外侧菌块分别与 35 及 52 所进行的第 2 次配对,均实现了双核化。这是由于 7 × 22 之间有核迁移发生,从而使第 2 次配对两个可亲和的核相遇后形成锁状联合。综上所述, $(A_x B_x)$ 与 $35(A_y B_x)$ 的 B 因子相同, $(A_x B_x)$ 与 $22(A_x B_y)$ 的 A 因子相同。用相同方法确定了华平 49 和平 963-14 种孢子的交配型,结果与表 4 中 OWE-SOJ 试验那结果完全一致。

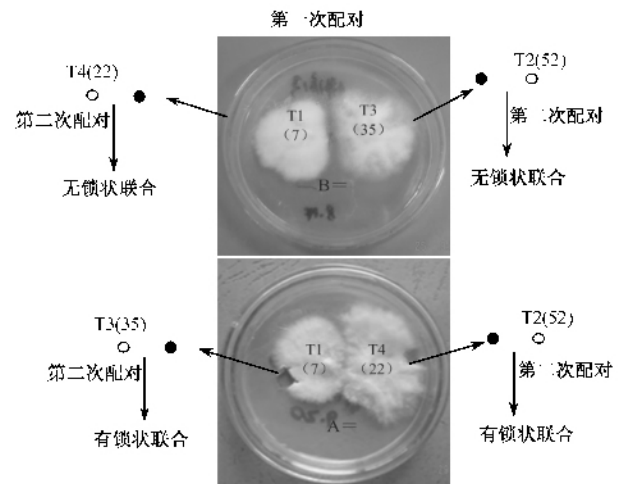


图 2 佛诱 1 号核迁移试验

2.5 重复核迁移和 OWE-SOJ 试验

取各菌株属于 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 的孢子进行重复试验,试验结果与上述结果相同,说明这两种方法对于糙皮侧耳是适用的。

3 讨论

供试菌株的菌丝原生质体单核体和孢子单核体的交配型均出现了不同程度的偏分离。Raper^[6]在裂褶菌(*Schizophyllum commune*)的研究中指出出现这种偏分离与B因子有关。程水明^[7]等在香菇的研究中表明出现这种偏分离既受B因子控制也与细胞质有关。糙皮侧耳中出现这种现象的原因还有待进一步研究。

OWE-SOJ技术的核心在于将 $A \neq B =$ 反应形成栅栏型菌落这一在普通培养基上不太明显的特征,通过特定培养基的转换培养而凸显出来,因而结果比较直观便于观察。不过,在OWE-SOJ试验中,有时也会遇到某些菌落形态不太典型的问题。因此,

必要时将两种方法联合应用,相互印证,结果将更为可靠。

参考文献

- [1] 张树庭,林芳灿. 蕈菌遗传与育种. 北京: 农业出版社, 1997, pp. 85 ~ 91, 142 ~ 143.
- [2] 林芳灿,汪中文,熊再明,等. 华中农业大学学报, 2000, 19(6): 573 ~ 576.
- [3] Eger G. Biology and Breeding of *Pleurotus*. In: Chang, ST and W. A Hages (eds). The Biology and cultivation of Edible Mushrooms. New York: Academic Press, 1978, pp. 501 ~ 506.
- [4] Darmono TW, Burdsall H H. Mycologia, 1992, 84(3): 367 ~ 375.
- [5] 林芳灿,张树庭. 华中农业大学学报, 1995, 14(5): 459 ~ 466.
- [6] Raper C A. Exs Mycol, 1985, 9: 149 ~ 160.
- [7] 程水明,林范学,徐学锋,等. 自然科学进展, 2005, 15(4): 486 ~ 490.