

双孢蘑菇的分子遗传育种研究进展

曾伟^{1,2} 宋思扬¹ 王泽生² 苏文金¹

¹(厦门大学生物学系 厦门 361005) ²(福建省轻工业研究所 福州 350005)

关键词 双孢蘑菇, 分子遗传, 分子育种

分类号 Q933, S646.1 **文献识别码** C **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0301-04

双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 是一种以二极性次级同宗配合方式进行遗传的食用真菌。双孢蘑菇的双核孢子多数为自体可育的异核孢子, 使得在育种实践及基础遗传学研究中急需的同核不育单孢很难获得, 而且同、异核菌丝也无法在生理形态上加以区分。这是多年来双孢蘑菇遗传育种研究进展缓慢的最重要原因。1980年, Fritsch 以恢复育性为标记进行单孢杂交, 才首先育成了在生产上广泛使用的 U1 和 U3。1982年, Royle 和 May 发展了蛋白质水平上的同工酶电泳标记技术^[1]。随后, 随着分子生物学技术的发展, 双孢蘑菇的遗传育种也以 DNA 标记进行菌株间亲缘关系的分析、同核体的分离, 以及杂交子的证实等研究。本文介绍运用 RFLP、RAPD 等 DNA 分子标记在双孢蘑菇遗传育种研究中取得的研究进展。

1 担子减数分裂行为

对于双孢蘑菇的遗传方式的研究, 主要围绕研究担子内由减数分裂产生的四个核在两个孢子中是如何分配这一核心问题展开的。Langton 和 Elliott 认为核的

分配过程应该是随机的, 而 Evans 以及 Royle 和 May 分别通过细胞学观察, 应用同工酶标记研究则发现减数分裂后非姐妹核有进入同一孢子的非随机倾向^[1]。

80 年代中期以来, 随着分子生物学技术的蓬勃发展, DNA 分子标记 RFLP 及 RAPD 也很快应用于双孢蘑菇遗传育种研究。Castle 等人曾以 RFLP 为遗传标记分析双孢蘑菇及大肥菇 (*Agaricus bitorquis*) 的种间及种内多态性^[2]; Summerbell 也曾应用 RFLP 跟踪分析了由异核亲本产生的单孢子的遗传物质存在情况^[3]; 而 Khush 则应用 RAPD 进行遗传亲子鉴定^[4]。这些研究均进一步证实, 双孢蘑菇减数分裂后形成的四个单倍体核确有非姐妹核进入同一孢子的非随机迁移倾向, 并且重组事件在该物种中极少发生。核非随机迁移行为导致绝大多数孢子为异核的现象, 被解释为是由于该物种为防止同核体隐性纯合可能导致的菌株致残、

福建省自然科学基金项目资助。

1998-06-08收稿, 1998-08-10修回。

致死效应,而进化出的适应性遗传机制,该机制最大程度地保持了亲本的异核性质。同核菌株在 RFLP 及 RAPD 分析研究中均表现为一些电泳谱带的缺失,这一点与王泽生等人应用同工酶鉴定同核子的研究结果一致^[5]。电泳谱带的缺失可能反映了同核体中执行正常生命功能基因的缺乏。因此必须注意到,由此导致的不易萌发,生存能力低下的同核体在实验观察中就可能被遗漏,造成观察中的同核孢子比率偏离真实比率。此外,Castle 应用 RFLP 进行的研究还发现,菌株的生长活力低并不能作为鉴定该菌为同核子的严格标准,二者之间不存在的绝对对应关系^[2]。

2 育性因子及生活史

有关双孢蘑菇育性因子的研究工作包括性因子的定位及性因子等位基因的寻找。

Xu 等人以 RFLP 以及 RAPD 标记为辅助成功地将性因子定位在双孢蘑菇最大连锁群,即染色体 1 上,并发现子实体的形成有赖于性因子,但由性亲和的同核菌丝杂交形成的异核体并不绝对地保证子实体的形成^[6]。由于在双孢蘑菇中无法用锁状联合的形成来判断异核体,所以在过去检验具不同交配型性因子的同核菌株是否成功杂交的传统标准是观察两类菌丝相互接触区是否产生绒毛状菌丝,以及通过栽培观察是否产生子实体。但用 DNA 分子标记检验发现这些传统方法仍欠严格,RFLP 或 RAPD 检测出的异核体有可能不出现以上生理行为。目前距性因子位点最近的遗传标记有 35 个遗传图距(约 600kb),用染色体步查法来分离性因子仍存在许多技术上的困难。

Castle 用 RFLP 为遗传标记的研究发现性因子的等位基因不少于 3 个。1992 年,美国加州发现了双孢蘑菇的四孢变种,此后 Micheline、Imbermoow 通过将四孢变种与传统双孢蘑菇菌株进行杂交,又发现了一些新的性因子等位基因,在双孢蘑菇中,人们共发现了 14 个性因子等位基因,但出现的概率均—^[7]。

1992 年四孢变种的发现不但丰富了种质资源,大大推动了性因子的研究,同时也使得双孢蘑菇生活史的研究得到进一步完善。在传统的双孢蘑菇中,双孢担子占绝大多数,四孢担子为数极少,次级同宗配合的遗传方式在其完整生活史中占着很大的比例^[1]。而在四孢变种中,异宗配合是主要繁殖方式^[8]。杂交研究表明,四孢担子性状相对双孢担子是显性的。

种内杂交研究还发现,四孢担子数量这一性状与性因子位点高强度连锁。对担子产孢数量、菌丝的育性与结实性这 3 个相互之间紧密联系又相互独立的性状真实关系的研究将成为今后研究的焦点问题。

3 染色体组型分析及遗传连锁图的建立

随着现代生物技术的发展,脉冲电泳已成为分析丝状真菌染色体核型的新手段^[9,10]。双孢蘑菇的核型在脉冲电泳凝胶中表现为 11 个条带,分子量分布在 1.1 到 5.7mb,基因组总长约 34mb,进一步进行 Southern 杂交则确证双孢蘑菇染色体应共有 13 条。早在 1959 年 Evans 也曾通过染色体镜检观察,估计染色体有 12 条。

双孢蘑菇的染色体组型种内多态性明显,并且遗传物质在杂交子中是非等量混合的。同核株的菌丝活力往往又与一定染色体片段相关联。Kerrigan 于 1993 年建立了包括同工酶、RFLP、RAPD、rDNA 重复序列以及少量外部表型性状等多种标记的遗传连锁图^[11]。混合标记连锁图的建立为今后进一步分析双孢蘑菇的遗传行为,定位、克隆有关基因提供了一个很好的参照标尺。

1996 年 Sonnerberg 则将从 cDNA 文库中分离得到的表达序列标记(EST)定位于双孢蘑菇相应的染色体上,其中包括 ATP 合成酶、漆酶、纤维素酶等已被克隆测序的与双孢蘑菇菌丝的生理生化特性相关基因^[12]。研究发现 rDNA 在染色体中拷贝数的不同可导致相同的染色体的长度在不同菌株中发生变化。这是染色体组型在各菌株间呈现多态的原因之一。

4 mtDNA 的遗传

Hintz 于 1988 年构建了双孢蘑菇的 mtDNA 的物理图谱。双孢蘑菇 mtDNA 的大小为 136kb,是在真菌中发现的分子量较大的 mtDNA。线粒体基因组编码能力稳定,在种间及种内显现多态性的原因主要由于内含子数量的变化。另外,所有 mtDNA 中均存在反向重复序列,此类序列有时双向存在,暗示双孢蘑菇 mtDNA 中存在转座行为,从而导致分子内重组。

尽管双孢蘑菇 mtDNA 存在种内多态性。但由于双孢蘑菇遗传保守以及长期以来人工筛选的标准单一,其多态性明显不如其它许多物种显著。Sonnerberg 等用限制性酶酶切产生多态酶谱的方法发现 3 种 mtDNA^[13],即使后来 Jin 再用 RFLP 标记探针杂交,也仅能区分出 4 种 mtDNA^[14],这是双孢蘑菇种质危机的另

一体现。

mtDNA的遗传是单亲遗传,杂交子只承袭其中一个同核亲本的线粒体基因型,而且往往是长得较快亲本的基因型。但如果让生长较慢的同核株先生长一段时间后,再与生长较快的同核亲本杂交,则在菌丝的融合区可分离到包含两个亲本线粒体基因型的异核子代,在子代中两亲本的胞质分配不均造成 mtDNA 单亲遗传的原因之一^[14]。杂交子中极少发现有重组型线粒体 DNA。不同的线粒体 DNA 之间也未发现有明确的显隐性关系, Sonnerberg 曾经提出不同核/质组合可能存在显隐性关系的假说^[13]。

5 转化育种

双孢蘑菇育种实践呈现两大趋势,一是筛选用核单孢或原生质体进行杂交育种,另一趋势则是运用原生质体进行转化育种。原生质体阳性转化子,一般通过营养缺陷互补,表型互补或显性标记的方法进行选择,但双孢蘑菇的营养缺陷型突变株很难获得,而且突变子由于生理上的缺陷,生长缓慢,培养困难,因此,通常以抗药性作为显性标记。

大多数丝状真菌的转化为整合转化,而且转化 DNA 的整合有同源重组和非同源重组两种类型。然而,在双孢蘑菇中,无论是核基因组还是线粒体基因组,重组行为极少发生,因此,90年代初期进行的双孢蘑菇原生质体转化实验鲜有成功的报道。

到了90年代中期,原生质体转化研究有了较大进展,转化子选择标记仍沿用以往的潮霉素(hygromycin)抗性作标记,但转化载体的启动子及终止子源自双孢蘑菇自身^[15]。Van de Rhee 等人还尝试了将造成双孢蘑菇褐变的酪氨酸基因的反义 DNA 序列与潮霉素抗性基因进行共转化,以期抑制子实体中酪氨酸酶的活性,达到保鲜的目的。结果在转化株的子实体中用探针可检测到稳定存在的导入 DNA 片段。

一个有价值的双孢蘑菇的转化株的获得必然包括3个技术环节,外源 DNA 片段的成功导入;片段的稳定表达;以及目的性状在子代中的稳定遗传。但目前为止,外源 DNA 在受体细胞中的稳定表达还很难做到,而且克隆到的直接控制双孢蘑菇表型性状的目的基因为数甚微。

6 结语

双孢蘑菇遗传育种研究中,遗传标记的更新经历

了从外观形态表型标记,如菌落形态,子实体特征到生理生化标记,如营养缺陷型及抗药、抗病性标记,再到分子水平的同工酶、RFLP、RAPD 标记的不同发展阶段。期间研究素材也逐步标准化和多元化,原生质体的制备不但提供了一个获取同核菌株的高效途径,也为转化育种提供了良好的外源 DNA 片段受体;四孢变种的发现不但丰富了双孢蘑菇的种质资源,完善了对双孢蘑菇生活史的分析,它的一些有别于普通双孢蘑菇的典型生理性状,也为建立合适的遗传品系进行性状相关基因的分析研究提供了优良的杂交材料。

同时我们必须看到,尽管分子生物学技术将双孢蘑菇遗传育种的研究水平提升到一个新的高度,但研究在很大程度上仍只是处于分子水平上现象的观察,数据的收集,以及假说的提出阶段。取得实质性的突破仍需假以时日,为进一步提高研究成果的实际应用效力,应增加标记数量,进行系统全面的家系分析,建立更高丰度的遗传连锁图,方便基因的定位、分离和克隆。

参 考 文 献

- [1] Poysse D J, May B. *Mycologia*, 1982,74:93~102.
- [2] Castle A J, Horgen P A, Anderson J B. *Appl Environ Microbiol*, 1987,53:816~822.
- [3] Summerbell P C, Castle A J, Horgen P A. *Genetics*, 1989,123:293~300.
- [4] Khush R S, Becker E, Wach M. *Appl Environ Microbiol*, 1992,58:2971~2977.
- [5] Wang H C, Wang Z S. *Mushroom Science*, 1989,Ⅺ (pratl):87~100.
- [6] Xu J, Kerrigan R W, Horgen P A *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1993,59:3044~3049.
- [7] Imbernon M, Callac P, Granit S *et al.* Allelic polymorphism at the mating type locus in *Agaricus bisporus* var. *burnettii* and confirmation of the dominance of its tetrasporic trait. *in: Elliott T J ed. Science and cultivation of edible fungi. Rotterdam.* 1995,11~19.
- [8] Callac P, Imbernon M, Kerrigan R W *et al.* The two life cycles of *Agaricus bisporus*. *in: Royse D J. ed. Mushroom Biology and Mushroom Products Penn State Univ.* 1996,57~66.
- [9] 刑来君,李明春. *微生物学通报*, 1996,23(4):244~248.
- [10] 边银丙,罗信昌. *微生物学通报*, 1997,24(1):22~26.
- [11] Kerrigan R W, Royer J C, Baller L M *et al.* *Genetics*, 1993,133:225~236.

- [12] Sonnenberg A S M, Groot P W J, Schaap P J *et al.* Appl Environ Microbiol, 1996,12:4542~4547.
- [13] Sonnenberg A S M, Von Loon P C C, Van Griensven L J L D. Mitochondrial genotypes and their inheritance in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. in: Van Griensven L J LD ed Genetics and breeding of *Agaricus* Wageningen, 1991, 42~51.
- [14] Jin T, Horgen P A. Appl Environ Microbiol, 1994, 12: 4456~4460.
- [15] Mooibroek H, Van de Rhee M, Rivas C S *et al.* Progress in transformation of the common mushroom, *Agaricus bisporus*. in: Royse D J, ed Mushroom Biology and Mushroom Products Penn State Univ. 1996, 37~36.