

细胞质因子对香菇交配型因子分离比例的影响

程水明¹, 徐学锋²

(1 黄冈师范学院 生命科学与工程学院, 湖北 黄冈 438000; 2 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642)

摘要:主要通过双-单杂交技术,探讨造成香菇原生质体单核化后2种交配型单核体分离比例偏离1:1与细胞质间的遗传关系.结果表明,双-单杂交所形成的由受体细胞质和受体、供体细胞核组成的同质异核体经原生质体单核化裂解后,毫无例外地都是与受体交配型相同的核居多,说明受体细胞质环境对双-单杂交所得异核体裂解后的核的存活和数量起着重要的作用;双-单杂交中,作为供体的2个核中只有亲和力强的那个核优先迁移到受体中,形成新的异核体,即存在先导核,先导核与B因子的亲和特异性有关,特异性越高,先导核迁移速度越快.

关键词:交配型因子;香菇;偏分离;细胞质因子

中图分类号:S646.12

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)01-0018-04

Influence of Cytoplasm Factor on Asymmetric Recovery of Nuclear Types from Dikaryons in *Lentinula edodes*

CHENG Shui-ming¹, XU Xue-feng²

(1 Life Science and Engineering College, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, China;

2 College of Food Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: This study has determined the genetic relations between the phenomenon of significant asymmetric ratio of the two component nuclear types from dikaryons and cytoplasm factors in *Lentinula edodes* via di-mon mating. Genetic analysis to fully compatible di-mon mating showed that the monokaryons with acceptor nuclear type outnumbered exclusively those pre-entrance nuclear type after dedikaryotization in all secondary derived homocyttoplasm heterokaryon consisted of acceptor cytoplasm and acceptor and donor karyons via di-mon cross, suggesting that some factors in cytoplasm are probably responsible for influencing survival of nuclei recovery from dedikaryotization. Moreover, the nucleus migrated from a dikaryon to a monokaryon is the nucleus with stronger compatibility between different B factors, then they form derived dikaryon, this showed that a pre-entrance nucleus exists in donor and pre-entrance nucleus mainly dependent on the compatible specificity of B mating-type factor between acceptor and donor nucleus; the higher the specificity, the faster the migration of pre-entrance nucleus.

Key words: mating-type factor; *Lentinula edodes*; segregation distortion; cytoplasm factor

香菇 *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 是世界第二大栽培蕈菌. 中国是全球最大的香菇生产国和出口国,产量高达世界总产的80%^[1]. 香菇是一种四极性食用蕈菌,理论上,双核菌丝体中,2种可亲和核的数量是相等的. 经原生质体单核化后,2种交配

型单核体的比例预期应为1:1.

交配型因子偏分离现象在致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary 中得到证实^[2],裂褶菌 *Schizophyllum commune* (L.) Fr.、金针菇 *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing.、平菇 *Pleurotus ostreatus* (Tacc.

收稿日期:2006-04-05

作者简介:程水明(1966—),男,副教授,博士, E-mail: swcsm@hgnc.net

基金项目:湖北省教育厅青年基金项目(Q200627001)

ex Fr.) Quel. 等蕈菌菌丝原生质体单核体交配型出现偏分离的现象已见诸报道^[3-5]. 在香菇中交配型因子的分布,作者已从菌丝原生质体单核体和担孢子两个方面进行了系统的研究, χ^2 测验表明在菌丝原生质体单核体中 2 种核型的比例偏离 1:1 平衡状态的占供试菌株总数的 61.71%,担孢子交配型发生偏分离的菌株占总数的 64.71%,且菌丝和孢子 2 类交配型偏离程度,均为栽培菌株高于野生菌株^[6]. 作者已证实在香菇 A、B 交配型因子中,B 因子或是与 B 因子连锁的因子对这种偏离有明显的影响,而 A 因子对此影响不明显. B 因子特异性不同,与之相对应的交配型单核体出现的比例亦不同,特异性越高,其对应交配型单核体在经原生质体单核化后将以较大的比例出现,反之,特异性小的 B 因子,对应交配型单核体出现的几率则少. 据此将参试的 2 个香菇菌株中的 4 个 B 因子按特异性大小排列出 $B_1 > B_3 > B_4 > B_2$ 的顺序^[7]. 本研究主要通过双-单杂交技术,探讨对造成香菇原生质体单核化后 2 种交配型单核体分离比例偏离 1:1 与细胞质间的遗传关系.

1 材料与方法

1.1 供试菌株和培养基

供试香菇菌株:栽培菌株 IB01 和 IB15 由河南省科学院生物研究所提供;野生菌株 HUB007、SHX021 由华中农业大学应用真菌研究所从野外采集并提供.

培养基:PDY(马铃薯、葡萄糖、酵母膏)、CYM(磷酸盐、硫酸镁、葡萄糖、酵母膏和蛋白胨)、MYG(麦芽糖、酵母膏、葡萄糖)和木屑培养基的配制参照文献[8]所述方法进行.

1.2 正反双-单杂交组合

用栽培双核菌株与担孢子之间进行双-单杂交,具体的组合及相应的交配型见表 1. 将每一杂交组合所得的杂交菌株进行彼此拮抗试验,若为阴性,说明杂交组合只产生一个杂交后代,将其分别编号为 1~8.

1.3 非对称杂交(双-单杂交)

将单核体菌丝接种于 9 cm 平皿,25 ℃ 培养 10 d,距菌丝尖端约 1 cm 处接种双核菌丝,15~20 d 后,待菌丝刚接触时,在单核体菌落最外端取样镜检,挑取经镜检具锁状联合的新双核菌丝,转至新鲜 MYG 固体培养基平板扩大培养,一般挑取 3~4 块,1 周后再挑取 3~4 块扩大培养. 然后将新双核菌株参照文献[9]所述方法进行原生质体单核化,确定杂

表 1 杂交后代及其来源

Tab. 1 Hybrids and their origins of <i>Lentinula edodes</i>		
菌号	杂交组合	亲本交配型
No.	cross combinations	mating types of parental strains
1	IB01 × IB15s66 ¹⁾	(A1B1 + A2B2) × A3B3
2	IB01 × IB15s64	(A1B1 + A2B2) × A4B4
3	IB15 × IB01s41	(A3B3 + A4B4) × A1B1
4	IB15 × IB01s37	(A3B3 + A4B4) × A2B2
5	HUB007 × SHX021s2	(A5B5 + A6B6) × A7B7
6	HUB007 × SHX021s31	(A5B5 + A6B6) × A8B8
7	SHX021 × HUB007s2	(A7B7 + A8B8) × A5B5
8	SHX021 × HUB007s13	(A7B7 + A8B8) × A6B6

1) IB15s66:分离自菌株 IB15 的担孢子,编号 66

交后代单核体的交配型,从而确定迁移核及交配型的比例.

1.4 单核化和交配型分析

原生质体单核体交配型鉴定参照文献[8]和[9]所述方法进行. 单核体交配型之比用公式 $\chi^2 = \frac{(|A - a| - 1)^2}{n}$ 进行统计分析,式中 A 和 a 分别代表 2 种核型单核体的试验观测值, $n = A + a$.

2 结果与分析

2.1 先导核的验证

将杂交异核体后代的一系列原生质体单核体分别与其亲本原生质体单核体 T1 及 T2 接种到 PDA 平板上进行交配,7~10 d 后镜检. 从其亲和性确定杂交后代单核体的交配型,从而定出先导核,其结果见表 2.

表 2 先导核交配型的验证

Tab. 2 Test and verification of mating type of the pre-entrance nucleus in <i>Lentinula edodes</i>				
菌号	供体交配型	受体交配型	衍生异核体交配型	先导核
No.	donor	recipient	mating-type of	pre-entrance
	mating-type	mating-type	derived dikaryon	nucleus
1	A1B1 + A2B2	A3B3	A3B3 + A1B1	A1B1
2	A1B1 + A2B2	A4B4	A4B4 + A1B1	A1B1
3	A3B3 + A4B4	A1B1	A1B1 + A4B4	A4B4
4	A3B3 + A4B4	A2B2	A2B2 + A3B3	A3B3
5	A5B5 + A6B6	A7B7	A7B7 + A5B5	A5B5
6	A5B5 + A6B6	A8B8	A8B8 + A5B5	A5B5
7	A7B7 + A8B8	A5B5	A5B5 + A7B7	A7B7
8	A7B7 + A8B8	A6B6	A6B6 + A8B8	A8B8

通过拮抗试验证实菌株 IB01 和 IB15 之间,菌株 HUB007 与 SHX021 之间拮抗明显,从杂交的亲本交配型组合来看,供体核与受体核的 A 与 B 因子均不

相同,供体中的2个核均能迁移,并与受体核形成具有真正锁状联合的双核体.因此,从核迁移及双核体形成的规律来看,正交($A1B1 + A2B2$) $\times A3B3$ 和($A1B1 + A2B2$) $\times A4B4$ 的杂交后代其交配型组合可分别为($A3B3 + A1B1$)、($A3B3 + A2B2$)和($A4B4 + A1B1$)、($A4B4 + A2B2$),反交($A3B3 + A4B4$) $\times A1B1$ 和($A3B3 + A4B4$) $\times A2B2$ 的杂交后代交配型组合也应分别为($A3B3 + A1B1$)、($A4B4 + A1B1$)和($A3B3 + A2B2$)、($A4B4 + A2B2$).

但从表2可看出,完全亲和和双-单杂交中,虽然作为供体的双核菌丝体中的2个核与作为受体的单核体均可亲和,但只有亲和力强的那个核(称之为先导核)可优先迁移到受体中,形成新的双核菌丝体.同一种双核菌丝体与不同单核体杂交时,迁移的可能为同一种核,也可能分别为2个不同的核.如正交中,($A1B1 + A2B2$)分别与 $A3B3$ 和 $A4B4$ 杂交时,二者的先导核均为 $A1B1$;但反交中,($A3B3 + A4B4$)分别与 $A1B1$ 和 $A2B2$ 杂交时,受体为 $A1B1$ 时,先导核为 $A4B4$,受体为 $A2B2$ 时,先导核为 $A3B3$.类似地,在($A5B5 + A6B6$)与 $A7B7$ 和 $A8B8$ 正交中,先导核均为 $A5B5$,而($A7B7 + A8B8$)与 $A5B5$ 和 $A6B6$ 反交时,先导核却分别为 $A7B7$ 和 $A8B8$.此外,在同时涉及 $A1B1$ 和 $A4B4$ 这2个核的双-单杂交,即($A1B1 + A2B2$) $\times A4B4$ 和($A3B3 + A4B4$) $\times A1B1$ 中,双核体中的相应竞争对象 $A2B2$ 和 $A3B3$ 均处于弱势地位,因而形成的新双核体均为 $A1B1 + A4B4$.同样,在同时涉及 $A5B5$ 和 $A7B7$ 的双-单杂交,即($A5B5 + A6B6$) $\times A7B7$ 和($A7B7 + A8B8$) $\times A5B5$ 中, $A5B5$ 和 $A7B7$ 处于优势地位,形成的新双核体均为 $A5B5 + A7B7$.

2.2 双-单杂交后代中2种原生质体单核体的比例

2.2.1 供试亲本菌株2种原生质体单核体的比例 为说明细胞质因子对交配型因子分离比例的影响,特对4种供试亲本菌株中的2种组成型核在经原生质体单核化后的比例进行了分析,结果如表3所示.从表3可以看出,4种供试亲本菌株中的2种组成型核,在经原生质体单核化后的比例,经 χ^2 分析,除IB01外,均偏离1:1的分离比.

2.2.2 单-单杂交后代中2种原生质体单核体的比例 为了更准确地反映细胞质因子对交配型分离比例的影响,作为对照,本研究以供试亲本菌株IB01和IB15为材料,对单-单杂交后代中2种原生质体单核体的比例进行了分析,在 $A \neq B \neq$ 异核体中,当含 B_1 的单核体分别与含 B_2 、 B_3 和 B_4 的单核体配对

表3 供试亲本菌株2种原生质体单核体的比例¹⁾

Tab.3 Ratio between two types of protoplast monokaryons in parent tested

菌株 strains	两种菌丝单核体比例 ratio of protoplast monokaryons	χ^2
IB01	36:24 ($A1B1$: $A2B2$)	2.02
IB15	47:11 ($A3B3$: $A4B4$)	21.12
SHX021	79:15 ($A5B5$: $A6B6$)	42.22
HUB007	53:17 ($A7B7$: $A8B8$)	17.50

1) $\chi^2_{0.05-1} = 3.84$

成完全亲和异核体时,经原生质体单核化后含 B_1 的单核体总是以多数的形式出现,4个B因子对自异核体中分离后的比例呈 $AB_1 > AB_3 > AB_4 > AB_2$ 的趋势,具体方法和数据参见文献[7].

2.2.3 双-单杂交后代中2种原生质体单核体的比例 将按表1所示杂交组合获得的8个新异核体进行原生质体单核化,将经镜检确定的原生质体单核体按常规交配型分析方法,分别与其亲本原生质体单核体T1及T2接种到PDA平板上进行配对,7~10 d后镜检.从其亲和性确定杂交后代单核体的交配型及其比例,结果见表4.

表4 双-单杂交后代中2种原生质体单核体的比例¹⁾

Tab.4 The ratio of two mating types of protoplast monokaryon regenerated from di-mono hybrids of *Lentinula edodes*

菌号 No.	受体 recipient	供体 donor	受体:供体 recipient:donor	χ^2
1	$A3B3$	$A1B1$	3:1(54:18)	17.01
2	$A4B4$	$A1B1$	2.43:1(51:21)	11.68
3	$A1B1$	$A4B4$	4.77:1(62:13)	30.72
4	$A2B2$	$A3B3$	1.88:1(49:26)	6.45
5	$A7B7$	$A5B5$	1.81:1(58:32)	7.81
6	$A8B8$	$A5B5$	3.32:1(73:22)	27.78
7	$A5B5$	$A7B7$	2.22:1(60:27)	11.77
8	$A6B6$	$A8B8$	2.13:1(64:30)	11.59

1) 括号内数字为实际试验数据; $\chi^2_{0.05-1} = 3.84$

表4中,双-单杂交形成的8个新双核菌丝体经原生质体单核化裂解后,出现一个十分有趣的现象:衍生异核体经裂解后的再生菌落中毫无例外地都是与受体交配型相同的核居多,2种单核体的比例最高的达4.77:1(异核体3),最小的(异核体5)也达到1.81:1,8个异核体平均为2.7:1,2种交配型单核体比例经 χ^2 测验,除异核体4为显著差异外,其余7个均达到极显著差异.

尤其值得注意的是,交配型同为 $A1B1 + A4B4$ 的

2个新双核体,一个来自双-单杂交(A1B1 + A2B2) × A4B4,另一个来自(A3B3 + A4B4) × A1B1 杂交,双核菌丝体裂解后,当受体为 A1B1 时, A1B1: A4B4 为 62:13;而当受体为 A4B4 时, A1B1: A4B4 为 21:51,而在单-单杂交试验中含 B1 的核的数量始终多于含 B4 的核;同样,交配型同为 A5B5 + A7B7 的2个新双核体的情况也如此,当受体核分别为 A5B5 和 A7B7 时,裂解后 A5B5 与 A7B7 的比例分别为 60:27 和 32:58. 从细胞质遗传学来看,这种遗传差异应归于细胞质差异即核外遗传因子差异,因此认为香菇双-单杂交后代应是同质异核体,受体细胞质的环境条件对双-单杂交衍生双核菌丝体裂解后核的存活及数量起着极为重要的作用.

3 讨论

交配型是食用菌最重要的遗传特性之一,由于原生质体再生菌株的姊妹菌株不是减数分裂的产物,在交配型方面将不会出现基因重组. 在完全亲和双-单杂交中,从其核迁移规律来看,供体中2个核都可迁移到受体细胞中. 但一般认为,供体中与单核体的核对应因子差异大的那个核,其亲和力强,迁移速度快. 从而出现一个核优先于另一个核进入单核体亲本而形成双核体. 此核可以称为“先导核”. 当受体的交配型不同时,其供体的先导核可以相同,也可以不同,从细胞质遗传来看,这种遗传差异应归于细胞质差异即核外遗传因子差异,由于本研究选用了栽培菌株与野生菌株作为代表菌株进行了正-反双-单杂交及其后代的遗传分析,香菇不同品种的杂交组合所产生的杂交后代均取得一致的结果,说明该正反杂交后代受其他因子的影响效应是完全相同的.

本研究中香菇双-单杂交后代应是同质异核体,同时也说明供体中核的迁移既受 B 因子控制,又与细胞质有关;新双核经原生质体单核化后,2种单核体中受体核型始终占有较大比例,表明细胞质中

存在着与核选择有关的因子,但究竟是哪一类因子在起作用,尚待进一步研究.

参考文献:

- [1] LIN Fang-can, WANG Zhong-wen, YANG Xin-mei. Cultivation of the black oak mushroom: *Lentinula edodes* in China[M]//VAN GRIENSEN L J L D. Science and cultivation of edible fungi. Rotterdam: Balkema Publishers, 2000: 955-958.
- [2] JUDELSON H S, SPIELMAN L J, SHATTOCK R C. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the Oomycete, *Phytophthora infestans*[J]. Genetics, 1995, 141:503-512.
- [3] RAPER C A. Controls for development and differentiation of the dikaryon in basidiomycetes[M]//BENNETT J W, CIEGLER A. Secondary metabolism and differentiation in fungi. New York: Decker Publishers, 1983: 195-236.
- [4] KAWABATA H, MAGAE Y, SASAKI T. Mating type analysis of monokaryons regenerated from protoplasts of *Flammulina velutipes*[J]. Trans Mycol Soc Japan, 1992, 33(2): 243-247.
- [5] LARRAYA L M, PEREZ G, IRIBARREN I. Relationships between monokaryotic growth rate and mating type in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3385-3390.
- [6] CHENG Shui-ming, LIN Fan-xue, XU Xue-feng, et al. Genetic analysis of segregation distortion of mating-type factors in *Lentinula edodes*[J]. Progress in Natural Science, 2005, 15(8): 584-589.
- [7] 程水明,林芳灿. B 因子对香菇交配型因子分离比的影响[J]. 遗传学报,2005, 32(12): 1301-1304.
- [8] 林芳灿,张树庭. 中国香菇栽培菌株不亲和因子的分析[J]. 华中农业大学学报,1995, 14(5): 459-466.
- [9] RAPER C A. B mating-type genes influence survival of nuclei separated from heterokaryons of *Schizophyllum*[J]. Exs Mycol, 1985, 9:149-160.

【责任编辑 李晓卉】