

食用菌灭活原生质体电融合及属间融合产物的鉴定分析*

曾 荣 刘祖同

(清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

张树庭

(香港中文大学生物学系 香港)

食用菌因其显著的营养、保健、药用及综合利用价值受到世人青睐。原生质体融合技术则为食用菌的育种和遗传学研究提供了一条很好的途径^[1,2]。食用菌的种内、种间乃至属间、目间的原生质体融合均已有过报道,但这些工作大多利用营养缺陷型标记的亲株,采用化学融合法完成。这种融合的效率较低,对亲株的标记繁琐费时,甚至会对菌株性状产生不良影响。最近,一种具有较高融合效率的物理融合法——电融合法以及非遗传性标记法分别被一些研究者所采用^[3-7]。本研究将原生质体电融合法与灭活标记法相结合来获得食用菌的属间融合产物,并采用包括同工酶分析和 RAPD (或 AP-PCR)^[8-10]方法在内的分子生物学方法,对食用菌属间杂交后代的遗传学特性进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 菌株

1.1.1 虎皮香菇 (*Lentinus tigrinus*) LT: 野生种。菌丝最适生长温度 35℃, 停止生长温度高于 45℃。32℃下能形成子实体。

1.1.2 金针菇 (*Flammulina velutipes*) 8123-1 和 VF2: 均为栽培种。菌丝最适生长温度 25℃, 停止生长温度 33℃, 37℃以上死亡, 最适出菇温度为 13℃。

1.2 原生质体的制备、灭活及电融合

基本操作按文献^[7]进行。试验用的去壁酶有 Lywallzyme (广东省微生物研究所), Novozyme 234 (Sigma 公司) 和 Helicase (自制) 3 种。用 2-碘乙酰胺对虎皮香菇 LT 的原生质体进行灭活处理。所用电融合装置为 DR-1 型多功能细胞融合仪 (清华大学与航天部共同研制)。

1.3 融合子的检出

将电融合处理过的原生质体转移到再生培养基上, 放在 35℃ 下培养观察, 把再生出的菌落接种到 PDA' 培养基上继续培养。然后将与周围其他菌落有明显拮抗的菌落挑出, 做以下的鉴定分析工作。

1.4 融合子的形态学鉴定

鉴定融合物的方法包括: 菌落和菌丝形态学比较, 生长速度测定, 拮抗实验, 锁状联合检查^[7], 吖啶橙核荧光染色^[11,12], 出菇试验^[3]等。

1.5 酶同工酶谱分析

参照陈都珍的方法^[13], 采用 10% 的分离胶浓度走垂直板聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 进行分析。

1.6 RAPD 分析

* 本研究项目由国家自然科学基金及香港 Croucher 基金会资助。

本文于 1993 年 9 月 15 日收到。

总 DNA 的抽提按文献[11]进行。RAPD 扩增按 Smith 的方法操作^[14]。所用引物 P4 的序列为: GAC GCT ATC GAT AAG CTT GA。

2 结果

2.1 原生质体制备、灭活及电融合条件的选取

获得一定数量的高质量的原生质体是进行电融合的前提。菌丝的菌龄,去壁酶和酶解时间等因素都影响原生质体的产率(表1)。

表1 影响原生质体制备的因素

菌株	菌龄 (d)	酶液	原生质体产率 ($\times 10^7$ /ml)						
			酶解时间						
			20	40	60	80	100	120	150
			(min)						
LT	2+2*	1 ^b	— ^c	0.15	0.50	1.10	1.75	1.80	1.90
LT	2+2	2	—	—	—	—	—	—	0.10
LT	2+2	3	—	—	0.13	0.30	0.50	1.00	1.20
LT	2+4	3	—	—	—	0.13	0.20	0.45	0.30
LT	2+2	4	—	0.25	0.47	1.30	1.70	1.48	1.58
VF2	3+2	3	1.6	3.5	5.0	4.4	4.7	—	—
8123-1	3+2	3	3.6	4.8	5.1	4.3	4.9	4.3	—

注: a. 在 GYP' 中培养 2 天后, 转到新鲜 GYP' 培养液中再培养 2 天, 以下类同。

b. 1. 15mg/ml 新生酶; 2. 15mg/ml 蜗牛酶; 3. 15mg/ml 溶壁酶; 4. 13mg/ml 溶壁酶+2mg/ml 新生酶。

c. 因产率太低或破损严重而没有计数。

对 LT 的原生质体制备而言, Novozyme234 的效果最好, Helicase 的效果最差。如果往 Lywallzyme 中掺入少量的 Novozyme234 也会得到单独用大量的 Novozyme234 同样的酶解效果。因此, 从经济实用的角度考虑, 混合酶液 (13mg/ml Lywallzyme + 2mg/ml Novozyme234) 被用来制备 LT 的原生质体。制备金针菇 8123-1 和 VF2 的原生质体时, 单独使用 15mg/ml 的 Lywallzyme 溶液即可得到很好的酶解效果。菌丝的菌龄对原生质体释放的影响也很明显。随着菌丝在新鲜培养液中的培养时间延长, LT 的原生质体产率会下降。当每种菌株的原生质体产率接近峰值时 (此时 LT 菌丝酶解的时间约为 100 分钟, 两个金针菇菌株则约为 60 分钟), 原生质体的数量和质量都符合实验要求。如果再延长酶解时间, 原生质体就会因质膜的不均匀或破损而不适于做电融合处理。

LT 的原生质体用 0.8% 的碘乙酰胺溶液在 20℃ 下处理 6 分钟即不能再生, 而用 0.4% 的碘乙酰胺溶液在 20℃ 下作用 10 分钟也能达到同样的效果, 且原生质体的质膜比用 0.8% 的溶液处理过的更均匀。不过, 经灭活处理过的原生质体在进行电融合时的净融合率通常仍要比未经处理的低。

在作电融合处理时, 交变电场的频率和强度, 直流脉冲的脉幅、脉宽和脉冲个数, 以及电击液的组成等都对融合效果有影响。实验中选用频率为 1 或 1.2MHz, 场强为 300—350V/cm 的交变电场, 可使原生质体在电极上形成含 2—20 个原生质体的稳定的珠串。此外, 在施加交变电场之前将原生质体在电极间沉降 4—5 分钟会有助于形成更长、更稳定的珠串。直流脉冲的 3 个主要参数 (脉幅、脉宽和脉冲

个数)是密切相关的。实验结果表明,选用脉幅为10kV/cm,脉宽为25 μ s的直流脉冲3—4个(脉冲间隔约为0.5秒),可使净融合率达40%以上,且被击碎的原生质体也很少。如果往电击液0.6mol/L甘露醇中加入0.1mmol/L CaAc₂和0.5mmol/L MgAc₂,可使净融合率提高20%以上。

2.2 属间融合子的检出与形态学比较

对从亲本LT和VF2获得的属间融合子LF1以及从亲本LT和8123-1获得的15个融合子LF2至LF16进行了研究。当这些融合子在PDA'培养基上生长时,其菌落形态倾向于高温亲本LT,而与亲本8123-1或VF2有较大差异。这些融合子的菌丝大多比亲本LT的菌丝生长得更茂盛(见表2)。此处要说明的是,表2中亲本VF2和8123-1的菌落直径虽然比融合子的大,但菌线非常稀疏。

表2 不同温度下融合子与双亲的菌落生长速度比较*

菌 株	VF2	LF1	LT	LF2	LF6	LF15	LF18	8123-1
菌落平均直径 (cm)	25℃	6.2	5.4	5.3	5.9	6.2	5.7	5.9
	35℃	—	8.4	8.3	8.6	8.6	8.5	—

* 在PDA'培养基上培养6天。

有些融合株在生长过程中还出现扇形分离现象(图1)。融合子与双亲均有明显的拮抗现象(图2),融合子之间也有拮抗作用。

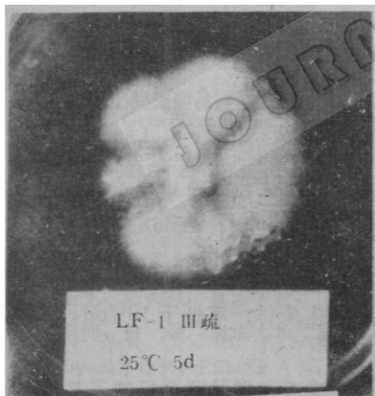


图1 属间融合产物LF1在25℃下培养5天后出现扇形分离现象

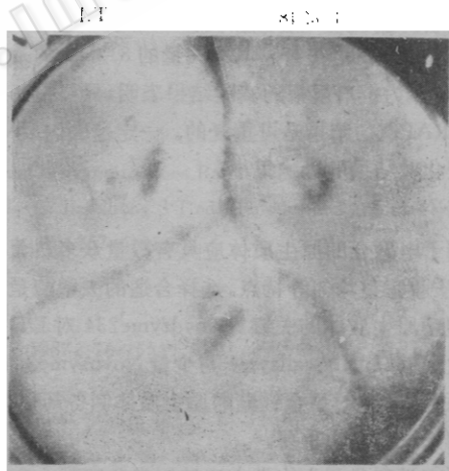


图2 LF2与亲本LT和亲本8123-1之间的拮抗现象

这几个亲本中,LT和VF2均能形成锁状联合,而8123-1不能;在融合子之中,除了LF1,其他融合子均能形成锁状联合。核荧光染色表明LF1和8123-1的菌丝为单核,而亲本LT、VF2,以及其他融合子都为双核体(图版I-1),这与锁状联合检查的结果是一致的,因为只有双核菌丝才形成锁状联合。出菇试验表明,融合子都能在28℃下出菇(图版I-2)。其菇形与LT的相似,但其菌盖的口感要比LT的细嫩。值得注意的是,单核体融合再生株LF1也能出菇,只是出菇所需时间要比其他融合子的

长一些。

2.3 属间融合产物与亲本的酯酶同工酶谱比较

融合子和亲本的同工酶谱见图 3。融合子与双亲的酶谱均有差异。融合子与亲本 LT 的差异主要在中间泳带区。实验结果还表明这些属间融合子的酶谱都能从亲本中找到对应的酶带，且表现出双亲酶带的组合。这一特征与文献[7]中报道的属间融合子 F19-1 (金针菇 8123-1 × 糙皮侧耳 QH-1) 的特征类似。

2.4 融合子的 RAPD 图谱

图 4 显示了用 RAPD 技术检测出的部分属间融合子的基因组 DNA 的多态性。扩增出来的 DNA 片段的大小主要集中在 300—1600bp 之间。融合子与双亲之间以及融合子之间在谱带的数目和位置等方面均有明显差异。融合子的谱带数量总体上讲要比双亲的少，且谱带 (即 DNA 片段) 的分子量偏小。融合子的谱带也都可以从双亲找到对应带，所有融合子和亲本 LT 都共有一条很强的谱带 (约 600bp)。作为对照的属间融合子 F19-1 的 RAPD 图谱更清楚地显示出了双亲谱带组合的特征。这与同工酶分析的结果是一致的。另外，以不同量的 8123-1 的基因组 DNA 作为扩增模板的实验结果表明，只要控制好条件，RAPD 的结果是可重复的。一定范围内 DNA 量的变化对结果的影响很小。

3 讨论

用于电融合的原生质体应具有数量众多，大小均一，质膜完整均匀等特点。选择合适的去壁酶是制备食用菌原生质体的关键。Novozyme234 对 LT 的酶解效果较好，Lywallzyme 与少量 Novozyme234 混用效果也不错。单独使用 Lywallzyme 对虎皮香菇的效果不佳，但对于金针菇的原生质体制备却很有效。另外，如果原生质体产率低于 $10^6/\text{ml}$ ，则电融合参数的选取就更为重要。

形态学和分子生物学方法被用来鉴定融合产物。菌落形态、生长速度和锁状联合反映了基本的形态学特征。菌丝拮抗则显示了融合子与双亲的不亲和性。这种不亲和性被用作了融合子的早期快速鉴定。核荧光染色直接显示了核的数目及其在菌丝中的分布。碘化丙啶和 Honest 33258 是食用菌研究中常用的荧光染料^[3,8]，但在本研究中应用吖啶橙效果也不错。同工酶和 RAPD 分析则揭示了融合子和双亲中基因表达，调控和重组方面的差异。

从鉴定分析的结果看，属间融合子与双亲在形态上均有差别，融合子之间也有些差异，但这些融合子仍以表现高温亲本虎皮香菇 LT 的性状为主。融合产物的同工酶谱和 RAPD 图谱表现为双亲谱带的组合，且也显示出了与 LT 更大的相似性。因而推测这些属间融合产物在菌丝体阶段并没有发生大规模的遗传物质的重组变异，但可能有某些成份丢失了。对属间融合子的表现型倾向于 LT 这一现象的一种可能的解释是：由于双亲的亲缘关系较远，染色体的结构差异较大，从而互不相容。与金针菇相比，亲本 LT 无论在核分裂的速度上还是在高温选择的适应性方面都占有优势。因此，在融合子的胞内，来

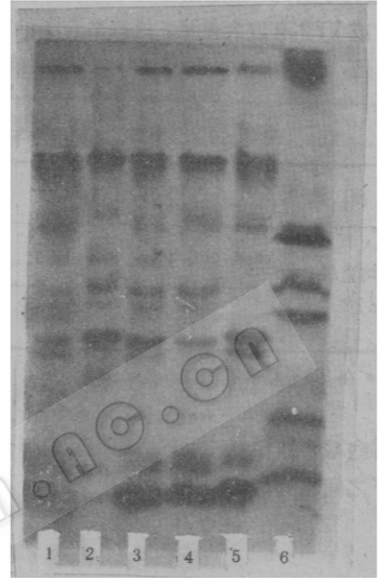


图 3 部分融合产物的酯酶同工酶谱

1. LT; 2. LF15; 3. LF2;
4. LF5; 5. LF6; 6. 8123-1

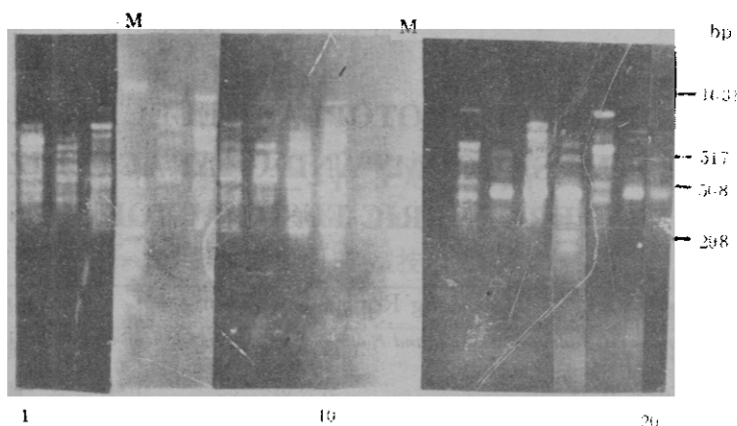


图4 部分融合产物的 RAPD 图谱

1. QH-1; 2. F19-1 (QH-1×8123-1); 3, 6. 8123-1; 4, 12. pBR322/Hinf I; 5, 16. LT; 7. LF2; 8, 19. LF5; 9. LF1; 10. VF2; 11. P4 (未加基因组 DNA); 13. LT (未加引物); 14. 8123-1 (加 0.1mg 基因组 DNA); 15. LF16; 17. LF6; 18. 8123-1 (加 0.2mg 基因组 DNA); 20. LF15。

自金针菇亲本的遗传物质可能会优先丢失或不表达, 而来自 LT 亲本的遗传物质则会较多地保留下来且能较好地表达, 从而使融合子的表型与 LT 的更相象。融合产物 LF1 与其他融合产物的性状特征差异较大, 这种差异有待于进一步研究阐明。

参 考 文 献

- [1] Chang S T, Miles P G. *Edible Mushrooms and Their Cultivation*. Boca Raton: CRC Press, 1989.
- [2] Yoo Y B. Gene Transfer in Edible Fungi Using Protoplasts. In: Chang S T ed. *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms*. Gordon and Breach Science Publishers, 1992. 157—191.
- [3] Toyomasu T, Mori D. *Mushroom Science*. 1989, 12: 151—159.
- [4] Yoo Y B, Korean J. *Mycol*, 1989, 17 (3): 119—123.
- [5] Sonnenberg A S M, Wessels J G. *Theor Appl Genet*, 1987, 74: 654—458.
- [6] 彭卫亮, 陆大京. *真菌学报*, 1987, 6 (3): 184—192.
- [7] 刘祖同, 曾 荣. *清华大学学报*, 1991, 31 (S3): 66—74.
- [8] Williams J G K, Kubelik A R, Livak J *et al*. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6521—6535.
- [9] Welsh J, McClelland M. *Mucl Acids Res*, 1990, 18: 7213—7218.
- [10] Kwan H S, Chiu S W, Pang K M *et al*. *Exp Mycol*, 1992, 16: 163—166.
- [11] 罗信昌, 陈大年. *真菌学报*, 1990, 9 (1): 64—58.
- [12] 张鸿卿, 连慕兰. *细胞生物学实验方法与技术*, 北京: 北京师范大学出版社, 1992.
- [13] 陈都珍, 成恒嵩, 必晓黎. *真菌学报*, 1987, 6 (1): 34—41.
- [14] Smith M L, Anderson J B. *Nature*, 1992, 356: 428—431.

INACTIVATED PROTOPLAST ELECTROFUSION OF EDIBLE MUSHROOMS AND CHARACTERIZATION OF INTERGENERIC FUSION PRODUCTS

Zeng Rong Liu Zutong

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084)

Chang Shu-Ting

(Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong)

Abstract The intergeneric fusion products were obtained by means of high temperature (35°C) selection after electrofusion between the inactivated protoplasts of *Lentinus igrinus* and the living protoplasts of *Flammulina velutipes*, meanwhile the conditions for isolation, inactivation and electrofusion of protoplasts were optimized. Morphologic comparison, Antagonistic reaction, Nuclear fluorescence staining, Isozyme analysis and RAPD technique were applied to characterize fusants. The results revealed the distinctive features of these intergeneric fusion products in both character and genetic recombination.

Key words Edible mushroom, Intergeneric protoplast electrofusion, Protoplast inactivation, Isozyme pattern, RAPD

图版说明

1. 吖啶橙荧光染色显示亲本 LT、融合产物 LF1 (LT×VF2) 和 LF6 (LT×8123-1) 的菌丝与细胞核：
A. LT; B. LF6; C. LF1.
2. 部分融合产物的子实体。