

用 CHEF 凝胶电泳探测远缘担子菌间 原生质体融合后的染色体变异*

曾 荣¹ 张树庭² 刘祖同¹ 尤美莲²

(1 清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

(2 香港中文大学生物学系 香港)

摘 要 用电场诱导灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus* Co5104, his⁻) 和佛罗里达侧耳 (*Pleurotus florida* Pf67, ade⁻) 两菌株的原生质体融合, 获得了两类属间融合子: 一类为不断发生分离的单核体, 另一类为稳定的双核异核体。利用等高钳位均匀电场 (CHEF) 凝胶电泳技术比较融合子与两亲本的染色体长度多型性 (CLP), 显示出融合子的染色体变异以整条染色体的丢失为主。结合形态观察和 DAPI 核荧光染色的结果, 推测单核融合子在胞质融合后很可能发生了核融合, 但来自亲本 Pf67 的染色体不断丢失, 最后融合子的遗传组成以来自 Co5104 的染色体为主; 而双核融合子在质配之后可能并未发生核配, 不过, 来自各亲本的染色体最终均只有部分得以保留在融合子中。

关键词 担子菌, 属间原生质体融合, CHEF 凝胶电泳, 分子核型, 染色体长度多型性 (CLP)

食用蕈菌 (主要是担子菌) 因其极高的营养、药用及综合价值而受世人青睐。改良菌种以提高蕈菌产量及品质是发展蕈菌产业的关键。从 80 年代初开始, 原生质体融合技术因能实现种间、属间乃至更远缘的体细胞杂交而应用于蕈菌的育种工作。然而, 由于对大多数蕈菌的分子遗传特性了解甚少, 加之缺乏直接有效的手段来鉴定分析融合子以及对细胞融合后的遗传变异过程进行探测, 使得原生质体融合技术应用于蕈菌育种的成效甚微。近几年来, 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 技术得到长足的发展。随着对产生脉冲场的方式的不断改进, 相继有 TAFE、CHEF 等技术问世^[1, 2], 这些技术已被应用于分离 0.5~10Mb 的真菌染色体 DNA, 从而获得其分子 (或电泳) 核型, 解决了真菌因染色体分子量较小而不易用普通光学显微镜进行核型分析的难题, 为从染色体和 DNA 分子水平上研究蕈菌的遗传学开辟了新的前景^[3]。并且, 由于 PFGE 可检测出不同菌株间的染色体长度多型性 (CLP), 因此该技术又可被应用于鉴定分析真菌原生质体融合产物, 探测融合产物在染色体水平上的变异情况^[4, 5]。尽管如此, PFGE 技术在担子菌研究中的应用却刚刚起步, 迄今仅有少数几种担子菌的分子核型用 PFGE 技术 (主要是 CHEF 和 TAFE 技

* 香港 Croucher 基金会资助项目。

CHEF: Contour-clamped Homogeneous Electric Field; CLP: Chromosomal Length Polymorphism; DAPI: 4, 6-Diamidino-2-Phenylindole; PFGE: Pulsed-field Gel Electrophoresis; TAFE: Transverse Alternating Field Electrophoresis.

本文于 1995 年 6 月 26 日收到。

术)分析过^[6~8]。本研究应用 CHEF 电泳技术比较了灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)和佛罗里达侧耳(*Pleurotus florida*)的属间原生质体融合子与亲本的分子核型,结合形态鉴定分析的结果,对融合子的染色体变异的机理进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 菌株: 灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)Co5104,单核菌株,组氨酸缺陷型(*his*⁻);佛罗里达侧耳(*Pleurotus florida*)Pf67,单核,腺嘌呤缺陷型(*ade*⁻)。

1.1.2 培养基: PDA 斜面培养基: Biolife 土豆葡萄糖琼脂 39.0g, 酵母粉 2.0g, 定容至 1L; MYG 平板培养基: 麦芽糖 10.0g, 葡萄糖 4.0g, 酵母粉 4.0g, Difco 琼脂 14.0g, 定容至 1L; PDY 菌丝液体培养基: Difco 土豆葡萄糖粉 24.0g, 酵母粉 2.0g, 加水到 1L; RMM 再生基本培养基: 天冬氨酸 2.0g, 葡萄糖 20.0g, 盐酸硫胺 0.12g, KH₂PO₄ 1g, K₂HPO₄ 0.46g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, Bacto 琼脂 14.0g, 加水至 1L。

1.2 原生质体制备

参照 Zhao 等人的方法^[9]从液体培养的新鲜菌丝制得。所用去壁酶液为用 0.6mol/L 的甘露醇配制的 20mg/ml 溶壁酶液(Lywallzyme, 广东省微生物研究所提供)。酶解条件是: 30℃, 100r/min, 保温 1~2h。

1.3 原生质体融合和融合产物的初步鉴定

将制得的菌株 Co5104 和菌株 Pf67 的原生质体按刘祖同等人的方法进行融合^[10], 融合产物的形态鉴定和拮抗实验按 Toyomasu 等人的方法进行^[11], 细胞核的 DAPI 荧光染色参照 Meixner 等人的方法^[12]。

1.4 染色体 DNA 制备

制得的原生质体稀释到 $2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ / ml 的浓度, 与等体积的 50℃ 下保温的制样用琼脂糖溶液混合(1.2% 制样用琼脂糖(Sigma 公司产品), 0.125mol/L pH8.0 Na₂EDTA, 0.6mol/L 甘露醇), 将混合液迅速注入样品模子中, 在冰浴上凝固 15~30min。取出样品胶块, 放入 NDS 缓冲液中(1% SDS, 0.45mol/L EDTA (pH8.0), 10mmol/L Tris-HCl (pH8.5), 1mg/ml 蛋白酶 K), 在 50℃ 下保温过夜, 然后用 50mmol/L EDTA 洗样品胶块数次, 放置过夜, 最后把样品胶块放在 50mmol/L EDTA 溶液中于 4℃ 下保存备用。

1.5 CHEF 电泳

在 BioRad CHEF DRTM-II 系统下进行。用粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的染色体 DNA 作为 DNA 分子大小的标记。电泳在 12℃ 下进行, 电泳缓冲液为 0.5×TBE (TBE, 45mmol/L Tris, 45 mmol/L 硼酸, 1mmol/L EDTA), 电泳时间为 144~168h, 脉冲时间为 3600~900s。每次电泳的具体条件在图例中均有说明。本研究使用了两种走电泳用的琼脂糖: LE 琼脂糖(FMC)和染色体级琼脂糖(Bio-Rad)。电泳结束后, 凝胶用 5μg/ml 溴化乙锭(EBr)染色 30min。

2 结果和讨论

2.1 融合产物的获得和形态生理鉴定

将经融合处理后的菌株 Co5104 和菌株 Pf67 的原生质体混合液涂布于 RMM 平板上。因亲本 Co5104 (his^-) 和 Pf67 (ade^-) 在该培养基上均不能生长, 只有这两个缺陷型亲本的原生质体融合产物由于营养互补拯救才能生长, 从而可在 RMM 培养基上得 Co5104 和 Pf67 的属间融合子。

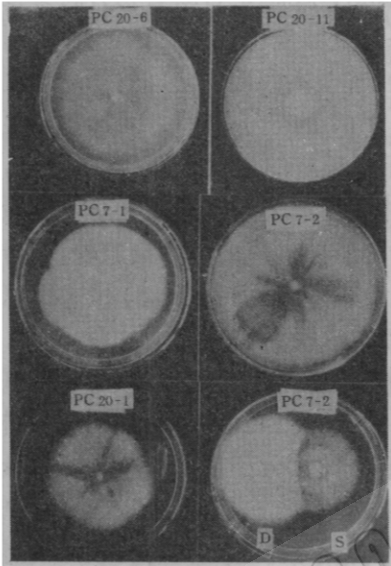


图1 融合子的菌落形态

PC20-6、PC20-11 为双核体, 菌丝均匀生长;
PC7-1、PC7-2 和 PC20-1 为单核体, 菌落有分离现象。D: 浓密生长部分; S: 稀疏生长部分。

Fig.1 Colonial morphology of fusants

PC20-6 and PC20-11 are dikaryons, the mycelia grow homogeneously; PC7-1, PC7-2 and PC20-1 are monokaryons, the colonies exhibit sectors of segregation. D. densely-growing part; S. sparsely-growing part.

为了与分子核型分析的结果相互印证, 对融合子作了进一步的形态生理鉴定。这些融合子在菌落形状和生长状况方面差异明显(图 1)。有的融合子在 PDA 上均匀生长, 呈现为两亲本的中间形态特征(如融合子 PC20-6 和 PC20-11 等); 但另一些融合子则发生分离, 在同一菌落上可区分出浓密生长的部分和稀疏生长的部分(如融合子 PC7-1、PC7-2 和 PC20-1 等), 经几次传代培养之后, 稀疏生长的部分变得更象亲本 Co5104, 而浓密生长的部分则继续分离出浓密生长的部分和稀疏生长的部分。所有融合子均与两亲本有明显的拮抗反应(图 2), 其中与 Pf67 的拮抗又更强烈一些, 显示融合子与另一亲本 Co5104 有更近的亲缘关系。对部分融合子菌丝的显微观察和 DAPI 核荧光染色的结果

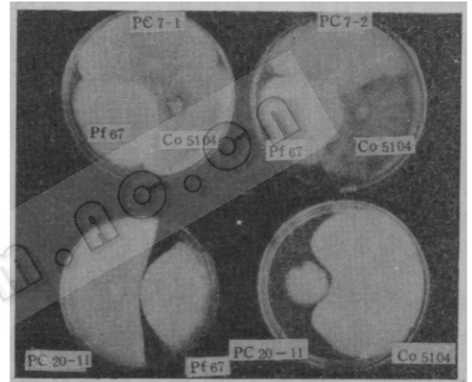


图2 融合子与亲本的拮抗反应

Pf67 和 Co5104 为亲本, PC7-1、PC7-2 和 PC20-11 为融合子。

Fig.2 Antagonism between fusants and their parental strains

Pf67 and Co5104 are parental strains, PC7-1, PC7-2 and PC20-11 are fusants.

显示(图版 I-1),融合子 PC7-1、PC7-2 和 PC20-1 的菌丝没有锁状联合,为单核菌丝;而融合子 PC20-6 和 PC20-11 有明显的锁状联合,为双核体。以上结果表明,这些融合子与亲本菌株既相似又有差异。但是,这些融合子在融合过程中是仅仅发生了胞质融合,还是已发生过核配?它们在染色体水平上是否发生了变异?下面试从对这些融合子与双亲的分子核型的比较分析来探讨融合子的核质遗传行为。

2.2 电泳核型分析的实验条件的优化

将电泳核型分析技术应用于担子菌融合子的鉴定分析的前提是能够获得多种担子菌菌株,尤其是亲本菌株的分子核型图谱。通过比较,看这些图谱是否具有物种特异性和多型性。为了获得较清晰的图谱,还须对电泳样品制备及电泳条件进行优化。为此,对 7 种担子菌的 9 个菌株进行了试验,结果表明,不同属、种,甚至不同菌株之间均呈现出明显的染色体长度多型性。在用作融合亲本的 Co5104 和 Pf67 的分子核型之间的差异更为明显,且在不同电泳条件下获得的图谱的基本带型显示出很好的可重复性(图版 I-2,图版 I-3)。不过,对样品胶块的处理,包括用 NDS 缓冲液裂解的时间长短和是否加蛋白酶 K 等,都会对电泳分辨率有影响。另外,使用不同的琼脂糖做成的电泳凝胶块,其分辨效果也不一样。使用同一浓度(如 0.8%)的染色体级琼脂糖(Bio-Rad)和 LE 琼脂糖(FMC),在同样的电场条件下,染色体 DNA 在前者中泳动更快且对大片段 DNA 分得更开;而在后者中泳动时则每条泳带都非常窄而清晰,尽管电泳速率较慢。因此,在以后的实验中主要使用 LE 琼脂糖,并把电泳时间延长 1~2d(由 142h 变为 180h)。脉冲时间也是一个与分辨率密切相关的关键性的参数,一般要分离大分子量 DNA (>2.0Mb)时,需要较长的脉冲时间(>1800s,相应的凝胶浓度也要低一些,一般约为 0.5%~0.7%,电泳时间长一些,至少 3d 以上);而分离小分子量 DNA (<2.0Mb),则需要较短的脉冲时间(<1000s,凝胶浓度大于 1.0%),且电泳时间也仅需 1~2d^[3]。为了在同一块凝胶上对大、小分子量的染色体 DNA 都能获得好的分辨率,利用了 Bio-Rad CHEF DRTM-II 系统的 ramping 功能,使脉冲时间能在电泳过程中逐渐由大变小。从结果上看,选取的 ramping 区间 3600~900s 和 3000~1200s 都能获得较高的分辨率。综上所述,在以下的实验中所采用的标准电泳条件是:12℃,0.5×TBE 缓冲液,0.9% Sea Kem LE 琼脂糖(FMC),电压 50V,电泳时间 180h,脉冲时间 3600~900s(ramping)。

2.3 属间融合子与其亲本的分子核型比较

融合子与其亲本的染色体长度多型性非常明显(图版 I-3)。从总体上看,这 5 个融合菌株可分为两类:一类如 PC7-1、PC7-2 和 PC20-1,其带型与 Co5104 的很相似,其中 PC7-1 和 PC20-1 包含所有 Co5104 的带,且另有一条大于 5.7Mb 的带与亲本 Pf67 相对应。但 Pf67 所具有而 Co5104 没有的 4 条带(2 条小于 225kb,1 条约 300kb,1 条约 1.44kb)在这一类融合子中均没有;另一类融合子,如 PC20-6 和 PC20-11,其泳带只与 Co5104 的一部分泳带相对应(225kb、1.1Mb 和 2.8Mb),有些 Co5104 或 P67 所具有的带,如 1.4Mb、2.4Mb、3.2Mb、3.4Mb、3.6Mb 和 4.0Mb 等泳带在 PC20-6 和 PC20-11 中均无相应带,Pf67 所特有的那条大于 5.7Mb 的带在 PC20-6 中也没有出现,但 300kb 的带则为 Pf67 和 PC20-6、PC20-11 所共有。从以上比较可看出:这两类融合子与双亲既有相似之处又有差异性。特别要指出的是,融合产物中没有非亲本的新带出现,只是表现

为双亲泳带的组合,且两亲本均有部分泳带没有出现在融合产物的图谱中。

一般认为,在 CHEF 电泳中,每条大于 0.5Mb 的泳带至少对应一条染色体 DNA (小于 200kb 的泳带可能是线粒体 DNA)^[3,13],因而上述泳带的变化实际上是反映了双亲的染色体在融合子中的变异情况。由此我们推断,在 Co5104 和 Pf67 间的这种属间远缘融合杂交过程中,在染色体水平上可能并没有发生染色体间的大片段(大于 20kb,因目前 CHEF 电泳还分辨不出小于 20kb 的染色体长度的变化)的易位,或染色体内大片段的缺失、插入等,但是,发生了整条染色体的丢失,且在不同类型的融合子中两个亲本的染色体丢失的程度是不一样的。有的融合子(如上述第 I 类融合子)保留了某一亲本的几乎全部染色体,可是却只保留了另一亲本的部分染色体;另一些融合子(如上述的第 II 类融合子)则是保留每一个亲本的部分染色体。这两类融合子在形态特征上也不一样,第 I 类融合子为单核体,在融合后的传代培养中不稳定,不断发生分离,直到其菌落形态与亲本 Co5104 的一样为止,这时的融合子在基本培养基 MM 上已不能再生;第 II 类融合子为双核异核体,有锁状联合,菌落在传代培养中没有明显的分离现象,其形态介于两亲本之间,在 MM 上仍能正常生长,表明两缺陷型亲本间的营养互补性仍存在。

将分子核型与形态特征相比较,推测在第 I 类融合子中发生过核融合,但在融合之后的传代过程中,亲本 Pf67 的染色体不断丢失,以至最后融合子的核型以亲本 Co5104 的染色体为主,且仍具有 Co5104 的组氨酸缺陷型(*his*⁻)特性;在第 II 类融合子中没有发生过核融合,但由于两亲本的不相容性(这两亲本在分类学上分属于不同的“属”),通过核-核或核-质相互作用,每一亲核均有部分染色体丢失,最终两个不完整但具有互补性的亲核达到平衡而稳定共存于同一胞质环境中。至于为什么会出出现多种类型的融合子,是什么因素导致了核配或核不配,以及染色体是怎样丢失的等等问题,还有待进一步研究阐明。

另外,在 Pf67 和 Co5104 及其融合子的电泳核型分析中,有两类特殊的小分子量泳带值得注意:一类是 225kb 和 300kb 的泳带,这两条带在有关 *C. cinereus* 和 *P. florida* 的分子核型的报道中都没有提到^[7,8],它们比一般的染色体 DNA (>0.5Mb)要小,但又比线粒体 DNA 大(*C. cinereus* 的线粒体 DNA 为 43kb, *P. florida* 的为 143kb),因而推测它们可能是额外染色体(Supernumerary chromosome)即 B 染色体。这两条带在第 II 类融合子中均出现,表现出明显的双亲本组合的特征,因为 Co5104 中只有 225kb 的带,而 Pf67 中只有 300kb 的带。值得注意的另一类小分子量 DNA 是在 Pf67 中的两条小于 225kb 的泳带,从分子量大小推测,可能是线粒体 DNA 或线粒体质粒 DNA 的带。这种小带未见诸有关 *P. florida* 的报道,但在植物病原真菌 *Leptosphaeria onaculans* 的电泳核型分析中有过类似的带出现^[14]。对这两类特别的带,还须利用 Southern 杂交及限制性酶切等技术作进一步的鉴定分析。

致谢 本工作得到英国 Nottingham 大学的贾建华博士、南非 Stellenbosch 大学的赵炯博士和香港中文大学的赵绍惠博士、徐海楼先生及何小仪小姐等的帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Chu G, Vollrath D, Davis R W. *Science*, 1986, **234**: 1582~1585.
- [2] Gardiner K, Patterson D. *Nature (London)*, 1988, **331**: 371~372.
- [3] Skinner D, Budde A, Leong S. *More Gene Manipulations in Fungi*. New York: Academic Press Inc, 1991. 86~103.
- [4] Hoffmann M, Zimmermann M, Emeis C. *Curr Genet*, 1987, **11**: 599~603.
- [5] Selebano E, Govinden R, Pillay D *et al*. *Curr Genet*, 1993, **23**: 468~471.
- [6] Lodder S, Gull K, Wood D. *Curr Genet*, 1993, **24**: 496~499.
- [7] Peberdy T, Fox H. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Hong Kong: The Chinese University Press, 1993. 41~50.
- [8] Pukkila P, Casselton L. *More Gene Manipulations in Fungi*. New York: Academic Press Inc, 1991. 126~151.
- [9] Zhao J, Chang S-T. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1993, **9**: 538~543.
- [10] 刘祖同, 曾 荣. 清华大学学报, 1991, **31**(S3): 66~74.
- [11] Toyomasu T, Mori K-I. *Mushroom Science*, 1989, **12**(Part 1): 151~159.
- [12] Meixner B, Bresinsky A. *Trans Br Mycol Soc*, 1988, **90**(2): 175~180.
- [13] Cantor C, Smith C, Mathew M. *Ann Rev Biophys Biochem*, 1988, **17**: 287~304.
- [14] Plummer K, Howlett B. *Curr Genet*, 1993, **24**: 107~113.

CHEF GEL ELECTROPHORESIS AS A MEANS FOR PROBE OF CHROMOSOMAL ABERRATION INDUCED BY PROTOPLAST FUSION OF DISTANTLY RELATED BASIDIOMYCETES STRAINS

Zeng Rong¹ Chang Shu-Ting² Liu Zutong¹ Yu Marilyn M²

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

(2 Department of Biology, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong)

Abstract Two kinds of intergeneric fusants were obtained by protoplast electrofusion between *Coprinus cinereus* Co5104 (*his*⁻) and *Pleurotus florida* Pf67 (*ade*⁻): one is unstable monokaryon which continually segregated when sub-cultivated, the other is stable dinucleic heterokaryon. Comparison of Chromosomal Length Polymorphism (CLP) between fusants and their parental strains was conducted with Contour-clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) gel electrophoresis. The result revealed that the deletion of entire chromosomes is the principal chromosomal aberration of fusants. Furthermore, combined with the results of morphological observation and DAPI nucleic fluorescence staining, this result of molecular karyotyping implied that: nucleic fusion, which follows the cytoplasmic fusion, probably takes place in the monokaryotic fusants, and the final genetic composition of this kind of fusants is mainly the chromosomes from parental strain Co5104 as a result of the continual deletion of chromosomes from the other parental strain Pf67. On the other hand, in dinucleic fusants, the nucleic fusion does not occur after cytoplasmic fusion; however, only a propor-

tion of chromosomes from each parental strain were retained in this kind of fusants.

Key words Basidiomycetes, Intergeneric protoplast fusion, CHEF electrophoresis, Molecular karyotyping, Chromosomal length polymorphism (CLP)

图版说明

Explanation of plate

1. 融合子菌丝的显微观察及其 DAPI 核荧光染色: L. 荧光染色; R. 菌丝形态($\times 400$); a. Co5104; b. Pf67; c. PC7-1; d. PC20-1; e. PC20-6; f. PC20-11; 2. 用 CHEF 电泳分离染色体 DNA: 电泳条件: 0.7% 的染色体级琼脂糖(Bio-Rad), $0.5 \times$ TBE 缓冲液, 电压 50V, 脉冲时间 3600~1200s, 142h, 12 $^{\circ}$ C; a. *S. pombe* marker DNA; b. Co5104; c. PC7-1; d. PC7-2; e. Pf67; f. *Flammulina velutipes* FV2; g. *F. velutipes* 8123-1; h. *Coriolus versicolor* Cv1; i. *Lentinus edodes* L34; j. *S. cerevisiae* marker DNA; 3. 融合子与其亲本的 CHEF 电泳核型比较: 电泳条件: 0.9% 的 Sea Kem LE 琼脂糖(F. M. C), $0.5 \times$ TBE 缓冲液, 电压 50V, 脉冲时间 3600~900s, 180h, 12 $^{\circ}$ C; a. *S. pombe* marker DNA; b. PC7-1; c. PC7-2; d. Co5104(亲本一); e. Pf67(亲本二); f. PC20-1; g. PC20-11; h. PC20-6; i. *S. cerevisiae* marker DNA.

1. Microscopic observation and DAPI nucleic fluorescence staining of mycelia of fusants: L. fluorescence staining; R. mycelial morphology; a. Co5104; b. Pf67; c. PC7-1; d. PC20-1; e. PC20-6; f. PC20-11; 2. Chromosome separation by CHEF electrophoresis: Electrophoresis conditions: 0.7% Chromosomal Grade Agarose (Bio-Rad), $0.5 \times$ TBE buffer, 50V, 3600~1200s (ramping), 142h, 12 $^{\circ}$ C; a. *S. pombe* marker DNA; b. Co5104; c. PC7-1; d. PC7-2; e. Pf67; f. *Flammulina velutipes* FV2; g. *F. velutipes* 8123-1; h. *Coriolus versicolor* Cv1; i. *Lentinus edodes* L34; j. *S. cerevisiae* marker DNA; 3. Comparison of molecular karyotypes between fusants and their parental strains by CHEF electrophoresis: Electrophoresis conditions: 0.9% Sea Kem LE Agarose(F.M.C), $0.5 \times$ TBE buffer, 50V, 3600~900s (ramping), 180h, 12 $^{\circ}$ C; a. *S. pombe* marker DNA; b. PC7-1; c. PC7-2; d. Co5104 (parent one); e. Pf67 (parent two); f. PC20-1; g. PC20-11; h. PC20-6; i. *S. cerevisiae* marker DNA.