

刘 娜,张 敏,宋 莹,等. 香菇原生质体杂交后代的遗传分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):106–109.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2018.17.026

香菇原生质体杂交后代的遗传分析

刘 娜,张 敏,宋 莹,刘俊杰
(辽宁省农业科学院食用菌研究所,辽宁沈阳 110161)

摘要:以香菇菌株 168、931、荷香 1 号和野生香菇及其杂交后代为材料,采用酯酶同工酶技术,研究香菇原生质体杂交后代与亲本之间的遗传关系。结果表明,供试菌株酯酶同工酶谱带数为 4~10 条,迁移率在 0.092~0.804 之间。所有杂交后代与亲本之间既有共同酶带,又有属于自己的特征酶带,可以初步认为供试的 24 个杂交后代有别于亲本,与前期的拮抗试验结果相符。聚类分析结果表明,当相异系数为 0.68 时,以 59 和 xy2 为亲本的杂交群体被分为 2 类,第 1 类为 ln3、ln4、ln8,第 2 类为 59、xy2;当相异系数为 0.78 时,以 59 和 ztd 为亲本的杂交群体被分为 3 类,第 1 类为 ln15,第 2 类为 ztd、ln1、ln7、ln10,第 3 类为 59;当遗传相异系数为 0.60 时,以 80 和 ztd 为亲本的杂交群体被分为 2 类,第 1 类为亲本 80,第 2 类为杂交后代与 ztd;当相异系数为 0.80 时,以 ztd、xy2 为亲本的杂交群体被分为 2 类,野生菌株 xy2 单独被分为一类,表明该菌株与其他菌株的亲缘关系较远。聚类分析结果初步鉴定了杂交亲本与后代之间的亲缘关系,从而为今后的栽培试验提供了理论依据。

关键词:酯酶同工酶;原生质体;杂交;遗传分析;香菇

中图分类号: S646.1+20.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2018)17–0106–04

香菇(*Lentinula edodes*)营养丰富,具有较高的保健价值,自古以来深受人们的喜爱^[1]。中国是人工栽培香菇的发源地和世界香菇第一生产大国,目前,我国香菇年产量约为 10 万 t,占世界总产量的 90% 以上。香菇品质的好坏与品种有很大关系,所以优良香菇品种的选育尤为重要。

原生质体杂交育种技术中的单核原生质体是由双核菌丝体中直接分离得来的,没有经过有性阶段,一般认为能更好地保持亲本的性状。利用这种原生质体再生单核体,更容易定向选育优良菌株^[2]。同工酶分析作为分子遗传标记技术之一,不仅被广泛应用于动植物的遗传分析、生理生化研究,而且被作为化学分类的重要指标应用于真菌的分类鉴定中,特别是在属内种间及品种之间的分类鉴定中是非常有效的^[3–4]。

在食用菌杂交育种中,亲本的合理选配及杂种的准确鉴定是至关重要的环节。多年来,育种工作者常常根据育种材料的生态型、生理特性及地理距离的差异选配亲本。但是,这类差异与亲本固有的遗传差异往往并不完全一致。

本研究中的亲本是基于酯酶同工酶技术、简单重复序列区间(inter-simple sequence repeat,简称 ISSR)分子标记技术,结合农艺性状选择的 4 个菌株(168、931、荷香 1 号和野生香菇),制备原生质体并单亲杂交,采用酯酶同工酶技术对原生质体单核化对称杂交获得的后代及其亲本进行遗传分析,旨在鉴定杂交后代与亲本的遗传关系及杂交子的真实性。

收稿日期:2017–03–30
基金项目:辽宁省农业领域青年人才创新基金(编号:2015026)。
作者简介:刘 娜(1981—),女,辽宁凌源人,硕士,助理研究员,主要从事食用菌遗传育种与栽培技术研究工作。Tel:(024)31025879; E-mail:516419005@qq.com。
通信作者:宋 莹,硕士,副研究员,主要从事食用菌遗传育种与栽培技术研究工作。E-mail:95123550@qq.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株及来源详见表 1。

表 1 供试香菇菌株及其来源

菌株编号	菌株名称	来源/亲本	菌株编号	菌株名称	来源/亲本
59	931	福建三明	ln11	杂交后代	80 × ztd
ztd	168	福建三明	ln12	杂交后代	80 × ztd
xy2	野生香菇	新宾县冈山	ln14	杂交后代	80 × ztd
80	荷香 1 号	荷兰	ln15	杂交后代	59 × ztd
ln1	杂交后代	59 × ztd	ln16	杂交后代	ztd × xy2
ln2	杂交后代	59 × xy2	ln17	杂交后代	80 × ztd
ln3	杂交后代	59 × xy2	ln18	杂交后代	80 × ztd
ln4	杂交后代	59 × xy2	ln22	杂交后代	80 × ztd
ln5	杂交后代	ztd × xy2	ln23	杂交后代	ztd × xy2
ln6	杂交后代	80 × ztd	ln24	杂交后代	ztd × xy2
ln7	杂交后代	59 × ztd	ln25	杂交后代	80 × ztd
ln8	杂交后代	59 × xy2	ln27	杂交后代	80 × ztd
ln9	杂交后代	ztd × xy2	ln29	杂交后代	80 × ztd
ln10	杂交后代	59 × ztd	ln30	杂交后代	ztd × xy2

PDA 综合培养基配方:200 g 马铃薯,20 g 葡萄糖,20 g 琼脂,3 g 磷酸二氢钾,1.5 g 硫酸镁,3 g 蛋白胨,1 000 mL 水,pH 值自然。

1.2 试验方法

1.2.1 杂交菌株获得 获得单核原生质体杂交菌株的试验参照甘炳成等的方法^[5]。

1.2.2 菌丝培养 将杂交亲本及杂交后代菌株接于 25 mm × 25 mm 的试管内,每个菌株接 10 支,置于 23 ℃ 恒温培养 15 d,刮取菌丝。

1.2.3 酯酶同工酶方法 采用垂直平板聚丙烯酰胺电泳法,收集供试菌株菌丝 0.5 g/份,用液氮研磨,将样品收集于

1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 样品提取液。将研磨后的样品在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min,取其上清液。将上清液、蔗糖溶液按体积比 1:1 混合后作为电泳样品。点样量为 40 μL,以溴酚兰作为电泳指示剂,在 4 ℃ 条件下电泳,初期电压为每板 150 V,当溴酚兰指示剂进入分离胶后电压升为每板 250 V,待指示剂迁移至距末端 1 cm 左右处停止电泳,染色,保存备用。

1.3 数据分析

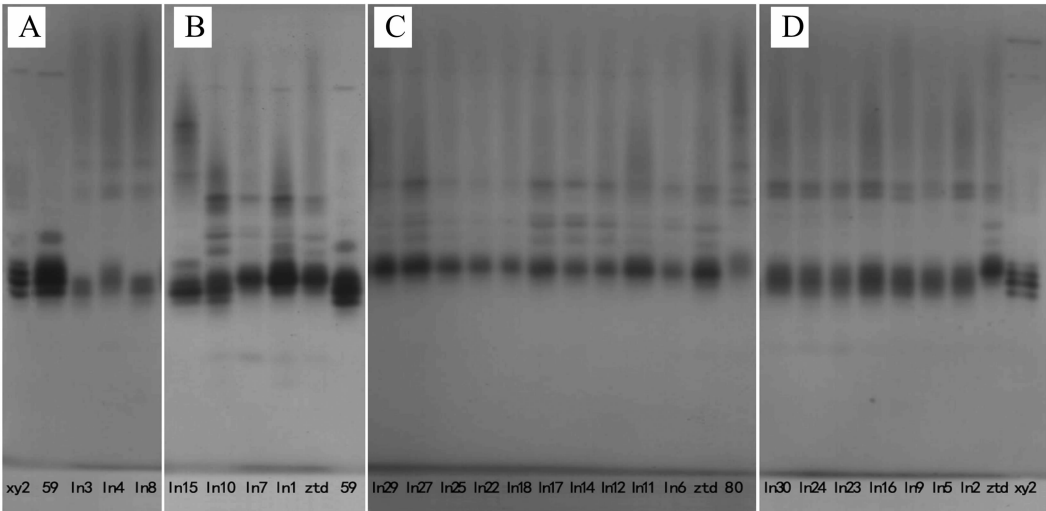
聚类分析。相对迁移率(R_i) = X/Y 。式中: X 为从点样孔下沿开始,酶带在凝胶中的迁移距离; Y 为从点样孔下沿开始,指示剂在凝胶中的迁移距离。在测量迁移距离时,以酶带的中部位置为准。依据酯酶酶谱,按照条带的有无进行标记,

在相同迁移率位置上,有条带的记为 1,无条带的记为 0。利用 DPS 数据处理软件,分析得到供试菌株的聚类分析图。

2 结果与分析

2.1 杂交亲本与杂交后代酯酶同工酶图谱

对酯酶同工酶图谱经过软件 Gel-Pro analyzer 进行条带识别和人工审核的结果如下:由图 1-A、表 2 可知,亲本 59、xy2 及其杂交后代共有迁移率各异的条带 13 条。杂交后代 ln3、ln4、ln8 与亲本有 1 条共同条带, R_i 为 0.595,杂交后代有 3 条特异性条带, R_i 分别为 0.351、0.402、0.571,说明杂交后代与亲本之间有共源性,但杂交后代中又有属于自己的特征酶带,是有别于亲本的新菌株。



A—以 59 和 xy2 为亲本的酯酶同工酶图谱; B—以 59 和 ztd 为亲本的酯酶同工酶图谱; C—以 80 和 ztd 为亲本的酯酶同工酶图谱; D—以 ztd 和 xy2 为亲本的酯酶同工酶图谱

图1 杂交亲本与杂交后代酯酶同工酶图谱

表 2 以 59 和 xy2 为亲本的酯酶同工酶的相对迁移率

谱带号	相对迁移率				
	ln4	ln8	ln3	59	xy2
1	—	—	—	—	0.092
2	—	—	—	0.173	0.173
3	—	—	—	—	0.310
4	0.351	0.351	0.351	—	—
5	—	—	—	—	0.381
6	0.402	0.402	0.402	—	—
7	—	—	—	—	0.408
8	0.420	—	0.420	—	—
9	—	—	—	—	0.446
10	—	—	—	0.512	—
11	0.571	0.571	0.571	—	—
12	0.595	0.595	0.595	0.595	0.595
13	—	0.613	0.613	0.613	0.613

注:“—”表示没有酶带。下表同。

由图 1-B、表 3 可知,供试菌株亲本 ztd、59 及其杂交后代的酯酶同工酶图谱表现不同,酯酶同工酶酶谱带数为 5~10 条,所有酶带的 R_i 为 0.171~0.804,6 个菌株所共有的 R_i 为 0.595、0.763,可以认为是香菇的基础酶谱带,表明 6 个香菇品种之间有同源性,在主要代谢过程中具有相似的生理性

状。4 个杂交后代在 R_i 为 0.253、0.282、0.361、0.386、0.430、0.481、0.557、0.598、0.620、0.804 的位置与亲本存在差异,表明杂交后代虽然与亲本菌株间有相同的酶带,但是又有各自的特征酶带,为新菌株。其中杂交后代中 ln15 与其他杂交后代遗传距离较远,具有多条特征性条带,说明 ln15 的变异幅度较大。

由图 1-C、表 4 可以看出,亲本 ztd、80 与其杂交后代酶谱带数和酶活性有较明显的差异,其中共同的酶带有 2 条, R_i 分别为 0.408、0.578。2 个亲本酶带类型、数量、位置及宽度相差明显,说明二者亲缘关系较远,为远源杂交^[6];杂交后代酶带类型、数量、位置及宽度相差较小,说明其亲缘关系较近。 R_i 为 0.170 的是杂交后代共有而亲本不具备的酶带,可以看出,杂交后代有别于亲本。

由图 1-D、表 5 可以看出,以 ztd、xy2 为亲本,每个杂交后代与亲本菌株有 6~9 条不等的酶带。对供试菌株的迁移率分析表明,迁移率都在 0.092~0.738 之间。供试菌株在 R_i 为 0.571、0.613 这 2 处均有酶带出现,为杂交亲本与后代共有的酯酶酶带。杂交后代拥有的 3 条酯酶酶带中, R_i 为 0.399、0.417 的酶带与亲本 ztd 共有, R_i 为 0.595 的酶带与亲本 xy2 共有,而 R_i 为 0.455 的酶带为杂交后代区别于亲本所特有的酶带。

表 3 以 59 和 ztd 为亲本的酯酶同工酶相对迁移率

谱带号	相对迁移率					
	ln15	ln10	Ln7	ln1	ztd	59
1	—	0.171	—	0.171	—	0.171
2	0.253	—	—	—	—	—
3	0.282	—	—	—	—	—
4	0.361	—	—	—	—	—
5	—	—	—	0.386	—	—
6	—	0.411	0.411	0.411	0.411	—
7	—	0.430	—	0.430	—	—
8	—	—	0.481	0.481	—	—
9	—	0.500	0.500	0.500	0.500	—
10	—	—	—	—	—	0.519
11	—	0.532	—	0.532	0.532	—
12	0.557	—	—	—	—	—
13	0.595	0.595	0.595	0.595	0.595	0.595
14	0.598	—	—	—	—	—
15	0.620	0.620	—	—	—	—
16	—	0.639	—	—	—	0.639
17	0.763	0.763	0.763	0.763	0.763	0.763
18	—	—	—	0.804	—	—

2.2 聚类分析图

从图 2 可以看出,931(59)和野生香菇(xy2)2 个菌株遗传距离较远。在相异系数为 0.68 时分为 2 类,第 1 类为 ln3、ln4、ln8,第 2 类为 59、xy2;杂交后代遗传相异系数较小,在相异系数为 0.51 时聚为一类,但与 2 个亲本的遗传相异系数较大,在相异系数为 0.85 时聚为一类。由此可以看出,杂交后代是有别于 2 个亲本的新菌株。

从图 3 可以看出,以 931(59)、168(ztd)为亲本进行杂交,931(59)和 168(ztd)的亲缘关系较远,在相异系数为 0.78 时分为 3 类:第 1 类为 ln15,第 2 类为 ztd、ln1、ln7、ln10,第 3 类为 59;杂交后代中 ln15 与其他菌株的亲缘关系较远,其他几个杂交后代亲缘关系较近,在相异系数为 0.73 时杂交后代与亲本 ztd 聚为一类,可以初步判断,杂交后代遗传性状与 ztd 较为接近。在后期试验中发现,ln1、ln7、ln10 在生育期、菇体形态方面都接近亲本 ztd。

从以荷香 1 号(80)、168(ztd)为亲本杂交后代的聚类分析结果可以看出,在遗传相异系数为 0.60 时,第 1 类为亲本 80,第 2 类为杂交后代与 ztd。杂交后代中 ln18、ln22、ln25 遗传相异系数为 0,ln11、ln12、ln14、ln17、ln27 遗传相异系数为 0(图 4)。遗传相异系数都为 0 的菌株说明它们具有共同的遗传基因,为同一菌株。

表 4 以 80、ztd 为亲本的酯酶同工酶相对迁移率

谱带号	相对迁移率											
	ln29	ln27	ln25	ln22	ln18	ln17	ln14	ln12	ln11	Ln6	ztd	80
1	0.170	0.170	0.170	0.170	0.170	0.170	0.170	0.170	0.170	0.170	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.238
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.276
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.361
5	0.408	0.408	0.408	0.408	0.408	0.408	0.408	0.408	0.408	0.408	0.408	0.408
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.435
7	—	0.469	—	—	—	0.469	0.469	0.469	0.469	0.469	—	—
8	0.490	0.490	0.490	0.490	0.490	0.490	0.490	0.490	0.490	0.490	0.490	—
9	0.524	0.524	—	—	—	0.524	0.524	0.524	0.524	—	0.524	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.571
11	0.578	0.578	0.578	0.578	0.578	0.578	0.578	0.578	0.578	0.578	0.578	0.578

表 5 以 ztd 和 xy2 为亲本的酯酶同工酶相对迁移率

谱带号	相对迁移率								
	ln30	ln24	ln23	ln16	ln9	ln5	ln2	ztd	xy2
1	—	—	—	—	—	—	—	—	0.092
2	—	—	—	—	—	—	—	—	0.173
3	—	—	—	—	—	—	—	—	0.310
4	—	—	—	—	—	—	—	—	0.381
5	0.399	0.399	0.399	0.399	0.399	0.399	0.399	0.399	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—	0.408
7	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	0.417	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—	0.446
9	0.455	0.455	0.455	0.455	0.455	0.455	0.455	—	—
10	—	0.476	—	—	0.476	—	—	0.476	—
11	—	—	—	—	—	—	—	0.512	—
12	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571
13	0.595	0.595	0.595	0.595	0.595	0.595	0.595	—	0.595
14	0.613	0.613	0.613	0.613	0.613	0.613	0.613	0.613	0.613
15	0.738	0.738	0.738	—	—	—	—	—	—

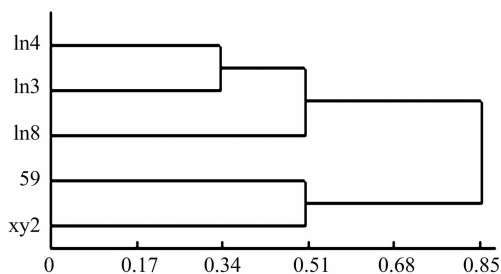


图2 以 59 和 xy2 为亲本的聚类分析结果

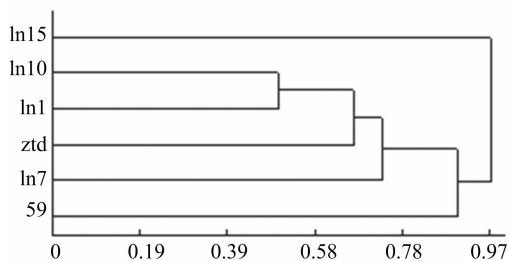


图3 以 59 和 ztd 为亲本的聚类分析结果

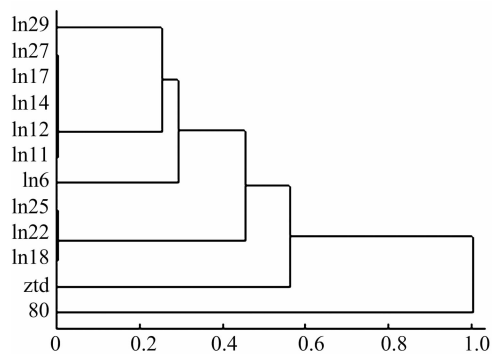


图4 以 80 和 ztd 为亲本的聚类分析结果

由以 168(ztd) 和野生香菇(xy2) 为亲本的聚类分析结果看出, xy2 与其他菌株亲缘关系较远, 单独为一类; 杂交后代中几个菌株遗传距离较近, 在遗传相异系数为 0.32 时聚为一类; ln23、ln30 的遗传相异系数为 0, 为同一菌株; ln2、ln5、ln16 的遗传相异系数为 0, 为同一菌株(图 5)。

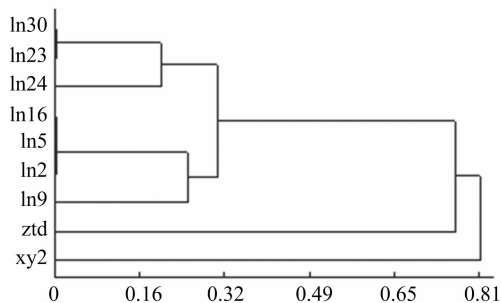


图5 以 ztd 和 xy2 为亲本的聚类分析结果

3 结论与讨论

本研究采用酯酶同工酶技术, 对杂交亲本及其后代进行遗传差异研究, 酯酶同工酶遗传分析结果表明, 供试菌株酯酶同工酶酶谱带数为 4 ~ 10 条, 迁移率在 0.092 ~ 0.804 之间, 所有杂交后代与亲本之间既有共同酶带, 又有属于自己的特征酶带, 可初步认为供试的 24 个杂交后代有别于亲本。聚类分析结果表明, 以 931(59)、野生香菇(xy2) 为亲本的杂交群体, 这 2 个亲本菌株的遗传距离较远, 在相异系数为 0.68 时分为 2 类, 第 1 类为 ln3、ln4、ln8, 第 2 类为 59 和 xy2; 以 931(59)、168(ztd) 为亲本进行杂交, 在遗传相异系数为 0.78 时分为 3 类, 第 1 类为 ln15, 第 2 类为 ztd、ln1、ln7、ln10, 第 3 类为 59, 杂交后代中 ln15 与其他菌株亲缘关系较远; 以荷香 1 号(80)、168(ztd) 为亲本, 在遗传相异系数为 0.60 时分为 2 类, 第 1 类为亲本 80, 第 2 类为杂交后代与 ztd; 以 168(ztd) 和野生香菇(xy2) 为亲本与杂交后代的聚类分析表明, 野生菌株(xy2) 与其他菌株亲缘关系较远, 单独为一类, 杂交后代几个菌株间遗传距离较近。聚类分析结果也初步鉴定了杂交亲本与后代之间的亲缘关系, 为以后的栽培试验提供了理论依据。供试的 24 个杂交后代均为真实杂交后代, 结果与前期杂交后代亲本拮抗呈阳性试验结果相符, 说明酯酶同工酶技术可以作为鉴定杂交子真实性的标准之一。所有杂交后代中都具有特征酶带, 可作为判断其他菌种是否为辽宁省农业科学院食用菌研究所选育菌株的依据之一。从聚类分析图可以初步看出杂交后代的遗传距离趋近于哪个亲本, 至于农艺性状是否和聚类分析结果相符, 还需要进行栽培性状比较试验。

中国香菇主栽品种遗传背景相对狭窄, 而野生资源存在丰富的遗传多样性, 有意识地应用野生种作为杂交亲本, 是一种有效扩大栽培种遗传多样性的方法。为此, 本研究将继续利用野生资源进行香菇新菌株选育, 以保证香菇产业的可持续发展。

参考文献:

- [1] 王丽宁, 赵妍, 陈明杰. 香菇单孢杂交及耐高温杂交子的 ISSR 分析[J]. 微生物学杂志, 2015(4): 43 - 47.
- [2] 焦海涛, 杨先新, 周伟, 等. 香菇原生质体单核体杂交方法试验[J]. 中国食用菌, 2002, 21(6): 8 - 10.
- [3] 叶明, 叶生梅, 潘迎捷, 等. 不同来源香菇双 - 单杂交后代的遗传研究[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(1): 53 - 56.
- [4] 宋莹, 张忠伟, 刘俊杰, 等. 香菇辽抚 4 号遗传差异性分析[J]. 食用菌, 2016, 38(5): 19 - 20.
- [5] 甘炳成, 唐家蓉, 彭卫红, 等. 香菇单核原生质体杂交菌株 JW 系列的选育研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(3): 494 - 497.
- [6] 宋莹, 刘娜, 肖千明, 等. 十五个香菇菌株遗传特异性研究[J]. 北方园艺, 2014(18): 163 - 166.