

# 用 RAPD 方法对平菇、香菇属间原生质体融合子的研究<sup>①</sup>

刘国振 刘振岳 贾建航 刘丽娟 泰立芳

(河北农业大学实验中心, 保定 071001)

李小兵 朱 衡 朱立煌

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

**摘要** RAPD 是一种新的分子生物学技术。本实验用 28 个随机引物对平菇、香菇及其融合子进行 PCR 扩增, 在融合子谱带中, 有 64 条与平菇相同(与平菇的相似指数 SI=70.6%), 14 条与香菇相同(SI=33.6%), 另外有 26 条谱带为双亲与融合子所共有。本实验结果说明融合子是双亲融合的产物, 但在融合过程中, 从双亲获得的遗传信息不等。本实验首次在食用真菌中获得了原生质体融合的分子生物学证据。我们认为, 在食用菌研究中, RAPD 将是一种有重要价值的分析方法。

**关键词** RAPD, 原生质体融合, 香菇, 平菇

## Studies on Fusants Derived from Intergeneric Protoplast Fusion of *P.sapidus* and *L.edodes* by RAPD Analysis

Liu Guozhen Liu Zhenyue Jia Jianhang Liu Lijuan Tai Lifang

(Technical Centre, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)

Li Xiaobing Zhu Heng Zhu Lihuang

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

**Abstract** RAPD is a novel molecular biological technique. *P. sapidus*, *L. edodes* and their intergeneric fusants were tested by RAPD method using 28 randomly selected primers. In bands gained from fusants by amplification reaction, there were 64 bands with the same position as in *P. sapidus* (the similarity index (SI) was 70.6%), 14 bands as in *L. edodes*. This results illustrated that fusants are true hybrid derived from protoplast fusion procedure, but the genetic information obtained from the two parents were not equal. Molecular biological evidence of protoplast fusion had obtained first time in edible mushroom by RAPD method in this experiment, we suggest that this technique is a valuable genetic marker for mushroom study.

**Key words** *Pleurotus sapidus*, *Lentinus edodes*, Protoplast fusion, RAPD

自 70 年代末以来, 国内外学者对食用菌的原生质体制备、再生及融合开展了广泛的研究工作<sup>(3)</sup>。80 年代中期, 日本学者进行了长根鬼伞种内原生质体融合, 并再生形成了子实体<sup>(5)</sup>, Tetsuo, T. 等<sup>(8)</sup>报道了食用菌种间原生质体融合的工作。本实验室<sup>(1)</sup>(1991)实现了平菇、香菇的属间原生质体融合。

<sup>①</sup>张秀君同学参加部分工作, 特致谢意。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)是近几年出现的一种新的分子生物学技术,它最初是由 Williams<sup>〔10〕</sup> (1990)和 Welsh<sup>〔9〕</sup> (1991)二个研究小组发展起来的, Crowhurst等<sup>〔6〕</sup> (1991)用该技术对二个真菌品系进行了分类学鉴定; Martin等<sup>〔7〕</sup> (1991)通过比较二个番茄近等基因系的 RAPD多态性,分离出了与抗 *Pseudomonas* 的基因紧密连锁的 DNA 片段。RAPD 方法检测具有快速、简便的特点,它在生物学各领域都有广阔的应用前景。但在食用菌中的应用,尚未见报道。

本研究试图用 RAPD 方法对融合子及其融合双亲进行分析,以探讨体细胞杂交后的基因重组规律,并进一步获得原生质体融合后的分子生物学证据。

## 1 材料和 方法

### 1.1 实验材料

平菇(*P. sapidus*):紫孢侧耳;香菇(*L. edodes*):7402;属间原生质体融合子再生第五代(F<sub>5</sub>)。①

### 1.2 DNA 提取方法

1.2.1 原生质体裂解—饱和酚抽提法 原生质体的制备按文献〔1〕进行。裂解在 1.5ml 离心管中进行,5克菌丝制备的原生质体加 100μl TE 缓冲液,混匀后加 400μl 裂解缓冲液,55℃水浴裂解 4 小时,间隔摇动(其它同参考文献〔2〕)。

1.2.2 氯化苄法 按参考文献〔4〕进行。

### 1.3 引物的选择

所用引物为美国 Operon 公司产品,实验中选取了 28 个引物对平菇、香菇及其融合子进行 PCR 扩增。

### 1.4 PCR 扩增反应条件

扩增反应的总体积为 25μl。其中包括 Tris-HCl, pH8.3, 10mmol/L; MgCl<sub>2</sub> 2mmol/L; KCl 50mmol/L; 明胶 0.001%; 4 种核苷酸各为 0.1mmol/L; 引物 15ng; 模板 DNA 5ng; Tag 酶 0.5 单位(中国科学院遗传所); 石蜡油 40μl, 反应程序如下:

反应混合物在 94℃变性 2 分钟,然后进入循环:94℃变性 1 分钟,36℃复性 1 分钟,72℃延伸 2 分钟,共 44 个循环,最后在 72℃保温 10 分钟,结束后保存在 4℃条件下。PCR 仪为 PERKIN ELMER 公司 DNA Thermal Cycler 480。扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察、拍照。

### 1.5 相似指数的统计

对扩增 DNA 片段进行了相似指数(Similarity Index)分析,公式为  $S_{xy} = 2 \cdot N_{xy} / (N_x + N_y) \times 100\%$ 。其中,  $N_{xy}$  是比较的二种材料  $x$  和  $y$  共有的 DNA 片段数目,  $N_x$  和  $N_y$  分别为材料  $x$  和  $y$  各自的 DNA 扩增片段数目。

## 2 结 果

首先用原生质体裂解法和氯化苄法制备了高分子量的平菇、融合子和香菇基因组 DNA,0.6% 琼脂糖凝胶电泳结果表明,所制备的 DNA 分子量大,没有降解,可用于 PCR 反应。

实验共选取了 28 个引物对融合子、平菇及香菇进行扩增反应,除了 3 个引物外,其余引物的扩增产物都能在琼脂糖凝胶中分出清晰的带,不同引物扩出的带从 0—13 个不等,扩增片段一般在 0.5—2.0kb 之间,用 28 个随机引物对融合亲本(平菇、香菇)及其融合子 F<sub>5</sub> 代扩增产物的电泳带型分析,结果归纳如下:

### 2.1 平菇与香菇扩增结果的比较

28 个引物对平菇共扩增出 108 条谱带(平均每个引物 3.9 条),香菇 96 条(平均 3.4 条/引物)。从电泳带型看,

①注:本文所指世代为从孢子→孢子的完整世代,不是母种的转接。

二者大多差异较大(图 1、图 2 中 L、P 相比), 经比较, 发现二者有 30 条谱带有相同的迁移速率。所以其相似指数为 29.4%。

## 2.2 融合子与平菇的比较

融合子共扩增出 147 条谱带, 其中大部分 (90 条) 与平菇相同, 相似指数为 70.6%。在有的引物中, 融合子与平菇的扩增结果基本相同(如图 1 中引物 C-08、D-18、A-13, F.P 相比), 也有的引物, 二者差异较大(图 1, D-08、B-17)。上述现象从图 2 中各引物的扩增结果(F.P 相比) 也可看出。

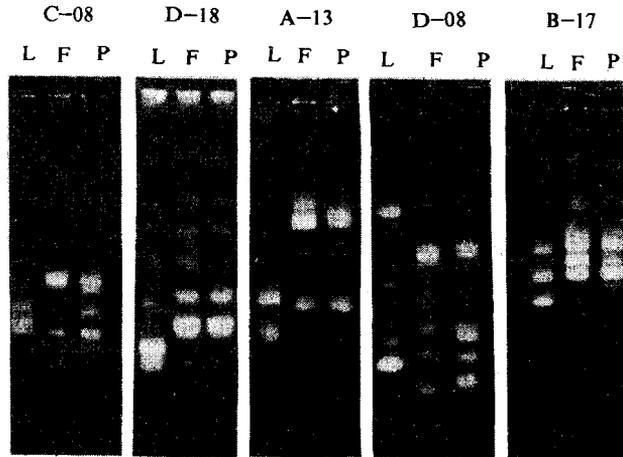


图 1 用随机引物 C-08 (TGGACCGGTG), D-18 (GAGAGCCAAC), A-13 (CAGCACCCAC), D-08 (GTGTGCCCA), B-17 (AGGGAACGAG) 进行扩增的结果  
L: 香菇; F: 融合子; P: 平菇。

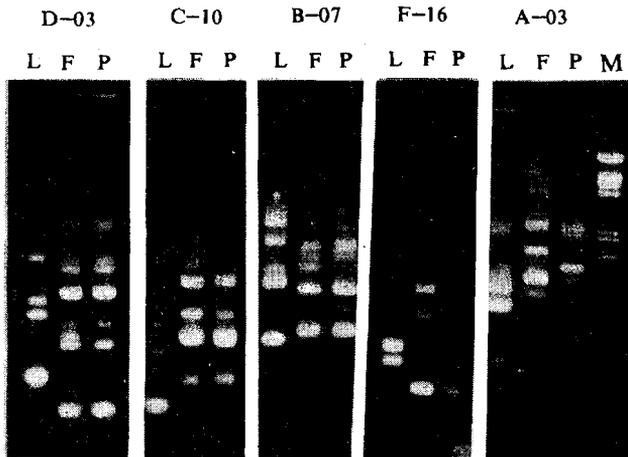


图 2 用随机引物 D-03 (GTCGCCGTCA), C-10 (TGTCTGGGTG), B-07 (GGTGACGCAG), A-03 (AGTCAGCCAC), F-16 (CGAGTACTGG) 进行扩增的结果  
L: 香菇; F: 融合子; P: 平菇; M: 分子量标记。

## 2.3 融合子与香菇的比较

融合子与香菇的谱带相比较, 有 40 条谱带相同, 相似指数为 33.0%, 与实验 2.2 中结果相比, 低于与平菇的相似指数 (70.6%), 但同上述 2.1 中相比, 又高于双亲间的相似指数。在融合子与香菇的共有谱带中, 有 14 条谱带为

融合子与香菇所特有, 图 2 各引物的融合子谱带中, 都能找到明显来自香菇的谱带(平菇中没有)。

将香、融、平三者综合比较(表 1), 双亲与融合子有 26 条相同谱带, 所以大多数双亲的共有谱带(30 条)都可以在融合子中表现出来。由表 1 还可看出, 融合子的 147 条谱带中, 有 26 条为双亲共有, 占 17.7%, 与平菇相同的 64 条(43.5%), 与香菇相同的 14 条(9.5%), 即来自双亲的谱带有 104 条, 占 70.7%, 其余 43 条(29.3%)为融合子的新谱带。

表 1 28 个随机引物对香菇、融合子及平菇的扩增结果

材料/谱带数	谱带总数	LFP 共同	LP 特有	LP 共同	FP 特有	FP 共同	FL 特有	FL 共同	相似指数(%)
香菇(L)	96	26	4	30	0	26	14	40	$S_{FL} = 33.0$
融合子(F)	147	26	0	26	64	90	14	40	$S_{LP} = 29.4$
平菇(P)	108	26	4	30	64	90	0	26	$S_{FP} = 70.6$

### 3 讨 论

根据 RAPD 的原理, 由每种随机引物扩增的 1 条谱带代表了被扩增的基因组中的一个遗传位点<sup>(10)</sup>, 因此, 本实验总共检查了平菇 108 个位点, 融合子 147 个位点, 香菇 96 个位点。

平菇与香菇为不同属的大型食用真菌, 平菇属于侧耳属(*Pleurotus*), 香菇为香菇属(*Lentinus*), 二者亲缘关系较远, 其基因组内的同源序列较少, 只有当引物结合位点之间的序列区段在二亲本之间同源时, PCR 扩增产物的带型才会相同, 从扩增结果来看, 相同的谱带较少( $SI = 29.4\%$ ), 差异是主要的。

从对融合子的分析来看, 融合子的谱带有的与平菇相同, 有的与香菇相同, 虽然本文未进行进一步的分子杂交, 但由 RAPD 的原理也足以说明, 其基因组 DNA 既有与平菇同源的序列, 又有与香菇相同的序列。这表明融合子是平菇和香菇的属间体细胞杂种。本实验在以前对其进行的形态、生化性状、营养成份等方面的分析的基础上, 进一步获得了原生质体融合的分子生物学证据。

根据 Williams 等(1990)<sup>(10)</sup> 的实验, RAPD 谱带呈显性的孟德尔方法遗传, 虽然本实验中发现双亲的共有谱带基本上都可在融合子中找到, 部分单亲谱带也出现在融合子中, 但不是双亲谱带的叠加, 融合子中还出现了新的谱带, 这可能是融合后的重组引起引物结合位点改变的结果。如果将融合子分别与二亲作比较, 由本实验结果可以看出, 融合子与平菇更为接近, 说明在原生质体融合中, 融合子从双亲获得的遗传信息不等。由于本实验所用材料为融合后第五代, 看来在世代延续中, 可能发生过双亲 DNA 的互相排斥或单亲 DNA 的丢失, 但目前的实验尚不能提供这方面的证据, 有待进一步研究。

在食用菌中, 这种新的 RAPD 方法所产生的电泳谱带提供了非常有用的遗传标记, 在原生质体融合材料的分析、种质资源的鉴别研究及突变体分析中都有广泛的应用价值。

### 参 考 文 献

- (1) 刘振岳等, 1991. 遗传学报, 4: 352—357.
- (2) 吕作舟, 1992. 中国食用菌, 1: 13—14.
- (3) 何强泰, 1986. 食用菌, 3: 6—8.
- (4) 朱 衡、翟 峰、朱立煌, 1994. 真菌学报, 1: 34—40.
- (5) 柳园江, 1986. 化学与生物, 5: 285—287.
- (6) Crowhurst R N, *et al*, 1991. Current Genetics, 20: 391—396.
- (7) Martin G B, *et al*, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 3: 2236—2340.
- (8) Tetsuo T, *et al*, 1987. Agric. Biol. Chem., 3: 935—937.
- (9) Welsh J, *et al*, 1991. Nucleic Acids Research, 24: 7213—7218.
- (10) Williams J G K, *et al*, 1990. Nucleic Acids Research, 22: 6531—6535.

本文于 1993 年 10 月 4 日收到。