

暗褐网柄牛肝菌交配系统研究

曹 旻, 方艺伟, 高 锋, 何明霞, 张春霞, 许欣景

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

摘 要:以人工栽培的暗褐网柄牛肝菌(*Phlebopus portentosus*)为试材, 观察其担孢子着生情况及细胞核数量, 并以三轮杂交试验对其交配系统进行研究。结果表明:暗褐网柄牛肝菌每个担子上着生 4 个担孢子, 每个担孢子内含有 1 个细胞核, 53 株单孢菌株按不同的交配型被分为 4 组, 分别包含 5、25、4、19 个菌株, 说明暗褐网柄牛肝菌属于四极性交配系统, 交配型受双因子控制。

关键词:暗褐网柄牛肝菌; 三轮杂交试验; 交配系统

中图分类号:Q 949.329⁺.7; S 646.7 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)24-0133-03

暗褐网柄牛肝菌(*Phlebopus portentosus* (Berk& Broome) Boedijn)属牛肝菌目小牛肝菌科(Boletinellaceae), 主要分布于泛热带地区, 包括我国的云南、四川、广西、海南等地, 国外的泰国、斯里兰卡、越南、印度尼西亚、澳大利亚、新西兰、非洲、墨西哥等地^[1-7]。暗褐网柄牛肝菌俗名“黑牛肝菌”, 其味道鲜美、营养丰富, 是云南海南及泰国北部最受欢迎的野生食用菌之一, 也是目前已知的唯一能够真正实现人工菇房栽培的可食用牛肝菌^[8-10]。暗褐网柄牛肝菌担孢子、菌丝体在实验室条件下能够萌发、生长、交配, 在菇房中经过约 3 个月时间的培养, 能够完成整个生活史, 形成子实体。

近年来, 有关该牛肝菌温室栽培、田间栽培方面的相关研究不断涌现^[11-14]。这些研究为该牛肝菌的产业化、规模化生产奠定了坚实的基础, 其商业化推广栽培指日可待。另一方面, 暗褐网柄牛肝菌能够实现在较短的周期内, 在人工温室的条件下完成有性世代的循环, 这对于研究其生活史过程中的各种环境因素, 获得足够的子代进行遗传学研究, 以及进行基因功能的验证都是十分有利的条件, 因此可以把它当作牛肝菌目的模式生物之一来研究。阐明其交配系统及交配行为特征, 是对其进行遗传学研究, 遗传育种及种质资源评价的重要前提。该试验初步研究了暗褐网柄牛肝菌交配系统的基本特征。

1 材料与方法

1.1 试验材料

暗褐网柄牛肝菌菌株编号 13013, 保存于云南省热带作物科学研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 暗褐网柄牛肝菌栽培出菇 暗褐网柄牛肝菌液体菌种、栽培种制备、覆土及出菇培养方法同文献^[11]。

1.2.2 担孢子着生情况及细胞核观察 选取成熟子实体菌褶部分, 显微观察担孢子着生情况。利用 DAPI 对担孢子进行染色, 并观察其细胞核数量。

1.2.3 担孢子收集 选择人工菇房中菌孔刚刚开始开放的暗褐网柄牛肝菌子实体, 利用预先灭菌的试管, 在无菌条件下选下部分菌盖, 使其粘于试管口处, 将试管置于无菌环境中静置过夜, 使担孢子自然弹射到试管底部, 约 24 h 后, 肉眼可见试管壁上及底部出现褐色担孢子印, 取出子实体块, 利用酒精灯火焰对试管口进行灭菌处理, 塞回棉塞, 完成担孢子收集。

1.2.4 孢子悬浮液预处理 在上述含有暗褐网柄牛肝菌担孢子的试管中加入 10 mL 无菌水, 制成孢子悬浮液, 置于 45 °C 培养箱中, 培养 48 h, 利用高温处理的方法对孢子悬浮液进行预处理。

1.2.5 孢子萌发培养 在无菌条件下将预处理过的孢子悬浮液稀释至 100 倍显微镜视野中有 10~20 个担孢子, 即可将其涂布于暗褐网柄牛肝菌担孢子萌发培养基, 置于 28 °C 培养, 至担孢子萌发。暗褐网柄牛肝菌担孢子萌发培养基配方及制作方法: 称取 200 g 红土壤, 200 g 去皮马铃薯, 加水煮沸 30 min 后, 纱布过滤, 加入葡萄糖 20 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ 1 g, 酵母膏浸提液 2 g, 琼脂粉 20 g, 加水定容至 1 000 mL, pH 自然, 121 °C 灭菌

第一作者简介:曹旻(1983-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为食用菌学。E-mail: caoyang8352@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31560008); 云南省科研院所技术开发专项资助项目(2015DC014); 中国科学院“西部之光”人才培养资助项目(326); 景洪市科技三项费资助项目(2013-46)。

收稿日期:2016-09-23

30 min,待其冷却至 60 ℃以下,但未凝固时,加入青霉素和链霉素,使其终浓度为 100 U · mL⁻¹,混匀后立即倒平板备用。

1.2.6 单孢菌株获得及检测 选取边缘整齐,小于 0.5 cm 的担孢子萌发菌落,在无菌条件下以接种针挑取,转接于 PDA 斜面培养基上,28 ℃培养,10 d 后在显微镜下观察是否有锁状联合,无锁状联合的即为单孢菌株。

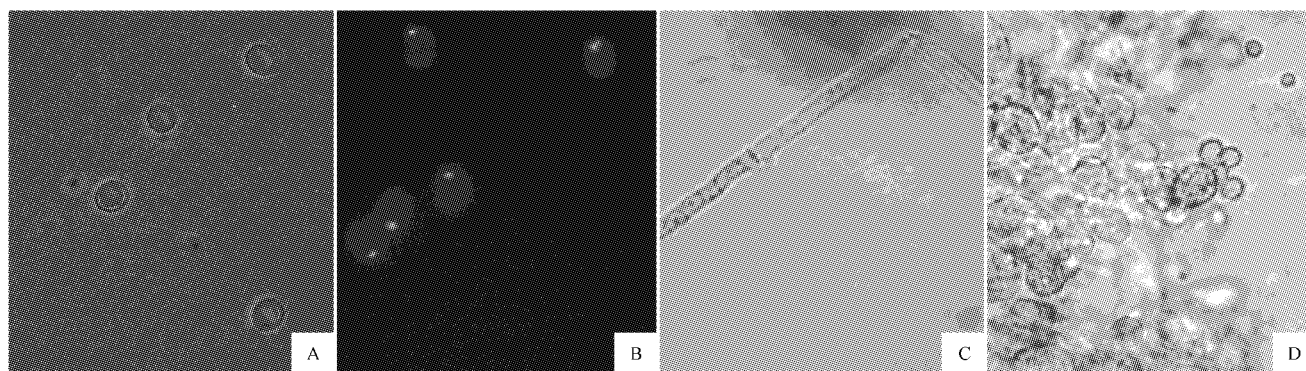
1.2.7 配对试验及交配型分析 在 PDA 平板培养基上相距约 1 cm 接种不同单孢菌株菌丝块,28 ℃培养,10 d

后在显微镜下观察 2 个菌落交界处是否有锁状联合(图 1),以确定交配情况。以 3 轮交配试验^[16-17]的结果来确定单孢菌株交配型。选取不同交配型单孢菌株对交配系统特征进行验证。

2 结果与分析

2.1 担孢子着生情况及细胞核数量

如图 1 所示,暗褐网柄牛肝菌每个担子上着生 4 个担孢子,每个担孢子内含有 1 个细胞核。初步推论,暗褐网柄牛肝菌的交配系统应为异宗配合交配系统。



注:A((400)和 B((1 000);担孢子;C((400);锁状联合;D((400);担子。

Note:A((400) and B((1 000);Basidiospores;C((400);Clamps;D((400);Basidia.

图 1 暗褐网柄牛肝菌担子、担孢子及锁状联合

Fig.1 Basidia,basidiospores and clamps of *P. portentosus*.

2.2 单孢菌株交配型确定

通过担孢子萌发、培养及分离,镜检无锁状联合,共获得 53 株单孢菌株,编号 DB1~DB53。

第一轮交配试验:随机选取菌株 DB20,与剩余 52 株单孢菌株进行配对试验,能够形成锁状联合的亲菌株共 5 株,其余 47 株不亲和。

第二轮交配试验:由上一轮亲和菌株中,随机选取菌株 DB53,与表现为 DB20 不亲和的 47 株菌及 DB20 本身进行配对试验,获得与 DB53 亲和的菌株共 25 株,其余 23 株不亲和。

第三轮交配试验:由上一轮不亲和的 23 株菌株中,随机选取菌株 DB22,与其余 22 株菌进行配对试验,获得与 DB22 亲和的菌株共 4 株,其余 19 株不亲和。

表 1 3 轮交配试验结果

Table 1 The results of three-cycle mating tests

	测试菌株编号 Tester strain	供试菌株 Tested strains	亲和菌株 Compatible strains	不亲和菌株 Incompatible strains
第一轮 First-cycle	DB20	52	5	47
第二轮 Second-cycle	DB53	48	25	23
第三轮 Third-cycle	DB22	22	4	19

经 3 轮交配试验,53 株暗褐网柄牛肝菌单孢菌株被分为 4 组,代表不同的交配型,分别包含 5、25、4、19 个菌株。该特征与四极性交配系统相符,其交配型受双因子控制。

2.3 交配系统特征验证

分别从每组单孢菌株中随机挑选出 2 个菌株,进行两两交配反应(表 2),验证了暗褐网柄牛肝菌属于四极性交配系统,交配型受双因子控制。

表 2 4 种类型单孢菌株两两配对试验

Table 2 Mating test between different types of monokaryons

供试菌株 Tested strains	DB17	DB12	DB43	DB51	DB7	DB14	DB4	DB24
DB17	—	+	+	—	—	—	—	—
DB12			+	+	—	—	—	—
DB43				—	—	—	—	—
DB51					—	—	—	—
DB7						—	+	+
DB14							+	+
DB4								—
DB24								

注:“+”表示亲和反应,“—”表示不亲和反应。

Note:‘+’ represents compatible mating reaction,‘—’ represents incompatible mating reaction.

3 讨论

担子菌大型真菌的子实体是有性生殖的产物,包括了质配、核配、减数分裂等过程,发生有性生殖的基础就是交配型的存在。担子菌的交配系统可分为同宗配合、异宗配合。同宗配合指的是单一担孢子萌发的菌丝即具有形成子实体的能力,其中初级同宗配合中担孢子为单细胞核(草菇等),次级同宗配合中担孢子含不同交配型的双细胞核(双孢菇等)。异宗配合指的是由不同担孢子萌发的,具有不同交配型因子的单倍体菌丝结合后才具有形成子实体的能力,交配型因子可为1个或2个,分别称为二极性交配系统(滑菇等)和四极性交配系统(香菇,金针菇等)。在很多担子菌中,菌丝体发生有性生殖的重要标志就是形成锁状联合,这是质配后所形成的双核菌丝的增殖方式。在暗褐网柄牛肝菌的双核菌丝体及子实体中,能观察到锁状联合的存在,其单孢子萌发的菌丝体中则观察不到锁状联合,且不能形成子实体。另外,其每个担子上着生4个担孢子,担孢子含单细胞核。由这些特征可初步推论,暗褐网柄牛肝菌的交配系统应为异宗配合,但应属于二极性交配系统还是四极性交配系统,还需要进一步试验验证。

由于担子菌的交配型因子在有性生殖中遵循孟德尔遗传定律,收集暗褐网柄牛肝菌同一子实体上产生担孢子,萌发获得单孢菌丝群体,进行配对杂交,检测锁状联合形成情况,即可确定其交配型因子的个数及交配系统类型。该试验运用3轮杂交试验,将获得的53株单孢菌株分为代表不同交配型的4组,符合四极性交配系统的特征,交配型受双因子控制。

在该研究中,不同交配型的单孢菌株数量分别为5、25、4、19株,不符合1:1:1:1的比例,这种交配因子的偏向性分布在其它的食用菌中也有报道^[17-18],但其机理尚有待进一步研究。

(该文作者还有王文兵、王云,单位同第一作者。)

参考文献

[1] 臧穆.我国东喜马拉雅及其邻区牛肝菌目的研究(续)[J].云南植物

研究,1986,8(1):1-22.

[2] 臧穆.中国真菌志[M].22卷.北京:科学出版社,2006.

[3] 杨祝良,臧穆.中国南部高等真菌的热带亲缘[J].云南植物研究,2003,25(2):129-144.

[4] HEINEMANN P, RAMMELOO J. Observations sur le genre *Phlebopus* (Boletineae)[J]. Mycotaxon, 1982(15):384-404.

[5] BARBARA P S. An annotated checklist of *Agarics* and *Boleti* recorded from New Zealand[J]. New Zealand Journal of Botany, 1987, 25(2):185-215.

[6] WATLING R. The relationships and possible distributional patterns of *Boletes* in South-East Asia[J]. Mycological Research, 2001, 105(12):1440-1448.

[7] BANDALA V M, MONTOYA L, JARVIO D. Two interesting records of *Boletes* found in coffee plantations in Eastern Mexico[J]. Persoonia, 2004, 18(3):365-380.

[8] 张春霞,纪开萍,何明霞,等.暗褐网柄牛肝菌子实体营养成分分析[J].云南大学学报(自然科学版),2010,32(6):702-704.

[9] JI K P, CAO Y, ZHANG C X, et al. Cultivation of *Phlebopus portentosus* in southern China[J]. Mycological Progress, 2011(10):293-300.

[10] SANMEE R, LUMYONG P, DELL B, et al. *In vitro* cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand[J]. Mycoscience, 2010, 51:15-22.

[11] 曹咏,纪开萍,刘静,等.瓶栽条件下覆土方法对暗褐网柄牛肝菌子实体生长的影响[J].食用菌学报,2010,17(3):29-32.

[12] 曹咏,纪开萍,刘静,等.不同覆土的性质及其对暗褐网柄牛肝菌人工栽培出菇的影响[J].食用菌学报,2011,18(4):25-27.

[13] 刘静,王文兵,纪开萍,等.覆土层中细菌对暗褐网柄牛肝菌子实体生长的影响[J].微生物学通报,2012,39(11):1622-1628.

[14] 王文兵,曹咏,纪开萍,等.覆土中放线菌对暗褐网柄牛肝菌出菇的影响[J].中国食用菌,2013,32(2):36-38.

[15] 季哲,李玉祥,薛淑玉.黄伞的交配型性状研究[J].菌物学报,2004,23(1):38-42.

[16] 董洪新,蔡德华,李玉.猪肚菇担孢子交配型的分析[J].微生物学通报,2010,37(11):1617-1620.

[17] 汪虹,曹晖.大球盖菇交配系统的研究[J].食用菌学报,2006,13(2):9-11.

[18] 王守现,刘宇,耿小丽,等.长根菇交配系统研究[J].安徽农业科学,2009,37(26):12547-12548.

Study on Mating System on *Phlebopus portentosus*

CAO Yang, FANG Yiwei, GAO Feng, HE Mingxia, ZHANG Chunxia, XU Xinjing, WANG Wenbing, WANG Yun
(Yunnan Institute for Tropical Crop Research, Jinghong, Yunnan 666100)

Abstract: The insertion of basidiospores and number of nuclei was observed in artificially cultivated *Phlebopus portentosus*, and the three-cycle mating tests were used to preliminarily study its mating system. The results showed that, each basidia produced 4 basidiospores, and each basidiospore contained only one nucleus. 53 monokaryon strains were divided into four groups according to different mating types containing 5, 25, 4 and 19 strains respectively. These results indicated that *P. portentosus* has a tetrapolar heterothallism mating system under control of two genetic factors.

Keywords: *Phlebopus portentosus*; three-cycle mating tests; mating system