

新型 ISSR 分子标记鉴别香菇双单杂合子

吴圣进, 张芳芳, 陈雪凤, 刘增亮, 张雯龙

广西壮族自治区农业科学院微生物研究所, 广西南宁 530007

摘要: 杂合子的鉴别是香菇杂交育种中的关键步骤, 为了快速准确地鉴别香菇双单杂交后代, 本研究设计一种基于区分供体亲本双核的新型 ISSR 分子标记技术, 采用该技术对香菇野生双核菌株 YX7 为供体和菌株 808 孢子单核体为受体杂交获得的 40 个杂交菌株进行鉴别, 并以传统的显微观察与拮抗试验和传统 ISSR 分子标记技术为对照。新型 ISSR 分析结果表明: 仅拥有供体菌株 YX7 一个核的特异性条带的菌株有 27 个, 可判定为杂合子; 其余 13 个菌株均判定为非杂合子, 其中有 11 个菌株同时拥有供体菌株 YX7 两个核的特异性条带, 是菌株 YX7 自身; 有 2 个菌株不含供体菌株 YX7 两个核的任何特异性条带, 属于菌株 808 的孢子单核体。与传统显微观察和拮抗试验方法相比, 新型 ISSR 技术鉴定出的杂合子菌株更全面, 不仅包含前者鉴定出的全部 19 个杂合子, 还包括其无法判断的菌株 6 个和错判为非杂合子的菌株 2 个。新型 ISSR 技术采用单个引物就可确定全部 27 个杂合子菌株和 13 个非杂合子菌株, 并能根据导入的供体细胞核类别将杂合子归为 2 类, 而传统 ISSR 技术需采用 4 个引物才能鉴别出 27 个杂合子, 并且不能确定剩余 13 个菌株为非杂合子, 也不能对杂合子进行分类。综上, 新型 ISSR 技术能更快速、全面和精准鉴别香菇双单杂交菌株的杂合子和非杂合子, 可为香菇杂交选育和遗传分析提供技术支撑。

关键词: 香菇; 新型 ISSR; 双单杂交; 杂合子; 分子鉴别

中图分类号: S961.6 文献标识码: A

Identification of the Di-Mon Mating Heterozygote in *Lentinula edodes* Using a New ISSR Technique

WU Shengjin, ZHANG Fangfang, CHEN Xuefeng, LIU Zengliang, ZHANG Wenlong

Institute of Microbiology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

Abstract: Identification of heterozygote is a key step in the cross breeding of *Lentinula edodes*. A new ISSR technique (N-ISSR) was designed in this study based on discrimination between the two nucleus of the donor strain to identify quickly and accurately the authenticity of hybrid strains of *L. edodes*. The new ISSR was used to identify 40 hybrid strains which were from the Di-mon mating between dikaryon wild strain YX7 and spore monokaryons of cultivated strain 808, as well as microscopy observation combined with antagonistic test (MOCAT) and the traditional ISSR technique (T-ISSR) as the control. N-ISSR results showed 27 strains were confirmed to be true heterozygote as they possessed specific DNA bands from one of the nucleus of donor strain YX7, and the other 13 strains were confirmed to not be heterozygote. Among them, 11 strains were strain YX7 itself as they possessed both specific DNA bands from the two nucleus of strain YX7, and 2 strains were spore monokaryons of strain 808 as they had no any specific DNA bands of donor strain YX7. Compared with MOCAT, N-ISSR could thorough identify all the 27 heterozygote strains, which included the 19 strains identified as heterozygote, the 6 strains unable to be identified and 2 strains incorrectly identified as non-heterozygote by MOCAT. N-ISSR could identify all the 27 heterozygote stains and 13 non-heterozygote stains with simple primer, and could classify the heterozygote strains into two groups according to the type of nucleus received from the donor. On contrast, T-ISSR needed 4 primers to identify all the 27 heterozygote strains, and was unable to con-

收稿日期 2022-05-25; 修回日期 2022-06-14

基金项目 广西科技计划项目(桂科 AB21196069); 广西特色作物试验站建设专项(No. TS202115); 国家现代农业产业技术体系广西食用菌创新团队建设专项(No. Nycytxgxcxtid-2021-07-02)。

作者简介 吴圣进(1973—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食用菌育种与栽培, E-mail: gxwusj@126.com。

firm the other 13 stains as non-heterozygote stains, and was unable to classify the heterozygote strains into two groups. In conclusion, N-ISSR was an effective tool to be used for fast, extensive and accurate identification of heterozygote and non-heterozygote strains of *L. edodes*, and would be a technical support for further study on the cross breeding and genetic analysis of *L. edodes*.

Keywords: *Lentinula edodes*; new ISSR; di-mon mating; heterozygote; molecular identification

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.03.004

香菇是我国传统的菜肴，其味道鲜美、营养丰富，深受人们的喜爱。香菇的人工栽培历史悠久，近 20 年得到迅猛发展，已成为我国栽培规模最大的食用菌品种，年产量达 900 多万 t^[1]。我国培育出的优良香菇品种不断增长，为香菇产业的快速发展做出了卓越贡献^[2]。

香菇杂交育种是其新品种选育中最常用、最有效的技术手段，主要包括单单杂交与双单杂交 2 种方法。双单杂交是以 2 个亲本中的一个亲本的单核体作为受体，以能提供所需优良性状的另一个亲本双核菌株为供体，其一个核进入受体细胞完成配对的非对称杂交方法。双单杂交具有杂交后代筛选工作量相对少、育种周期相对短等优点，从而被广泛应用^[3-6]。

杂交后代的鉴定筛选是香菇杂交育种过程中的关键步骤之一，传统方法通过拮抗试验和显微观察菌丝是否存在锁状联合结构进行判别，非常费时、费工，而且效率低、误判率高。随着分子生物技术的快速发展，分子标记技术被越来越多的应用于食用菌杂交育种中，其中 ISSR (inter-simple sequence repeat) 作为一种常用的分子标记，具有稳定性好、可重复性高、引物通用等优点，被广泛应用于食用菌的遗传差异分析^[7-9]。ISSR 标记已成功应用于香菇单孢杂交后代的分析，王丽宁等^[10]应用 ISSR 标记分析耐高温的香菇单孢杂交子时，发现与亲本存在一定遗传差异；宋莹等^[11]利用 ISSR 标记分析发现，香菇单孢杂交菌株 0912 同时含有 2 个香菇亲本菌株的特异性条带，从而判定 0912 为两亲本的杂交后代；陈世通等^[12]利用 ISSR 标记成功从 84 个香菇单孢杂交菌株中筛选出 45 个真正的杂合子。本研究将 ISSR 分子标记技术拓展应用于香菇双单杂交后代的鉴别筛选，同时通过区分供体核对杂交子进行归类分组，以期对香菇优异单核体菌株材料的创制和筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

香菇亲本菌株 808 和 YX7 均由广西壮族自治区

农业科学院微生物研究所提供。菌株 808 是广西推广栽培品种，具有外观品质好，栽培产量高等优良性状；菌株 YX7 是广西农业科学院微生物研究所分离驯化自广西野生香菇的菌株，具有较耐高温、香味浓、出菇早等优良性状。PDA 培养基：去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1000 mL。

1.2 方法

1.2.1 孢子单核体菌株的获取 亲本香菇菌株 808 栽培出菇后，选择菇形圆整、开伞七八分的子实体，在无菌环境下采集孢子。采用稀释涂板法分离单孢子^[10,13]，菌丝萌发并纯化一次后，显微镜检测 3 次无锁状联合结构的判定为单孢菌株，试管培养保存备用。

1.2.2 双单杂交及杂交菌株的获得 参照程爽爽等^[14]的方法，将分离自菌株 808 的不同孢子单核体菌株，分别与供体亲本双核菌株 YX7 同时接种到 PDA 平板上进行两两配对杂交，两菌株接种点相距 1.5 cm，于 25℃ 下培养 15 d，挑取单核体菌株远离供体亲本菌株一边的菌丝块接种于新的 PDA 平板上纯化 2 次，保存，作为候选杂交菌株。

1.2.3 杂交子的镜检和拮抗试验 挑取候选杂交菌株菌落边缘不同部位菌丝，置于显微镜下观察是否存在锁状联合结构。同时挑取候选杂交菌株菌丝块，接种于新的 PDA 平板上，分别与 2 个亲本菌株对峙，于 25℃ 下培养 15 d，观察候选杂交菌株与两亲本菌株的拮抗反应情况。

1.2.4 ISSR 分析 将亲本菌株和候选杂交菌株分别接种至铺有玻璃纸的 PDA 平板上，于 25℃ 下培养 10 d，收集菌丝，采用吴圣进等^[9]的方法提取基因组总 DNA。ISSR-PCR 反应体系为：2×Taq PCR MasterMix 10 μL，Primer 1 μL (10 μmol/L)，模板 DNA 1 μL (150 ng)，ddH₂O 8 μL。PCR 反应条件：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，按表 1 所列退火温度下复性 45 s，72℃ 延伸 90 s，循环 35 次；72℃ 延伸 7 min，4℃ 保存。扩增产物采用含有 GelRed 染料的 1.0% 琼脂糖凝

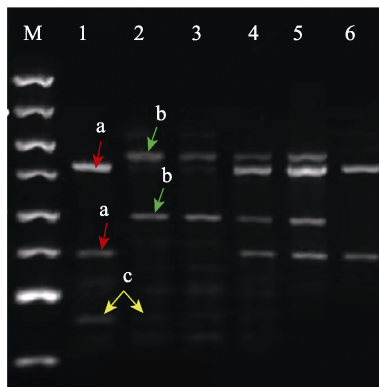
胶电泳, 并于凝胶成像系统中观察拍照。

表 1 供试 ISSR 引物及其退火温度

Tab. 1 ISSR primers and their denatured temperature used

编号 Code	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 $T_m/^\circ\text{C}$
P1	AGAGAGAGAGAGAGAGT	54
P2	ACACACACACACACT	54
P4	ACACACACACACACC	56
P9	VHVGTTGTGTGTGTGTGT	54

1.2.5 ISSR 综合分析 首先比较 2 个亲本菌株间的条带 (图 1), 相同 ISSR 引物下, 2 个亲本菌株的 PCR 电泳条带中, 仅菌株 808 拥有的 DNA 条带为该菌株的特异性条带 (图 1 中的箭头 a 所示条带); 与此相同, 仅菌株 YX7 拥有的 DNA 条带则为菌株 YX7 的特异性条带 (图 1 中的箭头 b 所示条带); 相同大小位置, 菌株 YX7 和 808 都有的 DNA 条带设为共同条带 (图 1 中的箭头 c 所示条带)。检测记录每个杂交子菌株的电泳图谱是 (标记为●) 否 (标记为○) 存在上述 3 类条带。如图 1 中杂交菌株 1、2 和 7 拥有 3 类条带 (菌株 808 和菌株 YX7 特异性条带、共同条带) 情况分别标记为: ○●●、●●●和●○○。将同一杂交菌株不同引物的结果进行综合分析, 同一类型条带只要有一个引物的结果为●, 则该类型条带综合结果标记为●, 若所有引物的结果均为○, 则该杂交菌株该类型条带综合结果标记为○。



M: DNA marker S plus (100-5000 bp); 1: 亲本菌株 808; 2: 亲本菌株 YX7; 3-6: 杂交菌株 1、2、3 和 7; 箭头 a 和 b 分别为亲本菌株 808 和 YX7 的特异性条带, c 为两亲本共同条带。

M: DNA marker S plus (100-5000 bp); 1: Parent strain 808; 2: Parent strain YX7; 3-6: Hybrid strain 1, 2, 3, 7; Arrow a and b: Specific bands of parent strain 808 and YX7; Arrow c: Common bands of both parent strains.

图 1 基于引物 P9 的香菇菌株 ISSR 图谱

Fig. 1 ISSR pattern of *L. edodes* strains amplified by primer P9

2 结果与分析

2.1 双单杂交子的镜检和拮抗测试

随机挑取 40 个杂交菌株进行显微检测和与 2 个亲本菌株的拮抗测试 (表 2)。显微检测结果表明, 40 个杂交菌株中共有 36 个菌株检测出锁状联合结构, 这些菌株可鉴定为双核菌株, 剩余 4 个杂交菌株未检测出锁状联合结构, 其可能是单核菌株, 初步鉴定为非杂合子。拮抗测试结果表明, 与 2 个亲本菌株的拮抗反应均明显的杂交菌株共有 19 个, 可初步鉴定为杂合子。对 2 个亲本菌株均有拮抗反应, 但拮抗反应不明显的杂交菌株共有 5 个; 与亲本无拮抗反应的杂交菌株共有 16 个。不明显的拮抗反应与无拮抗反应二者较难区分, 如菌株 808 自身应无拮抗的菌落间也有不明显的沟痕, 菌株 YX7 自身应无拮抗的菌落间也有细微隆起 (图 2)。因此, 菌株 15 与 YX7 的菌落间有不明显的沟痕, 本研究判断为不拮抗, 菌株 47 与 808 菌落间有不明显隆起而判断为轻微拮抗, 菌株 24 与 YX7、菌株 49 与 808 菌落间明显隆起而判断为明显拮抗。可见, 拮抗反应的判断具有主观性, 存在误判的可能。19 个与亲本均拮抗明显的杂交菌株同时检测出锁状结构, 可确定为杂合子, 分别是菌株 2、3、7、8、9、13、23、24、31、34、35m、38、39、42、46、52、57、66 和 67。与亲本拮抗不明显的 5 个杂交菌株中, 菌株 1、52e 和 68 检测有锁状结构, 菌株 47 和 79 未检测出锁状结构。与亲本不拮抗的 16 个杂交菌株中, 菌株 15、36m、36e、37m、37e、49、52m、58m、58e、60、70、70e、74 和 78 共 14 个菌株存在锁状结构, 菌株 56m 和 73 未检测出锁状联合结构。

2.2 传统 ISSR 多引物综合分析双单杂交菌株

采用 P1、P2、P4 和 P9 引物的 ISSR 数据对选用的 40 个香菇杂交子菌株进行综合分析 (表 3)。40 个杂交菌株中, 27 个杂交菌株 2、3、7、8、9、13、23、24、31、34、35m、37m、37e、38、39、42、46、47、52、52e、57、58e、66、67、70、70e 和 79 均具有两亲本的特异性条带, 确定为杂合子; 13 个杂交菌株 1、15、36m、36e、52m、49、56m、58m、60、68、73、74 和 78 仅有单个亲本菌株的特异性条带, 不能确定为真正的杂合子, 但它们均具有两亲本的共同条带, 由于共同条带无法确定源自哪个亲本, 因此也不能排除它们为杂合子的可能性。

表 2 杂交菌株锁状联合和与亲本的拮抗反应情况
Tab. 2 Results of examination of clamp connection and antagonism test on hybrid strains

菌株号 Strain No.	拮抗反应 Antagonistic reaction		锁状联合 Clamp connection	菌株号 Strain No.	拮抗反应 Antagonistic reaction		锁状联合 Clamp connection
	808	YX7			808	YX7	
	1	++			+	有	
2	++	++	有	47	+	+	无
3	++	++	有	52m	++	-	有
7	++	++	有	52e	+	+	有
8	++	++	有	49	++	-	有
9	++	++	有	57	++	++	有
13	++	++	有	58m	++	-	有
15	++	-	有	58e	+	-	有
23	++	++	有	60	++	-	有
24	++	++	有	66	++	++	有
31	++	++	有	67	++	++	有
34	++	++	有	70	+	-	有
35m	++	++	有	68	++	+	有
36m	++	-	有	70e	+	-	有
36e	++	-	有	73	-	+	无
37m	+	-	有	74	++	-	有
37e	+	-	有	78	++	-	有
38	++	++	有	79	+	+	无
39	++	++	有	52	++	++	有
42	++	++	有	56m	-	+	无

注：++为明显拮抗，+为不明显拮抗，-为无拮抗。

Note: ++ represents obvious antagonistic reaction, + represents obscure antagonistic reaction, - represents no antagonistic reaction.

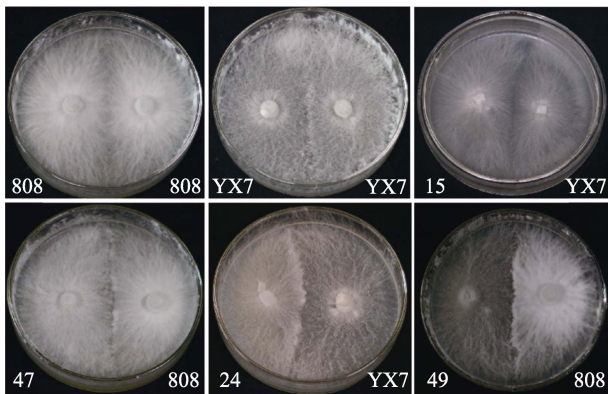


图 2 香菇杂交菌株与亲本菌株间的不同拮抗反应
Fig. 2 Different antagonistic reaction between hybrid strains and parent strains of *L. edodes*

2.3 新型 ISSR 技术单引物鉴别分析双单杂交菌株

新型 ISSR 技术采用筛选出的单个引物 P1，该引物能扩增出供体菌株 YX7 的 d、e 和 f3 条特异性条带（图 3），其中 f 条带在所有杂交菌株中均有出现，而 d 和 e 条带则分别出现在不同的杂

交菌株中。说明 f 条带位点同时分布在供体亲本菌株 YX7 的 2 个细胞核中，而 d 和 e 条带位点则分别分布在菌株 YX7 的 2 个细胞核中。因此，根据电泳图谱可将待测菌株分成 4 类，第 1 类为拥有 d 特异性条带的杂合子（图 3 中的菌株 2、3、13、23 和 31），第 2 类为拥有 e 特异性条带的杂合子（图 3 中的菌株 7、24、34、39 和 42），第 3 类为同时拥有 d 和 e 条带的非杂合子（图 3 中的菌株 1、49 和 52m），第 4 类为 d 和 e 条带都没有的非杂合子（图 3 中菌株 56m）。第 3 类非杂合子可能是误挑取的供体亲本菌株 YX7 本身，第 4 类非杂合子则是未获得供体核的 808 孢子单核体。

研究结果表明，40 个待测菌株中共有 27 个为杂合子，其中拥有 d 条带的杂合子为菌株 2、3、9、13、23、31、35m、37m、37e、38、46、52e、57、58e、66、67、70、70e 和 79，拥有 e 条带的杂合子为菌株 7、8、24、34、39、42、47、和 52。11 个菌株 1、15、36m、36e、49、52m、58m、60、68、74 和 78 为误挑取的供体亲本 YX7 双核

表 3 杂交菌株的特异性 ISSR 条带分析
Tab. 3 Analysis on specific ISSR bands of hybrid strains

菌株号 Strain No.	P1			P2			P4			P9			综合结果 Comprehensive result		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	○	●	●	○	●	○	○	●	○	●	○	○	○	●	●
2	○	●	●	●	●	○	●	●	○	●	●	○	●	●	●
3	○	●	●	●	●	○	●	●	○	●	●	○	●	●	●
7	●	●	●	●	○	○	●	●	○	●	○	○	●	●	●
8	○	●	●	●	○	○	●	●	○	●	○	○	●	●	●
9	○	●	●	●	●	○	●	●	○	●	●	○	●	●	●
13	●	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	●
15	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
23	●	●	●	●	●	○	●	●	○	○	●	○	●	●	●
24	●	●	●	○	●	○	○	●	○	●	○	○	●	●	●
31	○	●	○	●	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	○
34	●	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	●	●	●	●
35m	○	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	●
36m	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
36e	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
37m	○	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	●
37e	○	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	●
38	●	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	○	●	●	○
39	●	●	●	●	●	○	○	●	○	●	○	○	●	●	●
42	●	●	●	●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	●
46	○	●	●	●	●	○	●	○	○	●	●	○	●	●	●
47	●	●	●	○	●	○	●	●	○	●	○	○	●	●	●
52	○	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	●
52m	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
52e	○	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	●
49	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
56m	●	○	●	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	○	●
57	○	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	●
58m	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
58e	●	●	●	●	●	○	○	●	○	○	●	○	●	●	●
60	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
66	○	●	○	●	●	○	●	●	○	●	●	○	●	●	○
67	○	●	●	○	●	○	○	●	○	●	●	○	●	●	●
70	●	●	●	●	●	○	●	●	○	●	●	○	●	●	●
68	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	●	○	●	●
70e	●	●	●	●	●	○	●	●	○	●	●	○	●	●	●
73	●	○	●	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	○	●
74	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
78	○	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	○	●	●
79	●	●	●	○	●	○	○	●	○	○	●	○	●	●	●

注: a 代表菌株 808 的特异性条带, b 代表菌株 YX7 的特异性条带, c 代表两菌株的共同条带。
Note: a represents specific bands of strain 808, b represents specific bands of strain YX7, c represents common bands of both strains.



M: DNA marker S plus (100~5000 bp); 1: 亲本菌株 808; 2: 亲本菌株 YX7; 3~16: 杂交菌株 1、2、3、7、13、23、24、31、34、39、42、49、52m 和 56m。
M: DNA marker S plus (100-5000 bp); 1: Parent strain 808; 2: Parent strain YX7; 3~16: Hybrid strains 1, 2, 3, 7, 13, 23, 24, 31, 34, 39, 42, 49, 52m and 56m, respectively.

图 3 基于引物 P1 的香菇部分杂交菌株的 ISSR 图谱
Fig. 3 ISSR pattern of partial hybrid strains of *L. edodes* amplified by primer P1

菌株；菌株 56m 和 73 则为未杂交成功的 808 孢子单核体菌株。

3 讨论

菌丝存在锁状联合和与两亲本存在拮抗反应，是鉴别异宗结合食用菌如姬菇^[15]、杏鲍菇^[16]、金针菇^[17]、香菇^[6]等品种杂交后代的最常用方法。本研究中，40 个杂交菌株中有 19 个菌株同时与两亲本具有明显的拮抗反应并具有锁状联合，可以确定是杂合子。但也有存在锁状联合结构而与亲本拮抗反应不明显或无拮抗反应的情况，如菌株 1、52e、68、15、36m、36e、37m、37e、49、52m、58m、58e、60、70、70e、74、78 等。由于挑取双单杂交后代时有可能取到双核亲本的菌丝，它们具有锁状联合结构，而自身又存在轻微拮抗反应，此时很容易将这些非杂合子误判为杂合子，所以有锁状联合但与亲本存在不拮抗或拮抗不明显的菌株还有待进一步的检测确定。菌株 47 和 79 未检测出锁状联合，但与两亲本均有轻微拮抗反应，这也有待于进一步检测，以免因锁状联合未被发现导致将杂合子误判为非杂合子。可见，传统的锁状联合和拮抗反应观测结果只能确定部分杂合子，尚有许多不能确定的菌株，而且容易产生误判。

为确保杂合子鉴别的准确性和高效率，分子标记技术被越来越多应用于杂交子的鉴定。王丽宁等^[10]和宋春艳等^[18]分别采用传统 ISSR 和

RAPD 分子标记技术比较香菇杂交子与亲本间的遗传差异，但由于孢子与亲本本身存在遗传差异，不能根据杂交子与亲本存在遗传差异而判断其为杂合子。陈世通等^[12]通过筛选出 ISSR 引物 6，将香菇单杂交菌株中同时拥有 2 个亲本的特异性条带的菌株成功判断为杂合子。但传统 ISSR 技术需要多个引物进行分析比较才能辨识出尽可能多的杂合子，而仅凭单个或少数引物的结果则有可能使部分杂合子不被辨识。本研究采用多个引物对香菇双单杂交菌株进行传统 ISSR 分析，根据杂交菌株是否拥有两亲本特异性条带判断其是否为杂合子，结果发现，部分菌株（如菌株 8）单个引物（如 P1、P2 或 P9）的 ISSR 图谱仅有一个亲本的特异性条带，不能被标识为杂合子，但综合多个引物的结果则同时拥有两亲本特异性条带，可判断为杂合子。可见，增加引物数量可提高传统 ISSR 技术对杂合子的辨识率。本研究采用 4 个引物对待检杂交菌株进行传统 ISSR 分析，结果从 40 个杂交菌株中共辨识出 27 个杂合子菌株，仍有 13 个菌株尚无法判断是杂合子还是非杂合子。可见，传统 ISSR 技术判断出的杂合子具有较高的准确性，但无法判断非杂合子菌株。

双单杂交的供体是双核菌株，其 2 个核的基因型是固定的，杂交时单核体只能接受其中一个核形成新的杂合子，不同杂合子接受到的核只有 2 种，它们受单核体基因型的控制^[3]。因此，可通过标记区分供体 2 个细胞核，对杂合子进行鉴定。本研究构建了一种新型 ISSR 分子标记技术鉴别香菇双单杂交杂合子，该技术利用单个引物（P1）可扩增出双单杂交中供体亲本菌株的 2 个细胞核的特异性条带，拥有其中任意一条特异性条带的杂交菌株可判断为杂合子，无特异性条带或同时拥有 2 个细胞核的特异性条带的杂交菌株均可判断为非杂合子。本研究结果表明，新型 ISSR 分子技术从 40 个杂交菌株中检测出 27 个菌株为杂合子，检测出的杂合子菌株与传统 ISSR 方法检测的结果完全一致，同时确定其余 13 个菌株为非杂合子。27 个杂合子中，有 19 个杂合子接受了供体相同的一个细胞核，另外 8 个杂合子则接受了供体的另外一个细胞核，从而可将杂合子分为 2 类，有利于后续的农艺性状定位和遗传分析。

与传统显微观察与拮抗试验方法相比，新型 ISSR 技术可鉴定出待检菌株中的全部 27 个杂合子菌株，而传统显微观测与拮抗试验方法只能确

定 19 个菌株为杂合子;传统方法容易将有锁状联合但无拮抗或拮抗不明显的菌株(如菌株 52e、37m、37e、58e、70 和 70e),以及未检测出锁状联合的菌株(如菌株 47 和 79)误判为非杂合子,而新型 ISSR 技术可准确鉴定它们为杂合子,菌株 47 和 79 未检测出锁状联合可能是显微检测时视野数量不够多所致;传统方法有时也容易将非杂合子误判为杂合子,如菌株 1 与 808 有明显拮抗,与 YX7 有轻微拮抗,且菌丝有锁状联合,按传统方法判断应为杂合子,但新型 ISSR 技术结果表明,菌株 1 同时具有供体 2 个核的特异性条带,为 YX7 自身而非杂合子。可见,新型 ISSR 分子技术可以完美解决传统显微观察和拮抗试验对杂合子鉴别结果不够全面和容易产生误判的问题。

与传统 ISSR 技术相比,新型 ISSR 技术采用单个引物就可确定全部 27 个杂合子菌株,而传统 ISSR 技术需采用 4 个引物才能鉴别出 27 个杂合子。新型 ISSR 技术可确定剩余 13 个菌株为非杂合子,其中有 11 个菌株(分别为 1、15、36m、36e、49、52m、58m、60、68、74 和 78)同时拥有供体亲本 2 个核的特异性条带,说明它们是供体菌株 YX7 本身,可能是挑取菌丝时误取到供体菌丝所致;另外 2 个非杂合子菌株 56m 和 73 不拥有供体任一核的特异性条带,说明是受体菌株 808 的孢子单核体。而传统 ISSR 技术则无法确定剩余 13 个菌株为杂合子还是非杂合子,更无法解释非杂合子的来源。新型 ISSR 技术能根据导入的供体细胞核类别将杂合子归为 2 类,而传统 ISSR 则不能对杂合子进行分类。

综上所述,基于供体亲本菌株双核特异性条带的单引物新型 ISSR 分子标记技术可准确鉴别待测菌株是杂合子还是非杂合子,解决了传统显微观察和拮抗试验方法效率低、准确性差的问题,同时解决了传统 ISSR 技术需要采用多引物而程序复杂、杂合子鉴别结果全面性不确定、无法判定非杂合子、不能对杂合子归类的问题,是一种简便、快速和有效的香菇双单杂交后代鉴定技术。该技术不仅可运用在香菇杂交育种中,还可拓展到其他食用菌品种的杂交育种中,缺点是不能用于单单杂交中的杂合子鉴别。

参考文献

[1] 赵春艳,陈旭,董娇,邵丽梅. 2015~2018 年我国食用菌产

量和品种概况分析[J]. 中国食用菌, 2021, 40(2): 101-105.
ZHAO C Y, CHEN X, DONG J, TAI L M. An analysis on Chinese edible fungi yield and varieties distribution from 2015 to 2018[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(2): 101-105. (in Chinese)

[2] 谭琦,潘迎捷,黄为一. 中国香菇育种的发展历程[J]. 食用菌学报, 2000, 7(4): 48-52.

TAN Q, PAN Y J, HUANG W Y. The development process of *Lentinula edodes* breeding in China[J]. Acta Edulis Fungi, 2000, 7(4): 48-52. (in Chinese)

[3] 叶明,潘迎捷,陈永萱. 香菇完全亲和双单杂交及其先导核的验证[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(3): 37-40.

YE M, PAN Y J, CHEN Y X. The full compatible di-mon mating and verification of the pre-entrance nucleus in *Lentinula edodes*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1999, 22(3): 37-40. (in Chinese)

[4] 叶明,潘迎捷,马桂荣,陈咏萱. 香菇正反双单杂交后代的遗传分析[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 94-99.

YE M, PAN Y J, MA G R, CHEN Y X. Genetic analysis of the hybrids of the positive and negative di-mon mating in *Lentinula edodes*[J]. Mycosystema, 2001, 20(1): 94-99. (in Chinese)

[5] 叶明,叶生梅,马桂荣,严培兰,贺东梅,潘迎捷. 香菇不同供体双单杂交育种研究[J]. 中国食用菌, 2002, 21(5): 3-4.

YE M, YE S M, MA G R, YAN P L, HE D M, PAN Y J. Study on di-mon mating breeding from the different donors in *Lentinula edodes*[J]. Edible Fungi of China, 2002, 21(5): 3-4. (in Chinese)

[6] 赵研,王丽宁,蒋俊,陈明杰. 利用杂交方法选育香菇耐高温菌株[J]. 分子植物育种, 2016, 14(11): 3145-3153.

ZHAO Y, WANG L N, JIANG J, CHEN M J. Breeding thermo-tolerant strains of xianggu mushroom (*Lentinula edodes*) by hybridization method[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(11): 3145-3153. (in Chinese)

[7] 孟虎,孙国琴,睢韡,石爱霞. ISSR 技术在食用菌研究上的应用[J]. 北方园艺, 2016, 40(5): 207-210.

MENG H, SUN G Q, SUI W, SHI A X. The application of ISSR in edible fungi research[J]. Northern Horticulture, 2016, 40(5): 207-210. (in Chinese)

[8] 韦仕岩,吴圣进,汪茜,王灿琴. 草菇菌株的 ISSR 遗传差异分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(11): 2209-2213.

WEI S Y, WU S J, WANG Q, WANG C Q. Genetic variation of *Volvariella volvacea* strains revealed by ISSR analysis[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(11): 2209-2213. (in Chinese)

[9] 吴圣进,陈雪凤,王灿琴,苏启臣,韦仕岩,吴小建,郎宁,蓝桃菊. 广西云耳菌株的遗传差异分析[J]. 热带作物学报,

- 2020, 41(5): 921-928.
- WU S J, CHEN X F, WANG C Q, SU Q C, WEI S Y, WU X J, LANG N, LAN T J. Genetic variation of *Auricularia heimuer* strains in Guangxi[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(5): 921-928. (in Chinese)
- [10] 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, 35(4): 35-39.
- WANG L N, ZHAO Y, CHEN M J. Monospore cross-breeding of xianggu mushroom (*Lentinula edodes*) & ISSR analysis of thermo-tolerant hybrid[J]. Journal of Microbiology, 2015, 35(4): 35-39. (in Chinese)
- [11] 宋莹, 张忠伟, 刘俊杰, 肖千明, 张季军. ISSR 分子标记鉴定香菇杂交菌株试验[J]. 食用菌, 2015, 37(3): 12-13.
- SONG Y, ZHANG Z W, LIU J J, XIAO Q M, ZHANG J J. Molecular identification of *Lentinula edodes* hybrid by ISSR[J]. Edible Fungi, 2015, 37(3): 12-13. (in Chinese)
- [12] 陈世通, 白建波, 李梦杰, 李荣春. 香菇单孢杂交及杂合子鉴定的研究[J]. 中国食用菌, 2013, 32(1): 45-46.
- CHEN S T, BAI J B, LI M J, LI R C. Study on monospore cross and identification of heterozygotes of shiitake[J]. Edible Fungi of China, 2013, 32(1): 45-46. (in Chinese)
- [13] 陈英南, 姜涛, 张忠伟. 香菇单孢子杂交育种[J]. 特种经济动植物, 2008, 11(7): 46.
- CHEN Y N, JIANG T, ZHANG Z W. Monospore cross breeding of *Lentinula edodes*[J]. Special Economic Animal and Plant, 2008, 11(7): 46. (in Chinese)
- [14] 程爽爽, 杜双田, 张姣, 舒斌, 高昱昕. 香菇 9608 与一株野生香菇单双杂交及优良杂交菌株筛选[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(5): 57-65.
- CHENG S S, DU S T, ZHANG J, SHU B, GAO Y X. Single-double cross hybridization between *Lentinula edodes* 9608 and a wild strain and selection of excellent hybrid strains[J]. Journal of Shanxi Agriculture University (Natural Science Edition), 2020, 40(5): 57-65. (in Chinese)
- [15] 谭伟, 周洁, 曹雪莲, 苗人云, 贾定洪, 黄忠乾, 甘炳成, 彭卫红, 郑林用. 姬菇 258 和金凤 2-1 杂交构建姬菇新菌株[J]. 西南农业学报, 2015, 28(6): 2655-2660.
- TAN W, ZHOU J, CAO X L, MIAO R Y, JIA D H, HUANG Z Q, GAN B C, PENG W H, ZHENG L Y. Hybrid strains breeding by *Pleurotus cornucopiae* No. 258 and *Pleurotus* sp. Jinfeng 2-1[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(6): 2655-2660. (in Chinese)
- [16] 周云, 朱婧, 郑雪平, 吴金男, 姚璐晔, 冀宏. 杏鲍菇工厂化栽培品种杂交育种研究[J]. 北方园艺, 2010(24): 189-193.
- ZHOU Y, ZHU J, ZHENG X P, WU J N, YAO L Y, JI H. Breeding new strain of *Pleurotus eryngii* suitable for cultivation in industry by hybridization[J]. Northern Horticulture, 2010(24): 189-193. (in Chinese)
- [17] 徐珍, 尚晓冬, 郭倩, 王瑞娟, 李玉, 谭琦. 早熟金针菇新品种 G1 的杂交选育[J]. 食用菌学报, 2009, 16(4): 20-22.
- XU Z, SHANG X D, GUO Q, WANG R J, LI Y, TAN Q. Cross-breeding and selection of *Flammulina velutipes* G1 an early maturing hybrid[J]. Acta Edulis Fungi, 2009, 16(4): 20-22. (in Chinese)
- [18] 宋春艳, 刘德云, 尚晓冬, 谭琦, 项寿南. 香菇杂交新品种“申香 16 号”的选育及示范推广[J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 11-14.
- SONG C Y, LIU D Y, SHANG X D, TAN Q, XIANG S N. Breeding and popularization of a new *Lentinula edodes* hybrid “Shenxiang 16”[J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(4): 11-14. (in Chinese)