

[文章编号]1000-2782(2000)02-0068-04

香菇和凤尾菇原生质体融合初探

王澄澈¹, 苗艳芳¹, 梁枝荣², 田娟¹

S646.103.6

¹ 洛阳农业高等专科学校园艺系、河南洛阳 471003² 中国科学院北京农村经济技术开发部, 北京 100080

[摘要] 选用经高温灭活的香菇原养型双核原生质体作供体亲本, 以带有脯氨酸(Prol)营养缺陷型标记的凤尾菇单核原生质体为受体亲本, 对其原生质体融合情况进行研究。结果发现, 两亲本原生质体的融合再生率为 0.106%, 部分融合子菌丝细胞多核, 无锁状联合。对该融合子再进行原生质体分离、再生, 得到了具有新的生理特性的菌株材料。表明这种单双核原生质体融合是实现食用菌属间远缘杂交育种的有益探索。

[关键词] 香菇; 凤尾菇; 原生质体; 远缘杂交育种; 原生质体融合

[中图分类号] S646.1 **[文献标识码]** A

香菇 [*Lentinus edodes* (Berk) Sing.] 是世界上著名的食用菌, 其风味独特, 营养丰富, 具有较高的商品价值, 但菌丝生长缓慢, 出菇期长, 生物学效率较低, 一直是育种和生产上急待解决的问题。而凤尾菇 [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.] 则具有菌丝生长快、出菇早、产量高和较耐高温的特性^[1]。香菇和凤尾菇的有性繁殖同属双因子控制的四极性异宗结合, 具有相似的交配和遗传机理^[2], 如果能将二者进行体细胞杂交, 选育出既保持香菇营养价值又获得凤尾菇优良特性的香菇新品种, 无论在科研或生产上都具有重大意义。但是, 由于香菇和凤尾菇的亲缘关系较远, 不能通过常规杂交获得杂种后代, 而试图以原生质体融合为手段得到体细胞杂种也是比较困难的^[3]。为此, 本试验选用香菇原养型双核原生质体经高温灭活^[4]作供体亲本, 以带有 Prol 营养缺陷型标记的凤尾菇单核原生质体^[5]为受体亲本, 将两亲本的原生质体融合、分离、再生, 得到了具有新的生理特性的菌株材料, 现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

香菇 L38, 为栽培用原养型双核体菌株; 凤尾菇 P277, 为 PL27 的担孢子经紫外线(UV)诱变处理后分离得到的 Prol 营养缺陷型单核体。

1.2 培养基及试剂

本试验所用培养基及试剂见表 1。

1.3 原生质体分离与融合

菌丝体在完全培养液(CM)内 25℃摇床培养 7 d, 按无菌操作, 用铺有擦镜纸的漏斗

[收稿日期] 1999-12-07

[基金项目] 河南省科技攻关项目(981050019)

[作者简介] 王澄澈(1954—), 男, 副教授

收集,经高渗稳定液(OSS)多次冲洗后,加入裂解酶液(ES),25℃酶解5h,无菌过滤除去菌丝残片,滤液经3000 r/min离心收集原生质体,用OSS冲洗纯化2次。

L38原生质体经60℃保温5s灭活后,与P277等量的原生质体混合,离心浓缩后加入促融剂(PEG)处理15s,分别把融合子、融合亲本均匀地涂抹于各种平板培养基上,用塑膜封口,25℃培养7d后,检查平板上出现的菌落并计数,将高渗稳定固体基本培养基(OMMA)平板上出现的菌落转接到完全固体培养基(CMA)和基本固体培养基(MMA)平板上作进一步的研究。

表1 培养基及试剂组成成分

培养基名称	硫酸镁/ (g·L ⁻¹)	磷酸 二氢钾/ (g·L ⁻¹)	磷酸 氢二钾/ (g·L ⁻¹)	蛋白胨/ (g·L ⁻¹)	酵母 浸汁/ (g·L ⁻¹)	葡萄糖/ (g·L ⁻¹)	盐酸/ mL
完全培养液(CM)	0.5	0.46	1.0	2.0	2.0	20.0	0.005
完全固体培养基(CMA)	0.5	0.46	1.0	2.0	2.0	20.0	0.005
高渗稳定完全培养液(OCM)	72.7	0.46	1.0	2.0	2.0	20.0	0.005
基本固体培养基(MMA)	0.5	0.46	1.0	0	0	20.0	0.12
高渗稳定固体基本培养基(OMMA)	72.7	0.46	1.0	0	0	20.0	0.12
高渗稳定固体完全培养基(OCMA)	72.7	0.46	1.0	2.0	2.0	20.0	0.005
高渗稳定液(OSS)	72.2	0	0	0	0	0	0
裂解酶液(ES)	72.2	0	0	0	0	0	0
促融剂(PEG)	0	0	0	0	0	0	0

培养基名称	琼脂/ (g·L ⁻¹)	天冬 酰胺/ (g·L ⁻¹)	裂解酶/ (g·L ⁻¹)	聚乙烯 乙二醇/ (g·L ⁻¹)	二氧 化钙/ (g·L ⁻¹)	甘氨酸/ (g·L ⁻¹)	pH
完全培养液(CM)	0	0	0	0	0	0	0
完全固体培养基(CMA)	20.0	0	0	0	0	0	0
高渗稳定完全培养液(OCM)	0	0	0	0	0	0	0
基本固体培养基(MMA)	20.0	2.0	0	0	0	0	0
高渗稳定固体基本培养基(OMMA)	20.0	2.0	0	0	0	0	0
高渗稳定固体完全培养基(OCMA)	20.0	0	0	0	0	0	0
高渗稳定液(OSS)	0	0	0	0	0	0	0
裂解酶液(ES)	0	0	15	0	0	0	5.8
促融剂(PEG)	0	0	0	300	11.1	3.75	8.3

1.4 细胞核荧光染色

染色液 Propidium iodide 10 μg,核糖核酸酶 500 mg/L。菌丝体置于载玻片上,立即加1滴染色液,用盖玻片轻轻挤压,20℃反应30s后用荧光显微镜观察。

1.5 香菇栽培料配方

杂木屑 80.6 kg,麸皮 16 kg,蔗糖 1 kg,硫酸钙 1.6 kg,碳酸钙 0.4 kg,尿素 0.1 kg,多菌灵 0.3 kg,充分拌匀,含水量适宜,塑料袋规格为 15 cm×30 cm,每袋装湿料 650 g,121℃高压灭菌 2 h。

2 结果与分析

2.1 单双核原生质体的融合结果

在 OMMA 平板上再生出 36 个再生菌落, 经统计, 其融合再生率为 0.106%。亲本 P277 的 Prol 营养缺陷型单核原生质体在 MMA 上不能生长, 表明受体亲本的遗传标记稳定, 无回复突变。DL38 在各种培养基上单独均不能生长, 表明灭活供体稳定。两亲本融合后在 MMA 上得到的融合子可靠。

2.2 融合子的细胞学观察与分析

从 36 个再生菌落中选出 5 个进行荧光染色和细胞学观察(见表 2), 融合子 H213 和 H215 的菌丝细胞双核, 有锁状联合, 连续 5 次转接, 具有供体亲本 L38 稳定的双核特性。融合子 H212, H214 和 H216 的菌丝细胞多核, 在细胞内成对或单个地自由分布, 无锁状联合, 其荧光染色的程度比亲本要高得多。选取 H216 再次进行原生质体分离、再生, 得到 2 种类型的菌落, 1 种在 MMA 上不能生长, 经分析具有受体亲本 P277 的单核特性, 另 1 种则生长速度不一, 形态各异, 具锁状联合的菌落则表现出供体亲本 L38 的基本特性。

表 2 融合子和亲本菌株的细胞学观察

菌株	核相	锁状联合	核染色比率/%	菌株	核相	锁状联合	核染色比率/%
L38	双核	有	15~30	H214	多核	无	70~85
P277	单核	无	3~10	H215	双核	有	50~70
H212	多核	无	70~85	H216	多核	无	70~85
H213	双核	有	50~70				

2.3 融合子的菌丝生长和出菇表现

如表 3 所示, 所有融合子在培养基平板上和木屑栽培料内的菌丝生长速度均比供体亲本 L38 快, 不同融合子之间的菌丝生长速度存在较大的差异。出菇试验中只有融合子 H214 能在 CMA 平板上 28℃ 培养 21 d 后, 形成原基, 而在木屑栽培料内所有的融合子均没有得到原基和子实体。而 H216 再通过原生质体分离、再生, 从再生菌株中选取具有 L38 基本特性的 10 个菌株进行出菇培养, 有 4 株形成了子实体, 其中 1 株具有比亲本 L38 生长快、出菇早、产量高的优良特性, 在生产上有一定的应用价值。

表 3 亲本菌株和融合子菌丝生长速度

cm

菌株	CMA 平板*	MMA 平板*	栽培料**	菌株	CMA 平板*	MMA 平板*	栽培料**
P277	0.65	0	0	H213	2.7	3.6	7
L38	1.3	0.6	6	H214	4.5	4.3	9
DL38	0	0	0	H215	2.6	2.5	7
H212	6.8	5.0	5	H216	2.3	1.8	6

注: * 28℃ 培养 7 d 的菌落直径; ** 25℃ 培养 20 d 测量的料内菌丝长度。

3 小结与讨论

1) 用带有 Prol 营养缺陷型标记的凤尾菇单核原生质体为受体亲本, 以香菇原养型双核原生质体经高温灭活作供体亲本, 两亲本的单双核原生质体的融合再生率为 0.106%。

2) 所得到的部分融合子菌丝细胞双核,有锁状联合,另一部分融合子菌丝细胞多核,在细胞内成对或单个地自由分布,所有融合子在培养基平板上和栽培料内的菌丝长速均比供体亲本快,但难以形成原基和子实体,表明两个亲缘关系较远的细胞核在同一细胞内由于基因对性状控制的紊乱,使得控制出菇的基因表达困难。

3) 如果将具有供体亲本基本特性的融合子再通过原生质体分离、再生,从中可得到优于供体亲本的新的菌株材料。

4) 在亲缘关系较远的食用菌杂交育种手段上,本试验进行了初步的有益探索,所涉及的一些机理和技术方面的问题尚待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1998. 301~302, 436.
- [2] Chang S T, Miles P G 著. 食用菌及其栽培[M]. 杨国良, 张金霞译. 保定: 河北大学出版社, 1992. 93.
- [3] 赵永昌, 张树庭. 食用菌原生质体研究的发展史[J]. 中国食用菌, 1995, (4): 3~7.
- [4] 梁枝荣, 张喜群, 王澄澈. 原生质体灭活供体在食用菌融合中的应用初探[J]. 菌物系统, 1999, 18(3): 341~342.
- [5] 梁枝荣, 曹素芳. 凤尾菇营养缺陷型的诱变筛选及交配型基因测定[J]. 食用菌, 1999, (6): 9.

A preliminary study on intergeneric protoplast fusion between *Lentinus edodes* and *Pleurotus sajor-caju*

WANG Cheng-che¹, MIAO Yan-fang¹, LIANG Zhi-rong², TIAN Juan¹

(¹ Agricultural College of Luoyang, Luoyang, Henan 471003, China)

(² Department of Rural Economy and Technology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The protoplasts of wild dikaryon of *L. edodes* were heat-inactivated as dead donor and the protoplasts of auxotrophic mutant Monokaryon of *P. sajor-caju* were used as recipient. A study of two parents fusion showed that the regeneration ratio of fusion was 0.106%. Some of the fusants were polyenergid, but no clamp connection. Through protoplast isolation and reversion of one polyenergid fusant, new strains with new physiological characteristics were obtained, such as fast mycelial growth and earlier fruiting. The experiment result showed that the technique and method used in this study might be used as profitable exploration for distant hybridization.

Key words: *Lentinus edodes*; *Pleurotus sajor-caju*; protoplast; distant hybridization