

香菇原生质体分离诱变育种研究

梁枝荣

(中国科学院北京农村经济技术发展部 北京 100080)

安沫平 通占元

(河北省农业环境保护监测站 石家庄 050011)

摘要:通过UV处理香菇原生质体后得到的105株再生菌株与它们亲本菌株的菌丝生长速度、产量和出菇期进行了比较。约有30%的再生菌株获得了较高的产量和较早出菇期的优良特性、多次继代培养证明,这些再生菌株获得的优良特性稳定。研究结果表明,香菇原生质体分离诱变是一种很有应用价值的食用菌菌种选育方法。

关键词:香菇,育种,原生质体,UV诱变

中图分类号:Q939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0038-04

THE BREEDING STUDY BY UV-INDUCING PROTOPLASTS OF *LENTINUS EDODES*

LIANG Zhi-Rong

(Department of Rural Economy and Technology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080)

AN Mo-Ping TONG Zhan-Yuan

(Hebei Agro-environmental Protection & Monitoring Station, Shijiazhuang 050011)

Abstract: The experiment was carried out to inquire about the possibility of strain selection and improvement in *Lentinus edodes* through protoplast formation and mutagenesis by UV. Mycelial growth rate, yield, and period of fructification of 105 selected regenerants from UV-treated protoplasts have been measured and compared with their parents. Several selected regenerants achieved some better qualities such as higher yield and earlier fruiting. Several repeated cultivations of these regenerants reconfirmed their new capacities. The results indicated that protoplast formation and mutagenesis are the potential methods for strain selection and improvement in edible fungi.

Key words: *Lentinus edodes*, Breeding, UV-inducing, Protoplasts

食用菌菌丝体多核、担孢子壁厚的特点造成诱变育种的困难。脱壁后的原生质体对诱变因子的敏感性增强,增加变异的机会,提高了诱变率。目前,原生质体诱变育种在平菇和金针菇里已有成功的报道^[1,2],我们在八十年代末进行了香菇菌丝原生质体的紫外线诱变育种研究,选育的菌种,经多年的实际应用,效果较好。现将有关资料整理报道,供同行参考,以促进原生质体诱变育种技术在生产中的推广应用。

1 材料与方法

1.1 菌株

L13, L38, 生产中栽培用菌株,引自香港中文大学生物系。

1.2 培养基

完全培养液(CM): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KH_2PO_4 0.46g, K_2HPO_4 1.0g, Bacto-peptone 2.0g, yeast extract 2.0g, glucose 20g, Thiamin-HCl 0.005g, 定容 1L, 调 pH 到 5.8。

基本培养液(MM): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KH_2PO_4 0.46g, K_2HPO_4 1.0g, DL-asparagine, 2.0g, glucose 20g, Thiamin-HCl 0.12g; 定容 1L。

完全固体培养基(CMA): CM 内加 20.0g 琼脂。

高渗稳定完全培养液(OCM): CM 内加 0.6mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

高渗稳定完全培养基(OCMA): OCM 内加 20g 琼脂。

高渗稳定液(OSS): 0.6mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05mol/L 马来酸, pH5.8。

溶壁酶液(ES): 15g 溶壁酶溶于高渗稳定液。

1.3 栽培袋培养料

木屑 78%, 麸皮 20%, 石膏粉 2%, 料水比 1:1.4, 拌匀装入直径 15×30cm 的聚丙烯袋, 每袋装湿料 550g, 高压灭菌。

1.4 原生质体分离

在完全培养液内 25℃ 摇床培养 7d 的香菇菌丝体, 用 OSS 多次洗后加入酶液, 25℃ 裂解 5h, 过滤后离心收集原生质体, 用 OSS 冲洗两次后稀释到适当浓度。

1.5 原生质体诱变和双核再生体的检出

原生质体稀释液在黑暗中用 30W 紫外线灯距离 35cm 处理 15s。处理后的原生质体溶液均匀涂抹于 OCMA。黑暗中 25℃ 培养再生 10~15d, 将单个再生菌落转接到 CMA 平板, 25℃ 培养 5d 后, 通过显微镜观察检出双核再生体。

1.6 菌丝生长和出菇试验

从再生菌株和亲本菌株菌落上切取直径 0.3cm 的小圆片分别转接入 CMA 平板中心, 每个菌株做 5 次重复, 24℃ 暗光培养, 定期观察, 于第 21d 测量菌落直径。

再生菌株和亲本菌株分别接入栽培袋, 每个菌株做 5 次重复, 暗光下 24℃ 培养, 定期观察, 于第 45d 测量记载菌丝从袋口接种处到菌丝生长前沿长度。55d 菌丝满袋, 脱袋喷水 20℃ 进行转色出菇培养。现蕾后进行出菇管理, 子实体成熟后喷水前采菇称重, 记载统计 3 潮菇的产量。

2 结果与讨论

2.1 原生质体分离和再生

采用本实验所用的原生质体分离再生方法, 一般可得到 5×10^6 /mL 以上的原生质体, 再生率在 0.3%~0.8% 之间, 原生质体量和再生率可完全满足实验所需。

2.2 原生质体诱变

诱变处理 10^5 个原生质体, 经再生培养得到 456 个再生菌株, 再生率为 0.456%, 而对照处理的原生质体再生率为 0.328%。这样的结果表明, 原生质体经紫外线诱变处理后再生率似乎较对照有所提高, 对其中原因还需做进一步的研究。

2.3 双核菌丝的检出

再生菌落经显微镜观察, 约有 10% 左右是单核菌丝, 随机从单个再生菌落中挑选出 105 个双核菌丝体转接入 CMA 平板, 培养成再生菌株, 做进一步的研究。

2.4 再生菌株和亲本菌株菌丝的生长

如表1所示,25℃培养21d,CMA固体培养基上菌落直径在2.9cm~4.6cm之间,大部分在3.6cm~4.0cm之间,其中生长最快的是L38-2,直径达到4.6cm,生长最慢的是L38-34和L38-55,直径分别是3.0和2.9cm;两株亲本菌株的直径是3.8cm。栽培袋内菌丝长度大部分在11.3cm和12.2cm左右,其中生长最快的是L38-37,菌丝长度达到13cm,最慢的是L38-2和L38-6,菌丝长度分别是10.5和10.3cm;两株亲本菌株菌丝长度分别是11.5cm和12.2cm(表2)。两种培养基上亲本菌株的生长速率均处于中间范围,结果表明通过原生质体诱变得到的再生菌株之间菌丝生长特性有了明显的分化变异。

表1 CMA固体培养基上再生菌株和亲本菌株菌丝的生长速率

	菌落直径(cm)	直径平均值(cm)	数量(株)
再生菌株	2.9~3.0	3.0	6
	3.1~3.5	3.3	3
	3.6~4.0	3.8	30
	4.1~4.5	4.3	63
	4.6	4.6	3
亲本菌株(L13)	3.8	3.8	1
亲本菌株(L38)	3.8	3.8	1

表2 栽培袋内再生菌株和亲本菌株菌丝的生长速率

	菌丝长度(cm)	平均值(cm)	数量(株)
再生菌株	9.9~10.5	10.2	6
	10.6~11.2	10.9	15
	11.3~11.9	11.6	48
	12.0~12.6	12.5	30
	12.7~13.3	13.0	6
亲本菌株(L13)	11.5	11.5	1
亲本菌株(L38)	12.2	12.2	1

2.5 再生菌株和亲本菌株的出菇期与出菇产量

亲本菌株的出菇期在44~50d期间内,出菇期最短的6株再生菌株在30~36d之间,而有3株再生菌株出菇期最长为57~63d,两株亲本出菇期在44~50d之间,结果表明通过原生质体分离诱变得到的再生菌株出菇期也出现了较大的分化变异,见表3。

表3 再生菌株和亲本菌株的出菇期

	出菇期(d)	平均值(d)	数量(株)
再生菌株	30~36	33	6
	37~43	40	33
	44~50	47	42
	51~56	54	15
	57~63	60	3
亲本菌株(L13)	48	48	1
亲本菌株(L38)	45	45	1

表 4 所示,亲本菌株的产量在 56~127g 的范围内,再生菌株的产量变异幅度较大,其中有 6 株没有出菇,而有 6 株的产量超过亲本菌株 1 倍以上,两株亲本菌株的产量处于平均值略微偏低一点的水平,结果表明,通过原生质体分离诱变可筛选得到产量大幅度提高的变异菌株。

表 4 再生菌株和亲本菌株出菇产量比较

	产量(g)	平均值(g)	数量(株)
再生菌株	0	0	6
	10~55	32.5	21
	56~101	78.5	18
	102~147	124.5	21
	146~193	168.5	21
	194~239	214.5	12
	240~285	262.5	6
亲本菌株(L13)	110	110	1
亲本菌株(L38)	98	98	1

2.6 再生菌株产量的稳定性

随机选出两株产量较高的再生菌株通过组织分离得到下一代,连续两代经重复栽培实验,其高产早熟的特性稳定(表 5)。

表 5 再生菌株后代与亲本菌株产量出菇期比较

实验菌株	产量(g)			出菇期(d)		
	第一代	第二代	第三代	第一代	第二代	第三代
亲本菌株 L13	110	128	124	46	44	48
再生菌株 L13-4	222	267	249	31	35	32
再生菌株 L13-8	185	241	237	33	30	31

3 小结

通过原生质体分离诱变进行菌种选育已有不少成功的报道^[3,4]。本实验的目的就是以香菇为材料,探讨通过原生质体的分离诱变进行食用菌菌种选育的可能性。香菇菌丝原生质体通过紫外线的处理,选出了 105 株再生菌株,这些菌株的菌丝生长特性、出菇量、出菇期与它们的原始菌株进行了比较,一些再生菌株获得了高产早熟的优良特性。选出的几株优良菌株经过多次继代栽培,所获得的优良特性表现稳定。结果表明,原生质体分离诱变是一种很有应用价值的食用菌菌种选育方法。

参 考 文 献

[1] 许襄中,夏道平,刘金元. 食用菌,1996,(2):9~10.
[2] 成亚利. 食用菌学报,1995,2(3),61~64.
[3] 贾身茂. 食用菌,1992,(2):8~9.
[4] 朱宝成. 微生物学通报,1996,23(2):69.