

香菇品种杂交的研究

1. 单元体菌丝和异核体的观察及鉴定

罗 宽 华

(广东省微生物研究所, 广州)

香菇 [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] 在我国已有七、八百年的栽培历史, 历来都是采用自然传播的老法生产, 产量和质量不稳定。1965年开始改用纯菌种人工接种, 产量虽有增长, 但幅度不大, 菌种和接种技术都存在不少问题。由于目前还没有一个较为理想的香菇生产菌种, 我们试图通过杂交途径, 综合亲株优良性状, 选育优良品种, 以适应生产需要。本试验着重观察单元体、双核化株系菌丝形态和探索单元体、双核化菌丝和异核体的鉴定方法。

材料和方法

菌种: 香 9、丰 01、465、7401、7405 等均选采自香菇栽培场。同一香菇个体进行单孢、多孢及组织分离。

培养基: 孢子萌发试验采用 2% 枫香木水煎液; 单孢分离用麦芽糖、蛋白胨琼脂培养基; 保存菌种用马铃薯、葡萄糖琼脂培养基; 其它试验用麸皮、蛋白胨、葡萄糖琼脂培养基。pH 为 5.4—5.6, 培养温度为 25—28℃。

方法:

1. 孢子萌发试验: 悬滴法, 培养后每 12 小时观察记录一次。

2. 单孢分离: 空中捕捉法和平板稀释法。

3. 单孢杂交: 将两个不同亲株的单元体菌丝体同时接种在平板或斜面培养基上, 相距 0.5—1.0 厘米, 培养 7—10 天, 待两菌丝体接触后, 镜检接触部分的菌丝, 如发现锁状联合, 即将将此接触部分的菌丝体转移到新鲜斜面培养基上培养。

4. 多孢杂交: 把两个不同亲株的孢子悬液混合稀释后在平板上培养 20—30 天, 待菌丝长满后, 把不同部位的菌丝体分别转移到新鲜斜面培养基上培养。

5. 拮抗试验: 异核体间以及异核体与两亲株配对, 接种在新鲜培养基上, 距离 2—3 厘米, 培养 15—25 天后观察两菌丝体接触部分的拮抗现象。

结 果

一、单孢萌发和单元体菌丝体的培养

香 9 菌系的新鲜孢子经培养后, 12 小时约有 10% 萌发, 24 小时大部分萌发。萌发的过程: 孢子吸水膨胀—中间形成隔膜, 分裂成两个细胞—两细胞各自伸长, 基部细胞钝圆, 前端细胞略细—继续分裂成 3—4 个细胞—前端细胞伸长。分裂新细胞的同时, 第 2 甚至第 3 个细胞产生瘤突—瘤突伸长成分枝—分枝伸长、分裂形成菌丝体。整个过程为 48—72 小时。

二、单元体、双核化菌株的培养特征和保存

单元体菌丝无锁状联合, 直径通常较小 (2.5—3.0 微米), 分枝较多; 双核化(异核)菌丝较粗 (3.0—4.0 微米), 且不均匀, 分枝较少。

琼脂培养基上单元体菌丝体的气生菌丝较旺盛, 呈绒毛状, 疏松, 生活力较弱, 易衰亡, 经多次转管或长期保存后, 生长势减弱, 有的甚至分泌黄褐色色素直至停止生长而死亡(表 1), 尚存的菌株生长也较弱。

单元体菌丝体在平板培养基上的菌落有 4 种类型, 其特征和各种形态菌落所占比例也有

差异(表 2)。

表 1 冰箱保存十六个月的香菇菌株存活情况

菌 株	分离数 (株)	存活数 (株)	存活率 (%)
7402(单元体)	17	5	29
7405(单元体)	7	5	71
香 9(单元体)	10	5	50
异核体(双核化)	24	24	100
亲株(双核化)	6	6	100

表 2 香菇单元体菌落的不同形态类型

类型	菌落形态特征	菌株数 (株)	所占比例 (%)
I	生长速度快,菌丝旺盛,厚薄均匀	15	42.9
II	生长速度慢,菌丝旺盛,厚薄均匀	9	25.7
III	生长速度较快,菌丝较旺盛,厚薄不均匀	6	17.1
IV	生长速度很慢,菌丝不旺盛,厚薄很不均匀	5	14.3

单元体菌丝在斜面培养基上培养,生长速度均比双核化菌丝慢。以其中一次试验为例:以组织分离的双核细胞培养物其菌丝长度为 8.9 厘米,多孢分离的双核培养物菌丝长 7.3 厘米;而单孢分离的单元体菌丝长分别为 5.0 厘米(465-4 菌株)、2.7 厘米(465-8 菌株)、6.0 厘米(465-9 菌株)和 5.7 厘米(465-31 菌株)。

单元体菌丝体经斜面培养后形成黄褐色菌膜较慢,在与双核化菌丝体的对比试验中,465、丰 01、香 9 菌株的双核菌丝体经培养形成菌膜的时间分别为 21、28、49 天;而它们的单元体菌丝体,85 天后还未形成菌膜。

三、杂交试验

用不同菌株的不同性系的单元体菌丝体杂交配对: 香 9 菌株的 2 株和 465 菌株的 22 株配对,香 9 菌株的 3 株和丰 01 菌株的 10 株配对,丰 01 菌株的 4 株和 465 菌株的 22 株配对,结果都能产生锁状联合,形成异核体。这表明不同菌系间杂交,不受单元体菌株的类型、生长速度及生长势的影响。在室温及自然光照条件下培养,465×丰 01 的异核体有 49% 的菌株,12—45 天内 在试管中生成子实体。

不同菌系的单元体菌丝体相互交配形成异核体后,其形态特征、生长速度与组织分离及多孢分离的亲株双核菌丝体无显著差别。

四、不同菌系间的拮抗作用

将来自不同地区的 20 多个菌系进行培养试验,发现它们之间都有拮抗作用。而同一品系与其不同地区繁殖的后代均无此作用(表3)。不同品系的菌丝体在生长过程中能分泌一些抑制对方生长的物质。因此,在琼脂培养基上培养时双方菌丝体在接近的边界上形成一条宽约 0.5 毫米以下的空白带,10 天左右后,两侧菌丝体逐渐累积,生长旺盛的一侧高高隆起。通常两种菌丝体接触后产生均势,稍突起或凹下,中间有一条明显界限。接触部分两侧的菌丝体较快变褐,拮抗线的颜色变深。这种现象不仅在培养基表面可见,在琼脂深层 1—2 毫米处及试

表 3 香菇不同品系间的拮抗作用

菌 系*	香 9	香 9 (孢)	香 9 (b)	丰01	丰01 (孢)	465	465 (孢)	7402	7402 (孢)	7402 (1)	7402 (2)	7405	7405 (孢)
7405(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
7405(孢)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
7405	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
7402(2)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-			
7402(1)	+	+	+	+	+	+	+	-	-				
7402(孢)	+	+	+	+	+	+	+	-					
7402	+	+	+	+	+	+	+						
465(孢)	+	+	+	+	+	-							
465	+	+	+	+	+								
丰01(孢)	+	+	+	-									
丰01	+	+	+										
香 9(b)	-	-											
香 9(孢)	-												

* (1)、(2)、(b)表示该菌系在不同地区组织分离的后代; (孢)表示该菌系多孢分离的后代。

管壁上的气生菌丝体接触处也可见到。

异核体间、各异核体与两亲株间同样产生拮抗作用(表4)。因此,多孢杂交的菌丝体长

满平板后,由于拮抗作用,菌丝体被拮抗线分割成许多界限分明的小块,分别挑取各小块,培养后进行拮抗试验,同样可以获得异核体。

表 4 异核体间及各异核体与两亲株间的拮抗作用*

菌 系	香 9-9 × 丰01-3	香 9-9 × 丰01-4	香 9-9 × 丰01-5	香 9-9 × 丰01-7	香 9-9 × 丰01-8	香9-9 × 丰01-9	香 9-9 × 丰01-10	香 9-9 × 丰01-13	香 9-9 × 丰01-21	香 9-9 × 丰01-22	香 9 组织 分离	香 9 多孢 分离	丰01 组织 分离	丰01 多孢 分离
丰01多孢分离	+	±	+	+	+	±	+	+	+	++	++	++	-	
丰01组织分离	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++		
香 9 多孢分离	+	+	+	+	+	±	+	+	+	++	-			
香 9 组织分离	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++				
香9-9×丰01-22	++	++	++	++	++	+	++	++	++					
香9-9×丰01-21	±	+	+	++	+	±	+	+						
香9-9×丰01-13	+	+	+	+	++	±	+							
香9-9×丰01-10	+	+	+	+	+	±								
香9-9×丰01-9	±	±	±	±	±									
香9-9×丰01-8	++	+	++	+										
香9-9×丰01-7	++	+	++											
香9-9×丰01-5	+	+												
香9-9×丰01-4	++													
香9-9×丰01-3														

* ++ 表示拮抗线非常明显。
+ 拮抗线明显。
± 拮抗线隐约可见。
- 无拮抗作用。

讨 论

1. 为进行香菇品种杂交,首先必须分离得到单元体菌丝体。用空中捕捉法及平板稀释法所得到的菌落不一定是单孢菌落(虽然孢子发芽后作了标记)。因此,鉴定所分离的菌丝是否单元体菌丝成了必不可少的步骤。单元体菌丝的形态特征和生长情况与双核化菌丝有很大差别,其中镜检有无锁状联合是鉴定单元体菌丝的简单而可靠的方法。

2. 试验初步证明拮抗试验可作为香菇品种鉴定方法之一。此法也可以鉴定异核体。

3. 试验表明,单元化菌丝体的类型、生长速度对交配无明显影响,都能形成异核体。但对香菇子实体的形成、性状、产量、质量等的影响,有待深入试验研究。

参 考 文 献

[1] 广东省微生物研究所:《香菇新法栽培》,广东人民出版社,广州,1974。
[2] 武九雄雄:菌蕈研究所研究报告第一号,61—68页,1961。
[3] 堀準爾:しいたけ栽培の实际(新版),38—39页,秦文馆,昭和40年。
[4] 廣江勇:最新しいたけ栽培法(增订),79—80页,富民协会,昭和47年。