

草菇种内原生质体融合育种研究

温海祥, 肖洪东, 黄剑波, 温玉辉, 任吉君

(佛山科学技术学院, 广东 佛山 528231)

摘要: 对草菇种内原生质体的制备、融合和再生进行研究。结果表明, 黑色草菇品种 V-5 原生质体制备时菌丝适宜菌龄为 48h, 酶作用时间以 3~4h 为宜, 白色草菇品种 V-38 则以培养 48h 及酶作用时间 2~3h 为宜。利用草菇不同品种间胞外蛋白酶和淀粉酶活性的差异, 检测原生质体融合后再生的菌株, 筛选了三个与出发菌株有明显差异的融合子。

关键词: 草菇; 原生质体; 溶壁酶; 融合

中图分类号: S646.1⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2000)03-0048-02



第一作者简介 温海祥, 讲师, 佛山科学技术学院农学系副主任, 主要从事农业微生物学及食用真菌学的教学和科研工作, 担任广东省微生物学会理事。近年来在《Molecular Plant-Microbe Interactions》、《食用菌》等国内外刊物上发表论文 13 篇, 参编教材《食用菌制种与栽培》, 主持“草菇原生质体融合育种研究”等多项省、

市科研项目, 获市优秀论文奖一项, 学院优秀论文奖四项, 学院优秀教学成果奖三项。

草菇(*Volvariella volvacea*)属担子菌亚门伞菌目包脚菇属, 是一种适宜在较高温环境下生长发育的食用菌。目前商业化生产中广泛使用的草菇品种主要有两大类, 一类是黑色草菇品种, 子实体颜色较深, 呈鼠灰色, 形状美观, 单生, 开伞速度较慢, 商业性状良好, 适宜规模化栽培使用; 但菌丝生长速度慢, 抗污染能力差, 产量较低, 室内废棉花栽培生物转化率仅为 20% 左右, 制约了其在生产上的使用。另一类是白色草菇品种, 子实体颜色较浅, 呈灰白色, 菌丝生长速度快, 抗污染能力强, 产量高, 室内废棉花栽培生物转化率为 30% 左右, 但其子实体簇生, 菇形不规则, 开伞速度快, 商业性状差, 生产中的应用同样受到制约。

原生质体融合育种技术^[1]的日益完善^[2], 为草菇的

育种提供了新的途径, 王辅德^[3]等报道了草菇原生质体的制备与再生, 李成一^[4]等进行的平菇、香菇种内和种间的原生质体融合已获得了进展, 将原生质体融合育种技术应用于草菇种内融合育种, 育取兼具不同品种间优良生产性状的草菇新品种是可行的。本文报道草菇黑色品种与白色品种间进行融合及融合子筛选的方法, 为原生质体融合育种技术在草菇育种中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 黑色草菇品种 V-5 和白色草菇品种 V-38 均由佛山科技学院食用菌研究室提供。

1.1.2 培养基 斜面培养基使用马铃薯葡萄糖培养基; 液体培养基为马铃薯葡萄糖培养基再添加 0.15% KCl; 原生质体再生培养基为 2% 葡萄糖, 0.015% 酵母粉, 用 0.6M 甘露醇作渗透压稳定剂^[5]。

1.1.3 酶与试剂 溶壁酶, 广东微生物研究所生产; 聚乙二醇-600, 佛山市化工实验厂生产; 可溶性淀粉, 上海化学试剂站生产; 脱脂牛奶, 大庆奶制品厂生产。

1.2 方法

1.2.1 原生质体制备 ①菌种培养: 将 V-5 和 V-38 从斜面试管中挑取小块培养基接入液体培养基中, 35℃ 摇床培养 7d, 然后离心收集菌体, 用无菌水洗涤一次, 用超声波细胞粉碎机处理 5min, 取 V-5 和 V-38 各 10ml 接入 200ml 新液体培养基中, 35℃ 下静置培养 48h, 然后进行如下试验。②酶解时间试验: 据文献^[3]报道, 溶壁酶对草菇细胞壁的分解有特效, 浓度以 1.5% (W/V) 为宜。取培养 48h 的草菇菌丝用无菌水洗涤二次, 离心称重, 悬浮于稳渗剂中, 用超声波细胞粉碎机处理 5min, 将菌丝分散, 加入用稳渗剂配制且用细菌过滤除菌的 1.5% 溶

壁酶, 35℃水浴酶解, 酶解时间设 1、2、3、4、5、6h 六个处理, 酶解结束后覆盖一薄层脱脂棉的 200 目尼龙丝网滤去残留的菌丝, 然后用稳渗剂纯化洗涤二次, 1000rpm 离心 5min 收集原生质体, 血球计数板计数。③菌龄试验: 分别取液体培养 24h、48h、72h、96h、120h 的菌丝进行原生质体制备试验, 方法同②, 血球计数板计数。

1.2.2 原生质体融合 使用 0.6M 甘露醇溶液将两菌株的原生质体浓度调至 10/ml, 按 1:1 比例混合后, 离心收集原生质体, 加入 1ml 融合剂 (40% PEG-600、0.01M CaCl₂、0.5MKCL、0.05M 甘氨酸、pH7.5), 35℃水浴中作用 30min, 加入 5ml 稳渗剂稀释, 离心沉淀并悬浮在 0.5ml 原生质体再生液体培养基中, 在原生质体再生培养基上涂板, 35℃恒温箱中培养 7d。

1.3 融合子的筛选

1.3.1 拮抗筛选 将再生培养基上形成的菌落, 与出发菌株相互对应接种在平板上, 筛选与二个出发菌株均有拮抗作用的菌落进一步检测。

1.3.2 酶活性检测 将拮抗作用筛选的菌落分别接种在含 0.1% 脱脂牛奶、0.1% 可溶性淀粉的液体培养基中, 以出发菌株为对照, 35℃摇床培养, 每隔 24h 测定酶相对活性, 各种酶相对活性的测定采用消光值法^[6], 使用 722 光栅分光光度计测定, 以在波长 560nm 处测定的消光度表示各种酶的相对活性。每个处理设三次重复。

2 结果与讨论

2.1 草菇原生质体制备

2.1.1 酶解时间对原生质体产率的影响 结果见表 1。酶解时间对原生质体的产率有一定影响, 且不同品种间的酶解时间有差异, V-5 酶解时间控制在 3~4h, V-38 酶解时间控制在 2~3h 为宜。

表 1 酶解时间对草菇原生质体产率的影响

菌株	酶解时间 (h)					
	1	2	3	4	5	6
V-5	4.1×10 ⁵	4.3×10 ⁵	5.8×10 ⁵	7.1×10 ⁵	4.5×10 ⁵	2.0×10 ⁵
V-38	0.7×10 ⁵	1.2×10 ⁵	3.2×10 ⁵	2.1×10 ⁵	1.1×10 ⁵	0.5×10 ⁵

注: 原生质体产率为个/ml/0.25g 鲜菌丝

2.1.2 草菇菌丝菌龄对原生质体产率的影响 结果见表 2。用于制备草菇原生质体的菌丝以生长 48h 的幼龄菌丝较为理想, 这可能与液体摇床培养过程中形成球状菌丝团有关, 随着培养时间的加长, 球状菌丝团越来越紧密, 影响菌丝分散与酶溶液接触, 对原生质体的产率有影响。

表 2 菌龄对草菇原生质体产率的影响

菌株	菌 龄 (h)				
	24	48	72	96	120
V-5	2.7×10 ⁵	7.3×10 ⁵	3.2×10 ⁵	1.7×10 ⁵	0.8×10 ⁵
V-38	1.7×10 ⁵	3.2×10 ⁵	2.2×10 ⁵	1.1×10 ⁵	0.3×10 ⁵

注: 原生质体产率为个/ml/0.25g 鲜菌丝

2.2 草菇原生质体融合

2.2.1 拮抗作用 在 PEC-600 作用下, 草菇 V-5 和 V-38 的原生质体互相作用, 在稳渗剂配制的再生培养基上涂板 7d 后长出菌落, 从长成的 756 个单个菌落中, 通过拮抗试验, 筛选出 15 个菌株与出发菌株 V-5 和 V-38 有明显拮抗作用, 初步确定为融合子。

2.2.2 酶活性检测 结果如图 1、2。筛选的 15 个菌株中, 编号为 VY-3、VY-6、VY-11 的三个菌株在淀粉酶及蛋白酶相对活性方面与出发菌株 V-5 和 V-38 有明显差异, 其活性介于二个出发菌株之间。这种差异为融合子的筛选提供了参考, 融合子进一步的确定和生产性能检测有待进一步研究。

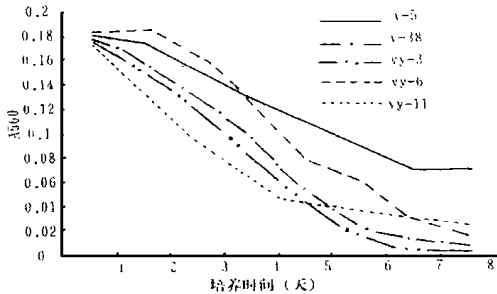


图 1 草菇融合菌株与出发菌株胞外蛋白酶活性曲线图

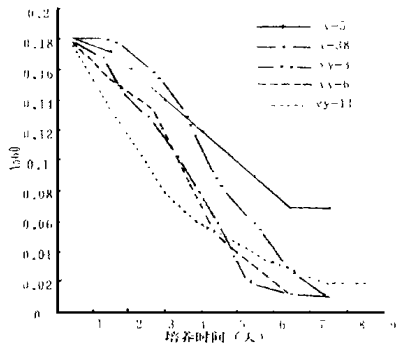


图 2 草菇融合菌株与出发菌株淀粉酶活性曲线图

参考文献

- 1 J. F. Peberdy. Protoplasts from fungi. Sci. Prog. Oxf, 1972, 60: 78~86
- 2 Hong Soon- Woo & Yeup Yoon. Formation and regeneration of protoplasts in Lentinus edodes. Mushroom Newsletter for the Tropics, 1985, 5: 4~10
- 3 王辅德等. 草菇和银丝草菇的原生质体分离及菌丝再生[J]. 上海农业学报, 1988, 4(1): 17~22
- 4 李成一等. 平菇和香菇原生质体融合育种研究简报[J]. 中国食用菌, 1994, 13(3): 19~20
- 5 王轲. 香菇原生质体工程菌株的构建研究[J]. 食用菌学报, 1997, 4(4): 1~4
- 6 韩雅珊. 食品化学实验指导书[M]. 北京: 农业出版社, 1982. (本文作者还有林丽超同志)