

杏鲍菇工厂化栽培品种杂交育种研究

周云¹, 朱婧¹, 郑雪平², 吴金男¹, 姚璐晔¹, 冀宏¹

(1. 常熟理工学院 生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500; 2. 昆山市正兴食用菌有限公司 江苏 昆山 215321)

摘要: 采用钩悬法和弹射法进行单孢子收集、菌丝体融合、酯酶同工酶分析的杂交育种方法, 将光滑型(S型)和粗糙型(R型)杏鲍菇的优良性状集中表达, 获得性状优良的杂交子。结果表明: 利用单核菌丝进行杏鲍菇种间杂交育种的方法是可行的; 杂交子 S6×R84 表现出优于父本的良好生产性状, 经过生产适应性驯化, 极可能成为性状优良的工厂化生产品种新资源。

关键词: 杏鲍菇; 单孢子杂交; 杂交子; 酯酶同工酶电泳

中图分类号: S 646.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0189-05

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)属担子菌亚门伞菌目侧耳科侧耳属, 学名刺芹侧耳, 富含氨基酸及部分矿物质等对人体有益的营养成分, 因其味道鲜美、菇体乳白、菌肉组织质地紧密, 而具有良好的市场商品性能。杏鲍菇工厂设施化生产与传统栽培模式有很大的不同, 对生产菌种的适应性必然有着不同的要求。加快选育具有优良性状的新品种, 改进和提高生产栽培工艺, 是相关技术研究所关注的主要方向^[1]。目前食用菌育种研究领域常用的方法有人工选择育种、诱变育种、杂交育种、转基因育种、野生食用菌驯化育种等技术, 其中应用最为普遍, 同时也最具成效的方法是杂交育种技术, 而杂交育种的关键是有性单孢子收集和杂交子鉴定^[2-5]。目前有性单孢子收集的方法很多, 而杂交子鉴定通常采用酯酶同工酶分析法, 该方法对杏鲍菇杂交子鉴定是最为真实可靠的方法。

“昆山市正兴食用菌有限公司”是专业从事杏鲍菇工厂化生产的科技型企业, 日产杏鲍菇 10 t。目前公司生产采用 2 个杏鲍菇品种, 其一产量高、菌肉结实, 但菌盖有瘤状突起, 影响感官品质, 称之为“R”型品种; 其二整体形态感官优良, 但菌肉绵软, 产量低, 称之为“S”型品种。该研究旨在通过单孢子收集、菌丝体融合、酯酶同工酶分析的杂交育种方法将二者的优良性状集中表达, 获得性状优良的杂交子, 为杏鲍菇工厂化生产及新

品种开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 由江苏昆山正兴食用菌有限公司提供的“S”型和“R”型 2 个生产品种。

1.1.2 主要试剂 葡萄糖、牛肉膏、维生素 B₁、磷酸二氢钾、硫酸镁、过硫酸铵、蔗糖、Tris、TEMED、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、Acr、Bis、甘氨酸、乙酸-1-萘酯、乙酸-2-萘酯、固兰 RR 盐、丙酮、乙酸、溴酚蓝, 上述试剂均为分析纯, 由中国医药集团上海化学试剂有限公司提供。豆粕、麸皮、玉米粉、马铃薯等为市购。酯酶同工酶电泳的试剂配制参照 NY-T 1097-2006^[7]。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(100 mL); 马铃薯 20 g, 葡萄糖 2 g, 琼脂 2 g, pH 自然; 液体培养基(100 mL): 葡萄糖 2 g, 玉米粉 1 g, 豆粕 1 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 硫酸镁 0.5 g, 牛肉膏 1 g, 维生素 B₁ 110 mg, pH 自然。

1.2 仪器与设备

EL104 电子天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司); S-SW-CJ-2F 超净工作台(上海博泰实验设备有限公司); HYG-A 全温摇瓶柜(太仓市博莱特仪器厂); 303 型智能人工气候培养箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司); 光学显微镜(江南光电股份有限公司); 3K30 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 1 000 μ L 移液枪(英国 GILSON 公司); DYCZ-24DN 型垂直板电泳槽(北京六一仪器公司); 显微镜图像分析系统(上海精天电子仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 孢子收集 钩悬法: 无菌操作将杏鲍菇菌盖切成大小合适(以入瓶后不碰触瓶壁为宜)的块状, 取灭菌回形针, 一端钩住块状菌盖, 另一端钩在三角瓶口上(瓶内事先注入 1 cm 厚灭菌 PDA 培养基), 瓶口塞上中性硅胶

第一作者简介: 周云(1989-), 女, 江苏盐城人, 在读硕士, 研究方向为生化与分子生物学。

通讯作者: 冀宏(1969-), 男, 河北保定人, 在读博士, 研究员, 研究方向为食药菌工程技术研究及现代农业技术经济与管理。E-mail: jihong8848@126.com。

基金项目: 江苏省教育厅科研成果产业化推进资助项目(JHZD08-34); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划资助项目。

收稿日期: 2010-10-14

塞置 26℃培养, 试验设置若干组, 分别于 2、12、18、20 h 取出三角瓶内菌盖, 之后继续培养, 观察孢子萌发情况。弹射法: 用 75%酒精棉擦拭杏鲍菇菌盖表面消毒, 菌褶面朝下无菌操作放置在已灭菌平皿的血底上, 上覆 2 层无菌纱布, 无菌环境放置 24 h 后, 取出菌盖, 血底有大量白色粉末即为孢子堆。用灭菌移液管吸取 10 mL 无菌水冲洗血底, 所得即为孢子原液; 将原液用无菌水分别稀释 10、100、1 000 倍, 并涂布 PDA 平板, 置 26℃恒温培养, 观察孢子萌发情况。将孢子萌发形成的单菌落挑至斜面培养基中编号培养, 待菌丝满管, 于 4℃条件下保藏。

1.3.2 单核菌丝筛选 无菌操作挑取上述培养菌丝体制成水封片, 置于高倍显微镜下观察, 无锁状联合且菌丝细弱者即为单核菌丝, 确认后标记为杂交亲本材料。

1.3.3 杂交组合设计 试验采用单孢杂交育种进行种间杂交(两点法)。在同一平板培养基(直径 90 mm)上相距 2.5 cm 分别接种“R”型和“S”型的单核菌丝, 26℃恒温培养。试验共设置 255 对随机杂交组合。

1.3.4 杂交子鉴别 镜检锁状联合: 挑取杂交组合相交部位的菌丝, 制成水封片, 置于 40×10 倍显微镜下观察锁状联合结构; 拮抗试验: 采用三点法在平板培养基中分别接入亲本和杂交子, 26℃培养观察并记录试验结果, 酯酶同工酶电泳法鉴定杂交子: (1) 样品制备: 菌丝体培养: 采用 1.1.3 中的液体培养基, 无菌条件下接种试管斜面菌丝体, 静置 24 h 后置于摇床中 26℃, 220 r/min 条件培养, 培养时间分别设定为 5、7、14 d。收集菌丝球, 用蒸馏水冲洗数次后自然吹干。分别称取 0.5 g 菌丝球, 0.5 g 石英砂, 于研钵中冰浴研磨, 4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 将上清液、蔗糖、溴酚蓝按 (V:V:V)5:1:1 混合制成样品液(研磨离心后的样品须当天使用)。(2) 凝胶制备: 分离胶: 将分离胶缓冲液、分离胶贮液、蒸馏水、过硫酸铵按体积比 2:5:1:4 的比例混合均匀, 用移液枪加入电泳槽中直至距短板上沿 3 cm 处, 并封上适量蒸馏水, 使分离胶液面平行。然后将整个制胶器置于 60℃恒温培养箱中 30 min 左右, 待胶聚合后用吸水纸小心将水吸尽。浓缩胶: 将浓缩胶缓冲液、浓缩胶贮液、过硫酸铵、蔗糖溶液、TEMED 按 1:2:2:4:0.03 的体积比混合均匀, 灌入胶室, 立即插好样品梳, 并用保鲜膜包好, 日光灯下聚合。(3) 点样: 用 50 μL 微量进样器吸取 15 μL 样品液缓慢注入样品槽底部。(4) 电泳: 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 电泳及染色固定方法参照 NY-T 1097-2006^[7]。(5) 结果计算: 置于凝胶成像系统(76S/07969, Biorad)下拍照, 计算迁移率(Rf)和相似系数(Se)。试验分别以“S”型单核菌丝, “R”型单核菌丝和“S”型双核菌丝与试验杂交子菌丝进行酯酶同工酶谱分析对照, 以鉴定其真实性。

1.3.5 杂交子出菇试验 杂交子出菇试验在实验室人工气候箱内进行; 生产应用试验及生产性状观测在“昆山市正兴食用菌有限公司”中试生产车间完成。

2 结果与分析

2.1 孢子收集及单核菌丝筛选结果

钩悬法结果表示, 静置 20 h 的试验处理结果最优, 在培养 1 周后产生大量孢子菌落, 但是该方法污染率高(主要为霉菌污染), 不利于挑取单菌落。

改良种菇弹射法获得的孢子原液, 稀释 10 倍涂布培养, 菌落重叠, 不易挑取; 稀释 1 000 倍培养出的菌落数过少, 只有稀释 100 倍的孢子悬液涂布培养后, 培养皿中菌落数适中。该试验单孢子菌落均以此法获得。试验共获得“S”型单核菌丝 29 株, “R”型单核菌丝 99 株, 分别编号为 S 1~29 号及 R 1~99 号。镜检结果显示“S”型 3, 5, 6, 19, 20, 23~29 号和 R 型 5, 45, 46, 48~50, 54, 55, 58~63, 65~67, 72, 73, 81, 84, 85, 89~91, 99 号菌丝体无锁状联合结构, 菌丝相对纤细, 活力弱(图 1), 可确认为单核菌丝。

表 1 杂交组合镜检及拮抗试验结果

杂交组合编号	有无锁状联合	三点法拮抗试验
		有无 2 条拮抗线
S3×R85	有	无
S3×R46	有	无
S5×R63	有	无
S5×R85	有	有
S6×R49	有	无
S6×R63	有	有
S6×R84	有	有
S19×R54	有	无
S19×R61	有	有
S19×R63	有	有
S20×R62	有	有
S20×R65	有	有
S20×R66	有	无
S20×R67	有	无
S20×R72	有	有
S23×R62	有	有
S23×R65	有	有
S23×R66	有	无
S23×R72	有	有
S24×R62	有	有
S24×R66	有	无
S24×R67	有	无
S24×R72	有	无
S25×R62	有	无
S25×R65	有	无
S25×R66	有	有
S25×R67	有	有
S25×R72	有	无

2.2 杂交试验结果

共做 255 组随机杂交试验。挑取各试验组相交部位的菌丝至 PDA 培养基, 26℃恒温培养, 待菌丝长满, 移至冰箱 4℃保存。共得杂交组合 28 株(表 1)。

2.3 杂交子鉴定结果

对选定的杂交组合进行锁状联合镜检和拮抗试验初筛,最后经酯酶同工酶谱分析确定杂交子。

2.3.1 镜检锁状联合 杂交成功则菌丝为双核体,镜检可观察到锁状联合。镜检上述 28 株杂交组合菌丝,均能观察到锁状联合(表 1),且菌丝强壮,活力旺盛(图 2),认为均为双核菌丝。

2.3.2 拮抗试验结果 试验系统显示,杂交菌株至少对

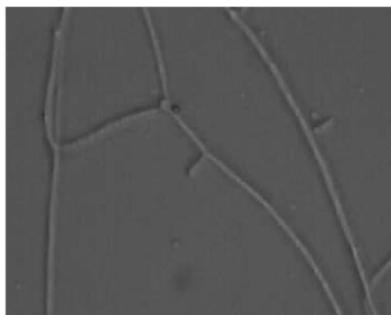


图 1 显微镜下的单核菌丝(40×10)

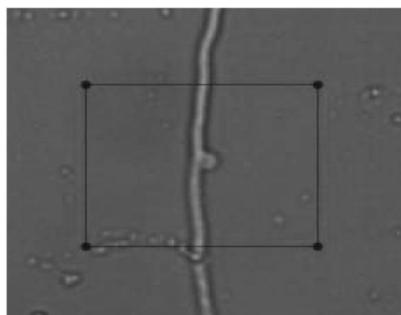


图 2 杂交组合的锁状联合结构(40×10)

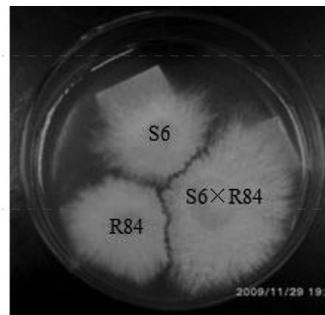


图 3 S6 R84 与 S6×R84 拮抗试验

2.3.3 酯酶同工酶谱分析结果 酯酶同工酶电泳酶带的位置是由编码各酶带的基因直接决定的,所以通过观察酶带的条数、位置、宽度和染色深浅可判断杂交子与亲本的基因组异同⁹⁻¹⁰。下面仅以杂交组合 S6×R84 为代表,来说明酯酶同工酶谱分析的方法与结果。图 4 为单核亲本(S6 和 R84)与杂交子(S6×R84)酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。其模式图及各酶带迁移率分

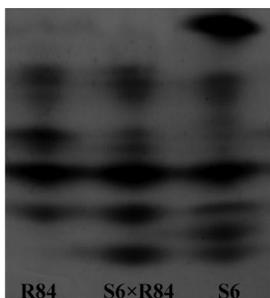


图 4 亲本与杂交子酯酶同工酶图谱

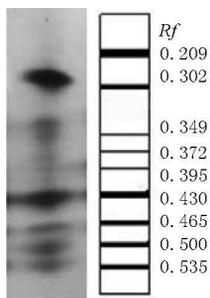


图 5 S6 模式图及迁移率

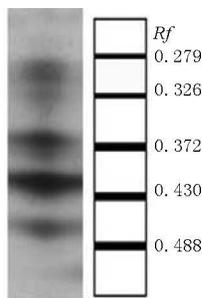


图 6 R84 模式图及迁移率

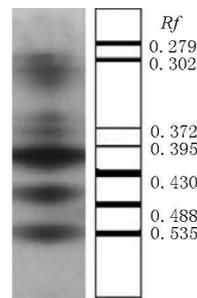


图 7 S6×R84 模式图及迁移率

计算杂交子与单核亲本之间的相似系数 S_e 分别以 S6 和 R84 作为标准样品。

以 S6 为标准样品: $S_e = \frac{2S_{xy}}{(S_x + S_y) + 2S_{xy}} \times 100\% = \frac{2 \times 5}{(4+2) + 2 \times 5} \times 100\% = 62.5\%$; 以 S84 作为标准样品 $S_e = \frac{2S_{xy}}{(S_x + S_y) + 2S_{xy}} \times 100\% = \frac{2 \times 4}{(1+3) + 2 \times 4} \times 100 = 66.67\%$ 。上述计算公式中: S_e —表示被检样品和标准样品二者间相似系数; S_{xy} —表示被检样品和标准

亲本株之一呈明显的拮抗性,有些则对双亲株均呈显拮抗反应,拮抗表现的多样性反映着杂交子变异程度的不同^[8]。上述 28 组杂交菌丝“三点法”拮抗试验结果显示,其中 14 组杂交子与亲本菌落之间产生了明显的拮抗线(表 1、图 3)。在此基础上,进行酯酶同工酶谱分析,进一步验证杂交子真实性。有资料显示,拮抗现象不明显不能确定就为非杂交子,需进一步实验验证。

别见图 5~7。由酯酶图谱和模式图可以看出 S6 有 9 条带, R84 有 5 条带,杂交子有 7 条带。杂交子与 S6 共有的条带数为 5 条,与 R84 共有的条带数为 4。同时显示出酶带的宽度和颜色的深浅不同,这表明酶的活性和含量也是不同的。因此可知所选杂交子是与单核亲本不同的新品种。

样品二者间共有酶带数; S_x —表示标准样品特有酶带数; S_y —表示被检样品特有酶带数。相似系数表明了二者之间的亲缘关系,从结果可以看出杂交菌株 S6×R84 与单核亲本的遗传特性是有明显差别的。

2.4 出菇试验结果

将经过鉴定的杂交子在人工气候箱中进行固体培养料出菇试验^[11],观察其在人工栽培条件下结实能力。结果显示各试验组中,只有编号为“S6×R84”、“S20×R72”和“S5×R85”的杂交子显示出较

好的结实性能。将上述 3 株杂交子在昆山市正兴食用菌有限公司中试车间进行生产应用试验,并以“S”型和“R”型杏鲍菇生产菌种作对照。结果显示,在工厂化设施生产环境中,杂交菌株“S6×R84”活力旺盛,生长出菇正常,形成的子实体菌盖表面光滑,菌肉致密,个体质量较重,集中体现了“S”型和“R”型亲本的优良生产性能(图 8~11)。



图8 亲本“S”型杏鲍菇



图9 亲本“R”型杏鲍菇



图10 生长中的“S6×R84”杏鲍菇



图11 “S6×R84”杏鲍菇子实体

为了进一步验证杂交菌株的真实性,经组织分离得到“S”型和“S6×R84”的菌丝体培养物,进行酯酶同工酶谱分析比照,结果见图 12。可以看出“S”型有 5 条酶带,杂交子有 7 条酶带,二者有明显区别。计算相似系数为 66.67% TV,说明所得的杂交菌株“S6×R84”确为杏鲍菇新品种。

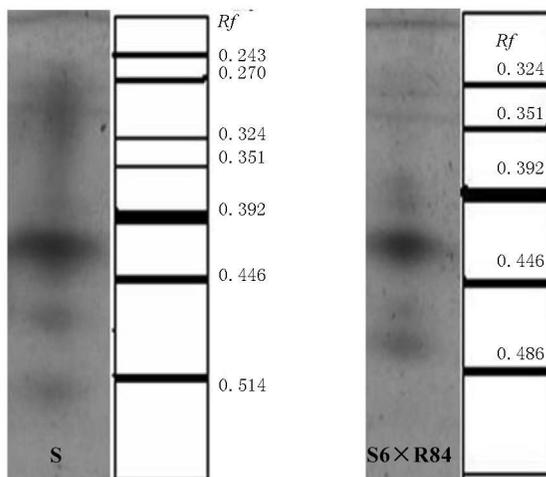


图12 “S”型与杂交株“S6×R84”酯酶同工酶谱及模式

以 S 型作为标准样品,计算杂交子“S6×R84”与

“S”型之间的相似系数 Se : $Se = \frac{2S_{xy}}{(S_x + S_y) + 2S_{xy}} \times$

$100\% = \frac{2 \times 4}{(1+3) + 2 \times 4} \times 100\% = 66.67\%$ 。

3 结论与讨论

利用单核菌丝进行杏鲍菇种间杂交育种的方法是可行的。相对于父本,杂交菌株具有一定的优势,杂交子“S6×R84”表现出优于父本的良好生产性状,经过生产适应性驯化,极可能成为性状优良的工厂化生产品种新资源。

在遗传育种中酯酶同工酶电泳鉴别方法准确度高,条件也相对易于控制。然而在实际操作过程中,也存在着温度条件难控制,酶活性不稳定等问题^[10]。已有研究表明,真菌同工酶分析结果易受取样部位(营养菌丝体、子实体、分生孢子、菌核等)、核相(双核、单核)以及培养条件(包括培养时间、培养基)的影响,而导致结果的不稳定和不准确。该试验中发现,杏鲍菇酯酶同工酶的种类和酶活性与菌丝球的液体培养时间有关,培养时间越长酶谱中酶带颜色越深(酶活性越强),因此,电泳条件的控制和一致性是极为重要的^[12]。在以后的试验中需继续对最佳的试验条件进行摸索,以获得更高的准确度。此外,杂交子尚需通过回交试验观察 F₂ 代的遗传稳定性及生产稳定性,并进一步改良品种性状^[13-14]。

参考文献

- [1] 贺新生. 食用菌组织分离技术[J]. 食用菌, 2001(1): 22-23.
- [2] 陈娟, 苏开美. 食用菌遗传育种及种质鉴定研究进展[J]. 中国食用菌, 2008, 27(5): 3-8.
- [3] 马三梅, 王永飞, 亦如潮. 食用菌育种的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(4): 108-112.
- [4] 桂明英, 王刚, 郭永红, 等. 食用菌育种技术的研究进展[J]. 食用菌, 2005(5): 3-5.
- [5] 赵厚坤, 李云龙, 刘柱. 黑木耳杂交育种试验[J]. 中国食用菌, 2008, 27(1): 19-21.
- [6] 刘日新. 食用菌的研究与利用[J]. 中国食用菌, 1997, 17(4): 5-7.
- [7] NY-T 1097-2006. 食用菌菌种真实性鉴定, 酯酶同工酶电泳法[S].
- [8] 戴秉丽. 原生质体技术在食用菌育种中的应用研究[J]. 中国食用菌, 1995(6): 17-19.
- [9] 刘庆, 徐兴华. 电泳法分析食用菌酯酶同工酶方法的优化[J]. 生命科学仪器, 2008, 6(5): 42-43.
- [10] 杨立红, 辛晓林, 蔡德华, 等. 酯酶同工酶在食用菌菌种选育中的应用研究[J]. 中国食用菌, 2004, 23(5): 10-12.
- [11] 郑安波, 赵坤. 杏鲍菇栽培技术[J]. 现代化农业, 2009(8): 5-6.
- [12] Micales J A, Bonde M R, Pererson G L. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics [J]. Mycotaxon, 1986, 27: 405-449.
- [13] 吕舟舟. 食用菌栽培学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 70-72.
- [14] 刘宇, 陈文良, 王丽珍, 等. 杏鲍菇 13 号杂交菌株选育研究[J]. 食用菌学报, 2004, 3(1): 61-64.

云南大白口蘑子实体中秋水仙碱含量的 TLC 法测定研究

刘鸿高¹, 王元忠²

(1. 云南农业大学, 云南 昆明 650201; 2. 云南省农业科学院 药用植物研究所, 云南 昆明 650223)

摘要: 采用超声法提取云南大白口蘑子实体中的秋水仙碱, 并用薄层扫描法来测定其含量。结果表明: $\lambda=352\text{ nm}$, 秋水仙碱线性范围为 $0.08\sim0.94\ \mu\text{g}$, 相关系数为 0.9994 , 平均回收率为 99.65% , $RSD=3.98\%$; 该法准确、简便、快速、重复性好, 适用于优质单株的高通量筛选。

关键词: 薄层扫描法; 大白口蘑; 子实体; 秋水仙碱含量

中图分类号: S 646.1⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)24-0193-02

云南大白口蘑 (*Tricholoma giganteum* Masee) 属于口蘑科白蘑属真菌^[1]。据报道大白口蘑栽培子实体中氰化物含量为 $86\sim283\text{ mg/g}$, 自然生境中野生子实体中氰化物的含量低于 1.0 mg/g , 且以单质形式存在^[2]。但是经过轻微的处理, 如超过 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的烘干, 烹饪和油炸能破坏产氰组织。目前食用大白口蘑未见中毒或其它报道, 因此子实体中的氰化物对消费者的健康不会产生影响^[3]。未熟透的金针菇中含有秋水仙碱, 人食用后容易因氧化而产生有毒的秋水仙碱, 对胃肠黏膜和呼吸道黏膜有强烈的刺激作用。一般在食用 $0.5\sim4\text{ h}$ 内, 会出现咽干、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等症状, 如大量食用还会引起发热、水电解质平衡紊乱、便血、尿血等严重症状^[4]。为探究云南大白口蘑子实体中秋水仙碱含量, 现采用超声法提取, 薄层扫描法进行测定。

第一作者简介: 刘鸿高(1974), 男, 云南武定人, 副教授, 现主要从事资源真菌开发与利用研究。

基金项目: 教育部科学技术研究重点资助项目(209118); 云南省自然科学基金资助项目(2008CD128)。

收稿日期: 2010-10-15

1 材料与方法

1.1 试验材料

从云南普洱南屏镇整碗村慈竹丛中地上采集到的丛重 45 kg 野生大白口蘑子实体和人工栽培获得子实体。供试材料经 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干后, 用植物粉碎机粉碎, 过 100 目筛备用。

1.2 仪器和试剂

薄层扫描仪 TLC SCANNER 3(瑞士卡玛公司), 带 winCATS 软件和半自动点样仪, 超声波清洗器(上海 BRANSON, SB2200), 微型旋涡混合仪(上海泸西分析仪器厂, WH-2); 秋水仙碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号为 110788-200968)、甲醇、三氯甲烷、乙醇均为分析纯, 硅胶 GF254 板(青岛海洋化工厂)。

1.3 秋水仙碱的提取

精密称取样品 0.3000 g (12 份), 置于 10 mL 具塞管中, 加 75% 乙醇 3.0 mL , 超声提取 30 min , 倒入离心管中以 5000 r/min 离心 5 min , 取上清液, 备用。

1.4 TLC 色谱条件

展开剂: 三氯甲烷-甲醇($9.0:0.5$); 采用单波长荧光线性扫描法, $\lambda=352\text{ nm}$ 。

Breeding New Strain of *Pleurotus eryngii* Suitable for Cultivation in Industry by Hybridization

ZHOU Yun¹, ZHU Jing¹, ZHENG Xue-ping², WU Jin-nan¹, YAO Lu-ye¹, JI Hong¹

(1. College of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500; 2. Kunshan City Zhengxing Edible Fungi Company Limited, Kunshan, Jiangsu 215321)

Abstract: Using the method of hook hanging and improved ejection, the good character of *Pleurotus* were concentrate expressed by cross-breeding methods of single spore collect, hyphal fusion, esterase isozyme analysis to smooth type (S type) and rough (R type), acquired good crossbred. The results showed that the use the methods of interspecific hybridization breeding of mushroom by the mononuclear mycelium was feasible; hybrids $S6\times R84$ showed good production traits than male parent, after production of adaptive domestication, most likely a good trait variety of new resources for industrial production.

Key words: *Pleurotus eryngii*; monospore-hybridization; hybrid; esterase-isoenzyme electrophoresis