

DOI:10.11937/bfyy.201506041

白灵菇品种选育研究

徐 兵, 姚 璐 晔, 朱 婧, 冀 宏

(常熟理工学院 生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500)

摘 要:以“白灵0号”、“白灵1号”、“白灵2号”3种白灵菇孢子为试材,采用杂交育种及紫外诱变育种技术,在致死率75%条件下进行紫外线诱变处理;以其为亲本,采用单孢杂交(两点法)进行单核菌丝体交配后,观测菌丝的“锁状联合”、拮抗试验(三点法)和酯酶同工酶谱鉴定杂交子。通过杂交子与亲本的菌丝体生长速度、色泽及菌丝体密度对比,筛选出优势菌株26株,选育白灵菇新品种。结果表明:经过诱变处理的白灵菇孢子具有较高杂交亲和性,且杂交子呈现正向变异率高的特点。

关键词:白灵菇;紫外诱变;单孢杂交;生长速度;酯酶同工酶电泳

中图分类号:S 646.1⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)06-0147-05

白灵菇(*Pleurotus nebrodensis*)属真菌门担子菌纲伞菌目侧耳科侧耳属^[1],学名为白灵侧耳。虽已人工栽

第一作者简介:徐兵(1982-),男,本科,实验师,研究方向为食用菌学。E-mail:xubing@cslg.cn.

责任作者:冀宏(1969-),男,博士,教授,现主要从事食用菌工程技术及现代农业技术经济与管理等研究工作。E-mail:jihong@cslg.cn.

基金项目:江苏省科技计划资助项目(BE2013346)。

收稿日期:2014-11-10

培多年,但是工厂化栽培菌株的农艺性状和商品性状仍不令人满意,主要原因是由于对白灵菇遗传学的了解远逊于双孢菇、香菇等其它种类,加上野生资源稀少,严重制约着优良品种的选育^[2],因此加快选育白灵菇工厂化生产优良性状新品种是相关技术研究所关注的主要方向^[3]。

杂交育种和诱变育种技术已在食用菌品种选育改良中普遍应用并取得成功,在食用菌遗传研究与育种工

[8] Sairam R K, Srivastava G C. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress [J]. Plant Science, 2002, 162(6): 897-904.

[9] 张志良, 瞿伟菁, 李小方. 植物生理学实验指导[M]. 4版. 北京: 高等

教育出版社, 2009: 227-229.

[10] 段才绪, 何平, 谢英赞, 等. 盐胁迫对决明种子萌发和幼苗生理特性的影响[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2013, 38(2): 73-78.

Effect of Salt Treatment on Germination of *Cassia obtusifolia* L. Seed

TAO Hong-zheng^{1,2}, SHEN Yun-mei^{1,2}, LI Li-rong¹, TIAN Xue-jun¹

(1. College of Life Science and Technology, University of Honghe, Mengzi, Yunnan 661100; 2. Key Laboratory of Crop High Quality and Efficient Cultivation and Security Control of College in Yunnan Province, Mengzi, Yunnan 661100)

Abstract: *Cassia obtusifolia* L. seed was used as the material, treated by different concentration of NaCl, then the germination indexes, radical length, hypocotyl length, biomass, soluble protein content, soluble sugar content, malondialdehyde content and relative electric conductivity was measured to research effect of salt treatment on germination of *Cassia obtusifolia* L. seed. The results showed that, low concentration (25 mmol/L) of salt treatment promoted seed germination and soluble sugar content; middle concentration (50 mmol/L) of salt treatment had no significant effect on germination indexes, but restrained hypocotyl length and biomass and promoted soluble protein content, soluble sugar content and relative electric conductivity; high concentration of salt treatment (100 and 200 mmol/L) restrained the seed germination significantly, promoted accumulation of soluble protein content, soluble sugar content, malondialdehyde content and relative electric conductivity. So, low concentration of salt was benefit for germination of *Cassia obtusifolia* L. seed, but high concentration of salt was harmful.

Keywords: salt treatment; *Cassia obtusifolia* L. seed; germination indexes; physiological indexes

作中,自交技术的运用报道较少,尚晓冬等^[4]通过多孢自交对刺芹侧耳建立的自交双核群体菌丝相对生长性状进行研究,结果发现自交双核体后代相对生长与菌丝生长速度有较高的相关性,且相对生长的结果比菌丝生长速度更加可信。苏蓉等^[2]用多孢自交方法研究金针菇后代生物学性状的遗传规律,同时拓宽了种质资源,并筛选了适合工厂化栽培的优良新品种。

白灵菇属四极性异宗结合的食用菌,是双因子控制的交配系统。基于此,该试验设计应用紫外诱变和单孢杂交多重育种技术,经过鉴定试验确定真实的白灵菇杂交子,并通过其菌丝体培养的形态学观察和生长速度测定,初步筛选出优势菌株,为白灵菇工厂化生产优良品种选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株“白灵0号”、“白灵1号”、“白灵2号”分别采自河北省保定市、江苏省常熟市产区(表1),以3个品种为该试验杂交亲本,经分子生物学指纹对比技术鉴定(另文报道),为不同的白灵菇栽培品种。试验时选择生长健壮、无杂菌、无病虫害白灵菇,切取菌盖(菌褶)组织部分2~3块。

表1 供试菌株

品种编号 Strain No.	菇形 Shape of mushroom	来源 Origination	菌丝体颜色 Mycelium colour	菌丝体密度 Mycelium density
“白灵0号”	柱状	常熟市(食用菌基地)	白	密
“白灵1号”	掌状	常熟市(食用菌基地)	白	密
“白灵2号”	掌状	保定市(食用菌基地)	白	密

固体培养基(PDA):马铃薯20 g,葡萄糖2 g,琼脂2.4 g,自来水1 L,pH自然。液体培养基:葡萄糖2 g,蛋白胨0.4 g,磷酸二氢钾0.3 g,硫酸镁0.15 g,维生素B₁0.002 g,蒸馏水1 L,pH自然。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种组织分离 将事先切好的白灵菇菌盖带入无菌室内,用75%酒精快速擦洗表面,用无菌水冲洗多次,无菌操作取内部组织0.5 cm³左右的组织块接种于试管培养基中部,26℃恒温培养9~10 d。

1.2.2 孢子收集 种菇弹射法:在无菌环境下,用酒精棉擦拭菌盖表面进行消毒,采用该实验室研发的“食用菌孢子采集器”^[5]。供试白灵菇孢子及孢子粉:用无菌接种环挑取3环孢子粉至10 mL无菌水中制成孢子悬液;再用无菌水分别稀释10、100、1 000倍,并用1 mL无菌移液管分别吸取0.2 mL孢子悬液至PDA培养皿中(吸不同稀释倍数的孢子悬液需换移液管),涂布,每一浓度梯度做3个平行,贴好标签,倒置,26℃恒温培养观察。

1.2.3 紫外诱变致死率曲线测定^[6] 分别制备稀释10、

100、1 000、10 000倍孢子悬液,每个稀释梯度均取5 mL悬液于直径9 cm的培养皿中,置紫外诱变灯管(有效波长254 nm)30 cm处照射,不断改变照射时间,进行诱变处理,再分别吸取0.2 mL处理液涂布平板培养基,每组设3个平行,用黑纸包好,于26℃恒温倒置培养,进行菌落计数,与未经诱变的对照组进行比较,计算致死率,绘出致死率曲线。

1.2.4 孢子悬液的诱变处理^[7] 选取致死率75%条件下进行诱变处理,每组处理设3个平行,诱变处理结束涂布平板培养基,黑暗条件下,26℃恒温培养7 d,观察并挑选生长速度快的单个菌落,移入斜面培养,4℃保存。

1.2.5 单核菌丝鉴定 无菌挑取上述各试验组培养菌丝体(诱变处理和未诱变处理)制成水封片,置于高倍(40×)显微镜下观察,无锁状联合且菌丝细弱者即为单核菌丝^[1],确认后4℃保存并作为杂交亲本材料。

1.2.6 种间单孢杂交试验 诱变单孢子杂交:将经过诱变处理的,分别来自“白灵0号”和“白灵2号”的单核菌丝进行杂交配对。试验共设计了110个杂交组。诱变单孢子与未诱变单孢子杂交:诱变处理过的“白灵0号”单孢子与未处理“白灵1号”单孢子杂交;诱变处理过的“白灵2号”单孢子与未处理“白灵0号”单孢子杂交,分别设计36对杂交组。杂交子鉴别:镜检锁状联合:挑取杂交组合相交部位的菌丝,制成水封片置于高倍显微镜下观察。拮抗反应试验^[8]:采用三点法在平板培养基中分别接入亲本和杂交子,培养并观察有无拮抗线。酯酶同工酶电泳法鉴定杂交子^[9-12]。

1.2.7 杂交子生长情况对比试验^[11] 将鉴定确认的不同组合杂交子分别接种于含30 mL培养基,直径为9 cm的平板培养皿中央,每皿接入直径约为8 mm、厚0.1 mm的活化菌丝体1块,置于26℃下恒温倒置培养,每个处理做3个平行,每个处理3个重复。当其中任一处理长满培养皿时,结束培养,记录菌丝体生长天数和菌落半径,计算生长速度,观察菌落(菌丝体)形态及长势,进行分析、比较。菌丝体生长速度(cm/d)=菌落半径(cm)/生长天数(d)。

2 结果与分析

2.1 孢子收集

经培养7~10 d,在孢子采集器培养基表面可观察到若干白色菌落,从理论上即为孢子萌发的单核菌丝体。共得到“白灵0号”孢子(单核菌丝体)40个,“白灵1号”孢子(单核菌丝体)30个,“白灵2号”孢子(单核菌丝体)30个。同时采集得到各品种孢子粉若干。分别置4℃,干燥保存备用。

2.2 孢子紫外诱变结果

试验发现,随着紫外诱变处理时间的递增,白灵菇孢子萌发菌落数递减。在0~40 s照射时间内,曲线变

化很剧烈;40 s以后,曲线基本呈现直线,表明致死率达到100%。得到白灵菇孢子诱变剂量效应曲线如图1所示。

根据相关文献报道^[2,12],致死率在70%~80%时,既能扩大变异的幅度,又能促进变异趋向正变。由图1可知,致死率为75%时,照射时间约为30 s,故确定此剂量作为该试验诱变剂量。经过紫外诱变及筛选得到“白灵0号”诱变孢子31个,“白灵2号”诱变孢子40个。

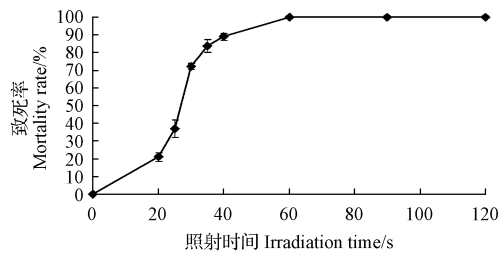


图1 白灵菇孢子紫外线诱变剂量效应曲线
Fig.1 *P. nebrodensis* spore UV mutagenesis dose-response curve

2.3 亲本单核菌丝筛选结果

镜检发现,亲本单核菌丝相对纤细,无“锁状联合”。通过筛选,挑选单核菌丝,结果如表2、图2所示。

2.4 杂交配对试验结果

共计杂交配对处理182组,其中,诱变“白灵0号”×诱变“白灵2号”杂交组合110组,“白灵1号”×诱变“白灵0号”杂交组合36组,“白灵0号”×诱变“白灵2号”杂交组合36组。

表3 杂交子鉴别结果

Table 3 Number of hybrids recorded table

Monospore hybridization	杂交组合 Hybrid group number/组	镜显 Microscopy	拮抗 Antagonism
诱变“白灵0号”×诱变“白灵2号” Mutate ‘Bailing No. 0’×Mutate ‘Bailing No. 2’	110	36	28
诱变“白灵1号”×诱变“白灵0号” Mutate ‘Bailing No. 1’×Mutate ‘Bailing No. 0’	36	7	5
诱变“白灵0号”×诱变“白灵2号” Mutate ‘Bailing No. 0’×Mutate ‘Bailing No. 2’	36	11	11
总计 Totle	182	54	44

2.4.2 拮抗试验验证结果 通过三点拮抗试验观察,共筛选得到杂交子44组,具体情况见表3所示。当每相邻2个菌株菌落间都有明显拮抗线时,即可判断为杂交子(图3)。

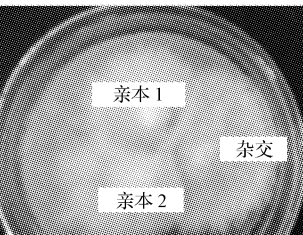


图3 三点法拮抗试验示意图

Fig.3 Antagonistic test diagram of three-point method

表2 孢子(单核菌丝)镜检筛选结果

Table 2 Cystourethroscopy results

品种编号 Strain No.	无突变 No mutated	突变 Mutated
“白灵0号”“Bailing No. 0”	12	12
“白灵1号”“Bailing No. 1”	15	—
“白灵2号”“Bailing No. 2”	8	20

注:镜检后未诱变的孢子中“白灵0号”依次标号为0-1~0-12;“白灵1号”依次标号为1-1~1-15;“白灵2号”共计8个分别为2-10、2-15、2-16、2-17、2-18、2-20、2-21、2-23;诱变“白灵0号”编号为Y0-1~Y0-12。诱变“白灵2号”编号为Y2-1~Y2-20。

Note:Based on the microscopy results,the spores of ‘Bailing No. 0’ with no mutated named as 0-1~0-12,the spores of ‘Bailing No. 1’ with no mutated named as 1-1~1-15,the spores of ‘Bailing No. 2’ with no mutated named as 2-10、2-15、2-16、2-17、2-18、2-20、2-21、2-23;and then the spores of ‘Bailing No. 0’ with mutated named as Y0-1~Y0-12, the spores of ‘Bailing No. 2’ with mutated named as Y2-1~Y2-20.

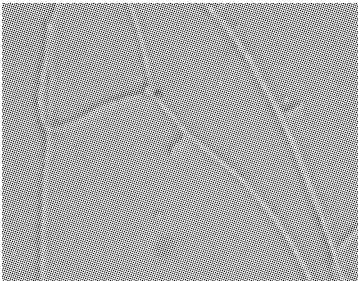


图2 显微镜下的单核菌丝(40×10)

Fig.2 The mononuclear hyphae under the microscope(40×10)

2.4.1 杂交子鉴别 通过镜检观察菌丝有无“锁状联合”结构,初步挑选成功杂交子,结果见表3。

2.4.3 酯酶同工酶电泳鉴别杂交子^[6-7,9] 以杂交组合Y0-1×Y2-9(编号1的“白灵0号”诱变处理孢子×编号9的“白灵2号”诱变处理孢子)为例,进行酯酶同工酶图

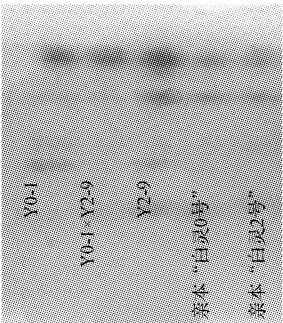


图4 亲本与杂交子酯酶同工酶图谱

Fig.4 Parents and hybrids esterase isozyme diagram

谱分析,结果如图 5、6 所示。由酯酶图谱和模式图可以看出,Y0-1 有 6 条带(图 5),Y2-9 有 6 条带(图 6),该杂交子 Y0-1×Y2-9 有 4 条带(图 7)。Y0-1×Y2-9 与 Y0-1 共有的条带数为 3 条,与 Y2-9 共有的条带数为 2。试验表明,所选杂交子是与单核亲本不同的新品种。

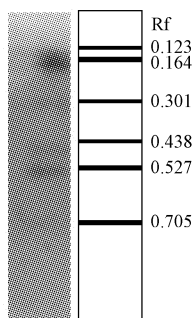


图 5 Y0-1 模式图及迁移率

Fig. 5 Y0-1 pattern and the mobility

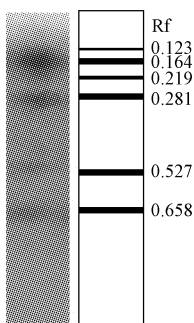


图 6 Y2-9 模式图及迁移率

Fig. 6 Y2-9 pattern and the mobility

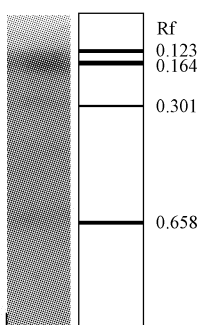


图 7 Y0-1×Y2-9 模式图及迁移率

Fig. 7 Y0-1×Y2-9 pattern and the mobility

2.5 杂交子生长情况

2.5.1 诱变单孢杂交子生长情况 取“白灵 0 号”的诱变单孢子与“白灵 2 号”诱变单孢子做随机杂交,经过上述鉴定得到 28 对杂交子,对其进行生长速度、菌丝体颜色、菌丝体密度的观察,结果见图 10。显示共有 23 组杂交子在生长速度上较亲本具优势,除去菌丝体颜色灰白的和菌株菌丝体稀疏杂交子菌株:Y0-2×Y2-5、Y0-4×

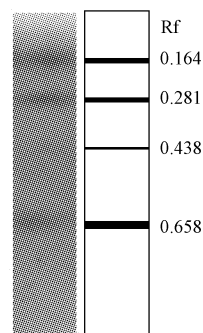


图 8 亲本“白灵 0 号”模式图及迁移率

Fig. 8 Parental 'Bailing No. 0' pattern and the mobility

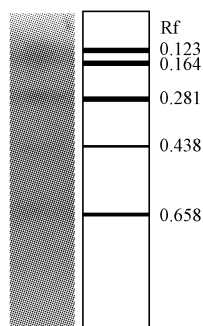


图 9 亲本“白灵 2 号”模式图及迁移率

Fig. 9 Parental 'Bailing No. 2' pattern and the mobility

Y2-1、Y0-4×Y2-5、Y0-4×Y2-28,共获得 19 组优势菌株。

2.5.2 诱变单孢子与未诱变单孢子杂交子生长情况 诱变处理过的“白灵 0 号”单孢子与未处理“白灵 1 号”单孢子杂交,共得杂交子 5 个,进行生长速度、菌丝体颜色、菌丝体密度的观察,结果如图 11 所示。生长速度表现优势的杂交子有 3 个,分别为:1-2×Y0-12、1-5×Y0-4、1-11×Y0-1;从菌丝体密度与颜色看优势菌株有 1-7×Y0-2、1-11×Y0-1。共计 4 个优势菌株,其中只有杂交子 1-11×Y0-1 在生长速度,菌丝体颜色,菌丝密度上均显示出优势特征。诱变处理过的“白灵 2 号”单核菌丝体与未处理“白灵 0 号”单核菌丝体杂交,共得杂交子

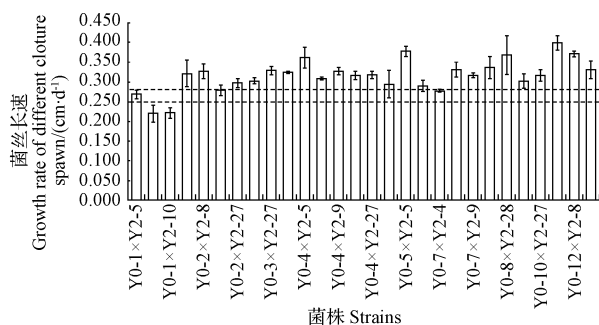


图 10 诱变杂交子菌株菌丝体生长情况

Fig. 10 The growth state of mutagenesis hybrids stains

11 个,对其进行生长速度、菌丝体颜色、菌丝体密度的观察,结果如图 12 所示。生长速度优势杂交子只有 0-6×Y2-5,从菌丝体密度与颜色看优势菌株 3 个:0-3×Y2-4、0-6×Y2-5、0-6×Y2-9。其中,菌丝体生长速度快,菌丝体颜色洁白,密度大的只有杂交子 0-6×Y2-5。

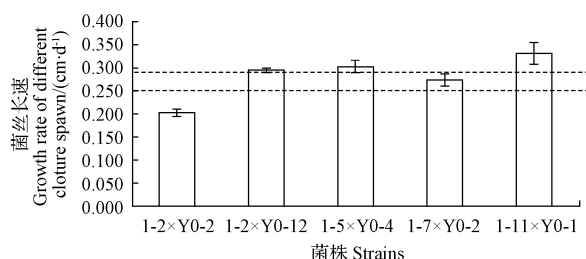


图 11 诱变后单孢子与未诱变单孢子杂交子生长情况

Fig. 11 The growth state of different hybrids stains of mutated spores and no mutatetl spores

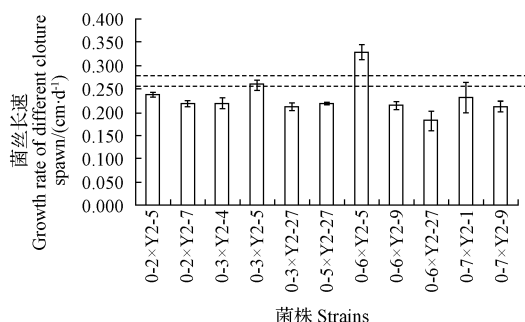


图 12 诱变处理过的“白灵 2 号”单核菌丝体与未处理“白灵 0 号”单核菌丝体杂交杂交子生长情况

Fig. 12 The growth state of different hybrids stains of mutated mononuclear hyphae 'Bailing No. 2' and no mutated mononuclear hyphae 'Bailing No. 0'

3 结论

该试验 182 组白灵菇杂交处理,镜检具锁状联合的杂交子有 54 个,再经过拮抗试验鉴定和酯酶同工酶电泳分析,最后筛选出 44 个配对成功的杂交子菌株。通过菌丝体颜色、生长密度观测和菌丝体生长速度比较,共获得 26 个优势杂交子菌株。试验发现经过诱变处理的白灵菇孢子具有较高杂交亲和性,且杂交子呈现正向变异率高的特点,分析可能是诱变导致基因型改变所致。菌丝体生长速度与生物学效率没有明确的正相关性^[13],因此,想要获得生产性状优势菌株,还需要做进一步的出菇栽培试验。

参考文献

- [1] 张金霞. 中国食用菌菌种学[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [2] 苏蓉,尚晓冬,谭琦. 金针菇自交后代生物学特性的研究[J]. 菌物学报,2009,28(3):378-384.
- [3] 贺新生. 食用菌菌组织分离技术[J]. 食用菌,2001(1):22-23.
- [4] 尚晓冬,程继红,谭琦. 刺芹侧耳菌丝相对生长性状的研究[J]. 食用菌学报,2007,14(4):9-13.
- [5] 冀宏,徐兵,姚璐晔. 食用菌孢子采集器[P]. 中国,201220020991,2012-08-29.
- [6] 李红梅. 杏鲍菇遗传分化研究及工厂化栽培优良菌株筛选[D]. 上海:上海海洋大学,2008.
- [7] 李静. 白灵菇孢子诱变杂交子代优良菌株的筛选[D]. 保定:河北农业大学,2007.
- [8] NY/T 1845-2010. 食用菌菌种区别性鉴定拮抗反应[S].
- [9] NY/T 1097-2006. 食用菌菌种真实性鉴定酯酶同工酶电泳法[S].
- [10] 周云,朱婧,郑雪平,等. 工厂化栽培品种杂交育种研究[J]. 北方园艺,2010(24):189-193.
- [11] 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.
- [12] 吴建,梅吴明,霞卢勤. 酯酶同工酶电泳法鉴定特优组合种子纯度效果研究[J]. 福建稻麦科技,2003(6):18-20.
- [13] 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):61-64.

Study on Selective Breeding of Mushroom *Pleurotus ferulae*

XU Bing, YAO Lu-ye, ZHU Jing, JI Hong

(College of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu Jiangsu 215500)

Abstract: With 'Bailing No. 0', 'Bailing No. 1', 'Bailing No. 2' monospore as test materials, cross breeding and UV mutation breeding technology were used to select breeding mushroom *Pleurotus ferulae*. UV mutagenic treatment under the condition of the fatality rate of 75%. As parents, the single spore hybridization method was adopted to mononuclear mycelium after mating, Hybrids were primarily identified with clamp connection, then confirmed by antagonistic test and esterase isoenzyme analysis. The 26 strains were selected based on the comparison of mycelial growth rate, color and density among parent strain and hybrids. The results showed that *Pleurotus ferulae* spores treated by UV mutagenesis had high cross compatibility, and then hybrid had the characteristics of high positive mutation rate.

Keywords: *Pleurotus ferulae*; UV mutagenesis; monospore hybridization; growth rate; esterase isoenzyme electrophoresis