

超声-高温诱导茶薪菇厚垣孢子育种研究

朱维红, 苗晓燕, 张筱梅, 许 婷, 张保石

(保定学院 生化系, 河北 保定 071000)

摘 要:以茶薪菇 SM(三明原株)、At103(退化株)2 种菌株分离出的厚垣孢子为新型育种材料,采用超声波-高温复合处理,比较各处理间菌丝长势及出菇情况,探讨茶薪菇厚垣孢子诱导育种的可行性。结果表明:超声-高温处理对厚垣孢子育种具有明显促进作用,以超声波 300 W、15 min,复合 40 ℃ 高温处理 6 h 效果较好,其中 S3 菌株增产 29.6%。退化不出菇菌株厚垣孢子诱导后可分化形成子实体,生物转化率 30%。

关键词:茶薪菇;退化株;厚垣孢子;诱导

中图分类号:S 646.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)04-0132-05

茶薪菇(*Agrocybe aegerita* Huang)日益受人们喜爱,市场需求量逐年增多,但连续生产栽培发现其减产现象十分明显,新优菌株常常使用半年或一年,菌丝活力、子实体产量和性状便明显下降,菌株退化常导致栽培户经济损失严重。传统的茶薪菇育种方式较多,主要包括原生质诱变育种^[1]、组织分离、多孢快速育种^[2]、性遗传模式等^[3],这些多以有性孢子或菌丝细胞为材料,方法繁琐、周期较长,不能满足生产需要,亟待寻找新型育种方法及抗逆境强、保藏期长及种质纯系的育种材料。课题组多年研究发现,茶薪菇厚垣孢子壁厚,抵御外界不良环境能力强^[4-5],胞体较大,适合条件下可萌发形成菌丝^[6-8],进一步分化形成子实体,该试验以茶薪菇典型厚垣孢子为试材,采用超声波-高温进行复合诱导,以其得到子实体性状及产量优良的生产菌株,由此进一步确定厚垣孢子作为育种新材料的可行性意义,开辟茶薪菇无性孢子育种新途径,同时为退化菌株恢复及育种保藏提供新材料,为丰富种质资源提供借鉴。

第一作者简介:朱维红(1970-),女,本科,高级实验师,研究方向为微生物应用。E-mail:zhuweihonglxn@126.com

责任作者:张筱梅(1957-),女,本科,教授,研究方向为食用真菌。E-mail:zhxm06@163.com

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2013104055);保定学院食药菌驯化育种与开发科研团队资助项目(KXT02013007)。

收稿日期:2016-10-20

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 茶薪菇 SM(三明原株)、At103(退化株),由保定学院细胞生物学实验室保藏。

1.1.2 培养基 母种培养基:马铃薯 20%,麦麸 2%,玉米粒 1.5%,葡萄糖 2%,琼脂 1.8%。平板培养基:马铃薯 20%,麦麸 2%,玉米粒 1.5%,K₂HPO₄ 0.1%,葡萄糖 2%,琼脂 1.8%。栽培种培养基:木屑 35%,棉籽皮 47%,麦麸 13%,玉米面 3%,红糖 1%,石膏 1%。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝平板培养 供试菌株进行二次斜面转管活化,转入平板培养基,从原菌株中挑取一小块接入分装的平板中,每板接 5 小块,25 ℃ 恒温培养^[8-10] 6~10 d,当菌丝长满整个平板,表面菌丝开始变得较干燥,颜色略深时挑取少量菌丝制片于显微镜下观察,发现有较多厚垣孢子时停止培养,冰箱保存备用。

1.2.2 厚垣孢子分离纯化 平板菌丝用接种勺轻轻刮取,加适量无菌水适度研磨 4~6 min。80 目筛过滤收集滤液,1 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,沉淀重复 3 次离心,加 1%纤维素及蜗牛复合酶液 26 ℃ 消化 4 h,1 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,沉淀加 2 mL 生理盐水,计数后冰箱保藏备用。

1.2.3 温度单因子诱导 纯化厚垣孢子悬液分别置于 15、25、35、45、55 ℃ 诱导 6 h 后,转 25 ℃ 培育 20 h,记录萌发率,观察细胞原生质变化,以菌丝为对照。

1.2.4 超声-高温复合因子诱导 孢子悬液经超声波 300 W 处理 10 min^[9-11]后分别于 30、35、40 ℃下静置,6 h 后各取 0.1 mL 至培养基平板涂布,25 ℃恒温倒置培养,每处理 3 次重复。记录厚垣孢子萌发时间及萌发率。

1.2.5 菌丝萌发及长速比较 待复合诱导处理平板出现纤细单一菌落时,挑取长势优良菌丝转斜面,连续 3 次转管,选出生长快,长势均匀的菌丝。记录菌丝萌发时间、状态、数量统计、萌发率等,比较不同温度处理间的差异,进行显著性分析。

1.2.6 子实体农艺性状比较 筛选不同处理的优良菌株进行栽培袋出菇试验,每袋干料 150 g,每处理 5 次重复,记录菌丝长速、满袋时间、现蕾时间,描述农艺性状。

1.2.7 拮抗试验 将优选出的诱导菌株与原菌株成对接入平板,菌块相距 20 mm,25 ℃培养 14 d 观察拮抗现象。

1.3 数据分析

以子实体产量、形态、增产率作为主要指标,比较超声-温度对子实体农艺性状的差异,应用 SPSS 软件对茶薪菇厚垣孢子的诱导效果进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 高温单因子对厚垣孢子细胞的诱导作用

由表 1 可知,处理后 SM 厚垣孢子在 25~45 ℃均萌发生长,25 ℃萌发率最高(47.8%),芽管原生质密度较大,分布不均;15、55 ℃各样本均未见萌发,表明低于 15 ℃及高于 55 ℃不利于孢子萌发;对照菌丝萌发率较低,45 ℃处理未见萌发,说明厚垣孢子较菌丝细胞的耐高温性强。显微观察发现,45~55 ℃高温处理后茶薪菇厚垣孢子原生质变得浓密,胞内颗粒物质分布出现明显的区域性,反映出高温对厚垣孢子细胞物质分布有显著影响(图 1)。

表 1

高温对 SM 茶薪菇厚垣孢子细胞的诱导作用

Table 1

Induction of high temperature on *Agrocybe aegerita* Huang cell

处理 Treatment	厚垣孢子 Chlamydospore					菌丝(CK) Component mycelium				
温度 Temperature/℃	15	25	35	45	55	15	25	35	45	55
萌发率 Germination rate/%	0	47.8	42.5	9.6	0	0	31.3	25.6	0	0
原生质 Protoplasm	—	较密均匀	浓密不均	浓密不均	—	—	较密均匀	较密均匀	—	—

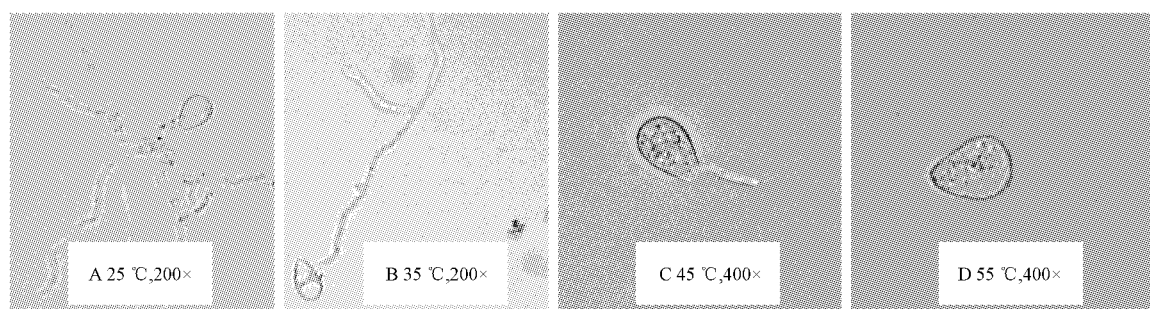


图 1 高温对 SM 厚垣孢子细胞物质分布的影响

Fig. 1 Effect of high temperature on the distribution of chlamydospore material from SM

2.2 超声-高温复合诱导对厚垣孢子萌发的影响

厚垣孢子经超声波及不同温度处理后均萌发生长,平板培养 9 d 观察,30 ℃最早 6 d 萌发,菌落数最多达 58 个,萌发率 29.0%;随温度升高,厚垣孢子萌发时间延长 1~2 d,萌发率依次降低,45 ℃处理 9 d 未见萌发,11 d 出现较少稀疏浅灰色菌落,说明厚垣孢子经超声波及 45 ℃处理后基本失去活力,高温对厚垣孢子萌发具延迟和抑制作用(表 2)。另外相同温度下,At103 较 SM 厚垣孢子的萌发时间延长 1 d,萌发率降低 27.6%~50.0%,分析认为可能与出发

菌株本身菌丝活力较弱有关;原菌株与退化菌株所分离的厚垣孢子萌发态势表现较一致。

2.3 高温诱导效果的差异性分析

选萌发早粗壮单菌落诱导菌丝转斜面,SM 选出 104 株,At103 选出 66 株,经转管菌丝日均长速比较测定,SM 选 6 株,At103 选 4 株,进行长速差异显著性分析,确定各诱导株最佳的高温诱导效果。分析表明,SM 诱导株 30~35 ℃或 30~40 ℃间差异极显著,35 ℃与 40 ℃间差异不显著,表明 SM 以 35~40 ℃诱导效果较好(表 3)。At103 各处理间差异极

表 2

超声-温度诱导对厚垣孢子萌发的影响

Table 2

Effect of ultrasonic-temperature induced on chlamyospore germination

菌株 Strain	SM 厚垣孢子 SM chlamyospore				At103 厚垣孢子 At103 chlamyospore			
温度 Temperature/℃	30	35	40	45	30	35	40	45
萌发初始时间 Initial germination time/d	6	7	8	—	7	8	9	—
9 d 萌发菌落数 Germination colonies for 9 days	58	44	26	0	42	22	14	0
萌发率 Germination rate/%	29	22	13	0	21	11	7	0

显著,以 40 ℃ 效果最明显,厚垣孢子经高温刺激后,菌丝萌发快活力增强,生长优势明显高于 At103 株,由此确定高温诱导 40 ℃ 效果较好(表 4)。总之,各诱导株均以 40 ℃ 高温诱导效果较好,30 ℃ 效果较差。试验发现各诱导株对温度的敏感性不同,退化株 At103 对高温较敏感,30~40 ℃ 处理后各株菌丝均长势好于原株。

表 3 SM 诱导株菌丝长速差异比较

Table 3 The differences comparison of SM induced strain on mycelia growth rate

处理温度 Processing temperature/℃	菌丝日均长速 Mycelia growth rate /(mm · d ⁻¹)						平均值 Average value	$\alpha=0.05$ $\alpha=0.01$	
40	4.3	4.2	4.5	4.3	4.6	4.3	4.366 7	a	A
35	4.1	4.0	4.0	3.6	4.3	4.1	4.016 7	b	A
30	3.5	3.8	3.7	3.5	3.4	3.7	3.600 0	c	B

注:菌丝日均长速为 6 次重复的均值。下同。

Note: Mycelium growing daily is average value of sixth repeated data. The same below.

表 4 At103 诱导株菌丝长速差异比较

Table 4 The differences comparison of At103 induced strain on mycelia growth rate

处理温度 Processing temperature/℃	菌丝日均长速 Mycelia growth rate /(mm · d ⁻¹)						平均值 Average value	$\alpha=0.05$ $\alpha=0.01$	
40	4.1	4.0	4.0	4.3	4.1	4.0	4.100 0	a	A
35	3.4	3.3	3.6	3.3	3.4	3.4	3.400 0	b	B
30	3.0	3.1	2.9	2.9	2.9	2.9	2.975 0	c	C

2.4 诱导株初筛-菌丝生长势比较

经生长势比较和差异显著分析,选出 4 株较优良诱导株,其中 SM 诱导株 S3 和 S5 生长最快,At103 诱导株 A19、A1 长速较快。试验发现,40 ℃ 处理诱导株菌丝活力明显优于出发菌株,以 At103 厚垣孢子诱导株优化力度大,A1、A19 菌丝生长速度较 At103 原株菌丝长速分别提高 64%、95%(表 5)。厚垣孢子诱导株菌丝长势较出发菌株快,S3 菌株 61 d 现蕾,时间最早;At103 在 90 d 后有一袋出现原基扭结,但未形成明显菇蕾,但其诱导株 A19 菌丝长势达到生产株 SM 的同等水平。

2.5 诱导株复筛-子实体农艺性状比较

初筛 4 个株诱导株(S5、S3、A19、A1)进行出菇

试验,研究表明,诱导株 S3、S5 出菇提前 1~6 d,子实体农艺性状良好,畸形率较低,产量较高,其中 S3 较原株增产 29.6%。A19 子实体正常出菇,恢复了原有的有性繁殖世代,子实体产量较高,一潮菇平均产量达 22 g,略低于 SM 菌株;A1 也出现原基,但因温度等条件原因,最终未形成子实体。另外从子实体性状比较:S3、S5 优于 SM、A19,而 SM、A19 外观及一潮菇产量相差不大。由此可知,超声-高温复合处理对厚垣孢子育种具有明显诱导作用,尤以高温诱导效果最好,可明显提高菌株的产量及子实体优良性状,特别是对于一些已经退化不正常出菇菌株的厚垣孢子,仍然可经过高温诱导形成正常的子实体,高温诱导对退化株恢复生活力有积极的作用。

表 5 厚垣孢子诱导株菌丝生长势比较

Table 5 The differences comparison on mycelia growth of chlamyospore induced strain

菌株 Strain	诱导温度 Induction temperature /℃	日均长速 Average growth rate /(mm · d ⁻¹)	密度 Density	颜色 Color	爬壁能力 Climb ability
SM	—	4.4	+++	白	一般
S3	35	4.6	+++	白	一般
S5	40	4.5	+++	白	明显
At103	—	2.2	+	黄白	差
A19	40	4.3	++	白	一般
A1	40	3.6	—	黄白	略差

表 6 厚垣孢子诱导株子实体农艺性状比较

Table 6 The differences comparison of chlamyospore induced strain on agronomic characters

菌株 Strain	SM	S3	S5	At103	A19
现蕾时现蕾时间 Time appears/d	67	61	66	—	68
一潮菇产量 A wave of mushroom yield/g	27	35	32.9	0	22
盖径 Cover diameter/mm	49	54	56	—	50
柄长 Handle length/mm	143	147	148	—	142
畸形菇率 Mushroom deformity rate/%	13.2	7.6	8.2	—	14
增产率 Growth rate/%	—	29.6	21.8	—	-18.5
抗霉能力 Anti-mold capability	+	++	++	+	+

注:栽培袋干质量 150 g。S3、S5 为 SM 厚垣孢子诱导株,A19 为 At103 厚垣孢子诱导株,增产率以 SM 对照。

Note: Cultivation bags dry weight of 150 g. S3 and S5 are SM chlamyospore induced strain; A19 is At103 chlamyospore induced strain, increasing rate with SM as control.

2.6 诱导孢子实体产量的差异性分析

表7表明,各温度诱导菌孢子实体产量差异不同,S5和S3无差异,SM和A19无差异。S5和S3产量明显高于SM和A19,差异显著。A19子实体产量

低,生物转化率仅25.3%~30.0%。厚垣孢子通过适宜的诱变手段进行育种,不仅诱导退化株厚垣孢子生长分化形成子实体,而且完全可以培育出好于原菌株的优势菌株。

表7 厚垣孢子诱导菌孢子实体产量方差分析及生物转化率

Table 7 Chlamydospore induction analysis strains fruiting body yield of fruit body variance and biological conversion rate

菌株	子实体产量					平均值	$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$	生物转化率
Strain	Fruiting body yield/g					Average value			Biological conversion rate/%
S3	59	58	52	58	52	55.8	a	A	34.7~39.3
S5	56	49	52	53.5	52	52.5	a	A	32.7~37.3
SM	42	48	41	40.5	44	43.1	b	B	27.0~32.0
A19	42	44	42.5	38	45	42.3	b	B	25.3~30.0
At103	0	0	0	0	0	0	c	C	—

注:栽培袋干质量150g,子实体产量计二潮菇。生物转化率=子实体产量/栽培料干质量。

Note: Cultivation bags dry weight of 150 g, two meter wave of mushroom fruiting body production. The biological conversion rate=fruit body output/cultivating material dry weight.

2.7 诱导株S3拮抗试验及生长特征比较

拮抗试验表明,诱导株S3、S5与原株SM有一

定拮抗性,S3子实体农艺性状长势优良,多次栽培子实体产量及菇体性状比较稳定(图2)。

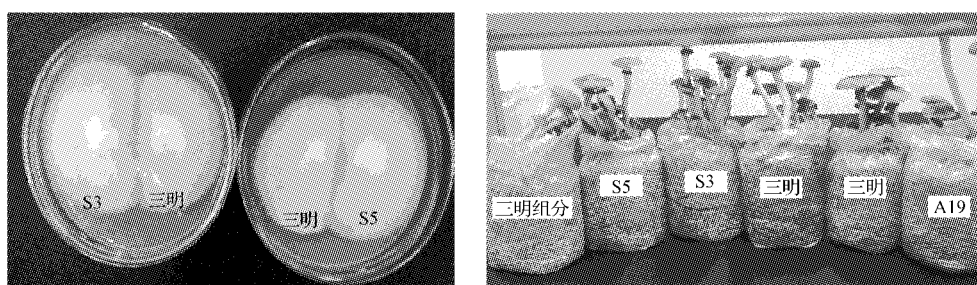


图2 茶薪菇厚垣孢子菌丝生长及出菇比较

Fig. 2 The comparison of *Agroclybe aegerita* Huang on mycelia growth and fruiting

3 结论

高温对茶薪菇厚垣孢子细胞物质分布有显著影响,45~55℃高温处理后厚垣孢子原生质变得浓密,颗粒物质分布明显。不同菌株厚垣孢子的高温存活率有所差异,40℃萌发率7%~13%。超声-高温复合处理对厚垣孢子有明显诱导作用,试验结果表明,以超声波300W、15min,结合40℃、6h处理效果较好,可培育出性状、产量优良菌株;超声-高温诱导厚垣孢子不仅可培育出优良菌株,还可使退化株厚垣孢子生长分化形成正常子实体。该试验对茶薪菇厚垣孢子进行了超声波和高温诱导,分析2种因子的诱导效应,并进行差异显著性比较,由此开辟茶薪菇无性孢子育种新途径,证明厚垣孢子可作为茶薪菇食用菌育种的新材料,为种质资源的保存和纯化提供了新思路。

参考文献

[1] 张渊,王谦,张筱梅,等.茶薪菇原生质体制备及诱变研究[J].中国食用菌,2006,23(3):15-17.

- [2] 张筱梅,张渊,张焕英,等.茶薪菇多孢快速育种简报[J].中国食用菌,2008,27(3):14-16.
- [3] 郑元忠,蔡衍山,傅俊生,等.茶薪菇性遗传模式和育种工艺研究[J].中国食用菌,2007,26(1):17-20.
- [4] 谯天敏,朱天辉,李芳莲,等.绿粘帚霉厚垣孢子的生物学特性[J].四川农业大学学报,2006,24(2):166-170.
- [5] 王国良.影响稻曲病菌厚垣孢子萌发因素的研究[J].植物保护学报,1998(4):27-31.
- [6] 张静峰,朱坚.草菇厚垣孢子的研究[J].中国食用菌,2004,23(1):13-15.
- [7] 张渊,张筱梅,朱维红,等.环境条件对茶薪菇厚垣孢子萌发的影响[J].北方园艺,2014(14):146-150.
- [8] 张筱梅,张焕英,张渊.猴头菌单核菌丝厚垣孢子的观察[J].菌物系统,2003,22(3):436-440.
- [9] 燕玮婷,刘二明,邓林伟,等.稻曲病菌厚垣孢子不同破壁方法的比较[J].微生物学杂志,2010,30(2):14-16.
- [10] 宋国胜,胡松青,李琳.超声波技术在食品科学中的应用与探究[J].现代食品科技,2008,24(6):609-612.
- [11] 赖小玲,郑秀玲,郑浩文,等.超声波法提取茶薪菇多糖的工艺[J].湛江师范学院学报,2007,33(6):145-148.

DOI:10.11937/bfyy.201704032

光皮桦生料栽培三种菇类研究

徐彦军

(贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要:以长裙竹荪“D-古优1号”“织金红托竹荪”和“织金白鬼笔”为试材,采用光皮桦木材生料层架式筐栽方法,研究光皮桦生料对3种菇类菌丝、菌蛋、子实体生长发育情况和产量的影响,以期为不同温型竹荪高效栽培提供参考。结果表明:菌丝生长速度快慢顺序为处理3(“D-古优1号”) > 处理1(“织金红托竹荪”) > 处理2(“织金白鬼笔”);单个菌蛋质量为处理2 > 处理3 > 处理1,且处理间存在显著以上差异;干菇产量为处理1($443.1 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$) > 处理2($430.4 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$) > 处理3($400.4 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$),处理1与处理2间差异不显著,处理1与处理3间差异极显著。比较光皮桦2种处理方式栽培“织金红托竹荪”,处理1在 1 m^2 菇数、菌盖直径、菌柄粗、菌柄长、菌裙长宽、单菇鲜质量等性状及产量表现优于CK,且干菇产量达显著差异。

关键词:光皮桦;生料;竹荪;白鬼笔;产量

中图分类号:S 646.8 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2017)04-0136-04

我国人工栽培的竹荪主要有红托竹荪、棘托竹荪、长裙竹荪和短裙竹荪^[1],滇黔桂地区是鬼笔科真菌多样性丰富的地区^[2]。织金竹荪属清香型红托竹

荪,是在贵州毕节得天独厚的自然环境下培养出的优良地方食用菌品种,织金县是清香型红托竹荪的原产地和菌种供应中心^[3],从20世纪70年代通过组织分离和驯化栽培以来,织金县种植竹荪已有30多年的历史^[4],但织金竹荪(中温型)温型单一,生产集中在3—4月中旬播种,9—11月出菇。导致菌蛋、鲜菇集中上市,降低了竹荪生产的经济效益。近年来,贵州省织金、大方开始人工栽培无裙荪(低温型白鬼笔),为丰富竹荪生产类型,课题组同时引进长裙竹荪(中偏高温型)菌株,研究在织金气候环境下各菌

作者简介:徐彦军(1972-),男,贵州毕节人,硕士,教授,现主要从事食用菌教学及科研等工作。E-mail: gdxyl1996@126.com.

基金项目:贵州省科技厅农业攻关资助项目(黔科合NZ[2013]3010号);贵州省科技计划资助项目(黔科合成果转化[2014]5210号,黔科合农G字[2013]4008号)。

收稿日期:2016-09-23

Breeding Research of Ultrasonic-high Temperature Inducement on *Agrocybe aegerita* Huang Chalmydospore

ZHU Weihong, MIAO Xiaoyan, ZHANG Xiaomei, XU Ting, ZHANG Baoshi
(Department of Biochemistry, Baoding University, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: Chlamydospores of *Agrocybe aegerita* Huang isolated from two strains SM and At103 were used as new materials to study the feasibility of inducing breeding. After ultrasonic-high temperature treatments of chlamydospores. Mycelium growing and fruiting among different processing were compared. The results showed that ultrasonic-high temperature treatments had obvious promotion effect on inducing breeding, the best effect was under the conditions of 300 W ultrasonic+15 minutes, 40 °C+6 hours, the induced dominant strains S3 increased yield by 29.6%, and with the inducing treatments of chlamydospores, the undifferentiated strain could form fruiting bodies again, the biological conversion rate could reach 30%.

Keywords: *Agrocybe aegerita* Huang; degenerate strains; chlamydospore; induced