

doi:10.11937/bfyy.20170013

工厂化杏鲍菇杂交亲本筛选

王民乐¹, 李守勉¹, 李明¹, 辛敏霞²

(1. 河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000; 2. 河北易县农牧局, 河北易县 074200)

摘要:以国内引进的 12 个杏鲍菇菌株(P1~P12)为试材, 采用 ISSR 分子标记方法分析菌株间的遗传距离, 研究了不同菌株的菌丝体阶段和子实体阶段的差异。结果表明: P4 菌株产量高、生物学效率高, P9 菌株生长周期短、菌柄长, 适宜作为杂交亲本。

关键词:杏鲍菇; 工厂化生产; 亲本筛选; ISSR

中图分类号:S 646.1⁺41 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)15-0145-06

杏鲍菇(*Pleurotus eryngii* Quel)属伞菌目侧耳科侧耳属, 又名刺芹侧耳, 其品质优良、营养丰富、质地脆嫩, 素有“平菇王”的美誉, 深受广大消费者青睐^[1]。杏鲍菇为我国工厂化食用菌主要栽培种类之一, 近年来工厂化杏鲍菇发展迅速, 据统计 2016 年 1—9 月, 我国工厂化杏鲍菇总产量达 82.24 万 t。随着工厂化杏鲍菇产业的快速发展, 生产中出现了一系列问题, 如杏鲍菇菌株管理混乱, 同种异名现象屡见不鲜^[2]; 菌株反复继代转接, 缺乏脱毒提纯复壮技术, 导致品种退化现象严重; 国内工厂化杏鲍菇栽培品种单一, 缺乏自主研发的优良新品种, 育种工作严重滞后于产业发展^[3]。因此, 对国内工厂化杏鲍菇品种进行亲缘关系鉴定^[4]及选育工厂化杏鲍菇优良新品种^[5]迫在眉睫。该试验搜集、引进国内工厂化杏鲍菇菌株 12 个, 鉴定菌株间的亲缘关系, 并比较不同菌株菌丝体阶段及子实体阶段生长情况, 筛选出符

合工厂化栽培特性、性状互补的优良菌株作为亲本, 以为杏鲍菇育种工作提供优质种质资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

从国内不同地区引进工厂化杏鲍菇菌株 12 个, 具体来源见表 1。

表 1 供试菌株

Table 1 The tested varieties of *Pleurotus eryngii* Quel

编号 No.	菌株 Variety	来源 Source
P1	杏鲍菇	河北省永诚食用菌公司
P2	杏鲍菇 01	福建三明食用菌研究所
P3	杏鲍菇	福建大丰食用菌公司
P4	杏鲍菇 1 号	江苏天达食用菌研究所
P5	杏美 289	江苏天达食用菌研究所
P6	杏鲍 79	江苏天达食用菌研究所
P7	杏鲍菇 3 号	山东寿光食用菌研究所
P8	杏鲍 511	山东寿光食用菌研究所
P9	杏美 1 号	山东寿光食用菌研究所
P10	杏鲍 sx-42	山东寿光食用菌研究所
P11	杏丰 68	山东寿光食用菌研究所
P12	杏鲍菇	河北农业大学食用菌实验室

1.1.2 供试培养基

母种培养基^[6]: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 L。液体培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 5 g, 磷酸二氢钾 3 g, 硫酸镁

第一作者简介:王民乐(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食用菌生物技术与遗传育种。E-mail: 574487113@qq.com.

责任作者:李守勉(1978-), 女, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事食用菌栽培生理与遗传育种及设施蔬菜栽培生理等研究工作。E-mail: yylsm@hebau.edu.cn.

基金项目:河北省科技支撑计划资助项目(15222910D); 河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队资助项目(HBCT2013060203)。

收稿日期:2017-03-02

1.5 g,水 1 L。原种培养基:麦粒,2%石灰水。栽培种培养基:木条,杂木屑,水(含水量为 60%)。栽培料配方:玉米芯 30%,棉籽皮 22%,麸皮 20%,木屑 11%,豆粕 9%,玉米粉 8%(含水量为 60%供试)。

1.1.3 供试试剂

2×Taq PCR MasterMix、ISSR 引物,购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 不同工厂化杏鲍菇品种亲缘关系的鉴定

1)总 DNA 制备及检测。液体培养基培养菌丝,采用 CTAB 抽提法进行 DNA 提取,提取后进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳试验,检测 DNA 的提取质量并通过 ND 2000 超微量分光光度计检测 DNA 浓度,稀释至 $20\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 保存于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。2)PCR 扩增及电泳检测。PCR 扩增反应体系($25\text{ }\mu\text{L}$):模板 $1\text{ }\mu\text{L}$ ($20\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),引物 $2\text{ }\mu\text{L}$, 2×Taq PCR MasterMix $12.5\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 20 s,52℃复性 30 s,72℃延伸 2 min,35 个循环;72℃延伸 7 min,4℃永久保存。采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并将 ISSR 图谱通过 Bio-Rad 凝胶成像系统进行拍照^[7]。

1.2.2 亲本筛选

1)不同工厂化杏鲍菇菌株菌丝体阶段的比较试验。①不同工厂化杏鲍菇菌株母种阶段菌丝生长情况比较:将供试菌株分别接种于含 25 mL母种培养基的 90 mm 培养皿中,每皿接入直径为 8 mm、厚 0.1 mm 活化菌丝圆片,置于 25℃培养箱培养,每种菌株 5 次重复^[8]。当有任意处理长满培养皿时结束培养,并记录菌丝生长天数和菌落半径,计算菌丝生长速度,观察菌丝体形态及生长势。菌丝生长速度($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$)=菌落半径(mm)/生长天数(d)。②不同工厂化杏鲍菇菌株栽培种阶段菌丝生长情况的比较:将长满菌丝的原种培养基接入栽培种培养基中,置于 25℃黑暗环境下发菌,记录每包栽培种培养基的满袋天数,并计算菌丝在栽培种培养基中生长速度。菌丝生长速度($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$)=培养料高度(mm)/满袋天数(d)。2)不同工厂化杏鲍菇菌株子实体阶段比较试验。将 1.2.2 项长满菌丝不同菌株的栽培种接入栽培料中,其规格为 18 cm×

37 cm×0.05 mm 的聚丙烯袋,每处理接种 50 袋,置于 25℃的黑暗环境下发菌。待菌丝长满菌包,继续培养 1 周完成后熟后,转入出菇室进行出菇,出菇室温度控制在 15℃左右,湿度保持在 80%~95%,待子实体成熟后进行采摘^[9-10]。记录不同供试菌株的满袋时间、原基形成时间(转入菇房至原基形成时间)、子实体成熟时间(原基形成至采摘时间),统计成熟的子实体单菇质量、菌柄长度、菌柄直径、菌盖直径、菌盖颜色、子实体硬度等农艺性状,并计算不同菌株的总产量(第一潮菇产量)、生物学效率与生长周期。生物学效率(%)=子实体鲜品产量(g)/栽培料干质量(g)×100。生长周期(d)=栽培种满袋时间(d)+后熟时间(d)+原基形成时间(d)+子实体成熟时间(d)。

1.3 数据分析

对 ISSR 图谱进行分析,有带谱统计为 1,无则统计为 0,并构建数据矩阵,运用 NTSYS 2.10e 软件计算遗传相关系数,并构建供聚类树状图。运用 SPSS 20.0 软件对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 检测

通过 ND 2000 超微量分光光度计检测 DNA 纯度,12 株菌株 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.0, DNA 杂质少,纯度高。由图 1 可知,电泳检测 DNA 条带清晰,无降解,可用于下步试验。

2.2 ISSR 标记及扩增结果

由图 2 可知,30 条引物中有 15 条引物能够扩增出条带清晰的图谱,共扩增出 72 条清晰的多态性条带。引物扩增的条带数目在 3~7 条,平均 4.8 条。由图 3 可知,12 种菌株在 0.64 时聚集在一起,当遗传相似系数为 0.86 时,供试菌株可分为 5 类,P1、P3、P4、P5、P7、P11、P12 为一类,P2、P6 为一类,P8、P9 与 P10 各为一类。P1 与 P3 的遗传相似系数达到了 0.99,极有可能是同一品种。12 种菌株的遗传相似系数变异范围为 0.64~0.99,表明其遗传差异大,有利于该试验杂交出更多具有显著性差异性状的子代。P8、P9、P10 与其它菌株间亲缘关系较远,遗传相似系数分别为 0.64、0.70、0.81。P8、P9、P10 菌株与任

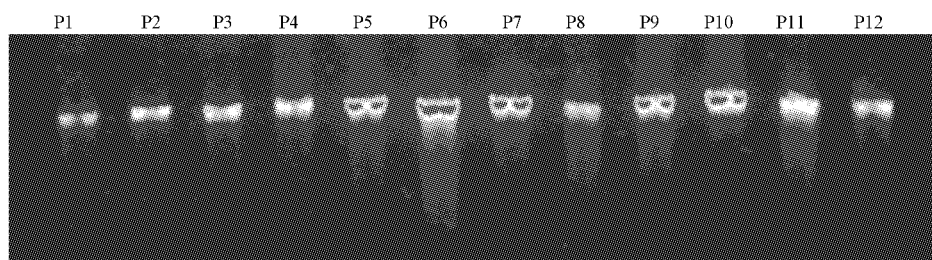


图 1 不同菌株 DNA 电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic result of different strains DNA

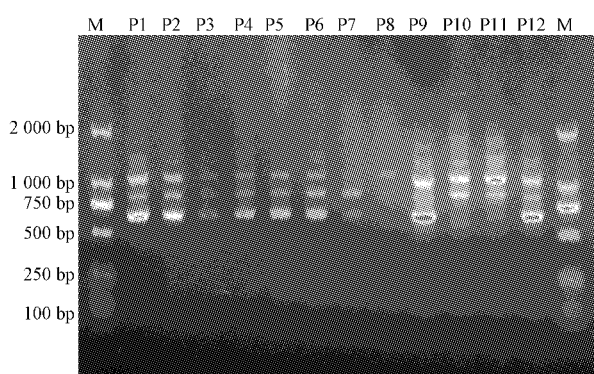


图 2 812 引物 PCR 扩增电泳结果

Fig. 2 Electrophoretic result of
812 primer PCR amplification

意菌株作为杂交亲本,均有利于选育出新的杏鲍菇品种。

2.3 不同工厂化杏鲍菇菌株菌丝体性状比较

2.3.1 母种阶段菌丝生长情况比较

表 2、图 4 表明,P3、P7 生长势最佳且菌落边缘整齐、菌丝浓密,P2、P4、P5、P6、P9、P12 次之且菌落边缘较整齐、菌丝浓密,P8、P10、P11 生长势最差且菌落边缘参差不齐、气生菌丝较多;P4 菌丝生长速度最快为 $5.83 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$,且与其它 11 种菌株间差异显著,P2、P6、P7、P9、P12 菌丝生长速度较快,均在 $5.00 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 以上,其它 6 种菌株生长速度缓慢。

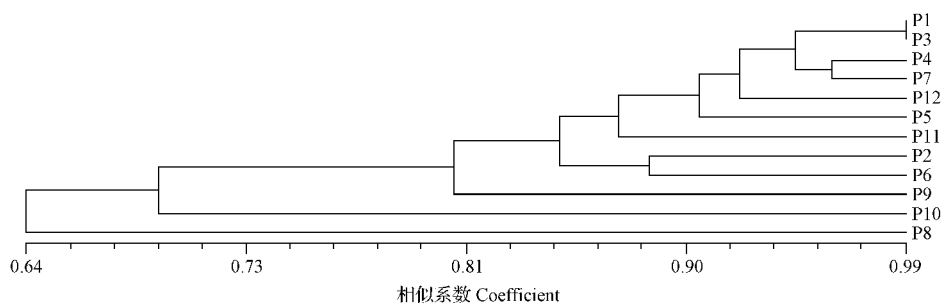


图 3 不同菌株聚类树状图

Fig. 3 Cluster analysis of different strains

2.3.2 不同工厂化杏鲍菇菌株原种阶段菌丝生长情况比较

由表 3 可知,P9 在原种培养基中生长速度最快,菌丝长满袋的时间为 26 d,生长速度达到了 $7.69 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$,且与其它 11 种菌株间均差异显著;P1、P3、P4、P5、P11 满袋时间较短为 27 d,菌丝生长速度均为 $7.41 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2.4 不同工厂化杏鲍菇菌株的产量、生物学效率与生育周期比较

P1、P2、P4、P9 菌株 50 袋菌包的子实体总产量高,均超 15 kg。P3、P5、P6、P7、P11、P12 次之,总产量均在 10 kg 以上。P8、P10 总产量最低,均在 10 kg 以下。P4、P9 生物学效率较高,均在 80% 以上,P4 生物学效率最高,达到了 85.25%。P8、P10 生物学效率较低,分别为 39.00%、47.50%。

表 2 不同菌株菌丝生长情况比较

Table 2 Comparison growth of mycelial with different strains

菌株	生长势	生长速度	菌丝颜色
Test sample	Growth	Growth rate /(mm • d ⁻¹)	Mycelium color
P1	++	4.77ef	较洁白
P2	+++	5.27bc	白
P3	++++	4.95de	较洁白
P4	+++	5.83a	洁白
P5	+++	4.82e	白
P6	+++	5.09cd	白
P7	++++	5.15bcd	洁白
P8	+	4.40g	较洁白
P9	+++	5.21bc	较洁白
P10	+	4.57fg	白
P11	+	4.93de	白
P12	+++	5.38b	白

注: +表示菌丝生长势。
Note: + indicates the mycelial growth potential.

表 3 不同菌株菌丝原种培养基中的生长情况比较

Table 3 Comparison of the growth condition of different strains of hyphae

菌株	时间	生长速度
Test sample	Time/d	Growth rate /(mm • d ⁻¹)
P1	27	7.41b
P2	28	7.14c
P3	27	7.41b
P4	27	7.41b
P5	27	7.41b
P6	28	7.14c
P7	28	7.14c
P8	29	6.90d
P9	26	7.69a
P10	29	6.90d
P11	27	7.41b
P12	29	6.90d

注:小写字母表示 0.05 水平上差异显著性。下同。
Note: Lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.
The same below.

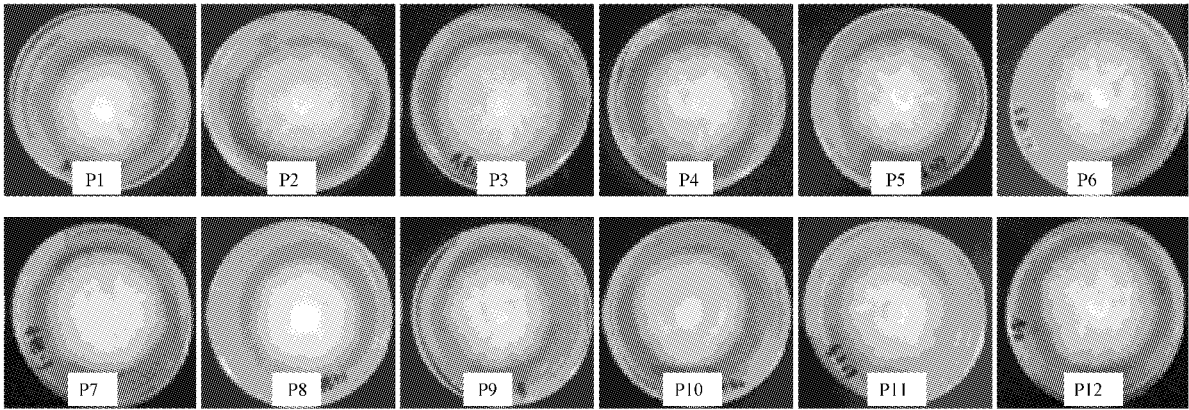


图 4 不同菌株菌丝体形态
Fig. 4 Hyphae of different varieties of *Pleurotus eryngii* Quel

表 4 不同菌株的生物学效率与生长周期比较

Table 4 Comparison of biological efficiency and growth cycle of different strains

菌株	总产量	平均生物学效率	原基形成时间	子实体成熟时间	生长周期
Test sample	Total output/kg	Average biological efficiency/%	Primodium stage/d	Fruiting body maturation time/d	Growth cycle/d
P1	15.20	76.00	7	7	48
P2	15.35	76.75	7	7	48
P3	13.40	67.00	7	7	48
P4	17.05	85.25	7	7	48
P5	14.30	71.50	7	7	46
P6	12.80	64.00	7	7	48
P7	12.10	60.50	7	7	51
P8	7.80	39.00	7	8	58
P9	16.50	82.50	7	7	46
P10	9.50	47.50	7	8	58
P11	13.95	69.75	7	7	48
P12	13.80	69.00	7	7	53

12 种菌株原基形成时间与子实体成熟时间基本一致,P8、P10 子实体成熟时间为 8 d,其它菌株均为 7 d。但生长周期相差较大,P5 与 P9 生长周期最短为 46 d,P1、P2、P3、P4、P6、P11 生长周期较短为 48 d,P8 与 P10 生长周期最长为 58 d。

2.5 不同工厂化杏鲍菇菌株子实体农艺性状比较

P1、P2、P4、P9 单菇质量较大,均在 300 g 以上,菌株间差异不显著。P8、P10 单菇质量很小,均在 200 g 以下,与其它菌株差异显著。P1、P2、P4、P5、P9、P11 菌柄最长,菌柄长度均超过了

200 mm,差异显著,符合优良商品菇的要求。P8 菌柄最短,为 135.40 mm,与其它 11 个菌株均差异显著。P3、P6、P7、P10、P12 菌柄长度中等。P7、P8、P12 菌柄直径较粗,P10 菌柄直径最小,但菌柄直径不作为区分商品菇优良品质的重要指标。菌盖直径不作为评定商品菇的指标,但可根据菌柄长度、菌柄直径、菌盖直径 3 个指标,对 12 种菌株子实体形态进行分类,一类为保龄球型:P8 与 P10;一类为棍棒型:其它 10 个菌株。P4 子实体硬度最大,P1、P2、P3、P9 子实体较硬,P8、P10 子实体最软。P6、P7、P8、P10 菌盖颜色最深。

表 5 不同菌株的子实体农艺性状比较
Table 5 Comparison of agronomic traits of fruiting bodies of different strains

菌株	单菇质量	菌柄长度	菌柄直径	菌盖直径	子实体软硬度	菌盖颜色
Test sample	Weight per fruit body/g	Stipe length/mm	Stipe diameter/mm	Cap diameter/mm	Degree of fruit body firmness	Cap color
P1	304ab	211.29a	52.11cd	52.37ab	++++	浅灰
P2	307ab	203.94ab	47.95e	49.63bc	++++	浅灰
P3	268bcd	193.23bc	49.53cde	49.97bc	++++	浅灰
P4	341a	203.67ab	49.61cde	51.67ab	+++++	浅灰
P5	286bc	203.95ab	48.86de	52.21ab	+++	浅灰
P6	256cd	192.84bc	53.23bc	52.90ab	++	深灰
P7	242d	185.51c	56.41ab	48.56bc	++	深灰
P8	156e	135.40d	57.57a	33.55d	+	深灰
P9	330a	219.23a	53.07bc	56.10a	++++	浅灰
P10	190e	180.12c	43.65f	45.88c	+	深灰
P11	279bcd	202.78ab	52.27cd	54.07ab	++	浅灰
P12	276bcd	189.04bc	53.73abc	50.06bc	+++	浅灰

注: + 表示子实体硬度程度。
Note: + indicates the degree of hardness of the fruiting body.

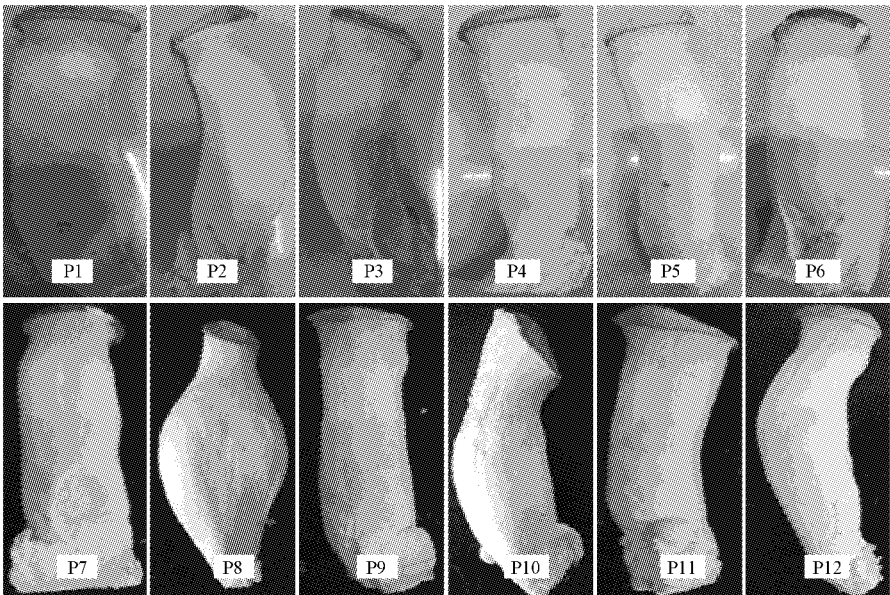


图 5 不同菌株子实体形态
Fig. 5 Fruiting bodies of different strains

3 结论与讨论

根据菌丝体阶段与子实体阶段的结果分析,从菌丝生长速度、菌丝生长势、产量、生物学效率、生长周期、单菇质量、菌柄长度等性状中,筛选出5个优良性状的菌株:P1、P2、P4、P5、P9。亲本的优良性状互补、亲缘关系较远时,更容易选育出优良的新品种,综合以上结果分析筛选出产量高、生物学效率高的P4菌株与生长周期短、菌柄长的P9菌株作为该试验杂交育种亲本。

该试验目的是选育出适合工厂化生产杏鲍菇新品种,须从高产、生长周期短、生物学效率高、子实体形态优良等提高效益,降低成本的性状进行杂交亲本的筛选。亲本P4与P9优良性状分别为产量高、生物学效率高,生长周期短、菌柄长,子实体形态均优良、性状互补且P4与P9的亲缘关系较远,是最佳杂交亲本组合。若单考虑能否杂交出更多的新品种作为育种目标,可以选择与其它菌株亲缘关系最远的P8菌株与具有最多性状优良的P4为杂交亲本,但由于P8生物学效率、生长周期、农艺性状等都很差,会加大该试验工作量,不易选育符合该研究要求的新菌株。P4在母培养基中菌丝生长速度最快,P9在栽培培养基中菌丝生长速度最快,表明不同的品种菌株有各自最适宜的培养基。P1与P3的遗传相似系数达到了0.99,但在性状表达上仍存在一定的差

异,表明杏鲍菇极易受到环境因素而影响其性状表达,这与陆娜等^[11]利用ISSR分子标记鉴别杏鲍菇生产菌株的研究一致;P8、P9、P10与其它不同菌株间的性状差异显著,表明ISSR分子标记法可以将不同杏鲍菇菌株区分开。

参考文献

- [1] 郑雪平,冀宏,尹永刚,等. 中国杏鲍菇工厂化生产实践及问题分析与展望[J]. 食用菌,2014(1):7.
- [2] 田景花,李明,李守勉. 我国杏鲍菇生产研究进展[J]. 北方园艺,2013(4):179-181.
- [3] 王瑞娟,郭力刚,刘朝贵,等. 工厂化栽培杏鲍菇优良菌株筛选[J]. 食用菌学报,2006,13(3):19-21.
- [4] 曲绍轩,高山,黄晨阳. SRAP、ISSR和RAPD分子标记技术在银耳菌株鉴别上的应用[J]. 食用菌学报,2007,14(3):1-5.
- [5] 刘宇,陈文良. 杏鲍菇13号杂交菌株选育研究[J]. 食用菌学报,2004,11(3):61-64.
- [6] 李月梅,采俊香,牛瑞青. 不同基质配方工厂化栽培杏鲍菇研究[J]. 北方园艺,2012(7):177-179.
- [7] 徐全飞,郭亮,充娜,等. 杏鲍菇工厂化栽培优良菌株的筛选及亲缘关系评价[J]. 食用菌学报,2010,17(2):19-21.
- [8] 董伟,陶鸿,卢伟,等. 10个杏鲍菇菌株的比较研究[J]. 中国食用菌,2010,29(3):26-28.
- [9] 李辉平,宋金伟,林金盛,等. 主要环境因子对杏鲍菇工厂化生产影响的研究[J]. 江西农业学报,2011,23(11):28-30.
- [10] 黄志龙,肖淑霞,上官舟建. 杏鲍菇优良菌株筛选及配套标准栽培技术[J]. 食用菌,2008(2):25-27.
- [11] 陆娜,周祖法,王伟科,等. 利用ISSR分子标记鉴别杏鲍菇生产菌株的研究[J]. 北方园艺,2015(21):150-152.

Screening of Parental Strains of *Pleurotus eryngii* Quel

WANG Minle¹, LI Shoumian¹, LI Ming¹, Xin Minxia²

(1. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Yi County Agriculture and Animal Bureau, Yixian, Hebei 074200)

Abstract: Twelve strains of *Pleurotus eryngii* Quel were used as test materials. These strains were numbered as P1—P12. The genetic distance between strains was studied by ISSR molecular marker method, and differences in mycelial and fruiting stages of the twelve strain were analyzed. The results showed that the yield of P4 strain was high and the biological efficiency was high; the growth period of P9 strain was short and the stipe length was long. P4 strain and P9 strain were used as hybrid parents in this experiment.

Keywords: *Pleurotus eryngii* Quel; factory production; parents screening; ISSR