

采用原生质体单核体杂交技术 创新香菇种质资源

宋莹, 刘俊杰, 张敏, 刘岩岩, 刘娜, 李宏亮

(辽宁省农业科学院 食用菌研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以野生香菇和国内主栽菌株‘931’‘168’‘荷香1号’为亲本材料,采用原生质体单核杂交育种方法选育香菇新菌株,并研究了杂交菌株与亲本菌丝长势、长势、产量和子实体形态等农艺性状的关系。结果表明:杂交菌株 LNX3、LNX5 和 LNX6 在农艺性状、产量和品质上均较亲本有明显优势,具有进一步开发的潜力。

关键词:香菇;原生质体再生;杂交

中图分类号:S 646.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)19-0165-05

香菇属于担子菌门(Basidiomycota),层菌纲(Hymenomycetes),伞菌目(Aganicales),口蘑科(Tricholomataceae),香菇属(*Lentinus*),是一种重要的食用菌^[1]。香菇含有多种营养物质,具有较高的食用和药用价值,享有“蘑菇皇后”的美誉。辽宁省是我国夏季香菇主产区,具有30多年的栽培历史。2014年,辽宁省香菇栽培量达到5.8亿袋,生产鲜食香菇62.8万t^[2]。随着我国香菇产业的快速发展,优质高抗香菇新品种的缺乏问题被凸显出来。目前,可应用的香菇品种较少,消费者可选择范围也小。所以,选育和加快推广香菇良种,是我国香菇产业可持续发展的关键。

传统的香菇杂交育种是以孢子杂交为基础,需要配制大量的杂交组合,筛选工作量大。另外,孢子是香菇生活史有性世代中形成的单核单倍体的有性后代,自身不育,除具有亲本的2种交配型外,还有2种通过减数分裂形成的重组交配型,变异幅度大,不利于选择亲本的目标性状。而以原

生质体单核体为基础材料的杂交技术路线,可以有效地克服传统育种中孢子单核体遗传多样性所造成的亲本性状分散和筛选困难的障碍,减少了杂交后代筛选的工作量。同时,原生质体单核体可在实验室条件下由菌丝体直接获得,便于将人工栽培条件下无法出菇的野生种资源用于杂交育种^[3]。

该研究以野生香菇菌株和国内主栽香菇菌株为亲本,进行原生质体单核体杂交试验,旨在选育出高产、高抗、优质、短柄的子代菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

野生香菇菌株采自辽宁省抚顺市新宾县冈山,国内主栽香菇菌株‘931’‘荷香1号’‘168’‘L808’‘辽抚4号’为辽宁省农业科学院食用菌研究所保藏菌株。

1.1.2 培养基及试剂

试管培养基:马铃薯200g,葡萄糖20g,磷酸二氢钾3g,硫酸镁1.5g,琼脂20g,维生素B₁0.01g,水1000mL。

再生培养基:马铃薯200g,葡萄糖20g,蔗糖

第一作者简介:宋莹(1982-),女,硕士,副研究员,现主要从事食用菌遗传育种与栽培技术等研究工作。E-mail:sy.512@163.com.

基金项目:辽宁省农业领域青年人才创新基金资助项目(2015026)。

收稿日期:2017-04-05

205.38 g, 麦芽糖 2 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL。

原种培养基及袋栽培料配方: 木屑 78%, 麸皮 21%, 石膏 1%, 含水量 60%。

酶制剂: 溶壁酶购于广东微生物所, 用 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇配制成 1.2% 浓度的酶液, 现配现用。

1.2 试验方法

1.2.1 亲本单核原生质体的制备

将供试菌株进行液体浅层静培 7 d。过滤收集菌丝 500 mg, 用无菌水冲洗后用无菌吸水纸将菌丝吸干, 将菌丝转移至酶液中, 在 30°C 和 $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中酶解 4 h, 滤去残留菌丝, 离心收集原生质体, 用甘露醇清洗 1~2 次, 适当稀释, 涂布于再生培养基上 25°C 培养。将再生的菌株分别挑取转接于试管斜面培养基上 25°C 培养, 挑取少量菌丝镜检, 单核无锁状联合的菌株即为亲本单核原生质体再生菌株。

1.2.2 单核原生质体的杂交

将 2 个亲本的单核原生质体再生菌株进行一一杂交, 从菌丝交接处挑取菌丝镜检, 并分离纯化杂交后产生的具有锁状联合的新菌株。

1.2.3 杂交后代菌株菌丝生长特性分析

将分离所得具有锁状联合的新菌株与亲本菌株进行菌丝拮抗试验, 观察拮抗情况。对与亲本有明显拮抗现象的菌株接种到直径为 9 cm 的培养皿中, 置于 24°C 条件下培养, 观察菌丝长势并测定其菌丝生长速度, 淘汰生长过于缓慢和长势较差的菌株。将保留的菌株制备成原种, 在 750 mL 原种瓶中于 24°C 条件下培养, 观察菌丝吃料情况、生长速度、长势以及污染率等, 并再次淘汰长势不佳和菌种抗性弱的菌株。

1.2.4 杂交后代菌株和主栽品种菌株农艺性状对比试验

将经过 1.2.3 筛选得到的杂交后代菌株和栽培品种 ‘931’ ‘168’、野生香菇、‘荷香 1 号’ ‘L808’ ‘辽抚 4 号’ 进行出菇对比试验。每个处理栽培 100 袋, 菌袋规格为 $17 \text{ cm} \times 36 \text{ cm}$, 每袋装 0.5 kg 干料, 常规接种培养。出菇条件为 $23 \sim 26^\circ\text{C}$, 记录每个香菇品种菌棒整个制袋、培养、出菇、采收过程的各菌株性状表现, 并进行考评。

1.3 数据分析

试验数据采用 DPS 7.05 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 亲本单核原生质体的数量

由表 1 可知, 每个菌株获得原生质体数量不同, 最少的是野生香菇, 为 6 株; 获得相对较多的是 ‘931’ 和 ‘168’, 为 21 株和 18 株; ‘荷香 1 号’ 原生质体获得数量为 11 株。

表 1 获得原生质体单核体数量

Table 1 Number of monokaryotization

名称 Name	单核体数量 Monokaryotization number
野生香菇	6
‘931’	21
“荷香 1 号”	11
‘168’	18

2.2 杂交菌株的获得及拮抗试验

通过对菌丝生长速度、长势等情况的初步筛选, 最后将分离获得具有锁状联合的 6 个菌株制备原种, 观察菌丝在木屑培养基上的生长状况, 并分别定名为 LNX1、LNX2、LNX3、LNX4、LNX5 和 LNX6, 杂交亲本情况见表 2。菌丝拮抗试验的结果表明, 6 个杂交后代菌株的菌丝与亲本拮抗均表现为阳性, 均有明显的拮抗线(图 1)。

表 2 杂交后代亲本

Table 2 Parents of hybrids

菌株 Strains	亲本 Parents
LNX1	‘168’、野生香菇
LNX2	‘168’ ‘931’
LNX3	‘931’、野生香菇
LNX4	‘168’ ‘931’
LNX5	‘168’、野生香菇
LNX6	“荷香 1 号” ‘168’

2.3 LNX 系列再生菌株菌丝的特性

经过多轮筛选, 最后得到 6 株菌丝长势优良的香菇菌株。由表 3 可知, 6 个再生菌株菌丝的长速和长势上存在差异, LNX3 和 LNX6 菌丝长势较强, 洁白、浓密, 菌丝粗壮, 生长速度相对较快, 长速为 $5.12 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $5.53 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 满皿时间分别为 9 d 和 8 d; LNX2、LNX4 和 LNX5 菌丝呈透明状, 淡薄, 生长速度分别为 4.71、

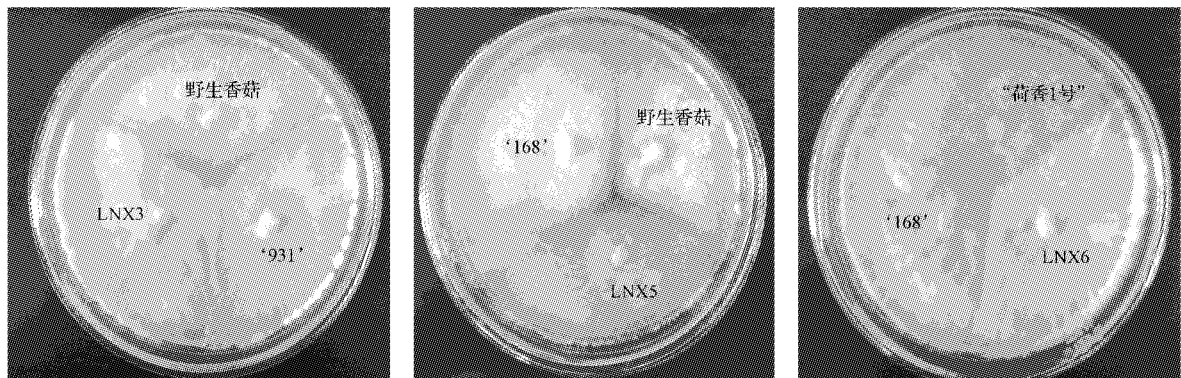


图 1 拮抗试验结果
Fig. 1 Results of antibiosis test

表 3
Table 3
菌丝生长特性
Mycelial growth characters

菌株 Strains	长势 Growth vigor	特征 Trait	日均生长速度 Mean growth speed per day/(mm · d ⁻¹)	满皿时间 Days of filling the petri dish/d
LNX1	+	菌丝稀疏,透明	3.78±0.08	15
LNX2	++	气生菌丝多,淡薄	4.71±0.05	13
LNX3	+++	菌丝洁白,浓密	5.12±0.04	9
LNX4	++	菌丝透明	4.83±0.06	12
LNX5	++	菌丝透明	4.86±0.05	11
LNX6	+++	菌丝洁白,浓密	5.53±0.02	8

注: +, ++, +++ 表示菌丝长势由弱渐强。下同。
Note: +, ++, +++ show the mycelia growth from weak to strong. The same below.

4.83、4.86 mm · d⁻¹, 满皿时间分别为 13、12、11 d; 长势相对最弱的为 LNX1, 菌丝稀疏, 透明, 生长速度为 3.78 mm · d⁻¹, 15 d 才能长满整个培养皿。
由表 4 可知, 菌丝生长速度由快到慢分别为 LNX6 > LNX3 > LNX5 > LNX4 > LNX2 > LNX1; 在接种点完全萌发后, LNX3 和 LNX6 吃料速度较快, 而 LNX1 吃料较慢; LNX3、LNX5

和 LNX6 生长势较强, LNX1、LNX2 和 LNX4 生长势相对弱; 同样培养条件下, LNX6 污染率为 1%, 其次为 LNX5, 污染率最高的为 LNX1 和 LNX4; LNX6 长满菌瓶所用的天数最短, 为 39 d, LNX1 满瓶时间最长, 为 53 d。综合原种生长试验结果, 将杂交后代表现较好的菌株 LNX3、LNX5、LNX6 进行农艺性状栽培试验。

表 4
Table 4
原种菌丝生长特性
The growth characters of mother spawn mycelial

菌株 Strains	培养基消耗情况 Medium nutrient consumption	生长速度 Growth speed/(mm · d ⁻¹)	长势 Growth vigor	污染率 Contamination rate/%	满瓶天数 Days of filling test bottle/d
LNX1	慢	4.23	++	5	53
LNX2	中等	4.71	++	4	49
LNX3	快	5.58	+++	3	42
LNX4	中等	4.85	++	5	46
LNX5	中等	4.88	+++	2	45
LNX6	快	5.84	+++	1	39

2.4 杂交后代菌株及主栽菌株农艺性状对比试验

农艺性状是鉴别食用菌品种优劣的重要标准之一,对不同香菇品种进行比较栽培试验,是筛选最优品种的有效方法。栽培对比试验表明,不同菌株的生育期不同,LNX3的生育期最短,为55~65 d,比亲本‘931’短10~15 d,比野生香菇短25 d,生育期明显短于主栽菌株“辽抚4号”和‘L808’;LNX5的生育期为100~110 d,居于2个亲本中间,与主栽品种“辽抚4号”接近,LNX6的生育期也居于2个亲本中间,但长于“辽抚4号”而短于‘L808’,为120~130 d;LNX3为软质菇,

LNX5和LNX6为硬质菇;生物学效率表现为LNX3=LNX6=“荷香1号”>LNX5>‘931’=“辽抚4号”>‘168’=野生香菇=‘L808’,杂交后代生物学效率均高于亲本和对照主栽菌株(表5),在菌盖直径、菌盖厚度、菌柄直径和长度方面,3个杂交后代性状都优于亲本;在颜色方面,LNX3、野生香菇、“荷香1号”和“辽抚4号”颜色稍浅,为浅褐色,LNX5、LNX6、‘168’和‘L808’为褐色,‘931’颜色最深,为深褐色;LNX3菇盖周围鳞片分布较均匀,LNX5菌盖四周分布鳞片,菇盖较平,而LNX6四周有鳞片,盖顶有少许鳞片,菇盖呈馒头形(图2)。

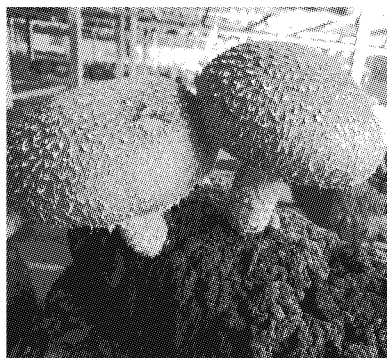
表5

不同菌株农艺性状对比

Table 5

The agronomy characteristics of different strains

菌株 Strains	生育期 Period of duration/d	菌盖直径 Diameter of pilcus/cm	菌盖厚度 Thickness of cap/cm	菌柄长度 Length of stipe/cm	菌柄直径 Diameter of stipe/cm	子实体颜色 Fruiting body color	鳞片性状 Scales characteristics	硬度 Hardness	生物学效率 Biological efficiency/%
LNX3	55~65	5.58	1.94	4.90	1.95	浅褐色	菇盖布满鳞片	软	91
LNX5	100~110	7.10	2.40	5.15	2.00	褐色	菇盖周围鳞片较多	硬	89
LNX6	120~130	6.80	2.60	5.40	2.20	褐色	菇盖周围鳞片较多,盖顶少许鳞片	硬	91
‘931’	65~70	5.47	1.38	5.10	1.72	深褐色	鳞片较少	软	87
野生香菇	80~90	5.56	1.72	5.22	1.58	浅褐色	鳞片较多	硬	85
‘168’	120~150	6.32	2.23	7.60	2.05	褐色	菇盖周围具鳞片	硬	85
“荷香1号”	90~110	6.78	2.19	5.10	1.89	浅褐色	菇盖周围鳞片较多	硬	91
‘L808’	120~150	6.56	2.58	5.68	2.12	褐色	菇盖周围鳞片较多	硬	85
“辽抚4号”	90~110	6.32	2.36	4.75	1.98	浅褐色	菇盖周围具鳞片	硬	87



LNX3



LNX5



LNX6

图2 杂交子实体形态

Fig. 2 Fruiting body shape of hybrids

3 讨论

原生质体单核体杂交技术是充分利用香菇种质资源,拓宽现有香菇栽培种基因型和加快育种

程度的一个有效途径,是今后我国香菇以及其它食用菌杂交育种的主要技术程序和研究方向^[4-5]。在该研究中,采用原生质体单核体进行杂交选育优良香菇新品种,筛选出的杂交后代在菌丝长势、

农艺性状及产量方面都优于亲本,表明原生质体单核体杂交技术是一种高效的香菇种质资源创新的方法。LNX3、LNX5 和 LNX6 生物学效率高,于亲本和对照菌株“辽抚 4 号”和‘L808’,LNX3 为短龄菌株,该菌株菌丝在 38 ℃条件下培养 72 h 或 42 ℃条件下培养 6 h 后在 25 ℃条件下恢复培养,菌丝均能继续向前生长。菌棒转色后在 30 ℃条件下均能正常出菇,说明该菌株耐高温能力较强^[6],但为软质菇,可做促成栽培供应市场;LNX5 和 LNX6 产量、形态及颜色接近,但 LNX5 菌盖较平,而 LNX6 为馒头形,在栽培方面 LNX6 的生育期比 LNX5 要长 20 d 左右,生物学效率也稍高于 LNX5,但菌柄要长于 LNX5。研究结果显示,‘LNX’系列菌株在农艺性状、产量和品质上均较亲本有明显优势,具有进一步开发的潜力。通过研究人员试吃,杂交后代菌株口感好,具

有浓郁的香味。在营养成分含量方面还需进一步分析研究,在其配套的栽培技术,如栽培模式、栽培时期、营养料配方等方面还需要继续研究,摸清菌株生物学特性,从而进一步提高产量。

参考文献

- [1] 杨新美. 食用菌研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [2] 刘俊杰,杨镇,吕立涛,等. 辽宁省食用菌产业现状及发展展望[J]. 食用菌,2016(1):7-8.
- [3] 赵妍,林锋,宋春艳,等. 香菇主要育种技术研究进展[J]. 生物学杂志,2015(4):92-95.
- [4] 谭琦,杨建明,陈明杰,等. 香菇孢子单核体与原生质体单核体遗传差异分析[J]. 中国食用菌,2001,20(6):3-5.
- [5] 任鹏飞,李瑾,曲玲,等. 利用原生质体技术选育香菇优良菌株[J]. 微生物学杂志,2008,28(1):45-48.
- [6] 刘岩岩,宋莹,刘俊杰,等. 几种香菇菌株抗高温和抗霉菌性能比较的研究[J]. 园艺与种苗,2016(8):36-38.

Innovation of *Lentinus edodes* Germplasm by Protoplast Monokaryon Hybridization Technology

SONG Ying, LIU Junjie, ZHANG Min, LIU Yanyan, LIU Na, LI Hongliang

(Institute of Edible Mushroom, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: The *Lentinus edodes* strains of ‘931’, ‘168’, ‘Hexiang No. 1’ and a wild species were used as parents materials, respectively, and new *Lentinus edodes* germplasms were created by protoplast monokaryon hybridization technology. The relationships of the agronomic trait of mycelium growth vigo, growth speed, yield and fruiting body shape between hybrids and parents were studied. The results showed that three hybrid strains of LNX3, LNX5 and LNX6 had obvious advantages in agronomic traits, yield and quality compared with their parents, having the potential for further development.

Keywords: *Lentinus edodes*; protoplast regeneration; hybridization