

难栽培食用菌原生质体融合技术研究进展*

邹莉¹, 孟雪¹, 李绍鹏^{1,2}

(1. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; 2. 大兴安岭阿龙山林业局, 跟河 522362)

摘要: 大多数难栽培食用菌都与植物有共生或寄生关系, 人工栽培出菇问题一直无法解决。原生质体融合技术是近几年来迅速发展起来的细胞工程育种技术, 它去除了细胞壁的屏障, 实现了远缘杂交, 为难栽培食用菌育种提供了新方法。本文着重介绍了难栽培食用菌原生质体融合技术, 并概括了其发展前景。

关键词: 难栽培食用菌; 原生质体; 融合技术

中图分类号: S 646 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2006)02-0067-03

Advances in Protoplast Fusion Technology of Edible Fungi Culturing Difficultly

ZOU Li¹, MENG Xue¹, LI Shao peng^{1,2}

(1. Northeast Forestry University, Harbin 150040; 2. Alongshan Forestry Bureau of Inner Mongolia, Daxingan Mountain, Genhe 522362)

Abstract: A lot of Edible fungi culturing difficultly intergrow with plant, at present, it is difficult to find suitable culture medium. It is impossible to gain fruiting-body of the edible fungi. The technology of protoplast fusion belongs to cell-engineering breeding, which is developed rapidly in the recent years. It can get rid of the barrier of the cell, achieve hybridization of far family species and afford a new method for breeding the edible fungi culturing difficultly. The protoplast fusion technology of edible fungi culturing difficultly was introduced mainly, and the technology of future development was discussed.

Key words: edible fungi culturing difficultly; protoplast; fusion technology

食用菌是营养丰富、味道鲜美、健身强体的理想食品, 是人们公认的高营养保健食品。我国有着丰富的食用菌资源, 但目前只有 80 种人工栽培成功。难栽培食用菌是营养共生型的菌根菌, 在其生活史中, 菌丝体与树木根系共生并形成菌根。难栽培食用菌菌丝从活立木中吸取必需的养分, 萌发形成子实体, 由于这种生态习性的特殊性, 致使这些菌至今未实现人工栽培, 仍处于野生状态。近几年来, 现代生物技术应用在食用菌研究领域取得了很大的进展, 尤其单核原生质体技术, 为食用菌遗传和育种研究提供了一个十分重要的基础材料。原生质体融合

技术充分利用野生菌的优良特性, 去除细胞壁的屏障, 实现了远缘杂交, 为难栽培食用菌的栽培提供了一个广阔的发展空间。

1 原生质体的制备

1957 年 Emersond 等人用蜗牛酶和半纤维素酶得到了丝状真菌的原生质体, 从而奠定了真菌原生质体技术的实验系统^[1]。1972 年 Devies 等人成功地分离到裂褶菌原生质体, 从此原生质体技术应用应用于食用菌研究领域^[2]。随着科学技术的不断发

* 收稿日期: 2005-10-31

基金项目: 哈尔滨市科技攻关项目 (2002AQXJ08)

第一作者简介: 邹莉(1966-), 女, 黑龙江省哈尔滨人, 教授, 博士, 主要从事野生食用菌的驯化、资源的开发利用与生物技术研究。

Tel: 0451-82191961; E-mail: zouli6616@yahoo.com.cn

展,原生质体融合技术正在不断的完善。近几年,对难栽培食用菌原生质体的制备建立了实验体系。1994年,程东升、邹莉等使用国产脱壁酶从厚环乳牛肝的菌丝制备原生质体,研究结果表明厚环乳牛肝原生质体制备的最佳酶解温度为 31°C ,较适菌丝培养基为MYG,原生质体产量达 6×10^6 个/ $\text{mL}^{[3]}$ 。1999年孙丽等用1.5%溶壁酶,0.6M甘露醇及CYM再生系统制备了浓香乳菇的原生质体,并建立了浓香乳菇原生质体的再生系统^[4]。2001年陈晓琳等用广东微生物研究所研制的溶壁酶、北京百泰生化技术公司生产的蜗牛酶、上海丽珠东风生物技术公司生产的纤维素酶组成的6种酶液,用3种渗透压稳定剂处理两种虫草无性型G106M和HSO1的菌丝体,结果表明复合酶的效果好于单一酶,其中用溶壁酶与蜗牛酶混合酶液处理菌丝体,形成的原生质体数量最多,达到 4.9×10^6 个/ mL ;无机盐稳定剂效果要好于蔗糖,G106M用0.6M的氯化钠再生率最高,为17.92%,HSO1以0.6M的硫酸镁再生率最高,为0.46%,而蔗糖作为稳定剂,G106M的再生率仅为9.58%,HSO1也仅为0.22%^[5]。2004年姜波采用了正交法筛选虫草菌原生质体的最佳条件组合,结果表明酶液组成对原生质体形成率的影响最大,其次是渗透压稳定剂和作用时间,最后是菌龄。复合酶的效果好于单一酶,溶菌酶与纤维素酶混合酶液处理菌丝体时,形成的原生质体数量最多,且形状最好,达到 1.145×10^7 个/ $\text{mL}^{[6]}$ 。近年来的研究表明,不同的食用菌应使用不同的溶解酶系,采用单一酶系还是混和酶系由菌种本身的特性所决定。目前,尚未完全弄清渗透压稳定剂对真菌原生质体释放率影响的机理。李刚等学者认为,其机理可能是渗透压稳定剂对细胞壁溶解酶活性有一定的影响^[7]。

2 原生质体的再生

2001年沙涛等以明胶为再生因子,0.6M的 MgSO_4 作为渗透压稳定剂的PDY再生培养基效果最好,松茸菌丝再生率最高可达4.97%^[8]。2001年陈晓琳等人在研究两种虫草无性型原生质体融合时,得出在几种不同培养基上,两种菌原生质体的再生率不同,在SDAY培养基上G106M再生率最高,为17.92%,说明SDAY培养基中的蛋白胨和酵母浸出粉是G106M原生质体再生较好的营养物质;而蜂头虫草在黄豆粉培养基上再生率最高,说明黄豆粉和白砂糖是HSO1原生质体再生较好的营养物质^[5]。2001年黄萍等对培养绿菇菌体的时间、酶

浓度、酶解时间、酶解温度、震荡与否影响其原生质体的形成和再生的研究,结果表明以无机盐 KCl 、 MgSO_4 、 CaCl_2 做渗透压稳定剂分离绿菇原生质体的再生率比甘露醇为渗透压稳定剂的高;葡萄糖、蔗糖的再生率比山梨糖醇、甘露醇的高;且 MgSO_4 可促进萌发, CaCl_2 对稳定原生质体、提高其再生率的作用非常显著^[9]。原生质体的再生是融合子萌发的先决条件,只有提高原生质体的再生率,才可以提高融合子的再生率。食用菌原生质体再生所需的渗透压稳定剂主要是无机盐、葡萄糖和甘露醇,它们对不同的食用菌作用结果不同。

3 原生质体融合

1974年,Kao和Michayluk发现聚乙二醇(PEG)可以作为植物原生质体的促融合剂^[10]。随后PEG被用于微生物原生质体、动物原生质体的融合,至今仍被广泛使用。食用菌的原生质体融合剂PEG的分子量为4000或6000,浓度为20%~40%(w/v),pH6~7,加入适量的 CaCl_2 和 Mg^{2+} ,可促进原生质体融合。1980年,Zimmermann等报道了电场诱导细胞融合的新技术。

2003年,王淑珍等人将纯化得到的香菇再生原生质体悬浮于0.6M甘露醇溶液中,使之浓度为 10^3 个/ mL ,与已经灭活的松茸再生原生质体以1:1混合,2000 r/min离心10 min,弃上清液,逐滴加入1mL 50 mmol/L CaCl_2 配制的30%PEG分子量为4000,30 $^{\circ}\text{C}$ 处理25 min,用甘露醇洗涤2次后,把原生质体悬浮液涂布于加有潮霉素再生培养基中,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,融合率为0.45%^[11]。2004年,牛艳芳采用双亲灭活原生质体融合技术,以30%PEG(6000)为融合剂,使蒙古口蘑与双孢蘑菇原生质体融合10 min,融合率为 5.6×10^{-5} ,经遗传稳定性检验,融合菌株的遗传稳定率为80%^[12]。但是,在难栽培食用菌的研究领域,用电诱导融合原生质体融合的应用未见报道。

4 融合子的筛选和鉴定

4.1 融合子的筛选

对难栽培食用菌的融合子鉴定,多采用抗药性标记法、营养缺陷型标记法、形态差异观察法,或者几种方法相结合。1999年,孙丽等人以锁状联合的有无作为浓香乳菇单核体判断的主要依据,从CYM平板上挑出的80个再生菌落及MM平板上调取40个再生菌落中均未发现单核体^[4]。2004年,牛艳芳等人挑取在再生平板上传代5次后的融

合株菌丝接种于 MA 平板上, 继续培养 5 d, 观察菌落特征, 并与亲本菌株蒙古口蘑与双孢蘑菇的菌落特征进行比较筛选融合子^[12]。

4.2 融合子的鉴定

对融合子的鉴定多采用生物学鉴定法(菌落表型鉴定、拮抗实验、核相观察、出菇实验等)、生化鉴定(可溶性蛋白质凝胶电泳图谱分析)和同工酶电泳图谱。王淑珍等人利用同工酶的分析测试、液体培养菌丝球特点比较、插片培养菌丝形态比较、菌丝体生长速度比较以及拮抗实验, 对松茸与香菇融合子和其亲本进行比较, 来检测融合子的生物学特性^[13]。牛艳芳等采用稳定性检验法、菌落特征比较法、融合子与亲本菌株的菌丝显微结构观察法、亲本及融合菌株生长速率比较法、同工酶测定法, 鉴定蒙古口蘑与双孢蘑菇的融合子^[12]。

近些年来, 研究者利用分子生物学的方法进行融合子的鉴定, 该法比一般方法更科学和准确, 更令人信服。常用的方法有 PCR 法(多聚酶链式反应)、RFLPs 法(DNA 限制性片段长度多态性)、RAPD 法(随机扩增的多型性 DNA)、分子核型技术等。目前, RAPD 技术在鉴定食用菌原生质体融合子中应用较广。RAPD 是利用随机合成的 10 个碱基的寡聚核苷酸序列为引物, 分别与 DNA 的两条单链结合, 对基因组的特定区域进行 PCR 扩增, 形成多态性 DNA 片段。RAPD 技术可以在所研究物种 DNA 序列不清楚的情况下, 扩增足够的多态性以适应种与种之间各水平的分析, 克服了 RFLPs 的局限性。2003 年, 刘国振等人用 RAPD 方法对平菇、香菇属间原生质体融合子进行研究, 首次在食用真菌中获得了原生质体融合子的分子生物学印记^[14]。利用 RAPD 技术鉴定难栽培食用菌原生质体融合子报道的很少, 可见 RAPD 技术应用于该领域是有很大空间的。在未来的研究中 RAPD 技术将是一种重要的遗传鉴定分析方法。

5 难栽培食用菌原生质体融合技术的前景与展望

我国有着丰富的野生食用菌资源, 而且有着稳定的市场, 目前难栽培食用菌的获得全部靠野生采摘, 满足不了市场的需要。因此利用原生质体融合技术, 使难栽培食用菌与可商业化栽培食用菌的原生质体融合, 融合后的融合子既带有野生食用菌的优良特性, 又带有可栽培食用菌的广泛栽培特性, 使

难栽培食用菌发展为可商业化栽培的食用菌, 有着广阔的发展前景。

原生质体融合技术应用在难栽培食用菌上的研究比其它育种技术起步晚, 但是发展迅速。迄今, 多种食用菌的原生质体分离、再生技术已趋于成熟, 研究成果不断涌现, 如松茸和香菇的原生质体融合、平菇和灵芝等远缘融合成功。原生质体融合技术具有技术难度小, 设备简单, 成本低廉等特点, 决定了它有着广阔的发展空间, 因此原生质体融合技术是难栽培食用菌栽培育种的重要手段之一。

同时, 它也有很多不完善的地方。食用菌原生质体融合菌株难以形成子实体一直是个难题, 研究其原因, 大多学者认为是由于国内外均没有研究出融合核分裂技术。但是, 随着科学技术的不断发展, 食用菌原生质体技术将日趋完善, 发展前景仍然十分广阔。

参考文献:

- [1] 曹文芬, 郭顺星, 徐锦堂. 大型真菌原生质体融合技术研究进展[J]. 生物通报, 1998, 33(10): 24.
- [2] 邱龙新. 食用菌原生质体技术研究现状[J]. 龙岩师专学报, 2002, 20(6): 49-52.
- [3] 程东升, 邹莉, 潘学仁. 厚环乳牛肝的原生质体分离与再生[J]. 中国食用菌, 1994, (13)2: 24-26.
- [4] 孙丽, 凌建亚, 张长恺. 浓香乳菇原生质体再生及再生株特性研究[J]. 食用菌学报, 1999, 6(2): 10-14.
- [5] 陈晓琳. 两种虫草无性型原生质体融合及蜂虫草发酵条件的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士论文, 2001, 37-38.
- [6] 姜波. 虫草菌原生质体的制备及诱变[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2004, 13-15.
- [7] 李刚, 李宝健. 灵芝原生质体分离与再生研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 79-88.
- [8] 沙涛, 张汉波, 丁骅孙, 等. 松茸菌丝原生质体形成与再生条件的研究[J]. 生物技术, 2001, 2(11): 12-14.
- [9] 黄萍, 沈孝善. 绿菇子实体菌株的原生质体分离及再生菌株的获得[J]. 西南农业学报, 2001, 14(1): 91-95.
- [10] 张鸿卿, 连慕兰. 细胞生物学实验方法与技术(第一版)[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992.
- [11] 王淑珍, 白晨, 高雁, 等. 松茸与香菇原生质体融合的研究[J]. 食用菌, 2003, (2): 9-10.
- [12] 牛艳芳. 蒙古口蘑与双孢蘑菇原生质体融合育种研究[D]. 呼和浩特市内蒙古师范大学硕士论文, 2004, 9-10.
- [13] 王淑珍, 白晨, 高雁. 松茸与香菇原生质体融合子生物学特性的研究[J]. 食用菌, 2003, (3): 8-9.
- [14] 刘国振, 刘振岳, 贾建航, 等. 用 RAPD 方法对平菇香菇属间原生质体融合子的研究[J]. 遗传 HEREDITAS(Beijing), 1995, 17(5): 37-40.