

食用菌原生质体技术应用的研究

李守勉, 李明*, 邢蕾, 王俊玲, 张殿生 (河北农业大学园艺学院, 河北保定071001)

摘要 主要介绍了原生质体技术在食用菌方面应用的主要技术及存在问题、发展前景。

关键词 食用菌; 育种; 原生质体技术

中图分类号 S646 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)25-07770-02

Application of Protoplast Technology of Edible Mushroom

LI Shou-mian et al (College of Horticulture, Agriculture University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract The application of protoplast technology in genetic breeding of edible mushroom was reviewed. At the same time, the problems existed and the prospects were studied.

Key words Edible mushroom; Breeding; Protoplast technique

食用菌营养丰富, 具有医疗保健作用, 是理想的健康食品。食用菌生产具有原料广、成本低、周期短、效益高的特点, 具有很大的发展潜力。育种是发展食用菌产业的一个重要环节。20世纪兴起的原生质体技术、基因工程技术、酶工程技术、信息技术等高新技术很快渗透到食用菌等学科领域, 并且被广泛应用^[1]。笔者主要论述了新技术中的原生质体技术, 为食用菌产业的发展提供方向。

1 原生质体技术的简述

原生质体是指植物或微生物的细胞或菌丝在细胞壁脱去或降解后所形成的圆球体^[2]。原生质体虽然失去了原有细胞壁, 但是它依然有原生质膜和整体基因组, 是一个具有生理功能的单位^[1]。原生质体技术是近年来迅速发展起来的细胞生物工程育种新技术, 在食用菌育种中具有明显的开拓性。原生质体技术在植物和细菌中应用较早, 在真菌中起步较晚。1957年, Eddy等首次用蜗牛中酶溶解酵母菌细胞壁分离得到原生质体^[3]。原生质体技术在食用菌中的应用最早见于 Davies 和 Wessels 对双孢蘑菇和草菇的原生质体制备和分离^[2]。近30年来, 食用菌原生质体技术在理论和应用上都取得了很大的进展。迄今, 国内外学者已从50多种食用菌中成功制备原生质体, 并就利用原生质体技术进行食用菌育种进行了大量的研究^[4]。

2 原生质体技术的应用

2.1 原生质体再生无性系^[5-10] 原生质体无性繁殖系在蕈菌遗传育种中的应用有3个方面: 从蕈菌原生质体化菌株中选育生产性状改良的优良生产菌株; 应用于蕈菌细胞质遗传、核遗传和生理生化研究; 应用于蕈菌老化生产菌株的复壮。原生质体再生无性系的变异机理在于去壁细胞敏感性增强。再生过程能消除与经济性状传递有关的质粒, 导致次级代谢途径的变化, 从而出现有利于产量性状的变异。

佐木尧从金针菇的双核菌丝制备的原生质体再生无性系发现了菌落形态突变株、黄色素等生化突变株。Yun^[11]从平菇的再生无性系中获得了高产新菌株。我国在这方面也有报道。肖在勤等研究表明, 一些食用菌的原生质体再生无性系具有出菇能力强、产量高和早熟等优良变异。

2.2 原生质体诱变系统^[4,11-13] 另一类原生质体研究

与常规诱变相结合, 统称原生质体诱变系统。食用菌菌丝为多细胞, 不宜作诱变材料。担孢子虽是单细胞且大多单核, 但因其壁厚, 诱变剂不易穿透, 诱变效果不甚理想。而去除细胞壁的原生质体对外界环境非常敏感, 经诱变剂处理后易发生突变, 因此原生质体诱变育种已成为原生质体育种的一种方法。

刘国振等以紫外线诱变处理筛选出增产、早熟、抗逆性强、菇型改变、效益提高的香菇菌株。该系统产生的营养缺陷型突变株, 为原生质体融合研究提供了遗传标记型材料。迄今, 在侧耳属和香菇属中, 利用原生质体诱变获得的营养缺陷型菌株在国内外都已有不少成功的例子。杨崇林等报道了从桃红平菇中选育出一株丙氨酸和天冬氨酸双缺突变体。它被认为适用于细胞融合。原生质体诱变系统还被应用于选育无孢平菇。许囊中等报道用无孢平菇菌株 P22 原生质体进行紫外线诱变处理, 经拮抗试验、孢子印检测、扫描电镜和出菇试验。筛选出一株中低温型、高产、菇型好的无孢平菇突变菌株^[4-10]。

2.3 原生质体融合技术^[14-15] 原生质体融合技术是近几年食用真菌原生质体育种研究中的活跃领域。该技术主要围绕原生质体分离效率和再生率、改善融合条件与方法、探索融合子的有效筛选鉴定方法等方面展开。

用于融合的亲本菌株多数带有缺陷遗传标记。这就要求用来培养单核菌丝体的液体培养基营养丰富, 从而促进菌丝体在短时间内旺盛生长。原生质体的释放量与酶解时间成正比, 但随着酶解时间的延长, 其对原生质体的再生率影响较大。为解决这一矛盾, 在同样的酶浓度下, 可加大用酶量。这既可保证有一定数量的原生质体释放, 又可保证原生质体有较高的生活力和再生率。原生质体的纯度影响原生质体的融合效果。在纯化原生质体时, 应尽量除去菌丝残片。要调整好两亲本的酶解时间, 防止酶液去除后原生质体再生壁的形成。同时, 促融前期增加搅动可以增加碰撞机会, 促融后期静止有利于融合的发生。PEG对原生质体有一定的毒性, 可降低原生质体的再生率。加等渗液或再生液体培养基, 并且放置一段时间, 既可降低PEG浓度, 减少PEG毒性, 又可使原生质体的壁经过一定再生发育, 减少在离心洗涤中原生质体的破碎, 提高原生质体的融合、再生率。

在融合子的鉴定方面, 同工酶分析是采用最普遍的方法。酯酶是一种存在较普遍的酶, 其同工酶谱具有较高的多

作者简介 李守勉(1978-), 女, 河北泊头人, 助教, 从事食用菌生物技术与遗传育种方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-06-11

型性,因而适合于作为杂种鉴定的指标之一。第2种较为实用的鉴定方法是融合株与亲本株的拮抗试验。拮抗表现的多样性反映融合子的变异程度。在带有选择性标记的融合株产生担孢子的前提下,对融合杂种的减数分裂产物进行遗传分析是一种更可靠的鉴定方法。另外,根据菌株形态生长特性上的自然标记,也可以鉴别异源融合株。在20世纪90年代才发展起来的新技术——RAPD在进行杂种及原生质体融合子的鉴定分析中也开始崭露头角。

2.4 原生质体单核化技术^[16-18] 单核体是异宗结合食用菌杂交育种中的基本材料。双核体单核化的方法主要有分生孢子分离、化学处理、机械分割。这些方法有一些局限性和难度。1973年,Devries和Wesseis在裂褶菌原生质体制备和再生研究中,发现再生菌丝中可产生双核、单核两种菌丝。随后,又有金针菇、香菇等食用菌的单核原生质体被分离出来。潘迎捷等研究发现,原生质体单核化是平菇、凤尾菇、金针菇、鬼伞、虎皮香菇和香菇等异宗结合食用菌的普遍现象。原生质体单核化现象是原生质体技术在食用菌遗传和育种研究中的一个重要分支。由于单核原生质体具有特殊的遗传背景,在理论上是研究其基因定位和遗传性状的重要材料,在育种上形成了以单核原生质体为材料的新方向,所以具有广阔的应用和推广前景。

2.5 原生质体转化技术^[3] 转化技术在微生物遗传改良、基因工程中占十分重要的地位。但大部分微生物的自然转化能力很低,特别是真核微生物几乎很少能发现自然转化。原生质体技术出现不久,Bibb等发现当PEG存在时,质粒DNA可以很高频率转化链霉菌原生质体,从而彻底摆脱转化依赖感受态的限制。食用菌中的遗传转化已有多例成功的报道,包括糙皮侧耳、杨树菇、紫孢侧耳、双孢蘑菇等。目前,外源基因导入食用菌的最常用方法是CaCl₂/PEG介导的原生质体转化。

3 展望

食用菌原生质体育种研究虽起步较晚,但发展很快。它比传统的杂交育种具有明显的开拓性。由于原生质体育种具有不受亲缘关系的影响、遗传信息传递量大、不需了解双亲详细的遗传背景等优点,因而便于操作。原生质体筛选和诱变技术在应用时遇到的问题都应从技术方面予以改进。原生质体单核化技术已进入应用阶段。食用菌的原生质体

融合技术,既有综合不同食用菌遗传信息的重组作用,又有剖析基因组基因、转移外源基因的分析作用。虽然存在着远缘杂交融合不稳定、应用于栽培生产少等困难,但不影响该技术的发展和推广。

原生质体已去除遗传物质进入细胞的一大屏障,因而它是基因转移的最好受体。由于菇类病虫害日趋严重,所以用分子生物学方法培养新品种的任务已列入议事日程。此外,原生质体破碎后易得到大片段完整的DNA,因此,将食用菌菌丝体制成原生质体,再从原生质体提取DNA后建立基因文库是一条较好的途径。食用菌育种技术应用研究将日益缩小我国与世界先进水平的差距。

参考文献

- [1] 刘祖同,罗信昌.食用菌蕈菌生物技术及应用[M].北京:北京清华大学出版社,2002.
- [2] 杨新美.食用菌研究法[M].北京:中国农业出版社,1998:12.
- [3] 吴小平.原生质体技术在食用菌遗传育种中的应用[J].食用菌学报,1999,6(3):49-53.
- [4] 戴秉丽.原主质体技术在食用菌育种中的应用研究[J].中国食用菌,1995,14(5):15-16.
- [5] 王海英,华秀英,钮旭光,等.原生质体技术在食用菌育种上的应用[J].沈阳农业大学学报,2006,31(3):300-303.
- [6] 何培新,罗信昌,郝保军,等.光木耳原生质体无性系繁殖的研究[J].河南职业技术学院学报,1998,26(4):45-48.
- [7] 路等学,李成一,卢洪英,等.食用真菌原生质体无性繁殖株产菇优势及出菇性状研究[J].甘肃科学学报,1994,6(2):67-72.
- [8] 单英芳,李用芳,何方淑.糙皮侧耳831原生质体再生株的生物学特性研究[J].中国食用菌,1996,15(6):5-7.
- [9] 郭砚翠,刘凤春,王雅茹,等.黑木耳原生质体再生株选育高产菌株研究[J].食用菌学报,1994,1(2):7-10.
- [10] LUD X, LI C Y, DUAN X H. Studies on characters of asexual regenerative strains from protoplast *Heurotus* and *Lentinula edodes*[J]. *Acta Edulis Fung*, 1997,4(3):1-6.
- [11] 刘国振,贾建航,李莉云,等.原生质体诱变技术选育香菇菌株研究[J].食用菌学报,1997,4(4):11-16.
- [12] 许囊中,夏道平.原生质体紫外线诱变选育无孢高产平菇的研究[J].食用菌学报,1997,4(2):11-15.
- [13] 戴秉丽.原主质体技术在食用菌育种中的应用研究[J].中国食用菌,1995,14(6):17-19.
- [14] 薛丽娥,顾沁雪.运用原生质体融合技术培育香菇新品种[J].贵州农业科学,1998,26(3):23-24.
- [15] 何强泰,陆佩洪,陈胜兰,等.平菇新品种选育[J].南京师范大学学报:自然科学版,1995,18(2):59-65.
- [16] 王波.香菇原生质体再生的单核体形成与遗传生理特性研究[J].西南农业学报,1995,8(2):119-122.
- [17] 潘迎捷,陈明杰,汪昭月,等.单核和同核原生质体技术在食用菌遗传育种上的应用[J].食用菌学报,1994,1(2):56-62.
- [18] 杨岱筠,张丕奇,郑美媛,等.白色金针菇原生质体单核菌系的建立及其遗传特性分析[J].食用菌学报,1995,2(4):18-21.