

平菇与香菇属间原生质体融合的研究*

刘振岳 董毓琨 泰立芳 庞国新¹⁾

(河北农业大学农学系,保定 071001)

赵世民 徐金相

(中国科学院遗传研究所,北京)

通过分离和出菇试验,获得了纯化的平菇 (*Pleurotus sapidus*) 和香菇 (*Lentinus edodes*) 单孢系。用溶壁酶去细胞壁制备成原生质体。以 PEG 为融合诱导剂,诱导两者原生质体融合。1988年获得了可以出菇的融合子。这些融合子形成的子实体,从形态、生长习性和菌伞的颜色特征上都与双亲有明显的差异。大部分氨基酸含量介于双亲之间。同功酶分析也显示出融合子呈现与双亲不同的酶带。融合子出现的上述新性状,可能是平菇与香菇的原生质体基因重组的结果。

关键词 平菇,香菇,原生质体,融合子

食用菌种、属间的原生质体融合研究,是国内外融合技术研究的一个重要课题,已有一些食用菌学者进行了这方面的研究工作^[5-7,11-13,18-22]。本研究解决了种、属间杂交不亲和性。它将为远缘杂交育种开辟一条有效育种途径。

70年代初期,就有学者对裂褶菌原生质体制备和再生进行了研究^[20]。到70年代末期,已将这些研究技术引入到食用菌研究领域。Chiu, S. W. 和山田理等对草菇、金针菇和平菇的原生质体分离和再生作了报道^[22,17]。80年代中期,日本已做了长根鬼伞种内原生质体融合,并形成子实体的报道^[19]。现在国内外不少学者已成功地从几十种食用菌制备出原生质体,有些能再生出菌丝。高新强、肖在勤以及 Yumi, M. 等从平菇和凤尾菇的再生菌丝中形成子实体^[6,7,10,27]。还有少数学者报道了异种间原生质体融合,成功地得到融合子^[25,26]。关于属间食用菌原生质体融合研究,迄今未发现融合成功的报道。

香菇在食用菌中占第二位,由于它有独特的香味,是营养丰富的保健食品。因生长期太长,栽培管理复杂,抗逆性差,所以在我国北方很少栽培。平菇在我国北方有大面积栽种,它生长周期短,易栽培,产量高,但品质差。长期以来人们设想把两者优点结合起来,由于杂交方法未解决,未能实现。

从1985年开始,我们对平菇和香菇进行单孢分离,经过3次单孢纯化工作,淘汰有锁状联合的非单孢系。将纯化的平菇和香菇的单孢系制备原生质体。然后,分别进行平菇和香菇的单孢系原生质体再生,并进行出菇实验。证明单孢原生质体只能再生菌丝,而不能形成子实体。同源的不同单孢原生质体交配结果,有少数交配组合能形成子实体^[2]。

本文于1990年1月11日收到。

* 本课题系河北省科委资助项目。

1) 陈家玉、薛君英、臧悦利同志参加部分工作,在此表示谢意。

1987年12月开始,将已纯化的平菇和香菇单孢原生质体进行异源融合,用PEG作聚合剂,使两者融合而后得到融合子,并对融合子进行出菇试验。现将结果报告如下。

材料与方 法

平菇紫孢侧耳(*Pleurotus sapidus*)来自河北省微生物研究所。香菇7402(*Lentinus edodes*)来自华中农业大学真菌研究所。

(一) 培养基

1. 分离单孢的培养基 PDA培养基,马铃薯(去皮)200克,葡萄糖20克,加水至1000毫升。分别将PDA培养基的pH调至6.5和5.0,高压灭菌后,分别接平菇和香菇悬浮孢子液。

2. 纯化香菇和平菇单孢的培养料 香菇采用木屑加水,比例为1:1.2,自然pH值。平菇采用棉籽皮和5%的麦麸,干料和水的比例为1:1.3,pH调至7.5。高压灭菌2小时。

3. 培养单孢菌丝的培养基 D-葡萄糖20克,蛋白胨2克, KH_2PO_4 0.46克, K_2HPO_4 1克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5克,燕麦粉30克,加水至1000毫升。分别调pH为5.0和6.5。

4. 原生质体再生菌丝培养基 D-葡萄糖5克,0.6 mol/L KCl, KH_2PO_4 0.5克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05克,天门冬酰胺0.2克,加水至100毫升,调pH值为6.0(平菇)和5.5(香菇)。以上培养基经高压灭菌(1.0—1.5 kg/cm²)20—30分钟。

(二) 酶液配制

溶壁酶(Lywallzyme)来自广东省微生物所。将溶壁酶配制成3%的水溶液,抽滤灭菌。平菇所用的溶壁酶的浓度为1.5% + 0.6 mol/L KCl,pH为5.8—6.0。香菇采用的酶浓度为3% + 0.6 mol/L KCl,pH为5.5—5.8。

(三) 单孢分离及其纯化

将收集的平菇和香菇孢子,分别放在离心管中,加无菌水7—8毫升,充分悬浮。然后离心(2000转/分)15分钟,重复洗涤3次,把杂菌去掉,第三次洗涤时改换为培养液。取样镜检(10×12),每个视野有7—8个孢子时为适宜孢子液,用平板稀释法分离平菇和香菇的单孢子。而后将平菇和香菇的单孢系经过3次出菇试验,并镜检有无锁状联合,淘汰出菇的和有锁状联合的非单孢。

(四) 平菇和香菇原生质体制备及其纯化

由于香菇比平菇菌丝生长慢,香菇单孢系要比平菇菌丝提前1—2天接在浅层培养液中,在23—24℃温箱中培养5天左右即可酶解。平菇酶解时酶浓度1.5%,温度在28—29℃,酶解时间1.5—2小时。香菇酶解时酶浓度3%,温度34℃,酶解时间3小时即可得到大量原生质体(2.31×10^7 /毫升)。在酶解时每隔3—5分钟摇动1次,以加速酶解。为清除未酶解的菌丝残片。在有1厘米厚的脱脂棉的镍丝网上再过滤1次,这样可以得到纯净的原生质体(镜检时未见菌丝片段,图版I,1.2)。以上操作均在无菌条件下进行。

(五) 异源单孢原生质体融合操作

平菇与香菇原生质体的融合操作,采用王培田等^[4]基本方法并稍加修改。取等量的两者原生质体各2毫升(每毫升含原生质体数 2.31×10^7)混合,用4.5毫升0.4 mol/L的

PEG (MW = 6000) 一滴一滴地轻轻加入两者原生质体混合液中,融合处理后在 35℃ 恒温箱内静止半小时,移至在 27℃ 温箱中放半小时,而后用洗液 2 洗涤离心两次,洗去 PEG,吸去洗液后,培养瓶内加培养液 2—3 毫升,然后在 25℃ 恒温箱内培养。

结果与分析

平菇和香菇原生质体经过融合操作后 11 天时,观察到培养液中出现若干小菌落,第二天将单个小菌落转移到斜面培养基(PDA)上,共分离出小菌落 46 个(图版 I, 3)。

1. 小菌落的出菇试验和观察 1988 年 6 月 25 日袋栽,每个菌落设 3 个重复,长满袋的菌丝体,在 22℃ 地下室培养。8 月 2 日木屑培养菌丝袋有些转色(棕褐色),8 月 27 日显菇蕾(因遇高温不适宜出菇),9 月 9 日出菇。观察由融合子形成的子实体,在外部形态、生长习性和菌伞颜色上和形状以及孢子印的特性都具有双亲的特征(图版 I, 4—7)。例如菌柄中生,菌伞圆形,习性单生偏于香菇;菌伞顶部略凹陷,孢子印带灰紫色,偏于平菇特征。

对小菌落形成的子实体进行了氨基酸测定,结果见表 1。从表 1 可以看出谷氨酸、缬氨酸、酪氨酸和组氨酸等,大部分氨基酸含量介于平菇和香菇双亲之间,少数偏于香菇子实体的氨基酸含量。

2. 小菌落形成子实体的同功酶测定^[8,9,15]对形成的子实体进行以下几种同功酶测

表 1 平菇和香菇融合子的氨基酸含量分析¹⁾ (mg/100mg)

Table 1 Analysis of amino acid contents in *P. sapidus*, *L. edodes* and their fusant fruiting bodies.

氨基酸 Amino acids	样品名称 (TAG)	<i>L. edodes</i>	<i>P. sapidus</i>	<i>L. edodes</i> + <i>P. sapidus</i>
天门冬 ASP		1.824	3.000	1.7688
苏氨酸 THR		0.994	1.5242	0.9562
丝氨酸 SER		1.0024	1.5313	0.9686
谷氨酸 GLU		3.9876	6.0964	4.4223
甘氨酸 GLY		0.9189	1.4501	0.9102
丙氨酸 ALA		1.6644	2.3956	1.4745
半胱氨酸 CYS				
缬氨酸 VAL		6.6533	11.8038	7.5222
蛋氨酸 MET		0.1864	0.2702	0.0857
异亮氨酸 ILE		1.2964	1.9031	1.4617
亮氨酸 LEU		1.5751	2.4080	1.4890
酪氨酸 TYR		0.4241	1.1057	0.6401
苯丙氨酸 PHE		0.9329	1.5962	1.0539
赖氨酸 LYS		1.0919	1.7464	1.0380
氨 NH ₃		0.5329	0.7365	0.5101
组氨酸 HIS		0.3851	0.7413	0.4162
精氨酸 ARG		0.9200	2.2010	1.0618
脯氨酸 PRO		0.3887	0.5761	0.3913

1) 中国科学院遗传所遗传工程实验室毕世华、贾世琴测定,在此表示谢意。

定^[1],并对酯酶(EST)的酶谱作了扫描分析。从中可以看出,小菌落的酶带出现了新的酶带,有的菌落比双亲酶带多而染色较深(图 1),两者有明显的差异。同时也作了其他同功酶的酶谱分析,如 POD (过氧化物酶)、COD (细胞色素氧化酶)、AP (磷酸酯酶) 等

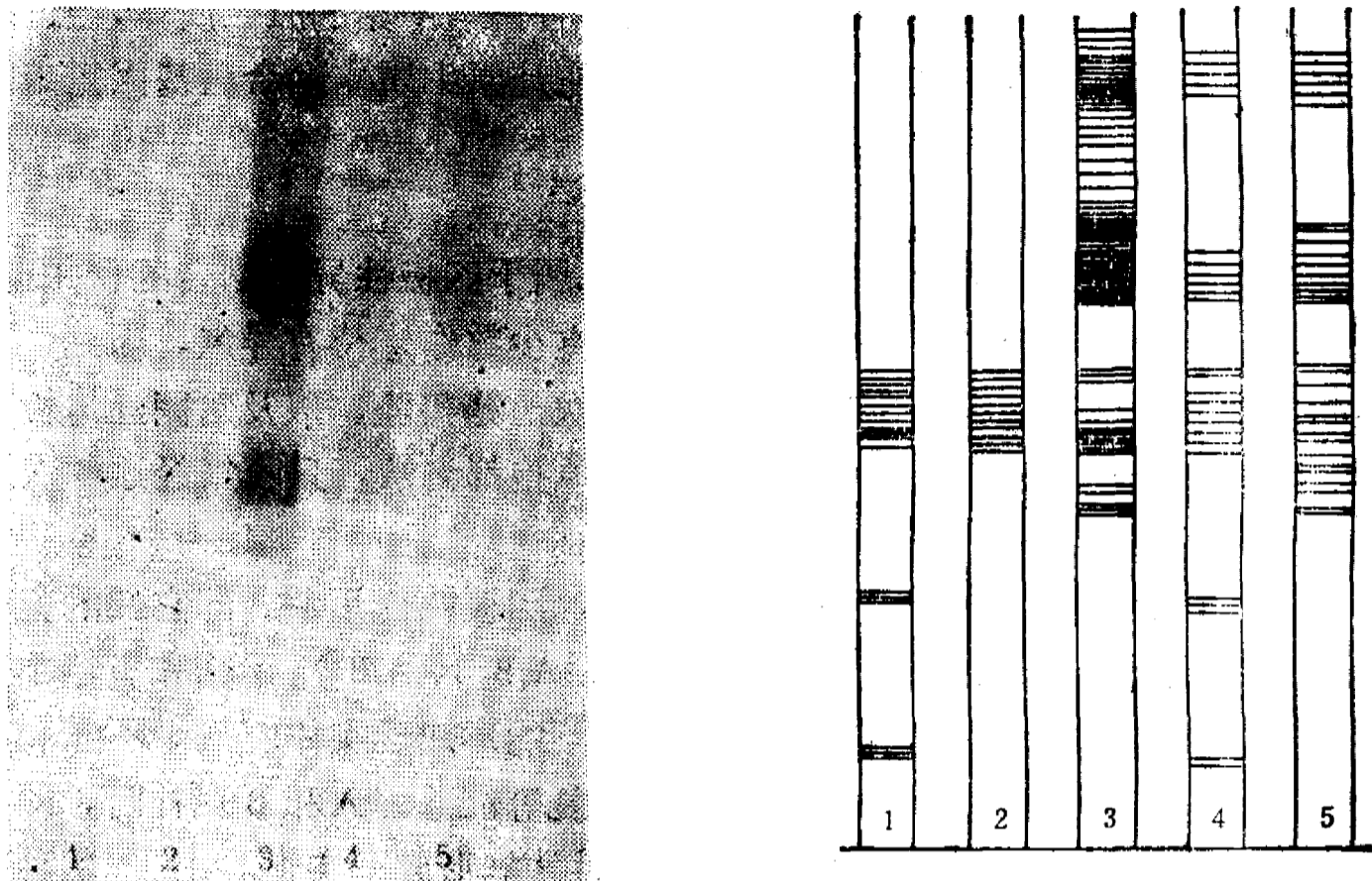


图 1 平菇和香菇原生质体融合后获得的融合子和双亲 EST 同功酶带(1,2,5 为双亲)
 Fig. 1 The isozyme (EST) patterns of the fusants obtained by protoplast fusion from *L. edodes* and *P. sapidus* (parents-1, 2,5)

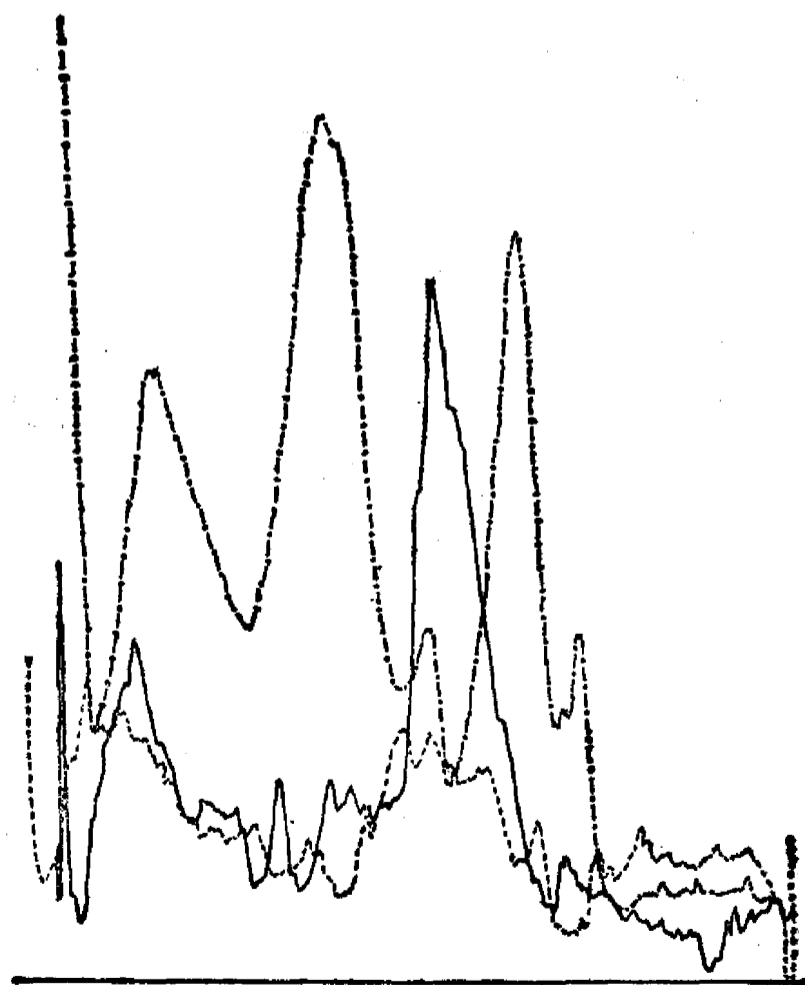


图 2 融合子和双亲之间 EST 同功酶的扫描图比较
 Fig. 2 The comparison with scanning diagrammatic of esterase Isozyme between the fusant and its parents.
 - - - - 平菇+香菇(3-1), *P. sapidus* + *L. edodes* (3-1);
 ——— 平菇, *P. sapidus*; - - - - 香菇, *L. edodes*

分析,也发现了双亲未有的酶带。

对 EST (酯酶) 扫描分析观察(图 2),表明香菇与平菇的融合子形成的子实体,其波峰大小与双亲有明显的差异,出现了双亲未有的波峰。

根据以上各方面的结果与分析表明,可以认为香菇与平菇的原生质体,经过融合操作后发生了真正的融合。融合子出现的新性状,可能是原生质体融合后基因重组的结果。

讨 论

本研究课题主要的理论依据是,平菇和香菇都属于四极性异宗结合的食用菌。两者的单孢系只生长菌丝而不形成子实体^[15]。但国内有少数作者持有异议。因此,本实验认真检验平菇和香菇的单孢能否出菇问题。经过 3 次出菇实验,以及对菌丝体检查有无锁状联合等。把有锁状联合的菌丝体和能出菇的非单孢都淘汰,只收集经过 3 次纯化的平菇和香菇的单孢系。

上述的平菇和香菇都属于双因子 A 和 B 控制的四极性食用菌,即它们的孢子有 4 种交配型($A_1B_2 \times A_1B_2$ 、 $A_1B_1 \times A_2B_1$ 、 $A_2B_2 \times A_2B_1$ 、 $A_1B_1 \times A_2B_2$)。平菇和香菇单孢原生质体本身基因型,即 $A_1B_2 \times A_1B_2$ 配合只再生菌丝,不能形成子实体。两个不亲和的复等位基因 A 和 B 控制出菇的有性过程。当两个不亲和复等位基因 A 和 B 互补时,即单孢原生质体 A_1B_2 和另外一个单孢原生质体 A_2B_1 融合时才能形成子实体。其他两种交配型如 $A_1B_1 \times A_2B_1$ 、 $A_2B_2 \times A_2B_1$ 也只能形成再生菌丝,而不产生子实体。据统计只有 25% 的融合子能形成子实体,因此,产生能够出菇的融合子的机率很低,在这一方面比高等植物原生质体融合难度大。

融合子的筛选是细胞融合研究的技术难点和关键。虽然国内外许多研究者采用营养缺陷型法筛选融合子,在种内和种间融合子筛选已见成效。但是,利用诱变手段获得营养缺陷型也很困难。本项研究在筛选能出菇的融合子方法和理论依据,是平菇和香菇的两对复等位基因互补选择体系^[2,15]。即平菇单孢原生质体基因型 A_1B_2 和香菇单孢原生质体基因型 A_2B_1 融合后,基因互补为 $A_2B_1 \times A_1B_2$ 。只有此类基因型的融合子才能出菇。我们筛选出的融合子形成的子实体,在外部形态和生长习性上具有双亲性状,在同功酶谱和酯酶扫描以及氨基酸生化分析上,都显示出融合子比双亲有明显差异。上述更加证明,两对复等位基因互补选择体系的可靠性。关于平菇与香菇融合子出菇的品质、生长周期、产量以及性状稳定性正在进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王培田等: 1981。科学通报,6: 373—375。
- [2] 刘振岳等: 1988。河北农业大学学报,11(3): 96—100。
- [3] 何强泰: 1986。食用菌,3: 6—8。
- [4] 何强泰: 1986。中国食用菌,3: 42—43及4: 36—37。
- [5] 阮一骏等: 1986。食用菌,2: 8。
- [6] 肖在勤: 1988。食用菌,5: 6—7。
- [7] 肖在勤: 1989。食用菌,5: 17。
- [8] 周丽斌: 1989。食用菌,5: 23—24。
- [9] 周金树: 1987。中国食用菌,2: 2—6。
- [10] 高新强: 1986。中国食用菌,1: 14—15。

- [11] 廖汉生等: 1989. 中国食用菌, 2: 2—6。
 [12] 廖汉生等: 1987. 微生物通报, 14(1): 1—3。
 [13] 罗信昌: 1987. 中国食用菌, 1: 3—6。
 [14] 张树庭: 1983. 食用菌遗传及育种, 第74—78页, 第92—102页。商业部食用菌开发中心出版。
 [15] 张厚铨等: 1986. 中国食用菌, 2: 7。
 [16] 贺建超: 1989. 中国食用菌, 5: 13。
 [17] 山田理等: 1983. 日本食品工業學會誌, 30(9): 495—500。
 [18] 佐佐木尧: 1986. 遗传(日), 40(6): 15—20。
 [19] 柳园江: 1986. «化学と生物» 24(5): 285—287。
 [20] 柳园江: 1985. *Res. J. Food. Agric. (Japan)*, 8(1): 23—27。
 [21] Chiu, S.W.: 1985. *Mirc. J. Appl. Microbi. Biotech.*, 1(2): 185—193。
 [22] Chiu, S.W.: 1982. *Mushroom. Newsle. Tropi.*, 3(2): 13—14。
 [23] Hong, S.W. et al.: 1985. *Mushroom Newsle. Tropi.*, 5(4): 4—11。
 [24] Masami, A. et al.: 1982. *Agric. Biol. Chem.*, 46(7): 1955—57。
 [25] Toyomasu, T. et al.: 1986. *Agric. Biol. Chem.*, 50(1): 223—225。
 [26] Tetsuo, T.: 1987. *Agric. Biol. Chem.*, 51(3): 935—937。
 [27] Yumi, M. et al.: 1985. *Appl. Enviro. Microbi.*, 49(2): 441—442。

Studies on the Interceneric Fusion of Protoplasts from *Pleurotus sapidus* and *Lentinus edodes*

Liu Zhenyue, Dong Yukun, Tai Lifang Pang Guxin

(Dept. of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071001)

Zhao Shimin, Xu Jinxian

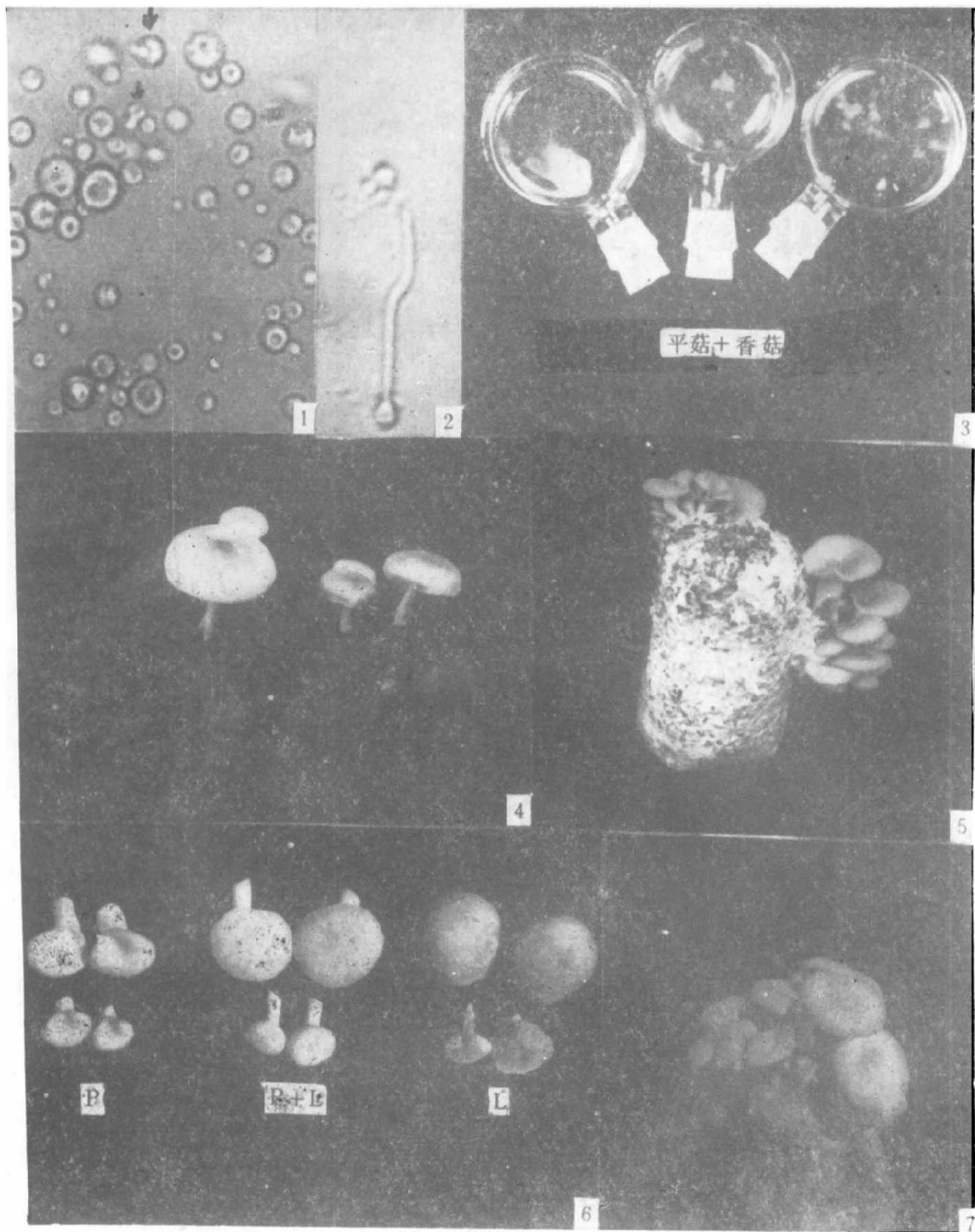
(Research Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

ABSTRACT

Single spore pure lines of homozygous *Pleurotus sapidus* and *Lentinus edodes* were isolated and mushroom germination was tested. After removing the cell wall and by using Polyethyleneglycol(PEG) as fusogen, both the protoplasts were fused to give fusant which could grow up and form mushroom. The fruiting bodies from fusants were remarkably different from that of their parents in morphological characters, growth habits and pileus colours. Amino acid analysis showed that the contents of most amino acids in the fusant were in intermediary between two parents. The isozyme analysis also showed that the fusant manifested itself different zymogram bands from its parents.

Based on the comparison with the criteria mentioned above, we believe that the intergeneric hybrids have been obtained by manipulating the protoplasts of single spore pure lines of *P. sapidus* and *L. edodes* and that the new characteristics of fusants are resulted from the gene recombination of their parent protoplasts.

Key words *P. sapidus*, *L. edodes*, Protoplasts, fusant



1. 纯化的平菇原生质体； 2. 平菇再生菌丝； 3. 平菇和香菇原生质体融合子形成的小菌落； 4. 香菇； 5. 平菇； 6. 香菇和平菇两者融合后形成的子实体； 7. 平菇和香菇融合子出菇形态性状。
1. Purified protoplasts of *P. sapidus*; 2. Regenerated mycelium of *P. sapidus*; 3. Small colony formed from *P. sapidus* and *L. edodes* protoplast fusant; 4. *L. edodes*; 5. *P. sapidus*; 6. The fruiting bodies from fusants of *L. edodes* and *P. sapidus*; 7. Morphological characteristics of fusant from *P. sapidus* and *L. edodes*.