

李光环,索肖园,史灵燕,等. 鲍鱼菇原生质体的制备与再生研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):111-113.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.026

鲍鱼菇原生质体的制备与再生研究

李光环,索肖园,史灵燕,郑素月,郭金英

(河北工程大学园林与生态工程学院,河北邯郸 056021)

摘要:以鲍鱼菇为材料,拟研究稳渗剂种类、酶解时间、菌丝量、菌龄对原生质体产量及再生率的影响。结果表明,原生质体制备的优化条件是取菌龄为 10 d、液体静置培养的菌丝 0.04 g,在以 0.6 mol/L 蔗糖作为稳渗剂的酶液(浓度为 2%)中于 30 ℃ 酶解 2 h,获得原生质体的产量为 1.2×10^7 个/mL。在优化条件下得到的原生质体再生率达到 0.30%;对再生菌落进行镜检发现,无锁状联合的原生质体单核菌株菌丝洁白,长势旺盛,超过了双核菌丝的长速。研究结果可以为鲍鱼菇原生质体融合选育新品种提供一定的基础。

关键词:鲍鱼菇;原生质体;制备;再生;单核体

中图分类号: S646.1⁺41.04⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)04-0111-02

鲍鱼菇(*Pleurotus abalonus*)子实体肥大,风味似鲍鱼,清香脆嫩,是食药兼用的珍稀食用菌之一。利用多种原料在夏季栽培鲍鱼菇,可以弥补冀中南地区夏季鲜菇产品缺乏的状况。此外,通过选育鲍鱼菇的新品种可以逐步解决冀中南地区夏季鲜菇的供应问题^[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,原生质体的制备与再生是原生质体育种技术的基础^[2]。迄今,国内外许多学者已经从 60 多种食用菌中成功制备出原生质体,并对原生质体的育种技术进行了大量探索。研究发现,在金针菇^[3]、香菇^[4]、白灵菇^[5]中都有少量单核原生质体被分离出来。潘迎捷等研究发现,单核化现象在平菇、香菇、凤尾菇、金针菇等异宗结合的食用菌中非常普遍^[6]。单核体是异宗结合食用菌杂交育种的基本材料,在食用菌育种中具有明显的开拓性。目前关于鲍鱼菇原生质体制备及再生的研究鲜有报道,本研究拟探索鲍鱼菇原生质体制备及再生条件,并在优化条件下制备获得原生质体优良单核菌株,旨在为鲍鱼菇原生质体融合选育新品种提供重要的研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 鲍鱼菇,为笔者所在实验室保存的菌株。

1.1.2 供试培养基及试剂 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,简称 PDA)综合培养基;0.6 mol/L 蔗糖再生培养基;0.6 mol/L 甘露醇再生培养基;溶壁酶,购自广东省微生物研究所。

收稿日期:2017-11-02

基金项目:河北省现代农业产业技术体系食用菌创新团队建设专项资金(编号:HBCT2013060205);冀南地区林下双孢菇高效栽培技术与示范项目(编号:1622201053)。

作者简介:李光环(1987—),女,河北邯郸人,硕士研究生,研究方向为食用菌新品种选育与菌种生产技术。E-mail:769105928@qq.com。

通信作者:郭金英,博士,副教授,研究方向为食用菌新品种选育与菌种生产技术。E-mail:15933880643@163.com。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝培养 用 PDA 综合培养基活化菌丝,研磨后置于 50 mL 液体 PDA 培养基中,于 25 ℃ 黑暗静置培养。

1.2.2 原生质体的制备 在无菌操作条件下将培养的菌丝过滤收集,先后用无菌水、稳渗剂分别漂洗离心(5 000 r/min, 6 min)2 次。将洗涤好的菌丝用滤纸吸干水分并称质量,采用单因素试验分别研究稳渗剂种类、酶解时间、菌丝量、菌龄等因素对原生质体产量的影响。将菌丝放入预热的酶解液中,置于 30 ℃ 水浴锅中酶解,每隔 10 min 摇动 1 次,使酶解液和菌丝充分接触,从而加快酶解速度。在酶解过程中定时取酶液置于血球计数板上镜检观察原生质体的释放情况。酶解终止后用无菌脱脂棉过滤除去残留菌丝,将滤液于 4 000 r/min 离心 10 min,弃清液,收集沉淀,用稳渗剂适当稀释后得到纯化的原生质体悬液。

1.2.3 原生质体的再生 原生质体用稳渗剂稀释至适宜浓度,设置 3 个浓度梯度,每个梯度取 0.1 mL 原生质体悬液涂布于再生培养基平板上,于 25 ℃ 遮光培养。获取再生菌落,观察计数,计算再生率。以不加稳渗剂的 PDA 平板作对照,再生率的计算公式如下:

再生率 = (再生培养基上生长的菌落数 - PDA 培养基上生长的菌落数) / 接种数 × 100%。

1.2.4 原生质体再生菌落的鉴定 将涂布于再生培养基上的原生质体进行遮光培养,肉眼可观察到星芒状或点状的再生菌落,挑选再生菌落于试管斜面培养基中培养,镜检,根据有无锁状联合确定是单核还是双核菌丝。

2 结果与分析

2.1 原生质体制备条件

2.1.1 稳渗剂种类对原生质体产量的影响 分别以 0.6 mol/L 甘露醇、蔗糖为稳渗剂(酶浓度为 2%),于 30 ℃ 酶解 3 h,每隔 0.5 h 取样测定原生质体产量。由图 1 可以看出,酶解开始时,原生质体随着酶解的进行逐渐释放,原生质产量逐渐上升直至达到峰值,以甘露醇作为稳渗剂酶解 1.5 h 时,原生质体产量高于以蔗糖作为稳渗剂的,随后低于以蔗糖

作为稳渗剂的,以甘露醇作为稳渗剂处理的原生质体产量在 1.5 h 时达到峰值 1.1×10^7 个/mL,以蔗糖作为稳渗剂处理的原生质体产量在 2.0 h 时达到峰值 1.0×10^7 个/mL。2.0 h 后,酶活性逐渐降低,且原生质体随着酶解时间的延长会破裂,原生质体产量呈下降趋势。

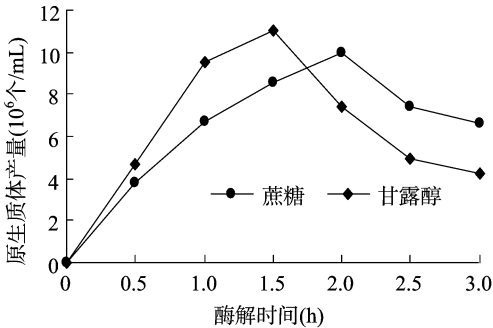


图1 稳渗剂种类对原生质体产量的影响

2.1.2 菌丝量对原生质体产量的影响 分别称取 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g 菌丝放入以 0.6 mol/L 蔗糖作为稳渗剂的无菌酶解液中(酶浓度为 2%),于 30 ℃ 酶解 2 h 后,

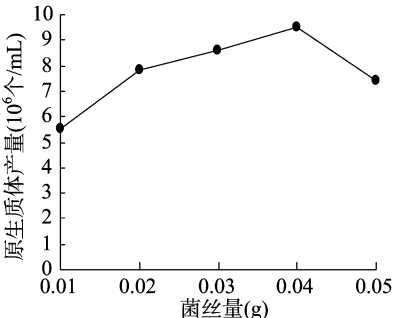


图2 菌丝量对原生质体产量的影响

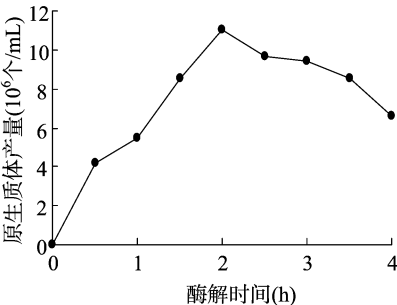


图3 酶解时间对原生质体产量的影响

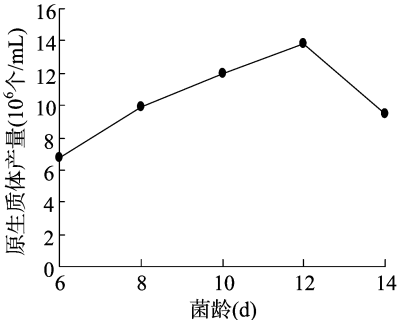


图4 菌龄对原生质体产量的影响

2.2 原生质体再生结果

2.2.1 不同稳渗剂再生培养基对原生质体再生率的影响

分别以 0.6 mol/L 甘露醇、蔗糖作为稳渗剂,在培养 12 d 时,蔗糖培养基上原生质体再生率为 0.30%,而甘露醇培养基只有 0.05%。综合考虑,以 0.6 mol/L 蔗糖再生培养基作为优选培养基。

2.2.2 不同菌龄对原生质体再生率的影响

分别选取菌龄为 6、8、10、12、14 d 的菌丝体,检测原生质体的再生率。由表 1 可以看出,菌龄为 8、10 d 的原生质体再生率远远高于其他菌龄的,以菌龄为 10 d 的菌丝原生质体再生率最高,达 0.30%。

表 1 菌龄对原生质体再生率的影响

菌龄 (d)	原生质体再生时间 (d)	原生质体再生率 (%)
6	15	0.07
8	13	0.25
10	12	0.30
12	12	0.04
14	12	0.05

2.3 原生质体再生菌落的鉴定分析

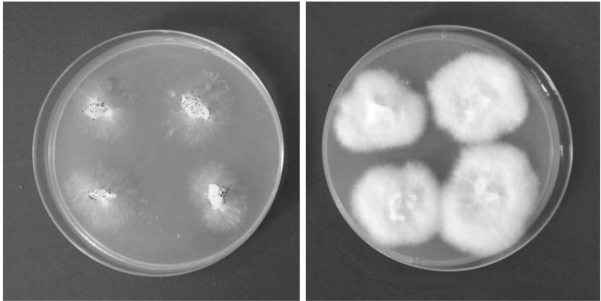
通过对再生菌落进行镜检发现,鲍鱼菇有锁状联合的双核菌株都长有分生孢子梗束,顶部呈黑色球形,梗呈白色,而

检测原生质体产量。由图 2 可以看出,0.04 g 菌丝量的原生质体产量最高,达到 9.5×10^6 个/mL,之后随着菌丝量的增加,原生质体产量出现了下降趋势。

2.1.3 酶解时间对原生质体产量的影响 取菌丝置于以 0.6 mol/L 蔗糖作为稳渗剂的无菌酶解液中,于 30 ℃ 酶解 1、2、3、4 h,在不同时间取样测定原生质体产量。图 3 结果表明,在 1~2 h 之间,原生质体产量随着酶解时间的延长而迅速增加,在 2 h 时酶解所得原生质体产量最高,为 1.1×10^7 个/mL,随后原生质体产生量逐步下降,由此可见,制备鲍鱼菇的原生质体酶解时间以 2 h 为宜。

2.1.4 菌龄对鲍鱼菇原生质体产量的影响 分别取培养 6、8、10、12、14 d 的菌丝体,在以 0.6 mol/L 蔗糖为稳渗剂的无菌酶解液中于 30 ℃ 酶解 2 h,检测原生质体的产量。由于鲍鱼菇菌丝较其他侧耳属品种生长速度慢,培养的前 5 d 菌丝量较少,因此不适合用于制备原生质体。图 4 结果表明,从培养 6 d 开始,随着菌龄的增加,原生质体产量开始递增,培养 10 d 时的原生质体产量为 1.20×10^7 个/mL,到培养 12 d 时,原生质体产量最高,达到 1.38×10^7 个/mL,但是培养 12 d 以后,原生质体产生量开始明显下降。

无锁状联合的单核菌株菌丝洁白,呈绒毛状,长势旺盛。从菌丝长势及显微结构观察初步看出,挑取的单核菌丝更加粗壮,经测定,单核菌丝在培养 10 d 时长满直径为 90 mm 的培养皿,双核菌丝在培养 16 d 时长满直径为 90 mm 的培养皿,单核菌丝体在长势和长速上均超过了双核菌丝(图 5)。



a. 双核菌丝 b. 单核菌丝
图5 双核菌丝和单核菌丝的生长

3 结论与讨论

本研究得出鲍鱼菇原生质体制备的优化条件:用液体静置培养的菌龄为 10 d 的 0.04 g 菌丝,在以 0.6 mol/L 蔗糖作为稳渗剂的酶液(浓度为 2%)中于 30 ℃ 酶解 2 h,原生质体

辛董董,朱自果,候行行,等.不同葡萄品种花粉生活力、花粉量及柱头可授性的测定[J].江苏农业科学,2019,47(4):113-116.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.027

不同葡萄品种花粉生活力、花粉量及柱头可授性的测定

辛董董,朱自果,候行行,连艳会,闫丹丹,张 洋,李桂荣

(河南科技学院园艺园林学院,河南新乡 453003)

摘要:以粉红亚都蜜、红巴拉蒂、里扎巴特、新西兰攀金等4种葡萄品种的花粉为试验材料,分别贮藏在-5、-10、-15、-20、-25、-30、-80℃温度条件下,贮藏1、3、5 d,然后用200 g/L蔗糖+50 mg/L硼酸+8 g/L琼脂固体培养基作为营养基质,进行花粉离体培养。结果发现,不同温度处理下贮藏5 d后,红巴拉蒂在-10℃下花粉生活力最高;粉红亚都蜜在-80℃下花粉生活力最高;新西兰攀金在-20℃下花粉生活力最高;里扎巴特在-20℃下花粉生活力最高;不同品种的葡萄花粉量不同,摩尔多瓦的花粉量最多,为 $11\,833 \pm 780$ 个。柱头可授性测定试验结果表明,不同葡萄品种柱头可授性强弱不同,摩尔多瓦的柱头可授性最强,适合在杂交育种作母本。

关键词:葡萄;花粉生活力;花粉量;柱头可授性

中图分类号: S663.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0113-04

近年来我国葡萄(*Vitis vinifera* L.)的种植面积逐渐扩大。在现代技术的引领之下,避雨棚、温室等先进的栽培设施与配套的栽培技术相继出现,加快了我国葡萄产业的发展^[1]。先进的栽培设施虽然使我国葡萄产业迅速发展,但由于这类栽培设施都存在一个致命的缺陷——湿度过大,长期生长在这种高温高湿、光照不足的人造小气候环境内的葡萄,其抗性必然下降,培育出抗逆性强的优良葡萄品种,是今后葡萄育种的

发展趋势。在葡萄育种中最为重要的育种手段就是杂交育种^[2-3]。杂交育种中,父母本的选择是育种最重要的保证。花粉活力是评估花粉细胞活性的依据之一,高生活力的花粉、较多花粉量、较强柱头可授性是杂交育种成功的一个重要前提,花粉生活力的高低、花粉量的多少、柱头可授性强弱直接影响授粉、受精乃至坐果^[4-8]。因此,在使用贮藏的葡萄花粉之前对其进行生活力的测定是保证杂交授粉获得较高坐果率的关键步骤^[9]。本试验选取不同鲜食葡萄品种花粉,通过离体培养的方法,对不同温度处理下的花粉生活力进行研究,探索最佳花粉的贮藏方法,通过血球计数板法测定不同鲜食葡萄品种花粉量,并采用联苯胺-过氧化氢法测定葡萄品种柱头可授性,探索柱头可授性的强弱,旨在为葡萄育种中亲和力和强的父母本的选择提供理论依据,有助于提高杂交授粉率,获得较高的杂交后代率。

收稿日期:2017-10-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:U1404321);河南省高等学校重点科研项目(编号:16A21003);河南科技学院博士启动项目(编号:2014024)。

作者简介:辛董董(1994—),男,河南商丘人,硕士研究生,从事园艺植物生理特性及生物技术育种方面的研究。E-mail:331629257@qq.com。

通信作者:李桂荣,博士,副教授,从事园艺植物育种与生物技术教学科研工作。E-mail:liguirong10@163.com。

产量为 1.2×10^7 个/mL。在优化的条件下,得到的原生质体再生率达到0.30%。影响原生质体释放的因素很多,本试验通过对鲍鱼菇原生质体制备条件和再生的研究,明确了在液体静置培养的条件下,稳渗剂种类、酶解时间、菌丝量、菌龄对原生质体产量和再生的影响。本研究通过对鲍鱼菇菌丝进行液体培养制备原生质体,首先对稳渗剂种类进行选择,在本试验中,以甘露醇作稳渗剂制备获得的原生质体产量在酶解0~1.5 h内高于以蔗糖作为稳渗剂的,与周霞等报道的以甘露醇作为稳渗剂制备获得的原生质体产量高于蔗糖的研究结果^[7]一致,但因以蔗糖作为稳渗剂时,再生率远远高于甘露醇,因而本试验均采用蔗糖作稳渗剂。

在前人的相关研究中,原生质体单核菌丝长速一般低于双核菌丝,本试验选出的几个鲍鱼菇单核菌丝长速明显快于双核菌丝,其机制尚需进一步研究。

本研究通过对鲍鱼菇原生质体制备及再生条件的初步研究,优化了其制备条件,获得了原生质体优良单核菌株,为鲍

鱼菇原生质体融合选育新品种提供了重要的研究基础。

参考文献:

- [1] 黄春燕,万鲁长,宫志远,等.鲍鱼菇富硒栽培适宜菌株筛选[J].山东农业科学,2014,46(11):54-56.
- [2] 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.
- [3] 王 波,祁丽萍,贾定洪,等.金针菇菌株单核原生质体交配型与菌丝生长分析[J].西南农业学报,2012,25(4):1407-1413.
- [4] 朱朝辉,陈明杰,谭 琦,等.香菇原生质体单核体的再生与交配型的关系[J].食用菌学报,2000,7(4):1-3.
- [5] 李 莎,刘 宇,马 康,等.原生质体单核化技术在白灵菇菌种提纯复壮中的应用[J].江苏农业科学,2015,43(5):248-250.
- [6] 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.
- [7] 周 霞,张 尧,张成霞,等.原生质体诱变选育高产多糖荷叶离褶伞菌株[J].江苏农业科学,2017,45(16):126-128.