

刘昆昂,刘 萌,张根伟,等. 金针菇遗传育种研究进展[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):18-22.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.004

# 金针菇遗传育种研究进展

刘昆昂<sup>1,2</sup>, 刘 萌<sup>1</sup>, 张根伟<sup>1</sup>, 李书生<sup>1</sup>, 马 宏<sup>1</sup>, 尹淑丽<sup>1</sup>

(1. 河北省科学院生物研究所, 河北石家庄 050081; 2. 华南农业大学农学院, 广东广州 510642)

**摘要:**金针菇是双因子控制的四极性异宗结合的食用菌,与其他异宗配合的食用菌一样,主要采用选择育种、杂交育种、诱变育种、原生质体融合和基因工程育种等育种方法进行育种,其中选择育种是其他一切育种方法的基础。杂交育种手段繁琐费事,但目的性和方向性都比较明确,仍然是目前培育金针菇新的优良菌株的真正有效方法。诱变育种多采用金针菇的原生质体进行诱变,但诱变育种只扩大了变异范围,并不能定向诱变,后期筛选工作将会十分繁琐,诱变率也偏低。原生质体融合方法具有重组频率高、受结合型限制较小、遗传物质传递更为完整、重组体种类多、有助于外源基因转化等特点。随着各种测序技术和分析手段的不断发展,金针菇的基因工程育种将成为未来菌株改良的新途径。

**关键词:**金针菇;选择育种;杂交育种;诱变育种;原生质体融合;基因工程育种

**中图分类号:**S646.1+50.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)14-0018-05

金针菇[*Flammulina velutipes* (Curt. Ex Fr.) Sing.],别称构菌、冬菇、毛柄金钱菌,属于担子菌门(Basidiomycotina)层菌纲(Hymenomycetes)伞菌目(Agaricales)口蘑科(Tricholomataceae)金钱菌属(*Flammulina*)<sup>[1]</sup>。金针菇营养丰富、味道鲜美且兼具药用价值,富含蛋白质、多糖、维生素和氨基酸等多种营养物质,其中人体所必需的8种氨基酸占氨基酸总量的44.5%,其中赖氨酸和亮氨酸等人体必需氨基酸的含量高于其他菇类,因此又称增智菇。金针菇作为一种优质的膳食纤维来源,还具有促进消化、排除重金属离子和降低胆固醇的作用,其中含有的多糖成分,还可预防高血压和肿瘤等疾病,经常食用可明显提高人体免疫力。

金针菇在世界各地分布广泛,主要集中在中国、日本和韩国等地,在国际食用菌市场上,金针菇的产销量位居第4。20世纪60年代,日本开始通过空调设备与各种自动化装置,实现了金针菇的工厂化栽培,整个金针菇栽培管理过程全部自动化。金针菇菌种作为发展金针菇的基础生产资料,对金针

菇生产起着关键性作用,直接影响其产量和质量。因此,金针菇生产与研究的关键是对具有高产、抗病、广温等优良农艺性状菌株的筛选。

## 1 金针菇生活史

金针菇是双因子控制的四极性异宗结合的食用菌,有性世代产生担孢子,每个担孢子产生4个担孢子,交配型可以分为4种,分别为AB、ab、Ab、aB<sup>[2]</sup>。金针菇单个担孢子发育而来的同核体菌丝为单核,无锁状联合,单核菌丝也可以形成子实体,但与双核相比子实体小且发育不良。具有可亲和交配型的单孢菌丝经过质配形成异核体菌丝,异核体菌丝双核,具有锁状联合,双核菌丝经过发育后扭结形成原基,进而发育形成异核子实体,异核子实体的原担子细胞为异核体,胞内具有2个核,这2个核经过核配融合为1个二倍核,二倍核的担子进行减数分裂形成4个单倍子核,4个子核分别进入4个担孢子中,随着担孢子继续发育,其中的单核再进行1次有丝分裂,成熟担孢子为双核,但这2个核是同质的。金针菇的无性阶段,单核菌丝和双核菌丝都可以产生单核的粉孢子,粉孢子在条件适宜时可以萌发出单核菌丝或者双核菌丝<sup>[3]</sup>。

## 2 育种方法

### 2.1 选择育种

选择育种(selective breeding)是以食用菌的自然变异为基础,有意识地控制和积累有益的突变,经过不断的优胜劣汰,培育出新的优良品种的育种方法,该方法操作简单,应用

收稿日期:2018-04-08

基金项目:河北省科学院两院合作项目(编号:181608);河北省高层次人才资助项目“三三三人才工程”(编号:A201803038)。

作者简介:刘昆昂(1986—),女,河北秦皇岛人,博士研究生,主要从事食用菌育种及分子机制研究。Tel:(0311)66032749;E-mail:liukunang@163.com。

通信作者:李书生,研究员,主要从事食用菌育种及产品开发。E-mail:lishsh717@126.com。

2017(8):97-101.

- [76]常泽辉,贾柠泽,侯 静,等. 聚光回热式太阳能土壤灭虫除草装置光热性能[J]. 农业工程学报,2017,33(9):211-217.
- [77]隋俊杰. 土壤电消毒灭虫机在设施农业中的应用[J]. 农业工程,2012,2(增刊1):35-38.
- [78]纪 超,冯青春,袁 挺,等. 温室黄瓜采摘机器人系统研制及性能分析[J]. 机器人,2011,33(6):726-730.
- [79]魏忠彩,李学强,孙传祝,等. 马铃薯收获与清选分级机械化伤

薯因素分析[J]. 中国农业科技导报,2017,19(8):63-70.

- [80]徐 鹏,吴玉月,刘 勤. 我国果蔬气调保鲜技术及装备的现状 & 发展趋势[J]. 包装与食品机械,2016,34(6):51-54.
- [81]高 德,谷吉海,董 静,等. 臭氧果蔬保鲜包装技术及试验[J]. 农业机械学报,2006,37(8):190-193.
- [82]齐 飞. 论温室产品的“低质-低价”趋向对温室行业的影响[C]//2002年中国农业工程学会设施园艺工程学术年会. 北京:中国农业工程学会,2002:13-15.

广泛,是最传统的方法,也是各种育种方法的基础<sup>[2]</sup>。目前用于人工栽培的食用菌菌种绝大多数都是由野生菌种驯化而来,驯化育种又称为人工选择,以品种在自然界中的变异为基础,选育出高产优质菌株,我国引进和驯化栽培成功的食用菌已达 80 多个种<sup>[4]</sup>。野生育成的菌株具有菌柄粗、色泽深、菌盖大、绒毛多、抗病性强、生物转化率高等优点,并且子实体脆嫩,与野生菇一样鲜美。我国金针菇种质资源比较丰富,地方品种繁多<sup>[5]</sup>,须要充分了解当地食用菌生存环境、生活习性以及遗传特性等特征,利用孢子分离法或组织分离法进行分离,将筛选出的野生菌株不断进行人工选择,改变部分特性,逐渐培养为栽培种<sup>[6]</sup>。野生食用菌驯化栽培是食用菌育种的重要内容。刘胜贵等对湖南省怀化市郊区采集的野生金针菇 F9703 菌株进行驯化,并与杂交 19 菌株在菌丝生活力、出菇特征、生物学效率等方面进行比较,结果发现,金针菇 F9703 菌株的菌丝生活力、生物学效率均强于杂交 19 菌株,但子实体外观品质略差<sup>[7]</sup>。周建林等对浙江省江山市主栽金针菇品种江山白菇进行组织分离,经逐年自然筛选,选育出高产、优质、抗逆性强的白色金针菇新品种 F21-2,该品种已成为浙江省金针菇栽培的重要品种<sup>[8]</sup>。驯化成功后,人们又采用杂交育种、诱变育种、原生质体融合等多种方式进一步对该菌种进行改造,最终形成多个生产上常用的新菌株。

## 2.2 杂交育种

杂交育种 (crossbreeding) 也是食用菌常用的育种方法,着眼于双亲性状的优势互补或借助于一亲本的优点去克服另一亲本的缺点,其目的性及方向性都比较明确<sup>[9]</sup>。选择适当的亲本是杂交育种成功的关键,首先选择的 2 个亲本都应该具有突出的优点,其次亲本之间应具有较大的遗传差异,再次亲本之间应具有较好的配合力。杂交育种一般费时费力,且对各项操作步骤要求都较高,但却是目前食用菌育种最常用的方法,尤其在异宗结合的食用菌新品种选育中使用最广泛,收效最显著<sup>[6]</sup>。金针菇是异宗结合的食用菌,可以利用不同性别的单核菌丝进行杂交,其杂交方法有单孢杂交和多孢杂交,目前杂交育种是对金针菇品种改良和选育最有效的方法<sup>[10]</sup>。食用菌杂交育种主要分为单孢杂交、双单杂交和多孢杂交,单孢杂交配对后的杂交菌株必须通过出菇试验确定优劣。自然界中单孢杂交的机会极少,多数是多孢杂交获得的优势菌株,这些菌株具有菇形圆整、抗病力强等优点<sup>[11-12]</sup>。

金针菇杂交 19 号菌株,是以日本信浓二号和三明一号为亲本进行多孢子杂交选育出来的一个优良杂交菌株,于 1988 年年底通过鉴定<sup>[13]</sup>。F-7 是以杂交 19 为亲本,通过多孢杂交选育而成的优质、高产菌株,其色泽黄白,外形美观,菌柄基部无褐色,菌柄细而挺直,菌盖小,耐高温能力强<sup>[14]</sup>。王波等对从 Fv12 中分离出的单孢菌株进行两两相互配对杂交,共配对杂交组合 228 个,以锁状联合为标记鉴别杂交种,确定杂交菌株有 72 个,杂交率为 31.6%,经过初筛和复筛,得到 1 株较优良的菌株川金 2 号<sup>[15]</sup>。王波等通过黄色金针菇与白色金针菇双单杂交选育出了金针菇新品种川金 3 号,该品种于 2006 年通过四川省农作物品种审定委员会审定<sup>[16]</sup>。徐珍等以金针菇菌株 F3-31 和 FM-83 为亲本,利用单孢子分离技术,经过单孢杂交选育出菇形好、生育期短、产量高的白色优良菌株 G1,弥补了 F3-31 颜色浅黄、菌盖伞形、产量较低和

FM-83 生育期长、抗性差的不足<sup>[17-18]</sup>。金针菇农金 6 号是以黄色品种三明一号与白色品种金 21、金 3 为亲本通过杂交选育获得的 1 株菇形好、生育期短、产量高、适应性广的白色金针菇菌株,于 2012 年 4 月通过福建省农作物品种审定委员会认定<sup>[19]</sup>。王波等以黄色金针菇与白色金针菇为亲本,通过双单杂交获得杂交种后再自交得到早熟白色金针菇 F2121,再分别与白色金针菇 F21 和清白 F4 的双核体进行双单杂交,获得优良白色金针菇川 7 金号和川金 8 号<sup>[20]</sup>。金针菇川金 33 是以早熟白色金针菇菌株 F363 和晚熟白色金针菇菌株 FNK1302 为亲本,通过双单杂交选育出来的,其子实体白色,菌盖大、不易开伞,菌柄粗壮、基部不粘连,该品种于 2016 年通过四川省农作物品种审定委员会审定并大面积示范应用<sup>[21]</sup>。

杂交育种的一般程序:(1)选择具有优良目的性状的亲本且孢子成熟的子实体,收集孢子;(2)采用玻片稀释法、平板稀释法和显微操作器分离法进行单孢分离;(3)单孢杂交,先对单孢子进行培养,在培养皿的培养基上接入 2 个杂交亲本的单核菌丝各 1 块,2 单孢菌丝接触后,镜检接触处的菌丝体,挑取双核菌丝;双单杂交,即双核亲本与另一个单核菌丝亲和,配对成功;多孢杂交,是直接稀释后孢子涂平板,挑取生长速度快的菌丝进行双核鉴定;(4)得到一定数量的杂交菌株后,要选择适当的栽培方式对优良菌株进行筛选和验证,包括生产性状、抗逆性等;(5)将初步筛选出的杂交菌株通过进一步的生产试验(包括区域性试验)来进行复筛,从而更加确定杂交菌株的各种性状,预估出杂交菌株的生产价值和推广价值,对于各项性状都理想的菌株要保留,并及时进行推广,获得优良菌株<sup>[22]</sup>。

## 2.3 诱变育种

诱变育种 (mutation breeding) 是人为利用某些物理或化学因子处理细胞群体,促使其中少数细胞的遗传物质分子结构发生改变,从而引起其遗传性变异,再从多种突变体中选出正突变菌株的方法,诱变育种也是获得优良食用菌菌株的常用手段之一<sup>[2]</sup>。遗传育种上常用的突变株有营养缺陷突变株,如氨基酸、维生素、碱基等合成能力有缺陷的突变株;另外还有温度敏感突变株,指可在某一温度条件下生长而在另一温度条件下不生长的突变株;还有一种是对某种药物具有一定抵抗力的突变株,通过诱变剂处理孢子可以提高产生抗性突变的几率。

诱变育种技术主要包括物理诱变和化学诱变,当前金针菇常用的物理诱变主要包括紫外线 (UV)、<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线、激光、微波、常压室温等离子体 (ARTP) 及航空等诱变。F8815 和 F8817 是以三明一号为出发菌株,选用菌丝原生质体为诱变材料,经  $\gamma$  射线辐射诱变,从双核再生株中选育出来的,这是食用菌中首例采用原生质体诱变方法选育出来的子实体色泽浅、产量高并表现出广温出菇的新品种,于 1992 年 12 月通过部级成果鉴定<sup>[23-24]</sup>。成亚利等用紫外线照射金针菇 Y19 和 W088 菌株原生质体 1 min,再生后挑选生长好的菌株,与出发菌株相比,变异菌株生长速度提高 23.1%~52.3%,出菇时间提早 10~14 d<sup>[25]</sup>。李耀维等用 He-Ne 激光辐照诱变金针菇三明 1 号的原生质体、菌丝体片段和分生孢子悬液,通过初筛、复筛及突变株遗传稳定性研究发现,采用原生质体进

行诱变,其正突变率、单株超氧化物歧化酶(SOD)产量提高率、产 SOD 遗传稳定性均高于菌丝体与分生孢子<sup>[26]</sup>。周丹对金针菇 F40 原生质体进行紫外诱变处理,经过初筛和复筛,选出硒含量和生物量明显高于出发菌株的突变株 Y12 和 Y57<sup>[27]</sup>。解生权等通过对市售金针菇驯化后的菌株进行紫外诱变处理 60 min,获得了比原菌丝体生长能力旺盛的菌种,诱变菌种的斜面培养时间为 7~10 d<sup>[28]</sup>。陈力力等比较了紫外线和微波单因子对金针菇 J05Y-c 单细胞悬液的诱变效应,通过比较诱变致死率、正变率、透明圈直径与菌落直径比例(HC 值)、菌丝生长量和传代稳定性进行优势菌株筛选,结果表明,诱变效应的最佳剂量范围在致死率为 75%~90% 的处理组,相同处理时间内,微波诱变的正变率大于紫外诱变;采用最大功率为 700 W、脉冲频率为 2 540 MHz 的微波炉,以中等功率强度处理 80 s,获得 HC 值、菌丝生长量比出发菌株提高 32.38%、62.16% 的优势突变株 W8011,连续 8 次传代遗传性能稳定<sup>[29]</sup>。张诚等将金针菇品种江山白 F21 菌丝体通过返回式卫星进行航天搭载,从 7 个变异菌株中筛选获得金针菇新品种航金 1 号,与出发菌株相比,该品种菇形好、早熟、产量高、耐高温和适应性广<sup>[30]</sup>。杨茹等采用常压室温等离子体对菌株 AR0 进行处理,通过抗病性、纤维含量及亲缘关系测定,筛选出菌株 AR12 和 AR17,AR12 与出发菌株相比抗托拉斯假单胞杆菌能力提高 15.49%,菌丝体纤维含量降低 15.82%;AR17 抗托拉斯假单胞杆菌能力提高 1.90%,菌丝体纤维含量降低 36.31%<sup>[31]</sup>。

金针菇常用的化学诱变剂主要有氯化锂、甲基磺酸乙酯(EMS)、硫酸二乙酯和亚硝基胍(NTG)、亚硝酸等,目前多采用化学诱变结合物理诱变的方式对金针菇进行处理。康林芝等采用紫外诱变、硫酸二乙酯诱变以及紫外、氯化锂和硫酸二乙酯复合诱变这 3 种方法获得高温节能型金针菇新菌株 FLAIUV、FLAIEMs、FLA7EMS、FLAIUV + LICIEMS,其菌丝可在 33 ℃ 高温下正常生长、在 20 ℃ 下可以正常发育形成子实体<sup>[32]</sup>。金玲等利用<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线诱变金针菇原生质体,对金针菇 73<sup>#</sup>进行改良,培养出生物转化率高、品质优良且产量较高的金针菇新菌株 5-114,克服了亲本采后基部易变褐的缺点,加快了育种过程,缩短了育种周期<sup>[33]</sup>。杨宗渠等用<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线处理野生种驯化菌株 F126F 的双核菌丝,经过筛选培育出菌丝生长快、抗杂力较强、产量高的金针菇新菌株辐金 1 号<sup>[34-35]</sup>。李蕤等通过对白金针 2 号菌丝进行机械破碎,获得了菌丝断片单细胞悬液,利用紫外线及亚硝酸对其诱变,并利用透明圈法测定正变率,结果发现,不同菌龄菌丝断片对紫外线的敏感性较亚硝酸低,2 种处理中较高的正变率都出现在平台期之后,即亚硝酸诱变时间 40~50 s,紫外线诱变时间 120~140 s,传代试验证明,获得的突变株遗传性状较稳定<sup>[36]</sup>。罗润以黄色金针菇菌株 FV7 为材料,采用紫外线、氯化锂和甲基磺酸乙酯(EMS)等多种诱变方法对金针菇的菌丝细胞进行诱变,诱变后的菌丝细胞经过菌丝体生长阶段 33 ℃ 高温初筛和子实体发育阶段 20 ℃ 中温复筛,获得耐高温突变菌株 FV7EMS,该菌株生长速度快、菌柄较长,生物学效率较系本 FVT 提高 28.82%<sup>[37]</sup>。

诱变育种通过诱使金针菇野生菌株或者栽培菌株发生变异,从中筛选出生长期短、产量高、品质好的菌株,多采用金针

菇的原生质体进行诱变,但诱变育种只扩大了变异范围,并不能定向诱变,筛选工作将会十分繁琐,诱变率也偏低,且诱变性状不够稳定,容易引起长出畸形菇。

## 2.4 原生质体融合

原生质体就是在人工条件下人为去除细胞壁的裸露细胞。19 世纪末 Hanstein 最早提出原生质体的概念,原生质体具有完整新陈代功能,可完成所有生命活动,是由细胞质膜、细胞质和细胞核组成的有机整体<sup>[38]</sup>。随着对原生质体的不断研究,在 20 世纪 60 年代诞生了原生质体融合(protoplast fusion)技术,该技术可使不同遗传类型原生质体的基因组进行交换和重组,产生具有亲代遗传特性的全新品种<sup>[39]</sup>。原生质体融合方法具有重组频率高、受结合型限制较小、遗传物质传递更为完整、重组体种类多、有助于外源基因转化等特点。

原生质体融合前首先要获得原生质体,起初人们使用超声波和研磨等物理方法制备原生质体,但这些方法对细胞损伤大,制备的原生质体质量不高<sup>[40]</sup>。随后,酶技术和生物工程技术的发展为原生质体的制备提供了新的方法,成为食用菌原生质体制备的主要方法。目前,在食用菌领域酶解细胞壁使用的酶主要有几丁质酶、纤维素酶、蜗牛酶、溶壁酶、溶菌酶等,不同食用菌的细胞壁组成不同,需要根据所要制备的原生质体的种类选择不同的酶<sup>[41]</sup>。田娟等使用溶壁酶处理香菇和金针菇单核菌丝获得原生质体并进行了原生质体融合,从 142 个融合子中获得 17 个能出菇的菌株<sup>[42]</sup>。除了酶的选择外,菌龄、酶的浓度、稳渗剂、酶解时间、培养基成分和温度等都是影响原生质体制备的重要因素<sup>[43-44]</sup>。有报道采用正交试验方法对影响金针菇原生质体制备和再生的因素进行了研究,为后续的金针菇原生质体融合育种的研究提供了重要参考,该报道提供了金针菇原生质体制备和再生的最佳体系<sup>[45]</sup>。金针菇的原生质体融合以聚乙二醇(PEG)作为融合剂的化学法最常用<sup>[46]</sup>。在原生质体融合后需要对融合子进行筛选,融合子的筛选方法很多,需要根据试验材料和试验目的不同进行筛选,抗药性、荧光染色、营养缺陷型和应用原生质体灭活都是较为常用的方法<sup>[47-48]</sup>。筛选出的融合子要进行鉴定以确认融合子的真实性,常用的融合子鉴定方法分为生物学鉴定和 DNA 分子标记鉴定两大类,其中生物学鉴定主要是拮抗作用和锁状联合等特征的鉴定,分子标记鉴定主要采用限制性片段长度多态性(RFLP)标记技术、随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记技术和简单序列重复区间扩增多态性(ISSR)技术<sup>[49]</sup>。这些方法各自存在一定的局限性。锁状联合为许多担子菌菌丝所特有的一种细胞结构,香菇、金针菇和木耳等菌株的融合均可以锁状联合作为判定的自然标记,而双孢蘑菇、草菇等却不能使用该标记<sup>[50-52]</sup>。RFLP 技术虽然效果稳定,但试验周期长、方法复杂等不利因素限制了该技术的广泛应用<sup>[49]</sup>。

## 2.5 基因工程育种

基因工程育种(genetic engineering)就是人为从某一供体生物中提取所需的基因,在离体条件下采用适当的限制性核酸内切酶切割后,将它与载体 DNA 分子连接起来一并导入到受体生物细胞中进行复制和表达,从而选育出新物种。基因工程育种是一种比常规育种优越得多的定向育种新技术,可以通过跨属亲本或多亲本的递推融合和高通量筛选实

现食用菌基因组改组,将所有亲本中的优良基因集合到食用菌子代细胞上<sup>[53]</sup>。

随着基因组测序技术的发展,金针菇的基因组及转录组陆续被测定,这对基因工程育种与分子辅助育种具有很大的参考作用。2011 年,张光忠对金针菇单核菌株 L11 与 W23 的基因组进行了测序,拼接和组装后,根据基因组序列的差异区域,设计显性的特异性片段扩增区域(SCAR)标记引物<sup>[54]</sup>。2013 年,王威对金针菇 L11 与 W23 的转录组进行了测序,数据揭示了 *HD* 基因在不同生长发育时期转录水平的表达规律,总体表现为在单核菌丝时期表达量偏低,当质配为双核菌丝后,在双核菌丝内表达量明显升高,发育出原基后,表达量持平或下降<sup>[12]</sup>。在金针菇 L11 基因组和 H1123 转录组序列测定以及基因注释基础上对金针菇淀粉酶家族基因及萜类合成途径中的关键基因进行了信息分析<sup>[55-56]</sup>。刘建雨等对金针菇 *Dan3* 全基因组序列进行了测定,得到了大小为 34.17 Mb 的基因组,并预测到 8 个参与  $\alpha$ -氨基己二酸途径的关键基因<sup>[57]</sup>。

作为基因工程育种的核心环节,目前在食用菌领域常用的遗传转化方法有农杆菌介导法、电激法、限制酶介导法、PEG 法等<sup>[58]</sup>。李巍等以白金针菇菌丝球为受体材料,通过金针菇表达载体 p139035S-bFGF,用根癌农杆菌介导转入碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)<sup>[59]</sup>。施乐乐等通过根癌农杆菌介导转化的方法,以金针菇菌丝球为受体材料转入含该内源 HMG-box 转录因子的过表达载体,并对 1 个内源 HMG-box 转录因子 *fhom1* 进行了基因结构和表达量分析,获得了 1 个稳定的转化子<sup>[60]</sup>。

CRISPR/Cas9 系统是继锌指核酸酶(ZFNs)和类转录激活因子效应物核酸酶(TALENs)之后的新一代基因组编辑技术,其基本作用原理是通过向导 sgRNA 引导的核酸内切酶 Cas9 切割目标基因,形成 DNA 双链断裂缺口,再利用细胞自身的同源重组和非同源末端连接 2 种修复途径,实现基因定点编辑<sup>[61]</sup>。因其载体设计操作简单、编辑高效且通用性广,已成为基因组定向改造和基因功能验证的重要方法。罗润等采用 CRISPR/Cas9 高效基因编辑系统,构建了金针菇基因敲除载体及转化体系<sup>[62]</sup>。刘建雨等构建了 FvCas9 双元表达载体,利用农杆菌介导转化金针菇单核体 *Dan3*,抗性筛选后显示, *Cas9* 基因已经成功转入到金针菇菌丝体中<sup>[63]</sup>。

### 3 展望

初期栽培的菌株均为野生驯化育成的菌株,我国有丰富的食用菌种质资源,广泛收集的不同地域和不同生态型菌株,可作为金针菇遗传育种的原始资源,若用于大面积栽培,还须对野生种加以改良。杂交育种手段繁琐费事,但只限于种内杂交,杂交育种的目的性和方向性都比较明确,仍然是目前培育金针菇新的优良菌株的真正有效方法。诱变育种多采用金针菇的原生质体进行诱变,但诱变育种只扩大了变异范围,并不能定向诱变,筛选工作将会十分繁琐,诱变率也偏低,且诱变性状不够稳定,容易引起长出畸形菇。原生质体融合方法具有重组频率高、受结合型限制较小、遗传物质传递更为完整、重组体种类多、有助于外源基因转化等特点。基因工程育种以分子生物学理论为基础,为面临诸多问题的食用菌常规

育种提供了新的选择。目的基因的获取是基因工程育种的前提<sup>[64]</sup>,随着各种测序技术和分析手段的不断发展,目的基因的获取不再困难。金针菇高效稳定遗传转化体系已经建立,基因定点编辑的技术-CRISPR/Cas9 系统已经成功应用在酵母、烟曲霉、里氏木霉和稻瘟病菌等真菌中<sup>[65-68]</sup>,在金针菇上也开始应用,这些都使金针菇的基因工程育种成为未来菌株改良的新途径。

### 参考文献:

- [1]申进文. 食用菌生产技术大全[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2014:213-214.
- [2]王贺祥,刘庆洪. 食用菌栽培学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2008.
- [3]许昭仪. 金针菇生活史各阶段核相研究[D]. 长沙:湖南师范大学,2014.
- [4]马三梅,王永飞,亦如瀚. 食用菌育种的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(4):108-112.
- [5]宋冬灵,曾宪贤,吕杰,等. 金针菇遗传育种研究进展[J]. 种子,2007,26(5):52-54.
- [6]苏荣军. 我国食用菌育种技术应用研究[J]. 农技服务,2016,33(15):65.
- [7]刘胜贵,刘卫今. 野生金针菇菌株 F9703 的驯化栽培研究[J]. 怀化学院学报,1999,18(2):51-53.
- [8]周建林,何伯伟,黄良水,等. 金针菇新品种菌株选育及应用[J]. 中国食用菌,2010,29(3):15-17.
- [9]陈世通,李荣春. 食用菌育种方法的研究现状·存在的问题及展望[J]. 安徽农业科学,2012,40(10):5850-5852.
- [10]江玉姬,赵书光,谢宝贵,等. 金针菇杂交育种中亲本菌株的选择模式[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2010,39(4):403-408.
- [11]郭美英. 我国金针菇新品种的选育[J]. 食用菌学报,1997,4(1):8-14.
- [12]王威. 基于基因组和转录组分析金针菇的交配型[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- [13]郭美英. 金针菇杂交 19 号菌株的品种特性[J]. 食用菌,1989(4):9-10.
- [14]余兆海. 金针菇新菌株 F-7[J]. 北京农业,1994(11):5.
- [15]王波,唐利民,姜邻,等. 川金 2 号金针菇菌株选育初报[J]. 食用菌,2001,23(3):11-12.
- [16]王波,甘炳成,彭卫红,等. 金针菇杂交品种——川金 3 号[J]. 食用菌,2006(6):15.
- [17]徐珍,尚晓冬,郭倩,等. 早熟金针菇新品种 G1 的杂交选育[J]. 食用菌学报,2009,16(4):20-22,93.
- [18]徐珍,尚晓冬,谭琦. 金针菇杂交新品种金针菇 G1[J]. 园艺学报,2011,38(8):1621-1622.
- [19]刘新锐,谢宝贵,江玉姬,等. 早熟金针菇新品种‘农金 6 号’[J]. 园艺学报,2014,41(2):397-398.
- [20]王波,贾定洪,高俭,等. 早熟白色金针菇优良品种选育[C]//第十届全国食用菌学术研讨会论文汇编. 2014:191-195.
- [21]王波. 金针菇新品种川金 33 的选育和栽培应用[J]. 食药食用菌,2018,26(1):38-39.
- [22]张维东,谭笑,滕星,等. 食用菌育种方法[J]. 吉林农业,2017(14):72.

- [23] 杭树群, 周宗俊. 金针菇新品种——F8815、F8817[J]. 农业科技通讯, 1993(12): 27.
- [24] 吕和平, 武艳霞, 抗树群, 等. 金针菇新品种 F8815 和 F8817 的生理特性[J]. 中国食用菌, 1996(4): 23–24.
- [25] 成亚利, 朱宝成, 李亮亮, 等. 金针菇原生质体紫外诱变选育[J]. 食用菌学报, 1995, 2(3): 61–64.
- [26] 李耀维, 冯文新, 张素梅. He–Ne 激光对金针菇 SOD 高产株的诱变效应[J]. 激光生物学报, 2002, 11(4): 283–286.
- [27] 周 丹. 富硒金针菇菌株选育及应用初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [28] 解生权, 全艳玲, 王 菲. 金针菇 UV 诱变育种研究[J]. 中国酿造, 2011, 30(3): 143–144.
- [29] 陈力力, 张倩云, 甘文娟, 等. 金针菇菌种诱变选育的研究[J]. 生物技术, 2011, 21(2): 67–69.
- [30] 张 诚, 陈庆隆, 陈柳萌, 等. 金针菇新品种航金 1 号[J]. 园艺学报, 2013, 40(11): 2329–2330.
- [31] 杨 茹, 王 范, 董鼎才, 等. 利用 ARTP 诱变育种技术选育白色金针菇突变菌株[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2017(4): 249–255.
- [32] 康林芝, 韩 飞, 林俊芳, 等. 高温节能型金针菇新品种选育[C]//中国菌物学会第五届会员代表大会暨 2011 年学术年会论文集. 2011: 78.
- [33] 金 玲, 武艳霞, 周宗俊, 等. 原生质体辐射诱变培育金针菇新菌株[J]. 园艺学报, 2000, 27(1): 65–66.
- [34] 杨宗渠, 王柏楠, 王勤波, 等.  $\gamma$  射线诱变选育金针菇新菌株[J]. 核农学报, 2002, 16(5): 325–327.
- [35] 王柏楠, 杨宗渠, 杨献红. 金针菇新菌株的诱变选育[J]. 河南科学, 2007, 25(3): 413–415.
- [36] 李 蕤, 虞 磊, 阚劲松. 金针菇菌丝断片单细胞诱变育种的研究[J]. 合肥学院学报(自然科学版), 2005, 15(1): 16–18.
- [37] 罗 润, 郭丽琼, 林俊芳, 等. 金针菇耐高温新菌株的诱变选育[J]. 中华食用菌, 2016, 35(4): 18–23.
- [38] Weibull C. Characterization of the protoplasmic constituents of bacillus megaterium[J]. Journal of Bacteriology, 1953, 66(66): 696–702.
- [39] 付立忠, 吴学谦, 魏海龙, 等. 我国食用菌育种技术应用研究现状与展望[J]. 食用菌学报, 2005, 12(3): 63–68.
- [40] 任 轩, 贾 乐, 杨凤琴, 等. 食用菌原生质体融合育种研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(2): 42–44, 53.
- [41] 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.
- [42] 田 娟, 李玉祥. 香菇金针菇远缘亲本原生质体融合及融合子检测[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 63–69.
- [43] Yoo Y B, Peberdy J F, You C H. Studies on protoplast isolation from edible fungi[J]. Korea Journal of Mycology, 1985, 13(1): 1–10.
- [44] Go S J, Shin G C, Yoo Y B. Protoplast formation, regeneration and reversion in *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor – caju* [J]. Korean Journal of Mycology, 1985.
- [45] 陈 鹏, 郭成金. 金针菇原生质体制备和再生探究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 200–204.
- [46] Zhao J, Chang S T. Interspecific hybridization between *Volvariella volvacea* and *V. bombycina* by PEG – induced protoplast fusion[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1997, 13(2): 145–151.
- [47] 吴晓华. 真姬菇与金针菇原生质体融合育种研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [48] 梁枝荣, 张喜群, 王澄澈. 原生质体灭活供体在食用菌融合中的应用初探[J]. 菌物学报, 1999, 18(3): 341–342.
- [49] 郑锦荣. 金针菇与巨大口蘑原生质体融合育种研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [50] 马爱民, 贺冬梅, 潘迎捷. 双孢蘑菇原生质体同核体的验证[J]. 食用菌, 1998(6): 8–9.
- [51] 彭卫红, 甘炳成, 郑林用, 等. 茯苓与凤尾菇目间原生质体融合研究初报[J]. 菌物学报, 2005, 24(1): 42–47.
- [52] 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.
- [53] 刘 芳, 谢宝贵. 基因组改组及其在食用菌种上的应用前景[J]. 福建农业学报, 2010, 25(4): 526–530.
- [54] 张光忠. 基于基因组的金针菇遗传连锁图的构建与数量性状位点(QTL)分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [55] 曾 旭, 刘 芳, 陈 娟, 等. 金针菇基因组测序及萜类合成关键基因分析[J]. 菌物学报, 2015, 34(4): 670–682.
- [56] 李 肖, 王 健, 万 芳, 等. 金针菇淀粉酶家族基因鉴定及其表达特性分析[J]. 菌物学报, 2016, 35(7): 865–873.
- [57] 刘建雨, 王瑞娟, 张 丹, 等. 基于金针菇全基因组的赖氨酸合成途径关键酶分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2225–2233.
- [58] 林 锋, 李国贤, 赵 妍, 等. 草菇育种方法及相关分子标记研究进展[J]. 热带作物学报, 2014, 35(3): 609–615.
- [59] 李 巍, 刘秀明, 李洪志, 等. 农杆菌介导的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)转化金针菇的研究[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 46–53.
- [60] 施乐乐, Peer A F. 农杆菌介导一个内源 HMG – box 转录因子 fvhom1 转化金针菇[J]. 基因组学与应用生物学, 2014(6): 1268–1274.
- [61] Sander J D, Joung J K. CRISPR – Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(4): 347–355.
- [62] 罗 润, 林俊芳, 郭丽琼, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统的金针菇基因组编辑载体构建[J]. 食品工业科技, 2016, 37(20): 230–234.
- [63] 刘建雨, 刘建辉, 张 丹, 等. 农杆菌介导的 *Cas9* 基因转化金针菇的研究[J]. 食用菌学报, 2017(3): 25–29.
- [64] 王全智, 魏 跃. 农杆菌介导 *FaCBL1* 基因转化红颜草莓的研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(12): 39–42.
- [65] Dicarlo J E, Norville J E, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR – Cas systems[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(7): 4336–4343.
- [66] Fuller K K, Chen S, Loros J J, et al. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus* [J]. Eukaryotic Cell, 2015, 14(11): 1073–1080.
- [67] Liu R, Chen L, Jiang Y, et al. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system[J]. Cell Discovery, 2015, 1: 15007.
- [68] Arazoe T, Ogawa T, Miyoshi K, et al. Tailor – made TALEN system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(7): 1335–1342.