

凤尾菇和桃红平菇种间原生质体电融合获杂种菌株

邱景芸 吴月嫦 廖汉泉 郑丽群

(广东省微生物研究所 广州 510070)

摘要 以有自然标记的双核凤尾菇(*Pleurotus sajor-caju*)和桃红平菇(*P. rhodophyllus*)为出发菌株,以它们携带营养缺陷型标记的单孢菌株为直接亲本,采用BAEKON 2 000基因转移仪进行侧耳属种间原生质体电融合,成功地获得若干株融合体,其中有一株编号为F57的融合体已培育出子实体。比较了融合体F57与亲本的形态、生理、生化和遗传等性状,结果证实,融合体F57是一株新的种间杂种菌株。

关键词 原生质体融合,电融合,融合体,凤尾菇,桃红平菇

原生质体融合研究始于70年代初。食用菌原生质体融合,可能受去壁酶的限制^[1],起步较晚,80年代初,丹麦Novo公司生产的Novozyme 234^[2]和本所研制的溶壁酶(Lywallzyme)^[3]问世以来,本研究领域取得了很大进展。原生质体的分离与再生相继完成,并有少数种内和种间原生质体融合成功的报道^[4,5]。迄今为止,食用菌原生质体融合基本上是采用高国楠^[6]的PEG诱导融合法。

本研究采用由Senda^[7]建立的电诱导融合法,其原理是:在短时间强电场的作用下,两个相邻细胞膜发生可逆性电击穿,从而导致两细胞融合。和PEG诱导融合法相比,电诱导融合法具有操作简单,无化学毒性,融合频率高等优点^[8]。本文报道用电融合法进行凤尾菇和桃红平菇种间原生质体融合的方法及结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

直接亲本P1-34为肌醇缺陷型(*ino*⁻)菌株,由双核的凤尾菇*P. sajor-caju*的担孢子经UV诱变筛选获得。凤尾菇为本所三室野生菇组提供,其子实体有柄、菌盖漏斗状、灰褐色。直接亲本R4-34为蛋氨酸缺陷型(*met*⁻)菌株,由双核桃红平菇*P. rhodophyllus*的担孢子经UV诱变,筛选获得。桃红平菇由南京师范大学生物系赠送,其子实体几乎无柄、菌盖扇形、桃红色。

1.2 培养基

1.2.1 完全培养基(CM)组成(%):蛋白胨 0.05,葡萄糖 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, (NH₄)₂SO₄ 0.05, KH₂PO₄ 0.05, K₂HPO₄ 0.05, 琼脂 2.0, pH 6.0。

1.2.2 基本培养基(MM)组成(%):葡萄糖 2, KH₂PO₄ 0.06, K₂HPO₄ 0.06,

周小燕、梁跃云同志参加部分工作。

本文于1993年10月6日收到。

MgSO₄ · 7H₂O 0.05, NaNO₃ 0.2, KCl 0.05, FeSO₄ 0.001, 琼脂粉 1.5, pH6.0。

1.2.3 高渗培养基:在 CM 和 MM 中添加 0.5mol/L 蔗糖。

1.2.4 菌丝体培养基:PDA+0.2%蛋白胨。

1.2.5 担孢子营养表现型测定培养基:MM+蛋氨酸(70mg/L);MM+肌醇(100mg/L);MM+蛋氨酸+肌醇。

以上培养基均在 0.108MPa 的压力下灭菌 30 分钟。

1.2.6 子实体形成培养基(%):棉子壳 70, 麸皮 28, 蔗糖 1, CaCO₃ 1。用适量水拌匀后分装于 15cm×30cm 塑料袋中,每袋装湿料 500g 左右,0.14MPa 灭菌 1.5 小时。

1.3 分离酶

溶壁酶 Lywallzyme, 本实验室制备, 是一种高效广谱型真菌细胞壁水解酶^[9-11]。

1.4 渗透压稳定剂

甘露醇 0.8mol/L, 蔗糖 0.5mol/L。

1.5 制备酶溶液

称取适量 Lywallzyme, 用 0.8mol/L 甘露醇溶液溶解, 使酶液浓度为 1.5%(W/V), 冷冻离心(2 000r/min, 30 分钟, 0℃), 上清液用无菌的 0.45μm 孔径的醋酸纤维滤膜抽滤灭菌, 然后分装于无菌的试管中, 每管盛酶液 3ml, 冰箱保存备用。

1.6 制备原生质体

1.6.1 菌丝体培养:在 50ml 三角瓶中, 加 6—7ml 自来水和适量玻璃碎片, 灭菌后分别挑取 1/4 管 P1-34 和 R4-34 试管斜面菌种入三角瓶中, 充分摇动, 制成碎菌丝悬浮液, 分别吸 1ml P1-34 和 R4-34 悬浮液放入盛 20ml 菌丝体培养基的 150ml 三角瓶中, 26—27℃ 静止培养 5—6 天, 即长成酶解用的菌丝体。

1.6.2 制备原生质体:将 0.3—0.5g 培养好的 P1-34 和 R4-34 菌丝体, 分别放入 3ml Lywallzyme 溶液中, 30℃ 酶解 1.5 小时, 用脱脂棉过滤除菌丝碎片, 将滤液离心(1 500r/min, 15 分钟)收集原生质体, 用 0.8mol/L 甘露醇溶液洗 1—2 次后, 定容到 1ml, 用血球记数板记数后备用。

1.7 原生质体融合和亲本回复突变的检查

用 BAEKON 2 000 基因转移仪进行原生质体融合。将两亲株的原生质体悬液按 1:1 的比例混合, 原生质体密度约为 10⁷/ml, 取 1ml 混合液放入 BAEKON 2 000 的电极杯中, 调整好各参数(脉冲电压 4-5kV, 脉冲数 2⁸, 通电 6—8 秒, 作用周期 10, 距离 2—3mm, 脉宽 62.5μs), 后通电融合, 然后将融合混合物涂高渗 MM 平板, 筛选融合体。用未通电处理的涂高渗 MM 平板作对照; 同时取单一亲本原生质体悬液, 以高于或等于融合处理的密度, 分别涂高渗 MM 平板, 以检查亲本回复突变。重复四次。

1.8 酯酶同工酶测定

采用液体培养的菌丝体(其培养方法与制备原生质体相同), 按参考文献[12]进行测定。

1.9 担孢子营养表现型测定

收集子实体的担孢子, 将其用水悬浮后系列稀释, 取每毫升密度为 10⁵、10⁴、10³ 和 10² 的孢子悬浮液, 分别涂 CM 培养基平板, 每皿(∅9cm)加孢子悬液 0.1ml, 涂布均匀后置

28—30℃培养到无新菌落出现(约 15—20 天)从中挑选可将全部菌落挑出的平板挑取单菌落,以增加其随机性。待挑出的菌落在斜面生长后,按筛选营养缺陷型的步骤进行测定。

1.10 出菇试验

在 PDA 斜面上培养好的融合体及 P1-34 和 R4-34 转接到有子实体培养料的塑料袋中,每个菌号接种 3 袋,25—26℃培养到菌丝长满袋后,转移到自然温度 18—28℃的出菇房继续培养,直到子实体形成。并用凤尾菇和桃红平菇作对照。

2 结果和讨论

2.1 原生质体的数量和质量

每毫升酶液分离的原生质体数为 10^7 — 10^8 个,原生质体圆形,颜色发亮,再生频率约为 1%(图版 I-1,2)。

2.2 直接亲本遗传标记的验证和融合体的检出

P1-34 和 R4-34 的原生质体遗传标记的验证结果列于表 1,用融合混合物所涂的高渗 MM 平板中形成的菌落,即作为双亲营养互补的融合体验出。共检出 20 株融合体。对照平板无菌落出现。

表 1 直接亲本在鉴别培养基上的生长

Table 1 Growth of the parental strains on selective media*

Medium	Strain	MM	MM+ino	MM+met	MM+met+ino	CM
	R4-34	—	—	+	+	+
	P1-34	—	+	—	+	+

* +:Growth, -:No growth met:metionine; ino:inose

2.3 出菇试验结果

20 株融合体中,编号为 F57 的融合体,培养 30—35 天分化出子实体原基,打开塑料袋培养 3—4 天后发育成形态正常子实体(图版 1-6,7),其他 19 株融合体,尽管有一些菌株的菌丝生长势很旺,但无分化迹象;培养 75—80 天以后,直接亲本 P1-34 也形成了子实体(图版 I-5),但直接亲本 R4-34 在子实体培养基上却完全不长;而对照种凤尾菇和桃红平菇,培养 20—25 天左右,均形成了子实体(图版 I-3,4)。

2.4 融合体的鉴定

2.4.1 融合体 F57 与亲本的子实体形态特征比较:结果见图版 I-3—7。F57 的子实体兼有出发菌株凤尾菇和桃红平菇两个种的特征,形态像凤尾菇,颜色像桃红平菇。因此,F57 是一株典型的杂种菌株。直接亲本 P1-34 也形成了子实体,但其子实体基本像它的母体——凤尾菇,只是菇体颜色浅一些(图版 I-5)

2.4.2 融合体 F57 与亲本菌落形态比较:亲本 P1-34 菌丝生长紧密,气生菌丝较短;而 R4-34 菌丝紧贴培养基,菌落表面有明显皱折;融合体 F57 菌丝舒展,气生菌丝长,呈放射状。对它们的菌丝镜检发现,F57 菌丝有密集的锁状联合,而 P1-34 和 R4-34 菌丝无锁状联合。

2.4.3 融合体与亲本的菌丝生长速度比较:融合体的生长速度比双亲快得多,培养到第 8 天,F57、P1-34、R4-34 的菌丝体每天平均生长速度是 5.8mm,3.1mm,0.85mm,F57 表

现出较强的杂种优势。

2.4.4 F57 和亲本子实体担孢子发育比较:在收集孢子印时发现,F57 子实体很少孢子,有时甚至收集不到孢子,凤尾菇和桃红平菇及直接亲本 P1-34 均产生大量孢子,分别取其菌褶制片,用 JSM-25S 型扫描电子显微镜观察可见,凤尾菇、桃红平菇及 P1-34 的每个可孕担子上,绝大多数着生四个担孢子,偶尔见有着生 2—3 个的(图版 I-10,11),属于侧耳属的正常发育。而 F57 的每个可孕担子上,绝大多数只着生一个担孢子(图版 I-8,9),偶尔见有着生四个的。无疑这一表型变化与遗传背景有关,可能是在 F57 子实体中,两个生物学性状不同的细胞核融合后,不能进行正常的减数分裂,这与“远缘杂交通常不孕或可孕性低”的遗传现象一致。

2.4.5 F57 和亲本株酯酶同工酶谱比较:结果见图 1。F57 的四条酯酶同工酶谱中,分子量最小的一条带与亲本 R4-34 相同,有三条新酶带,并无与亲本 P1-34 相同的酶带,但 F57 子实体的形态却与亲本 P1-34 极为相似,似乎控制子实体形态的基因与酯酶无关。

2.4.6 F57 和亲本 P1-34 的担孢子遗传标记测定:凤尾菇和桃红平菇均属于侧耳属,其性模式为四极性异宗配合。根据独立分配定律,F57 形成的子实体应产生四种营养表现型担孢子,即两种亲本型:蛋氨酸缺陷型和肌醇缺陷型;两种组合型:蛋氨酸肌醇双缺陷型和原养型。对 F57 的 96 株担孢子测定结果列于表 2,其中有 8 株蛋氨酸缺陷型(亲本型),31 株原养型(组合型),但未测到另一亲本型(肌醇缺陷型)和另一组合型(肌醇蛋氨酸缺陷型)的担孢子(表 2),这两者都带有肌

醇缺陷型基因,可能是携带肌醇缺陷基因的担孢子难以萌发的缘故。这一结果与 Sonoe O Yanagi 等^[13]所测灰盖鬼伞种内融合体子代营养表现型的结果一致。此外在所测 96 株 F57 的担孢子中,有 49 株(占 51%)在四种选择培养基上均不长,是不同于亲本菌株,暂称“重组型”,另有 8 株可在两种以上选择性培养基(不包括测双缺陷培养基)上有微弱生长,暂称“中间型”,可能是基因“渗漏”所致。由此推断,融合体 F57 在形成子实体以后,发生了核融合,并且在减数分裂过程中产生了大量重组体后代。

对已形成子实体的直接亲本 P1-34 的 76 株担孢子测定结果,有 72 株原养型,占 94% 以上(表 2)。也未测到肌醇缺陷型担孢子,进一步证实上述带有肌醇缺陷的孢子难以萌发的假设。P1-34 是一株稳定的肌醇缺陷型菌株,其菌丝无锁状联合,为什么能出菇?其子代为什么会产生如此多的原养型菌株?原因不明。是否在凤尾菇中存在类似双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)的性模式,即二极性同宗配合,有待验证。

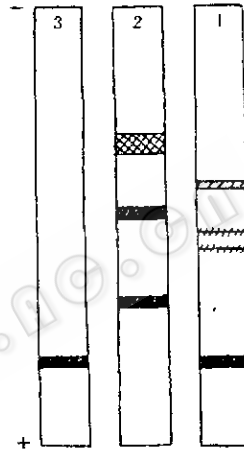


图 1 融合体 F57 和它的直接亲本的酯酶同工酶谱

Fig. 1 EST isozyme patterns of fusant F57 and its auxotrophic parents.

1. F57, 2. P1-34, 3. R4-34

■ First class band, ▨ Second class band
▩ Third class band, ▧ Diffusion band

表 2 融合子 F57 和亲本 P1-34 担孢子营养表现型测定结果

Table 2 Nutritional phenotypes of the basidiospores of fusant F57 and parent P1-34

Strains	Determined number	Number of nutritional phenotype(strains)					
		Parental phenotype		Combinative phenotype		Recombinant phenotype	Intermediate phenotype
		met ⁻	ino ⁻	met ⁻ ,ino ⁻	Prototrophy		
Fusant F57	96	8	0	0	31	49	8
Parent P1-34	76	—	0	—	72	2	2

F57 的子实体形态优美, 品味亦佳, 很少孢子, 经四代出菇观察, 性状稳定, 可望作为一株食用、观赏兼用的食用菌新种投放市场。本研究结果也说明, 电融合技术是创造新种的有效方法。

参 考 文 献

- [1] Peberdy J F, Ann Rev Microb, 1979, 33: 21—39.
- [2] Paul F H *et al.* Enzyme Microb, Technol, 1981, 3: 321—325.
- [3] 邱景芸等. 遗传, 1982, 4(4): 13—14.
- [4] Testsuo Toyomasu *et al.* Agric Biol Chem, 1987, 51(7): 2037—2040.
- [5] Toshiyuki k *et al.* Agric Biol Chem, 1988, 52(12): 3197—3199.
- [6] Kao K N *et al.* Planta, 1974, 115: 355.
- [7] Senda M *et al.* Plant Cell Physiol, 1979, 20: 1441.
- [8] 郑 强等. 生物工程学报, 1989, 5(3): 185—190.
- [9] 何强泰. 中国食用菌, 1986, 3: 42.
- [10] 刘振岳等. 遗传学报, 1991, 18(4): 352—357.
- [11] Chang S T *et al.* Mircen Jour, 1: 185—194.
- [12] 陆士伟等. 同工酶在农业上的应用, 广州: 广东科技出版社, 1987, 9.
- [13] Sonoe O Y *et al.* Agric Biol Chem, 1988, 52(1): 281—284.

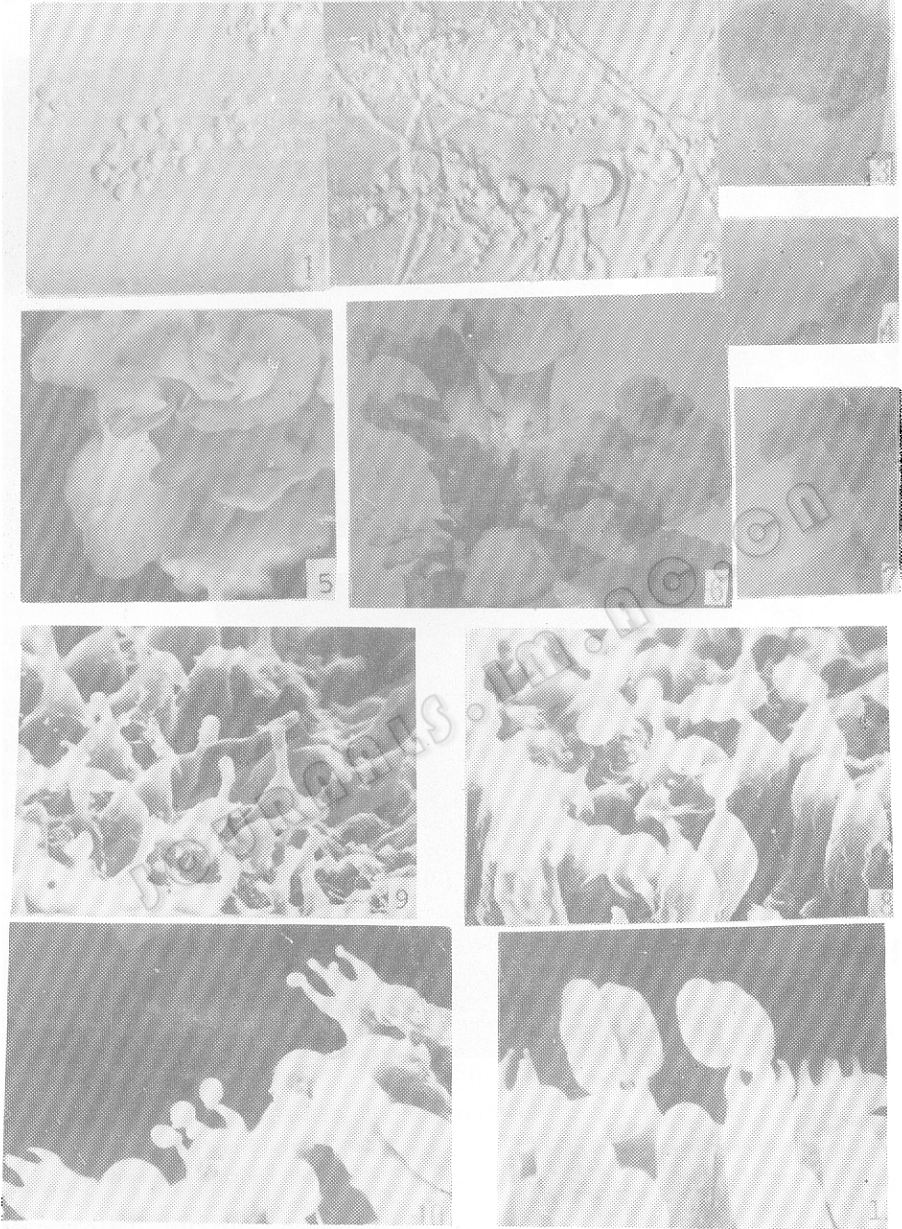
A New Hybrid Obtained by Electrofusion of Protoplasts Between *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus rhodophyllus*

Qiu Jingyun Wu Yuechang Liao Hanquan Zheng Liquan

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

Abstract Some interspecific fusants which successfully was obtained between protoplasts of *P. sajor-caju* and *P. rhodophyllus* by electrofusion with BAEKON 2 000 Advanced Gene Transfer System (BAEKON, INE USA). *P. sajor-caju* and *P. rhodophyllus* were dikaryons strains with natural genetic markers and used as original parents. The basidiospores of their auxotrophic mutants were used as parent strains. Only fusant(F57) has produced fruit bodies. Based on the characterization of morphology, physiology, Biochemistry and genetics of fusant, F57, and comparison with their parents F57 is a new interspecific hybrid strain.

Key words Protoplast fusion, electrofusion, fusant, *Pleurotus sajor-caju*, *P. rhodophyllus*



1. Protoplasts of parent P1-34(ino⁻) (×350).

2. Protoplasts regeneration of parent R4-34(met⁻) (×350).

3. Fruit bodies of the original parent—*Pleurotus sajor-caju*.

4. Fruit bodies of the original parent—*Pleurotus rhodophyllus*.

5. Fruit bodies of parent P1-34

6,7. Fruit bodies of fusant F57

8. Only one spore produced from the basidium of fusant F57 (×2250)

9. Only one sterigma remained after the spore of fusant F57 falling off at maturity (×2250)

10. *Pleurotus rhodophyllus* produced 4 spores on every basidium (×2250)

11. *Pleurotus sajor-caju* produced 4 spores on every basidium (×2250)