



廖武俊,钟启萍,李荣光,等.原生质体融合获得羊肚菌黑色栽培种与黄色非栽培种间杂交高产菌株[J].江西农业大学学报,2025,47(2):349-359.

LIAO W J,ZHONG Q P,LI R G,et al.Protoplast fusion to obtain high-yield strains from interspecific hybridization between black cultivated species and yellow uncultured species of *Morchella* [J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2025,47(2):349-359.

原生质体融合获得羊肚菌黑色栽培种与黄色非栽培种间杂交高产菌株

廖武俊¹,钟启萍¹,李荣光¹,霍达²,霍光华^{1*}

(1.江西农业大学 生物科学与工程学院,江西 南昌 330045;2.江西农业大学 南昌商学院,江西 九江 330300)

摘要:【目的】目前限制江西地区羊肚菌产业发展的主要问题为产量低、高产难重复及优质菌种少,而解决这些问题的关键在于菌种。本研究旨在选育适合江西本土栽培的高产羊肚菌新菌株。【方法】根据遗传与环境互作理论,有针对性的选择江西本土采集到的野生黄色羊肚菌JFRL01-161和在江西鹰潭地区商业栽培的梯棱羊肚菌JFRL01-107、六妹羊肚菌JFRL01-217作为原始菌种,通过20 g/L溶壁酶+10 g/L蜗牛酶组成的复合酶溶解细胞壁制取原生质体,再通过高温和紫外双灭活获得2种灭活原生质体,将不同灭活的原生质体进行两两融合获得融合子。对得到的融合子进行拮抗试验,栽培品比以及区间简单重复序列标记(ISSR)鉴定确定种源关系。【结果】经原生质体融合共获得融合菌株16株,即A11、A37、A39、B7、B12、B17、B18、B25、B26、B29、C1、C2、C5、C6、C11和C12;其中菌株A11、A37、A39和B18出菇并形成产量,特别是融合菌株A11产量达到351.90 g/m²,显著高于亲本JFRL01-107产量264.51 g/m²,年度重复栽培验证试验确认A11产量可达527.8 g/m²,亲本JFRL01-107产量为262.4 g/m²。非加权算数平均聚类系统发生树(UPGMA)显示A11分别与亲本JFRL01-161(相似水平系数0.24)和JFRL01-107(相似系数水平0.696)处于不同分支,证明融合菌株A11是不同于两亲本的新菌株。【结论】融合菌株A11产量显著高于亲本,经过重复栽培试验确认其种质稳定,经ISSR确定是不同于亲本的菌株,因此融合菌株A11可作为适应江西本土栽培的高产羊肚菌新菌株。

关键词:羊肚菌;高产羊肚菌新菌株A11;紫外和热双灭活;原生质体融合;区间简单重复序列标记分析

中图分类号:S332.5 文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2286(2025)02-0349-11

CSTR:32399.14.aauj.2025031



Protoplast fusion to obtain high-yield strains from interspecific hybridization between black cultivated species and yellow uncultured species of *Morchella*

LIAO Wujun¹,ZHONG Qiping¹,LI Rongguang¹,HUO Da²,HUO Guanghua^{1*}

(1.College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
2.Nanchang Business College of Jiangxi Agricultural University, Jiujiang, Jiangxi 330300, China)

收稿日期:2024-09-30 修回日期:2024-12-27

基金项目:江西省重点研发计划项目(20203BBF63036)

Project supported by the Key Research and Development Plan of Jiangxi Province(20203BBF63036)

作者简介:廖武俊,硕士生,orcid.org/0009-0001-7576-9856,2295403196@qq.com;*通信作者:霍光华,教授,博士,博士生导师,主要从事于农业微生物种质发掘与利用研究,orcid.org/0000-0002-2209-6379,2369675702@qq.com。

©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取CC BY-NC-ND协议

Abstract: [Objective] At present, the main issues that restricting the development of *Morchella* industry in Jiangxi Province are low yield, difficulty in replicating high yields, and limited availability of high-quality strains, and the key to addressing these challenges lies in the improvement of strains. The purpose of this study is to breed a new strain of *Morchella* with high yield, which is suitable for local cultivation in Jiangxi. [Method] According to the theory of interaction between heredity and environment, targeted selection was made of the wild yellow *Morchella* strain JFRL01-161 collected locally in Jiangxi, along with the commercially cultivated *Morchella importuna* strain JFRL01-107 and *Morchella sextelata* strain JFRL01-217 from Yingtan region of Jiangxi Province, which were used as original strains, and protoplasts were prepared by dissolving the cell wall with a complex enzyme composed of 20 g/L lywallzyme and 10 g/L snail enzyme, and then two kinds of inactivated protoplasts were obtained by high temperature and ultraviolet double inactivation. The obtained fusants were tested by antagonism, cultivar ratio and Inter-Simple Sequence Repeat to determine the provenance relationship. [Result] Sixteen fusion strains were obtained by protoplast fusion, namely A11, A37, A39, B7, B12, B17, B18, B25, B26, B29, C1, C2, C5, C6, C11 and C12. Among them, strains A11, A37, A39 and B18 successfully fruited and produced yields, the yield of the fusion strain A11 reached 351.90 g/m², which was significantly higher than that of the parent JFRL01-107 (264.51 g/m²). The annual repeated cultivation verification test confirmed that the yield of A11 could reach 527.8 g/m², and that of the parent JFRL01-107 was 262.4 g/m². The phylogenetic tree (UPGMA) of unweighted arithmetic mean clustering system showed that A11 was in different branches from its parents JFRL01-161 (similarity coefficient 0.24) and JFRL01-107 (similarity coefficient level 0.696), which proved that A11 was a new strain different from its parents. [Conclusion] The yield of fused strain A11 was significantly higher than that of its parents. Repeated cultivation experiments confirmed that its germplasm was stable, and ISSR confirmed that it was different from its parents. Therefore, fused strain A11 can be used as a new strain of high-yield *Morchella* adapted to local cultivation in Jiangxi.

Keywords: *Morchella*; new strain of *Morchella* esculenta with high yield A11; UV and heat double inactivation; protoplast fusion; marker analysis of interval simple repeat sequence

【研究意义】羊肚菌(*Morchella* spp.)具有肉质脆嫩、风味独特、维生素和氨基酸含量丰富的特点,其中氨基酸的含量大约在 15.12%~20.74%^[1],食用价值较高,是公认的珍稀食用菌之一^[2-4]。Li 等^[5]从梯棱羊肚菌(*M. importuna*)子实体中分离得到一种粗多糖,对延缓神经退行性疾病有效果,此外羊肚菌还具有多种活性成分,包括酚类化合物、抗坏血酸和维生素 D 等^[6]。羊肚菌还具有抗肿瘤、抗氧化、保护内脏器官等功能^[7]。近年来,中国羊肚菌产业发展迅猛,栽培面积不断增加,偶尔能在小面积获得高产,但好的收获难以每年获得重复,羊肚菌户外栽培的不确定因素一直是突出存在的问题,关键在于缺乏优良的栽培品种。作为子囊菌类的羊肚菌相比于担子菌类易受菌种和菌龄退化的困扰,分生孢子生成量、产菌核能力以及与子囊果产量的关系也不清楚,子囊果分化和生长还特别容易还受早春短时高温的胁迫而发黑、枯萎至死亡,导致极大的经济损失,因此迫切需要选育出可栽培的耐温型高产稳产新品种。【前人研究进展】迄今羊肚菌的育种方式主要是通过对野生种的人工栽培驯化而获得新种源。担子菌中常用锁状联合鉴定体细胞及其重组子代的可育特征,而羊肚菌作为子囊菌不存在锁状联合。Eyini 等^[8]指出,物理或化学诱变剂易致非特异性突变,使诱导标记如营养缺陷型和药物抗性突变体不稳定,故羊肚菌通常不适于诱变育种。因此,基于融合前原生质体灭活和融合产物中未灭活或使用不同处理灭活的融合配偶体再活化的非遗传方法被证明是选择性方法的良好替代方法^[9]。Kim 等^[10]研究表明原生质体融合可以有效地克服在真菌中建立异质联结的营养不亲和性障碍,原生质体融合可以特异性在种内、种间、属间进行,并且融合可以由聚乙二醇(PEG)或电场诱导。原生质体融合育种在担子菌中有诸多成功案例,而在子囊菌中鲜有报道^[11],He 等^[12]利用原生质体融合技术实现了 2 个栽培种即梯棱羊肚菌与六妹羊肚菌的种间杂交,但产量很低,只有 61.13 g/m²。

【本研究切入点】江西地处亚热带气候区,阔叶林下有一种野生黄色羊肚菌。该菌产子囊果晚于本

地栽培的黑色羊肚菌,且对温度耐受性强,但迄今尚未被驯化栽培。根据遗传和环境相互作用理论^[13-14],本研究选用本地野生黄色羊肚菌和商业栽培用种梯棱羊肚菌、六妹羊肚菌作为试验材料,采用原生质体融合技术、PEG进行诱导选育新菌株,运用区间简单重复序列标记(inter-simple sequence repeat, ISSR)进行鉴定^[15]。【拟解决的关键问题】获得与亲本具有遗传差异,能适应江西省亚热带气候区早春高温胁迫并可稳产高产的融合菌株即羊肚菌新品种。

1 材料与方法

1.1 方法材料

1.1.1 菌株

商业栽培的梯棱羊肚菌 JFRL01-107、六妹羊肚菌 JFRL01-217 和江西鹰潭采摘并分离得到的野生黄色羊肚菌 JFRL01-161。菌种保藏于农业微生物种质发掘与利用江西省重点实验室。

1.1.2 主要试剂

试验主要试剂见表1。

表1 试剂和厂家

Tab.1 Reagents and manufacturers

试剂 Reagent	厂家 Factory	试剂 Reagent	厂家 Factory
溶壁酶	广东碧德生物科技有限公司	磷酸二氢钾	西陇科学股份有限公司
蜗牛酶	北京索莱宝科技有限公司	磷酸氢二钾	西陇科学股份有限公司
葡萄糖	西陇科学股份有限公司	琼脂	北京索莱宝科技有限公司
蛋白胨	北京索莱宝科技有限公司	聚乙二醇 6000	西陇科学股份有限公司
酵母浸粉	北京索莱宝科技有限公司	氯化钙	西陇科学股份有限公司
硫酸镁	西陇科学股份有限公司	甘露醇	西陇科学股份有限公司

1.1.3 主要仪器

试验主要仪器见表2。

表2 仪器和厂家

Tab.2 Instrument and manufacturers

仪器 Instrument	厂家 Factory
滤膜	天津市科亿隆实验设备有限公司
显微镜	尼康株式会社
离心机	美国塞洛捷克仪器有限公司
水浴锅	上海爱朗仪器有限公司
生化培养箱	上海博讯医疗生物仪器股份有限公司
超净工作台	江苏苏净集团有限公司
立式灭菌锅	上海博讯实业有限公司

1.1.4 试剂配制

0.6 mol/L 甘露醇的配制:称取 10.93 g 甘露醇,溶于 100 mL 蒸馏水中;20 g/L 溶壁酶与 10 g/L 蜗牛酶的配制:分别称取 0.10 g 溶壁酶和 0.05 g 蜗牛酶,溶于 5 mL 0.6 mol/L 甘露醇溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤除菌,现配现用;PEG-CaCl₂溶液:6.0 g 聚乙二醇 6 000,0.14 g 无水氯化钙,使用 0.6 mol/L 甘露醇溶液溶解,使用 Tris-HCl 调节 pH 至 7.5^[16]并定容至 25 mL。

1.1.5 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g(煮汁),葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 自然;栽培料配方为:小麦占比 75%,木屑 23%,石灰与石膏各 1%;营养袋配方为:小麦 60%,玉米芯 38%,石灰和石膏均为 1%;液体培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 2 g,酵母膏 1 g,硫酸镁 0.5 g,磷酸二氢钾 0.46 g,磷酸氢二钾 1 g,蒸馏水 1 000 mL;再生培养基:液体培养基加琼脂 12 g/L,加入甘露醇,终浓度为 0.6 mol/L;对照培养基:液体培养基加琼脂 12 g/L,不加甘露醇。

1.2 方法

1.2.1 亲本菌种的活化培养

预制的 PDA 平板上接种六妹羊肚菌 JFRL01-217、梯棱羊肚菌 JFRL01-107 和野生黄色羊肚菌 JFRL01-161 的 7 mm 直径的菌块,置于 24 °C 下培养 4~5 d,使菌丝布满平板,并记录菌丝生长速率、产核与否等基本生长信息。

1.2.2 原生质体的制备

250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 液体培养基,121 °C 灭菌 30 min,冷却后接入 6 块活化好的 7 mm 羊肚菌菌丝琼脂块,24 °C 静置培养 3 d,用镊子去除接种块,剥下菌丝,先使用无菌水清洗 3 次,再使用 0.6 mol/L 甘露醇溶液清洗 3 次,用无菌滤纸吸干液体,按照^[17]菌丝量:酶液量=200 mg:1 mL 的比例取菌丝,添加 20 g/L 溶壁酶+10 g/L 蜗牛酶组成的复合酶溶解细胞壁制取原生质体。摇晃使菌丝中充分接触酶液,将离心管密封置于 30 °C 水浴锅中,每隔 10 min 轻轻摇晃,酶解 3 h,采用双层擦镜纸进行过滤,除去菌丝碎片,滤液经 3 000 r/min 离心 10 min,去上清液,用 0.6 mol/L 甘露醇溶液进行悬浮,重复 2 次,取悬浮液洗去酶液得到原生质体。用血细胞计数板进行原生质体浓度计算,而后将原生质体轻轻涂布于再生培养基和对照培养基,3 个重复,24 °C 避光培养。

$$\text{再生率} = \frac{(\text{再生菌落数} - \text{对照菌落数})}{\text{原生质体总数}} \times 100\% \tag{1}$$

1.2.3 原生质体双灭活条件优化

分别利用紫外线可使 DNA 链容易形成 TT 二聚体致而破坏。热高温可使蛋白质发生变性^[18],而细胞死亡,对原生质体进行灭活^[19]。紫外灭活:吸取 600 μL 原生质体悬液于小型培养皿中,于提前打开 30 min 稳定波长的紫外灯下照射,基础条件为功率 30 w,距离 30 cm,处理时间为 30, 60, 90, 120, 150, 180 s。热灭活:1.5 mL 离心管,加入 600 μL 原生质体悬液,基础条件为 50 °C,处理时间为 30, 60, 90, 120, 150, 180 s。不灭活的原生质体悬液作为对照,吸取 200 μL 原生质体悬液于再生培养基中涂布,每组处理设置 3 个重复。于 24 °C 下避光培养,观察再生菌落情况。

$$\text{致死率} = [1 - (\text{灭活后再生菌落数} / \text{对照再生菌落数})] \times 100\% \tag{2}$$

1.2.4 原生质体融合

使用灭活条件优化后的条件进行灭活,不同菌种的不同灭活方式获得的部分灭活原生质体按照 1:1 比例混合,亲本组合^[20]见表 3,离心条件为 3 000 r/min,5 min,舍弃上清液,将等体积的提前 30 °C 预热的 PEG-CaCl₂ 溶液沿离心管壁缓慢加入,轻轻摇晃混匀,立即置于 30 °C 的水浴锅中 20 min,融合反应结束后,2 000 r/min 离心 10 min,舍弃上清液,继续使用 0.6 mol/L 甘露醇清洗 2 次。取 200 μL 涂布于再生培养基,置于 24 °C 下避光培养,定期观察。

表 3 各组合亲本原生质体灭活方式

Tab.3 Various methods of inactivating parental protoplasts for fusion

标记 Mark	组合 Combination	亲本灭活方式 Parental inactivation mode
A 系列	组合 1	紫外灭活 JFRL01-107×热灭活 JFRL01-161
	组合 2	热灭活 JFRL01-107×紫外灭活 JFRL01-161
B 系列	组合 3	紫外灭活 JFRL01-217×热灭活 JFRL01-107
	组合 4	热灭活 JFRL01-217×紫外灭活 JFRL01-107
C 系列	组合 5	紫外灭活 JFRL01-217×热灭活 JFRL01-161
	组合 6	热灭活 JFRL01-217×紫外灭活 JFRL01-161

1.2.5 原生质体融合菌株的鉴定

拟融合菌株初筛:挑取再生培养基上的再生菌落,在 PDA 上观察菌丝和菌落情况,直接去除生长较差的菌株,将生长情况优良的菌株保存备用;亲本和拟融合菌株拮抗试验^[20]:在 PDA 平板上将亲本菌株和融合后菌株分别接种,两者相距 3~4 cm,24 °C 培养,5 d 左右观察是否有拮抗线,将与亲本菌株有拮抗线的菌株保留,其可能是有效融合菌株。进行融合菌株生长速率比较:使用 7 mm 打孔器在融合菌株的平板上打孔,接种于 PDA 平板上,置于 24 °C 下培养,记录生长情况。

1.2.6 菌株栽培品比

液体摇瓶:按照1.1.3中液体培养基配方配制培养基,121 °C灭菌30 min,冷却后接入3个7 mm直径的融合菌株和亲本菌株的菌块,21 °C,180 r/min培养7 d后,获得液体菌种;制袋和栽培:按照栽培袋配方进行制袋,小麦提前泡至无白芯,每袋装料375 g,待灭菌冷却后接入液体菌种,菌袋生长20 d,接近满袋时,播种于江西省贵溪市岭西村羊肚菌种植大棚、竹林和茶园中,每个菌株每袋播种于预先整好的1 m²地块,重复为3,播种完覆盖打孔的黑膜,避光保湿保温。7~15 d菌丝长出土面,放置预先制备好的营养袋,每平方米放4袋,每袋400 g,记录出菇信息。试验时间为2021年11月至2022年3月;验证试验时间为2022年11月至2023年3月,地点为江西农业大学农学院实验站冬闲水稻田,其他同上。

1.2.7 亲本和融合菌株子实体DNA的ISSR分析

区间简单重复序列标记鉴定(ISSR)^[21]首先选取长势较好的子囊果进行分析。DNA提取采用康为世纪新型植物DNA提取试剂盒进行羊肚菌基因组DNA的提取,提取步骤严格按照试剂盒使用说明书进行,提取完成的DNA进行电泳和浓度测试,确保能正常使用。引物和PCR条件参照武冬梅^[22],引物见表4,PCR体系和程序略做修改,PCR体系为:2×Taq Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 5 μL,引物1.5 μL, DNA模板1 μL, PCR仪执行程序为:94 °C预变性5 min, 94 °C变性45 s, 53 °C复性45 s, 72 °C延伸60 s, 35个循环; 72 °C再延伸7 min, 4 °C保存,电泳条件为:取5 μL PCR产物点入预先制备的1.5%的琼脂糖凝胶中,在1×TAE缓冲液中,以5 V/cm的电压进行电泳,当跑至3/4处时停止电泳,置于凝胶成像系统中进行成像,并拍照记录。根据电泳图谱上的条带的迁移率读取条带,有条带记为“1”,无条带记为“0”,舍弃模糊的条带,在Excel表格中建立数据矩阵,将数据矩阵输入POPGEN v1.32进行遗传多样性分析。再使用软件Ntsys v2.1e进行非加权算数平均聚类(unweighted pair-group mean average, UPGMA)^[23]聚类分析。

表4 研究所用ISSR引物

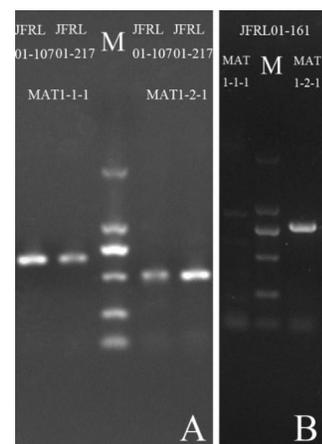
Tab.4 ISSR primer used in study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
R1	AGAGAGAGAGAGAGAC	R7	TGTGTGTGTGTGTGTGC
R2	AGAGAGAGAGAGAGAGG	R8	TGTGTGTGTGTGTGTGG
R3	CACACACACACACACAG	R9	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
R4	ACACACACACACACACT	R10	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
R5	ACACACACACACACACC	R11	CACACACACACACACARC
R6	ACACACACACACACACG	R12	CACACACACACACACARG

2 结果和分析

2.1 亲本菌株生长情况和交配型

3株亲本菌株长势良好,可栽培梯棱羊肚菌菌株JFRL01-107和野生黄色羊肚菌JFRL01-161均会产生大量菌核,菌丝较稀少,可栽培六妹羊肚菌菌株JFRL-217则不产菌核,菌丝较厚,3株菌株生长速率都较快,JFRL01-107和JFRL01-161生长速率分别达到12.16 mm/d和12.84 mm/d,而JFRL01-217生长速率最快,达到16.67 mm/d;菌株交配型:菌株交配型电泳图见图1,可栽培黑色菌株JFRL01-107和JFRL01-217均有2种交配型,MAT1-1-1交配型扩增大小大约700 bp, MAT1-2-1交配型扩增产物大约400~500 bp,且条带明亮。非栽培野生黄色羊肚菌JFRL01-161似具有2种交配型, MAT1-1-1交配型扩增大小大约700 bp, MAT1-2-1交配型扩增产物大约800~900 bp,但是MAT1-1-1交配型所对应的条带特别淡或模糊,说明MAT1-1-1基因含量少,可能是该菌难以栽培的原因。若将其作为育种材料与可育菌株杂交可望弥补其不育的缺陷。



A: 黑色羊肚菌; B: 黄色羊肚菌。

A: Black morel; B: Yellow morel.

图1 菌株交配型

Fig.1 Strain mating type

2.2 羊肚菌原生质体制备及再生情况

3个菌株制备出的原生质体和原生质体得数见图2和表5,3个菌株中,菌株JFRL01-217制备的原生质体数量最多,达到 7.7×10^5 个/mL,菌株JFRL01-107和JFRL01-161的制备情况较差,黄色羊肚菌JFRL01-161仅为 2.9×10^5 个/mL,数量极少,3个菌株的再生情况见表5,跟原生质体制备数呈现一样的规律,JFRL01-217再生率最高,达到0.093%,JFRL01-161最低,只有0.024%。

表5 3个菌株原生质体制备及再生情况

Tab.5 Regeneration of protoplasts of three strains

菌株 Bacterial strain	原生质体数量/(个·mL ⁻¹) Number of protoplasts	再生率/% Regeneration rate
JFRL01-107	3.5×10^5	0.049
JFRL01-161	2.9×10^5	0.024
JFRL01-217	7.7×10^5	0.093

2.3 灭活条件优化

紫外照射 30 w, 30 cm 和热灭活 50 °C 作为基础条件,不同处理时间结果见表6。紫外灭活时,基于致死率,JFRL01-107和JFRL01-217分别选择120 s和150 s,JERL01-161选择90 s作为条件;热灭活时,JFRL01-217抗性最强,选用180 s,JFRL01-107和JFRL01-161抗性较弱,分别选择150 s和120 s作为灭活条件。

表6 原生质体致死率

Tab.6 Protoplast lethality

时间/s Time	紫外灭活 Ultraviolet inactivation			热灭活 Thermal inactivation		
	JFRL01-107	JFRL01-161	JFRL01-217	JFRL01-107	JFRL01-161	JFRL01-217
30	30.61%	54.17%	14.89%	38.78%	41.67%	20.21%
60	55.10%	79.17%	47.87%	61.22%	70.83%	40.43%
90	81.63%	100%	72.34%	81.63%	91.67%	61.70%
120	100%	100%	92.55%	95.92%	100%	84.04%
150	100%	100%	100%	100%	100%	98.94%
180	100%	100%	100%	100%	100%	100%

2.4 原生质体融合菌株鉴定

2.4.1 初筛

从再生培养基上挑取拟融合再生的单个菌落,去掉菌丝细弱,长势较差的菌株。经过初筛,获得菌株16个,即A11、A37、A39、B7、B12、B17、B18、B25、B26、B29、C1、C2、C5、C6、C11和C12。通过拮抗试验发现,拮抗都比较弱,其中菌株A11、B7、B17、C1、C2和C5拮抗线相对于其他较为明显(图2)。

2.4.2 融合菌株的菌丝长速比较

相比于亲本的菌丝生长速度,融合子的生长速度有快有慢(表7),A系列中,A11生长速度快于2个亲本菌株,A39则较慢;B系列中,B12、B17、B18、B26、B29菌丝生长速度都快于2个亲本菌株,B7和B25,快于亲本JFRL01-107,慢于亲本JFRL01-217;C系列中,6个菌株菌丝生长速度都快于或接近于亲本JFRL01-217,快于亲本JFRL01-161,说明JFRL01-217活性强,将占据主导作用。

2.5 栽培品比

亲本与融合菌株的幼菇数和产量统计结果截止2022年3月12日,栽培时间92 d,还有很多幼菇不能采摘,数据见表8,后续数据因特殊原因未收集到。亲本JFRL01-107和A系列产生的幼菇较多,A11菌株的幼菇数少于亲本JFRL01-107,但是产量高于其亲本,A37和A39不管是幼菇还是产量均少于亲本JFRL01-107。B系列和C系列中,幼菇数与亲本JFRL01-217相比,差异都不是很大,黄色羊肚菌JFRL01-161菌丝在土壤中生长,菌丝稀少细弱,最终未见原基和幼菇的产生。各个菌株的出菇情况见图3,A系列生长跟亲本JFRL01-107相似,B、C系列跟亲本JFRL01-217生长情况相似,其中融合菌株A11的产量比亲本高。亲本菌株和融合菌株在贵溪市岭西村竹林和茶园的栽培情况更加不好,竹林中有少许原基,未见到原基分化生成菇,茶园因为土壤干燥,只有菌株A39产生了几朵小菇。

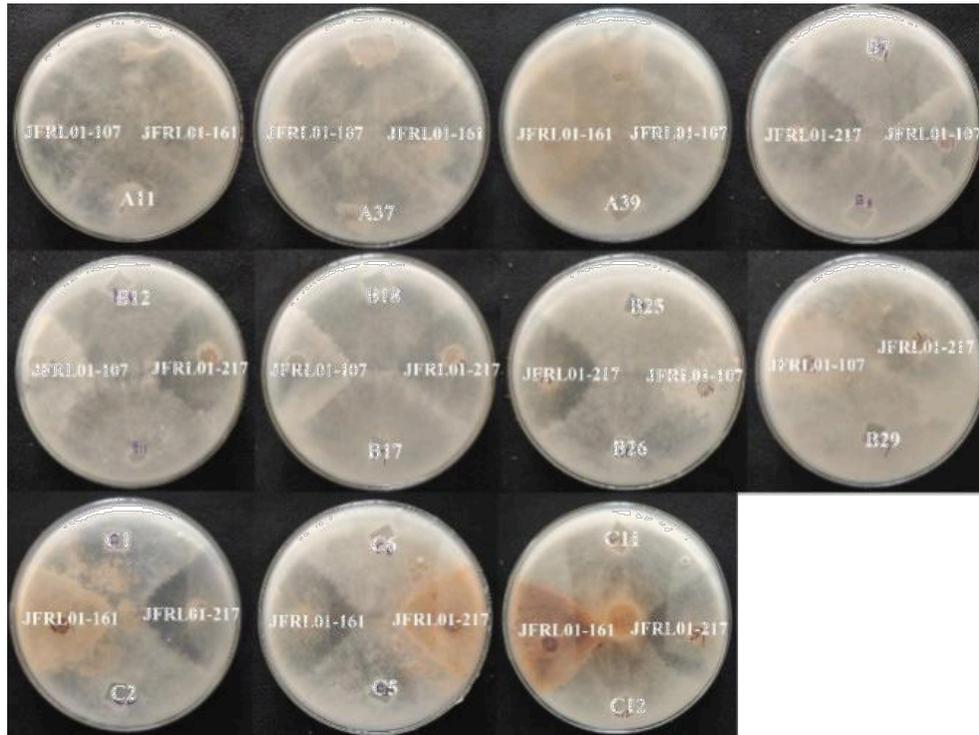


图2 融合菌株拮抗试验

Fig.2 Antagonistic map of fusion strains

表 7 融合菌株菌丝生长速率

Tab.7 Mycelial growth rate of fusion strains

菌株 Bacterial strain	菌丝生长速率/(mm·d ⁻¹) Growth rate of hyphae	菌株 Bacterial strain	菌丝生长速率/(mm·d ⁻¹) Growth rate of hyphae
A11	15.41±0.37	B26	17.76±0.37
A37	12.29±0.04	B29	18.07±0.16
A39	11.69±0.38	C1	17.14±00.21
B7	16.29±0.32	C2	16.76±0.19
B12	18.14±0.02	C5	17.34±0.02
B17	17.15±0.18	C6	14.67±0.38
B18	19.23±0.22	C11	16.74±0.44
B25	15.10±0.13	C12	16.73±0.21
JFRL01-107	12.16± 0.41	JFRL01-217	16.67± 0.39
JFRL01-161	12.84± 0.16		

2.6 年度重复栽培验证试验

经2021年11月份栽培试验结果表明,A11在产量上比亲本JFRL01-107提高了约34%。2023年11月将A11与亲本JFRL01-107进行了重复栽培验证实验,试验地为冬闲水稻田,位于江西农业大学农学院实验站,海拔63 m,位于中亚热带气候区。经过同期高温胁迫后,试验结果表明A11产量为527.8 g/m²,可见幼菇数88±11.23个,亲本JFRL01-107产量为262.4 g/m²,可见幼菇数50±15.53个。说明A11菌株较亲本产量得到了很大提高且性状稳定。

2.7 子实体DNA的ISSR分析

将出菇试验中表现相对较好的菌株进行ISSR分析,扩增电泳结果见图4,UPGMA聚类分析见图5。A11(泳道4),A37(泳道5)、A39(泳道6)在引物R1-R6扩增电泳图上几乎有相同的条带,但它们与亲本JFRL01-107(泳道1)和JFRL01-161(泳道3)在以引物R1、R3、R5扩增结果的电泳图上条带数和位置有

表 8 融合菌株和亲本大棚栽培幼菇和产量统计

Tab.8 Fusion strain and parental greenhouse cultivation of young mushrooms and yield statistics

菌株 Bacterial strain	可见幼菇数/(个·m ⁻²) Visible number of young mushrooms	产量/(g·m ⁻²) Yield
A11	128.00±7.21	351.90±10.83
A37	180.00±10.00	131.98±10.38
A39	160.00±50.00	51.02±4.25
B7	23.67±2.52	-
B12	9.67±5.13	-
B17	10.67±6.03	-
B18	18.33±4.51	41.75±6.02
B25	19.33±3.06	-
B26	21.67±3.51	-
B29	7.00±4.58	-
C1	11.33±3.06	-
C2	10.33±6.11	-
C5	9.67±3.21	-
C6	7.00±2.00	-
C11	-	-
C12	28.67±5.03	-
JFRL01-161	-	-
JFRL01-107	240.00±72.11	264.51±70.18
JFRL01-217	12.00±3.61	33.34±2.38

“-”表示因特殊原因未收集到数据。

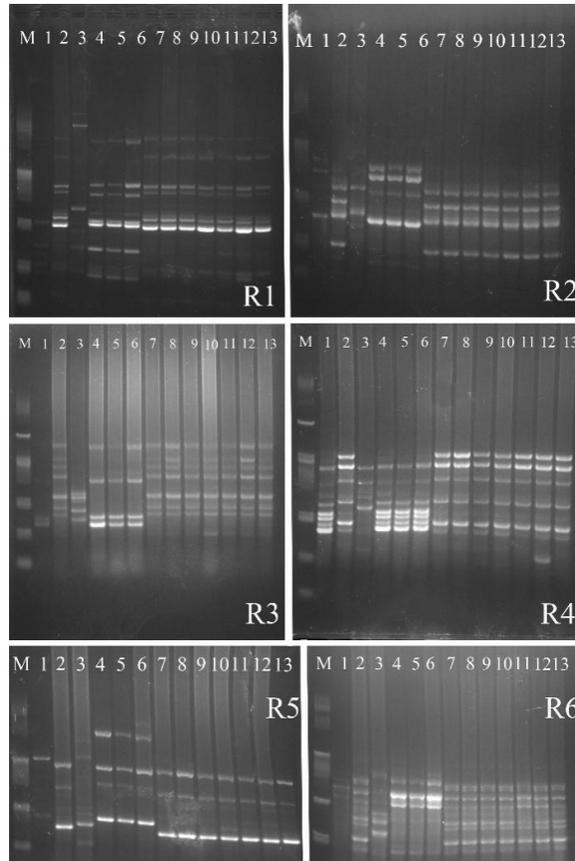
“-” indicates that data has not been collected for special reasons.



图 3 羊肚菌出菇栽培情况

Fig3 Cultivation status of morel mushrooms

显著区别,在以引物 R2、R4、R6 扩增结果的电泳图上条带位置上只有细微差别,说明 A11、A37、A39 之间是相似菌株,UPGMA 图上,在相似水平系数 0.696 上与亲本 JFRL01-107 分为不同支,差异较大,证明是不同于两亲本的新菌株,即融合产生的新菌株。B 和 C 系列融合菌株与亲本 JFRL01-217 在电泳条带几乎一致,在相似水平系数 0.96 上与亲本 JFRL01-217 分为不同支,差异较小,可以认为是相同菌株。



M: Marker, 1: JFRL01-107, 2: JFRL01-217, 3: JFRL01-161, 4: A11, 5: A37, 6: A39, 7: B7, 8: B18, 9: B25, 10: B26, 11: C1, 12: C2, 13: C12。 M: Marker, 1: JFRL01-107, 2: JFRL01-217, 3: JFRL01-161, 4: A11, 5: A37, 6: A39, 7: B7, 8: B18, 9: B25, 10: B26, 11: C1, 12: C2, 13: C12.

图 4 引物 R1-R6 扩增电泳分析

Fig.4 Primer R1-R6 amplification electrophoresis map

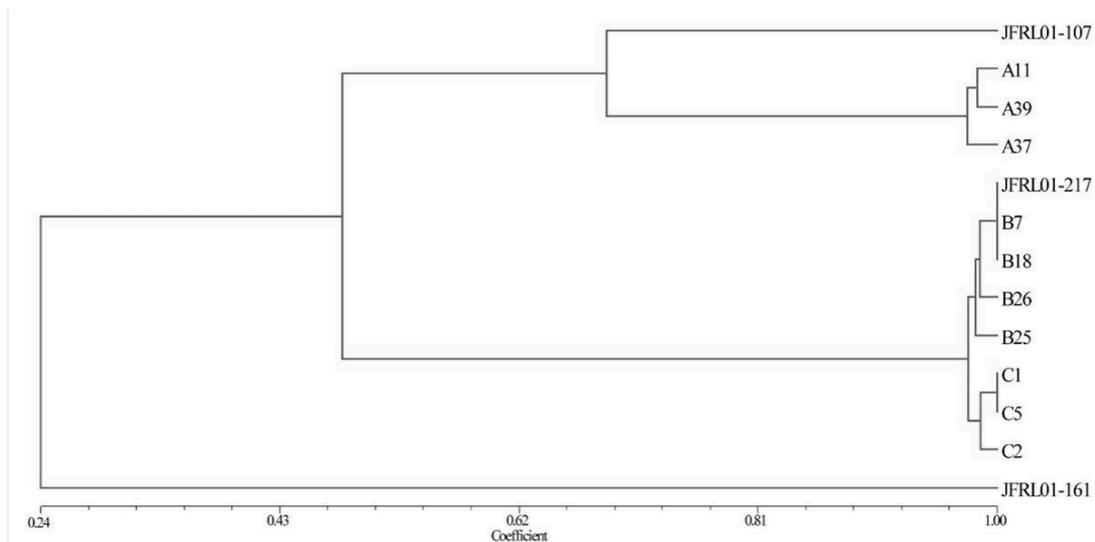


图 5 亲本和融合菌株 UPGMA 聚类分析

Fig.5 UPGMA clustering diagram of parental and fusion strains

3 讨论和结论

原生质体融合育种在担子菌中有诸多成功案例,而在子囊菌中鲜有报道。本研究采用双灭活法,对亲本原生质体分别进行紫外、热灭活,得到DNA失活和细胞质失活的两类原生质体,在PEG诱导使其融合形成互补的可再生细胞。根据遗传和环境互作理论,本研究选择江西本地采集到的野生黄色羊肚菌JFRL01-161和本地栽培较好的梯棱羊肚菌JFRL01-107和六妹羊肚菌JFRL01-217作为亲本。羊肚菌原生质体制备困难,活力强的JFRL01-217制备数量达 7.7×10^5 个/mL, JFRL01-107和JFRL01-161较少,分别为 3.5×10^5 个/mL和 2.9×10^5 个/mL。采用固体软琼脂平板再生,3个菌株再生率低,分别为0.093%、0.049%和0.024%,远低于He等^[8]的1.53%或1.82%,可能因再生方法不同。JFRL01-107、JFRL01-161和JFRL01-217紫外灭活时间分别为120 s、90 s和150 s,热灭活时间为150 s、120 s和180 s,致死率均达100%。可能因羊肚菌为低温型真菌,对热敏感,与其他食用菌不同,其灭活时间较短^[24]。紫外灭活致死强度更大,黄色羊肚菌原生质体90 s时致死率就达100%。

融合菌株A11、A37、A39和B18出菇并产生产量,其中A11产量尤为突出,达 351.90 g/m^2 ,显著高于亲本JFRL01-107的 264.51 g/m^2 ,是可出菇亲本产量的133.04%。经年度重复栽培验证,A11产量为 527.8 g/m^2 ,亲本JFRL01-107产量为 262.4 g/m^2 。A11融合菌株的子实体形态与亲本与差异不大,更多显现出的是黑色羊肚菌的特性,应是出现了杂交育种的偏亲现象^[25]。拮抗试验和ISSR鉴定显示融合子与其亲本具有明显拮抗线;A11与亲本非栽培黄色羊肚菌JFRL01-161在相似水平系数0.24处,与亲本可栽培梯棱羊肚菌JFRL01-107在相似系数水平0.696处处于不同分支,证明融合菌株A11是不同于两亲本的新菌株。综上所述,融合菌株A11可作为适宜江西亚热带地区稳产高产栽培的新品种。该菌株现保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,编号CGMCC NO.40670。

参考文献 References:

- [1] TU X M, TANG L, XIE G B, et al. Chemical composition of aromas and lipophilic extracts from black morel (*Morchella importuna*) grown in China [J]. *Mycobiology*, 2021, 49(1): 78-85.
- [2] 杜习慧, 赵琪, 杨祝良. 羊肚菌的多样性、演化历史及栽培研究进展 [J]. *菌物学报*, 2014, 33(2): 183-197.
DU X H, ZHAO Q, YANG Z L. Diversity, evolutionary history and cultivation research progress of *Morchella* [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(2): 183-197.
- [3] DU X H, YANG Z L. Mating systems in true morels (*Morchella*) [J]. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2021, 85(3): 22020.
- [4] DU X H, ZHAO Q, O'Donnell K, et al. Multigene molecular phylogenetics reveals true morels (*Morchella*) are especially species-rich in China [J]. *Fungal genetics and biology*, 2012, 49(6): 455-469.
- [5] LI S H, TANG D, WEI R, et al. Polysaccharides production from soybean curd residue via *Morchella esculenta* [J]. *Journal of food biochemistry*, 2019, 43(4): 1-12.
- [6] 谢占玲, 谢占青. 羊肚菌研究综述 [J]. *青海大学学报(自然科学版)*, 2007(2): 36-40.
XIE Z L, XIE Z Q. Review on *Morchella* [J]. *Journal of Qinghai university (natural science edition)*, 2007(2): 36-40.
- [7] 孙巧弟, 张江萍, 谢洋洋, 等. 羊肚菌营养素、功能成分和保健功能研究进展 [J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 323-328.
SUN Q D, ZHANG J P, XIE Y Y, et al. Research progress on nutrients, functional components and health care function of *Morchella* [J]. *Food science*, 2019, 40(5): 323-328.
- [8] EYINI M, RAJKUMAR K, BALAJI P. Isolation, regeneration and PEG-induced fusion of protoplasts of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus forida* [J]. *Mycobiology*, 2006, 34: 73-78.
- [9] CHAKRABORTY U, SIKDAR S R. Production and characterization of somatic hybrids raised through protoplast fusion between edible mushroom strains *Volvariella volvacea* and *Pleurotus forida* [J]. *World journal of microbiology biotechnology*, 2008, 24: 1481-1492.
- [10] KIM C, CHOI E C, KIM B K. Protoplast fusion between *Lentinula edodes* and *Coriolus versicolor* [J]. *Archives of pharmaceutical research*, 1997, 20: 448-453.
- [11] 陈芳草, 谭方河, 刘兴蓉. 羊肚菌原生质体制备和再生 [J]. *西南农业学报*, 2007, 20(5): 1097-1100.

- CHEN F C, TAN F H, LIU X R. Preparation and regeneration of protoplasts from *Morchella* spp. [J]. Southwest China journal of agricultural science, 2007, 20(5): 1097-1100
- [12] HE P X, YU M, WANG K, et al. Interspecific hybridization between cultivated morels *Morchella importuna* and *Morchella sextelata* by PEG-induced double inactivated protoplast fusion [J]. World journal of microbiology & biotechnology, 2020, 36(4): 58.
- [13] 徐建平, 王汉臣, 胡殿明. 基因型和环境互作在食用菌育种中的潜力和应用 [J]. 食用菌学报, 2018, 25(2): 1-22.
- XU J P, WANG H C, HU D M. Potential and application of genotype and environment interaction in edible fungi breeding [J]. Acta edulis fungi, 2018, 25(2): 1-22.
- [14] 夏会楠, 李东晓, 赵玉阳, 等. 原生质体融合技术在食用菌遗传育种中的应用概述 [J]. 食用菌, 2023, 45(6): 1-3.
- XIA H N, LI D X, ZHAO Y Y, et al. Application of protoplast fusion technology in genetic breeding of edible fungi [J]. Edible fungi, 2023, 45(6): 1-3.
- [15] 黄彬, 黄建建, 汤伏令, 等. 江西省浙江红山茶及近缘种群体遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(5): 1084-1095.
- HUANG B, HUANG J J, TANG Y L, et al. SSR analysis of genetic diversity of *Camellia chekiangoleosa* Hu. and its related species in Jiangxi Province [J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2023, 45(5): 1084-1095.
- [16] 康霄文, 杜晓华, 王东伟, 等. 远缘原生质体融合菌株的构建及生防作用研究 [J]. 湖南农业科学, 2023(10): 43-49.
- KANG X W, DU X H, WANG D W, et al. Construction of a distant protoplast fusion strain and its biocontrol effect [J]. Hunan agricultural sciences, 2023(10): 43-49.
- [17] 闫亚敏, 梁大伟, 马建伟, 等. 巨大口蘑与双孢蘑菇原生质体融合育种 [J]. 中国食用菌, 2023, 42(6): 24-31+40.
- YAN Y M, LIANG D W, MA J W, et al. Protoplast fusion breeding of *Tricholoma giganteum* and *Agaricus bisporus* [J]. Edible fungi of China, 2023, 42(6): 24-31.
- [18] 李丰硕, 冀宝莹, 韩冰, 等. 响应面法优化六妹羊肚菌原生质体的制备条件 [J]. 山东农业科学, 2023, 55(9): 165-172.
- LI F S, JI B Y, HAN B, et al. Optimization of protoplast preparation conditions of *Morchella esculenta* by response surface methodology [J]. Shandong agricultural sciences, 2023, 55(9): 165-172.
- [19] 王静怡, 吴戈辉, 万琪琪, 等. 过氧甲酸预处理与紫外联合消毒真菌效能机制 [J]. 中国环境科学, 2024, 44(11): 6164-6173.
- WANG J Y, WU G H, WAN Q Q, et al. Efficacy and mechanism of combined inactivation of fungal spores by peracetic acid pretreatment and UV combined [J]. China environmental science, 2024, 44(11): 6164-6173.
- [20] 周金看, 杨瑶, 冯璠, 等. 不同杏鲍菇品种种质鉴定及原生质体单核体杂交育种 [J]. 北方园艺, 2023(24): 118-125.
- ZHOU J K, YANG Y, FENG K, et al. Germplasm identification of different *Pleurotus eryngii* varieties and hybrid breeding of protoplast monokaryon [J]. Northern horticulture, 2023(24): 118-125.
- [21] 李卫星, 花艳敏, 张秀萍, 等. 银杏雄株 ISSR 分子标记及亲缘关系分析 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2015, 36(1): 101-106.
- LI W X, HUA Y M, ZHANG X P, et al. ISSR molecular markers and genetic relationship analysis of ginkgo male plants [J]. Journal of Yangzhou university (agricultural and life science edition), 2015, 36(1): 101-106.
- [22] 武冬梅. 新疆野生羊肚菌分子系统学和遗传多样性研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- WU D M. Molecular systematics and genetic diversity of wild *Morchella* in Xinjiang [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [23] 石楠, 张利平, 张晓. 基于 16S-23S rDNA 间隔区序列 (ITS)、REP 序列的基因指纹图谱及 UPGMA 聚类法的拟诺卡菌属分类方法 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(1): 40-47.
- SHI N, ZHANG L P, ZHANG X. Classification method of *Nocardia* based on 16S-23S rDNA spacer sequence (ITS), REP sequence and UPGMA clustering [J]. China journal of biochemistry and molecular biology, 2011, 27(1): 40-47.
- [24] 贺建超, 贺聪莹, 卢美欢, 等. 双孢蘑菇和姬松茸灭活原生质体融合育种研究 [J]. 中国食用菌, 2014, 33(1): 9-10.
- HE J C, HE C Y, LU M H, et al. Study on fusion breeding of inactivated protoplasts of *Agaricus bisporus* and *Agaricus blazei* [J]. Edible fungi of China, 2014, 33(1): 9-10.
- [25] 许琳, 刘洋, 张雪超, 等. 2 种灵芝原生质体制备及再生条件优化 [J]. 吉林农业大学学报, 2024, 46(6): 979-987.
- XU L, LIU Y, ZHANG X C, et al. Protoplast preparation and regeneration conditions optimization of two *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of Jilin agricultural university, 2024, 46(6): 979-987.