

一种适宜秸秆栽培的金针菇菌株筛选方法

李艳芳¹,张腾霄¹,王斌¹,张立伟¹,魏雅冬²,李贺²

(1.绥化学院食品与制药工程学院,黑龙江 绥化 152061; 2.绥化学院农业与水利工程学院,黑龙江 绥化 152061)

摘要:以一株野生黄金针菇菌株为试验材料,研究了在试管内进行适宜秸秆栽培的金针菇菌株的筛选方法,对栽培的黄金针菇进行组织分离和孢子分离,并对分离后的菌株进行了栽培试验。结果表明:在密闭试管内以秸秆为栽培基质栽培黄金针菇可以顺利出菇,继而进行组织分离与孢子分离,操作方便,成功率高,可用于适宜秸秆栽培的菌株初步筛选。

关键词:金针菇;菌株筛选;秸秆

中图分类号:S646 **文献标识码:**A **文章编号:**0488-5368(2024)05-0040-03

Screening Methods for Flammulina Mushroom Cultivation Using Straw

LI Yanfang¹, ZHANG Tengxiao¹, WANG Bin¹, ZHANG Liwei¹, WEI Yadong², LI He²

(1. College of Food and Pharmaceutical Engineering, Suihua University, Suihua, Heilongjiang 152061, China;

2 College of Agriculture and Hydraulic Engineering, Suihua University, Suihua, Heilongjiang 152061, China)

Abstract: A wild *Flammulina velutipes* strain was used as test material to investigate screening methods for *Flammulina velutifolia* strains suitable for cultivation with straw substrate in test tubes. Tissue and spore isolation techniques were used on *Flammulina velutipes* strains. The results showed that *Flammulina velutifolia* could grow successfully on straw as the cultivation medium in closed test tubes. The subsequent tissue and spore isolation are effective and convenient, which can be used for preliminary screening of strains suitable for straw cultivation.

Key words: Flammulina mushroom; Strain screening; Straw

金针菇 [*Flammulina velutipes* (Fr.) Singer] 是我国食用菌工厂化生产的主要栽培品种之一。随着人们生活水平的提高,食用菌消费量逐年增加,近三年虽受疫情影响金针菇产量有所回落,2021年全国年产量仍超过214万t^[1],占全年食用菌总产量的5.2%。因此培育产量高、质量好、抗逆性强、适宜栽培基质的金针菇优良菌株具有重要的理论意义和实用价值。金针菇的育种方法包括野生菌驯化育种、自然选育、杂交育种、诱变育种、原生质体融合育种、基因工程育种等^[1,2],其中野生菌驯化和自然选育是其他育种方法的基础。野生菌驯化育种指从野外采集到外观品质优良的菌体,利用组织分离(或孢子分离)方法,提取到该菌株的纯菌丝体,扩繁后再进行相应的人工栽培筛选,选择出具有商品性状好的菌株。自然选育,即选择在

自然生长条件下发生有益变异的菌株,再进行相关栽培试验、品质评价小试、中试、推广过程。近年来,随着秸秆在食用菌原料中的广泛应用,选育适宜秸秆栽培的食用菌菌种也成为食用菌行业的重要需求。本文以一株野生黄金针菇为亲本,通过试管栽培,利用多孢自交方法,筛选适宜秸秆栽培的金针菇菌株,为后续开展杂交育种或自然选育适宜秸秆栽培的菌株提供一种简单实用的育种筛选方法。

金针菇是双因子控制次级异宗结合食用菌,生活史分为有性世代和无性世代^[3],采用有性和无性生殖两种方式,以秸秆为主要栽培基质进行栽培初试,结果证明,此方法能够进行适宜秸秆栽培的金针菇菌株筛选,可帮助发现菌株的隐性不利基因,筛选出最优菌株经稳定性测试后作为品种或作为

收稿日期:2023-09-15 修回日期:2023-10-17

基金项目:黑龙江省省属高校基本科研业务费项目(YWK10236200202);绥化学院生物资源高值转化与综合利用创新团队项目(SIT05005)。

第一作者简介:李艳芳(1975-),女,助理研究员,硕士,主要研究方向:食用菌栽培及相关技术。

亲本再进行杂交。与其它方法相比具有用料少、操作简单、耗时少、成功率高等优点,为金针菇育种方法提供一种参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

在绥化学院校内腐朽柳树桩上采集到外观性状好的野生黄金针菇,以此为亲本,经过组织分离纯化后得到母种。采集分离过程如下:将采集到的黄金针菇子实体除去表面杂物泥土,用75%酒精棉球将子实体表面擦拭干净,移至超净工作台内,将菇柄切除,双手将菇盖从中间部位掰开,用无菌镊子在菇盖与菌褶间未与外界直接接触部分夹取小块菌肉,移至灭菌后的空白PDA培养基试管中央,封好试管口后放置于恒温培养箱内,25℃恒温避光培养,定期观察菌丝萌发及生长情况,待菌丝萌发生长至直径2 cm左右时移至超净工作台内,挑取尖端菌丝再移至空白PDA培养基中纯化培养,培养条件同上。待菌丝萌发长满管后即为黄金针菇菌株母种^[4],将母种扩繁培养备用。

1.2 栽培试验

1.2.1 菌丝体培养 制作空白PDA平板培养基,在超净工作台内将黄金针菇母种接入平板,25℃恒温避光培养,定期观察并记录菌丝体生长情况。

1.2.2 栽培种培养

① 配料、拌料

以稻草为栽培主料,制作秸秆培养基平板与试管。秸秆培养基配方:稻草(剪碎,长度0.5 cm)98%,石灰1%,石膏1%。根据配方配料、加水拌料均匀。

② 装容器

平板:将秸秆培养基装入直径90 cm平板并压平,装料量为平板高度的2/3,每10个平板一组;

试管:将秸秆培养料装入20 mm×200 mm试管并压实,高度6 cm,封好试管口(棉塞或硅胶塞),每10个试管为一组。

菌袋:将秸秆培养基装入17 cm×33 cm聚丙烯菌袋,湿料重0.75 kg,10袋为一组。

③ 灭菌

将装好培养基的容器(平板、试管、菌袋)放入高压蒸汽灭菌器中,121℃(0.1 MPa压力)灭菌,平板与试管灭菌时间1 h,菌袋灭菌时间2 h,冷却后取出备用。

④ 接种、培养

将灭菌后的平板、试管、菌袋培养基放入超净工作台内,在无菌状态下分别接入黄金针菇菌株及对照菌株。接种后置于恒温培养箱内,25℃恒温避光培养。定期观察、测量记录菌丝生长情况。

⑤ 出菇

试管:待试管内的培养基长满菌丝后,将试管取出,无需常规金针菇催蕾的各种外界刺激条件,置于室温非阳光直射条件(15~20℃)下竖直或横放保存,定期观察并记录,15~30 d左右试管内培养基表面出现菇蕾。待菇体长至8~10 cm,将试管平放固定,使试管内菇盖向上,菌褶向下,以便于孢子弹射至试管内壁上。

菌袋:待菌袋内培养基长满菌丝后,将菌袋置于15~20℃、相对湿度85%~95%环境下微光培养,定期观察并记录,待出菇至菇体12~15 cm时采收记录。

1.2.3 组织分离与孢子分离及培养 组织分离培养:取试管(管内金针菇体、菇柄、菇盖长势好且未弹射孢子),置于超净工作台内,在无菌操作条件下,去除试管口棉塞,用镊子从试管中分别夹取菇盖和菇柄部分,接种于空白PDA培养皿中央,25℃恒温避光培养。

孢子分离培养:取试管(试管内金针菇体、菇柄、菇盖长势好且孢子弹射时间短),置于超净工作台内,去除试管口棉塞或胶塞,用接种针蘸取少量孢子,轻涂于空白PDA培养皿中央,封口,倒置培养皿,25℃恒温培养5~7 d后,在平板上出现可见菌落时,挑取适当菌丝转接空白PDA平板上,按文献^[5]方法选取具有锁状联合菌丝为目标双核菌丝体。将目标双核菌丝体再转接至空白PDA平板培养。

定期观察组织分离与孢子分离培养皿,待培养皿中央有菌落长出并长至直径2~3 cm后,取尖端部分提纯,转接至空白PDA试管再培养。以亲本黄金针菇菌种为对照菌株,同时重复以上操作。至此,黄金针菇适宜稻草秸秆栽培的第1代菌株筛选完毕。

将第1代筛选出的菌株进行常规菌袋栽培,挑选优良菌株重复1.2.2、1.2.3过程,即可根据需要进行下一代筛选。

2 结果与分析

2.1 生物学特性

采集的绥化学院校园黄金针菇菌株,其子实体丛生,菇体黄色,菇盖淡黄至乳黄色,呈半球形,易

开伞。菇柄直立、中空,由菇盖端至根部由黄色至黄褐色渐进加深,根部有黄褐色绒毛,菌丝生长速度快、洁白浓密。

2.2 栽培特性

金针菇属于中低温出菇,菌丝在 5~30℃ 均可生长,最适宜生长温度为 20~25℃,菌丝长满后低

温(4~15℃)和微弱光刺激原基分化,最适宜出菇温度为 10~15℃,4~20℃ 子实体均可生长。

2.3 试管出菇表现

试管出菇情况见表 1,其中对照组为同一亲本菌株菌袋栽培方法出菇后,采用常规孢子分离方法^[6]。

表 1 试管出菇

菌株种类	出菇时间/d	菇体个数/个	出菇情况		孢子弹射情况	组织分离与孢子分离成功率/%
			菇盖	菇柄		
组织分离试验菌株	23	2~4	初期乳白,中后期淡黄	初期乳白,中期黄色,后期黄褐	有	100
孢子分离试验菌株	30	1~2	初期白色,后转乳白至淡黄	初期乳白,中后期淡黄	有	98
CK	23	2~5	初期乳白,中后期淡黄	初期乳白,中期黄色,后期黄褐	有	98

由表 1 可见,试管栽培均能出菇,且均有孢子弹射现象发生,因此出菇期间可进行菇体的组织分离与孢子分离,因菇体均在试管密闭空间,组织分

离与孢子分离不受环境污染菌影响,分离成功率高。

2.4 菌袋出菇表现

表 2 菌袋出菇

菌株	满袋时间/d	菇体性状	生物学效率/%
组织分离试验菌株	24	菇盖初期乳白,逐渐转至淡黄;菇柄初期乳白,后转由上至下乳白色渐变黄褐色	56
孢子分离试验菌株	30	菇盖初期乳白,逐渐转至淡黄;菇柄初期乳白,后转由上至下乳白色渐变淡黄色	45
CK	24	菇盖初期乳白,后转至淡黄;菇柄初期乳白,后转至淡黄,根部黄褐色	57

由表 2 可见,组织分离菌株与对照菌株在满袋时间、菇体性状与生物学效率上几乎无差别,但孢子分离菌株在满袋时间、生物学效率上与对照有明显差别,可能原因是孢子分离法为多孢自交,菌丝生长速度与产量方面均发生了退化。

3 讨论

野生金针菇种质资源丰富,为金针菇育种提供了良好的种质来源。但金针菇育种方法中最基本的组织分离与孢子分离,在实际操作中因菇体小菌肉薄,极易因操作不慎而在分离后引起真菌或细菌感染。孢子分离方法常规操作是在栽培室内收集适宜菇体,使其弹射孢子后再收集孢子,利用无菌水进行稀释后,在平板涂布接种。收集孢子时不可避免地自带栽培室空间散布的其它微生物,并且在稀释涂布等环节中,其它有害微生物(细菌、真菌)未去除净的机率大,极易引起分离失败。在选育适宜秸秆栽培的金针菇菌种时,常规方法为栽培种出

菇后采集性状优良的菇体进行孢子或组织分离,提取纯菌丝,扩繁后再以某种秸秆培养培养基栽培出菇,再进行多代的提纯过程,因栽培环境洁净度无法达到无菌的程度,在多代分离提纯过程中必然存在感染其它微生物的风险,降低分离成功率。

本研究采用试管内出菇,在组织分离与孢子分离时,无需常规分离的繁琐操作,被分离的组织体与孢子在试管内的洁净环境下几乎不与外界微生物接触,洁净度高,分离操作简单,成功率高。在实际应用时可根据需要,选取优质野生种质资源,利用此方法进行组织分离和孢子分离。本试验中进行孢子分离方法为多孢自交,尽管后代性状发生了退化,但在实际应用中也可用此方法收集各种性状优良的单核菌丝,以此作为亲本再进行各菌株之间的杂交,进而选育优良菌株。本试验的组织分离方法在培养料适应性驯化应用上,可选择性强,秸秆培养基用量少,占空间少,操作方便,可操作性强,成功率高。本

(下转第 67 页)