

清华大学学术专著

食用蕈菌生物技术及应用

刘祖同 罗信昌 编著



清华大学出版社

<http://www.tup.tsinghua.edu.cn>

107

清华大学学术专著

S646
L766

食用蕈菌生物技术及应用

刘祖同 罗信昌 编著

清华大学出版社

(京)新登字 158 号

内 容 简 介

《食用蕈菌生物技术及应用》是作者总结多年的研究工作经验、理论思维和科研成果,收集国内外最新的有关资料编撰而成。主要包括食用蕈菌基因工程技术、DNA 指纹技术(RFLP, RAPD, rDNA-ITS, PFGE)、原生质体技术(原生质体融合、原生质体单核化等)、酶工程技术、发酵工程技术及食用蕈菌多糖与提取技术等内容。

本书内容新颖,技术先进、适用,可供科研机构研究人员、大专院校生物系有关专业师生和研究生及广大食用蕈菌科研工作者和管理人员参考。

书 名: 食用蕈菌生物技术及应用

作 者: 刘祖同 罗信昌 编著

责任编辑: 陈善敏 罗健

出 版 者: 清华大学出版社(北京清华大学学研大厦, 邮编 100084)

<http://www.tup.tsinghua.edu.cn>

印 刷 者: 清华大学印刷厂

发 行 者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 787×1092 1/16 印张: 15.75 字数: 360 千字

版 次: 2002 年 9 月第 1 版 2002 年 9 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 7-302-04938-6/Q·15

印 数: 0001~4000

定 价: 38.00 元

作者简介

刘祖同

湖南醴陵人,1954年毕业于武汉大学生物学系,一直在高等院校及中国科学院从事教学与科研。1983年作为访问科学家在美国细胞科学中心工作两年,研究领域为微生物发酵工程、生产菌株的遗传育种,先后主持过国家自然科学基金及国际合作基金(Croucher Foundation)的科研项目,研究成果先后获国家发明奖、重大科研成果奖、高新技术产品一等奖及金奖等,均为第一获奖人,发表研究论文50余篇。与人合作撰写专著两本,出席国际会议十余次。选育的长链二元酸高产菌株、洛伐他汀菌株、L-乳酸菌株及植物生长素菌株等多已工业化,在国民经济中发挥作用。食用菌电融合杂交育种技术的研究在国内外领先。培养的研究生均已成为生物技术骨干。

现任清华大学生物科学与技术系教授、华侨大学兼职教授、多家生物技术公司的高级顾问、中华成功者研究会专家顾问团的高级顾问及世界生产率科联(WCPS)中国分部常务理事。

罗信昌

湖北省武汉市黄陂区人,1937年元月生。1963年华中农业大学植保系毕业,同年留校任教至今。曾分别于1985年,1994年以访问学者身份赴英国温室作物研究所(Glass House Crops Research Institute)和日本广岛大学从事应用真菌生物技术研究。出访过8个国家和地区进行学术交流。长期从事应用真菌生物技术的教学与科研工作。与他人合作,在国内率先开展食用蕈菌生物技术的研究工作。主持过农业部“七五”、“八五”农业生物技术食用菌子专题及多项国家自然科学基金项目研究。曾获部级科技进步二等奖(主要完成人)、三等奖3项(1项主持,2项为主要完成人),发表论著30余篇(部)。1993—2000年当选为世界蘑菇生物学和蘑菇产品协会(WSM BMP)委员。现任华中农业大学教授、博士生导师,中国食用菌协会副会长,中国菌物学会常委,湖北省科协委员,湖北省食用菌协会理事长,国际蘑菇科学协会(ISMS)亚洲科学委员会委员等职。

BRIEF INTRODUCTION OF CONTENTS

The Biotechnology and Application of Mushrooms has been edited according to authors' research work experience, theory thoughts and science research results for many years, and to recent references in the world. Main contents include gene engineering technique, DNA fingerprinting techniques (RFLP, RAPD, rDNA-ITS, PFGE), protoplast techniques (protoplast fusion, protoplast monocaryonization etc.), enzyme engineering techniques, fermentation engineering techniques and polysaccharides isolation techniques etc. of mushrooms. The contents are new, techniques are advanced and practical.

This book can be consulted by researchers in institutions, teachers, students and graduates in agricultural university and the department of biology at universities, scientific workers and officers of mushrooms.

前 言

食用蕈菌是惟一的在世界范围内被大量消费且市场走势一直看好的非光合作用植物性食品。它不仅以富含天然的蛋白质、氨基酸、维生素、多种矿质元素受到世人青睐,而且以其所含的生理活性物质——真菌多糖能增进人体健康,引起生物学家、药学家、化学家们的极大兴趣。由于它的生产依赖于农、林业有机废弃物质,因而可将这些废弃的有机物质分解转化成优质蛋白。这既消除环境污染营造良好的生态环境,实现零的排放(zero emission)又提供人类需要的食品,创造可观的经济效益和社会效益。所以,近年来我国食用蕈菌产业得以迅猛发展。

据有关资料统计,1996 年我国食用蕈菌的总产量为 250 万 t,1997 年达 400 万 t,1998 年达 435 万 t。约占世界总产量的 60%以上。按照目前发展速度,到 2010 年我国食用蕈菌总产量可望超过 600 万 t。成为世界上第一食用蕈菌生产大国。随着食用蕈菌产业的迅速发展,以及人们把菌类当作美味佳肴到保健食品的认识上的飞跃,消费者对栽培品种多样性、品种质量及产品深加工的要求越来越高,从而使得与之相适应的科学研究面临着新的挑战。20 世纪兴起的基因工程、DNA 指纹、酶工程、原生质体等高新技术正在渗透到食用蕈菌的各个学科的研究领域。为了加速这些新技术的应用,作者总结多年研究工作的经验、理论思维和科研成果,参考国内外最新的研究资料和科研成果,编著成《食用蕈菌生物技术与应用》。旨在推动我国食用蕈菌科技向更高、更深、更广的领域发展,起到抛砖引玉的作用。

本书力求理论结合实际。每项技术在理论指导下,论述技术原理、实验方法及实际应用,使读者读后既懂原理,又会操作应用,达到举一反三、拓宽思路之目的。

全书共 6 章 20 节。重点论述基因工程技术、DNA 指纹技术、原生质体技术、发酵工程技术、酶工程技术、食用蕈菌多糖及提取技术等食用蕈菌研究中的应用,其主要内容包括绪论(罗信昌教授撰写);基因工程技术(曾东方博士撰写),原生质体技术(刘祖同教授、罗信昌教授、王泽生、赵永昌、曾荣博士撰写),酶工程技术、食用蕈菌多糖及提取(陈福生博士撰写),发酵工程(张晓昱副教授撰写)。由于上述内容均为参编作者亲自参加或主持过的科学研究内容,使全书介绍更贴近实际,具有技术先进,方法切实可行的鲜明特点。

本书可供科研机构研究人员、大专院校有关专业师生、研究生及广大食用蕈菌科技工作者和管理人员参考。

本书介绍高新技术的应用,内容涉及面很广,由于作者水平有限,可能出现谬误之处,敬请广大读者批评指正。

在编写过程中,得到了我国菌物界许多老前辈和同行的支持和帮助,借本书出版之际谨向他们表示深切的谢意。

编 者
2001 年 9 月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 我国食用蕈菌生物多样性及种质资源的保藏和利用	1
1.1.1 我国食用蕈菌生物多样性	1
1.1.2 食用蕈菌资源保藏和利用	3
1.2 食用蕈菌新技术的研究与应用	7
1.2.1 原生质体技术与应用	7
1.2.2 基因工程研究进展	8
1.2.3 DNA 指纹技术与应用.....	9
1.3 食用蕈菌产业发展前景.....	12
1.3.1 食用蕈菌与植物再生资源的转化利用.....	12
1.3.2 食用蕈菌与人体健康.....	15
1.3.3 食用蕈菌与生物技术研究.....	17
主要参考文献	17
第 2 章 食用蕈菌基因工程与 DNA 指纹技术	20
2.1 食用蕈菌基因工程及其研究进展.....	20
2.1.1 食用蕈菌良种选育与基因工程的兴起.....	20
2.1.2 食用蕈菌基因工程研究.....	21
2.2 RFLP 技术及其应用	26
2.2.1 RFLP 原理	26
2.2.2 RFLP 研究技术	27
2.2.3 RFLP 在食用蕈菌研究中的应用	30
2.3 rDNA PCR 扩增技术及应用	36
2.3.1 PCR 原理	36
2.3.2 PCR 技术体系	37
2.3.3 rDNA PCR 在食用蕈菌中的应用	42
2.4 RAPD 技术及其应用	47
2.4.1 RAPD 原理	47
2.4.2 RAPD 技术介绍	47
2.4.3 RAPD 在食用蕈菌遗传研究中的应用	51
2.5 脉冲电泳(PFGE)技术与应用	60
2.5.1 脉冲电泳原理.....	60
2.5.2 脉冲电泳操作技术.....	61
2.5.3 脉冲电泳技术在食用蕈菌中的应用实例.....	62

主要参考文献	64
第3章 食用蕈菌原生质体技术	66
3.1 食用蕈菌细胞壁结构及脱壁酶	66
3.2 原生质体的分离与再生	69
3.2.1 原生质体的分离	69
3.2.2 原生质体的再生	71
3.3 原生质体融合	72
3.3.1 原生质体融合的意义	72
3.3.2 原生质体融合技术的发展简况	73
3.3.3 选择食用蕈菌融合亲本应注意的几个问题	75
3.3.4 融合亲本的标记方法	77
3.3.5 原生质体融合的方法	80
3.4 食用蕈菌原生质体融合子鉴定及遗传分析	92
3.4.1 原生质体融合子鉴定	92
3.4.2 原生质体融合子的遗传分析——减数分裂产物 分析(四分体分析)	95
3.5 原生质体技术在几种常见食用蕈菌中的应用	96
3.5.1 双孢蘑菇原生质体融合	96
3.5.2 香菇原生质体融合	102
3.5.3 木耳属种间原生质体融合	106
3.5.4 侧耳 <i>Pleurotus spp.</i> 原生质体融合	110
主要参考文献	121
第4章 酶与食用蕈菌	125
4.1 酶学的概述	125
4.1.1 酶的认识简史	125
4.1.2 酶是生物催化剂	127
4.1.3 酶的分类和命名	128
4.2 酶的分离与纯化	129
4.2.1 细胞的破碎	129
4.2.2 酶的初步纯化和浓缩	133
4.2.3 酶的进一步分离纯化	136
4.2.4 酶纯度的检测	142
4.2.5 木聚糖酶的分离纯化过程	143
4.2.6 膜分离技术在酶纯化中的应用	146
4.3 酶活力的测定	149
4.3.1 酶活的表示方法	149
4.3.2 酶活的单位	150

4.3.3	酶的比活力	150
4.3.4	影响酶活的因素	150
4.4	酶与食用蕈菌	153
4.4.1	酶与食用蕈菌的生长发育	153
4.4.2	同工酶与食用蕈菌的分类鉴定和育种	158
4.4.3	酶与食用蕈菌的保鲜和加工	161
	主要参考文献	163
第5章	食用蕈菌发酵工程	166
5.1	食用蕈菌发酵工程概论	166
5.1.1	食用蕈菌发酵工程发展过程	166
5.1.2	发酵工程在生物工程中所处的地位	167
5.1.3	发酵工程的基本内容	167
5.1.4	发酵工程的研究方法	168
5.2	常见发酵食用蕈菌生物学特性	168
5.2.1	常见发酵食用蕈菌	168
5.2.2	常见发酵食用蕈菌的营养需求	169
5.2.3	常见发酵食用蕈菌的环境要素	172
5.2.4	常见发酵食用蕈菌的代谢特征	173
5.2.5	常见发酵食用蕈菌的菌种选育	179
5.3	食用蕈菌深层发酵动力学	181
5.3.1	细胞生长动力学	181
5.3.2	基质消耗动力学	186
5.3.3	产物生成动力学	187
5.3.4	灭菌动力学	188
5.4	食用蕈菌发酵生产工业化反应器	190
5.4.1	反应器类型及结构特征	190
5.4.2	影响发酵介质的流变因素	196
5.4.3	氧在发酵液中的传递及消耗	196
5.4.4	反应器中的热量传递	199
5.5	食用蕈菌深层发酵过程	200
5.5.1	深层发酵生产工艺及工艺条件	200
5.5.2	培养基灭菌的工程设计	202
5.5.3	空气灭菌	203
5.5.4	发酵过程的监控	204
	主要参考文献	205
第6章	食用蕈菌多糖	207
6.1	食用蕈菌子实体多糖的提取方法	207

6.1.1	子实体的选择和粉碎	208
6.1.2	脂肪的去除	208
6.1.3	子实体多糖的浸提	208
6.1.4	多糖的沉淀	209
6.1.5	粗多糖的脱色和蛋白质去除	210
6.1.6	多糖的进一步分离纯化	210
6.1.7	多糖含量的测定、纯度的鉴定和分子量的测定	210
6.1.8	多糖结构分析	211
6.2	食用蕈菌液体发酵物中多糖的提取	212
6.2.1	食用蕈菌子实体多糖和液体发酵菌丝体多糖的比较	212
6.2.2	食用蕈菌液体发酵的基本知识	213
6.2.3	菌丝体中多糖的提取	215
6.2.4	发酵液中多糖的提取	215
6.2.5	木耳液体发酵及其胞外多糖的分离提取	215
6.3	食用蕈菌多糖的动物试验	217
6.3.1	实验动物的基本知识	218
6.3.2	动物实验的基本技术和方法	218
6.3.3	食用蕈菌多糖的抗疲劳作用	223
6.4	食用蕈菌多糖研究中值得注意的几个问题	225
6.4.1	食用蕈菌多糖的多样性	225
6.4.2	食用蕈菌多糖的改造	226
6.4.3	食用蕈菌多糖的药理作用	226
6.4.4	食用蕈菌的复合多糖	227
	主要参考文献	227
	附录	230
	附录 1	230
	一、农作物秸秆及副产品化学成分(%)	230
	二、农副产品主要矿质元素含量(%)	231
	三、各种培养料的碳氮比(C/N)	232
	附录 2 元素原子量表	232
	附录 3 常用酸、碱、盐溶液及指示剂的配制	234
	附录 4 常用缓冲液的配制	237
	附录 5 离心机转数与相对离心力的换算	239

第1章 绪 论

1.1 我国食用蕈菌生物多样性及种质资源的保藏和利用

生物多样性(biodiversity)是地球上的生命经过几十亿年发展进化的结果。

生物多样性既是人类生活的一种环境,又是人类赖以生存的物质基础。什么是生物多样性? Hawksworth (1995 年)将生物多样性简述为地球上生物变异的程度。目前一般将生物多样性理解为生物物种的多样性、遗传(基因)多样性、生态多样性和景观多样性 4 个层次的综合表述^[1]。在多样性中,物种多样性是一个主要的环节和基础。

由于世界人口的急剧增加,伴随人类面临着粮食危机,给自然资源施加极大的压力。修建高速公路、厂房,开垦自然土地,建房、采矿等人类活动造成生物物种数量不断减少,有的甚至灭绝。一定范围的物种群居消灭,导致物种资源丢失,使种内变异数量降低,从而进行物种遗传改良的可能性减小(Miles et al. 1986 年)^[2]。由此可见,生物多样性的研究是极其重要的,它与人类的生存息息相关。食用蕈菌生物多样性是生物多样性的一个方面,同样与人类关系密切。查清物种家底,科学保藏和合理利用食用蕈菌物种资源,是人类进入生物学世纪——21 世纪的一项艰巨而光荣的科研任务。

1.1.1 我国食用蕈菌生物多样性

1. 食用蕈菌物种多样性

真菌是相当大的生物类群,那么,世界上存在的菌类到底有多少,过去并没有较精确的评估。Hawksworth(1991 年)基于对一个地区(如英国)的维管束植物与菌类总数的比例为 1:6 进行推测,由世界上维管束植物如果有 27 万种,推估真菌约有 150 万种。而已知的种类约 7 万种,不到总数的 5%。这项估计已广为生物学者视为合理,并被普遍的使用^[1]。根据这一科学方法估计,中国已知维管束植物有 3 万种左右,按 1:6 推算,中国菌物估计种数应有 18 万种左右。其中大型真菌(蕈菌)约 2.7 万种。大型真菌中,食用蕈菌大约有 1.35 万种,该数据是通过大型真菌种群总数的 50%是可以食用的结论评估得到的^[1,3]。

蕈菌,英文为 mushroom,此名词广义上专指那些具有显著子实体并可资鉴别的大型真菌,狭义则指蕈菌的伞形子实体,俗称为“蘑菇”。可以食用的大型真菌称为食用蕈菌(edible mushroom)^[4]。我国地理复杂,植物种类繁多,气候多样,被列为世界上 12 个具高度生物多样性的国家和地区之一。同时是食用蕈菌良好的繁衍和滋生地,蕴藏着极其丰富的食用蕈菌物种资源。从 1950 年至 1998 年识别鉴定的食用蕈菌种类

见表 1.1。^[5,6]

表 1.1 1950 年—1998 年记述食用蕈菌种类^{*}

年 份	种 数	年 份	种 数
1950—1960 年	100	1987 年	655
1960—1970 年	250	1989 年	720
1970—1980 年	300	1994 年	858
1980 年	340	1998 年	871
1984 年	360		

^{*} 此表根据卯皖岚 1990 年,1994 年,1998 年报导的有关资料整理。

我国已记述蕈菌 871 种,分属于 53 科 16 目 143 属。估计全国目前已知近 1 000 种,其中,90 多种可人工栽培或菌丝体发酵培养^[7]。

2. 我国部分食用蕈菌遗传多样性评估

我国是鉴别、食用、栽培食用蕈菌最早的国家之一。也是香菇、黑木耳、草菇、银耳、金针菇、茯苓、竹荪等人工栽培的发源地。由于这些食用蕈菌经历漫长的繁衍进化,不仅在表型上发生变化,而且 DNA 的重复顺序也积累了许多沉默的变异,呈现丰富的遗传多样性。

香菇(*Lentinula edodes*)是古今中外极为著名的食用菌之一。由于我国受亚热带海洋性气候的影响及处于合适的地理位置,孕育着丰富的基因资源。香菇属双因子控制,四极性异宗结合担子菌。自然界中遗传变异相当丰富。王镭等,1997 年对来源于全国各地的 80 个香菇菌株进行农艺、生态和生理生化特性研究,并把各菌株表现出的差异依次编加代码,建立了一个统一的、标准的检测和分析特征的方法。每一菌株的数据和它们的代码特征经简单处理后输入计算机,对香菇的遗传特性通过差异分析和聚类分析进行评估,建立了香菇的资源种质库。80 个菌株可分为不同的居群。各菌株间遗传距离存在差异,形成遗传多样性^[8]。

DNA 的限制性酶切片段长度多态性 RFLP (restriction fragment length polymorphism)可有效地用于食用蕈菌的种内及居群水平的研究,将供试菌株的 DNA 经酶切、电泳、Southern 杂交,会产生不同长度的带型,反映出物种 DNA 结构的差异。1994 年李英波等应用 RFLP 对来自全国各地野生或半野生 32 株香菇菌株的总 DNA 进行多态性分析,结果表明,被分析的 32 个香菇菌株的 DNA 限制性片段存在多态性。通过 MINTS 软件进行平均连锁聚类(UPGMA)得到系统树,32 个香菇菌株依据菌株间的相似度被分为 4 个不同的居群^[9]。说明香菇自然居群在长期的繁衍过程中,发生了许多遗传变异并积累了丰富的基因资源。

我国食用和栽培木耳(*Auricularia auricula*)有悠久的历史。据记载,人工栽培大约始于 7 世纪。据娄隆后等人 1992 年对 19 个省、市、自治区的调查,发现我国现有木耳属(*Auricularia*)内的 14 个种(表 1.2)。^[10]

表 1.2 中国木耳属的 14 个种类(姜隆后等,1992 年)

种 类	出现率
黑木耳(<i>Auricularia auricula</i>)	AAAAA
毛木耳(<i>A. polytricha</i> (Mont))	AAAAA
皱木耳(<i>A. delicata</i> (Fr.))	AAA
肠膜状木耳(<i>A. mesenterica</i>)	AAA
褐毡木耳(<i>A. rugosissima</i>)	AAA
褐黄木耳(<i>A. fuscossuccinea</i>)	AAAA
短硬毛木耳(<i>A. hispida</i>)	A
华丽木耳(<i>A. ornata</i>)	A
薄肉木耳(<i>A. temuis</i>)	AAA
丰富木耳(<i>A. pletata</i>)	AA
角质木耳(<i>A. cornes</i>)	AA
西沙木耳(<i>A. xishaensis</i>)	A
网脉木耳(<i>A. relicutata</i>)	A
象牙白木耳(<i>A. ehurnea</i>)	A

其中黑木耳(*A. auricula*)和毛木耳(*A. polytricha*)在我国分布最为广泛,均属于二极性单因子交配系统异宗结合担子菌^[11]。木耳种自然居群经过长期的进化和演变也积累了丰富的遗传资源。

同工酶作为一类蛋白质,是由不同的等位基因或独立的遗传位点所编码。由于其编码基因在核苷酸序列上的差异导致氨基酸种类的差异,同工酶电泳图谱被广泛用于真菌的系统发育及遗传变异分析研究中。边银丙等 1997 年对 10 个木耳菌株培养 72d 的菌丝体进行酯酶同工酶分析,可检测到 44 条酶带,各个菌株分别具有 3~6 条酶带。10 个菌株具 8 种酶谱类型。这表明,酶基因位点呈现多样性^[12]。应用 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 随机扩增多态性 DNA 技术对木耳属 8 个种 25 个菌株基因组 DNA 进行随机扩增和系统发育关系研究,随机扩增出 287 条多态性 DNA 带。相似系数分析表明,供试木耳属 25 个菌株间相似系数范围为 0.610~0.951。按 75% 相似水平可将供试木耳属 8 个种 25 个菌株分为四大类。揭示了它们间的遗传距离和亲缘关系^[13]。

食用蕈菌——草菇(*Volvariella volvacea*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)、猴头菇(*Hericium erinaceus*)等种间、种内双核体(dicaryon)或单核体(monocaryon)经 RAPD 随机扩增都出现 DNA 多态性。说明食用蕈菌经过长期的遗传变异积累了丰富的遗传资源。

食用蕈菌遗传多样性增加了物种遗传改良和创造新物种的可能性,是食用蕈菌产业持续发展的潜在因素和希望。

1.1.2 食用蕈菌资源保藏和利用

随着经济建设的发展,经济开发区和旅游景点的不断增多和扩大,建房、修路等使得

自然资源和原始土地不断减少,生物种群(包括食用蕈菌在内)也在随之不断地减少。有的物种甚至濒临灭绝,导致种质资源的丢失。科学地采集和保藏及开发利用食用蕈菌种质资源,不仅可以有效地保护食用蕈菌生物多样性,而且会进一步促进生物多样性的研究和发展。

1. 食用蕈菌种质资源保藏

我国已记述的 871 种食用蕈菌仅占我国估计数的 6%。可见,我们对其种质资源知之甚少。除加大力度在全国范围内进行食用蕈菌种质资源的普查和鉴定外,对已记载和描述的种类妥善和科学保存,才能真正做到保护种质资源,使其免遭丢失。种质资源的研究工作应重在以下几方面:

(1) 基因资源的普查和鉴定

已报道的 871 种食用蕈菌仅占我国估计数 1.35 万种的 6%,这说明我国丰富的食用蕈菌资源远远未被查清。一旦栖息地的生态环境遇到破坏,就会有不少未被人们认识的基因资源面临着从地球上消失的危险。这是一个在生物多样性研究中不容忽视的问题。所以,在我国进行全面的蕈菌基因资源普查、鉴定和保藏的任务十分紧迫和繁重。

(2) 基因资源的采集和保藏

生物多样性的丢失危及人类的生存,并将改变人类的生活方式。一些科学家认为,生物物种的数量正在逐步减少,有的甚至灭绝。食用蕈菌与其它生物一样,也正处在种质资源减少的危险中。从自然条件下采集、分离蕈菌获得菌种培养物并保藏起来,可使其基因资源免遭丢失。分离物应采用各种技术保存,以使其生长速度保持在最低的水平,如用液体石蜡油或木粒低温保藏或液氮保藏等。对于特种食用蕈菌的遗传资源还应采取基因片保藏。

(3) 建立基因文库

为对现有的野生种质资源进行保存,特别是一些特种食用蕈菌遗传资源建立基因文库进行保藏是一种可行的方法。每一个物种就是一个独特的基因库。一种蕈菌的基因组在确定 DNA 的特征以后,DNA 片段通过分离的包装体构建生物体遗传信息,以文库的形式保存在冰箱内的小管中,随时可进行鉴定和操作。在蕈菌的遗传工程操作中,建立基因文库是必需的步骤,也是基因资源保存最科学的方法(Elliott, 1988 年)^[14]。

(4) 建立一个检测中心实验室和种质库

建立一个测试中心实验室,通过交配型试验、同工酶检测、RAPD 分析等技术评估全国收藏的蕈菌基因资源,在全国范围内协调和交换,以便更合理地发掘和利用基因资源。

2. 食用蕈菌基因资源的开发和利用

在已有描述和记载的 871 种食用蕈菌中,约有 86 种食用蕈菌成功地进行了人工驯化栽培,进行商业性栽培的有双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)、香菇(*Lentinula edodes*)、平菇(*Pleurotus spp.*)、草菇(*Volvariella volvacea*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)、银耳(*tremella fuciiformis*)、黑木耳(*Auricularia auricula*)、毛木耳(*A. polytricha*)、猴头菇(*Hericium erinaceus*)、骨菇(*Pholiota nameko*)、竹荪(*Dictyophora spp.*)等。

除此以外,各种新开发或新引进的珍稀食用蕈菌如真姬菇(*Hypsizigus marmoreas*)、姬松茸(*Agaricus blazei*)、杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)、阿魏蘑(*P. ferulae*)、茶薪菇(*Agrocybe chaxinggu*)、杨树菇(*A. aegerita*)、大球盖菇(*Stropharia rugosoannulata*)已普遍引起各地菇农的重视,成为继常规品种后,最有增产潜力的栽培品种。据黄年来 1999 年统计,我国目前人工栽培的食用蕈菌已超过 40 多种(参见表 1.3)^[15]。食用蕈菌的栽培是以废弃的农作物秸秆、种壳及木材加工剩余等物为栽培原料。栽培后的基质可作为动物饲料和作物肥料再利用。所以通过食用蕈菌的生产不仅可以获得廉价的食物蛋白,而且维护了良好的生态环境。

表 1.3 我国人工栽培的食用菌(统计至 1999 年 12 月)(黄年来,2000 年)

中文名	商 品 名	学 名
1 双孢蘑菇	白蘑菇、双孢菇、洋菇	<i>Agaricus bisporus</i>
2 双环蘑菇	大肥菇、高温蘑菇、美味蘑菇、高温洋菇	<i>Agaricus bitorquis</i> (= <i>Agaricus edulis</i>)
3 金针菇	冬菇、金钱菇、白金针菇、黄金针菇、金 针蘑	<i>Flammulina velutipes</i>
4 香菇	花香菇、厚菇、薄菇、香信	<i>Lentinula edodes</i>
5 虎奶菇	虎奶菌、南洋茯苓	<i>Pleurotus tuber-regium</i> (= <i>Lentinus tuber-regium</i>)
6 大斗菇	巨大香菇	<i>Lentinus giganteus</i>
7 草菇	杆菇、麻菇	<i>Volvariella volvacea</i>
银丝草菇	树生草菇、丝盖苞脚菇	<i>Volvariella bombycin</i>
8 巴西蘑菇	姬松茸、巴西菇	<i>Agaricus blazei</i>
9 皱环球盖菇	大球盖菇	<i>Stropharia rugosoannulata</i>
10 平菇	侧耳、蠓菇、北风菌、秀珍菇、小平菇	<i>Pleurotus ostreatus</i>
11 美味侧耳	紫孢平菇	<i>Pleurotus sapidus</i>
12 凤尾菇	印度平菇	<i>Pleurotus plumonarius</i> (历 来 误 为 <i>Pleuotus sajor-caju</i>)
13 亚侧耳	黄蘑、元蘑、晚生北风菌	<i>Panellus serotius</i>
14 榆黄蘑	金顶侧耳	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>
15 红平菇		<i>Pleurotus djamor</i>
16 黄白侧耳	姬菇、小平菇	<i>Pleurotus comucopiae</i>
17 刺芹侧耳	杏鲍菇、刺芹菇、干贝菇	<i>Pleurotus eryngii</i>
18 阿魏侧耳	阿魏蘑(含白灵菇)	<i>Pleurotus ferulae</i> , <i>Pleurotus ferulae</i> <i>var. nebrodensis</i>
19 鲍鱼菇		<i>Pleurotus abalonus</i>
20 盖囊侧耳	盖囊菇、高温平菇、夏季鲍鱼菇	<i>Pleurotus cystidiosus</i>
21 滑菇	滑子蘑、真珠菇、珍珠菇	<i>Pholiota nameko</i>
22 黄伞	金柳菇、黄柳菇、柳蘑、多脂鳞伞	<i>Pholita adiposa</i>
23 长根菇	奥德蘑、水鸡枞	<i>Oudemansiella radicata</i>
24 鳞长根菇		<i>Oudemansiella radicata var. furfuracea</i>
25 真姬菇	海鲜菇、蟹味菇、松茸菇、灵芝菇、玉蕈、 斑玉蕈、胶玉蘑	<i>Hypsizigus marmoreus</i>
26 杨树菇	柳松菇、柳环菌、柱状田头菇	<i>Arocybe aegerita</i> (= <i>Agrocybe cylind- racea</i>)

续表

中文名	商品名	学名
27 茶新菇	茶树菇	<i>Agrocybe chaxinggu</i>
28 毛头鬼伞	鸡腿蘑	<i>Coprinus comatus</i>
29 小孢毛头鬼伞	白鸡腿蘑	<i>Coprinus ovatus</i>
30 高大环柄菇	棉花菇	<i>Macrolepiota procera</i>
31 巨大口蘑	金福菇、洛巴依口蘑、仁王口蘑(日本名)	<i>Tricholoma giganteum</i>
32 灰离褶伞	松毛菌	<i>Lyophyllum cinerascens</i>
33 紫丁香蘑	裸口蘑	<i>Lepista nuda</i>
34 黑木耳	细木耳、牛皮木耳、黄背木耳、白背木耳	<i>Auricularia auricula</i>
35 毛木耳	斤耳、黄褐木耳	<i>Auricularia polytricha</i>
36 琥珀褐木耳	砂木耳、网纹木耳	<i>Auricularia fuscusuccenia</i>
37 皱木耳	白木耳、雪耳、通江银耳	<i>Auricularia delicata</i>
38 银耳	云南黄木耳	<i>Tremella fuciiformis</i>
39 金耳	血耳、红耳	<i>Tremellx aurantialba</i>
40 血耳	榆蘑	<i>Tremella sanguinea</i>
41 榆耳	舞茸、栗蘑、云蕈	<i>Gloeostereum incarnatum</i>
42 灰树花	牛排菌、肝脏菌	<i>Grifala frondsa</i>
43 牛舌菌	猴头菇	<i>Fistulina hepatica</i>
44 猴头菌	菜花菇	<i>Hericium erinaceus</i>
45 分枝猴头菌	竹荪	<i>Hericium ramosum</i>
46 长裙竹荪	竹荪	<i>Dictyophora indusiata</i>
47 短裙竹荪	竹荪	<i>Dictyophora duplicata</i>
48 棘托竹荪	竹荪	<i>Dictyophora echinovolvata</i>
49 红托竹荪	支苓、皖苓、鄂苓、闽苓、松茯苓	<i>Dictyophora rubrovolvata</i>
50 茯苓		<i>Wolfiporia cocos (= poria cocos)</i>

最近几年,我国的蕈菌产业迅猛发展,产量和产值稳步上升,在产品质量逐渐上升的同时,驯化栽培食用蕈菌的种类也越来越多。据统计,我国 1986 年食用蕈菌的总产量为 58.5 万 t,占世界总产量的 26.8%。1990 年,我国食用蕈菌的年产量首次超过 100 万 t。此后,我国食用蕈菌的年产量的增长率稳步在 18%~20%。至 1994 年,食用蕈菌的年产量已达到 264.1 万 t,占世界总产量(490.9 万 t)的 53.8%。据不完全统计,1996 年、1997 年,我国食用蕈菌的总产量已分别达到 350 万 t 和 400 万 t。1998 年达 435 万 t。按目前的发展速度,到 2010 年,我国食用蕈菌的总产量可望超过 600 万 t^[15]。目前我国有约 200 个菌种生产厂家,1 000 万农民从事食用蕈菌或相关行业生产,有近 100 家科研单位和厂家研制生产出了 100 多种蕈菌产品。中国是食用蕈菌生产的大国,蕈菌的快速发展必将对其他国家,尤其是发展中国家,产生深远的影响。

食用蕈菌既是营养丰富的美味食品,又是具一定食疗作用的保健品。科学实验证明,食用蕈菌中有不少种类可以通过发酵生产有药用价值的次生代谢产物,开发利用的潜力很大。近年来,食用蕈菌多糖研究进展迅速。真菌多糖的作用主要是活化免疫系统和干扰素的产生,以此提高人体的免疫能力。目前市场上开发的产品主要有:“三九胃泰”、“美

菇竹荪液”、“得宝-抗癌专用营养液”、“香菇多糖片”、“中国香菇可乐”以及“福寿仙”、“小精灵”等滋补、保健药品 20~30 种。这些开发产品问世只有几年,已经风靡国内外市场。蕈菌资源的开发利用正由子实体的直接利用,深化到从有机体提取对人类健康有益的代谢产物。随着现代科学技术的发展及现代分析技术的广泛应用,在明确人类所需要的目标后,有针对性地进行生物特定组分及其基因的开发,必将把蕈菌资源的开发利用带进一个崭新的阶段,为增进人类健康水平作出更大的贡献!

1.2 食用蕈菌新技术的研究与应用

由于人口急剧膨胀、资源环境的日益恶化,粮食和能源的供应将会紧张,世界农业面临着前所未有的巨大压力,人们把解决世界粮食问题的希望寄托于一场新的农业科技革命。食用蕈菌产业是大农业的一个组成部分,自 1973 年能源危机后,唤醒了人们对农业、工业废弃物利用的重视,大规模利用农作物秸秆、棉籽壳、木屑及工业废料等废弃物来栽培食用蕈菌,已被认为是通过生物作用将木质纤维素转化为人类优质蛋白的一条重要途径。也是解决人类面临食物短缺、环境污染和健康质量下降的有效途径。特别是在发展中国家更有其重要的意义。因此,世界各国政府对食用蕈菌的开发和利用相当重视,也引起了科学家们的广泛兴趣。以生物技术和信息技术为主体的现代高新技术大量注入农业并加速应用,对农业产生了广泛而深刻的影响,推动着农业和农业科技向更高、更深、更广的领域发展。20 世纪兴起的原生质体技术、基因工程技术、DNA 指纹技术、酶工程技术、信息技术等高新技术很快地渗透到食用蕈菌等各个学科领域并被广泛采用,展示了美好的发展前景。

1.2.1 原生质体技术与应用

食用蕈菌菌丝、孢子细胞的细胞壁在酶的作用下,消解后形成球体即原生质体(protoplast)。原生质体虽然失去了原有细胞壁的形态,变成球体,但是它依然具有原生质膜和整体基因组,是一个具有生理功能的单位。原生质体技术如原生质体融合及原生质体单核化,在食用蕈菌育种中具有明显的开拓性,受到科学家们的广泛关注。在实际的研究中也取得了一定的成效。

1. 原生质体融合

原生质体融合(protoplast fusion)是指通过脱壁后的不同遗传类型的原生质体,在融合剂的诱导下进行融合(或通过电场诱导原生质体融合),最终达到部分或整套基因组(核基因、线粒体基因及胞质基因)的交换与重组,产生出新的品种和类型。也就是说原生质体融合育种技术是一种不通过有性生活史(sexual cycle)而达到遗传重组或有性杂交的育种手段。原生质体融合育种技术同基因工程——重组 DNA 技术相比,其技术难度较小,所需设备简单,不需要大量的药品和价格昂贵的仪器,因此,原生质体融合技术是现代生物工程中最重要遗传操作技术之一。它既有综合不同食用菌遗传信息的重组作用,又有剖析基因组基因、转移外源基因的分析作用。^[17]