

分类号\_\_\_\_\_

密 级\_\_\_\_\_

UDC\_\_\_\_\_

单位代码 10435\_\_\_\_\_

青岛农业大学

# 硕士学位论文

利用 ARTP 诱变技术选育工厂化生产真姬菇优良品种

Breeding of Fine Varieties of Factory Production of

*Hypsizigus marmoreus* by ARTP Mutagenesis

姓 名：\_\_\_\_\_高杰\_\_\_\_\_

指导教师：\_\_\_\_\_郭立忠 教授\_\_\_\_\_

第二导师：\_\_\_\_\_高霞 高级农艺师\_\_\_\_\_

学位类别：\_\_\_\_\_工程硕士\_\_\_\_\_

专业领域：\_\_\_\_\_生物工程\_\_\_\_\_

中国·青岛  
二〇二一年六月

*Qingdao Agricultural University*

The Thesis of Professional Master

Breeding of Fine Varieties of Factory  
Production of *Hypsizigus marmoreus* by  
ARTP Mutagenesis

Graduate with Professional Master Degree:

**Gao Jie**

Mentor: Guo Lizhong

Second Mentor: Gao Xia

Type of Professional Degree: **Master of Engineering**

Academic field: **Bioengineering**

Qingdao, China

June, 2021

# 独创性声明

本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得青岛农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的人员对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间：            年    月    日

# 关于论文使用授权的说明

本人完全了解青岛农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意青岛农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

研究生签名：

时间：            年    月    日

导师签名：

时间：            年    月    日

# 利用 ARTP 诱变技术选育工厂化生产真姬菇优良品种

## 摘 要

真姬菇 (*Hypsizygus marmoreus*) 在分类学上隶属于担子菌门、伞菌纲、伞菌目、离褶伞科、玉蕈属。其子实体营养丰富, 氨基酸种类齐全, 包括 8 种人体必需氨基酸, 还含有多糖、维生素等生物活性物质。目前我国真姬菇产量位列全球第一, 并已实现了工厂化、自动化生产。真姬菇作为我国主要工厂化栽培品种之一, 近年来深受消费者的青睐, 真姬菇产业也迅速发展起来, 但由于真姬菇工厂化生产的菌种自主率低, 目前主要的生产品种大都来自于日本, 我国缺乏具有自主知识产权的真姬菇优良种质资源, 这阻碍了我国真姬菇工厂化产业的发展。真姬菇菌种在传代和保藏的过程中容易出现退化现象, 造成大规模的减产, 因而真姬菇生产企业需定期高价向国外购买菌种, 增大了投资风险及成本。

目前我国食用菌育种方法主要有人工选择育种、杂交育种、诱变育种、融合育种及基因工程育种等。其中常压室温等离子体 (ARTP) 诱变育种有着操作简便、过程无毒害、成本低、突变率高等一系列的优点, 逐渐发展成为食用菌育种的有效手段。

本研究利用 ARTP 诱变育种手段获得高产量的真姬菇诱变株并对其进行特异性、一致性和稳定性 (DUS) 测试及分析, 主要研究成果如下:

(1) 通过条件优化, 成功建立了真姬菇原生质体制备与再生体系, 最优条件为取打孔接种于 25 °C 摇床培养 4 d 的液体真姬菇菌球, 选用广东微生物研究所的溶壁酶, 酶液浓度为 15 mg/mL, 按照酶液与菌丝为 10:1 的比例进行酶解, 于 30 °C 摇床酶解 2.5 h, 随后过滤、清洗、计数并再生。经该体系, 每 1 g 菌丝酶解后可得到  $10^8$  数量级的原生质体, 再生率可达 2.46%, 这为后续诱变奠定基础。

(2) 成功建立了真姬菇原生质体 ARTP 诱变体系, 在功率为 130 W, 气量为 12.00 sLM 的条件下, 诱变 40 s、50 s 时致死率分别为 80.37%、87.50%, 选定这两个诱变时间对真姬菇原生质体进行诱变, 获得诱变后的蟹味菇单菌落 121 个、白玉菇单菌落 272 个。根据菌丝性状及与出发菌株的拮抗情况, 对所有诱变菌株进行 4 轮筛选, 最终筛选出菌丝性状优良的蟹味菇 8 株、白玉菇 4 株。

(3) 对初步选育出的 12 株真姬菇诱变株及 2 株真姬菇出发菌株进行栽培试验, 并完成 DUS 测试及数据分析。共测试 28 个性状, 其中菌丝性状 7 个, 子实体群体性状 5 个、菌盖性状 9 个、菌褶性状 3 个、菌柄性状 4 个。在所有性状中包含数量性状 11 个, 对其进行定级。利用非加权组平均法 (UPGMA) 对 14 株真姬菇进行相似性分析和聚类

分析。结果显示，蟹味菇出发菌株与 XWG-1、2 更为相似，XWG-8 产量高于出发菌株 3.87%，BYG-3 与白玉菇相似性最低，BYG-1 产量高于出发菌株 3.05%。

本研究成功建立了一套有效的真姬菇育种和筛选体系，并依靠该体系获得产量高于出发菌株的诱变株 3 株。

**关键词：**工厂化；真姬菇；ARTP；育种；DUS 测试

# Breeding of Fine Varieties of Factory Production of *Hypsizygus marmoreus* by ARTP Mutagenesis

## Abstract

*Hypsizygus marmoreus* belongs to Basidiomycota, Agaricomycetes, Agaricomycetes, Agaricaceae, and Agaricaceae in taxonomy. The fruit body is nutritious and has a complete range of amino acids, including 8 kinds of essential amino acids for the human body. In addition, it also contains a variety of polysaccharides, vitamins and other biologically active substances. At present, the output of *H.marmoreus* in China ranks first in the world, and it has realized factory and automated production. As one of the main factory cultivated varieties in China, *H.marmoreus* is favored by consumers in recent years, and the *H.marmoreus* has also developed rapidly. However, due to the low independent rate of strains in the industrial production, most of the main production varieties are from Japan at present. The lack of good germplasm resources with independent intellectual property rights in China hinders the development of the factory industry of *H.marmoreus*. In the process of passage and preservation, the strain of *H.marmoreus* is prone to degradation, resulting in a large-scale reduction in production. Therefore, the production enterprises of *H.marmoreus* need to purchase strains from abroad at a high price on a regular basis, which increases investment risks and costs.

At present, the breeding methods of edible fungi in China mainly include artificial selection breeding, cross breeding, mutation breeding, fusion breeding and genetic engineering breeding. Among them, Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis breeding has a series of advantages, such as simple operation, non-toxic process, low cost, and high mutation rate. It has gradually developed into an effective means of edible fungus breeding.

In this study, ARTP mutagenesis breeding method was used to obtain high-yield mutants of *H.marmoreus*, and Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) test and analysis were conducted on them. The main research results are as follows:

(1) A system for the preparation and regeneration of the protoplasts of *H.marmoreus* was successfully established, by optimizing the conditions. The optimal conditions for the preparation and regeneration of the protoplasts of *H.marmoreus* were as follows: the mycelium of *H.marmoreus* was inoculated in a shaker at 25 °C for 4 days. The liquid *H.marmoreus* mycelium is enzymatically hydrolyzed according to the ratio

of enzyme solution and hyphae of 10:1. The lysozyme from Guangdong Institute of Microbiology was selected, and the concentration of enzyme solution is 15 mg/mL. Enzymatic hydrolysis in a shaker at 30 °C for 2.5h, then filter, clean, count and regenerate. Through this system,  $10^8$  orders of protoplasts could be obtained per 1 g mycelium after enzymatic hydrolysis, and the regeneration rate could reach 2.46%, which laid the foundation for subsequent mutation.

(2) The ARTP mutagenesis system of the protoplasts of *H.marmoreus* was successfully established. Under the conditions of 130 W power and 12.00 sLM gas, the lethality rate was 80.37% and 87.50% at 40 s and 50 s, respectively. During these two mutagenesis times, the protoplasts of *H.marmoreus* were mutagenized, and 121 single colonies of gray *H.marmoreus* and 272 single colonies of white *H.marmoreus* were obtained. According to the characteristics of mycelial and the antagonism with the original species, 4 rounds of screening were performed on all the mutagenic strains. Finally 8 gray *H.marmoreus* and 4 white *H.marmoreus* with excellent mycelial characteristics were screened.

(3)The cultivation test of 12 mutants of *H.marmoreus* edulis and 2 original species of *H.marmoreus* were carried out, and the DUS test and data analysis were completed. A total of 28 traits were tested, including 7 hyphal traits, 5 fruit body population traits, 9 cap traits, 3 gill traits and 4 stipe traits. There are 11 quantitative traits in all traits, which are graded. The Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) method was used to analyze the similarity and cluster analysis of 14 strains of *H.marmoreus*. The results showed that the original species of gray *H.marmoreus* were more similar to XWG-1 and 2, the yield of XWG-8 was 3.87% higher than that of the original species. The similarity between BYG-3 and the original white *H.marmoreus* was the lowest, and the yield of BYG-1 was 3.05% higher than the original species.

In this study, an effective breeding and screening system of *H.marmoreus* was successfully established, and three mutants strains with high yield than the original species were obtained by this system.

**Key word:** Factory; *H.marmoreus*; ARTP; Breeding; DUS test

## 目录

1 前言.....	1
1.1 真姬菇研究概况.....	1
1.1.1 真姬菇简介.....	1
1.1.2 真姬菇的营养成分和活性物质研究.....	1
1.1.3 真姬菇形态特征.....	2
1.2 国内外真姬菇产业发展现状.....	3
1.2.1 真姬菇产业发展过程及研究进展.....	3
1.2.2 真姬菇产业存在的问题.....	4
1.3 食用菌遗传与育种研究进展.....	4
1.3.1 我国食用菌育种的发展.....	4
1.3.2 ARTP 诱变技术在食用菌中的应用.....	5
1.3.3 真姬菇育种研究进展.....	6
1.4 真姬菇菌种鉴定技术研究.....	6
1.4.1 分子标记技术.....	6
1.4.2 DUS 测试.....	6
1.5 研究目的及意义.....	7
1.6 技术路线.....	8
2 真姬菇原生质体制备与再生体系建立.....	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 供试菌株.....	9
2.1.2 主要仪器设备.....	9
2.1.3 试剂及药品.....	9
2.1.4 常用培养基及试剂配方.....	9
2.2 实验方法.....	10
2.2.1 真姬菇原生质体酶解时间优化.....	10
2.2.2 真姬菇原生质体计数及获得率计算.....	11
2.2.3 真姬菇原生质体再生及再生率计算.....	12

2.2.4 真姬菇原生质体显微观察.....	12
2.3 实验结果.....	13
2.3.1 真姬菇原生质体酶解时间优化下的获得率.....	13
2.3.2 真姬菇原生质体酶解时间优化下的再生率.....	14
2.3.3 真姬菇原生质体制备与再生体系建立.....	14
2.3.4 真姬菇原生质体显微观察结果.....	16
3 真姬菇原生质体 ARTP 诱变育种及初步筛选.....	18
3.1 实验材料.....	18
3.1.1 供试菌株.....	18
3.1.2 主要仪器设备.....	18
3.1.3 试剂及药品.....	18
3.1.4 常用培养基配方.....	18
3.2 实验方法.....	18
3.2.1 真姬菇原生质体 ARTP 诱变方法.....	18
3.2.2 真姬菇原生质体 ARTP 诱变致死率测定.....	19
3.2.3 诱变株筛选过程及标准.....	20
3.3 实验结果.....	22
3.3.1 真姬菇原生质体 ARTP 诱变体系建立.....	22
3.3.2 蟹味菇原生质体 ARTP 诱变及诱变株筛选.....	23
3.3.3 白玉菇原生质体 ARTP 诱变及诱变株筛选.....	25
3.3.4 真姬菇诱变株镜检结果.....	27
4 真姬菇诱变株的栽培试验及 DUS 测试.....	29
4.1 实验材料.....	29
4.1.1 供试菌株.....	29
4.1.2 主要仪器设备.....	29
4.1.3 试剂及药品.....	29
4.1.4 常用培养基配方.....	29
4.2 实验方法.....	29
4.2.1 真姬菇诱变株和出发菌株栽培.....	29

4.2.1.1 真姬菇母种的制备.....	29
4.2.1.2 真姬菇原种的制备.....	30
4.2.1.3 真姬菇栽培种的制备.....	30
4.2.1.4 真姬菇出菇期管理及采收.....	30
4.2.2 真姬菇诱变株和出发菌株的 DUS 测试与分析.....	31
4.2.2.1 取样方法和测量方法.....	31
4.2.2.2 数量性状分级及统计.....	36
4.2.2.3 相关性和聚类分析.....	37
4.3 实验结果.....	37
4.3.1 真姬菇 DUS 数量性状分级.....	37
4.3.2 真姬菇诱变株和出发菌株子实体产量分析.....	41
4.3.3 聚类分析.....	44
5 结论与讨论.....	49
5.1 结论.....	49
5.2 讨论.....	50
参考文献.....	52
导师组意见.....	55
致谢.....	56
作者简介.....	57
在读期间科研学术成果目录.....	58

## Contents

1 Introduction.....	1
1.1 Research overview of <i>H.marmoreus</i> .....	1
1.1.1 Introduction of <i>H.marmoreus</i> .....	1
1.1.2 Study on the nutritive components and active substances of <i>H.marmoreus</i> .....	1
1.1.3 The morphological characteristics of <i>H.marmoreus</i> .....	2
1.2 The development status of <i>H.marmoreus</i> industry at home and abroad.....	3
1.2.1 The development process and research progress of <i>H.marmoreus</i> industry.....	3
1.2.2 The problems in <i>H.marmoreus</i> industry.....	4
1.3 Research progress on genetics and breeding of edible fungi.....	4
1.3.1 The development of edible fungi breeding in China .....	4
1.3.2 Application of ARTP mutagenesis technology in edible fungi.....	5
1.3.3 The research progress of <i>H.marmoreus</i> breeding.....	6
1.4 Study on the identification technology of <i>H.marmoreus</i> .....	6
1.4.1 Molecular marker technology .....	6
1.4.2 DUS test .....	6
1.5 The purpose and significance of research.....	7
1.6 Technical route .....	8
2 Establishment of protoplasm preparation and regeneration system of <i>H.marmoreus</i> .....	9
2.1 Experimental materials.....	9
2.1.1 Strains.....	9
2.1.2 Main instruments.....	9
2.1.3 Reagents and drugs.....	9
2.1.4 Common medium and reagent formula.....	9
2.2 Experimental methods.....	10
2.2.1 Optimization of enzymolysis time of <i>H.marmoreus</i> protoplasts.....	10
2.2.2 Calculation of protoplast count and yield of <i>H.marmoreus</i> .....	11
2.2.3 Protoplast regeneration and regeneration rate calculation of <i>H.marmoreus</i> .....	12

2.2.4 Microscopic observation of <i>H.marmoreus</i> protoplasts.....	112
2.3 Experimental results .....	13
2.3.1 The yield of the protoplast of <i>H.marmoreus</i> under the optimal enzymatic hydrolysis time .....	13
2.3.2 The regeneration rate of the protoplast of <i>H.marmoreus</i> under the optimal enzymatic hydrolysis time .....	14
2.3.3 Establishment of protoplast preparation and regeneration system of <i>H.marmoreus</i> .....	14
2.3.4 Microscopic observation of <i>H.marmoreus</i> protoplasts.....	16
3 Mutation breeding and preliminary screening of <i>H.marmoreus</i> protoplasts by ARTP mutagenesis.....	18
3.1 Experimental materials.....	18
3.1.1 Strains.....	18
3.1.2 Main instruments.....	18
3.1.3 Reagents and drugs.....	18
3.1.4 Common medium and reagent formula.....	18
3.2 Experimental methods.....	18
3.2.1 The methods of ARTP mutagenesis of <i>H.marmoreus</i> protoplasts .....	18
3.2.2 The determination of lethality of <i>H.marmoreus</i> protoplasts by ARTP mutagenesis .....	19
3.2.3 The selection process and standard of mutagens.....	20
3.3 Experimental results .....	22
3.3.1 Establishment of ARTP mutagenesis system of <i>H.marmoreus</i> protoplasts .....	22
3.3.2 The ARTP mutagenesis of gray <i>H.marmoreus</i> protoplast and screening of mutant .....	23
3.3.3 The ARTP mutagenesis of white <i>H.marmoreus</i> protoplast and screening of mutant .....	25
3.3.4 Microscopic examination results of <i>H.marmoreus</i> .....	27
4 Cultivation experiment and DUS test of <i>H.marmoreus</i> .....	29
4.1 Experimental materials.....	29
4.1.1 Strains.....	29
4.1.2 Main instruments.....	29
4.1.3 Reagents and drugs.....	29
4.1.4 Common medium and reagent formula.....	29
4.2 Experimental methods.....	29

---

4.2.1 Cultivation of induced and original varieties of <i>H.marmoreus</i> .....	29
4.2.1.1 Preparation of mother species of <i>H.marmoreus</i> .....	29
4.2.1.2 Preparation of breeder species of <i>H.marmoreus</i> .....	30
4.2.1.3 Preparation of cultivated species of <i>H.marmoreus</i> .....	30
4.2.1.4 Management and harvest of <i>H.marmoreus</i> .....	30
4.2.2 DUS test and analysis of mutagenesis and original strains of <i>H.marmoreus</i> .....	31
4.2.2.1 The methods of sampling and measurement .....	31
4.2.2.2 Grading of quantitative characters.....	36
4.2.2.3 Correlation and cluster analysis .....	37
4.3 Experimental results .....	37
4.3.1 Grading of DUS quantitative characters of <i>H.marmoreus</i> .....	37
4.3.2 Yield analysis of mutagenesis and original strains of <i>H.marmoreus</i> .....	41
4.3.3 Cluster analysis .....	44
5 Conclusion and discussion .....	49
5.1 Conclusion.....	49
5.2 Discussion .....	50
References .....	52
Mentor group's opinion.....	55
Acknowledgements .....	56
The author resumes .....	57
Catalogue of research and academic achievements during study.....	58

# 1 前言

## 1.1 真姬菇研究概况

### 1.1.1 真姬菇简介

真姬菇 (*Hypsizygus marmoreus*) 又名玉蕈、斑玉蕈、蟹味菇, 在分类学上隶属于担子菌门 (Basidiomycota)、伞菌纲 (Agaricomycetes)、伞菌目 (Agaricales)、离褶伞科 (Lyophyllaceae)、玉蕈属 (*Hypsizygus*) (张婷等, 2021)。真姬菇是一种腐生性真菌, 原产自欧洲、北美、西伯利亚、日本及我国东北、云南等地, 野生真姬菇多在气温较低的春秋冬季生长, 常见于槭树科、山毛榉科及其他阔叶树的枯木、风倒木和树桩上 (张桂香等, 2002; 图力古尔等, 2010)。目前市场上的真姬菇多为工厂化栽培, 常见的真姬菇工厂化栽培种有灰色和白色两种, 灰色品种俗称为蟹味菇, 白色品种俗称为白玉菇。

真姬菇因为特有的鲜香味道和滑嫩的口感, 深受消费者的喜爱 (黄志龙等, 2002), 此外真姬菇还具有货架期长、耐储存、不宜变色等优点, 深受各大商超青睐。

### 1.1.2 真姬菇的营养成分和活性物质研究

真姬菇子实体营养丰富, 含有多糖、维生素、蛋白质等生物活性物质, 不仅营养丰富, 而且具有很好的保健效果。对真姬菇营养成分的测定分析发现, 每 100 g 新鲜真姬菇中含有碳水化合物 7.40 g, 粗蛋白 3.00 g, 包括 8 种人体必需氨基酸在内的 18 种氨基酸成分 (其中含量最多的为天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸等鲜味氨基酸), 必需氨基酸占总氨基酸的 37.86%, 粗脂肪 0.08 g, 此外还含有维生素 B1、B2、B6、C 等多种微量元素, 磷、钾、铁、钙、锌等多种无机盐 (Harada et al., 2003; 上官舟建, 2004; 王耀松等, 2006), 是一种低脂肪含量、高蛋白质含量, 同时具有多种保健功效的食用菌。

综合其营养成分分析, 其具有多种保健功效, 例如可抗氧化、延缓衰老, 抗病毒、肿瘤, 降血糖、血脂, 抗真菌等 (邱成书等, 2013)。2007 年陶明焯等发现真姬菇菌盖多糖对超氧自由基的清除作用更明显, 且比相同浓度平菇多糖的清除能力更高, 而菌柄多糖则对羟自由基的清除率更高 (陶明焯等, 2007); 2013 年 Tsai 等发现从真姬菇中分离得到的非凝集素糖蛋白 HM-3A 可以抑制人白血病 U937 细胞的生长和分化 (Tsai and Ma, 2013; Tsai et al., 2013); Liu 等 2018 年对真姬菇多糖 (MPS) 和硒化多糖 (MSPS) 的特性、抗氧化和抗炎作用进行了研究, 发现 MPS 和 MSPS 可提高肺部抗氧化状态, 显著改善由脂多糖 (LPS) 引起的肺衰竭小鼠肺湿重/干重 (W/D) 比值和肺组织病理学状况, 降低肿瘤坏死因子水平, 可明显减轻肺部损伤 (Liu et al., 2018; Liu et al., 2018);

2019年 Oliveira 等从真姬菇中提取出一种呋喃酮半乳聚糖 FMG-Hm，其没有细胞毒性，可抑制鼠黑色素瘤细胞的形成和迁移，表现出良好的体外抗肿瘤作用（Oliveira et al., 2019）；2020年 Xu 等人发现真姬菇热激蛋白 HmHsp70 可使烟草具有耐热性，随后根据蛋白质组学分析揭示了真姬菇的热应激响应机制（Xu et al., 2020; Xu et al., 2021）。真姬菇的活性物质不断被证实具有抗氧化、延缓衰老，抗病毒、肿瘤，降血糖、血脂，抗真菌等等一系列的功​​效，这也使得真姬菇在我国越来越受到消费者喜爱。

### 1.1.3 真姬菇形态特征

真姬菇灰色品种与白色品种的菌丝和子实体均存在较明显的差异。

灰色品种的蟹味菇菌丝洁白，菌丝稠密，但密度普遍低于白玉菇，在 PDA 培养基上有时呈现簇状生长状况，气生菌丝丰富，菌丝爬壁力强，菌丝尖端浓密整齐，菌丝最适生长温度为 20-25 °C，生长速度略快于白玉菇，菌丝会产生无性孢子（包括圆柱形的分生孢子和卵圆形的休眠孢子）（韩绍英等，1998），老化的菌丝密度明显下降，生长速度减慢且会由白色转变为黄白色。蟹味菇子实体成簇生长，整体呈现灰褐色，菌盖颜色多为褐色或深褐色，表面存在浅色纹路，菌褶多为黄白色或灰色，菌柄发灰或黄（张引芳等，1992），子实体最适生长温度为 12-18 °C，子实体有浓郁蟹香味。

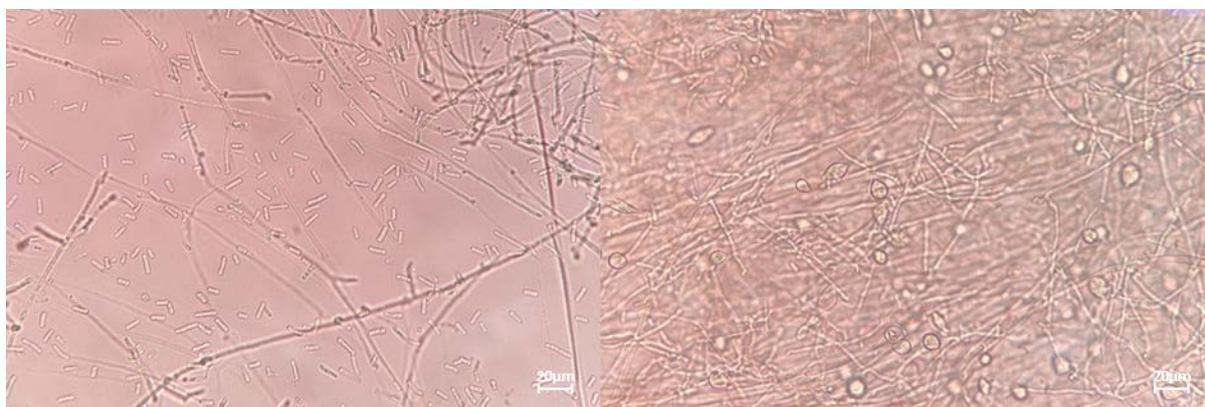


图 1.1 光学显微镜下真姬菇分生孢子（左）和休眠孢子（右）照片（40×）

Fig. 1.1 The photo of conidia (left) and dormant spores (right) of *H.marmoreus* under light microscope (40×)

白色品种的白玉菇菌丝洁白，菌丝极其稠密，气生菌丝丰富，菌丝爬壁力强，菌丝尖端呈现绒毛状，新长出的菌丝呈现透明状贴附于培养基表面，菌丝最适生长温度为 20-25 °C，菌丝会产生无性孢子（包括圆柱形的分生孢子和卵圆形的休眠孢子），老化的菌丝生长速度减慢，边缘参差不整齐且会由白色转变为黄白色。白玉菇子实体成簇生长，整体呈现透亮的白色，菌盖呈现半球状，表面平滑，有时会存在不明显的纹路，菌盖直径一般在 1.5-2.0 cm 之间；菌褶为白色极少为黄白色；菌柄圆柱形，长度为 3-12 cm 不

等（李挺等，2011），子实体最适生长温度为 12-18 °C，子实体味道略淡于蟹味菇。

## 1.2 国内外真姬菇产业发展现状

### 1.2.1 真姬菇产业发展过程及研究进展

国外对于真姬菇工厂化栽培的研究工作要早于我国，主要集中在日本、韩国等亚洲国家。1972 年，日本首先人工栽培真姬菇获得成功并申请了专利（董先茹，2013），在多年的栽培种植中其产量不断增长，目前已成为日本第二大工厂化食用菌栽培品种。国外对于真姬菇育种、真姬菇栽培技术、真姬菇活性物质的研究比较深入，目前国内栽培的真姬菇品种大部分来自于日本。

自上世纪八十年代以来，真姬菇由日本引入我国，曾在福建、山东、山西、辽宁、河南、河北等省小范围推广栽培（刘洋，2010），现已成为全国食用菌工厂化规模生产的重要品种之一。根据中国食用菌协会的统计，2010-2012 年我国真姬菇年产量不断上升，从年产 2.4 万吨发展到 15.4 万吨，随后的两年有些许下降，2014-2017 年快速增长，2017 年产量达到 39.1 万吨，但 2018 年又出现大幅下降，产量仅有 27.0 万吨。2010 年我国真姬菇产业主要集中于福建、上海两地，自 2012 年开始山东迅速发展成为真姬菇的主要产地，年产 8.5 万吨，占据全国年产量的 55.1%，随着真姬菇越来越受到市场喜爱，全国多地开始了真姬菇的生产，山东省年产量在随后的几年中有所下降，但仍是我国真姬菇的主要产地。

在 2004 年，上官舟建等就对真姬菇的生物学特性做了较为详实的叙述，阐释了温度、pH、湿度、碳源、氮源、光照等对真姬菇菌丝和子实体的影响（上官舟建等，2004），并对子实体营养成分的含量做了详细测定。在真姬菇的栽培方面，自本世纪初期我国才开始了对真姬菇的工厂化栽培研究（施肖堃和曾辉，2012），近年来不断有学者总结改善真姬菇工厂化栽培体系，郑峻等总结了营养条件、温度、水分、酸碱度、光照和空气对真姬菇子实体生长的影响，对培养料、接种、出菇管理和采收等方面进行归纳总结，对真姬菇工厂化生产做了详细介绍（郑峻等，2006）；刘明广等总结了真姬菇工厂化瓶栽技术，对设施建设、培养基筛选以及栽培流程等做了详细介绍（刘明广等，2014）；王迎鑫等、肖淑霞等先后对真姬菇工厂化生产的配方进行了优化，棉籽壳、木屑、玉米芯、麸皮、玉米粉等材料为工厂化生产真姬菇的最适材料（王迎鑫等，2014；肖淑霞等，2014），由此便开始了真姬菇在我国的工厂化栽培。

自本世纪初期以来，因为工厂化栽培技术的引进，真姬菇产业迅速发展起来，在我国逐渐发展成为仅次于杏鲍菇和金针菇的第三大工厂化栽培品种（杨国良，2018），目前

我国已发展成为全球真姬菇产量最大的国家。

### 1.2.2 真姬菇产业存在的问题

真姬菇是我国主要工厂化栽培的食用菌品种之一，栽培品种主要有蟹味菇和白玉菇两种，近年来其虽深受消费者的青睐，然而与其他食用菌品种相比，真姬菇在我国的推广种植总面积仍然相对较少。目前我国的真姬菇产量全球第一，并且已经实现了工厂化、自动化生产。虽然我国真姬菇产业发展迅速，但是用于真姬菇工厂化生产的菌种大多由日本引进，菌种自主率低，缺乏具有自主知识产权的真姬菇优良种质资源，这阻碍了我国真姬菇工厂化产业的发展。由于真姬菇菌种在传代和保藏的过程中容易出现退化现象且生产周期长达 120 d 左右，一旦菌种出现退化现象，则极易造成大规模的减产，因此真姬菇生产企业需定期向国外高价购买真姬菇菌种，增大了投资风险及成本。

而目前国内对于真姬菇的研究主要集中在多糖、三萜、凝集素等生物活性物质的提取及其利用上，近几年鲜有对于真姬菇育种方面的报道(孙培龙等, 2005; Lee et al., 2009)，因此真姬菇产业亟需拥有自主知识产权的优良菌株来供应产业发展。

## 1.3 食用菌遗传与育种研究进展

### 1.3.1 我国食用菌育种的发展

我国食用菌菌种大规模自主选育是从 20 世纪 70 年代末 80 年代初发展起来的，育种方法主要有人工选择育种、杂交育种、诱变育种、融合育种及基因工程育种等(李永江等, 2019)。

人工选择育种是最为简单和原始的育种方法，该方法是指在自然环境条件下发生的人为的正向选择，经过长期的筛选，选择出性状优良的个体(陈文良和顾沁雪, 1998)，此种育种方法并不能改变生物性状。杂交育种是食用菌育种中常用的育种方法，一般指通过不同亲本间的杂交，获得两者或多者的优良性状，使其共存于同一株菌内，而后通过一些列筛选，得到性状优良的新株系(张维东等, 2017)。杂交育种进一步又可分为单孢杂交、多孢杂交、双单杂交三种。诱变育种主要指通过物理或化学手段，对样品的遗传因子造成改变，从而对菌株性状造成改变，以此来筛选出优良诱变株。诱变育种可以在短时间内获得大量的突变株，但同样后期筛选工作也异常庞大。常用的诱变剂有 X 射线、紫外线、离子束、超声波、 $\gamma$ -射线等物理诱变剂(孙玲等, 2018)，此外还有烷化剂、抗生素等化学诱变剂(李荣杰, 2009)。融合育种是指将不同菌株的原生质体细胞在物理或化学方法下融合形成一个新的细胞，从而同时获得双亲性状，并通过一系列筛选得到优良菌株。基因工程育种指通过分子生物学手段对目的基因的改变而引起的菌株性状

改变,从而筛选出带有目的性状的新菌株。由于操作系统的不完善和基础研究的薄弱性,这种方法目前仍然处于发展阶段(王丕武等,2001)。

### 1.3.2 ARTP 诱变技术在食用菌中的应用

ARTP (Atmospheric and Room Temperature Plasma) 诱变技术是指常温常压等离子体诱变,其能够在常压的条件下产生常温的具有高活性粒子(包括处于激发态的氮原子、氧原子、氮原子、羟基自由基等)浓度的等离子体射流,作用于微生物后可引起微生物的基因损伤,进而导致突变体产生,突变率与 DNA 损伤引起的相应 SOS 反应成正比。与其他常规诱变方法相比,ARTP 对单个活细胞造成的 DNA 损伤更大,并且突变率也更高。并且有着操作简便、过程无毒害、成本低、突变率高、易产生大量突变体的等一系列的优点,是一种潜在的强大的诱变工具(Zhang et al., 2014; 张雪等, 2014; Zhang et al., 2015),近年来被不断的应用到食用菌的育种中来。

何建华等利用草菇原生质体进行 ARTP 诱变,优化诱变条件,以生长速度为筛选条件,成功筛选出 3 株生长速度增加的草菇突变株(何建华等,2014);王谦等利用 ARTP 诱变技术对茶树菇菌丝进行诱变,成功筛选出 7 株长势优于出发菌株的突变株(王谦等,2017);杨茹等成功利用 ARTP 诱变技术筛选出 6 株白色金针菇突变株,其抗病性和纤维含量均不同于出发菌株(杨茹等,2017);宋甜甜等研究了经 ARTP 诱变的猴头菌和出发菌株间的多糖差异,发现突变株多糖含量明显高于出发菌株(宋甜甜等,2018);Zhu 等对猴头菇进行育种,发现 ARTP 诱变菌株 321 培育的子实体产量比原始菌株 0605 提高了 22%,多糖含量提高了 16%,且诱变株的多糖组分的分子量分布和单糖组成与原始猴头菇菌株有显著差异,表明 ARTP 是一种高效实用的高多糖选育方法(Zhu et al., 2019);Zhang 等通过 ARTP 诱变技术选育出稳定的桑黄突变体 A67,其显示出更显著的抑制肿瘤细胞和增强抗氧化活性的作用,拓宽了对桑黄活性化合物和代谢途径的认识(Zhang et al., 2019);杨珊等采用 ARTP 诱变技术成功筛选到 5 株高产多糖的猴头菌突变株(杨珊等,2019);Li 等通过 ARTP 诱变技术对桑黄 SH1 菌种进行诱变,筛选出诱变菌株 A130,从诱变菌株发酵菌丝体中分离得到的多糖组分 A130-20, A130-50 和 A130-70 的产量比原始菌株分别高出 1.5、1.3 和 1.2 倍,且具有更高的分子量和更好的体外巨噬细胞活化活性(Li et al., 2020);马娜娜等利用 ARTP 诱变技术对灰树花菌株进行复壮,获得的突变株干重和多糖含量均明显高于出发菌株(马娜娜等,2020);刘广建等优化了蛹虫草 ARTP 诱变条件,成功筛选出 2 株高产蛋白且可稳定遗传的蛹虫草突变株(刘广建等,2020)。

### 1.3.3 真姬菇育种研究进展

关于真姬菇育种方面的报道并不常见，目前主要集中在诱变育种和融合育种两个方面，刘成荣等（刘成荣和柯晓青，2008）采用紫外光对真姬菇进行诱变，获得了斑玉蕈6号，其多糖含量显著增加；刘建忠等（刘建忠等，2010）利用真姬菇的原生质体与糙皮侧耳原生质体进行融合，获得新菌株金山1号，该菌株可以产生漆酶；Xu等（Xu et al., 2012）将真姬菇原生质体与大杯伞原生质体进行融合，成功选育出可产生漆酶的新品种。

此外分子育种是农作物育种的新方向，关于真姬菇遗传基础方面的研究为其分子育种打下了基础。2008年王谦等探索了真姬菇原生质体制备与再生的条件（王谦等，2008）；Zhang等在2014年总结了一种利用原生质体进行的有效农杆菌介导的真姬菇转化方法，为真姬菇的基础研究奠定了技术基础（Zhang et al., 2014）；随后其对真姬菇子实体发育的菌丝体结、菌丝体色素沉着、原基和子实体四个阶段相关基因进行了转录组分析，进一步揭示了真姬菇生长发育的分子机制（Zhang et al., 2015）；并利用gpd和35S双启动子沉默载体成功构建了真姬菇基因沉默系统（Zhang et al., 2017），进一步完善了真姬菇遗传操作体系；随后2020年Bao等又利用真姬菇产生的无性孢子，构建了农杆菌介导的真姬菇节孢子转化体系（Bao et al., 2020），为进一步加强真姬菇的遗传研究创造了有利条件。但是目前为止尚没有利用分子精确育种对真姬菇进行育种的报道。

## 1.4 真姬菇菌种鉴定技术研究

### 1.4.1 分子标记技术

精准的分类鉴定技术是品种选育的基础，分子标记技术可以有效区分不同的品种而广泛的应用于新品种选育和保护中。2009年董岩等对真姬菇栽培品种进行了ITS和SSR分子标记，对27个菌株进行了遗传分析（董岩等，2009），李翠翠等利用RAPD和SRAP对12株真姬菇进行了分子标记和遗传分析（李翠翠等，2009），Wang等开发了真姬菇中的AFLP标记（Wang et al., 2009），Lee等在2012年开发了关于真姬菇新菌株的相关SCAR标记（Lee et al., 2012），为真姬菇菌株鉴定、分类、标记等做出了贡献，丰富了真姬菇新品种保护手段和方法。

### 1.4.2 DUS 测试

DUS（Distinctness, Uniformity and Stability）测试是指对申请品种权的植物新品种的特异性、一致性和稳定性进行测试，是对新品种进行保护的技术基础和授权的科学依据。

其最早是在植物新品种保护行业发展起来的，早在 19 世纪，当孟德尔遗传规律被发现和应用后，育种及新品种保护就逐渐发展起来，随后在 1968 年正式成立了国际植物新品种保护联盟（UPOV），其制定了一套审查植物新品种的特异性、一致性和稳定性的总原则，简称为 DUS。我国在 1997 年颁布了植物新品种保护条例，这是我国首次将植物新品种列入到保护范围内，1999 年，中国正式加入 UPOV，随后经过修改于 2004 年颁布了《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 总则》，使得我国的植物新品种保护制度逐步开始完善（李晓辉等，2003；刘洋等，2013；杨江龙等，2018）。

在 DUS 测试中，特异性是指申请品种权的新品种应当明显区别于其他已知新品种，至少应当有一个特征明显区别于已知品种，该特性是区别申请新品种与已知品种差异的主要测试内容。一致性是指申请品种权的新品种经过繁殖，除可预见的变异外，其在形态特征、生理特征等方面的一致性和整齐性。稳定性是指申请品种权的新品种经过反复繁殖或者在特定繁殖周期结束时，其在生理和形态等方面的特征保持相对不变，在繁殖几代后仍然保持与原本一致的稳定状态（陆峻君等，2003；李祥羽等，2009）。

随着对种子的知识产权保护的发展，DUS 测试在植物新品种的保护中的应用越来越广泛，截止 2020 年，我国植物新品种申请总量已达 3.5 万件，授权总量已突破 15800 件（刘美娟等，2021），然而这个同样适用于食用菌的新品种保护方法，在食用菌的菌种保护中却应用极少，目前已发布的食用菌新品种特异性、一致性和稳定性测试指南只有白灵侧耳、金顶侧耳、双孢蘑菇、草菇、香菇、黑木耳六种，这对于食用菌的新品种保护是远远不够的。

此外还有学者根据 DUS 测试指南，对不同品种的食用菌进行的 DUS 测试及分析，陈强等对糙皮侧耳的 8 个菌株进行了 DUS 测试和分析（陈强和张金霞，2009）；王海英研制了金顶侧耳 DUS 测试指南，选定了 32 个测试性状，并对 12 株杂交金顶侧耳菌株进行了 DUS 测试（王海英，2012）；张微思等对羊肚菌的 DUS 测试技术进行研究（张微思等，2013）；徐珍等对 45 份金针菇品种进行了 DUS 测试及评价（徐珍等，2019）。

DUS 测试在植物新品种保护中的应用是及其值得借鉴的，将其应用于食用菌的新品种保护工作中，可以加强对食用菌行业的菌种保护意识，从而规范食用菌市场，促进产业有效发展。

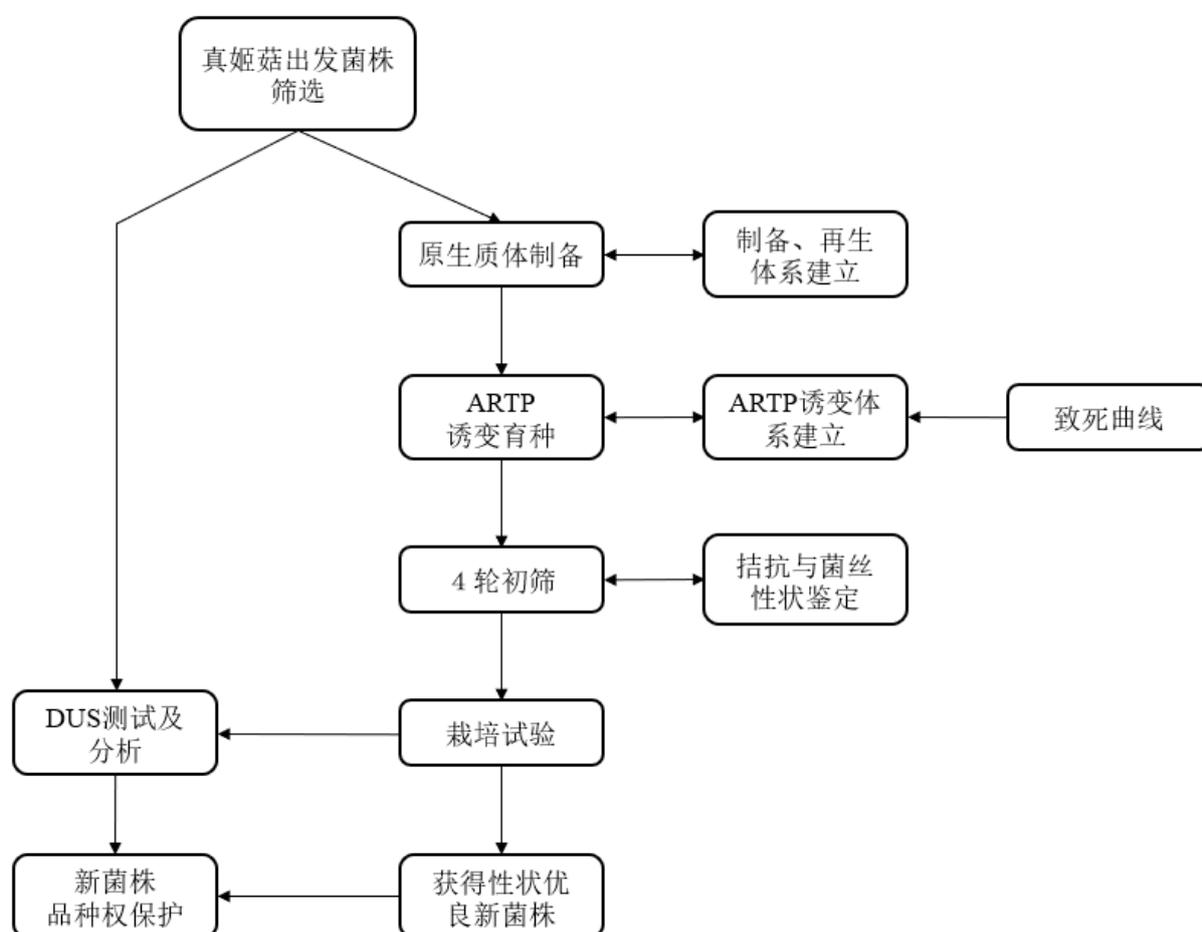
## 1.5 研究目的及意义

目前我国的真姬菇产量位列全球第一，并且已经实现了工厂化、自动化生产。真姬菇作为我国工厂化生产的珍稀食用菌品种，近年来深受消费者的青睐，真姬菇产业也迅速发展起来，但是由于用于真姬菇工厂化生产的菌种自主率低，目前主要的生产品种大

都来自于日本，我国缺乏具有自主知识产权的真姬菇优良种质资源，这阻碍了我国真姬菇工厂化产业的发展。由于真姬菇菌种在传代和保藏的过程中容易出现退化现象，造成大规模的减产，因而真姬菇生产企业每过一段时间都须高价向国外购买菌种，增大了投资风险及成本。

因此通过生物育种手段建立一套有效的真姬菇育种体系，并以此筛选出高产量的诱变菌株，对其进行 DUS 测试及分析，获得具有自主知识产权的真姬菇新品种，对于真姬菇产业来说有着巨大的现实意义，可极大的降低投资风险和成本。

### 1.6 技术路线



## 2 真姬菇原生质体制备与再生体系建立

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 供试菌株

由工厂提供的真姬菇生产菌种，白玉菇 HW-7，蟹味菇 Q1-Y。

#### 2.1.2 主要仪器设备

**表 2.1 主要仪器设备**

**Table 2.1 The main instruments and equipment**

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
电热恒温培养箱	DRP-9082	上海森信实验仪器有限公司
恒温震荡培养箱	HZQ-F160	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
自动蒸汽高压灭菌锅	MLS-3750	日本三洋电子生物有限公司
高速微量离心机	E3115	安胜科技有限公司
激光扫描共聚焦显微镜	TCS SP5	德国莱卡公司 (Leica)
光学显微镜	CX21FS1	Philippines,TOKYO,JAPAN

#### 2.1.3 试剂及药品

溶壁酶 (Lywallzyme, 广东省微生物研究所); 甘露醇 (BBI 生命科学有限公司); 琼脂粉 (北京索莱宝科技有限公司); DAPI solution (1 mg/ml, Solarbio); 刚果红 (BBI 生命科学有限公司); 葡萄糖、麦芽糖、酵母粉、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、氢氧化钠、无水乙醇均购于莱阳市康德化工有限公司。

#### 2.1.4 常用培养基及试剂配方

##### 1、PD (马铃薯葡萄糖) 培养基

200 g 土豆水煮 20-30 min, 八层纱布过滤, 向土豆汁中加入 20 g 葡萄糖, 蒸馏水定容至 1 L 后分装, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

##### 2、PDA (马铃薯葡萄糖琼脂) 培养基

使用购于海博生物技术有限公司的马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基, 按照使用说明, 称取 46 g PDA 粉末, 加入 1 L 蒸馏水, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

##### 3、RM (再生) 培养基

200 g 土豆水煮 20-30 min, 八层纱布过滤, 得到土豆汁, 向土豆汁中加入 10 g 葡萄糖、5 g 麦芽糖、5 g 酵母粉、109.32 g 甘露醇, 蒸馏水定容至 1 L, 最后加入 20 g 琼脂

粉, 115 °C高压蒸汽灭菌 30 min。

#### 4、5 M NaOH 溶液

称取 20 g NaOH, 慢慢的倒入盛有 50 mL 蒸馏水的干净烧杯内, 待 NaOH 全部溶解后加蒸馏水定容至 100 mL。

#### 5、10×PBS 溶液

分别称取 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、8 g NaCl、0.2 g KCl 于干净烧杯中, 加入 80 mL 蒸馏水, 充分搅拌溶解, 用 5 M NaOH 溶液调节 pH 至 7.4, 加蒸馏水定容至 100 mL。

#### 6、DAPI 染液工作液 (0.01 mg/mL)

用移液枪准确吸取 100  $\mu\text{L}$  DAPI 溶液 (1 mg/mL)、100  $\mu\text{L}$  10×PBS 溶液、800  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 于 1.5 mL 的离心管中, 颠倒混匀, 得到 0.1 mg/mL 的 DAPI 染色液。重复上述操作将 0.1 mg/mL 的 DAPI 染色液稀释至 0.01 mg/mL 即为 DAPI 工作液, 稀释后的溶液均用锡箔纸将离心管包住避光, -20 °C 保存。

#### 7、0.1% 刚果红染液

准确称取 0.1 g 刚果红, 加入到 80 mL 蒸馏水中, 搅拌至刚果红全部溶解, 加蒸馏水定容至 100 mL。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 真姬菇原生质体酶解时间优化

#### 1、菌种活化

取保存于 4 °C 冰箱的 PDA 试管斜面菌种约 5 mm×5 mm 大小, 放置于新鲜的 PDA 平板上, 25 °C 暗培养至菌丝生长到培养皿的 1/2 处。

#### 2、液体菌种制备

用 5 mm 打孔器, 取已活化的真姬菇菌株 4-6 块接种于 100 mL PD 培养基中, 共分 5 组, 于 25 °C 振荡培养箱中暗培养 4 d, 用于原生质体的制备。

#### 3、不同酶解时间原生质体制备方法

(1) 取出培养 4 d 的液体菌球于 50 mL 离心管中, 常温 8000 rpm 离心 5 min, 弃上清。

(2) 无菌水清洗菌球 1 次, 常温 8000 rpm 离心 5 min, 弃上清。

(3) 0.6 M 甘露醇清洗菌球 2 次, 常温 8000 rpm 离心 5 min, 弃上清。

(4) 将无菌滤纸铺于已灭菌的平板中, 清洗后的菌球置于滤纸上, 吸干液体。

(5) 将吸干的菌球转移至无菌 2 mL 离心管中, 称重, 并按照每 0.10 g 菌丝加入 1 mL 酶液的量, 向管中加入以 0.6 M 甘露醇溶液为溶剂所配制的溶壁酶溶液。酶液浓度为 15 mg/mL, 过滤除菌。

(6) 颠倒离心管, 使菌球与酶液充分接触, 将离心管放置于 30 °C 摇床酶解 1.5-3.5 h, 其间颠倒混匀数次, 每隔 0.5 h 取出一管, 进行后续操作, 以检验不同酶解时间对真姬菇原生质体得率的影响。

(7) 将菌丝酶解液通过含 1.5 cm 左右脱脂棉的注射器过滤, 除去大菌丝段, 然后再经 300 目筛网过滤, 得到较纯的原生质体悬液。

(8) 常温 2000 rpm 离心 15 min, 弃上清, 得到原生质体沉淀。

(9) 0.6 M 甘露醇溶液洗涤两次, 弃上清, 留沉淀。

(10) 用 1 mL 0.6M 甘露醇重悬沉淀, 即得原生质体悬液。取出约 100  $\mu$ L 用于血球计数板计数, 其余用于再生。

## 2.2.2 真姬菇原生质体计数及获得率计算

### 1、原生质体计数

(1) 将干净的盖玻片置于 25 $\times$ 16 的血球计数板上的计数区, 用移液枪吸取 10  $\mu$ L 的原生质体悬液, 沿盖玻片边缘缓缓加入, 直至悬液充满计数区而不溢出, 室温静置 5-10 min 后开始计数。

(2) 在光学显微镜 10 倍镜下找到血球计数板的方格区, 找到后更换 40 倍镜进行计数。计数过程中, 依照以下原则进行:

- ① 只对规则圆形的透亮细胞进行计数, 破裂细胞不计算在内;
- ② 在计数过程中, 微调细准焦螺旋, 以对不同平面的原生质体进行计数;
- ③ 中方格区域内上下双线选择记上不记下, 左右双线选择记左不计右;
- ④ 依次对左上、右上、左下、右下及中央 5 个中方格进行计数;
- ⑤ 分别对 5 组进行计数, 每组重复计数 3 次。

(3) 取每组 3 次计数的平均值, 按照下述公式进行计算, 即可得到每组每 mL 原生质体悬液中所含的原生质体个数:

$$\text{细胞数 (个)} = (\text{80 小格内的细胞数 (个)} / \text{80}) \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数} \quad \text{式 (2.1)}$$

### 2、原生质体获得率计算

依据计数所得的每 mL 原生质体悬液中所含的原生质体个数, 按照下式可计算出不同酶解时间下, 每 g 菌丝所制备得到的原生质体数量。

$$\text{原生质体得率 (个/g)} = \frac{\text{1 mL 原生质体悬液中原生质体数量 (个)}}{\text{制备原生质体所用菌体重量 (g)}} \quad \text{式 (2.2)}$$

### 2.2.3 真姬菇原生质体再生及再生率计算

#### 1、原生质体再生

##### (1) 原生质体稀释

根据计数结果, 将每组原生质体悬液依照浓度梯度, 用 0.6 M 甘露醇依次稀释至  $10^4$  数量级后备用。

##### (2) 再生

将稀释好的原生质体悬液混匀后, 加入到 45-50 °C 的 RM 培养基中, 轻柔摇匀, 不要产生气泡, 按照每个平板约 100  $\mu\text{L}$  原生质体悬液量倒平板 (每个平板约为 20 mL RM 培养基), 待培养基凝固后置于 25 °C 培养箱暗培养 6-9 d。

#### 2、再生原生质体数量计算

采用平板活菌计数法来计算原生质体再生率, 真姬菇原生质体再生大约从第 6 天开始至第 9 天结束, 自第 6 天开始统计再生出的单菌落数量, 并在平板上做好标记, 第 9 天统计结束后计算再生出的单菌落总数, 按照下述公式进行真姬菇原生质体再生率计算:

$$\text{原生质体再生率 (\%)} = \frac{\text{10 个平板上再生出的原生质体数量总和 (个)}}{\text{1 mL 原生质体悬液中原生质体数量 (个)}} \times 100\% \quad \text{式 (2.3)}$$

### 2.2.4 真姬菇原生质体显微观察

#### 1、光学显微镜观察

方法同 2.2.2 中计数观察方法相同。

#### 2、激光共聚焦显微镜观察

##### (1) 制片

①首先对原生质体的核酸进行染色, 取 50  $\mu\text{L}$  未稀释的原生质体悬液和 50  $\mu\text{L}$  DAPI 工作液, 置于干净的 1.5 mL 离心管中, 轻柔混合均匀, 室温避光染色 15-20 min。

②接着对真姬菇原生质体细胞壁进行染色, 取 DAPI 染色后的原生质体悬液一滴, 置于用无水乙醇浸泡过的干净载玻片上, 滴加一滴 0.1% 刚果红染液, 盖上盖玻片 (处理方法同载玻片), 用吸水纸吸取多余液体, 立刻置于激光共聚焦显微镜下观察。

##### (2) 观察

①打开激光共聚焦显微镜、激光器、电脑以及软件, 预热至少 10 min (其间完成制片过程)。

②将制好的片子倒置在显微镜上, 自低倍镜开始在可见光下找到原生质体, 找到后

更换至 40 倍镜，Format 扫描像素调整至 1024×1024，打开 UV 和 488 nm 激光器，调整至合适强度。

③设置 Sequential Scan，将 scan 1 设置为 UV 和明场，scan 2 设置为 488 nm 通道。

④点击 scan 1，然后点击 Live，将成像切换至软件上，调整 UV 激光器和明场下图像呈现度，调整 Z position 至荧光信号最强的层面，调节 Gain、Offset 使图像背景和亮度至合适状态；点击 Stop，切换至 scan 2，随后重复上述操作调整 488 nm 通道下的图像呈现度，点击 Start 进行荧光场和明场的扫描。

⑤在 Live 模式下，点击 Zoom in 对视野区域进行放大，手动选取想要放大的视野区域，重复步骤④中对视图的调整操作，并在最佳状态下进行扫描。

⑥重复步骤④、⑤完成对真姬菇原生质体的观察扫描，导出照片。

⑦关闭软件、电脑、显微镜，静待 10 min 左右关闭激光器。

## 2.3 实验结果

### 2.3.1 真姬菇原生质体酶解时间优化下的获得率

经过对真姬菇菌丝在不同酶解时间下得到的原生质体得率计算，得到如图 2.1 所示结果。在 1.5-3.0 h 的酶解时间下，0.1 g 真姬菇菌丝可获得原生质体个数分别为  $2.23 \times 10^5$  个、 $3.67 \times 10^6$  个、 $2.01 \times 10^7$  个、 $2.46 \times 10^7$  个，原生质体获得率分别为  $2.23 \times 10^6$  个/g、 $3.67 \times 10^7$  个/g、 $2.01 \times 10^8$  个/g、 $2.46 \times 10^8$  个/g。

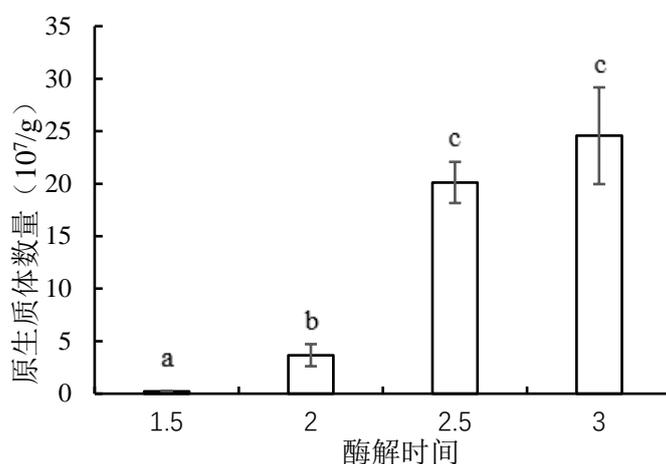


图 2.1 真姬菇菌丝在不同酶解时间下获得的原生质体数量

Fig. 2.1 The number of protoplasts obtained from mycelia of *H. marmoreus* under different enzymatic hydrolysis time

注：柱形图上方的字母表示显著性差异，若字母不同则表示有显著性差异， $p \leq 0.05$ ；若字母相同则表示无显著性差异， $p > 0.05$ 。

从实验结果可以看出,随着酶解时间的延长,原生质体的获得率不断升高,在酶解 2.5 h 时每 g 菌丝可获得  $10^8$  数量级的原生质体,随后原生质体得率维持该数量级持续增长。因此可得出结论真姬菇菌丝在酶解时间为唯一变量的条件下,酶解时间为 3.0 h 时可得到最多的原生质体数量,但在此情况下相较于 2.0 h、2.5 h 的酶解时间,3.0 h 酶解时间下的数据误差更大,实验数据更加不稳定。

### 2.3.2 真姬菇原生质体酶解时间优化下的再生率

经过对真姬菇菌丝在不同酶解时间下得到的原生质体再生率计算,得到如图 2.2 所示结果。在 1.5-3.0 h 的酶解时间下,真姬菇原生质体再生率分别为 0.19%、1.73%、2.46%、1.98%。从实验结果可以看出,随着酶解时间的延长,原生质体的再生率不断升高,在酶解 2.5 h 时达到最大值 2.46%,随后再生率开始下降,造成此现象的原因可能是酶解时间延长导致原生质体活力有所下降,再生率随之下降。因此可得出结论真姬菇菌丝在酶解时间为唯一变量的条件下,酶解时间为 2.5 h 时原生质体再生率最高。

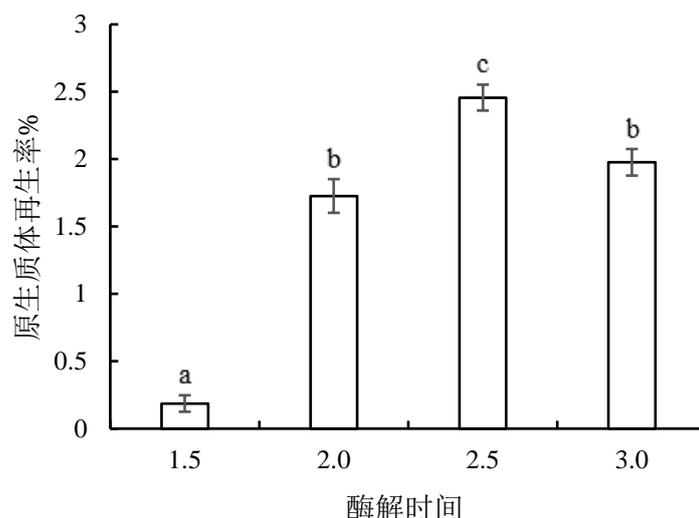


图 2.2 真姬菇菌丝不同酶解时间下获得的原生质体再生率

Fig. 2.2 Regeneration rates of protoplasts obtained from mycelia of *H.marmoreus* under different enzymatic hydrolysis times

注:柱形图上方的字母表示显著性差异,若字母不同则表示有显著性差异,  $p \leq 0.05$ ; 若字母相同则表示无显著性差异,  $p > 0.05$ 。

### 2.3.3 真姬菇原生质体制备与再生体系建立

根据 2.3.1、2.3.2 的实验结果可以看出在酶解 3.0 h 时原生质体得率最多,酶解 2.5 h 时原生质体再生率最高,但通过同一酶解时间下原生质体获得率和再生率相乘,可得到在不同酶解时间下可获得的再生单菌落数量,图 2.3 为计算结果。1.5-3.0 h 酶解时间

下每 g 菌丝可获得的原生质体再生单菌落数量分别为  $3.98 \times 10^3$  个、 $6.29 \times 10^4$  个、 $4.94 \times 10^6$  个、 $4.86 \times 10^6$  个，该数量随着时间的延长而逐渐增加，至 2.5 h 时达到峰值，随后基本保持不变，虽然在酶解 3.0 h 的条件下原生质体的获得率最多，但其再生率低于 2.5 h 时的再生率，因此最终得到的再生单菌落数量并不是最多的，且在该实验条件下数据误差更大，实验不稳定因素更多。由此可以得出结论，原生质体酶解时间延长虽然可以得到更多的原生质体，但其再生率会受酶解时间延长的影响而降低，从而不能得到更多的再生单菌落。

通过上述实验结果选定 2.5 h 的酶解时间，虽然该时间条件下原生质体得率不是最多的，但最终得到的再生单菌落数量却是最多的，本实验目的即为得到最多的再生单菌落以供诱变和筛选，因此选定 2.5 h 的酶解时间为最适酶解时间。

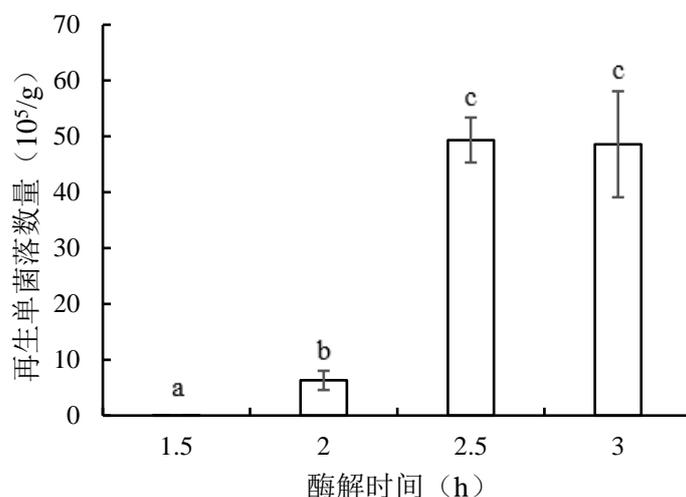


图 2.3 真姬菇菌丝不同酶解时间下可获得的原生质体再生单菌落数量

Fig. 2.3 The number of protoplast regenerated single colony of *H.marmoreus* mycelium under different enzymatic hydrolysis times

注：柱形图上方的字母表示显著性差异，若字母不同则表示有显著性差异， $p \leq 0.05$ ；若字母相同则表示无显著性差异， $p > 0.05$ 。

通过对真姬菇菌丝原生质体制备的酶解时间优化，成功建立了真姬菇原生质体制备与再生的完整体系，得到了真姬菇菌丝制备原生质体的最适条件，如表 2.2 所示。取生长 4 d 真姬菇液体菌球，0.6 M 甘露醇为稳渗剂，选用 15 mg/mL 的溶壁酶作为酶解液，酶液与菌丝比例为 10:1 (V:W)，在 30 °C 的恒温振荡摇床中酶解 2.5 h，经过滤和清洗后可确保每 g 菌丝获得  $10^8$  数量级的原生质体，经 RM 培养基再生后，再生率平均可达 2.46%。

表 2.2 真姬菇菌丝原生质体制备与再生最适条件

Table 2.2 The optimum conditions for preparation and regeneration of mycelial protoplasts of

*H.marmoreus*

名称	酶制剂种类	酶液浓度 (mg/mL)	酶液与菌丝比 (V:W)	酶解时间 (h)	酶解温度 (°C)	菌龄 (d)	稳渗剂	再生培养基	再生浓度 (个/mL)	再生体 (μL/板)
参数	溶壁酶	15	10:1	2.5	30	4 (液体培养)	0.6 M 甘露醇	RM	10 <sup>4</sup>	100

### 2.3.4 真姬菇原生质体显微观察结果

#### 1、光学显微镜观察

真姬菇原生质体在光学显微镜 100 倍镜下呈现透明的圆球状，中间亮边缘暗，形状较为规则，大小不一，如图 2.4 所示。

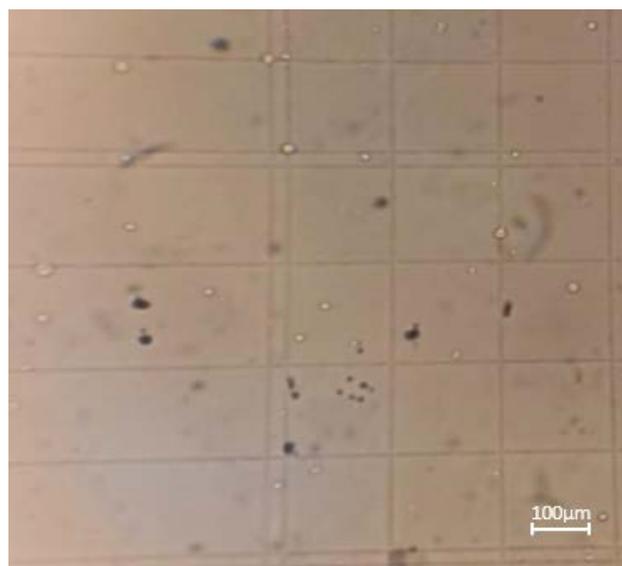


图 2.4 真姬菇原生质体光学显微镜观察结果 (100×)

Fig. 2.4 The observation on protoplasts of *H.marmoreus* by light microscope(100×)

#### 2、激光共聚焦显微镜观察

使用 DAPI 染液对原生质体的核酸进行染色，可在视野中看到明亮的蓝色，说明此位置含有核酸。通过观察可以将视野中的细胞大致归为三类，第一类为球状细胞，此类细胞中心被 DAPI 染色，应为酶解效果较好的原生质体个体；第二类为杆状细胞，此类细胞同样中心被 DAPI 染色，这类细胞应为酶解不完全，仍留存了部分细胞壁的真姬菇细胞；第三类为不规则的细胞，此类细胞同样可以看到被 DAPI 染色，这类细胞应是在

染色过程中因外力作用而破裂的原生质体细胞。

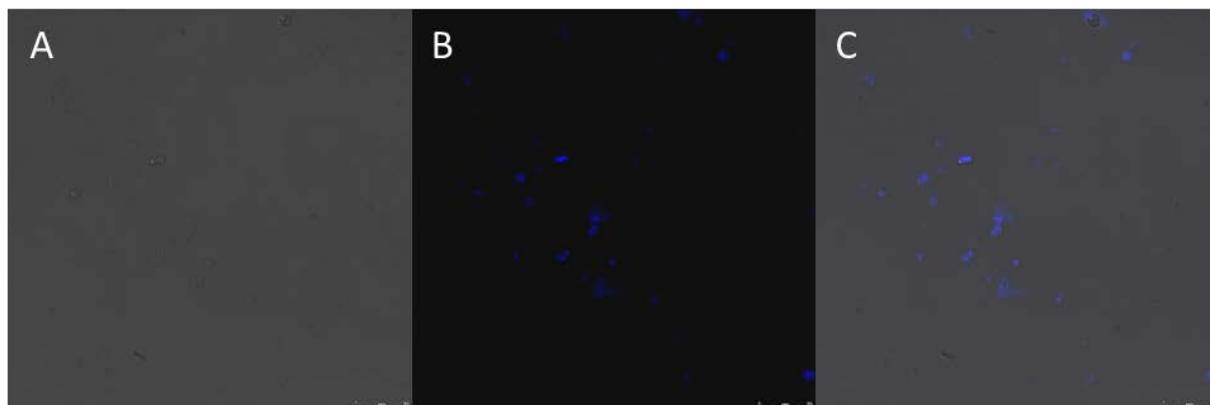


图 2.5 真姬菇原生质体 DAPI 染色结果 (40×)

Fig. 2.5 The results of DAPI staining of protoplasts of *H.marmoreus* (40×)

注：A 为明场下真姬菇原生质体；B 为荧光场下真姬菇原生质体；C 为明场与荧光场叠加后的真姬菇原生质体。

对真姬菇原生质体的显微观察可以看出，通过本实验所建立的真姬菇原生质体制备与再生体系可以成功的获得较纯的原生质体悬液，为下一步进行 ARTP 诱变奠定了良好的实验基础。

### 3 真姬菇原生质体 ARTP 诱变育种及初步筛选

#### 3.1 实验材料

##### 3.1.1 供试菌株

由工厂提供的真姬菇生产菌种，白玉菇 HW-7，蟹味菇 Q1-Y。

##### 3.1.2 主要仪器设备

**表 3.1 主要仪器设备**

**Table 3.1 The main instruments and equipment**

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
电热恒温培养箱	DRP-9082	上海森信实验仪器有限公司
恒温振荡培养箱	HZQ-F160	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
自动蒸汽高压灭菌锅	MLS-3750	日本三洋电子生物有限公司
高速微量离心机	E3115	安胜科技有限公司
光学显微镜	CX21FS1	Philippines,TOKYO,JAPAN
ARTP 诱变仪	ARTP-IIS	无锡源清天木生物科技有限公司

##### 3.1.3 试剂及药品

溶壁酶 (Lywallzyme, 广东省微生物研究所); 甘露醇 (BBI 生命科学有限公司); 琼脂粉 (北京索莱宝科技有限公司); 葡萄糖、麦芽糖、酵母粉均购于莱阳市康德化工有限公司。

##### 3.1.4 常用培养基配方

1、PD (马铃薯葡萄糖) 培养基

同 2.1.4。

2、PDA (马铃薯葡萄糖琼脂) 培养基

同 2.1.4。

3、RM (再生) 培养基

同 2.1.4。

#### 3.2 实验方法

##### 3.2.1 真姬菇原生质体 ARTP 诱变方法

### 1、菌种活化

方法同 2.2.1。

### 2、液体菌种制备

方法同 2.2.1。

### 3、原生质体制备

方法同 2.2.1，酶解时间固定在 2.5 h。

### 4、原生质体计数及稀释

计数方法同 2.2.2。

根据计数结果，将原生质体悬液稀释至  $10^6$  数量级用于后续诱变。

### 5、原生质体 ARTP 诱变

#### (1) 载片样品制备

在无菌条件下，吸取上述  $10^6$  数量级的原生质体悬液 10  $\mu\text{L}$  滴加在菌物载片上，分为 5 组，将悬液均匀涂抹在金属载片表面，使原生质体悬液覆盖全部载片。

#### (2) 常温常压等离子体诱变

①打开电源开关，打开冷却水循环机；

②打开气瓶阀门，将气体压力调整到 0.15-0.20 MPa；

③用 75%酒精擦拭等离子体诱变室，点击仪器控制面板进入操作界面，打开紫外，灭菌 20 min；

④在无菌条件下，用镊子将菌物载片转移到载物台上，每个载片下放置一个装有 990  $\mu\text{L}$  洗涤液（0.6 M 甘露醇）的离心管，分别编号 0-5；

⑤开启 ARTP 诱变系统，调整氦气供气压力在 0.1-0.2 MPa，设定参数在工作气流量为 10 L/min，功率为 120 W，等离子体发射源与样品距离为 2 mm，操作温度控制在 23.0-35.0  $^{\circ}\text{C}$  的条件下，依次设置照射时间为 0、10、20、30、40、50、60、70 s（每组放置一个载片）；

⑥待诱变完成后菌物载片自动掉到对应的离心管中，在无菌条件下取出装有菌物载片的离心管。

⑦关闭气体阀门，进行放气。关闭仪器电源，关闭冷却水循环机。完成实验过程。

#### (3) 诱变样品洗涤

将取出的离心管在漩涡振荡仪上振荡 1 min，使载片上的菌体均匀混合于洗涤液中，无菌条件下取出载片，得到诱变后的原生质体悬液。

## 3.2.2 真姬菇原生质体 ARTP 诱变致死率测定

### 1、原生质体再生及计数

将上述 6 组诱变后的原生质体原液分别再生及计数，方法同 2.2.3。

### 2、绘制致死曲线

按照下述公式计算每组诱变原生质体的致死率，并以诱变时间为变量，获得真姬菇原生质体致死曲线。

$$\text{致死率} = \frac{\text{未诱变平板菌落数} - \text{诱变后平板菌落数}}{\text{未诱变菌落数}} \times 100\% \quad \text{式 (3.1)}$$

## 3.2.3 诱变株筛选过程及标准

### 1、第一轮筛选

(1) 将诱变后再生平板于 25 °C 培养 7-10 d，至平板上有星芒状的单菌落长出时，将单菌落挑出至新的 PDA 平板上分别进行编号，25 °C 暗培养至长出新的菌丝。

(2) 将已长出新菌丝的诱变株分别与出发菌株如图 3.1 所示进行 7 点拮抗，将出发菌株放置于 PDA 平板中间位置，周围依次等距放置 6 个不同的诱变株，25 °C 暗培养至产生拮抗线。

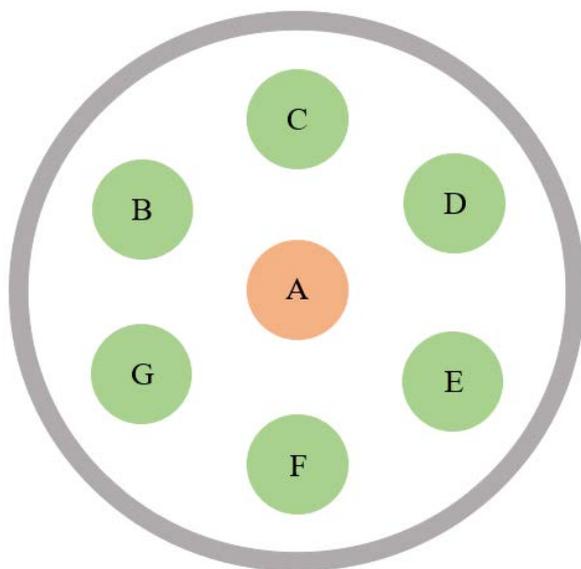


图 3.1 真姬菇诱变株与出发菌株第一轮拮抗示意图

Fig. 3.1 Schematic diagram of the first antagonism between the mutated species and the original species

注：A 为出发菌株；B-G 为诱变株。

待平板菌丝产生拮抗线后，依据表 3.1 中所示标准筛选与出发菌株拮抗明显、菌丝生长速度较快、菌丝洁白、浓密、气生菌丝多、爬壁力强且接种块周围没有或有不明显

的透明圈的诱变株进行第二轮筛选。

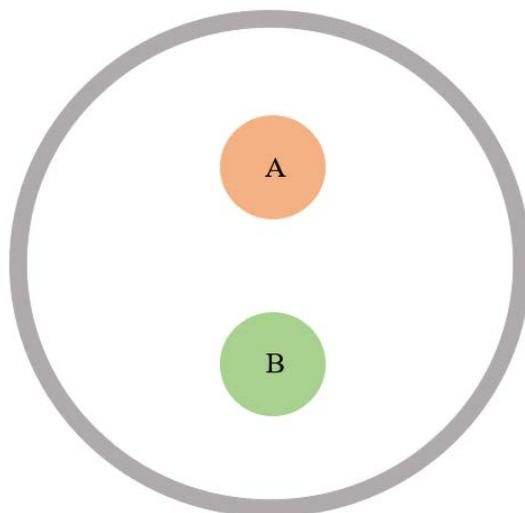
**表 3.1 诱变株筛选标准**

**Table 3.1 The screening criteria for mutagenic species**

序号	筛选标准	程度	程度	程度
1	与出发菌株拮抗现象	明显	不明显	无
2	菌丝生长速度	较快	一般	较慢
3	菌丝洁白程度	洁白	一般	发黄
4	菌丝密度	稠密	一般	稀疏
5	气生菌丝数量	多	一般	少
6	菌丝爬壁力	强	正常	弱
7	接种块周围是否有透明圈	无	不明显	明显

## 2、第二轮筛选

将第一轮筛选得到的诱变株按照图 3.2 所示依次与出发菌株进行一对一的拮抗筛选，将出发菌株与诱变株分别放置在 PDA 平板两端，25 °C 暗培养至产生拮抗线。



**图 3.2 真姬菇诱变株与出发菌株第二轮拮抗示意图**

**Fig. 3.2 Schematic diagram of the second antagonism between the mutated species and the original species**

注：A 为出发菌株；B 为第一轮筛选出的诱变株。

待平板菌丝产生拮抗线后，依据表 3.1 中所示标准筛选诱变株，方法同第一轮筛选。

## 3、第三轮筛选

(1) 将第二轮筛选出的诱变株与出发菌株同时进行活化，用 5 mm 打孔器取 PDA

平板边缘菌丝，接种于 5 个新的 PDA 平板上，25 °C 暗培养至菌丝生长到平板的 1/2-2/3 处。

(2) 用 5 mm 打孔器取活化好的出发菌株和诱变株至新的 PDA 平板（要求培养基厚度均匀一致，表面平整不倾斜）上，每株接种 30 个平板，于 25 °C 暗培养，每天观察并记录菌丝生长状况，按照表 3.1 中的性状 2-7 的标准对平板进行筛选，每株选出一个性状最为优良的平板进行第四轮筛选。

#### 4、第四轮筛选

方法同第三轮筛选（2）中所示，每天观察记录菌丝生长状况，每株选出一个性状最为优良的平板进行栽培试验。

#### 5、菌株镜检、保藏和扩繁

##### (1) 菌株镜检

用无菌 200  $\mu$ L 枪头从平板菌丝上挑取少许菌丝置于干净的载玻片上，滴 1 滴无菌水，盖上干净的盖玻片，在光学显微镜 40 倍镜下进行镜检，观察菌丝中是否存在锁状联合，若存在则进行后续实验。以上述方法依次对筛选出的菌丝进行镜检。

##### (2) 菌种保藏

将第四轮筛选中选出的平板分别接种于 PDA 试管斜面培养基中，25 °C 暗培养至菌丝长满培养基表面，于 4 °C 冰箱低温保存。

##### (3) 菌株扩繁

将第四轮筛选中选出的平板分别接种于新的 PDA 平板上进行扩繁培养，于 25 °C 暗培养，用于栽培试验。

### 3.3 实验结果

#### 3.3.1 真姬菇原生质体 ARTP 诱变体系建立

根据 3.2.1 的实验方法对真姬菇原生质体进行 ARTP 诱变，计算致死率绘制致死曲线，结果如图 3.3 所示。

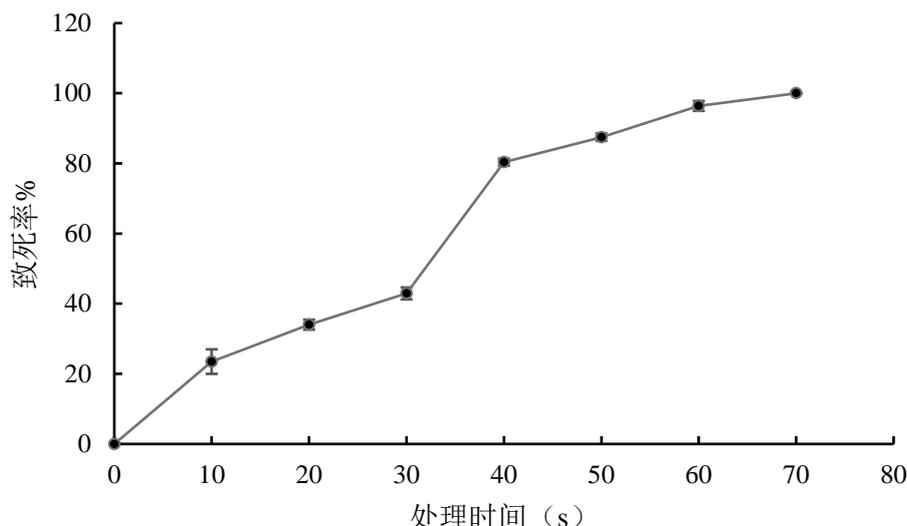


图 3.3 真姬菇原生质体 ARTP 诱变致死曲线

Fig. 3.3 The lethality curve of protoplasts of *H.marmoreus* induced by ARTP

诱变 0-70 s 后真姬菇原生质体致死率依次为 0.00%、23.50%、34.03%、42.93%、80.37%、87.50%、96.40%、100%，随着诱变时间的延长，原生质体致死率不断增加，在 40 s 时达到 80%，在 50-60 s 之间达到 90%，约在 70 s 时全部死亡无再生单菌落，致死率保持在 80%-90% 之间时既可保证有效诱变，又可保证获得一定数量的诱变体用于实验。因此依据实验结果选择 40 s、50 s 两个时间进行后续诱变实验。

表 3.2 真姬菇 ARTP 诱变体系

Table 3.2 The screening criteria for mutagenic species

名称	功率 (W)	气量 (sLM)	诱变时间 (s)	原生质体浓度 (个/mL)	原生质体体积 (μL)	载片洗涤液	载片洗涤液体积 (μL)	再生浓度 (个/mL)	再生体体积 (μL/板)
参数	130	12.00	40/50	10 <sup>7</sup>	10	0.6 M 甘露醇	990	10 <sup>5</sup>	100

### 3.3.2 蟹味菇原生质体 ARTP 诱变及诱变株筛选

根据 3.2.1 的实验方法对蟹味菇原生质体进行 ARTP 诱变，诱变时间依次设定为 0 s、40 s、50 s 三组，诱变后于 RM 培养基中 25 °C 暗培养再生，待 RM 培养基表面长出星芒状的单菌落后进行 3.2.3 的筛选。

第一轮筛选共对 121 株蟹味菇诱变株进行筛选，依据菌丝性状筛选出 32 株进行第二轮筛选，从中选出菌丝性状优良的诱变株 8 株并进行第三轮扩繁筛选，每株诱变株选出一个性状最优的平板进行第四轮筛选，最终筛选出的平板进行保种和扩繁。图 3.4、

3.5 为蟹味菇诱变株第一、二轮筛选拮抗图片。



图 3.4 蟹味菇第一轮拮抗图

Fig. 3.4 The first round antagonism of gray *H.marmoreus*

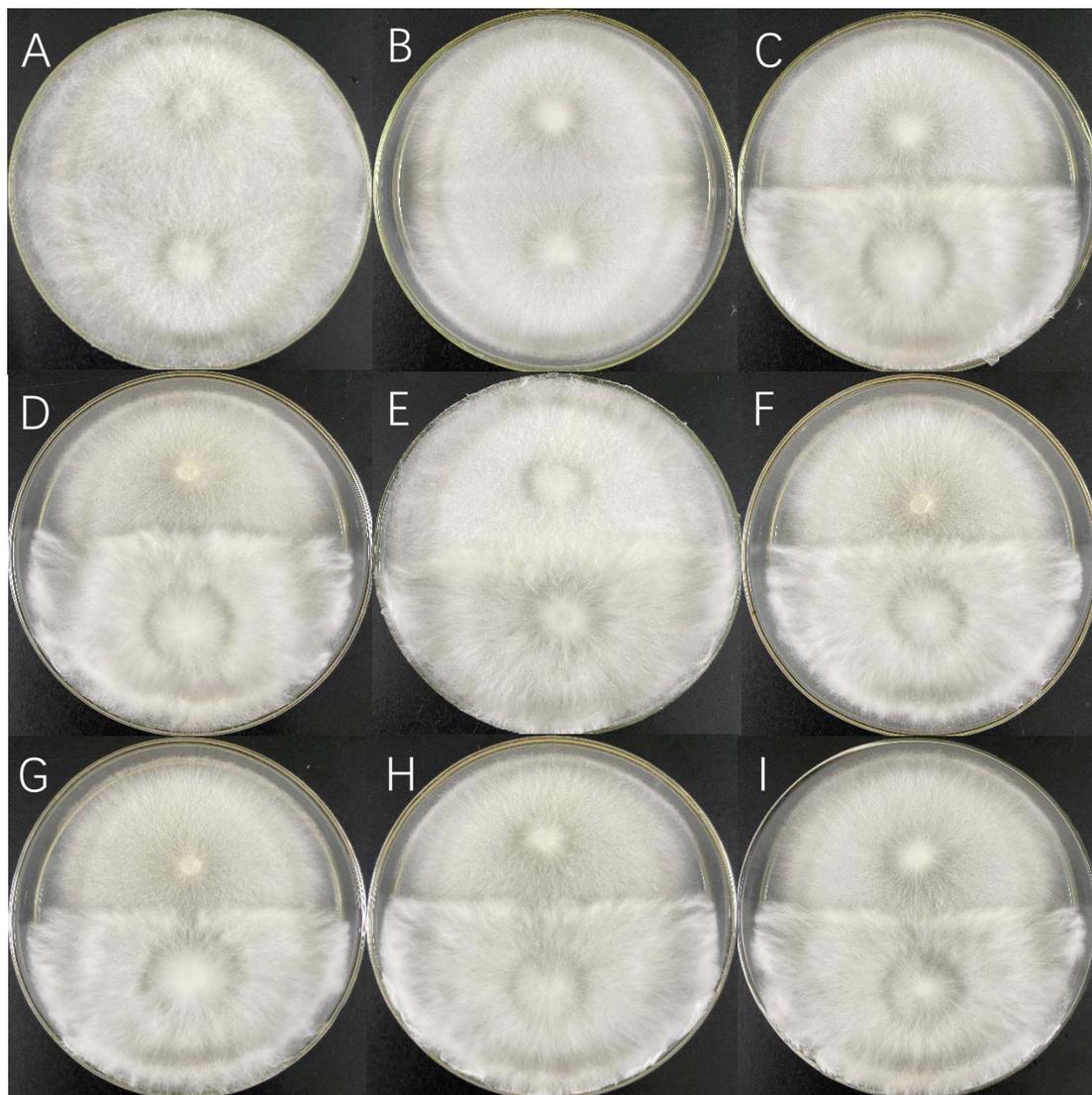


图 3.5 蟹味菇第二轮拮抗图

Fig. 3.5 The second round antagonism of gray *H.marmoreus*

注：A 为出发菌株 Q1-Y 与出发菌株 Q1-Y 拮抗情况；B-I 上方接种块全部为出发菌株 Q1-Y，下方接种依次为诱变株 XWG-1、2、3、4、5、6、7、8。

根据蟹味菇诱变和筛选结果可以看出，蟹味菇原生质体诱变后的诱变株较易与出发菌株产生拮抗现象，菌丝性状变化较为明显，因此可以从较少的诱变株中挑选出拮抗明显且性状优良的诱变株用于栽培试验。

### 3.3.3 白玉菇原生质体 ARTP 诱变及诱变株筛选

按照 3.2.1 的实验方法对白玉菇原生质体进行 ARTP 诱变实验，时间依次设定为 0 s、40 s、50 s 三个组别，诱变后的原生质体于 RM 培养基中 25 °C 暗培养再生，待培养基表面长出星芒状的单菌落后进行如 3.2.3 所述的筛选。

第一轮筛选共对 272 株白玉菇诱变株进行筛选，依据菌丝性状选出 41 株进行第二轮筛选，紧接着选出了菌丝性状优良的诱变株 4 株并进行第三轮的扩繁筛选，后续步骤同 3.3.2 中所述。图 3.6、3.7 为白玉菇诱变株第一、二轮筛选拮抗图片。



图 3.6 白玉菇第一轮拮抗图

Fig. 3.6 The first round antagonism of white *H.marmoreus*

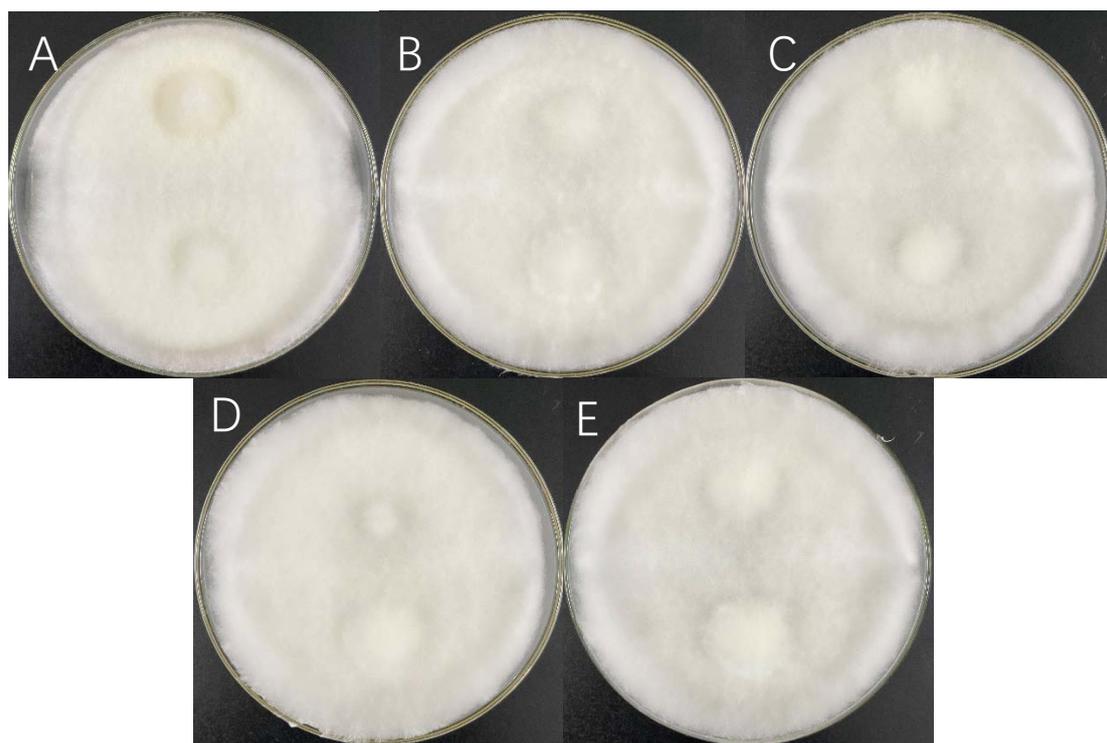


图 3.7 白玉菇第二轮拮抗图

Fig. 3.7 The second round antagonism of white *H.marmoreus*

注：A 为出发菌株 HW-7 与出发菌株 HW-7 拮抗情况； B-E 上方接种块全部为出发菌株 HW-7，下方接种块依次为 BYG-1、2、3、4。

对白玉菇诱变和筛选结果的观察，发现白玉菇诱变株菌丝形态产生变化的几率较小，与出发菌株拮抗现象没有蟹味菇诱变株明显，因此需要多次筛选，从较多的诱变株中挑选栽培试验所用诱变株。

### 3.3.4 真姬菇诱变株镜检结果

依据 3.2.3 中镜检方法对所有筛选出的用于栽培试验的诱变株进行镜检，图 3.8 所示为真姬菇诱变株光学显微镜 40 倍镜下的镜检结果，所有用于栽培试验的菌株均存在大量锁状联合结构，全部为双核菌丝，可用于栽培试验。

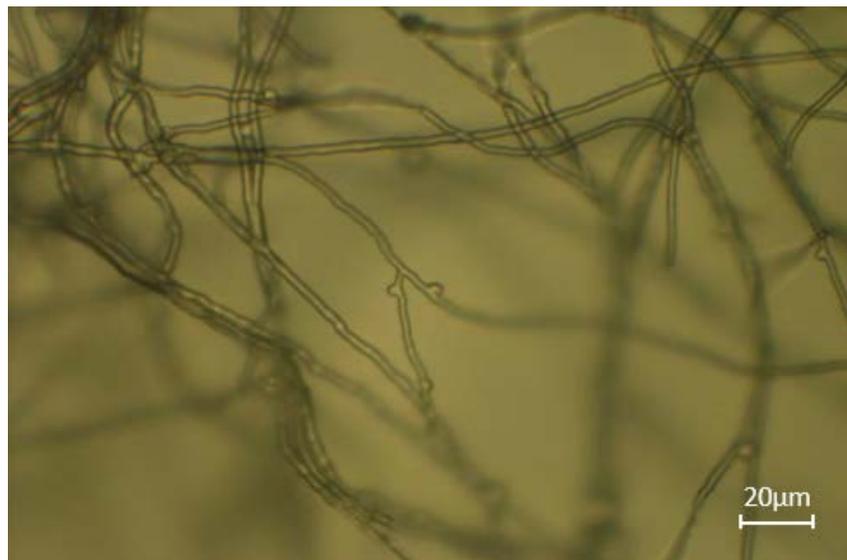


图 3.8 真姬菇光学显微镜镜检结果 (40×)

Fig. 3.8 The results of light microscope examination of *H.marmoreus* (40×)

## 4 真姬菇诱变株的栽培试验及 DUS 测试

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 供试菌株

由工厂提供的真姬菇生产菌种，即出发菌株蟹味菇 Q1-Y，白玉菇 HW-7；第三章中通过 ARTP 诱变筛选出的蟹味菇 XWG-1、2、3、4、5、6、7、8，BYG-1、2、3、4。

#### 4.1.2 主要仪器设备

表 4.1 主要仪器设备

Table 4.1 The main instruments and equipment

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
电热恒温培养箱	DRP-9082	上海森信实验仪器有限公司
自动蒸汽高压灭菌锅	MLS-3750	日本三洋电子生物有限公司

#### 4.1.3 试剂及药品

玉米芯、木屑、棉籽壳、麸皮、玉米粉

#### 4.1.4 常用培养基配方

##### 1、PDA 培养基

同 2.1.4。

##### 2、原种及栽培种培养基

棉籽壳 40%、木屑 38%、麸皮 15%、玉米粉 5%、石灰 2%，含水量 63-65%，pH 7.5-8.0，高压蒸汽灭菌，0.15 MPa 压力下灭菌 2 h。

### 4.2 实验方法

#### 4.2.1 真姬菇诱变株和原种栽培

##### 4.2.1.1 真姬菇母种的制备

真姬菇母种培养基为 PDA 培养基，按照 3.2.3 中筛选诱变株时对培养基的要求制备 PDA 平板。取出待测的 14 株真姬菇菌丝，打孔接种至新的 PDA 平板表面，每种 15 个重复，25 °C 暗培养 13-15 d，期间观察并记录菌丝生长状况。此时要特别注意菌丝生长状况及其他杂菌的污染，若出现污染情况则要及时清理，最终选取菌丝性状优良的平板

进行原种的制备。

#### 4.2.1.2 真姬菇原种的制备

根据 4.1.4 中原种培养基的配方配置培养基，待培养基灭菌冷却后即可接种。在接种室内完成接种操作，进入接种室前需穿戴实验服、帽子、鞋套等，进行清洁消毒后方可进入。接种时两人同时在酒精灯火焰旁进行操作，一人负责原种瓶的开关，一人负责接种，每个长满菌丝的 75 mm 平板约接种 8 个原种瓶。接种过的原种瓶置于 20-24 °C 的恒温室内进行发菌，一般需培养 40-45 d，期间室内保持黑暗环境，空气相对湿度保持在 60%-70%，保持室内通风，保持 CO<sub>2</sub> 浓度低于 0.3%，定期观察菌丝生长状况，若发现菌丝生长异常或有其他杂菌污染，则须及时清理。待菌丝长满后，挑选性状优良的原种瓶进行栽培种的制备。

#### 4.2.1.3 真姬菇栽培种的制备

真姬菇栽培种的培养基配置、接种及发菌过程同 4.2.1.2 一致，接种量控制在 5% 左右（侯祥保等，2018）。

真姬菇栽培种在长满瓶后还需进行长达 40-45 d 左右的菌丝生理成熟阶段，此时需继续保持原环境条件继续培养，待表面菌丝由白色转变为黄白色，菌丝明显粗壮并呈簇生长，培养料表面有水珠产生时，便完成了真姬菇菌丝的生理成熟，即俗称的后熟阶段，随后便对完成生理成熟的栽培瓶进行搔菌和催蕾等一系列操作。

#### 4.2.1.4 真姬菇出菇期管理及采收

完成后熟的栽培瓶需首先进行搔菌处理，过程中搔菌机会将栽培瓶瓶口的培养料去除，形成一个围绕瓶口的环状沟，从而使中央培养料形成丘陵状。此步操作的目的在于使菌丝受到外界刺激，而促进其由营养生长向生殖生长转变，是促进菌丝形成原基的重要过程。在完成搔菌后需向栽培瓶内注水，静待约 1 h 后，将培养料未吸收的水分倒净，以免造成杂菌污染。

完成搔菌操作后，便可将栽培瓶放置于出菇室内，首先暗培养 5-7 d，期间保持温度在 14-16 °C，空气相对湿度在 90%-95% 之间，此时瓶口开始逐渐出现绒毛状的菌丝，此时便可进行催蕾。催蕾阶段出菇室内温度应控制在 12-14 °C，空气相对湿度保持不变，需进行 100 lx 左右强度的弱光催蕾，培养 7 d 左右便可看到菇蕾，此时便可进入出菇期管理。

在栽培瓶现蕾后，出菇室温度应调回 14-16 °C，空气相对湿度仍然保持不变，光照强度调整在 500 lx 左右，此时 CO<sub>2</sub> 浓度应保持在 0.2% 左右，继续培养 14 d 左右即可采收。完成采收后需及时清理废料，并对出菇房进行清洁和消杀。

## 4.2.2 真姬菇诱变株和出发菌株的 DUS 测试与分析

### 4.2.2.1 取样方法和测量方法

#### 1、子实体取样方法

对蟹味菇、白玉菇出发菌株和诱变株共计 14 株进行 4.2.1 所述的工厂化生产，每个品种各栽培 384 瓶，分三大区摆放，每大区分为 8 小区，每小区 16 瓶，成 4×4 摆放，从中随机取样进行菌株子实体性状测试，每株取样 32 瓶，对一个子实体群体中子实体个体的取样数量为 3 个，测量值取三个个体的平均值。取样时将真姬菇子实体整朵从栽培瓶上取下，清理子实体底部多余的栽培料，清理干净子实体用于 DUS 测试。对 14 株待测定的真姬菇均进行两个独立生长周期的测定。

#### 2、测试性状

根据中华人民共和国农业行业标准《植物品种特异性、一致性和稳定性测试指南-真姬菇》的测试要求，共测定待测子实体 28 个性状，如表 4.2 所示，其中菌丝性状 7 个、菌盖性状 9 个、菌褶 3 个、菌柄 4 个、子实体群体 4 个。所有测试性状中数量性状 19 个、质量性状 4 个、假质量性状 5 个，需群体目测性状 16 个、群体测量性状 8 个、个体测量性状 4 个。将待测定的 28 个性状按照测试指南标准分为若干个不同的等级，各等级要求如 4.2.2.1 中测量方法中所描述。

表 4.2 真姬菇测试性状表

Table 4.2 The table of test characters of *H.marmoreus*

性状编号	性状名称	性状类别	测量方式
1	拮抗反应	QL	VG
2	菌丝：浓密程度	QN	VG
3	菌丝：10℃生长速度	QN	MG
4	菌丝：15℃生长速度	QN	MG
5	菌丝：20℃生长速度	QN	MG
6	菌丝：25℃生长速度	QN	MG
7	菌丝：30℃生长速度	QN	MG
8	菌盖：纵切面形状	PQ	VG
9	菌盖：表面斑点数量	QN	VG
10	菌盖：斑点大小	QN	VG
11	菌盖：斑点分布状态	QL	VG
12	菌盖：斑点清晰度	QN	VG
13	菌盖：直径大小	QN	MS
14	菌盖：中部主要颜色	PQ	VG
15	菌盖：边缘主要颜色	PQ	VG
16	菌盖：厚度	QN	MS
17	菌褶：颜色	PQ	VG
18	菌褶：排列方式	QL	VG
19	菌褶：密度	QN	VG
20	菌柄：长度	QN	MS
21	菌柄：直径	QN	MS
22	菌柄：颜色	PQ	VG
23	菌柄：绒毛	QN	VG
24	子实体：着生状态	QL	VG
25	子实体：产量	QN	MG
26	子实体：数量	QN	VG
27	接种至原基形成时间	QN	MG
28	苦味	QN	MG

注：MG-群体测量；MS-个体测量；VG-群体目测；QL-质量性状；QN-数量性状；PQ-假质量性状。

### 3、测量方法

#### 菌丝性状的测量

##### (1) 拮抗反应

按照 3.2.3 中第二轮筛选的方法, 将蟹味菇诱变株 XWG-1、2、3、4、5、6、7、8 与出发菌株 Q1-Y, 白玉菇诱变株 BYG-1、2、3、4 与出发菌株 HW-7 依次分别接种至新的 PDA 平板两端, 25 °C 暗培养 14 d 左右即可对平板菌丝的生长状况进行观察。该性状被分为两个不同等级, 若诱变株与出发菌株存在拮抗现象则标记为 1, 若不存在拮抗现象则标记为 2。出发菌株则与自身进行拮抗实验, 根据实验结果分别进行标记。由于蟹味菇和白玉菇产生拮抗现象的清晰程度不同, 白玉菇拮抗平板需对正、反两面同时进行观察, 若两面中有一面有明显拮抗现象则标记为 1, 若两面都未产生拮抗现象则标记为 2。

##### (2) 菌丝性状

依据 3.2.3 中第三轮筛选的接种方法, 分别接种用于测试的 14 株真姬菇菌株, 每株接种 25 个平板, 分别标号 1-25, 1-5 号、6-10 号、11-15 号、16-20 号、21-25 号分别为一组, 依次置于 10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C 的恒温培养箱中暗培养。

待 25 °C 恒温培养箱中的真姬菇平板上, 菌丝生长至平板的 2/3 处时, 对平板菌丝进行性状 2 菌丝稠密程度的观察。该性状被分为三个等级, 即稀疏、一般和稠密。对 14 株菌丝同时进行观察, 若菌丝为薄薄一层且较为稀疏则标记为 1, 若菌丝距平板有一定厚度但菌丝间仍可见些许空隙则标记为 2, 若菌丝距平板厚度明显且菌丝排列密集, 菌丝间并无间隙则可标记为 3。

性状 3-7 在真姬菇菌丝接种后的第 4 天开始测量至第 10 天结束, 此时所有培养温度下的菌丝均有一定程度的生长且还未长满全板, 每日于相同时间段对 5 组平板上菌丝直径进行测量。测量时使用游标卡尺自平板背面进行测定, 测量数据精确至小数点后 2 位。由于打孔接种菌丝时, 接种块上菌丝纵向排列两端生长较菌丝横向排列两端要略微快一些, 因此测量过程中全部选取菌丝纵向排列方向进行测定, 并标记每次测量位置, 以减少由测量位置不同所造成的误差。此外由于培养皿底部和培养基均有一定的厚度, 可能会对菌丝边缘的界定造成一定的误差, 测量时按照统一界定标准执行以减少操作误差。培养基本身的差异也会对测量结果带来误差, 在倾斜的 PDA 培养基表面可以清楚的看到, 培养基较厚一侧的菌丝生长更好, 较薄一侧的菌丝则生长速度减缓, 而在培养基过薄或过厚的均匀培养基表面也同样可以观察到菌丝生长变缓的现象, 因此需注意所使用的 PDA 平板要厚度适中、均匀且表面光滑不倾斜, 以减少因培养物带来的误差。测量过程中还需注意, 不要一次性将所有平板全部拿出培养箱, 在室温下等待测量, 应

当一组一组完成测量过程，以避免在室温下放置时间过长，而由温度变化所引起的菌丝生长差异。完成测量后将测量数据按照以下处理方法进行数据分析。

$$S = \frac{(D_{10}-D_9) + (D_9-D_8) + (D_8-D_7) + (D_7-D_6) + (D_6-D_5) + (D_5-D_4)}{2 \times 6} \quad \text{式 (4.1)}$$

注：S 为同一平板的菌丝生长平均速度 (cm/d)；D<sub>10</sub>、D<sub>9</sub>、D<sub>8</sub>、D<sub>7</sub>、D<sub>6</sub>、D<sub>5</sub>、D<sub>4</sub> 分别为生长第 10、9、8、7、6、5、4 天的菌落直径。

每组首先按照上式计算每个平板的菌丝平均生长速度，接着按照下式计算出同一菌株在同一温度下 5 个平板的平均生长速度。

$$A = (S_1 + S_2 + S_3 + S_4 + S_5) / 5 \quad \text{式 (4.2)}$$

通过上述计算最终分别得到每株菌不同生长温度下的平均生长速度。

### (3) 菌盖性状

按照 4.2.1 的栽培过程完成对真姬菇出发菌株和诱变株共计 14 株菌株的工厂化栽培，并在采收当天对随机取样的子实体完成菌盖性状测定，其中性状 8-12、14、15 采用群体观察的方法进行判定，性状 13、16 采用个体测量的方法进行测定，在进行个体测量时应该尽量选取同一生长状况的子实体进行测量。

首先对随机取样的子实体群体进行菌盖表面斑点数量、大小、分布状态、清晰度进行观察即性状 9-12，在真姬菇菌盖表面会有不规则的浅色纹路存在，这些纹路所围绕形成的形状不规则的区域被称为斑点。对取样选出的 14 株菌株子实体群体同时进行观察，斑点数量被分为 3 个等级即少、中、多，按照观察结果对 14 株真姬菇进行界定，斑点数量少的标记为 1，此种情况多为斑点大或斑点集中于菌盖中部所造成的，斑点数量中的标记为 2，此种子实体菌盖斑点大多大小适中或分布均匀，斑点数量多的标记为 3，此种情况多为纹路错综复杂造成的斑点小而杂。斑点大小同样被分为 3 个等级，斑点小的标记为 1，斑点大小居中的则标记为 2，斑点大的则被标记为 3。菌盖斑点分布状态分为 2 个等级，若斑点仅在菌盖中部存在边缘不存在则标记为 1，若斑点在菌盖上均匀分布，从顶部至边缘均有斑点则被标记为 2。菌盖表面斑点的清晰程度被分为 3 个等级，若纹路颜色与菌盖颜色差异很小造成菌盖表面斑点极不清晰则被标记为 1，若纹路颜色与菌盖颜色差异情况适中，斑点较为清晰则标记为 2，若纹路颜色与菌盖颜色差异明显，菌盖斑点清晰可见则标记为 3。

随后对性状 14、15 进行观察，均被分为 4 个等级。在对菌盖中部颜色进行观察时，只对菌盖中部颜色最深的位置进行观察记录，若为白色则标记为 1，若为较浅的褐色则被标记为 2，若为正常褐色则标记为 3，若为较深的暗褐色则标记为 4。菌盖边缘的颜色应当从菌盖上方俯视观察，不要将子实体反转，观察过程中只对正常生长态势的子实体

进行观察，不对已开伞的子实体进行观察，菌盖边缘为白色标记为 1、浅褐色标记为 2、褐色标记为 3、暗褐色则标记为 4，颜色判定标准应当同菌盖中部颜色判定标准一致，可在开始测量前从全部的子实体中选取代表性的子实体个体作为参考标准，以免长时间的观察对颜色判断造成误差。

接下来对菌盖直径和厚度进行测量即性状 13、16，取所有菌生子实体最中间生长点的 3 个个体进行测量，使用游标卡尺，对俯视菌盖的最宽处进行测量，标记为菌盖直径，对菌盖正视最高处与最低处间的高度进行测量，标记为菌盖厚度，依次对所有个体完成两组数据的测量和记录，测量数据精确到小数点后 2 位。

最后对进行完性状 13、16 测量的子实体个体纵切，用锋利的手术刀从菌盖顶端最中央处垂直切开菌盖，此时要注意不要用力过大对菌盖造成挤压从而改变其性状，若菌盖中央纵切面呈现较为平缓的圆弧状或呈现较平缓的椭圆形则被标记为 1，若菌盖中央纵切面为较规整的圆形则被标记为 2，若菌盖顶部明显看到有突起圆弧，菌盖两边凹陷，整体呈现凸字形时则标记为 3。

#### (4) 菌褶性状

按照 4.2.1 的栽培过程完成对真姬菇出发菌株和诱变株共计 14 株菌株的工厂化栽培，并在采收当天对随机取样的子实体完成菌褶性状测定，性状 17-19 全部采用群体观察的方法进行测定，可在测量前找到标准子实体作为参考，以防长时间观察对结果造成视觉误差。

将整朵真姬菇子实体反转，观察菌褶性状 17-19。菌褶颜色被分为 4 个等级，若菌褶呈现白色则标记为 1，若菌褶为略微发黄的黄白色则标记为 2，若菌褶为浅橙黄色则标记为 3，若菌褶为略微发黄的灰黄色则标记为 4。菌褶的排列方式被分为 2 个等级，若菌褶以菌柄为圆心，竖直呈现放射状排列则被标记为 1，若菌褶不是竖直状态而是呈现波浪状排列则标记为 2。菌褶密度被分为 3 各等级，菌褶排列稀疏的被标记为 1，菌褶排列密度适中则标记为 2，若菌褶排列密集则被标记为 3。

#### (5) 菌柄性状

按照 4.2.1 的栽培过程完成对真姬菇出发菌株和诱变株共计 14 株菌株的工厂化栽培，并在采收当天对随机取样的子实体完成菌柄性状测定，其中性状 20、21 采用个体测量的方法进行测定，测量个体使用上述菌盖测量时所选取的所有个体，与其一一对应，性状 22 则采用群体观察的方法进行判定。

使用游标卡尺进行性状 20、21 的测定，测量数据精确至小数点后 2 位。对菌柄长度的测量应当从菌盖与菌柄的衔接处作为最顶端，以子实体着生于培养基的末端位置作为最低端，测量两者之间的距离，标记为菌柄长度，此处需注意子实体个体应当选取菌

柄竖直无弯曲或有轻微弯曲的个体，以减少测量时因角度问题产生的误差。菌柄直径的测量应当在菌柄最宽处进行，正视子实体个体，量取子实体最宽处的直径标记为性状 21。

菌柄颜色性状被分为 4 个等级，在进行观察时，应当对菌柄最宽处至菌盖、菌柄交界处之间的颜色进行观察，不对菌柄最宽处下部已露出子实体内部颜色的部分进行观察，若菌柄呈现没有杂质的白色则标记为 1，若菌柄为略带黄色的黄白色则标记为 2，若菌柄呈现灰色则被标记为 3，若菌柄呈现较深的灰褐色则被标记为 4。

#### (6) 子实体

按照 4.2.1 的栽培过程完成对真姬菇出发菌株和诱变株共计 14 株菌株的工厂化栽培，并在采收当天对随机取样的子实体完成性状测定，其中性状 23、25 采用群体观察的方法进行判定，性状 24 采用群体测量的方法进行测定。

性状 23 被分为 2 个等级，自正面平视观察整朵子实体的形态状态，若子实体排列较为紧凑，子实体个体间的空隙很小，整体呈现簇生状态则标记为 1，若子实体个体间空隙较明显，个体排列较松散，整体呈现散生的状态则被标记为 2。

子实体产量以整朵子实体重量来记录，使用电子天平对子实体重量进行测定，数据精确至小数点后 1 位，在称量时需注意将子实体底部培养料清理干净，若有散落的子实体个体应当加入到整朵子实体的总重量中。

子实体数量的测定通过对整朵子实体中子实体个体的数量观察来进行，该性状被分为 3 个等级，若子实体个体数量较少则被标记为 1，若子实体个体数量适中则标记为 2，若子实体个体数量较多则标记为 3。

#### (7) 接种至原基形成时间

按照 4.2.1 的栽培过程完成对真姬菇出发菌株和诱变株共计 14 株菌株的工厂化栽培，并在栽培过程中完成性状测定，该性状采用群体测量的方式进行，自接种之日起记录每个栽培瓶中形成原基的时间，并依次做好记录。

#### (8) 味道

按照 4.2.1 的栽培过程完成对真姬菇出发菌株和诱变株共计 14 株菌株的工厂化栽培，并在采收当天对随机取样的子实体完成味道性状测定，通过品尝的方式来进行该性状的测试，取所有子实体菌柄中部的肉质进行品尝，若没有苦味或有极弱的苦味则被标记为 1，若苦味较弱但能明显品尝出则标记为 2，若苦味强烈则标记为 3。

### 4.2.2.2 数量性状分级及统计

#### 1、数量性状分级

需对测量结果进行分级的数量性状共 11 个，其中菌丝性状 5 个、菌盖 2 个、菌柄 2 个、子实体产量 1 个、形成原基时间 1 个。

通过 Excel 计算出 14 株真姬菇每个性状测量数据的最小值、最大值、平均值、中值、标准差和变异系数，按照级差大于等于 2 倍平均标准差的要求，依据式 4.3-4.5 对各数量性状进行分级（褚云霞等，2015）。

$$\text{极差} = \text{最大值} - \text{最小值} \quad \text{式 (4.3)}$$

$$\text{级数 1} = \text{极差} / (\text{标准差平均值} \times 2) \quad \text{式 (4.4)}$$

级数 2 是级数 1 按照 1、3、5、7、9 的就小取值

$$\text{级差} = \text{极差} / \text{级数 2} \quad \text{式 (4.5)}$$

分级数是根据中值和级差而确定的、连续的不同数据分布范围的数量。

## 2、数量性状统计

依据 1 中方法对 11 个数量性状分别进行分级后，将测试的性状数据根据分级情况，转换成对应等级。其中群体和个体测量性状均按照菌株取平均后的数据进行定级。

### 4.2.2.3 相关性和聚类分析

按照 4.2.2.1 和 4.2.2.2 中所述方法对所有测试性状进行分级，并将 14 株真姬菇对应性状的分级进行统计，绘制性状矩阵，其中性状按列排列，自上而下依次为 C1-C28，分别对应表 4.2 中性状 1-28；不同真姬菇菌株样品横向排列，依次标注 Q1-Y、X1-8、HW-7、B1-4，矩阵不存在缺失数据。

将得到的性状矩阵用多变量分析系统 NTSYSpc 2.10 统计软件中的 SM 法计算各性状间的遗传相似系数，然后根据得到的相似系数用 SAHN Clustering 和非加权重对算术平均法（UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean）进行聚类分析（褚云霞等，2016），得到聚类树状图，依据聚类树状图结果对 14 株真姬菇进行分析比较。

## 4.3 实验结果

### 4.3.1 真姬菇 DUS 数量性状分级

14 个品种的 11 个数量性状的分布范围和标准差范围如表 4.3 所示。

表 4.3 真姬菇 11 个数量性状的分布范围

Table 4.3 The distribution range of 11 quantitative characters of *H.marmoreus*

(单位: cm or g or d)

性状编号	品种间范围	品种内标准差范围
3	0.33-0.92	0.03-0.12
4	1.00-1.67	0.03-0.15
5	2.50-3.17	0.02-0.19
6	2.71-3.63	0.03-0.10
7	1.13-2.00	0.04-0.17
13	0.71-2.14	0.16-0.24
16	0.27-1.24	0.10-0.18
20	3.32-7.21	0.54-0.87
21	0.60-1.73	0.14-0.21
25	92.4-291.4	21.11-45.66
27	83-85	0.31-0.71

表 4.4 真姬菇 11 个数量性状的数据

Table 4.4 The data of 11 quantitative characters of *H.marmoreus*

(单位: cm or g or d)

性状 编号	最小 值	最大 值	平均 值	中值	平均 标准 差	平均变 异系数 (%)	级数 1	级数 2	级差	分级 数
3	0.33	0.92	0.70	0.71	0.08	11.02%	3.83	3	0.19	5
4	1.00	1.67	1.39	1.38	0.08	5.60%	4.38	3	0.22	5
5	2.50	3.17	2.83	2.83	0.08	2.67%	4.44	3	0.22	5
6	2.71	3.63	3.11	3.17	0.07	2.32%	6.34	5	0.18	9
7	1.13	2.00	1.53	1.46	0.09	5.82%	4.95	3	0.29	5
13	0.71	2.14	1.30	1.29	0.19	14.76%	3.76	3	0.48	5
16	0.27	1.24	0.73	0.73	0.13	18.58%	3.62	3	0.32	5
20	3.32	7.21	5.74	5.83	0.70	12.25%	2.78	1	3.89	3
21	0.60	1.73	1.03	1.03	0.16	15.79%	3.47	3	0.38	5
25	92.4	291.4	199.0	199.6	31.68	16.03%	3.14	3	66.33	5
27	83	85	84.30	84.00	0.49	0.59%	2.03	1	2.00	3

11 个数量性状的最小值、最大值、平均值、中值及平均标准差和变异系数如表 4.4 所示。所有数量性状的变异系数从自 0.59%-18.58%不等, 11 个数量性状分为 3-9 级不等。其中, 性状 6 菌丝在 25 °C 下的生长速度被分为 9 级, 其余菌丝生长速度 (性状 3-5、7)、性状 13 菌盖直径、性状 16 菌盖厚度、性状 21 菌柄直径、性状 25 子实体产量共分为 5 级, 性状 20 菌柄长度、原基形成时间分为 3 级。

表 4.5 展示了 11 个数量性状的具体分级数据, 根据测量结果, 将 14 株真姬菇的各个数量性状标记为 1-9 的不同等级。

表 4.5 真姬菇 11 个数量性状的分级

Table 4.5 The classification of 11 quantitative characters of *H.marmoreus*

(单位: cm or g or d)

性状 编号	分级								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	≤0.42	0.43- 0.61	0.62- 0.81	0.82- 1.00	≥1.01				
4	≤1.04	1.05- 1.26	1.27- 1.49	1.50- 1.71	≥1.72				
5	≤2.49	2.50- 2.71	2.72- 2.94	2.95- 3.16	≥3.17				
6	≤2.53	2.54- 2.71	2.72- 2.89	2.90- 3.07	3.08- 3.26	3.27- 3.44	3.45- 3.62	3.63- 3.80	≥3.81
7	≤1.02	1.03- 1.31	1.32- 1.61	1.62- 1.90	≥1.91				
13	≤0.56	0.57- 1.04	1.05- 1.53	1.54- 2.01	≥2.02				
16	≤0.24	0.25- 0.56	0.57- 0.89	0.90- 1.21	≥1.22				
20	≤3.88	3.89- 7.78	≥7.79						
21	≤0.45	0.46- 0.83	0.84- 1.22	1.23- 1.60	≥1.61				
25	≤100.0	100.1- 166.3	166.4- 232.7	232.8- 299.1	≥299.2				
27	≤82	83-85	≥86						

在 11 个数量性状中, 大多数样品集中分布在中间级数 (表 4.6 所示), 少数分布于两端。性状 6 中没有样品分布于 1、8、9 级, 多数集中于 3-6 级; 性状 3、4、5、7、13、16、21、25 的样品大多分布于 2-4 的等级内, 极少数个体分布于 1、5 级; 性状 20、27

中，绝大多数样品分布于 2 级，少数分布于 1 级，没有样品分布于 3 级。

表 4.6 真姬菇 11 个数量性状的分布频次

Table 4.6 The distribution frequency of 11 quantitative characters of *H.marmoratus*

(单位: cm or g or d)

性状 编号	各级别分布频次								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	1	9	48	12	0				
4	2	10	37	21	0				
5	0	15	41	14	0				
6	0	2	16	12	14	22	3	0	0
7	0	18	20	24	0				
13	0	96	653	146	1				
16	0	107	649	140	0				
20	20	876	0						
21	0	129	673	92	2				
25	5	152	561	178	0				
27	0	896	0						

#### 4.3.2 真姬菇诱变株和出发菌株子实体产量分析

蟹味菇出发菌株 Q1-Y 在本次 DUS 测试中的平均产量为 219.10 g (表 4.7)，单瓶产量最低为 128.7 g，单瓶产量最高为 273.4 g，变异系数为 12.69% 可认为具有一致性。在所有的蟹味菇诱变株中 XWG-7、8 的单瓶平均产量略高于出发菌株，分别为 223.22 g、227.58 g，相较于出发菌株产量分别多出 1.88%、3.87%，变异系数分别为 16.73%、12.51%，两者中 XWG-8 的产量更多且变异系数小于出发菌株，但 XWG-7、8 的单瓶平均产量数据与出发菌株不存在显著性差异，因此认为在单瓶平均产量方面，XWG-7、8 表现略优于出发菌株 Q1-Y，且 XWG-8 其单瓶最大产量达到 291.4 g，变异系数也略低于出发菌株 Q1-Y，经过进一步育种驯化，平均产量可继续提升。XWG-1、2 的单瓶平均产量与出发菌株相差不大，分别为 217.67 g、218.12 g，变异系数分别为 12.64%、14.52%，与出发菌株均无显著性差异。其余几个诱变品种 XWG-3、4、5、6 单瓶平均产量均低于出发菌株，分别为 194.21 g、188.60 g、205.76 g、199.21 g，均与出发菌株 Q1-Y 有显著性

差异，变异系数分别为 22.45%、24.21%、16.56%、22.80%，其中 XWG-3、4、6 的变异系数均高于 20%，且产量与出发菌株差异极显著，因此这 4 株蟹味菇被认为不具有—致性，菌株产量性状差异大、不稳定，不适于生产使用。

表 4.7 真姬菇单瓶产量数据分析

Table 4.7 The analysis of single bottle yield data of *H.marmoreus*

菌株名称	最小值 (g)	最大值 (g)	平均值 (g)	中值 (g)	标准差	变异系数	极差
Q1-Y	127.9	273.4	219.10	222.35	27.85	12.71%	145.50
XWG-1	128.7	264.0	217.67	220.25	27.51	12.64%	135.30
XWG-2	133.8	286.7	218.12	224.50	31.67	14.52%	152.90
XWG-3	103.9	262.8	194.21	198.75	43.60	22.45%	158.90
XWG-4	93.5	291.4	188.60	190.40	45.66	24.21%	197.90
XWG-5	103.9	266.3	205.76	208.15	34.07	16.56%	162.40
XWG-6	92.4	286.7	199.21	199.90	45.43	22.80%	194.30
XWG-7	104.7	287.3	223.22	228.45	37.34	16.73%	182.60
XWG-8	135.0	291.4	227.58	230.70	28.47	12.51%	156.40
HW-7	106.6	216.9	185.10	190.05	21.11	11.40%	110.30
BYG-1	124.4	228.7	190.74	191.70	21.80	11.43%	104.30
BYG-2	103.9	216.9	184.97	187.30	21.94	11.86%	113.00
BYG-3	92.4	207.8	160.21	158.00	30.58	19.09%	115.40
BYG-4	92.9	201.3	171.60	180.90	26.53	15.46%	108.40

白玉菇出发菌株 HW-7 的平均单瓶产量为 185.10 g，单瓶产量最低为 106.6 g，最高为 216.9 g，变异系数为 11.40%。白玉菇诱变株中，BYG-1 的单瓶平均产量达到 190.74 g，比出发菌株产量高出 3.05%，与出发菌株没有显著性差异，单瓶最低产量为 124.4 g、最高产量为 228.7 g，均高于出发菌株产量，变异系数为 11.43%，因此认为其具有—致性。BYG-2 的单瓶平均产量为 184.97 g，产量与出发菌株没有显著性差异，变异系数为 11.86%，同样具有—致性。BYG-3、4 单瓶平均产量均低于出发菌株，分别为 160.21 g、171.60 g，与出发菌株均存在极显著的差异，变异系数分别为 19.09%、15.46%均高于出发菌株。因此认为 BYG-1 在单瓶产量方面表现略优于出发菌株 HW-7，可对其开展进一步的育种，从而再次提高并稳定产量。

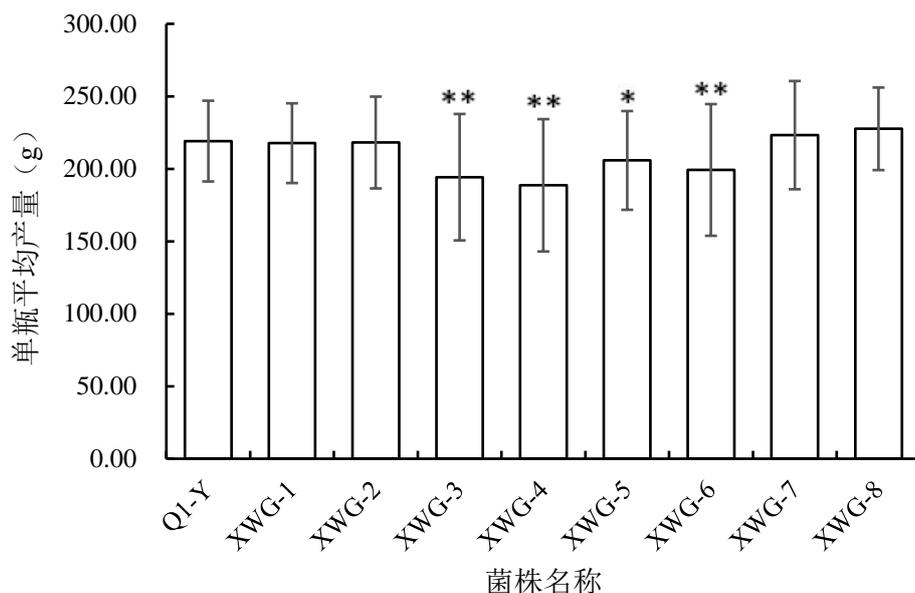


图 4.1 蟹味菇单瓶产量数据分析

Fig. 4.1 The analysis of single bottle yield data of gray *H.marmoreus*

注：与出发菌株 Q1-Y 单瓶平均产量进行比较，当  $p < 0.01$ ，为差异极显著，用\*\*表示； $0.05 \geq p > 0.01$ ，为差异显著，用\*表示； $p > 0.05$ ，为差异不显著，不做标注。

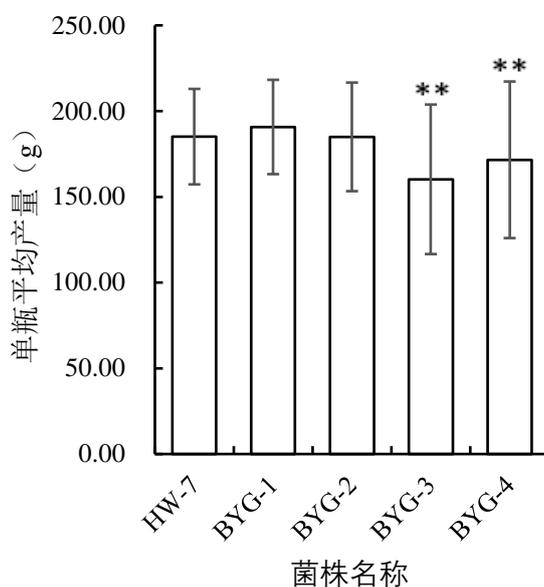


图 4.2 白玉菇单瓶产量数据分析

Fig. 4.2 The analysis of single bottle yield data of white *H.marmoreus*

注：与出发菌株 HW-7 单瓶平均产量进行比较，当  $p < 0.01$ ，为差异极显著，用\*\*表示； $0.05 \geq p > 0.01$ ，为差异显著，用\*表示； $p > 0.05$ ，为差异不显著，不做标注。

### 4.3.3 聚类分析

利用 UPGMA 法对 14 个真姬菇菌株进行了聚类分析，结果如图 4.3 所示，其中在遗传相似系数为 0.68 时，所测试的 14 株真姬菇可被分为三类。

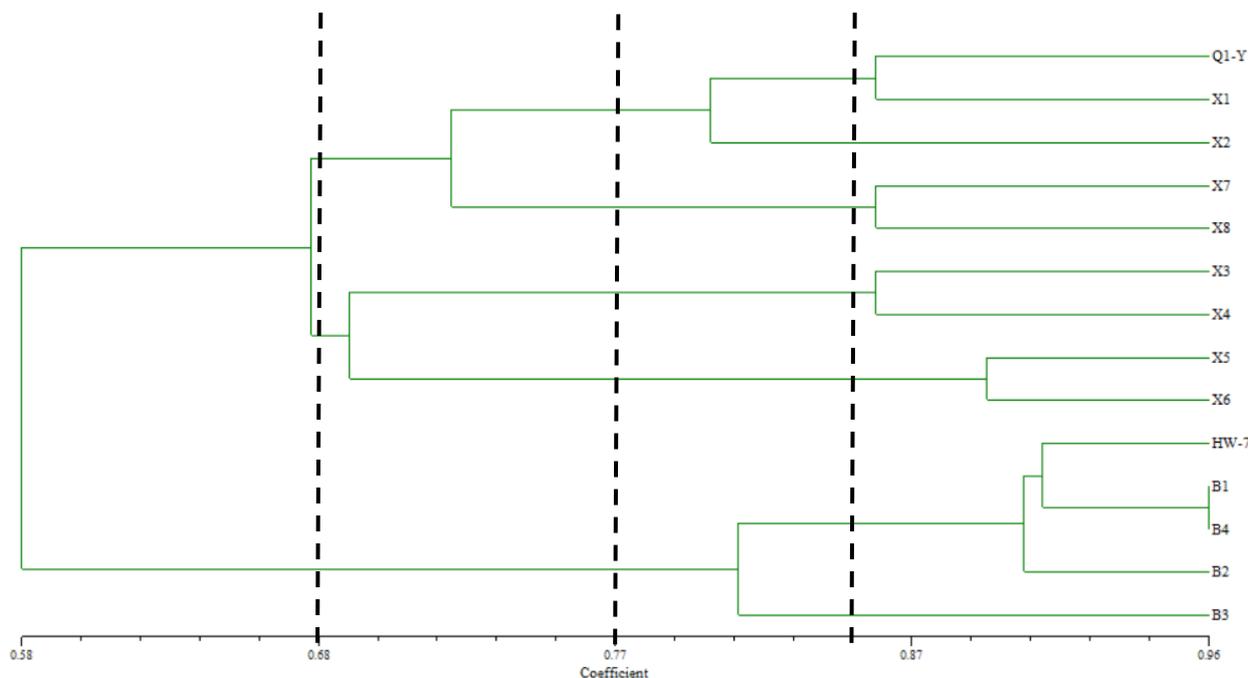


图 4.3 基于形态性状的 14 株真姬菇的聚类分析

Fig. 4.3 The cluster analysis of 14 strains of *H. marmoreus* based on morphological characters

注：Q1-Y 为蟹味菇出发菌株；X1-8 分别为蟹味菇诱变株 XWG-1-8；HW-7 为白玉菇出发菌株；B1-4 分别为为白玉菇诱变株 BYG-1-4。

第一类包括蟹味菇出发菌株 Q1-Y、蟹味菇诱变株 XWG-1、XWG-2、XWG-7、XWG-8，又可进一步将这五种蟹味菇分为两组，一组为蟹味菇出发菌株 Q1-Y、蟹味菇诱变株 XWG-1、XWG-2，这三株蟹味菇更为相似，另一组为蟹味菇诱变株 XWG-7、XWG-8。蟹味菇出发菌株 Q1-Y 菌丝白色，菌丝密度适中，菌丝多贴附于培养基表面，气生菌丝较少，菌丝尖端颜色较为透明，生长不整齐，在 25 °C 的最适温度下平均生长速度为 2.76 mm/d。蟹味菇诱变株 XWG-1、2、7、8 均与出发菌株菌丝有明显的拮抗现象，XWG-1 菌丝形态特征与出发菌株 Q1-Y 极为相似，气生菌丝数量少，最适温度下的生长速度优于出发菌株，可达 3.18 mm/d，XWG-2、7、8 则表现为菌丝洁白、稠密，气生菌丝多，菌丝尖端整齐，生长状况一致，最适条件下的生长速度分别为 3.28 mm/d、3.41 mm/d、3.25 mm/d，均优于出发菌株。蟹味菇出发菌株 Q1-Y、诱变株 XWG-1、2 的子实体整体呈现褐色，菌盖表面斑点数量和大小均适中，菌褶放射状呈黄白色，菌柄为灰色，三者子实体形态特征较为相似；蟹味菇诱变株 XWG-7、8 子实体整体呈现浅褐色，菌褶为黄

白色呈放射状，菌盖表面斑点清晰度高，XWG-7 的菌盖斑点数量多且小，XWG-8 则与第一组的三种蟹味菇类似。



图 4.4 Q1-Y 子实体照片

Fig. 4.4 The photo of fruiting body of *H.marmoreus* Q1-Y

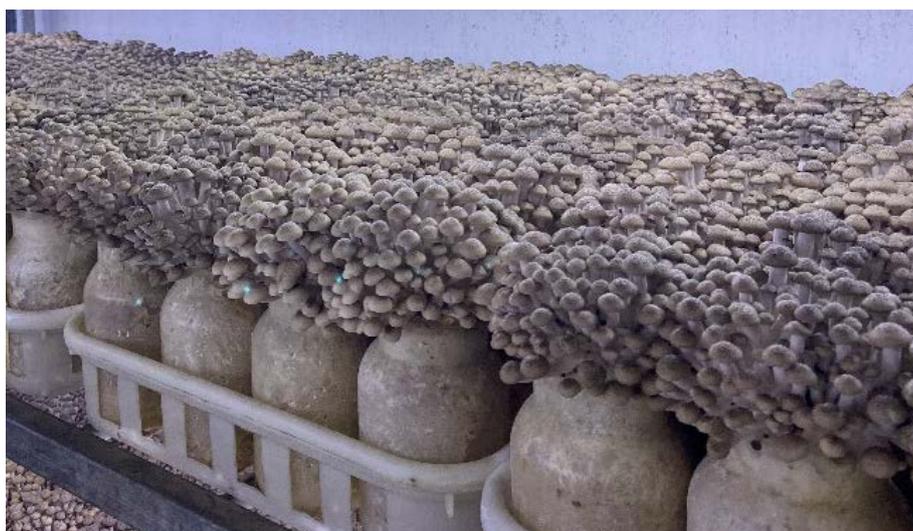


图 4.5 XWG-8 子实体照片

Fig. 4.5 The photo of fruiting body of *H.marmoreus* XWG-8

第二类包括蟹味菇诱变株 XWG-3、4、5、6，其中蟹味菇诱变株 XWG-3、4 更为相近，蟹味菇诱变株 XWG-5、6 更为相似。蟹味菇诱变株 XWG-3、4、5、6 均与出发菌株菌丝有明显的拮抗现象，四者菌丝形态较为相似，菌丝均洁白浓密，气生菌丝数量多，但 XWG-4 的菌丝相较于其他三者更为均一，在最适温度下的平均生长速度分别为 3.28 mm/d、3.47 mm/d、3.34 mm/d、3.31 mm/d，均优于出发菌株，生长速度最快的为 XWG-4。在子实体形态特征方面 XWG-3、4 整体呈现褐色，菌盖表面斑点清晰，斑点数量少而大，斑点集中分布在菌盖中央位置，菌褶为放射状呈黄白色，子实体产量差异系数大，均超过 20%，菌株生产不稳定。此外 XWG-4 目测子实体数量最少。XWG-5、6 子实体

呈暗褐色，颜色深于其余所有测试的蟹味菇菌株，菌褶呈现波浪状，XWG-5 菌盖表面斑点小、数量居中，斑点清晰程度居中，斑点均匀分布于整个菌盖表面，XWG-6 菌盖表面的斑点小、数量多，斑点清晰程度一般，且均匀分布于整个菌盖。XWG-6 的子实体产量变异系数同样高于 20%，不具备一致性和稳定性，XWG-5 子实体产量变异系数虽低于 20%，但产量远远低于出发菌株。

除上述特征外，还可明显看出 XWG-3、4、5、6 子实体中均存在两种性状，有明显的性状分离现象，XWG-3、4 多数为褐色子实体，少数为深褐色子实体（图 4.6），XWG-5、6 多数为深褐色子实体，少数为褐色子实体（图 4.7）。



图 4.6 XWG-3 子实体照片

Fig. 4.6 The photo of fruiting body of *H.marmoreus* XWG-3



图 4.7 XWG-5 子实体照片

Fig. 4.7 The photo of fruiting body of *H.marmoreus* XWG-5

第三类为白玉菇出发菌株 HW-7、白玉菇诱变株 BYG-1、BYG-2、BYG-3、BYG-4，其中白玉菇出发菌株 HW-7 与诱变株 BYG-1、BYG-4 更为相似，而诱变株 BYG-1、BYG-4 之间的相似度高达 0.96，在所有的白玉菇诱变株中，诱变株 BYG-3 与其他 4 种白玉菇相似性最低。白玉菇出发菌株 HW-7 菌丝为白色，菌丝浓密，气生菌丝丰富，菌丝尖端颜色略浅于菌丝根部，贴于培养基表面的菌丝生长略快，边缘较整齐，在 25 °C 的最适温度下平均生长速度为 2.90 mm/d。白玉菇诱变株 BYG-1-4 均与出发菌株有较为明显的拮抗现象，但没有蟹味菇诱变株与出发菌株明显。所有白玉菇诱变株菌丝的性状与出发菌株较为相似，均洁白且浓密，气生菌丝多，菌丝尖端颜色略浅于菌丝根部，贴于培养基表面的菌丝生长略快，边缘较整齐。其中在 25 °C 下平均生长速度最快的是 BYG-4，速度为 2.91 mm/d，其余几株诱变株生长速度均略低于出发菌株。5 种白玉菇子实体除 BYG-3 外，其余 4 种形态特征较为相似，均通体洁白，菌盖斑点不清晰，数量少而大，集中分布于菌盖中央，菌褶呈放射状，BYG-3 子实体同样通体洁白，菌盖表面斑点不清晰，集中分布于菌盖中央，但数量少，斑点大小适中，菌褶呈现波浪状，目测子实体数量略少于其他 4 种。所有白玉菇品种的产量变异系数均低于 20%，最低的为出发菌株 HW-7 和诱变株 XWG-1，分别为 11.40% 和 11.43%，最高的为 BYG-3，达到 19.09%，说明 BYG-3 的子实体一致性和稳定性均不如出发菌株和诱变株 BYG-1。



图 4.8 HW-7 子实体照片

Fig. 4.8 The photo of fruiting body of *H.marmoreus* HW-7



图 4.9 BYG-1 子实体照片

Fig. 4.9 The photo of fruiting body of *H.marmoreus* BYG-1

## 5 结论与讨论

### 5.1 结论

真姬菇原生质体制备与再生体系相对比较完善，主要的争议点在酶解时间对原生质体得率和再生率的影响，本研究针对这一问题进行优化，成功建立了真姬菇原生质体制备与再生完整体系。在该体系条件下，取打孔接种于 25 °C 摇床培养 4 d 的液体真姬菇菌球，选用广东微生物研究所的溶壁酶作为本实验酶解剂，酶液浓度为 15 mg/mL，用 0.6 M 甘露醇作为稳渗剂，按照酶液与菌丝为 10:1 (V:W) 的比例进行混合，于 30 °C 恒温振荡摇床酶解 2.5 h 后，脱脂棉过滤一次，300 目筛网过滤一次，稳渗剂清洗后，可确保每 g 菌丝制备得到  $10^8$  数量级的原生质体悬液 1 mL，经过 RM 培养基再生后，再生率可达 2.46%，经过计算，每 g 菌丝平均可再生得到真姬菇单菌落数量达  $10^6$  数量级，为真姬菇育种提供了充足的细胞资源。

由于 ARTP 诱变育种技术有着例如操作简便、过程无毒无害、成本低等诸多优点，因此本研究选择利用 ARTP 诱变技术对真姬菇进行新品种的选育，又因真菌细胞壁过厚会对诱变效果大打折扣，因此制备真姬菇原生质体，通过对原生质体进行诱变来提高有效诱变率。

本研究成功绘制了真姬菇原生质体 ARTP 诱变致死曲线，发现在诱变 40 s 时致死率便达到 80.37%，诱变 60 s 时致死率已超过 90.00%，根据致死曲线数据和菌丝形态特征成功构建了真姬菇原生质体 ARTP 诱变及筛选体系，可完整且有效的针对真姬菇原生质体进行 ARTP 诱变育种及筛选。该体系条件为，功率 130 W，气量 12.00 sLM，诱变时间为 40-50 s，诱变后的样品洗涤 1 min，按照原生质体再生的方式进行再生培养。通过诱变，我们共获得诱变后的蟹味菇单菌落 121 个、白玉菇单菌落 272 个。随后根据制定的菌丝性状筛选标准，对所有蟹味菇和白玉菇诱变单菌落进行 4 轮筛选，最终筛选出菌丝性状优良的蟹味菇 8 株、白玉菇 4 株。经过光学显微镜镜检，所有 12 株真姬菇诱变株全部为双核菌丝，均可用于栽培试验。

依据工厂化的真姬菇栽培模式，对真姬菇出发菌株及诱变株共计 14 株菌进行栽培试验。经过母种制备、原种制备、栽培种制备、搔菌、催蕾及出菇管理等一系列过程，12 株诱变株全部成功出菇，随后在对其进行 DUS 测试及数据分析的过程中，完成对 14 株真姬菇菌种的比较工作。

根据行业标准要求，真姬菇 DUS 测试共需进行 28 个性状的测试，其中包括菌丝性状 7 个，子实体群体性状 5 个、菌盖性状 9 个、菌褶性状 3 个、菌柄性状 4 个。菌丝性

状的测试在实验室内完成,子实体性状的测试均在栽培试验采收当天完成,共进行了两个独立生长周期的测定。在所有性状中需进行分级数量性状有 11 个,其中性状 6 分为 9 级、性状 3-5、7、13、16、21、25 共分为 5 级,性状 20、27 被分为 3 级,其余性状分级状况均按照真姬菇 DUS 测试指南所述。将被测试的 14 株真姬菇的所有性状按照对应等级进行标注,转化成数字矩阵,通过性状相似性和聚类分析发现,在遗传相似系数为 0.68 时,所测试的 14 株真姬菇可被分为三类。第一类包括蟹味菇出发菌株 Q1-Y、蟹味菇诱变株 XWG-1、2、7、8;第二类包括蟹味菇诱变株 XWG-3、4、5、6;第三类为白玉菇出发菌株 HW-7、白玉菇诱变株 BYG-1、2、3、4。

对所有供试真姬菇菌株进行单瓶平均产量分析,结果表明本研究通过 ARTP 诱变育种方法,成功构建了真姬菇有效的生物育种体系,并依据该体系选育出在产量上略高于出发菌株的蟹味菇 2 株(产量分别高于出发菌株 1.88%、3.87%),白玉菇 1 株(产量高于出发菌株 3.05%),变异系数均低于 20%,认为其均具有一致性。

## 5.2 讨论

真姬菇深受消费者的喜爱离不开其鲜美的味道和滑嫩的口感,作为工厂化的食用菌其近几年的产量不容乐观,造成这一现象的原因很多,其中最重要的是菌种问题,我国目前使用的大部分菌种均为国外高价购买而来,许多菌种多年使用退化严重,还有菌种存在归属纠纷,这些都是真姬菇市场亟待解决的问题。对真姬菇的育种和菌种保护工作并非一朝一夕既可完成,这个过程要依靠无数学者的努力,经过长期不断的试验,保持只要有生产就要有育种和保种的状态,才能使真姬菇行业保持利益最大化的进行规范化发展。

原生质体在食用菌育种中的应用越来越广泛,许多育种方法例如诱变育种、融合育种和分子育种等均利用原生质体作为实验材料,这表明原生质体相较于食用菌的菌丝,有着更大的可操作性,因此建立食用菌原生质体的制备与再生体系,可为食用菌的许多遗传操作提供大量有效可靠的实验材料。

在我国目前应用最为广泛的育种技术有杂交育种、诱变育种等,ARTP 诱变育种技术在食用菌育种中的应用既发挥了其相较于其他育种技术有着无污染、操作简单、时间短等的巨大优点,在保证无菌的条件下可获得大量的诱变菌株,为食用菌的育种工作提供了极大的便利,但也存在着一些缺点,由于诱变并不是定向进行,而是随机不定向产生,因此试验后期筛选工作较为庞大,需从上百、上千甚至更多的诱变菌株中进行多轮筛选,才可选出具有目标特性的诱变菌株,耗时耗力。针对如此巨大的筛选量,可以结合分子生物学手段,依据基因组信息,开发定向检测手段,从而简化繁杂的筛选过程,

可大大提高食用菌育种效率。

DUS 测试在植物新品种保护中应用极为广泛，自 2004 年我国测试指南总则发布以来，截止到 2020 年已申请的新品种保护达到了 3.5 万件，该方法同样适用于食用菌行业，但其在食用菌行业中的应用是少之又少。由于食用菌市场的混乱，许多种植者往往只重视产量而忽视了对菌种的保护工作，或者没有意识到乱用菌种的后果，从而造成种种菌种纠纷，同时也给种植者和市场带来巨大的损失。因此应当加强 DUS 测试在食用菌新品种鉴定方面的应用及研究，并加强种植者的菌种保护意识，相信在不久的将来，我国食用菌产业会向着规模化、标准化发展。

本研究所选育出的蟹味菇和白玉菇诱变种对比出发菌株，在产量方面其菌株优势虽不明显，但对菌株性状进行分析的过程中可以看出：

(1) 在所有的蟹味菇中，XWG-7、8 的单瓶平均产量分别高于出发菌株 1.88% 和 3.87%，虽然其产量与出发菌株没有显著性差异，但菌丝生长速度均快于出发菌株，并有着极显著的差异，且观察到 XWG-7、8 子实体颜色要明显浅于其余蟹味菇菌株，若对其继续进行选育优化，可进一步提高并稳定产量。XWG-3、4、5、6 单瓶平均产量均低于出发菌株，并与出发菌株有着显著性差异。诱变株 XWG-4 的菌丝生长速度最快，但其产量却最低且变异系数最大。在 XWG-3、4、5、6 的子实体中均观察到颜色较浅和较深的两类性状，出现了性状分离现象。

(2) 所有的白玉菇菌片子实体间没有明显差异，BYG-1 的单瓶平均产量比出发菌株高出 3.05%，其与出发菌株虽没有显著性差异，但其单瓶最低、最高产量均高于出发菌株，因此认为 BYG-1 在单瓶产量方面表现略优于出发菌株 HW-7，可对其开展进一步的育种，从而再次提高并稳定产量。BYG-3、4 单瓶平均产量均低于出发菌株，与出发菌株均存在极显著的差异。

通过对供试真姬菇的产量及性状分析，我们发现真姬菇产量似乎与菌丝生长速度、菌丝性状、子实体菌盖、菌柄颜色等一系列性状有着密切联系，深入关于菌株性状与菌株产量间关系的研究，可以为真姬菇的育种工作提供针对性的指导和帮助，提高有效育种效率，并进一步加深我们对于真姬菇的了解。

## 参考文献

- 陈强, 张金霞. 糙皮侧耳数量性状一致性评价. 中国菌物学会 2009 学术年会, 中国北京; 2009, p. 2.
- 陈文良, 顾沁雪. 食用菌育种技术的研究进展[J]. 生物学通报, 1998, 11: 15-17.
- 褚云霞, 邓姗, 黄志城, 等. 非洲菊新品种 DUS 测试数量性状分级及形态性状多样性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(04): 920-926.
- 褚云霞, 邓姗, 黄志城, 等. 朱顶红新品种 DUS 测试数量性状筛选与分级[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(03): 466-474.
- 董先茹. 蟹味菇菌株离子束诱变选育及油菜秸秆栽培研究: 安徽大学; 2013.
- 董岩, 陈辉, 赵明文, 等. 真姬菇栽培菌株的 ITS 和 SSR 分析[J]. 上海农业学报, 2009, 25(03): 59-64.
- 韩绍英, 姜彦祥, 孟光. 真姬菇风干子实体菌种分离与无性孢子形态特征[J]. 中国食用菌, 1998, 05: 36-37.
- 何建华, 蒋玮, 吕贝贝, 等. ARTP 诱变筛选草菇优良菌株及 RAPD 分析[J]. 核农学报, 2014, 28(11): 1950-1955.
- 侯祥保, 魏峰, 孙家宁, 等. 真姬菇工厂化栽培技术[J]. 农村新技术, 2018, 02: 18-19.
- 黄志龙, 肖淑霞, 谢福泉, 等. 真姬菇栽培特性研究[J]. 福建农业科技, 2002, 03: 11-12.
- 李翠翠, 郭立忠, 卢伟东, 等. RAPD 和 SRAP 分子标记在真姬菇菌种鉴定中的应用[J]. 食用菌学报, 2009, 16(01): 21-25.
- 李荣杰. 微生物诱变育种方法研究进展[J]. 河北农业科学, 2009, 13(10): 73-76+78.
- 李挺, 宋斌, 林群英, 等. 白玉菇的研究进展[J]. 贵州科学, 2011, 29(02): 48-52.
- 李祥羽, 孙连发, 陈立君, 等. 植物新品种保护及 DUS 测试简介[J]. 黑龙江农业科学, 2009, 05: 108-109.
- 李晓辉, 李新海, 张世煌. 植物新品种保护与 DUS 测试技术[J]. 中国农业科学, 2003, 11: 1419-1422.
- 李永江, 张盼, 张晓辉, 等. 食用菌分子生物学研究进展[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(14): 4-6.
- 刘成荣, 柯晓青. 真姬菇诱变菌株的选育及其发酵条件研究[J]. 福建农业学报, 2008, 23(04): 462-465.
- 刘广建, 郑惠华, 蒋益, 等. 蛹虫草高产菌丝体蛋白菌株的 ARTP 诱变选育[J]. 食用菌, 2020, 42(05): 12-14+18.
- 刘建忠, 孙淑静, 胡开辉, 等. 真姬菇融合菌株生物学特性及生产性能的研究[J]. 中国食用菌, 2010, 29(03): 22-25.
- 刘美娟, 薛璟祺, 曾燕, 等. 我国中药材新品种保护与 DUS 测试指南研制现状[J]. 中国现代中药, 2021, 1-15.
- 刘明广, 杨素红, 张新红, 等. 斑玉蕈工厂化瓶栽技术[J]. 北方园艺, 2014, 01: 146-147.
- 刘洋. 真姬菇菌种质量评价方法的研究: 南京农业大学; 2010.
- 刘洋, 熊国富, 闫殿海, 等. 植物新品种保护与 DUS 测试在我国的发展现状[J]. 青海农林科技, 2013, 04: 18-23.
- 陆峻君, 王威, 白玉亭, 等. 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试[J]. 新疆农业科学, 2003, 06: 378-380.
- 马娜娜, 车树刚, 张心青, 等. 灰树花菌株的复壮及常压室温等离子体诱变[J]. 微生物学通报, 2020, 47(08): 2526-2535.
- 邱成书, 林敏, 宋斌. 食用菌斑玉蕈研究进展[J]. 食用菌学报, 2013, 20(04): 78-82.
- 上官舟建. 真姬菇生物学特性及栽培技术研究[J]. 食用菌, 2004, 01: 16-18.
- 上官舟建, 林汝楷, 张运茂. 真姬菇生物学特性的研究[J]. 食用菌学报, 2004, 04: 1-7.

- 施肖堃, 曾辉. 中国真姬菇产业发展的现状及展望[J]. 福建轻纺, 2012, 08: 25-28.
- 宋甜甜, 吴迪, 张赫男, 等. ARTP 诱变猴头菌株的发酵菌丝体多糖理化性质及体外免疫活性[J]. 菌物学报, 2018, 37(06): 794-804.
- 孙玲, 刘利平, 徐婉茹, 等. 物理诱变在药食用菌育种中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(14): 29-33+153.
- 孙培龙, 魏红福, 杨开, 等. 真姬菇研究进展[J]. 食品科技, 2005, 09: 54-57.
- 陶明焯, 王玮, 王晓炜, 等. 真姬菇营养成分生物活性物质分析及其多糖清除自由基活性研究[J]. 食品科学, 2007, 08: 404-407.
- 图力古尔, 范宇光, 胡建伟. 长白山斑玉蕈的生物学特性及致濒机理[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(07): 100-102.
- 王海英. 金顶侧耳 DUS 测试指南的研制及种质创新的研究: 吉林农业大学; 2012.
- 王丕武, 王东昌, 李玉. 食用菌基因工程研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 03: 23-27.
- 王谦, 黄媛媛, 宋长林. 常压室温等离子体(ARTP)诱变技术选育柱状田头菇(茶树菇)优良菌株研究初探[J]. 菌物学报, 2017, 36(06): 776-783.
- 王谦, 王蕾, 张浩军, 等. 玉蕈原生质体制备条件研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 07: 2801-2802.
- 王耀松, 邢增涛, 冯志勇, 等. 真姬菇营养成分的测定与分析[J]. 菌物研究, 2006, 04: 33-37.
- 王迎鑫, 郭倩, 刘朝贵, 等. 真姬菇工厂化生产配方筛选研究[J]. 北方园艺, 2014, 04: 129-131.
- 肖淑霞, 饶火火, 王忠宏, 等. 真姬菇工厂化生产的配方优化试验[J]. 食药用菌, 2014, 22(04): 217-219.
- 徐珍, 章炉军, 尚晓冬, 等. 金针菇品种 DUS 测试性状的分级与评价[J]. 菌物学报, 2019, 38(05): 658-668.
- 杨国良. 我国食用菌总产量及工厂化生产问题探讨[J]. 食用菌, 2018, 40(06): 14-16.
- 杨江龙, 唐浩, 李硕碧, 等. DUS 测试将促进我国种业规范创新发展[J]. 中国种业, 2018, 04: 21-23.
- 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, 34(04): 249-255.
- 杨珊, 杨焱, 李巧珍, 等. 常压室温等离子体诱变筛选高产多糖猴头菌株的研究[J]. 上海农业学报, 2019, 35(05): 6-11.
- 张桂香, 任爱民, 王英利, 等. 真姬菇的特征特性及栽培技术要点[J]. 甘肃农业科技, 2002, 12: 27-28.
- 张婷, 王伟霞, 仝乐涛, 等. 斑玉蕈的研究现状及展望[J]. 现代园艺, 2021, 44(03): 18-20.
- 张微思, 邹永生, 罗孝坤, 等. 羊肚菌 DUS 测试技术研究[J]. 中国食用菌, 2013, 32(03): 26-27+30.
- 张维东, 谭笑, 滕星, 等. 食用菌育种方法[J]. 吉林农业, 2017, 14: 72.
- 张雪, 张晓菲, 王立言, 等. 常压室温等离子体生物诱变育种及其应用研究进展[J]. 化工学报, 2014, 65(07): 2676-2684.
- 张引芳, 王镭, 张嫫. 蟹味菇的生物学特性及其栽培技术[J]. 食用菌, 1992, 04: 13-14.
- 郑峻, 林友照, 胡开辉. 真姬菇工厂化栽培关键技术[J]. 福建农业, 2006, 08: 18-19.
- Bao D, Huang Z, Li Y, et al. Agrobacterium -mediated transformation of arthroconidia obtained from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 171.
- Harada A, Yoneyama S, Doi S, et al. Changes in contents of free amino acids and soluble carbohydrates during fruit-body development of *Hypsizygus marmoreus*[J]. Food Chemistry, 2003, 83(3).
- Lee CY, Park JE, Lee J, et al. Development of new strains and related SCAR markers for an edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 327(1): 54-59.
- Lee YL, Jian SY, Mau JL. Composition and non-volatile taste components of *Hypsizygus marmoreus*[J]. Academic Press, 2009, 42(2).
- Li TT, Chen LJ, Wu D, et al. The Structural Characteristics and Biological Activities of Intracellular

- Polysaccharide Derived from Mutagenic Sanghuangporous sanghuang Strain[J]. *Molecules*, 2020, 25(16).
- Liu M, Li SS, Wang XX, et al. Characterization, anti-oxidation and anti-inflammation of polysaccharides by *Hypsizygus marmoreus* against LPS-induced toxicity on lung[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111.
- Liu M, Yao WJ, Zhu YF, et al. Characterization, antioxidant and antiinflammation of mycelia selenium polysaccharides from *Hypsizygus marmoreus* SK-03[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 201.
- Oliveira R. S., Biscaia S. M. P., Bellan D. L., et al. Structure elucidation of a bioactive fucmannogalactan from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 225.
- Tsai PF, Ma CY. Effect of a glycoprotein from mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow on growth and differentiation of human leukemic U937 cells[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 62.
- Tsai PF, Ma CY, Wu J. SB. A novel glycoprotein from mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow with growth inhibitory effect against human leukaemic U937 cells[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2).
- Wang L, Hu XH, Feng ZY, et al. Development of AFLP markers and phylogenetic analysis in *Hypsizygus marmoreus*[J]. *Applied Microbiology, Molecular and Cellular Biosciences Research Foundation*, 2009, 55(1).
- Xu JZ, Zhang JL, Zhang WG, et al. The novel role of fungal intracellular laccase: used to screen hybrids between *Hypsizygus marmoreus* and *Clitocybe maxima* by protoplasmic fusion[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(8).
- Xu LL, Gao J, Guo LZ, et al. Heat shock protein 70 (HmHsp70) from *Hypsizygus marmoreus* confers thermotolerance to tobacco[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1).
- Xu LL, Guo LZ, Hao Y. Label-Free Comparative Proteomics Analysis Revealed Heat Stress Responsive Mechanism in *Hypsizygus marmoreus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021.
- Zhang JJ, Shi L, Chen H, et al. An efficient Agrobacterium-mediated transformation method for the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*[J]. *Microbiological research*, 2014, 169(9-10).
- Zhang JJ, Ren A, Chen H, et al. Transcriptome analysis and its application in identifying genes associated with fruiting body development in basidiomycete *Hypsizygus marmoreus*[J]. *PloS one*, 2015, 10(4).
- Zhang JJ, Chen H, Chen MJ, et al. Construction and application of a gene silencing system using a dual promoter silencing vector in *Hypsizygus marmoreus*[J]. *Journal of basic microbiology*, 2017, 57(1).
- Zhang HN, Chen RB, Zhang JS, et al. The integration of metabolome and proteome reveals bioactive polyphenols and hispidin in ARTP mutagenized *Phellinus baumii*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1).
- Zhu LL, Wu D, Zhang HN, et al. Effects of Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) Mutagenesis on Physicochemical Characteristics and Immune Activity In Vitro of *Hericium erinaceus* Polysaccharides[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2019, 24(2).
- Zhang X, Zhang XF, Li HP, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12).
- Zhang X, Zhang C, Zhuo QQ, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 99(13).

## 导师组意见

导师组已通过\_\_\_\_\_的论文审查，同意并推荐其参加硕士学位论文答辩。

导 师:

导师组成员:

年 月 日

## 致谢

我怀着无比激动地心情在此感谢我研究生生活中遇见的人。时光飞逝，我即将要结束我的研究生生活，回首我这三年，给我留下太多深刻的印象，可能是一生都难以忘怀的。

首先，我要感谢我的导师郭立忠教授，在我研究生在读期间给予我学术、思想及生活上的关心和帮助，在他身上我不仅学到了严谨认真的科研态度、一丝不苟的工作态度，更学会了向善真诚的为人之道，他不仅是我学术科研上的导师，更是我人生路上的导师。其次我还要感谢实验室的于浩老师对我科研上的指导和帮助，帮我理清研究思路，指导方向。

此外还有课题组的其他老师，徐丽丽老师、李树文老师、卢伟东老师、张燕娇老师、刘琳老师、陆秀华老师、杨秀青老师、樊亚琴老师、胡春辉老师，感谢各位老师对我学习和生活上的种种帮助；感谢王菲、孙倩姝和吉建成对我实验和生活上的帮助和鼓励；感谢赵书雪师姐、杨霆师兄、王同海师兄、赵建俊师兄、江春娇师妹、孟祥麟师弟、徐康师弟、邱田美师妹、张美华师妹、金晓璠师妹、张晨晓师妹、李晓航师弟、马志恒师弟对我的帮助；感谢我的舍友肖小璇、于宁、孙玉蔓和夏青青对我生活上的关心，感谢遇见的所有人，谢谢你们为我留下一个美好的研究生生活。

最后，我还要向我的父母，生活中的朋友致谢。感谢父母的养育之恩，为我无私的奉献，是我背后强大的支柱。还有我的朋友们，感谢你们的支持。

再次向所有关心和帮助我的师长、同学、朋友和亲人致以最诚挚的谢意，谢谢你们！

## 作者简介

高杰，女，1994年10月出生于山东省烟台市，汉族，中共党员。

2013年9月至2017年7月就读于青岛农业大学生命科学学院，生物科学（创新实验班）专业，于2017年7月获得理学学士学位；

2018年9月至2021年7月就读于青岛农业大学生命科学学院，生物工程专业，微生物方向，校内导师为郭立忠教授，校外导师为高霞。

## 在读期间科研学术成果目录

Lili Xu<sup>†</sup>, Jie Gao<sup>†</sup>, Lizhong Guo and Hao Yu\*. Heat shock protein 70 (HmHsp70) from *Hypsizygus marmoreus* confers thermotolerance to tobacco. *AMB Express*. 2020 Jan 18;10(1):12.

Guangyuan Wang, Lili Xu, Hao Yu, Jie Gao, and Lizhong Guo\*. Systematic analysis of the lysine succinylome in the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *BMC Genomics*. 2019 Jul 16;20(1):585.