

文章编号: 1674-148X(2017)04-0249-07

利用 ARTP 诱变育种技术选育白色金针菇突变菌株

杨 茹, 王 范, 董鼎才, 付祥梅, 郭立忠

(青岛农业大学农业应用真菌实验室, 山东 青岛 266109)

摘要:本研究首先从市售工厂化栽培的五株白色金针菇菌株中筛选出一株品质优良的菌株 AR0 作为本次诱变育种的出发菌株。然后利用常压室温等离子体(ARTP)诱变育种技术选育出 6 株白色金针菇突变株。通过对突变株与出发菌株的抗病性、纤维含量测定及亲缘关系鉴定, 结果表明突变株 AR12 和 AR17 为抗病性强、纤维含量低的目标新菌株。其优良品质表现如下: 突变菌株 AR12 与出发菌株 AR0 相比, 菌丝体抗 *P. tolaasii* 能力提高 15.49%, 菌丝体纤维含量降低 15.82%; 突变株 AR17 与出发菌株 AR0 相比, 菌丝体抗 *P. tolaasii* 能力提高 1.90%, 菌丝体纤维含量降低 36.31%。

关键词:白色金针菇; ARTP 诱变育种; 亲缘鉴定

中图分类号: Q933

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1674-148X. 2017. 04. 003

Screening Novel White *Flammulina velutipes* Strains by Atmospheric and Room Temperature Plasma

YANG Ru, WANG Fan, DONG Dingcai, FU Xiangmei, GUO Lizhong

(Agricultural applied Mycology Laboratory, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: In this study, a superior strain (AR0) was selected from five white *Flammulina velutipes* which were attained from the industrialized cultivation. Then, AR0 was utilized as the original strain to breeding six kinds of white *Flammulina velutipes* using Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) induced mutation. Afterwards, the disease resistance, cellulose content of the original and mutant strain were analyzed and their genetic relationship were identified too. The results have shown that, AR 12 and AR 17 were the target strain which have higher disease resistance and lower cellulose content properties. Compared with the original strain (AR0), the *P. tolaasii* resistivity, cellulose content of mutant stain (AR 12) were improved 15.49 % and reduced 15.82 %, respectively, and for mutant strain (AR 17), the *P. tolaasii* resistivity, cellulose content were improved 1.90 % and reduced 36.31 %.

Key words: white *Flammulina velutipes*; plasma mutagenesis; relationship identification

金针菇(*Flammulina velutipes*)又名毛柄金钱菌、朴菇、冬菇、构菌、金钱菌等, 含有丰富的纤维素、蛋白质以及氨基酸等营养物质, 其中包含 8 种人体必需氨基酸且脂肪含量较低, 是一种不可多得的高营养食品^[1]。其中纤维质可促进新陈代谢, 调节胆固醇代谢, 降低血浆中胆固醇的含量, 并有镇定的作

用但是含量过高不仅影响口感, 而且不易消化。金针菇中含有丰富的氨基酸, 对儿童增长智力有重要作用, 所以又叫“益智菇”。金针菇中含多种功能性蛋白, 这使得其在抗肿瘤、免疫调剂、降低胆固醇、保护肝脏细胞、抗疲劳及延长寿命等方面都有重要作用。因此金针菇具有重要的食用和药用价值。

收稿日期: 2017-06-15

基金项目: 工厂化栽培金针菇新品种选育(2014LZ-03); 山东省现代农业产业技术体系食用菌创新团队—遗传育种岗位科学家(SDAIT-11-011-02)

作者简介: 杨 茹(1992-), 女, 内蒙古巴彦淖尔市人, 在读研究生, 主要研究方向: 应用真菌, E-mail: 804793315@qq.com

通讯作者: 郭立忠(1964-), 男, 山东莱阳人, 教授, 硕士, 主要研究方向: 应用真菌发酵工程、应用真菌品种改良与工厂化生产, E-mail: glz119@126.com

随着金针菇生产规模的不断扩大,其病害发生也逐年增加并加重。其中黑腐病对金针菇产量及品质有严重影响。黑腐病发病速度快,难根除,很容易变成一种流行病传播到其他菇房^[2]。因此,本研究重点选育口感好、抗病能力高的优质菌种。

本研究中根据上海地区食用菌行业金针菇成品菇分级标准分级^[4]对各品种子实体进行商品性评价。以此判断是否获得优良品种。

1 实验材料

1.1 菌株来源

由蔬菜市场购买的五个白色金针菇菌株,如表1所示。

表1 五个白色金针菇菌株及生产厂家
Table 1 Five white *Flammulina velutipes* strains and manufactures

编号 Number	品种名称 Name	生产厂家 Manufacturer
1	九道菇	上海光明森源生物科技有限公司
2	荣丰	山东省东营市荣丰食用菌有限公司
3	蔬友	苏州华泰昌农业科技有限公司
4	鑫康盛	江苏康盛农业发展有限公司
5	雪榕	上海雪榕生物科技股份有限公司

1.2 培养基与试剂

PDA 固体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然。

牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 3 g,氯化钠 5 g,定容至 1 000 mL,pH 7.0。

RM 培养基:马铃薯 200 g,酵母膏 2.0 g,蛋白胨 2.0 g,蔗糖 20 g,MgSO₄ 1.5 g,甘露醇 109.32 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然。

裂解酶:溶壁酶(购自广州微生物所)。

2 实验方法

2.1 出发菌株筛选

2.1.1 五个白色金针菇菌株子实体形态学观察比较

由市场上购买的五株白色金针菇菌株中,每种随机抽取 3 袋进行子实体观察。

2.1.2 五个白色金针菇菌株子实体水分测定

由购买的白色金针菇中,每种随机抽取 3 袋进行子实体水分含量测定。从培养料算起,切掉 3.5

cm 菇根,子实体称重,置于 55℃ 鼓风式烘干箱至恒重,称重。

2.1.3 五个白色金针菇子实体氨基酸和纤维素含量测定

将每种金针菇烘干、粉碎,各取 10 g,利用氨基酸分析仪测定氨基酸含量,利用重铬酸钾氧化法测定纤维素含量。

2.1.4 五个白色金针菇菌株菌丝生长速度比较

本实验采用十字交叉法测定菌丝生长速度,具体方法如下:

将五个白色金针菇菌株分别接种于 PDA 平板上活化。用打孔器取活化的菌块分别放于 PDA 平板中央,每隔 24 h 用十字交叉法测量菌落直径,连续测量 5 d,每株做 5 个重复。分析比较五个白色金针菇菌株菌丝生长速度和长势^[5-7]。

2.1.5 对五个白色金针菇菌株进行 ERIC-PCR 鉴定

Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒分别提取五种白色金针菇的全基因组 DNA,以基因组为模板,利用通用引物:

ERIC1 (5' - ATGTAAGCTCCTGGGGAT-TCAC-3')

ERIC2 (5' - AAGTAAGTGACTGGGGT-GAGCG-3')

扩增其共有序列。将扩增结果统计后产生的“0/1”数据表输入 NTsys 软件系统中,进行聚类分析,并自动生成各菌株的遗传聚类图谱^[8]。

2.1.6 五个白色金针菇菌株抗黑腐病病原菌(*P. tolaasii*)比较

将本实验室保存的黑腐病病原菌接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中活化,吸取培养好的 *P. tolaasii* 菌液 50 μL,均匀涂在 PDA 平板右半边区域内,然后在平板中央距细菌区 3 cm 左右的地方接种各供试菌株直径为 5 mm 的菌块,接种后置于 25℃ 培养箱恒温培养^[9]。每组 5 个重复。培养 48 h 后,选取在右侧形成均匀菌膜的平板,测定平板中各菌株在左侧正常生长速率和右侧与拮抗生长速率。

2.2 突变株的筛选

2.2.1 白色金针菇原生质体的制备

原生质体的制备:液体静止培养的菌丝,菌龄为 5 天,用 0.6 mol/L 的甘露醇处理后取适量菌丝加入 1.5% 的溶壁酶,28℃ 酶解 2 h,制备原生质体。

2.2.2 原生质体 ARTP 常压室温等离子体诱变及筛选

ARTP 等离子体诱变^[10]方法对金针菇原生质体诱变,相关参数为:气体流量 16.0 slm,平台高度 10 mm,诱变时间为 25 s。

原生质体再生:诱变后的原生质体洗脱到 0.6 mol/L 甘露醇溶液中,形成新的原生质体悬液,取 0.1 mL 涂布于再生培养基 RM 中,25℃ 恒温避光培养。统计菌落数,计算再生率。

突变株筛选:将上述原生质体培养 7—10 天后得到的菌落再生分离,将再生分离得到的菌落与出发菌株做拮抗实验,将拮抗实验平板放入 25℃ 恒温培养,并观察是否形成拮抗线。

2.2.3 突变株与出发菌株抗黑腐病原菌(*P. tolaasii*)比较

方法同 2.1.6。

2.2.4 突变株与出发菌株纤维含量的测定

分别取突变株和出发菌株的菌丝 40 g,用重铬酸钾氧化方法检测纤维含量。

2.2.5 突变株与出发菌株 ERIC—PCR 鉴定

方法同 2.1.5。

3 结果与分析

3.1 五个白色金针菇菌株形态学观察结果

金针菇菌柄长度、菌柄直径和菌盖直径直接影响着其产量及口感,对五个白色金针菇形态学观察后,由表 2 可以得出,1 号和 5 号菌株综合菌柄长度、菌柄直径及菌盖直径三个因素都比较突出。分别对 1 号菌株与 5 号菌株的菌柄长度、菌柄直径、菌盖直径及平均高度进行显著性分析,结果 5 号菌株平均高度以上和以下的百分比与 1 号菌株相比差异明显, ($P<0.05$)。

表 2 五个白色金针菇菌株形态学观察

Table 2 The morphology observation of five white *Flammulina velutipes* strains

编号 Number	菌柄长度 Stipe length (cm)	平均高度以上百分比 Percentage above average height(%)	平均高度以下百分比 Percentage below average height(%)	菌柄直径 Stipe diameter (cm)	菌盖直径 Cap diameter (cm)
1	13.37±0.01	43.0±1.2	57.0±0.6	0.30±0.01	0.70±0.03
2	11.80±0.01	51.0±1.7	49.0±1.2	0.22±0.02	0.49±0.02
3	12.14±0.02	49.0±0.9	51.0±2.1	0.27±0.03	0.68±0.02
4	10.90±0.03	60.0±2.3	39.5±0.8	0.23±0.01	0.52±0.01
5	12.66±0.01	47.0±1.1	53.0±1.1	0.30±0.01	0.70±0.03

3.2 五个白色金针菇子实体水分、蛋白质、氨基酸和纤维素含量测定结果

蛋白质和纤维素是金针菇的营养成分,但纤维素过多则会影响金针菇的口感,含水量过多会影响菌片子实体的发育。通过对五株白色金针菇子实体水分、蛋白质、氨基酸和纤维素含量测定,如表 3

所示,3 号和 5 号菌片子实体水分含量最低,对其的水分含量和纤维素含量进行显著性分析,结果表明,5 号菌株含水量、纤维素含量与 3 号菌株相比差异极显著 ($P<0.01$),说明 5 号菌株具有含水量低且纤维含量低的优势。

表 3 五个白色金针菇子实体水分、蛋白质、氨基酸和纤维素含量测定

Table 3 The water content, amino acid, protein and cellulose content in five white *Flammulina velutipes* fruiting body

编号 Number	水分含量 Water content (%)	氨基酸含量 Amino acid content (%)	蛋白质含量 Protein content (%)	纤维素含量 Content of cellulose (%)
1	90.22±1.12	12.07±3.25	18.79±0.91	31.70±3.22
2	88.91±2.31	13.64±2.51	21.47±1.37	33.20±5.11
3	89.67±1.44	13.43±1.71	20.61±0.89	29.10±3.42
4	90.52±5.11	11.99±1.18	18.12±1.13	29.60±2.13
5	89.55±3.23	12.05±2.63	19.48±0.98	28.20±3.32

3.3 五个白色金针菇菌株菌丝生长速度比较

由表 4 可以得出,1 号和 5 号菌株生长速度快且长势较好。

表 4 五个白色金针菇菌株菌丝生长情况

Table 4 The mycelia growth of five white *Flammulina velutipes*

编号 Number	菌丝生长速度平均值 Average value of mycelial growth rate(mm/d)	菌丝长势 Mycelial growth
1	4.37±0.03	+++
2	4.07±0.02	++
3	4.03±0.01	++
4	4.23±0.02	+
5	4.11±0.01	+++

注: + 表示长势较弱; ++ 表示长势中等; +++ 表示长势较好

3.4 五株白色金针菇菌株 ERIC-PCR 鉴定

用 CTAB 法提取五个白色金针菇菌株的基因组,电泳图条带清晰,DNA 浓度较大。以菌株基因组为模板,以 ERIC 通用引物进行 ERIC-PCR 聚类分析。ERIC-PCR 分析结果如图 1 所示:五个白色金针菇菌株之间表现出了一定的遗传差异。当 $D=0.74$ 相异系数水平时,可以把菌株分为 3 类,1 号和 3 号聚为一类;2 号为一类;4 号和 5 号为一类。

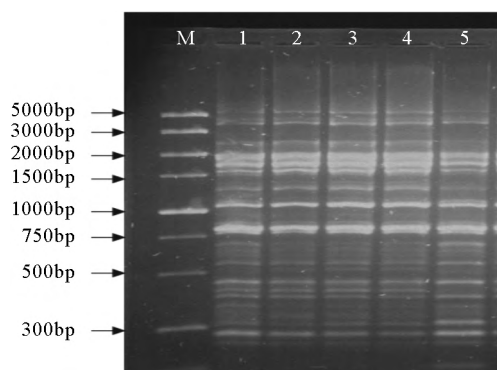


图 1 五个白色金针菇菌株 ERIC-PCR 电泳图谱

泳道 1~5: 分别为 1~5 号白色金针菇菌株 ERIC-PCR 电泳图谱

Fig. 1 The result of ERIC-PCR

Lane 1 to 5 : 5 strains of white *Flammulina velutipes* ERIC-PCR

3.5 五个白色金针菇菌株菌丝体抗 *Pseudomonas tolaasii* 结果

对五株白色金针菇菌株菌丝与病原菌对峙培养,如表 5 所示,4 号和 5 号菌株拮抗生长速度最

快,对其进行显著性分析,5 号菌株的拮抗生长速度相比 4 号菌株差异显著,所以可得出:5 号菌株菌丝抗 *P. tolaasii* 能力最强,抗性水平为 46.78%。

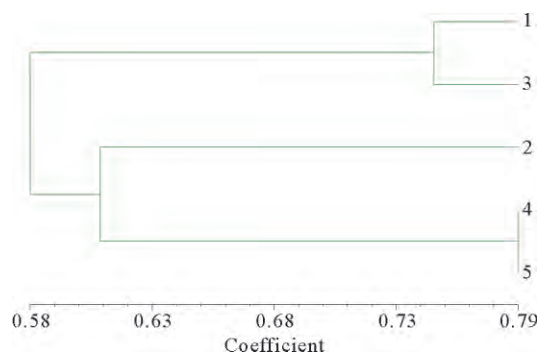


图 2 五个白色金针菇菌株 ERIC-PCR 聚类分析图谱

Fig. 2 The ERIC-PCR electrophoresis map of five white *Flammulina velutipes* strains

表 5 五个白色金针菇菌株菌丝体抗 *P. tolaasii* 拮抗情况

Table 5 The mycelium antagonistic experiment of five white *Flammulina velutipes* against *P. tolaasii*

编号 Number	菌丝拮抗生长速度 Mycelium antagonistic growth rate(mm/d)	菌丝正常生长速度 Mycelium normal growth rate(mm/d)	拮抗水平 Resistance level(%)
1	1.23±0.03	4.37±0.02	28.23±1.91
2	1.41±0.02	4.07±0.03	34.67±1.02
3	1.47±0.02	4.03±0.01	36.37±2.09
4	1.83±0.01	4.23±0.02	43.33±1.84
5	1.92±0.02	4.11±0.01	46.78±0.91

3.6 原生质体制备与再生

适龄菌丝用 0.6 mol/L 的甘露醇处理后 1.5% 的溶壁酶,28℃ 酶解 2 h,制备原生质体。原生质体的得率为 2.12×10^7 ,所得的原生质体在 RM 培养基中再生率最高达 0.17%。

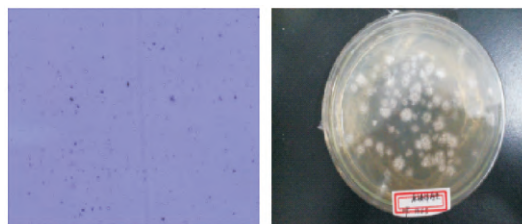


图 3 原生质体的制备与原生质体在再生培养基上生长 10d 的情况

Fig. 3 Pictures of protoplast preparation and protoplast regeneration in RM medium for 10 days

3.7 ARTP 诱变结果

出发菌株通过 ARTP 诱变育种技术得到六株突变株。出发菌株与所得突变株拮抗实验如图 5 所示。与出发菌株产生拮抗线的分别是 AR12, AR14, AR16, AR17 和 AR18。

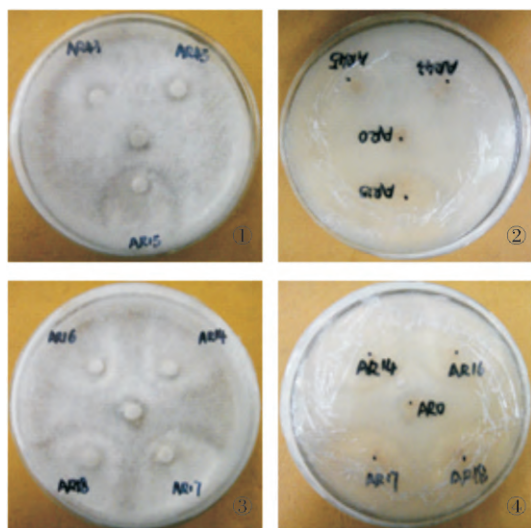


图 4 ARTP 诱变菌株与出发菌株 AR0 拮抗情况

Fig. 4 The antagonistic reaction of ARTP mutant strains and its original strain AR0

3.8 突变株两两拮抗实验结果

通过两两拮抗实验,如表 5 确定 6 个菌株不是同一个菌株,其中 AR12、AR14、AR16、AR17、AR18 之间拮抗线较强,AR15 与其它突变株产生的拮抗线较弱。因此,通过两两拮抗实验筛选出的突变株共 5 个,分别是 AR12、AR14、AR16、AR17 和 AR18。

表 6 突变株两两拮抗实验结果

Table 6 The experiment result of two antagonistic mutant

组别 Group	AR12	AR14	AR15	AR16	AR17	AR18
AR12	无	+++	+++	+++	+++	+++
AR14	+++	无	无	++	+++	+++
AR15	+++	+	+	+	+	++
AR16	+++	++	+	无	+++	+++
AR17	+++	+++	+	+++	无	+++
AR18	+++	+++	++	+++	+++	无

注: + 表示长势较弱; ++ 表示长势中等; +++ 表示长势较好

3.9 六个突变菌株与出发菌株之间的变异分析

用 ERIC-PCR 聚类分析法对所得的突变株与

出发菌株进行亲缘鉴定,如图 7 所示,各菌株之间都产生了遗传差异。当相异系数在 0.8 时,可以把六个突变株与出发菌株分为四类,亲本与 AR15 为一类;AR14 与 AR17 为一类;AR12 与 AR18 各为一类。

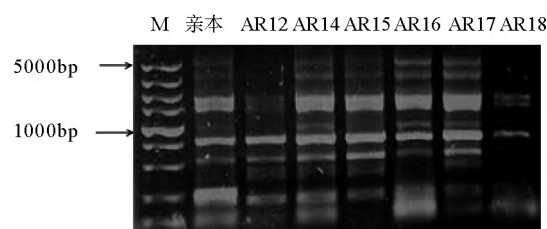


图 5 突变株与亲本菌株 ERIC-PCR 电泳图谱

Fig. 5 Mutant and the parent strain ERIC-PCR

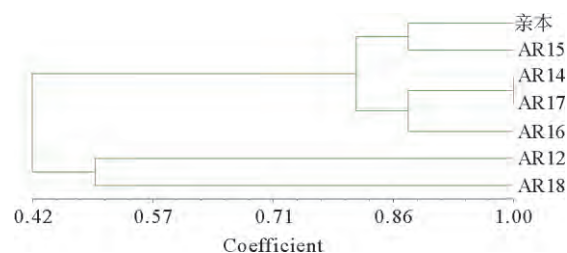
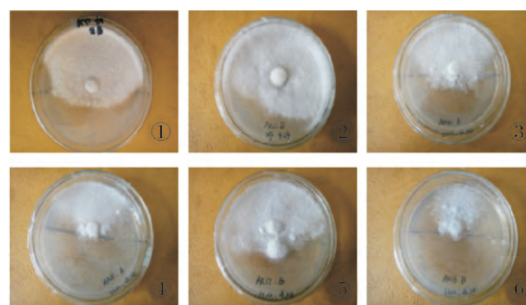


图 6 六个突变株与亲本菌株 ERIC-PCR 聚类分析图谱

Fig. 6 Six mutants and their parent strain
ERIC-PCR Atlas of cluster



①~⑥:分别是 AR0、AR12、AR14、AR16、AR17、AR18

菌株菌丝体与 *P. tolaasii* 生长 15 d 的拮抗结果

图 7 五个突变株与出发菌株菌丝体与 *P. tolaasii* 拮抗情况

Fig. 7 The mycelium antagonistic experiment of five white *Flammulina velutipes* mutants and its original strains AR0 against *P. tolaasii*

3.10 五个突变株与出发菌株菌丝抗 *P. tolaasii* 能力

对突变菌株 AR12、AR14、AR16、AR17 和 AR18 与出发菌株 AR0 的菌丝体抗 *P. tolaasii* 能力进行显著性分析,结果表明 AR12 抗病性与 AR0

差异极显著,抗病能力提高 15.49%;AR17 抗病性与 AR0 差异显著,抗病能力提高 1.9%。AR14、AR16、AR18 抗病能力分别降低 2.02%、26.88%、

28.39%。由此可得出,突变株 AR12 的抗病能力明显提高。

表 7 五个突变株与出发菌株菌丝体与 *P. tolaasii* 拮抗情况

Table 7 The mycelium antagonistic experiment of five white *Flammulina velutipes* mutants and its original strains AR0 against *P. tolaasii*

编号 Number	菌丝拮抗生长速度 Mycelium antagonistic growth rate(mm/d)	菌丝正常生长速度 Mycelium normal growth rate(mm/d)	抗性水平 Resistance level (%)	与 AR0 抗性水平相比 Compared with the level of AR0 resistance(%)	显著性分析 Significance test	
					0.01	0.05
AR0	1.92±0.01	4.11±0.02	46.78±1.13	—		
AR12	2.56±0.02	4.11±0.02	62.27±2.15	+15.49	*	*
AR14	1.84±0.01	4.10±0.01	44.76±2.61	-2.02		
AR16	0.80±0.01	4.02±0.01	19.90±1.58	-26.88		
AR17	1.94±0.03	3.98±0.03	48.68±0.88	+1.90		*
AR18	0.73±0.02	3.94±0.02	18.39±2.18	-28.39		

注: * 表示 $P<0.05$ 的显著性差异, ** 表示 $P<0.01$ 的显著性差异

3.11 五个突变株与出发菌株菌丝体纤维含量的比较

对突变菌株 AR12、AR14、AR16、AR17 和 AR18 与出发菌株 AR0 菌丝体纤维含量进行显著性分析,结果表明:AR12、AR17 纤维含量与 AR0

差异极显著,纤维含量降低 15.82%、36.31%;AR14、AR16 和 AR18 纤维含量分别提高 0.81%、31.64%、25.76%;由此可得出 AR17 的纤维含量明显降低。

表 8 五个突变株与出发菌株菌丝体纤维含量的比较

Table 8 The comparison of mycelial cellulose content for five white *Flammulina velutipes* mutants and its original strains AR0

组别 Group	AR0	AR12	AR14	AR16	AR17	AR18
菌丝纤维素含量 Content of cellulose(g/100g)	49.3	41.5	49.7	64.9	31.4	62.00
与 AR0 相比变化 Change compared to AR0	—	-15.82	+0.81	+31.64	-36.61	+25.76
显著性分析 Significance test		*	*		*	*

注: * 表示 $P<0.05$ 的显著性差异, ** 表示 $P<0.01$ 的显著性差异

4 结果与讨论

本研究首先筛选 5 号白色金针菇菌株为诱变育种的出发菌株。5 号菌株表现为:子实体菌柄长度较长,整齐度较好,菌柄直径大,菌盖直径大,每袋的数量最少;子实体水分含量较少,氨基酸和蛋白质含量适中,锌含量适中;子实体纤维含量较低,菌丝体抗 *P. tolaasii* 能力最强。出发菌株原生质体制备与再生的最佳条件为:液体静止培养的菌丝,菌龄为 5

天;用 1.5% 的溶壁酶 2 于 28℃ 的流动水浴锅中水浴 2 h,原生质体的得率为 2.12×10^7 ,所得的原生质体在 RM 培养基中再生率最高达 0.17%。利用 ARTP 等离子体诱变方法对金针菇原生质体进行诱变,相关参数为:气体流量 16.0 slm,平台高度 10 mm,诱变时间为 25 s。

通过对突变株拮抗实验筛选、亲缘鉴定、抗 *P. tolaasii* 和纤维素含量比较,最终得出突变株 AR12 和 AR17 为目标新菌株。菌株 AR12 和 AR17 的优

良品质表现如下:菌株 AR12、AR17 与出发菌株 AR0 相比,菌丝体抗 *P. tolaasii* 能力提高 15.49%、1.9%;菌丝体纤维素含量降低 15.82%、36.31%。得到的高抗病能力和低纤维含量的新菌株不仅产量有保证,而且具有良好的口感。

本研究使用的常压室温等离子诱变育种技术与传统诱变方法相比,对遗传物质的损伤机制多样,获得突变型多样性可能性大,而且操作简单、安全性高、突变速度快、突变效率高。本研究采用原生质体作为诱变材料,由于原生质体没有细胞壁保护,而且原生质体再生过程中存在优存劣汰的筛选过程,从而进一步确保了突变率的提高。

参考文献:

- [1] 暴增海. 食用菌栽培原理与技术[M]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 105—107
- [2] 王守现,刘宇,耿小丽,等. 北京地区 8 个白金针菇主栽菌株的鉴别研究[J]. 华北农报, 2009, (01): 219—222
- [3] 熊小龙. 四川金针菇木霉病害的研究及金针菇菌株抗性分析[D]. 四川: 四川农业大学, 2011: 13—14
- [4] 连凯,潘辉,王迎鑫,等. 不同纤维废弃物对金针菇生长发育的影响[J]. 北方园艺, 2014, (03): 138—140
- [5] 谭琦,潘迎捷,汪昭月,等. 用单核原生质体杂交育成香菇新菌株申香 8 号[J]. 食用菌报, 1999, (02): 1—4
- [6] 郭美英. 金针菇杂交育种研究[J]. 食用菌, 1993, (04): 4—6
- [7] 曹晖,黄瑞贞. 金针菇担孢子多孢混合杂交育种[J]. 食用菌, 1993, (06): 6—7
- [8] Farley B M, Pagano J M, Ryder S P. RNA target specificity of the embryonic cell fate determinant POS-1[J]. Rna, 2008, 14 (12): 2685—2697
- [9] 刘川. 平菇褐斑病发生的环境因素分析和抗性材料筛选[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012: 16—17
- [10] Gupta B, Reddy B P N, Kotasthane A S. Molecular characterization and mating type analysis of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) using single basidiospores for strain improvement[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27 (1): 1—9