

doi:10.11937/bfyy.20170775

香菇⁶⁰Co- γ 辐照突变菌株的筛选

王菲, 宋冰, 李丹, 付永平, 孟灵思, 李玉

(吉林农业大学 教育部食药食用菌工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要:以香菇栽培菌株“庆20”作为诱变材料,分别利用0.4、0.6、0.8 kGy 3种辐射剂量,剂量率为 $10\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ 的⁶⁰Co- γ 射线对香菇菌株进行物理诱变,以不辐射处理为对照,研究了不同辐射剂量对香菇菌株诱变率和致死率的影响,将诱变菌株与对照菌株进行拮抗试验和SSR分子鉴定,并对突变菌株对纤维素和半纤维素的利用能力进行筛选,以期筛选出能更好的利用秸秆作为栽培基质的香菇栽培菌株。结果表明:辐射剂量为0.4 kGy时,所有菌株致死率为0,0.6 kGy时致死率为46.7%,0.8 kGy时致死率达到100%。经过拮抗试验和SSR分子标记的筛选,得到6株符合要求突变菌株。

关键词:香菇; ⁶⁰Co- γ 射线; 辐射诱变; 纤维素; 半纤维素

中图分类号:S 646.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)15-0151-07

香菇(*Lentinula edodes*)俗称冬菇、香菌、香蕈、椎茸。香菇在我国有着悠久的栽培历史,庆元百山祖吴三公发明的“剃花法”“惊蕈术”至今已有数百年的历史,是我国种植规模最大和消费最为普遍的食用菌之一。我国香菇生产方式主要为代料栽培,其中东南和华中产区为代料栽培主产区;华中地区及陕西、甘肃、黑龙江、安徽、广西、江西和福建等地仍有少量段木栽培^[1-2]。据统计,我国香菇年产量上升迅速,2007年全国香菇产量为288.5万t,2015年约为750万t^[3-5]。

诱变育种根据诱变剂的种类可大体分为物理诱变和化学诱变2类。物理诱变所用的诱变剂主

要包括紫外线、钴60(⁶⁰Co- γ 射线)、各种宇宙射线等,其中紫外线诱变育种是最常见的。

⁶⁰Co是金属钴的一种放射性同位素,是强 γ 射线源,当 γ 射线辐射受体生物后导致DNA结构发生改变,进而导致受体生物发生突变。⁶⁰Co辐射诱变可以获得较高的突变率和较宽的突变谱,同时对于筛选新的突变型也有良好的作用。但是,⁶⁰Co诱变作为物理诱变方法也存在一些局限性,因其所需设备昂贵,需要承建能够隔离辐射的操作室,且维护较为繁琐,还需定期更新辐射源,所以一般的科研单位很难单独建立和维护诱变设施,具备诱变条件的机构有限^[6]。

近年来,有多位研究者利用⁶⁰Co辐射诱变手段进行食用菌诱变育种。2011年,林瑞虾^[7]利用⁶⁰Co对草菇菌丝进行了诱变;2012年福建农林大学利用⁶⁰Co选育出姬松茸新菌种“福姬J77”^[8];2013年,李前红^[9]用不同剂量的⁶⁰Co辐照双孢蘑菇孢子进行了诱变;同年,王正荣等^[10]利用⁶⁰Co对秀珍菇进行了诱变,并对其各类氨基酸效应的主成分进行了分析;2015年,沈福良等^[11]利用⁶⁰Co诱变蛹虫草原生质体选育高产多糖菌株;2016年,田鸿等^[12]利用⁶⁰Co- γ 射线对双孢蘑菇担孢子诱变效应进行了研究。

第一作者简介:王菲(1990-),女,硕士研究生,研究方向为食用菌栽培基质。E-mail:13944800667@sina.cn.

责任作者:李玉(1944-),男,博士,教授,中国工程院院士,研究方向为菌物学。E-mail:fungi966@126.com.

基金项目:公益性行业(农业)科研专项资助项目(201503137);国家重点基础研究发展规划资助项目(973计划)(2014CB138305);吉林省秸秆综合利用技术创新平台资助项目(吉高平合字2014B-1);吉林农业大学校内启动基金资助项目(2015007)。

收稿日期:2017-04-06

木屑和木段是香菇栽培最主要的原料,随着香菇及其它木腐食用菌栽培量的增长和木材资源的消耗,避免或减少木材的使用变得尤为重要。秸秆中的主要成分包括纤维素、半纤维素和木质素,在实际生产中,作物秸秆作为农业废弃物,除极少数可以被利用外,绝大部分的处理方式为就地焚烧,这样不但污染环境,造成浓烟和雾霾,对资源也是一种浪费,若能有效利用秸秆栽培香菇不但有利于节省木材资源,还能有效提高秸秆的利用率,减少环境污染。

由于香菇生长中所需的木质素在秸秆中含量有限,导致香菇栽培时对秸秆的利用率较低。现通过物理诱变方法获得高效利用作物秸秆的香菇菌株,以期达到降低香菇栽培的成本、节约资源的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试香菇菌株为“庆20”,由庆元县食用菌科研中心提供。

生长培养基: PDA培养基配方为马铃薯200 g、葡萄糖20.0 g、琼脂15.0 g,用蒸馏水定容至1 000 mL。121℃高压灭菌30 min后使用。

筛选培养基: CMC-Na培养基配方为羧甲基纤维素钠(CMC-Na)10.0 g、七水硫酸镁0.5 g、磷酸二氢钾2.0 g、蛋白胨1.0 g、硫酸铵4.0 g、琼脂15.0 g,用蒸馏水定容至1 000 mL^[13-15]。1×10⁵ Pa灭菌30 min。染色剂: 刚果红染料1.00 g,用蒸馏水定容至1 000 mL。洗脱剂: 1 mol·L⁻¹氯化钠溶液。木聚糖培养基配方为木聚糖10.0 g、七水硫酸镁0.5 g、磷酸二氢钾2.0 g、蛋白胨1.0 g、硫酸铵4.0 g、琼脂15.0 g,用蒸馏水定容至1 000 mL。121℃高压灭菌30 min后使用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株准备

将菌株接入PDA培养基中进行菌种活化,待菌丝恢复活力后用打孔器在菌丝尖端的位置进行打孔,将所得菌块移入到PDA培养基中进行培养。

1.2.2 诱变处理

待菌丝直径达到培养基直径的3/4左右时对各菌株进行辐射诱变。该试验设3个处理,采用辐射剂量分别为0.4、0.6、0.8 kGy的⁶⁰Co-γ射线进行照射,辐射剂量率为10 Gy·min⁻¹,以不进行辐射处理为对照,每处理10个培养皿,经过辐射处理后的培养皿用不透光的纸盒封装,在外侧用黑布包裹遮光后放在黑暗避光处存放。

1.2.3 诱变后处理

为防止辐射后马上取出菌丝会进行自我修复,故将培养皿静置约36 h后再对培养皿中的菌丝进行转接。每个培养皿取3处不同的位置接入新的PDA培养基中,为区分同一平板上取出的3块菌块,将它们对应的培养皿标注为a、b、c。置于25℃的恒温培养箱中进行黑暗培养,并每天观察记录菌丝的萌发时间、生长状态及菌丝直径。为了保证菌龄一致,对照组也要同诱变组一同进行转接,共同培养。

1.2.4 对峙试验(拮抗试验)

为了让诱变菌株的性状趋于稳定,将转接后的菌株再进行6次转接,以确保诱变性状稳定遗传,记录菌丝生长情况。将转接6次后的菌株同对照组接入同一培养基中,进行对抗培养,观察转接菌株同对照组之间能否产生拮抗。为确定对抗的效果,接种时采用三点式接种,一侧接种菌块较大的对照菌块,另一侧接种2块相同的,较小的诱变菌块,以便观察相同菌块与不同菌块相遇时拮抗效果的异同。

1.2.5 SSR分子标记鉴定

为了进一步确认诱变的结果,对筛选出的菌株和对照菌株进行基因组提取,利用设计好的5对香菇特异性SSR引物对基因组进行PCR扩增后,进行电泳并染色,利用SSR分子标记技术对选出的菌株进行分子确认并对它们的多态性进行分析^[16-24]。

试验中使用的SSR引物均由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成。试验所选用引物的T_m及引物序列如表1所示。

PCR反应体系为20 μL反应体系中含有10×PCR buffer (Mg²⁺) 2 μL, 2 mol·L⁻¹ dNTP 0.2 μL, 5 U Taq DNA polymerase 0.2 μL, 正向引物1.0 μL, 反向引物1.0 μL, 50 ng·μL⁻¹ DNA模板2 μL。

表 1
Table 1
试验所选用香菇特异性 SSR 引物
Lentinula edodes specific SSR primers

引物编号 Primer name	退火温度 T _m /℃	引物序列 Primer sequence (5'-3')
XGSSR-1s	67.03	GAGGATCGGGTGCCTGTGCT
XGSSR-1as	66.66	CTCCTCCGAATCCCCGAAT
XGSSR-2s	66.89	GCTCATGATAAATGCCGTCGACAC
XGSSR-2as	66.99	GCAGAATCTCGAAGAGGGCGTTA
XGSSR-3s	64.60	GGCTTTCATGATCACCAGGCTAA
XGSSR-3as	66.14	TTTGCGGCTTGCCATGATCT
XGSSR-4s	66.34	ACCACTGCTTACAAGCGTCCTTGA
XGSSR-4as	65.99	GCAGAATCTCGAAGAGGGCGTTA
XGSSR-5s	64.60	GGCTTTCATGATCACCAGGCTAA
XGSSR-5as	66.14	TTTGCGGCTTGCCATGATCT

PCR 扩增程序为 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 50 s, 60 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 40 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。将所得 PCR 产物稀释 5 倍后, 通过 LabChip GX Touch 生物大分子分析仪进行检测, 并对电泳产物的条带进行分析, 通过特异性条带进行聚类分析, 并构建不同菌株的分子身份证以此鉴别不同的菌株。根据带型转换成 0~9 数值(在同一引物所扩增出的条带, 带型一致的均为 1, 第 2 种类型条带为 2, 第 3 种类型为 3, 以此类推, 第 10 种类型为 0), 以此数字构建菌株的分子身份证, 确定各菌株的身份信息^[16]。

1.2.6 菌株复筛

筛选出表现与对照存在差异的菌株, 用 CMC-Na 培养基和木聚糖培养基作为筛选培养基, 对各诱变菌株进行筛选培养, 以此确认所筛选出的菌株同对照菌株相比, 在纤维素和半纤维素利用能力方面是否存在差异。

CMC-Na 培养基和木聚糖培养基均在 25 ℃ 的恒温培养箱中进行培养。木糖培养基每天记录菌丝生长状态; CMC-Na 培养基待菌丝直径达到培养皿直径的 2/3 左右时, 对培养基进行染色, 脱色后测量菌丝圈直径和水解圈直径, 并计算菌丝圈直径和水解圈直径的比值。

成活率(%) = 该诱变剂量下成活的菌株数 / 菌株总数 × 100。致死率(%) = 该诱变剂量下死亡的菌株数 / 菌株总数 × 100。

1.3 数据分析

选取 5 对香菇特异性 SSR 引物进行电泳, 将得到的多态性条带用数值表示(有条带记为 1, 无条带记为 0), 采用 Excel 软件统计试验数据, 利用生物统计软件 SPSS 10.0 进行 0-1 型变量聚类分

析, 得到香菇突变菌株的 UPGMA 聚类图, 所得聚类结果以树状图的形式表示。数据利用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同辐射剂量对香菇菌株“庆 20”的致死率

表 2、图 1~2 表明, 辐照剂量为 0.4 kGy 时, 30 个培养皿中的菌株均成活, 萌发时间、生长状

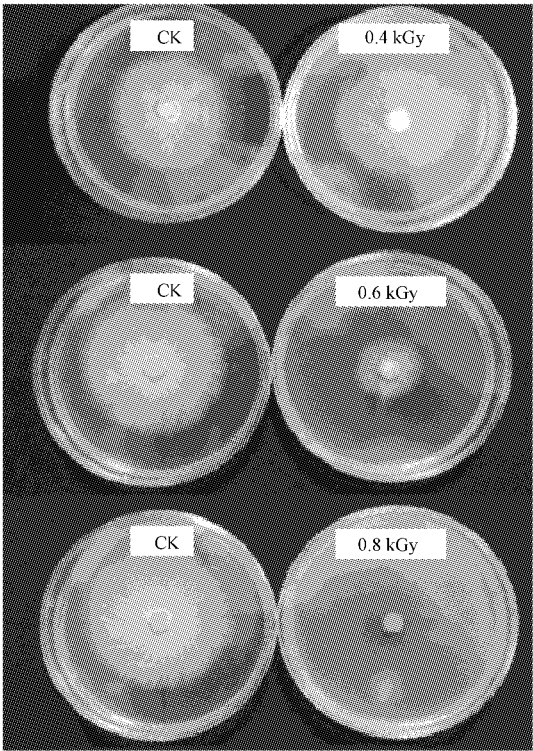


图 1 不同辐射剂量对菌丝生长的影响
Fig. 1 Effect of different radiation doses on the mycelial growth

态、菌丝直径大部分与对照组无明显差别,仅有少数几个同对照存在差异;辐照剂量为 0.6 kGy 时,30 个培养皿中的菌株有 14 个成活,萌发时间

延后,生长状态、菌丝直径存在一定差异;辐照剂量为 0.8 kGy 时,30 个培养皿中的菌株均未成活,全部死亡。

表 2
Table 2
诱变后的菌株成活情况
Survival of irradiated strains

辐射剂量 Radiation dose/kGy	初始培养数 SUM	存活数 Alive	存活率 Survival rate/%	致死率 Lethality rate/%
0(CK)	30	30	100.0	0
0.4	30	30	100.0	0
0.6	30	14	46.7	53.3
0.8	30	0	0	100.0

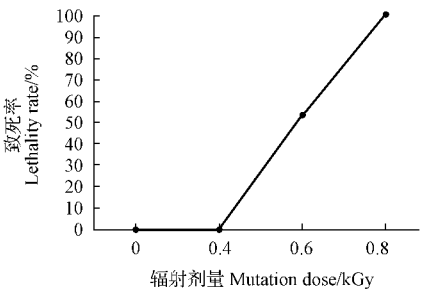
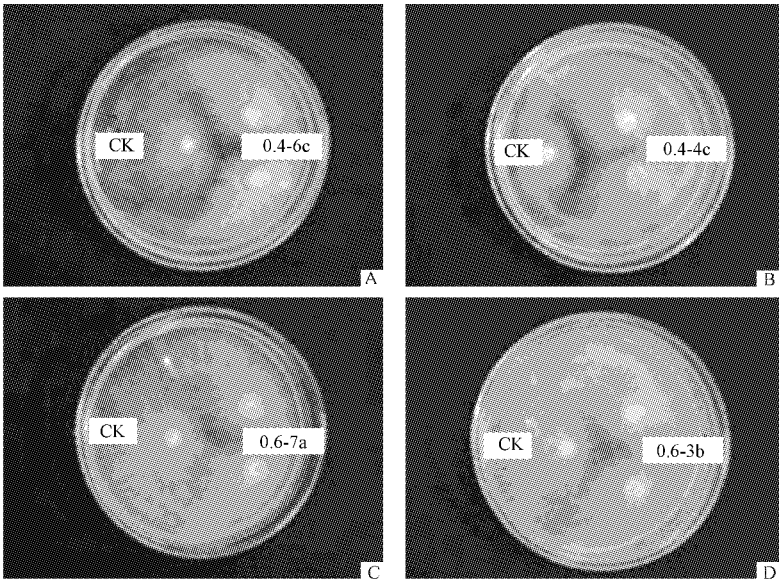


图 2 诱变剂量与致死率关系
Fig. 2 Relationship between mutation dose and lethality rate

2.2 诱变菌株与对照组的对抗试验

由图 3 可知,不同诱变菌株同对照菌株做对抗试验时产生的拮抗效果是不同的,有的诱变菌株与对照菌株有明显的拮抗现象(图 3-A、B),有的诱变菌株与对照组不能产生明显的拮抗现象(图 3-C、D)。需要特别注意的是,由于对照菌株与突变菌株来自同样的亲本,亲缘关系比较近,所以产生拮抗现象与否只能作为一个初步的筛选,不产生明显拮抗不代表没有发生变异。



注:0.4 和 0.6 表示诱变剂量;1~10 表示被辐照的 10 个平板中的第几个;a、b、c 表示对应平板上被取出的 3 块中的第几块。下同。
Note:0.4 and 0.6 indicate the mutagenic dose;1~10 represent the order of the 10 plates irradiated;a, b, c represent the order of 3 pieces in the corresponding plate. The same as below.

图 3 不同诱变菌株与对照菌株的对抗试验效果
Fig. 3 Antagonistic experiment of different strains of mutant with CK

2.3 SSR 分子鉴定

所选用的 5 对香菇特异性 SSR 引物可以将选出的 6 个突变菌株和 1 个对照菌株区分开, SSR 结果见表 3。突变菌株的 UPGMA 聚类情

况见图 4,可知,当相似系数为 0.65 时,7 株菌株被分成了 5 类,当相似系数为 0.82 时,7 株菌株被完全分开。

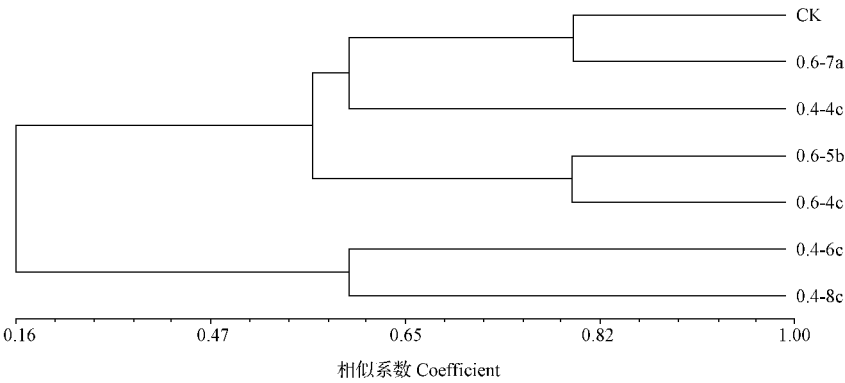


图 4 突变菌株的 UPGMA 聚类图
Fig. 4 UPGMA cluster of mutant

表 3 SSR 分子身份证
Table 3 SSR ID card

	xgssr-1	xgssr-2	xgssr-3	xgssr-4	xgssr-5
CK	1	1	1	1	1
0.4-4c	1	2	1	2	2
0.4-6c	2	1	2	1	2
0.4-8c	2	3	2	2	2
0.6-7a	3	1	1	1	1
0.6-5b	2	1	1	2	1
0.6-4c	2	1	1	1	1

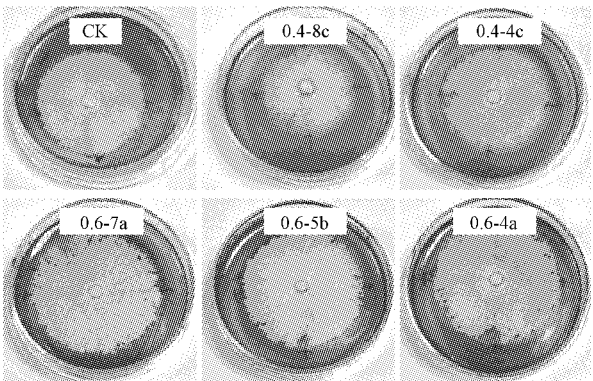


图 5 对照菌株与诱变后的菌株在 CMC-Na 培养基产生水解圈情况
Fig. 5 Hydrolytic cirde of mutant and CK in CMC-Na

2.4 对于诱变菌株在纤维素和半纤维素利用能力方面的筛选

从图 5~6、表 4~5 可知,对比对照菌株与变异菌株在羧甲基纤维素钠培养基中和在木聚糖培养基中的生长状态,记录其生长速度,并对测量的结果进行差异显著性分析,发现 0.4-4c 与对照菌株在纤维素利用率方面差异不显著,但在半纤维素利用能力发面差异极显著,其余菌株在纤维素利用能力和半纤维素利用能力方面均与对照组有显著差异。在纤维素利用方面,6 株变异菌株除 0.6-5b 与对照菌株持平外,其它 5 株变异菌株均不同程度的优于对照菌株。在半纤维素利用方面,0.4-8c 低于对照菌株,其余 5 株变异菌株明显优于对照菌株。

表 4 所选诱变菌株在 CMC-Na 培养基中的水解圈直径与菌丝直径比值

Table 4 Selected mutants in the hydrolytic circle diameter of CMC-Na media and the hyphal diameter ratio

	水解圈直径/菌丝直径 Hydrolytic circle diameter /Hyphal diameter	差异显著性 Significance of difference
CK	1.04±0.01	a
0.4-4c	1.07±0.00	a
0.6-4a	1.09±0.02	b
0.6-7a	1.06±0.00	ab
0.4-8c	1.05±0.00	ab
0.6-5b	1.04±0.03	b
0.4-6c	1.08±0.01	b

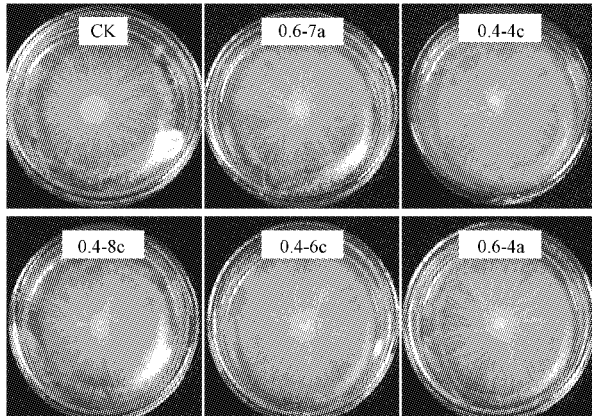


图6 对照菌株与诱变菌株在木聚糖培养基中的生长情况

Fig. 6 Growth of control strain and mutant strain in xylan culture medium

表5 木聚糖培养基中菌丝的生长情况

Table 5 Growth condition of strains in the xylan medium

	菌丝直径 Hyphal diameter/cm	差异显著性 Significance of difference
CK	6.69 ± 0.00	a
0.6-4a	7.63 ± 0.01	b
0.6-7a	7.32 ± 0.02	b
0.6-5b	7.07 ± 0.00	b
0.4-8c	5.95 ± 0.01	c
0.4-6c	7.25 ± 0.00	bc
0.4-4c	7.48 ± 0.01	c

3 结论

试验证明, ^{60}Co - γ 射线辐照诱变作为常用的物理诱变手段之一,可以有效地对菌株进行诱变,但在辐射剂量方面,以往的研究表明,当致死率为50%,即达到半致死剂量是最合适的,能同时保证较高的突变率和成活率。该试验结果表明,香菇菌株“庆20”的最适辐射剂量0.6 kGy,剂量率 $10 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

在筛选阶段之后,由于该试验主要的目的菌株是能更好的利用作物秸秆的变异菌株,故该试验主要对菌株的纤维素利用能力和半纤维素利用能力进行了验证。通过对峙试验的初步筛选和SSR-PCR分子确认后得到了6株符合要求的突变菌株,为了进一步确认,将这6株突变菌株与1株对照菌株一同进行了CMC-Na和木聚糖培养基中的生长试验,确定这6株突变菌株同对照菌株之间存在一定的差异性。

4 讨论

随着食药菌产业的快速发展和人们对于食用菌认识的加深,对于食用菌的需求量也日益增加。生产中必定需要更多的木屑或木段,也就意味着需要消耗更多的林业资源,所以如果能够选育出能适宜秸秆栽培的菌株,不但能有效缓解林业资源的消耗,而且能更高效的利用废弃的秸秆资源,对资源的有效利用和环境的保护都有重要的意义。

食药菌诱变技术发展至今,菌株退化问题严重,优良性状难以得到保持,所以如何保持突变株的优良性状,有效防止菌种的退化是日后需要解决的一个重要技术环节。

在诱变结果的验证和确认方面,该试验采取的是SSR分子确认手段和特定培养基的生长试验,为了更准确的确认诱变效果,加入一些其它的分子确认手段,进一步完善分子身份证的信息量也是一项很必要的确认手段,但此部分分析需要更多的特异性引物及更高效的检验手段作为支撑,对技术的要求逐渐增加,也对后续的研究提出了更高的要求。

参考文献

- [1] 中华人民共和国商务部. 出口商品技术指南-香菇(2014版)[EB/OL]. <http://policy.mofcom.gov.cn/export/mushrooms2014/index.action>. 2015-03-17.
- [2] 中国金融信息网. 食用菌产业成我国第五大种植产业[EB/OL]. <http://news.xinhua08.com/a/20160125/1602102.shtml>. 2016-01-25.
- [3] 吕作舟. 食用菌栽培学[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [4] 李玉. 中国食用菌产业的发展态势[J]. 食药菌,2011(1):1-5.
- [5] 李玉. 中国食用菌产业现状及前瞻[J]. 吉林农业大学学报,2008(4):446-450.
- [6] 宋冰,付永平,李丹. 食药菌诱变育种研究进展[J/OL]. 微生物学通报,doi:10.13344/j.microbiol.china.160867.
- [7] 林瑞虾. 草菇 ^{60}Co 诱变育种研究[D]. 福州:福建农林大学,2011.
- [8] 刘朋虎,陈爱华,江枝和. 姬松茸“福姬J77”新菌株选育研究[J]. 福建农业学报,2012,27(12):1333-1338.
- [9] 李前红. 利用放射性同位素 ^{60}Co 诱变技术创制双孢蘑菇育种新材料研究[D]. 成都:四川农业大学,2013.
- [10] 王正荣,江枝和,鄢铮. ^{60}Co - γ 射线辐射诱变秀珍菇的各类氨基酸效应的主成分分析[J]. 中国农学通报,2013,29(24):54-57.

- [11] 沈福良,张强. 蛹虫草原生质体⁶⁰Co 辐射诱变选育高产多糖菌株的实验[J]. 食用菌,2015(6):371-373.
- [12] 田鸿,张小平,余桂荣. 双孢蘑菇担孢子⁶⁰Co-γ 射线诱变效应初步研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2016(6):1423-1428.
- [13] 张建峰. 东北地区秸秆降解工程菌的选育及速腐菌剂的研制[D]. 长春:吉林农业大学,2012.
- [13] 曾青兰. 降解秸秆纤维素丝状真菌的分离鉴定[J]. 湖北农业科学,2008(6):652-655.
- [14] 张立霞,李艳玲,屠焰. 纤维素分解菌的筛选及其不同组合对秸秆降解的效果[J]. 饲料工业,2013(22):29-36.
- [16] 王新新,李丹,宋冰. 双孢蘑菇种质 SSR 分子身份证的构建[J]. 食用菌学报,2016(2):6-11.
- [17] 叶翔,黄晨阳,陈强. 中国主栽香菇品种 SSR 指纹图谱的构建[J]. 植物遗传资源学报,2012(6):1067-1072.
- [18] TOYAMA H, TOYAMA N. Cellulase hyperproducers constructed from polyploids of *Lentinus edodes* [J]. Microbios, 2000, 101(399):73-80.
- [19] 肖扬,李黎,吴茜. 香菇 SSR-PCR 技术体系的优化及其在遗传多样性分析中的初步应用[J]. 中国农学通报,2009(2):20-24.
- [20] TOYAMA H. Enhancement of microcrystalline cellulose degrading ability in *Lentinula edodes* by autopolyploidization at reduced temperature[J]. International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 2013, 4(3):308-314.
- [21] ZHU Z P, WU X, LYU B B, et al. A new approach for breeding low-temperature-resistant *Volvariella volvacea* strains: Genome shuffling in edible fungi[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2016, 63(5):605-615.
- [22] FRIES L. Mutations induced in *Coprinus fimetarius* (L.) by nitrogen mustard[J]. Nature, 1948, 162(4126):846-847.
- [23] HUNDERT P, KOLTIN Y, STAMBERG J, et al. Repair of UV-induced damage in wild-type and mutant strains of *Schizophyllum commune* [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1978, 50(2):157-162.
- [24] 肖扬. 几种新型分子标记技术在中国香菇种质资源遗传多样性研究中的应用[D]. 武汉:华中农业大学,2009.

Preliminary Screening of *Lentinula edodes* Mutant Strains by ⁶⁰Co-γ Irradiation

WANG Fei, SONG Bing, LI Dan, FU Yongping, MENG Lingsi, LI Yu

(Engineering Research Center of Chinese Ministry of Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: The *Lentinus edodes* strain ‘Qing 20’ was irradiated by ⁶⁰Co-γ ray, and the mutagen dosage was respectively 0.4 kGy, 0.6 kGy, 0.8 kGy, dose rate was 10 Gy · min⁻¹. Non-radiating treatment was CK. The effect of different mutagen dosages on the lethality rate of *Lentinus edodes* was studied. The mutant strains were identified by antagonistic reaction and SSR molecular marker, and utilization ratio of cellulose and hemicellulose was preliminarily screened. The results showed that all strains were alive after treated with 0.4 kGy, the death rate was 46.7% after treated with 0.6 kGy, and the death rate was 100% after treated with 0.8 kGy. Six mutant strains were screened out by antagonistic reaction and SSR, and the utilization ratio of cellulose and hemicellulose were better than CK.

Keywords: *Lentinula edodes*; ⁶⁰Co-γ; radiation mutagenesis; cellulose; hemicellulose