

应用变色法筛选斑玉蕈优良杂交子

张津京¹ 冯志勇¹ 刘洋² 赵静² 陈明杰¹ 汪虹¹ 宋晓霞¹ 陈辉^{1*}

(1. 国家食用菌工程技术研究中心 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 上海市农业遗传育种
重点开放实验室 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201403)
(2. 上海光明森源生物科技有限公司 上海 201408)

摘要:【目的】将变色检测方法应用于斑玉蕈优良杂交菌株的选育, 缩短育种过程。【方法】采用分光光度计检测变色培养基的颜色变化, 计算脱色率(D 值)。【结果】变色检测培养基的颜色变化和脱色率(D 值)是一致的, 即培养基显示黄色时 D 值是正值, 培养基显示蓝色时 D 值是负值。 D 值与斑玉蕈主要农艺性状具有紧密联系, D 值是正值的菌株平均吃料速度比 D 值是负值的菌株快, 单瓶产量和正常子实体数与 D 值呈正相关性, 畸形菇数与 D 值呈负相关性。【结论】应用变色检测法可以快速简单地筛选出优良菌株, 缩短斑玉蕈育种进程。

关键词: 斑玉蕈, 变色法, 杂交子, 农艺性状

Application of allochroic method on screening excellent hybridized strains of *Hypsizygus marmoreus*

ZHANG Jin-Jing¹ FENG Zhi-Yong¹ LIU Yang² ZHAO Jing² CHEN Ming-Jie¹
WANG Hong¹ SONG Xiao-Xia¹ CHEN Hui^{1*}

(1. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Key Laboratory of Resources and Utilization of Edible Fungi (South), Ministry of Agriculture, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China)
(2. Shanghai Bright Esunyes Bio-tech Co., Ltd., Shanghai 201408, China)

Abstract: [Objective] To shorten the process of screening excellent hybridized strains in *Hypsizygus marmoreus*. [Methods] We used the allochroic method in this study. [Results] The results showed that the color change of the allochroic medium was concordant with decolorization ratio (D value), of which the medium was yellow and the D value was positive value, and the medium was blue and the D value was negative value. Furthermore, we found that the D value was related to the main agronomic characters closely, and the mycelial growth of the strains with positive D value was faster than the strains with negative D value, the output per bottle and the number of normal fruit bodies had positive relationship with D value, and the number of abnormal fruit bodies had negative

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31401932); The Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 13391912202)

*Corresponding author: Tel: 86-21-62200747; Fax: 86-21-62201337; E-mail: huichen_js@aliyun.com

Received: October 14, 2015; Accepted: December 29, 2015; Published online (www.cnki.net): March 09, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31401932); 上海市科委专项项目(No. 13391912202)

*通讯作者: Tel: 86-21-62200747; Fax: 86-21-62201337; E-mail: Huichen_js@aliyun.com

收稿日期: 2015-10-14; 接受日期: 2015-12-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-09

relationship with *D* value. [Conclusion] Application the allochroic method could screen the excellent hybridized strains quickly and easily, and could shorten the breeding process of *H. marmoreus*.

Keywords: *Hysizygyus marmoreus*, Allochroic method, Hybridized strain, Agronomic characters

斑玉蕈(*Hysizygyus marmoreus*), 又名真姬菇、蟹味菇, 隶属白蘑科、玉蕈属, 因其独特的风味和丰富的营养受到广大消费者的青睐^[1]。在日本, 斑玉蕈是最早投入商业化生产的食用菌之一, 现在已成为除香菇(*Lentinus edodes*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)外的第三大栽培品种, 销售收入居第二位^[2]。在我国, 斑玉蕈是继金针菇、杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)后能够实现工业化生产的重要食用菌之一, 日产量可达 167 t, 产量仅次于金针菇和杏鲍菇(中国食用菌协会统计数据, 截止 2012 年底)^[3]。

目前, 单孢杂交育种仍是食用菌生产中筛选栽培菌株最有效的手段^[4]。相较于植物育种, 食用菌容易获得大量杂交子, 但从纷繁复杂的杂交子中筛选具有生产应用潜力的菌株是食用菌良种选育的“瓶颈”。而通过栽培实验考察杂交菌株质量优劣是一个费时费力的过程, 且存在易受环境因素与人为因素影响等缺点, 很难通过一两次的栽培实验客观评价杂交菌株的质量, 因而严重影响了育种进程。

Magae 等研究发现金针菇的正常菌株与退化菌株在液体培养基中具有不同程度地使合成染料变色的能力, 据此可以在培养一周左右时检测出退化菌株^[5]。本研究室将该方法应用于斑玉蕈, 建立了合成染料变色法评价斑玉蕈菌种质量的方法^[6], 并证实了该方法所依据的指标与斑玉蕈子实体的部分农艺性状间存在显著相关性^[7]。考虑到在筛选杂交子的育种过程中, 同样是以产量、子实体质量等农艺性状作为考察指标, 因此, 我们尝试将该方法应用于杂交子的筛选, 以期缩短斑玉蕈新品种选育时间, 提高育种效率, 同时为其他食用菌杂交子筛选提供可借鉴的方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

菌株斑玉蕈 SIEF2632 和 SIEF3132 由中国微生物

菌种保藏管理委员会农业微生物中心上海食用菌分中心提供, 为上海农科院食用菌研究所选育的工厂化栽培菌株。其他菌株为 SIEF2632 与 SIEF3132 的孢子单核体的 28 个杂交菌株(随机挑选)。

1.2 培养基

PDA 培养基购自美国 BD 公司。

栽培培养基(%): 木屑 30.0, 玉米芯 30.0, 米糠 22.0, 麸皮 13.0, 玉米粉 5.0, 含水量 65.0。

变色检测培养基(g/L): 乳糖 5.0, 溴百里酚蓝(Bromothymol blue, BTB) 0.025, 酵母粉 4.50, 蛋白胨 7.50, 加蒸馏水 1 000.0 mL, pH 自然。将此培养基定名为 Lactose BTB liquid (LBL)培养基。

1.3 栽培培养基上菌丝生长速度测定

将平板中经活化培养的供试菌株分别接种到 20 mm×200 mm 的试管中, 每管接种 1 cm² 菌块, 25 °C 培养箱中暗培养 7 d 后, 菌丝生长到的位置进行第一次划线, 继续培养 5 d 后, 第二次划线, 测量两次划线间的距离, 计算菌丝日生长速度。每个处理设 3 次重复。

1.4 栽培实验及主要农艺性状测定

栽培方法参照文献[8]。主要农艺性状包括单瓶产量、单瓶菇数量、单瓶畸形菇数量。

1.5 液体培养与检测

将培养于 PDA 培养基平板的菌块 1 cm², 接种于装有 50 mL LBL 培养基的 150 mL 三角瓶中, 25 °C、150 r/min 振荡培养 10 d, 观察液体培养基颜色变化。

测定吸光度, 计算脱色率(*D* 值)。

采用 Thermo Scientific 公司生产的 NANO DROP 1000 Spectrophotometer 进行全波长扫描, BTB 最大吸收峰 615 nm, 测定培养液的吸收值, 3 次重复, 求平均值, 并根据公式: $D = [A_{615}(\text{LBL 的空白培养液}) - A_{615}(\text{菌种培养液})] / A_{615}(\text{空白培养液}) \times 100$ 。

1.6 出菇性状稳定性实验

选择农艺性状最佳的3个杂交菌株和2个亲本进行3次出菇性状稳定性实验,主要考察了杂交菌株的产量、畸形菇数量,每个菌株接种80瓶(栽培瓶体积为1100 mL)。

2 结果与分析

2.1 菌株液体培养检测结果

将2个亲本菌株和28个杂交菌株按1.5所述的方法分别接种、培养,经10 d后观察培养液颜色及测量吸光度 A ,计算 D 值,其结果见表1。

供试菌株接种后经2–3 d培养,变色检测培养基颜色开始出现变化;经10 d培养后,可明显分辨出不同菌种间的颜色差异。为了进一步量化颜色的变化情况,应用分光光度计对培养液在220–750 nm区域进行全波长扫描,在615 nm处有一吸收峰,测定吸收值,并应用1.5中公式计算 D 值。从表

1中可知,杂交菌株在变色检测培养基中培养后,培养基颜色存在明显差异,肉眼可以辨别;吸收值测定也显示与颜色变化关系一致,即当吸收值低时显示黄色,相应 D 值为正值,当吸收值高时显示蓝色,相应 D 值为负值,当显示绿色, D 值介于两者之间;随机抽取的28株杂交子中显黄色的菌株占32%,黄绿色、绿色菌株分别占25%、21%,蓝绿色、蓝色菌株均为11%。

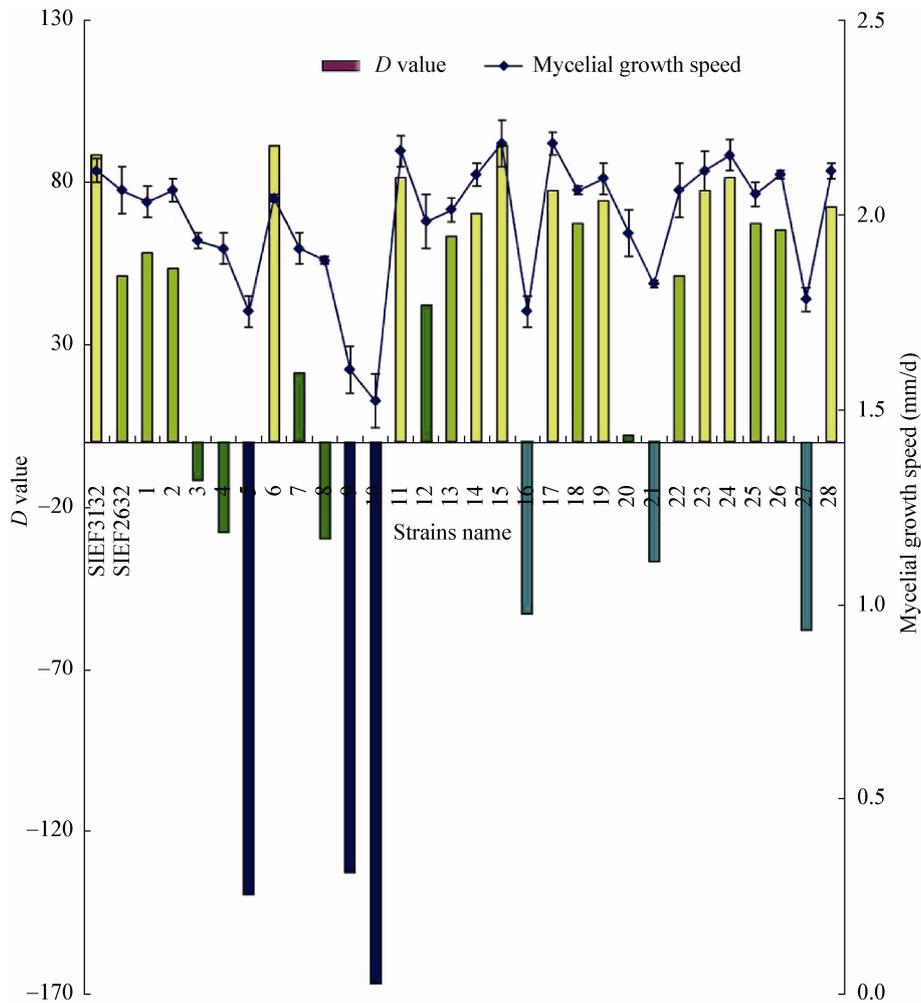
2.2 栽培培养基上菌丝生长速度测定

食用菌在栽培培养基上的菌丝生长速度(即吃料速度)可从一定角度反映菌株质量的优劣:在栽培培养料上吃料快的菌株质量不一定优良,但吃料慢的菌株,生长周期较长,在相同生长期内,由于利用营养较少,子实体质量一般都较差。因此,对菌株在栽培培养料上菌丝生长速度进行测定,可以从营养利用能力的角度评价该菌株的质量(图1)。由图1可知, D 值为负值的9个菌株的平均生长速度

表1 亲本与杂交菌株吸光度检测结果

Table 1 The absorbance values of parent and hybridized strains in liquid medium

菌株编号 Strain No.	培养液显色 Medium color	吸光度 OD_{615}	D 值 D value	菌株编号 Strain No.	培养液显色 Medium color	吸光度 OD_{615}	D 值 D value
SIEF2632	黄绿色	0.021 0±0.003 7	51	SIEF3132	黄色	0.005 0±0.000 7	88
1	黄绿色	0.018 0±0.003 6	58	15	黄色	0.004 0±0.001 1	91
2	黄绿色	0.020 0±0.004 9	53	16	蓝绿色	0.066 0±0.002 4	-53
3	绿色	0.048 0±0.005 2	-12	17	黄色	0.010 0±0.000 8	77
4	绿色	0.055 0±0.003 9	28	18	黄绿色	0.014 0±0.004 2	67
5	蓝色	0.103 0±0.005 8	140	19	黄色	0.011 0±0.001 3	74
6	黄色	0.004 0±0.000 6	91	20	绿色	0.042 0±0.003 8	2
7	绿色	0.034 0±0.001 7	21	21	蓝绿色	0.059 0±0.004 6	-37
8	绿色	0.056 0±0.002 1	30	22	黄绿色	0.021 0±0.001 5	51
9	蓝色	0.100 0±0.002 7	133	23	黄色	0.010 0±0.003 5	77
10	蓝色	0.115 0±0.012 9	167	24	黄色	0.008 0±0.001 7	81
11	黄色	0.008 0±0.001 3	81	25	黄绿色	0.014 0±0.002 1	67
12	绿色	0.025 0±0.004 1	42	26	黄绿色	0.015 0±0.004 5	65
13	黄绿色	0.016 0±0.009 8	63	27	蓝绿色	0.068 0±0.006 5	-58
14	黄色	0.013 0±0.000 8	70	28	黄色	0.012 0±0.003 2	72

图1 生长速度与 D 值及变色检测培养基显色的关系Figure 1 Relationship of mycelial growth, D value and the color of chromogenic medium

注: 柱状图颜色为变色检测培养基显示颜色。

Note: The color of histogram was the color of chromogenic medium.

为 1.77 ± 0.13 mm/d, 当 D 值为正值的 21 个菌株的平均生长速度为 2.07 ± 0.07 mm/d; 呈黄颜色的菌株生长速度表现较好, 呈蓝色的菌株生长速度最低, 过渡色则介于两者之间。

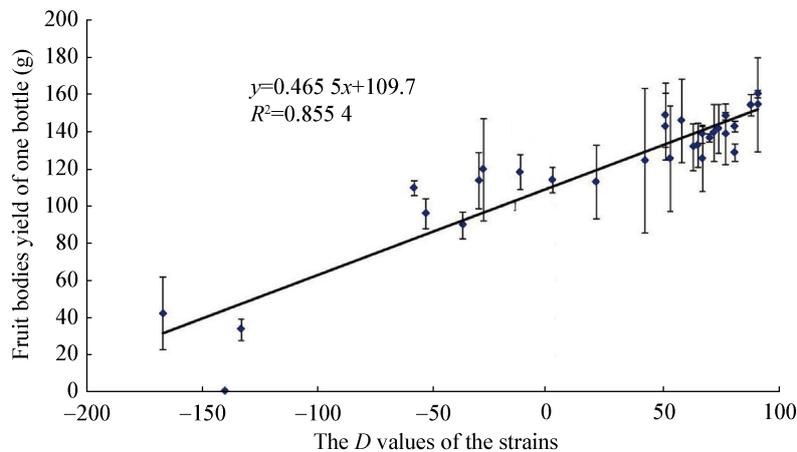
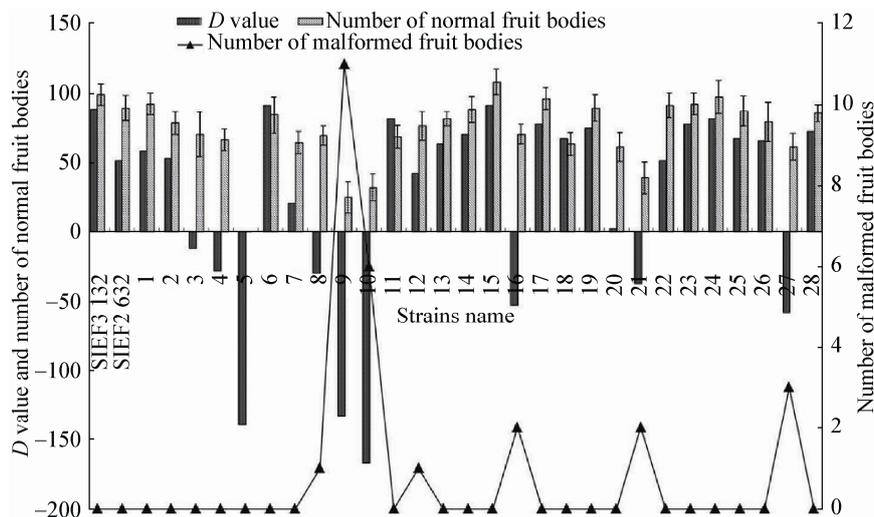
2.3 杂交菌株产量与 D 值的关系

产量作为食用菌农艺性状的最重要指标之一, 是评价品种质量优劣的基本指标。对供试菌株的单瓶产量进行了 3 个批次的栽培试验, 并结合该菌株的 D 值, 建立了产量和 D 值的关系图(图 2)。由图 2 可知, 单瓶产量与 D 值呈正相关性, R^2 达到了 0.855 4; 当 D 值大于 50 时, 单瓶(850 mL)产量均值维持在 120 g/瓶以上的较好水平; 当 D 值小

于 -100 时, 产量显著下降, 一般不足 60 g/瓶。

2.4 杂交菌株单瓶子实体数、畸形菇数与 D 值的关系

对供试菌株单瓶子实体数、畸形菇数进行统计, 并与其 D 值进行比较, 如图 3 所示: 显色与正常子实体数相关性较好, D 值最大的两个菌株 6 号和 15 号, 子实体数分别为 84 ± 13 和 108 ± 9 , 而 D 值最小的两个菌株 5 号和 10 号, 子实体数分别为 0 和 32 ± 10 ; 在畸形菇数上, D 值为负的菌株有 9 个, 其中出现畸形菇的菌株有 6 个, 而 D 值为正时仅有 1 个菌株出现了畸形菇; 出现畸形菇数量最多的是 9 号菌株, D 值为 -133。

图2 单瓶产量与 D 值的关系Figure 2 Relationship of output per bottle and D value图3 单瓶子实体数、畸形菇数与 D 值的关系Figure 3 Relationship of numbers of normal and abnormal fruit bodies per bottle and D value

3 讨论

2011年,本课题组通过液体培养、可见光谱分析与结实性试验,研制了真姬菇菌种质量评价方法,确立了评价用培养基质的组成,命名为LBL^[6]。在此基础上,本研究将该方法应用于斑玉蕈优良杂交子的选育。研究表明,变色检测培养基的颜色变化与 D 值是一致的,即培养基显黄色的 D 值是正值,显蓝色的 D 值是负值。参数 D 值的引入使颜色变化被量化,可以更准确地反映培养基在菌株培养后的颜色变化情况,使肉眼观察颜色相同的

不同样本之间的比较成为可能。刘洋等的研究结果显示 D 值与单瓶产量、有效子实体数量、畸形菇数量等重要农艺性状呈显著相关性,并建立了基于相关参数的菌种质量拟合方程^[6]。另外,他们还发掘了斑玉蕈菌种质量的一些预判性指标,证实了斑玉蕈子实体的主要表观农艺性状与菌种质量的相关性^[7]。我们的研究也显示 D 值与斑玉蕈杂交菌株的菌丝吃料速度、单瓶子实体产量、子实体数量呈正相关性,与畸形菇数量呈负相关性; D 值最大的两个杂交菌株6号和15号的农艺性状也较好。这

些结果说明将我们建立的菌种质量评价方法应用于斑玉蕈优良杂交子的选育是可行的, 利用此方法可以明显地缩短斑玉蕈新品种选育时间, 提高育种效率。同时, 此研究也为其他食用菌新品种选育提供一个借鉴。

Magae 等最早提出了应用分光光度法检测添加了特定指定剂的碳源培养基的颜色变化, 并据此开展对金针菇菌种质量评价的研究^[5]。我们课题组的赵楚楚等对评价菌种质量的 LBL 法的作用机理进行了初步的研究, 发现显示黄色的优质菌株, 代谢乳糖能力强, 培养基的 pH 值、电导率变化小; 显示蓝色的劣质菌株, 代谢乳糖能力弱, 培养基的 pH 值、电导率变化大; 引起变色的活性物质可以分泌到细胞外, 在胞内没有发现活性^[9]。在后续的研究中, 我们将更深入地研究其与菌株质量间的相关性的作用机制, 期望可以提供精确稳定的菌种质量评价方法, 在保持菌种活力和提高菌种质量方面提供新的研究手段。

参 考 文 献

- [1] Harada A, Gisusi S, Yoneyama S, et al. Effects of strain and cultivation medium on the chemical composition of the taste components in fruit-body of *Hypsizygus marmoreus*[J]. Food Chemistry, 2004, 84(2): 265-270
- [2] Huang NL, Lin ZB, Chen GL, et al. Medicinal and Edible Fungi[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Literature Press, 2010: 14 (in Chinese)
- [3] 黄年来, 林志彬, 陈国良, 等. 中国食药菌学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2010: 14
- [4] Huang Y. Edible Fungi Cultivation[M]. 3rd Edition. Beijing: Higher Education Press, 2008: 191,206 (in Chinese)
- [5] 黄毅. 食用菌栽培学[M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 191,206
- [6] Zhang JX. The Science and Development of the Edible Mushroom Industry in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 45-49 (in Chinese)
- [7] 张金霞. 中国食用菌产业科学与发展[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 45-49
- [8] Magae Y, Akahane K, Nakamura K, et al. Simple colorimetric method for detecting degenerate strains of the cultivated basidiomycete *Flammulina velutipes* (Enokitake)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 6388-6389
- [9] Liu Y, Chen H, Feng ZY, et al. An integrative and quantitative evaluation method of strain quality of *Hypsizygus marmoreus*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2011, 17(4): 577-579 (in Chinese)
- [10] 刘洋, 陈辉, 冯志勇, 等. 一种真姬菇菌种质量整合定量评价方法[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(4): 577-579
- [11] Liu Y, Chen H, Feng ZY, et al. Analysis on correlation between LBL evaluation and agronomic characters of *Hypsizygus marmoreus*[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2011, 27(2): 116-120 (in Chinese)
- [12] 刘洋, 陈辉, 冯志勇, 等. LBL 评价与真姬菇表观农艺性状相关性分析[J]. 上海农业学报, 2011, 27(2): 116-120
- [13] Cheng JH, Feng ZY, Gao JH. Effect of culture spawn-incubation times on the yield and quality of *Hypsizygus marmoreus*[J]. Acta Edulis Fungi, 2003, 10(2): 45-49 (in Chinese)
- [14] 程继红, 冯志勇, 高君辉. 栽培培养时间对真姬菇产量和质量的影响[J]. 食用菌学报, 2003, 10(2): 45-49
- [15] Zhao CC, Chen H, Feng ZY, et al. Preliminary study on the LBL evaluation mechanism of *Hypsizygus marmoreus* spawn quality[J]. Acta agriculturae Shanghai, 2013, 29(5): 70-73 (in Chinese)
- [16] 赵楚楚, 陈辉, 冯志勇, 等. 斑玉蕈菌种质量 LBL 评价法作用机理初探[J]. 上海农业学报, 2013, 29(5): 70-73