

物理诱变在药食用菌育种中的应用研究进展

孙玲, 刘利平, 徐婉茹, 李哲, 孙宇, 张志才, 马海乐* (江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要 药食用真菌以其营养丰富、免疫调节、抗菌、抗癌等营养保健功能而深受人们喜爱, 提高药食用真菌产量、改善药食用真菌品质是食用菌育种的重要目标, 物理诱变育种发挥了重要作用。介绍了物理诱变法在药食用真菌育种中的应用进展, 并对物理诱变机理、物理诱变过程进行了综述。

关键词 食用菌; 物理诱变; 菌种选育

中图分类号 S646 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)14-0029-05

Research Progress on Physical Mutation Breeding of Edible and Medical Fungi

SUN Ling, LIU Li-ping, XU Wan-ru et al (School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013)

Abstract It is very popular to eat edible and medical fungi which has nutrition and health care function, for example, immune regulation, anti-bacterial, anti-cancer and so on. How to improve yield and quality is the important goal of edible and medical fungi breeding. Physical mutation plays important roles in edible and medical fungi breeding. The recent progress of different physical mutation methods in study of edible and medical fungi physical mutation were introduced. The possible mechanism of inducing mutation and the main inducing process were reviewed.

Key words Edible and medical fungi; Physical mutation; Breeding

药食用真菌是可食用和药用的大型真菌, 我国是世界上认识、利用药食用真菌最早的国家之一, 也是栽培药食用真菌历史最长的国家。随着科学技术的发展, 药食用真菌中具有的药学活性成分逐渐受到人们重视, “一荤一素一菌菇”的饮食习惯开始深入人心。据中国食用菌协会统计^[1], 1978年我国食用菌产量仅6万t, 占全球的5.7%, 到2013年食用菌产量已高达3 167万t。由于菌菇类价格较高、较种植一般农作物收益高, 因此栽培药食用真菌有利于提高国民生产收入, 尤其是提高农民收入。我国野生药食用真菌资源丰富, 但可栽培的药食用真菌种类偏少、品种较单一, 很大程度上限制了药食用真菌的发展规模, 药食用真菌菌种选育已成为亟需解决的问题。目前人工栽培的药食用真菌品种大多是通过驯化野生菌种、杂交育种、诱变育种等方法培育获得。尽管药食用真菌在自然条件下也会发生突变, 但突变率极低, 有益于产量提高、品质提升的突变株更少, 而人工育种能够加速提高药食用真菌的优良菌株的选育。随着生物技术的快速发展, 基因工程、蛋白质点突变技术等技术在微生物育种工作中发挥了极大的作用。由于药食用真菌种类繁多, 相关基础研究较少, 金针菇、香菇、杏鲍菇、牛樟芝、灰树花、灵芝等药食用真菌的全基因组测序也是近几年才完成^[2-5], 因此, 采用基因工程等技术对药食用真菌育种尚存在很大难度。传统的诱变育种具有简单、易行、高效, 且对基因组信息要求较低等优点, 在药食用真菌的菌种选育中发挥了重要作用。诱变育种方法包括物理诱变、化学诱变、生物诱变等, 物理诱变具有安全、高效等优点因而深受广大育种工作者喜

爱, 笔者综述了物理诱变技术在药食用真菌菌种选育中的研究进展, 总结了物理诱变原理、物理诱变菌种选育过程以及相关注意问题, 以便于药食用真菌优良菌株的筛选和生产应用。

1 物理诱变

1.1 物理诱变方法 物理诱变的原理是使用各种射线对药食用真菌进行诱变处理, 从中筛选具有优良性状的单菌株, 传统诱变主要采用紫外线、X射线、 γ 射线、快中子等方法进行诱变。随着科技的发展, 最新物理诱变技术相继出现, 激光、超声波、电磁波、微波、宇宙射线等诱变方法, 极大地促进了药食用真菌的菌种选育。

1.1.1 传统物理诱变方法。传统物理诱变一直在农作物、微生物等育种工作中发挥着重要作用, 由于大多药食用真菌遗传背景、分子生物学等信息尚不清楚, 传统物理诱变育种在药食用真菌优良菌种选育中仍具有重要价值。

1.1.1.1 紫外线诱变。紫外线诱变是使用最早、沿用最久、应用广泛的物理诱变技术。因紫外诱变设备易得、操作简单, 一直是农作物、果蔬、微生物等育种中使用最多的诱变方法, 该技术使很多优良品种得以应用推广。紫外诱变育种的特点: 在260 nm紫外区域范围内DNA吸收峰最高, 易形成嘧啶二聚体, 阻碍碱基正常配对和DNA双链的解旋, 影响DNA链的复制, 导致诱变材料发生突变甚至死亡。紫外线这一特点使得紫外诱变一直深受广大育种工作者的喜爱, 在药食用真菌的诱变育种方面起到极大促进作用。

1.1.1.2 电离辐射诱变。X射线和 γ 射线都是高能电磁波, 利用放射源照射植物材料, 放射源放射出的快速运动的带电粒子通过物质时, 与物质原子中的电子和原子核相互发生碰撞, 进行能量转换, 使物质内部发生电离或激发, 形成正离子和负离子或激发态原子。辐射产生的电离作用以直接或间接的方式作用于DNA结构, 直接作用是引起碱基、脱氧核糖、糖-磷酸等化学键断裂, 间接作用是通过电离辐射使水、有机分子等产生的自由基间接作用于DNA分子, 从而引

基金项目 国家自然科学基金项目(31600197); 江苏省自然基金青年基金项目(BK20150501); 遗传工程国家重点实验室项目(SKJGE-1614); 江苏大学高级专业人才培养启动基金项目(14JDC158); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介 孙玲(1982—), 女, 山东诸城人, 讲师, 博士, 从事食品生物技术研究。*通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事生物菌种选育研究。

收稿日期 2018-02-26; **修回日期** 2018-03-06

起基因突变、染色体断裂等。X射线和 γ 射线含有比紫外线更多的能量和穿透力,更易打断DNA双链或单链,引起染色体断裂、缺失、重复、插入等突变。X射线、 γ 射线等传统辐射技术在水稻、小麦、大豆等农作物育种中起主力军作用,以 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 、X射线诱变育种应用最广,已经培育出大量新品种。由于这些射线诱变具有突变效率高、诱变简易的优点,因而也应用于药食用真菌菌种的选育。

1.1.2 最新物理诱变方法。物理诱变技术的发展有利于克服传统诱变技术的局限性、拓宽诱变域、提高诱变效率,以下是近些年发展的物理诱变方法,有望在药食用真菌优良菌种选育中发挥重要作用。

1.1.2.1 激光诱变。20世纪60年代才逐步兴起的激光诱变技术已成为农作物品种选育的主力军,其被广泛用于微生物、药食用真菌等菌种选育。激光具有能量集中、方向性好、定向性强等特点,根据激发器激发波长不同,分为紫外激光(波长260~380 nm)、可见光激光(波长440~700 nm)、红外激光(波长900~447.2 $\times 10^3$ nm),大多数频率的激光都有诱变效果,最常用的激光器主要是 CO_2 、He-Ne、 N_2 、YAG等。

1.1.2.2 超声波诱变。超声波是一种频率高于20 kHz的声波,具有方向性好、穿透能力强、声能集中、在水中传播距离远等特点,已在医学、军事、工业、农业上有很多的应用。超声波在诱变育种方面也有重要应用价值,主要作用体现在:①机械作用,如果超声诱变的频率与DNA分子的固有频率相同,就能发生共振,在共振状态的DNA分子吸收超声的能量达到峰值,会使原子发生剧烈振动,这种不稳定性可能导致DNA分子断裂,引起突变;②热效应,在超声过程中会对生物体产生热效应,为生物体中的各种酶提供反应条件,试验证明超声空化效应使单泡在闭合瞬间可产生高达7 000~16 000 K的瞬息高温,这瞬间的高温是否也对DNA等遗传物质产生了诱变筛选作用,有待于试验验证;③氧化还原作用,超声作用下能够形成具有强氧化还原特性的 $\text{H}\cdot$ 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基,这些自由基直接作用在DNA等生物大分子上引起突变^[6]。

1.1.2.3 离子束诱变。离子束诱变技术是20世纪80年代新兴技术,是指将一束具有能量的带电粒子注入细胞内,带电粒子注入后由于能量作用、质量沉积、动量传递、电荷交换等反应引起各种复杂的生物效应,引起DNA链断裂、基因突变、重组等。离子束诱变具有损伤轻、突变率高、突变谱宽、遗传稳定、易于获得理想菌株等特点,最早用于水稻、小麦等农作物的诱变育种,并且诱变出多个具有优良性状的新品种。离子束诱变在药食用真菌的菌种选育中也发挥了重要作用。

1.1.2.4 微波诱变。微波是指频率为300 MHz~300 GHz的电磁波,是一种低能电磁辐射,微波处理后生物体产生热效应和非热效应,热效应是指能够引起生物体局部温度上升,引起一系列生理生化反应,甚至死亡;非热效应是指生物体在低强度的微波作用下不产生明显的温度升高,但已经引起生物体内生理生化功能发生变化。经过多年研究,微波育

种在农作物、蔬菜、工业微生物等领域取得了一些成果。

1.1.2.5 脉冲强光诱变。脉冲强光具有诱变育种的作用。脉冲强光可致死微生物,关于脉冲强光杀菌效果和机制的研究较多,由于脉冲强光对微生物的核酸结构有影响,因此其可诱变微生物产生突变。张佰清等^[7]利用脉冲强光诱变啤酒酵母,脉冲处理电压分别选择1 000、1 500、2 000、2 500、3 000 V,分别选择闪照次数为4、8、16、32、48,筛选出的10#和12#这2株菌株发酵性能较好,且未对啤酒酵母的发酵度产生负面效应。孟宪军等^[8]采用电脉冲强光对纳塔尔链霉菌(*Streptomyces natalensis*)进行诱变处理,选育出1株遗传性状稳定的正突变株SN114,纳他霉素产量达1.098 g/L,较出发菌株提高1.6倍。赵春燕等^[9]采用脉冲强光照射诱变技术、定向分离筛选Nisin高产菌株,发现脉冲电压为1 000 V的诱变效果优于1 500 V,低剂量脉冲强光诱变效果比高剂量更好,选育到1株Nisin高产菌株,以上说明脉冲强光具有诱变作用,有望用于其他菌种选育。

1.1.2.6 超临界 CO_2 诱变。超临界 CO_2 是一种环境友好的溶剂,对微生物具有一定的致死效应,同样也具有诱变的潜力。张巧艳等^[10]尝试用超临界 CO_2 对脂肪酶(*Flavobacterium* sp. Strain YY25)菌株进行诱变处理。研究 CO_2 压力、温度、处理时间以及化学添加剂(二甲亚砜、水合肼)对YY25菌株存活率和正突变率的影响,确定的最适诱变剂量分别为8 MPa、35 $^\circ\text{C}$ 、30 min的超临界 CO_2 和1%的二甲亚砜、0.5%的水合肼。经过诱变筛选获得1株产酶活力为29.0 U/mL的突变株(YY25-H0.5),较出发菌株YY25提高76.7%,有望用于诱变育种。

1.1.2.7 复合诱变。不同诱变法都有其自身突变域的局限性,单一诱变方法往往难以达到预期效果,采用2种及其以上的诱变方法,即复合诱变法,有利于拓展突变谱、增加突变频率、提高正突变率。复合诱变既可以使用2种物理诱变法,也可以是物理诱变法与化学诱变、生物诱变、杂交育种、基因组重排等方法配合使用。复合诱变方法主要有2种:①2种诱变方法依次处理出发菌株,即第1种诱变处理后紧接着第2种诱变处理,筛选优良菌株;②每次诱变处理都筛选菌种1次,即第1种诱变处理后筛选优良菌株,然后对选育出的优良菌株进行第2种诱变处理,再次筛选优良菌株。复合诱变法较单一诱变法的优势已在药食用真菌菌种选育工作中得到证实。采用复合诱变法有利于克服各种突变方法的局限性,拓宽突变域,更有利于筛选到有益菌株。

1.2 物理诱变育种机理 诱变育种是使遗传物质发生改变的过程,只有遗传物质改变才能获得能够遗传的突变株。细胞基因组DNA发生损伤,如果没有及时被修复,将在复制、转录过程中出错,易产生突变、基因组变异甚至死亡。深入研究诱变机理有利于提高诱变效率、加快诱变育种。根据最新研究进展综述了目前研究较多的物理诱变机理。

1.2.1 紫外诱变育种。紫外诱变育种是广泛应用的育种方法,研究紫外线对DNA损伤的机理有利于提高紫外诱变效率。由于自然光中的紫外线对人、农作物等均造成一定程度

的伤害,很多研究集中在 DNA 的损伤修复机制。紫外诱导 DNA 中相邻的嘧啶交联形成嘧啶二聚体,包括环丁烷嘧啶二聚体(cyclobutane pyrimidine dimer,CPD)、嘧啶(6-4)嘧啶酮光产物和杜瓦价同分异构体^[11]。核苷酸切除修复(nucleotide excision repair,NER)是去除紫外诱导的嘧啶二聚体的主要修复方式。DNA 损伤后没有及时修复影响其复制和转录,引起突变、染色体变异,甚至死亡。在哺乳动物中,环丁烷嘧啶二聚体主要位于核小体上的 DNA 中,专一由核苷酸切除修复通路修复。Horikoshi 等^[12]解析了含有环丁烷嘧啶二聚体的核小体晶体结构。在核小体中,CPD 只引起有限的骨架扭曲,受影响的碱基局限在双链中,而且在核苷酸切除修复通路起始阶段 UV-DDB(UV-damaged DNA-binding protein,UV-DDB)也有效结合到核小体的 CPD 上,这些结果为了了解 CPD 在染色质中如何适应和被识别提供了重要的结构和生化信息。最新研究^[13]表明,紫外线诱变后 2 min 内被诱导的 RNA m6A 甲基化迅速聚集到 DNA 损伤位点,修复由紫外线照射 DNA 引起的 CPD,迅速招募 DNA 聚合酶 κ 到 DNA 断点修复 DNA,揭示了由紫外线引起的 DNA 损伤修复与 RNA 修复过程的联系。

1.2.2 重离子束诱变育种。重离子束诱变是一种有效的诱变剂。重离子束具有高突变率、突变谱广的特点,能有效诱导新突变体产生。在很难用 γ 或 X 射线诱导突变的菊花和康乃馨中,重离子束诱变有较好的诱变效果^[14]。这可能是由于沿着离子质点轨迹的一定区域内含有浓密的离子。线性能量转移(linear energy transfer,LET,keV/ μ m)代表了局部能量存储的程度,是重离子突变的一个重要参数。在较低 LET 范围内,随着 LET 参数提高诱变率提高。例如碳离子束的 LET 在 30.0 keV/ μ m 时较 LET 强度在 22.5 keV/ μ m 时具有 2 倍以上的诱变率,与常用化学诱变试剂乙基甲烷磺酸(ethyl methane sulfonate,EMS)的诱变率相似,诱变的突变体 80% 以上为碱基替换、100 bp 以内小片段 DNA 缺失、插入,少数涉及染色体的重排^[15]。随着重离子剂量的进一步提高,重离子束诱变的突变率将进一步降低,染色体重排概率提高。例如以 640 keV/ μ m 的高 LET 铁离子诱变较低 LET 诱变有较低的突变率,突变有碱基缺失、大片段 DNA 缺失、大片段 DNA 重复、DNA 重排等形式,表明重离子束诱变更有利于获得染色体的重排和大片段的缺失等突变体^[16]。利用微阵列比较基因组杂交技术(Array-CGH)和重测序技术在整个染色体水平上综合分析氙离子或铁离子对拟南芥基因组重排的影响,Array-CGH 数据显示氙离子或铁离子诱变后基因组内缺失片段平均数分别是 1.9 和 3.7,而且 81% 的缺失与基因组的重排同时存在,分析发现 DNA 重排多数是染色体内部重排,少数存在染色体间重排,表明重离子束导致染色体内部聚集的 DNA 损伤,有利于育种和突变系的构建^[17]。

1.2.3 激光诱变育种。激光是一种高亮度的定向能束,是由原子或者分子受到激发而产生的被放大的一种相干光辐射,由于激光源应用简单、易行,且突变效果佳,已被广泛应用于育种。激光诱变过程涉及多光子的吸收和等离子的形

成,激光产生的最大功率有利于在活细胞核内沉积亚微米大小的辐射能,激活电离和光化学驱动过程。利用超快 [<200 fs (200×10^{-15} s)]、能量低于 100 pJ 的激光处理,在多光子吸收过程中有可能产生 DNA 损伤,包括双链断裂、单链断裂和单碱基损伤,损伤的机制涉及直接电离作用、核酸电子激发态的产生,或者在 DNA 附近产生其他活性中间体通过水或者其他细胞组分诱导 DNA 的非直接损伤^[18]。He-Ne 激光在激光诱变育种中发挥了重要作用,激光辐照剂量、输出功率、辐照时间等是影响细胞存活率、正突变率的重要参数^[19]。

2 物理诱变在药食用真菌育种中的应用

2.1 物理诱变在食用菌育种中的应用 物理诱变技术的发展,尤其是最新物理诱变技术的开发和应用,极大地促进了食用菌菌种选育。以几种常见食用菌为例介绍物理诱变育种的应用。

2.1.1 香菇。段东霞^[20]采用波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光,以不同剂量辐照香菇 135 原生质体,产生了不同效果的诱变效率,筛选到的变异株经酯酶同工酶谱分析发现酶带条纹数、迁移率等均发生了显著变化,变异株的生长速率、生物量也发生了明显变化。江枝和等^[21]利用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照大杯香菇,结果发现 1.25 kGy 处理组较其他处理组诱变效果好,为较适宜的辐射剂量。颜丽君等^[22]采用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照诱变尖端菌丝,在辐照剂量 800 Gy、剂量率 8.3 Gy/min 的条件下,通过菌丝生长速度、拮抗试验、品比栽培选育出 1 株姬松茸优良菌株 JB6,新菌株在菌丝长速、出菇期及产量等方面,均优于对照菌株。

2.1.2 草菇。草菇是典型的热带高温型食用菌,菌丝对低温的抵抗力差,对环境条件的变化尤其是对温度的变化很敏感。与大多数食用菌相比,草菇存在着冷害,即在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的低温条件下保存,菌丝会发生自溶而导致菌种死亡和子实体发软,液化直至腐烂,这给草菇的菌种保存和产后保鲜带来了极大的困难。Zhu 等^[23]先通过 1% EMS、40 s 紫外诱变、750 Gy $^{60}\text{Co}-\gamma$ 辐射等诱变方法处理不同种草菇的菌丝,筛选到 16 个突变株,以 16 个突变株为出发亲本菌株,经 4 轮基因组重排和低温抗性检测,筛选到 3 个菌株(VF1、VF2 和 VF3)在 10 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可分别保存 20、28、28 h,较抗低温效果较好的出发菌株提高 25%、75% 和 75%;韩业君等^[24]通过 UV、 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线、硫酸二乙酯(DES)对草菇 V23 原生质体进行复合诱变,从近 1 500 株诱变菌株中选育出耐常规低温(4 $^{\circ}\text{C}$) ≥ 10 d 菌株 VH1、VH2、VH3、VH4。除 VH1 以外,各诱变株在较低温度(18、22、26、28、30 $^{\circ}\text{C}$)下生长速度明显高于 CK。初筛、复筛获得耐常规低温(4 $^{\circ}\text{C}$)10 d 的菌株 VH,在 26 $^{\circ}\text{C}$ 下的生物学效率明显优于出发菌株,且差异极显著、遗传性状稳定,是具有潜在应用价值的优良菌株。

2.1.3 金针菇。成亚利等^[25]用紫外线对金针菇(*Flammulina velutipes*) Y19 和 W088 菌株原生质体照射 1 min 进行诱变处理,筛选出的突变菌株与出发菌株相比,生长速率提高 23.1%~52.3%,出菇提前 10~14 d,表明紫外诱变能够有效

诱变食用菌菌株,利于优良菌株筛选。紫外线穿透能力差,因此常与激光、离子束等诱变方法联合使用,利于提高诱变效率。陈力力等^[26]比较了紫外线、微波单因子对金针菇 J05Y-c 单细胞悬液的诱变效应,微波诱变的正突变率大于紫外诱变的正突变率,分别为 85.00% 和 76.67%。采用最大功率 700 W、脉冲频率 2 540 MHz 的微波炉,以中等功率强度处理 80 s,获得 HC 值、菌丝生长量较出发菌株提高 32.38%、62.16% 的优势突变株 W8011,连续 8 次传代遗传性能稳定。

2.1.4 杏鲍菇。刘海英等^[27]利用 20 W 紫外灯(245 nm)对杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)菌株 PL7 的原生质体进行了诱变,筛选出的 20 株突变株与出发菌株 PL7 有明显的拮抗作用,其中 6 个菌株菌落生长速度提高了 11.0%~17.8%,液体培养生物量提高了 19.3%~32.4%,出菇试验结果表明此 6 个菌株较出发菌株长满培养料天数缩短、产量有不同程度的提高;夏志兰等^[28]采用⁶⁰Co- γ 射线诱变杏鲍菇菌丝,在辐照剂量 1 000 Gy、剂量率为 67.8 Gy/h 的条件下,经过拮抗试验和酯酶同工酶电泳验证,选育出 1 株杏鲍菇新菌株,诱变菌株较出发菌株的菌丝积累量差异均达到极显著水平。由于 X 射线、 γ 射线等电离辐射穿透力强,危险性较高,对操作人员和环境存在潜在的危害,电离辐射技术诱变选育食用菌菌株的研究相对较少。

2.1.5 姬松茸。叶勋艳等^[29]利用相似的试验方法发现 He-Ne 激光对诱变姬松茸原生质体也具有非常好的效果。比较分析 2 种激光对酵母菌的诱变发现,CO₂ 激光诱变率(0.47%)较 He-Ne 激光诱变率(1.50%)低。

2.1.6 松乳菇。凡启超等^[30]用低能氮离子束注入松乳菇后,随着辐照剂量的增加,菌株成活率呈现“马鞍型”的趋势;筛选出的诱变菌株 Ld-135 液体发酵生物量显著高于出发菌株 Ld-CK,突变菌株 Ld-135 和菌株 Ld-180 的胞内多糖含量分别为 1.27% 和 1.06%,较出发菌株显著提高。

2.1.7 蟹味菇。董先茹等^[31]采用氮离子束诱变蟹味菇菌株,筛选出优质突变菌株 X-004,菌株的产量、麦角甾醇、蛋白质和粗纤维含量在各诱变菌株中均为最高,产量达 139.22 g,麦角甾醇在菌盖中含量为 4.228 mg/g,菌柄中为 1.690 mg/g,蛋白质和粗纤维含量分别达 35.41% 和 23.29%。

2.1.8 猴头菌。严涛等^[32]以猴头菌菌丝为材料,在较大剂量范围对猴头进行离子束注入,筛选到 3 株最适温度下生长速度较快和 3 株较高温度下生长速度较快的 6 个变异菌株,突变株菌丝的多糖、氨基酸含量均有提高。离子束诱变技术作为一项新技术,在诱变育种领域具有很大潜质。

2.1.9 阿魏菇。陈恒雷等^[33]尝试用阿魏菇菌丝制备的单细胞为靶材,以离子束注入和激光辐照为复合诱变手段,采用营养缺陷型筛选办法定性初筛,通过离子束注入诱变,获得了 2 株菌丝体多糖产量较出发菌株提高了 46.5% 和 75.2% 的多糖高产菌 PFPH-1 和 PFPH-2;在此基础上,以激光辐照为复合诱变手段,获得了 1 株菌丝体多糖产量较出发菌株 PFPH-2 提高了 15.63% 的多糖高产菌 PFPH-3,表明离子束和激光复合诱变育种方法在改良阿魏菇多糖高产性状方

面诱变功效显著。

2.2 物理诱变在药用真菌育种中的应用 由于药用真菌研究起步较晚,大多研究集中在药用真菌的药用成分及其作用机理等方面,药用真菌普遍存在生长周期较长、产量较低、价格较高等特点,很大程度上限制了药用真菌的应用,培育优良菌种将有利于药用真菌产量、有效成分等的提高。鉴于大多药用真菌的遗传背景、分子生物学信息等尚不清楚,遗传转化等最新生物技术尚不能应用,而物理诱变能够有效诱变药用真菌,以下以桑黄、冬虫夏草、灰树花为例简单介绍物理诱变在药用真菌育种中的应用,为其他药用真菌的诱变育种提供参考。

2.2.1 桑黄。祝子坪等^[34]、张赫男等^[35]研究发现 He-Ne 激光-紫外复合诱变法处理桑黄原生质体,筛选到多个生物量和多糖产量均高的菌株,较单一紫外诱变的正突变率高,因激光处理生物体产生了光效应、热效应、电磁效应等综合作用,在诱变过程中使生物体产生染色体断裂、易位、重组,从而产生新的遗传变异,具有很好的应用前景。

2.2.2 冬虫夏草。卢翠文^[36]利用紫外线、微波及其二者结合分别对北冬虫夏草菌种进行诱变,以多糖含量为指标,通过紫外 40 s、微波 5 s 复合诱变,筛选到多糖含量比对照菌株高 17% 的突变菌株。尽管微波诱变在食用菌育种中的研究相对较少,但微波诱变已在工业微生物育种中取得较多进展^[37-38],将有效促进其在食用菌优良菌种的选育。

2.2.3 灰树花。Zhao 等^[39]利用宇宙辐射诱变灰树花筛选到 1 株多糖高产突变株 M270,在 20 L 的 M270 发酵液中,EPS 含量达 10.3 g/L,干菌丝重达 17.9 g/L,该灰树花 M270 突变体菌株是用于多糖生产的优良菌株。

3 物理诱变育种的一般过程

由于药食用真菌种类繁多,在进行菌种筛选时,应根据具体药食用真菌生长特性选择合适的诱变方法,采用预试验和大规模筛选相结合的方式有利于提高突变株的筛选效率。以下从物理诱变对象、诱变过程、菌种筛选、纯化、鉴定等方面综述物理诱变菌种的选育过程。

3.1 诱变对象 出发菌株的选择对药食用真菌诱变育种非常关键,选择合适的出发菌株有利于提高育种效率。一般选择具有较高应用价值、未经诱变但具有较好诱变效果的菌株作为出发菌株,更有利于提高诱变效率和诱变效果。

药食用真菌诱变育种的对象主要是单倍体孢子和原生质体。以孢子为诱变对象的优势体现在:①孢子是单细胞,可直接分离出孢子进行诱变处理;②对单倍体有性孢子诱变后,诱导染色体加倍可直接获得纯合突变株,提高了诱变效率。通常选择未萌发孢子的药食用真菌子实体,将其置于含有培养皿的干燥器中,待其自然喷发后收集孢子。但由于药食用真菌孢子生长周期较长或不易培育,因而采用物理诱变处理孢子的研究相对较少,用于杂交育种的较多。

对于孢子难以得到或培育周期较长的药食用真菌,以药食用真菌菌丝原生质体为诱变对象,具有取材容易、数量可控等优点,便于诱变育种。通常选择药食用真菌营养生长阶

段的幼嫩菌丝,根据药食用真菌菌丝细胞壁成分不同选择不同水解酶组合、优化酶解浓度,用于制备药食用真菌原生质体的酶包括溶壁酶、崩溃酶、纤维素酶、蜗牛酶等水解酶^[40-41],酶解出的原生质体用于诱变育种。例如以对数生长期的香菇菌丝为材料,2%溶壁酶酶解 2.5~3.0 h,香菇原生质体产率达 2.81×10^6 个/mL^[20];采用生长了 60 h 的草菇菌丝,以 1.5% 的溶壁酶 32 ℃ 酶解 3 h,原生质体数量达 2.52×10^7 个/mL^[23]。

3.2 物理诱变处理 不同药食用真菌种类、品种对不同物理诱变处理的敏感性都可能存在差异,因此,诱变处理前应先做预试验,粗略分析诱变方法、诱变剂量对诱变对象的致死率,一般选择致死率在 70%~80% 的条件下,进行大量、多轮诱变处理。

紫外诱变处理时通常选择黑暗条件下^[42]操作(可选择在红光条件下),避免光复活,提高突变率。诱变处理后按不同稀释浓度分别涂布平板,原生质体要涂布在高渗培养基平板上,选择含有筛选标记的平板有利于筛选到目的性状的菌种,提高筛选效率,筛选平板一般需避光培养 1~2 d。

3.3 诱变后菌种筛选、纯化 药食用真菌诱变处理后常根据菌丝生长情况进行初筛,主要鉴别指标包括菌落大小、形态、生长速度、颜色变化、菌丝密度、菌丝边缘整齐度、菌落渗出物等。这些鉴别指标通过肉眼即可分辨,在早期菌种筛选中发挥了重要作用。选择合适的筛选标记更有利于筛选、鉴定目标菌株,例如在培养基中加入愈创木酚更容易鉴定分析漆酶合成相关基因发生突变的菌株,有利于提高转化率、增加底物可利用性;在低温条件下更有利于筛选到耐低温菌株。

以药食用真菌菌丝原生质体或无性孢子(节孢子、分生孢子等)为诱变材料筛选优良菌株,需要将筛选到的稳定遗传的菌株进一步纯化,这是由于突变的随机性,在 2 条同源染色体上的等位基因同时发生相同突变的概率极小,通常是一个杂合的菌体,最佳处理方法是先使诱变材料繁殖 5~10 代后,二次酶解这些混合的菌丝为原生质体,然后再根据筛选标记筛选突变株,这有利于提高筛选纯化突变菌株的概率,最终筛选到遗传性状稳定的突变菌。对于异宗结合的药食用真菌,诱变处理单倍体孢子选育出诱变菌种后,需要对不同遗传背景的单倍体孢子杂交后才能形成子实体。

3.4 突变菌株的鉴定 药食用真菌的菌种选育是一项艰苦的工作,往往经过多轮筛选仅获得几株差异显著的菌株,这些菌株仍需要一些试验鉴定。药食用真菌的菌种鉴定常采用功能成分含量、拮抗试验、同工酶技术,还可以采用基因组重测序、蛋白质组分析、转录组分析等多种生物研究最新技术。

3.4.1 功能成分含量。根据诱变筛选目标,通常选择药食用真菌中有保健、免疫、抗氧化等功能成分作为分析指标,分析新菌株与出发菌株之间是否存在质、量上的差异,例如灰树花、桑黄菌株以多糖、萜类化合物为指标。

3.4.2 拮抗试验。拮抗试验是鉴定子代基因与亲本基因是

否发生变化最常用的一种试验,由于其对试验操作要求不高、结果简单明了,是初步鉴定新菌株的常用方法。拮抗现象是指 1 种菌丝在生长过程中产生了某些代谢产物从而对另外 1 种菌丝的生长有抑制或减弱作用。如果 2 种菌丝之间产生隔离、小沟或隆起等不相亲和的现象,说明 2 种菌丝的基因有差异,若 2 种菌丝没有发生拮抗试验,不能排除 2 种菌丝之间有基因差异,可能在不控制拮抗现象的基因之间有差异,需要其他鉴定试验验证。

3.4.3 同工酶技术。生物体内含有一些普遍存在的同工酶,具有催化相同反应但分子结构不同的酶,通过分析新菌株与出发菌株之间是否存在酶谱差异,鉴定这些菌株之间是否存在遗传差异,是一种常用于鉴定生物体内同工酶合成相关基因差异的技术。在药食用真菌的菌种筛选、鉴定中应用较多的同工酶主要有酯酶、乙醇脱氢酶、过氧化物酶、多酚氧化酶和漆酶等,被广泛应用于香菇、平菇、白灵菇、云芝等药食用真菌的菌种鉴定。

4 展望

不同物理诱变方法在药食用真菌优良菌种的选育工作中发挥了重要作用,部分物理诱变机理有一定的研究,但大部分物理诱变研究还比较浅显、诱变机理不甚清楚,育种工作仍存在很大的盲目性,今后应深入研究这些物理诱变因素对菌种诱变的生化和分子生物学机理。伴随着生物技术的发展,转录组测序、基因组重测序技术、蛋白质组分析、生物信息等技术已在植物、动物、微生物的基础研究中发挥了重要作用,利用这些技术能够在 DNA、RNA、蛋白水平上分析不同样本间的差异,揭示重要基因与表型之间的关联。目前,这些最新技术开始应用在药食用真菌的研究中,灰树花、樟芝、平菇等药食用真菌的全基因组测序已完成,转录组表达谱差异、蛋白表达差异分析将更有利于研究不同菌种间的差异,有望在药食用真菌的诱变育种中发挥重要作用。

参考文献

- [1] 张金霞.“食用菌产量和品质形成的分子机理及调控”项目简介:食用菌产业发展与技术创新的科学基础[J].菌物学报,2015,34(4):511-523.
- [2] KURATA A, FUKUTA Y, MORI M, et al. Draft genome sequence of the basidiomycetous fungus *Flammulina velutipes* TR19[J]. Genome Announc, 2016,4(3):505-516.
- [3] LU M Y, FAN W L, WANG W F, et al. Genomic and transcriptomic analyses of the medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* for its metabolite biosynthesis and sexual development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(44):4743-4752.
- [4] YANG R H, LI Y, WANG Y, et al. The genome of *Pleurotus eryngii* provides insights into the mechanisms of wood decay[J]. J Biotechnol, 2016, 239:65-67.
- [5] CHEN S L, XU J, LIU C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Nat Commun, 2012,3:1-9.
- [6] 雒祐芳,曹辉.超声诱变育种机理研究初探[C]//中国声学学会 2009 年青年学术会议[CYCA'09]论文集.上海:《声学技术》编辑部,2009.
- [7] 张伯清,孙烂梦.脉冲强光对啤酒酵母的诱变效应[J].食品科学,2015,36(7):153-157.
- [8] 孟宪军,郑凤娥,张琦.纳塔尔链霉菌的脉冲强光诱变育种研究[J].食品工业科技,2008,29(3):141-142,145.
- [9] 赵春燕,孟晓曦,刘长江.脉冲强光诱变选育 Nisin 高产菌株[J].食品科技,2010,35(8):32-34.

3 结论与讨论

野艾蒿真正意义上的繁育主要是靠地下根茎实现,田间野艾蒿的多少决定着次年的发生量和在农田中的优势度。该研究表明,野艾蒿根茎离表土层越近出苗越早,5~10 cm 土层是野艾蒿根茎的最适生长环境,该土层中野艾蒿的根茎数量多且生物量大。主根发育的野艾蒿植株在株高、根茎长度、生物量方面明显大于侧根所发育的野艾蒿植株。野艾蒿根茎着入土壤即可出苗,证明了其“入土必活”的特性。野艾蒿在出苗 30 d 左右时其株高和叶片数迅速增加,在出苗 120 d 左右时其株高和叶片数增速则迅速回落。在横走侧根比例大的土层(0~20 cm)中,野艾蒿根茎量在春夏季节的增长幅度远大于夏秋季节。上述野艾蒿的生物学特性对其综合防除措施的制定带来了一定的困难。

针对野艾蒿独特的繁殖特性和在整个生长季节不断发生的特点,笔者认为控制根茎的形成是防除野艾蒿很有效的农业防治途径之一。由于野艾蒿在田间垂直分布深度不同、根茎发生深,且具有很强的抗逆能力,因此在进行化学防除时,应选择具有高传导性和较长持效期的除草剂,并在野艾蒿迅速生长前期施药,否则难以保证防效。

单一措施防除野艾蒿往往难以达到理想的防除效果,综合防治才是高效防除野艾蒿的关键,如先利用耕作措施使其较深埋入土壤,降低其出土能力,或尽可能使其置于土壤表面,减少其入土概率,降低出苗率,并在野艾蒿迅速生长前期结合有效的化学防除,从而更好地防除野艾蒿,降低其危害。

参考文献

- [1] 张中信,张小平,刘慧君,等.野艾蒿化感作用初步研究[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2006,29(6):579-581.
- [2] 王登奎,吴刚,程向晖,等.野艾蒿中氨基酸、维生素、微量元素的含量分析[J].中成药,2006,28(11):1658-1660.
- [3] 朱亚民.内蒙古植物志:第3卷[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1989:175.
- [4] 沈霞,张绝红,袁慧慧,等.响应面分析法优化艾叶粗多糖提取工艺的研究[J].中成药,2010,32(1):48-51.
- [5] CHA J D, KIM Y H, KIM J Y. Essential oil and 1,8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(1):185-191.
- [6] 谢强敏,卞如谦,杨秋火,等.艾叶油的呼吸系统药理研究 I. 支气管扩张、镇咳和祛痰作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 1999, 16(4):16-19.
- [7] 王晓琴,周成江,张娜,等.野艾蒿化学成分研究[J]. 中药材, 2011, 34(2):234-236.
- [8] 李璞,龚炎维,李联芳,等.草甘磷、百草敌对野艾蒿地下根茎杀伤力的研究[J]. 杂草科学, 1989(4):9-11.
- [9] 张巧艳. 超临界 CO₂ 诱变选育脂肪酶菌种[D]. 杭州:浙江工业大学, 2008.
- [10] DOUKI T. The variety of UV-induced pyrimidine dimeric photoproducts in DNA as shown by chromatographic quantification methods[J]. Photochem Photobiol Sci, 2013, 12(8):1286-1302.
- [11] HORIKOSHI N, TACHIWANA H, KAGAWA W, et al. Crystal structure of the nucleosome containing ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 471(1):117-122.
- [12] XIANG Y, LAURENT B, HSU C H, et al. RNA m6A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response[J]. Nature, 2017, 543:573-576.
- [13] TANAKA A, SHIKAZONO N, HASE Y. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants[J]. J Radiat Res, 2010, 51(3):223-233.
- [14] KAZAMA Y, HIRANO T, SAITO H, et al. Characterization of highly efficient heavy-ion mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biol, 2011, 11:1-10.
- [15] KAZAMA Y, HIRANO T, NISHIHARA K, et al. Effect of high-LET Fe-ion beam irradiation on mutation induction in *Arabidopsis thaliana*[J]. Genes Genet Syst, 2013, 88(3):189-197.
- [16] HIRANO T, KAZAMA Y, ISHII K, et al. Comprehensive identification of mutations induced by heavy-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 2015, 82(1):93-104.
- [17] BOTCHWAY S W, REYNOLDS P, PARKER A W, et al. Use of near infrared femtosecond lasers as sub-micron radiation microbeam for cell DNA damage and repair studies[J]. Mutat Res, 2010, 704(1/2/3):38-44.
- [18] JIANG Y, WEN J P, CAIYIN Q, et al. Mutant AFM 2 of *Alcaligenes faecalis* for phenol biodegradation using He-Ne laser irradiation[J]. Chemosphere, 2006, 65(7):1236-1241.
- [19] 段东霞. He-Ne 激光诱变香菇原生质体选育速生高产菌株及香菇液体深层发酵工艺研究[D]. 西安:西北大学, 2002.
- [20] 江枝和, 翁伯琦, 雷锦桂, 等.⁶⁰Co γ 射线辐射大杯香菇诱变效应的主成分分析[J]. 激光生物学报, 2009, 18(3):309-314.
- [21] 颜丽君, 郑焕春. 姬松茸⁶⁰Co-γ 射线辐照诱变育种试验初报[C]//第二届全国食用菌中青年专家学术交流会论文集. 杭州:中国菌物学会, 2008.
- [22] ZHU Z P, WU X, LV B B, et al. A new approach for breeding low-temperature-resistant *Volvariella volvacea* strains: Genome shuffling in edible fungi[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2016, 63(5):605-615.
- [23] 韩业君, 曹晖, 陈明杰, 等. 草菇耐低温菌株的诱变选育与鉴定[J]. 菌物学报, 2004, 23(3):417-422.
- [24] 成亚利, 朱宝成, 李亮亮, 等. 金针菇原生质体紫外诱变选育[J]. 食用菌学报, 1995, 2(3):61-64.
- [25] 陈力力, 张倩云, 甘文娟, 等. 金针菇菌种诱变选育的研究[J]. 生物技术, 2011, 21(2):67-69.
- [26] 刘海英, 张运峰, 范永山, 等. 紫外线对杏鲍菇原生质体的诱变作用[J]. 核农学报, 2011, 25(4):719-723.
- [27] 夏志兰, 艾辛, 姜性坚.⁶⁰Co γ 射线对杏鲍菇菌丝的诱变效应[J]. 激光生物学报, 2004, 13(4):298-301.
- [28] 叶勋艳. He-Ne 激光诱变姬松茸原生质体选育速生高产菌株及姬松茸液体深层发酵工艺研究[D]. 西安:西北大学, 2003.
- [29] 凡启超. 野生松乳菇 N⁺ 离子束诱变育种及人工栽培研究[D]. 合肥:安徽大学, 2016.
- [30] 董先茹. 蟹味菇菌株离子束诱变选育及油菜秸秆栽培研究[D]. 合肥:安徽大学, 2013.
- [31] 严涛, 李冠, 曾宪贤. N⁺ 离子注入技术选育猴头菌优良菌株[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3):109-110, 113.
- [32] 陈恒雷, 武宝山, 石伟娜, 等. 阿魏菇多糖高产菌的离子束和激光复合诱变育种[J]. 生物技术, 2010, 20(1):30-33.
- [33] 祝子坪, 马海乐, 曲文娟. He-Ne 激光与紫外线复合诱变桑黄菌原生质体的研究[J]. 应用激光, 2007, 27(3):220-223.
- [34] 张赫男, 曲德辉, 杨焱, 等. 桑黄菌株的物理诱变及优势菌株的筛选[C]//中国菌物学会 2016 年学术年会论文摘要集. 北京:中国菌物学会, 2016.
- [35] 卢翠文. 北冬虫夏草菌丝体片段诱变育种[J]. 生物技术, 2008, 18(5):23-26.
- [36] 徐敬尧, 张明旭. 球红假单胞菌原生质体的微波诱变及其煤炭降解转化[J]. 中国矿业大学学报, 2014, 43(1):132-138.
- [37] 薛应钰, 叶巍, 张树武, 等. 微波诱变选育高效溶磷木霉菌株的研究[J]. 干旱地区农业研究, 2016, 34(4):231-236.
- [38] ZHAO C, TIAN X M, WANG G Y, et al. High-level production of exopolysaccharides by a cosmic radiation-induced mutant M270 of the maitake medicinal mushroom, *Grifola frondosa* (Agaricomycetes)[J]. Int J Med Mushrooms, 2016, 18(7):621-630.
- [39] 祝子坪, 马海乐. 桑黄菌原生质体的分离与再生研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21):2232-2235.
- [40] 王丽宁, 赵妍, 张宝粉, 等. 利用原生质体紫外诱变技术选育耐高温香菇菌株[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7):1350-1357.
- [41] 夏顺翔, 张魁, 贾秉晟, 等. 红色素产生菌 RZ21 菌株的原生质体紫外诱变育种研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(6):2780-2782.

(上接第 33 页)