

解生权,全艳玲.多脂鳞伞的化学诱变育种[J].江苏农业科学,2015,43(5):244-246.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.080

多脂鳞伞的化学诱变育种

解生权¹,全艳玲²

(1. 辽宁经济职业技术学院,辽宁沈阳 110122; 2. 辽宁科技大学,辽宁鞍山 114051)

摘要:以紫外线诱变后得到的多脂鳞伞(*Pholiota sdiposa*)的菌种作为出发菌种,对其进行化学诱变剂处理。结果表明,采用亚硝酸钠终浓度 3 450 mg/L 诱变 10 min、亚硝酸钠终浓度 6 900 mg/L 诱变 5 min 所得到的变异菌株菌丝生长速度、菌丝产量和栽培的生物转化率都有所提高。

关键词:多脂鳞伞;化学诱变;育种;亚硝酸钠;生长速度;产量;生物转化率

中图分类号: S646.036 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0244-02

各种研究表明,多脂鳞伞(*Pholiota sdiposa*)作为食用真菌具有极其丰富的营养价值,含大量的人体必需氨基酸、矿物质、维生素等,是理想的营养食品之一;此外,其体内还有多糖、麦角固醇、核酸等生物活性物质,对提高机体免疫力、抑菌、抗癌、延缓肌肉疲劳、恢复精力和脑力十分有效^[1]。各地栽培经验证明,多脂鳞伞具有适应性强、原料易得、质优高产、商品性状好、抗污染能力强等优点,是一种具有开发价值、市场前景好的食用菌,其推广栽培已经引起人们的重视;但是,各地栽培所使用的菌种大都是野生驯化而来的,产量都不尽如人意。本研究将栽培使用的菌种经过紫外线诱变得到 1 株高产的菌株(UV-65)^[2],并在此基础上对其菌丝体进行化学诱变,以期得到产量更高的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 经过紫外线诱变得到的菌株 UV-65。

1.1.2 培养基及制备 (1)液体培养基^[3]。马铃薯(去皮)100 g、胡萝卜 100 g、葡萄糖 20 g、磷酸二氢钾 2 g、硫酸镁 1 g、蛋白胨 10 g、水 1 000 mL。马铃薯与胡萝卜分别煮汁、过滤后合并,再加入其他成分,补足水分后充分溶解再分装到 500 mL 锥形瓶中,每瓶 200 mL,121 ℃灭菌 30 min,备用。(2)固体培养基^[3]。马铃薯(去皮)100 g、胡萝卜 100 g、葡萄糖 20 g、磷酸二氢钾 2 g、硫酸镁 1 g、蛋白胨 10 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL。按上述方法溶解灭菌,做成斜面、平板备用。(3)栽培培养基^[4]。阔叶木屑 78%、玉米粉 20%、蔗糖 1%、石膏 1%,水 60%,pH 值自然。常规拌料、装袋、126 ℃灭菌 2 h。

1.2 方法

1.2.1 活化菌种 将液体石蜡保藏的 UV-65 出发菌种接

种到斜面培养基上,(26±2)℃下避光培养。待菌丝长满试管后,再传代 1 次,长满后作为母种使用。

1.2.2 液体菌种的制备 用无菌接种铲取一小块活化的母种(0.5 cm×0.5 cm),尽量去除培养基,接种到液体培养基中,并使其漂浮在液面上。然后置于(26±2)℃、160 r/min 左右的全温振荡培养箱内培养,待瓶中菌丝球生长到 2~3 mm、发酵液澄清透明且无污染时停止培养,置于 4 ℃下冷藏备用。

1.2.3 诱变处理 利用不同浓度的亚硝酸钠^[5]对液体培养出的菌丝球进行不同时间的诱变处理,即取 5 mL 上述菌悬液加入 100 mL 无菌的锥形瓶中,并用无菌水稀释至 10 mL,再加入无菌亚硝酸钠溶液,使之最终浓度为 0、3.45、6.9、10.35、13.8、17.25 g/L,每个浓度 3 个平行样本,以终浓度 0 为空白对照。对以上各个等级的样本在(26±2)℃、160 r/min 的条件下分别振荡 5、10、15、20、25、30 min^[6],再加入 pH 值为 8.6 的 Na₂HPO₄ 溶液,调整 pH 值为 7,终止诱变作用^[6]。

1.2.4 菌种筛选 将上述进行不同诱变处理时间的各个浓度等级中的悬液混匀,无菌取等量的悬液接种到平板培养基上,(26±2)℃下避光培养,计数不同诱变处理时间、不同浓度的菌落数量,并计算致死率。对致死率达到 75%~90%^[7]的组别中的培养菌落进行生长速度的测定。

2 结果与分析

2.1 不同方式诱变处理后的菌落培养情况

用不同浓度的亚硝酸钠对上述液体培养物进行不同时间的诱变,培养出的菌落情况见图 1。

2.2 目的菌株的筛选

从图 1 可以看出,当在亚硝酸钠终浓度为 3.45 g/L 下诱变 10 min、在亚硝酸钠终浓度为 6.90 g/L 下诱变 5 min 时,致死率在 75%~90% 之间。对其进行编号(UVN6500510-1、UVN6500510-2、UVN6500510-3、UVN6500510-4、UVN6500510-5、UVN6500510-6;UVN65015-1、UVN65015-2、UVN65015-3、UVN65015-4)并测定其生长速度和生长量。

2.2.1 固体培养时菌丝生长速度的测定 将上述所有筛选出的菌株分别转接到平板培养基上,按前述的方式进行培养

收稿日期:2014-05-30

基金项目:辽宁省教育基金(编号:L2010191)。

作者简介:解生权(1965—),男,辽宁鞍山人,硕士,副教授,主要从事微生物教学、研究方面的工作。Tel:(024)89873812;E-mail:xshq4541@163.com。

通信作者:全艳玲,硕士,副教授,主要从事微生物教学、研究方面的工作。Tel:(0412)5928245;E-mail:qyl590@163.com。

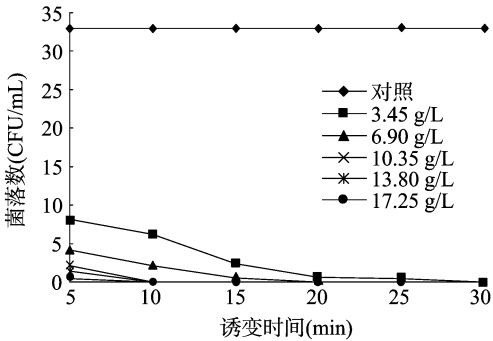


图1 各种方式诱变处理对菌落生长的影响

后,用无菌打孔器(直径0.5 cm)切取种块(尽量去除培养基)接种到12 cm 平板培养基上,每隔48 h 测量菌落直径(表1)。

2.2.2 液体培养时菌丝生长量的测定 取所有筛选出的菌株接入液体培养基,在(26±2)℃、160 r/min 下振荡培养,每隔24 h 混匀并定量取样,相同离心力下离心相同时间并烘干至恒质量,再称其质量,结果见表2。

从表1、表2 可以看出,菌株UVN6500510-4、UVN6500510-5、UVN 65015-3 的生长速度和菌丝产量都比出发菌株提高了10%以上;而其他菌株虽然也有所提高,但是幅度较小,有些不具有统计学意义。

2.2.3 栽培生物转化率的比较 取上述3种变异菌株的斜

表1 不同生长时间对菌落直径的影响

菌株	不同生长时间下的菌落直径(cm)				144 h 的直径增长率(%)
	0 h	48 h	96 h	144 h	
出发菌株(对照)	0.50	2.72±0.96	4.32±0.97	6.86±1.01	—
UVN6500510-1	0.50	3.45±0.83	4.47±0.86	7.01±0.78	2.2
UVN6500510-2	0.50	3.32±0.06	4.35±0.72	6.91±0.48	0.7
UVN6500510-3	0.50	3.77±0.35	4.50±0.42	7.23±0.31	5.4
UVN6500510-4	0.50	3.92±0.43	5.01±0.31	7.65±0.23	11.5
UVN6500510-5	0.50	3.87±0.42	5.12±0.76	7.64±0.21	11.4
UVN6500510-6	0.50	4.01±0.11	5.07±0.77	7.44±0.31	8.5
UVN65015-1	0.50	3.22±0.21	4.48±0.44	6.93±0.17	1.0
UVN65015-2	0.50	3.26±0.35	4.40±0.35	7.11±0.33	3.6
UVN65015-3	0.50	4.01±0.11	4.94±0.34	7.63±0.42	11.2
UVN65015-4	0.50	3.55±0.42	4.98±0.41	7.21±0.37	5.1

表2 不同生长时间对菌丝生长量的影响

菌株	不同生长时间的菌丝产量(mg/mL)			72 h 的产量增长率(%)
	24 h	48 h	72 h	
出发菌株(对照)	15.0±2.6	24.2±3.4	36.5±9.7	0
UVN6500510-1	15.3±3.5	24.0±3.6	36.7±7.8	0.5
UVN6500510-2	15.2±1.6	24.4±7.1	36.9±4.8	1.1
UVN6500510-3	14.9±3.5	26.5±2.3	37.7±3.1	3.2
UVN6500510-4	15.1±3.3	29.6±3.1	40.2±2.3	10.1
UVN6500510-5	15.4±2.2	30.1±5.6	41.1±1.1	12.6
UVN6500510-6	15.0±2.1	29.4±5.7	39.6±4.3	8.4
UVN 65015-1	15.2±1.7	25.0±3.4	38.3±1.7	4.9
UVN 65015-2	14.8±2.3	24.6±3.5	38.7±4.3	6.0
UVN 65015-3	14.9±2.1	27.4±4.4	40.9±4.2	12.1
UVN 65015-4	15.3±3.2	25.2±2.1	38.2±1.7	4.6

面接种到栽培培养基中,并以出发种作为对照,霉菌培养箱[温度(26±2)℃、湿度65%]中避光培养,观察菌丝生长速度时发现,长满栽培培养基的时间分别为24.67、25.15、24.86、29.13 d。由此可见,变异菌株栽培时菌丝生长速度也有所加快。菌丝长满后,进行必要的温差、湿差的刺激出菇,连续采摘3次,计算生物转化率(表3)。

表3 不同菌株的生物转化率

菌株	生物转化率(%)
UVN6500510-4	89.27
UVN6500510-5	88.69
UVN 65015-3	90.12
出发菌株(对照)	80.43

2.2.4 变异菌株的遗传稳定性 将菌株UVN6500510-4、

UVN6500510-5、UVN 65015-3 做成斜面种保存在液体石蜡中,在此期间连续5次传代,并测定每代菌丝生长速度、发酵产量。结果发现,经过长期保存并多次传代菌丝生长速度、发酵产量、生物转化率3项指标未发生统计学意义上的变化,说明这3株菌株遗传性状是比较稳定的,可以应用于规模栽培。

3 结论

微生物育种运用遗传学原理和技术对某种具有特定生产目的的菌株进行改造,以提高产品的产量和质量。微生物菌种选育技术在现代生物技术中,特别是发酵产业中具有十分重要的地位。通过对微生物菌种的选育可以有效提高产品的产量和质量。微生物育种技术主要有自然选育、诱变育种、杂交育种、代谢控制育种和基因工程育种等5种方式,各种方式并不孤立存在,而是相互交叉、相互联系的。新的育种技术的发展和运用促进了生产的发展^[8],而现在最常用的育种方式是诱变育种,即利用物理、化学诱变剂对微生物进行处理,从而筛选出主要生物性状优良的变异菌株。本研究对紫外线诱变得到的变异菌株利用典型的化学致变剂进行进一步的化学诱变,实际上进行复合诱变,筛选出3株菌株,其生长速度、发酵产量、生物转化率等主要生物学指标较原始菌株都有较大的提高,这对大规模种植增产奠定了坚实的基础。变异菌株进行发酵、栽培所得产物的成分变化有待进一步研究。

参考文献:

[1]林应兴,田景芝,童金华.黄伞的研究进展[J].亚热带农业研究,2009,5(2):90-93.

蒋春艳,郭达伟,曾 军,等. 细梗香草种子发芽试验[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):246-247.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.081

细梗香草种子发芽试验

蒋春艳,郭达伟,曾 军,周美玲,李建彬

(龙岩市农业科学研究所,福建龙岩 364000)

摘要:采用 6 种不同方法对细梗香草 3 个品种的种子进行处理,研究不同方法对细梗香草种子的发芽势和发芽率的影响。结果表明:100 mg/L 赤霉素(CA₃)处理能明显促进细梗香草 3 个品种种子的萌发,发芽率和发芽势达最高,分别为 94.78% 和 74.55%;不同品种种子间发芽情况也存在差异,A3 平均发芽率最高,为 88.33%,A2 平均发芽率最低,为 45.33%。

关键词:细梗香草;种子处理;发芽率;发芽势

中图分类号:S567.204.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)05-0246-02

药用植物种子是中药材生产和发展的源头,是决定药材质量的重要因素,是发展优质中药材生产的科学前提^[1]。目前,对中药材种子品质的研究还较薄弱,因此开展药用植物种子品质检验的研究成为中药材规范化生产中急需解决的问题。发芽率是种子品质检验的一项重要指标,需要适宜的发芽条件才能够准确检测^[2]。

细梗香草(*Lysimachia capillipes* Hemsl.)别称排草、香排草、香草、毛柄珍珠菜,系报春花科(Primulaceae)珍珠菜属植物,主要分布在福建、江西地区,尤以福建龙岩地区品质最佳。民间用于治疗感冒咳喘、风湿痛、月经不调、神经衰弱、补虚、驱蛔、抗肿瘤。目前还没有细梗香草种子发芽试验方面的报道,有关其他种子的催芽试验很多,如机械破损、变温处理、硫酸处理等,用得较多的方法有强酸、强碱、激素等化学药剂和热水处理,以及机械破壳等手段。由于细梗香草种子较小,采用机械破壳操作难度大,很容易损伤种子,也不适于在生产中应用。

有研究表明,赤霉素对许多种种子的发芽有明显的促进作用,低温处理能明显提高烟草种子的发芽率,而硫酸铜、碳酸钠处理可明显提高小麦、水稻等谷物种子的发芽率^[3]。为了寻找一种快捷、方便、高效、廉价的促进细梗香草种子萌发的方法,在参考其他作物种子发芽试验研究基础上,采用多种化学药剂对龙岩市农业科学研究所所筛选出的细梗香草 3 个

品种的种子(A1,茎秆全绿;A2,茎秆全红;A3,茎秆半红)进行处理,并分析和总结品种之间以及处理方法间细梗香草种子发芽率的情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于 2012 年 3 月 14 日在福建省龙岩市农业科学研究所试验室恒温箱内进行,材料来源于 2011 年 12 月初在福建省龙岩市江山乡前村村采集的 3 个不同品种的细梗香草果实,将其放入室内晾干,再用手搓掉果壳,去杂,挑选出健康、均匀饱满的种子。

1.2 试验方法

将各品种的试验材料装入纱布袋中,每袋 100 粒,将种子再进行如下处理:B1,用清水中浸泡 24 h 后播种;B2,用 0.2% 硫酸铜(CuSO₄)溶液浸泡 24 h 后播种;B3,用 100 mg/L 萘乙酸(NAA)溶液浸泡 24 h 后播种;B4,用 0.1% 高锰酸钾溶液浸泡 24 h 后播种;B5,用 1% 碳酸钠溶液浸泡 24 h 后播种;B6,用 100 mg/L 赤霉素(GA)溶液浸泡 24 h 后播种^[3]。将发芽所用培养皿洗净,装入沙土厚度约为培养皿高度的 2/3,用自来水浸透,上面垫 1 层滤纸,以更清楚地观察。试验为完全随机区组设计,每处理组合播 100 粒种子,分别均匀摆放于培养皿中的滤纸上,重复 3 次。置于 25 ℃光照培养箱内,每天观察 1 次,并保持培养皿内的湿度,4 d 后发现种子发芽,每天统计发芽数量,13 d 后各处理的种子发芽数量不再增加,播种后 30 d 统计种子的发芽率。

本试验以发芽率和发芽势作为种子发芽能力及整齐度的评价指标。发芽势 = 发芽初期(规定日期内)正常发芽种子

收稿日期:2014-11-17

基金项目:福建省龙岩市科技项目(编号:2010LY24)。

作者简介:蒋春艳(1980—),女,四川安岳人,硕士研究生,助理研究员,主要从事作物病虫害防治。E-mail:jcyxj@126.com。

[2]解生权,苏 利,陈 伟,等. 多脂鳞伞紫外线诱变育种[J]. 中国酿造,2012,31(3):66-68.

[3]全艳玲,解生权,施政杨,等. 黄伞的菌种选育[J]. 中国酿造,2008(12):43-45.

[4]何培新. 名特优食用菌 30 种[M]. 北京:中国农业出版社,1999:117-122.

[5]梁 亮,邱雁临,许进涛. 紫外线与亚硝酸钠复合诱变选育 L-

组氨酸产生菌[J]. 微生物学杂志,2008,28(2):27-29.

[6]吕 熹,王 刚,李 俊,等. 紫外、亚硝酸钠诱变筛选高产耐有机溶剂脂肪酶菌株[J]. 吉林农业大学学报,2010,32(4):394-397.

[7]王 惠,童应凯,吴兆亮,等. 亚硝酸诱变选育黄霉素高产菌的研究[J]. 饲料工业,2006,27(8):17-19.

[8]张彭湃. 微生物菌种选育技术的发展与研究进展[J]. 生物学教学,2005,30(9):3-5.