

# 农业学报

JOURNAL OF AGRICULTURAL AGRICULTURAL SCIENCE

中国农业科学院  
中国农业科学院  
中国农业科学院  
中国农业科学院

中国农业科学院  
中国农业科学院  
中国农业科学院  
中国农业科学院  
中国农业科学院

中国农业科学院  
中国农业科学院  
中国农业科学院  
中国农业科学院

## 目次

### 植物诱变育种 · 农业生物技术

- 2289 浙东地区水稻基因富集区序列的克隆及生物信息学分析 ..... 冯正斌 舒保亮 程秋良 王惠华
- 2295 水稻粳米籽粒和常粒状的 QTL 定位 ..... 汪敬峰 王根发 侯志峰 王智斌 石庆宇 潘晓华 吴自明
- 2301 水稻干尖线虫病病原类 16SrRNA 基因克隆与逆境条件下的表达分析 ..... 董 斌 冯 超 袁兆林 姚克兵 魏利新
- 2312 草莓 V23 子实体中低糖性诱变育种的初步研究 ..... 祝宇坤 李 娜 廖雪明
- 2318 不同球白菜抽苔开花性状的单基因 + 多基因遗传分析 ..... 李逸峰 朱红芳 朱玉英 侯瑞贤 程 文
- 2326 禾本科植物茎秆木质化相关基因的克隆及其进化分析 ..... 蔡安海 梁力群 郑立先
- 2330 甜苦芥大黄 L1011 反选系亲本荧光引物筛选 ..... 王爱兰 李维卫 李 慧 聂臻臻
- 2343 小麦花药培养的研究和应用 ..... 王 炜 陈 琛 欧巧明 叶春雷 罗俊杰

### 农产品辐照研究 · 食品科学

- 2355 紫菜多糖抗氧化活性及体外免疫调节作用研究 ..... 刘 亮 曹少谦 戚向阳 罗 彤
- 2363 不同干燥方法对板栗品质的影响 ..... 张 乐 王赵改 杨 慧 王晓敏 史冠莹
- 2373 秀丽槭叶总黄酮的提取及其抗氧化能力研究 ..... 林 立 林乐静 毛阳正 祝志勇 付 涛
- 2382 超声波 - 内部沸腾法提取杏鲍菇多糖的工艺优化  
..... 赖谱富 陈君琛 杨艺龙 翁敏劼 李怡彬 沈恒胜

- 2391 红叶李花中总黄酮提取工艺及抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性研究 ..... 卫 强 徐 飞
- 2402 苹果皮渣固态发酵生产菌体蛋白饲料工艺优化及产物品质分析 ..... 刘债男 哈益明 靳 婧
- 2411 烤烟打顶后喷施外源激素对中部烟叶品质的互作效应 ..... 王 林 朱金峰 许自成

## 同 位 素 示 踪 · 资 源 环 境 · 动 植 物 生 理

- 2418 莎草诱导土壤有机碳的激发效应 ..... 田耀武 王 宁 刘 晶
- 2425 川北烟区土壤有效磷空间变异特征及主控因素  
..... 王永豪 王昌全 李启权 李 斌 何玉婷 金明清 陈 林 陈玉蓝

- 2434 干旱胁迫下枸溶性钾肥配施对烤烟土壤理化性质、微生物数量及根系生长的影响  
..... 李 鑫 周冀衡 贺丹锋 张纪利 陈 峰

- 2441 施氮和接种根瘤菌对红壤旱地花生生长及氮素累积的影响  
..... 刘 佳 张 杰 秦文婧 谢 杰 王芳东 项兴佳 刘光荣 徐昌旭

- 2431 外源  $\text{NO}_3^-$  对  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  胁迫下番茄幼苗 PSII 功能及光能分配利用的影响  
..... 孙德智 韩晓日 彭 靖 范 富 张庆国

- 2460 外源硝酸钙对水培生菜生长及矿质元素吸收的影响  
..... 何 鑫 张存政 刘贤金 卢海燕 梁 颖

- 2467 基于黄金分割法的双季稻合理密植研究  
..... 谢小兵 蒋 鹏 黄 敏 曹放波 周雪峰 张瑞春 陈佳娜 伍丹丹 邹应斌

## 《核农学报》2016 年总目次



# 草菇 V23 子实体耐低温性能改良的初步研究

倪丹丹<sup>1</sup> 李娜<sup>1</sup> 唐雪明<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江台州学院生命科学院/浙江省植物进化生态学与保护重点实验室,浙江台州 318000;

<sup>2</sup>上海市农业科学院生物技术研究所,上海 201106)

**摘要:**为了改良草菇 V23 子实体耐低温储藏性能,对其原生质体分别进行电子束诱变和<sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线诱变,用筛选出的耐低温突变体进行基因组重排。经过 3 轮基因组重排成功选育出 1 株能正常出菇的菌株 VF;VF 遗传稳定,其子实体在 10℃ 条件下储藏期为 20 h,比原始菌株 V23 储存期延长了 25%。由此可见,用基因组重排技术提高草菇的耐低温性能是可行的。本研究结果为选育对环境耐受的食用菌菌株提供了新的思路。

**关键词:**草菇;基因组重排技术;原生质体;耐低温菌株

DOI:10.11869/j.issn.1008-8551.2016.12.2312

草菇 (*Volvariella volvacea* (Bull.) Sing.) 又称“蘑菇”,是一种喜温、喜湿的菌类蔬菜,栽培区域广泛。中国草菇是一种喜温、喜湿的菌类蔬菜,栽培区域广泛。近几十年来,随着人们生活水平的提高,对食用菌的需求量越来越大,草菇的生产和消费也日益增加。草菇的耐低温性能是影响其贮藏和运输的重要因素。本研究旨在通过基因组重排技术提高草菇的耐低温性能,为选育对环境耐受的食用菌菌株提供新的思路。

壁酶 (lywallzyme), 购自广东微生物研究所; 葡萄糖、氯化钙、PEG6000 等试剂均为分析纯, 购自上海国药试剂公司。

在较优的 PEG 浓度下进行融合剂 pH 优化试验, pH 值分别为 6.5、7、7.5、8、8.5、9。PEG 融合剂用渗透压稳定剂配制, 其中添加  $Ca^{2+}$  ( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

浓度为  $1.0 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 取 1 mL 置于 2.5 mL PE 离心管中密封, 采用上海市农业科学院高能电子直线加速器及 15 万居里的钴源辐照装置进行诱变。 $^{60}\text{Co} - \gamma$  诱变剂量率为  $10 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ 。高能电子直线加速器 (日本 IHI 公司), 功率为 10 KW, 每秒能发射 10 Mev 能量。诱变的草菇原生质体再生后, 放置  $0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下处理 24 h, 然后在  $32 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下培养, 4 d 后选取未冻死且复苏生长较快的菌株接种于 PDA 平板上, 选菌丝较密、生长健壮的菌株为初筛变异菌株。将

初筛变异菌株转接 4 代, 每代都进行耐低温试验 ( $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h), 到第 4 代还保持耐低温性且生长速度、菌落

外观形态、颜色均无明显变化的菌株为最终筛选出的

生平板培养法再生,  $32 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养 3~4 d。收集全部再生的融合菌株接种于 PDA 培养基上,  $32 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养 1 d, 然后置于  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  下处理 28 h, 再置于  $32 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养, 仍然能生长的菌株为  $F_1$  重排菌株。将  $F_1$  重排菌株连续转接培养 5 代, 每代都进行低温处理 ( $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , 28 h), 到第 5 代还保持耐低温性且生长速度、菌落外观形态、颜色均无明显变化的菌株为遗传性稳定的  $F_1$  基因组重排菌株。之后, 将  $F_1$  重排菌株全部收集, 制备原生质体, 并按同样方法进行第 2 轮

融合、再生、 $0 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下处理 32 h, 转接培养, 遗传稳定性测定, 所得菌株即为第 2 轮耐低温融合子, 即  $F_2$

重排菌株。将  $F_2$  重排菌株全部收集, 制备原生质体,

按同样方法进行第 3 轮融合、再生、 $0 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下处理 36 h, 转接培养, 遗传稳定性测定, 所得菌株即为第 3 轮耐

低温融合子, 即  $F_3$  重排菌株。

### 1.7 重排菌株子实体耐低温测定

对筛选出的基因组重排菌株进行耐低温测定。将

### 4 原生质体灭活

合适的灭活条件为草菇 V23 变异菌株的原生质体, 致死率刚好为 100% 的处理条件。热灭活: 将变异菌株的原生质体悬液移入无菌试管中, 置于  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温水浴





子实体内部结构示意图

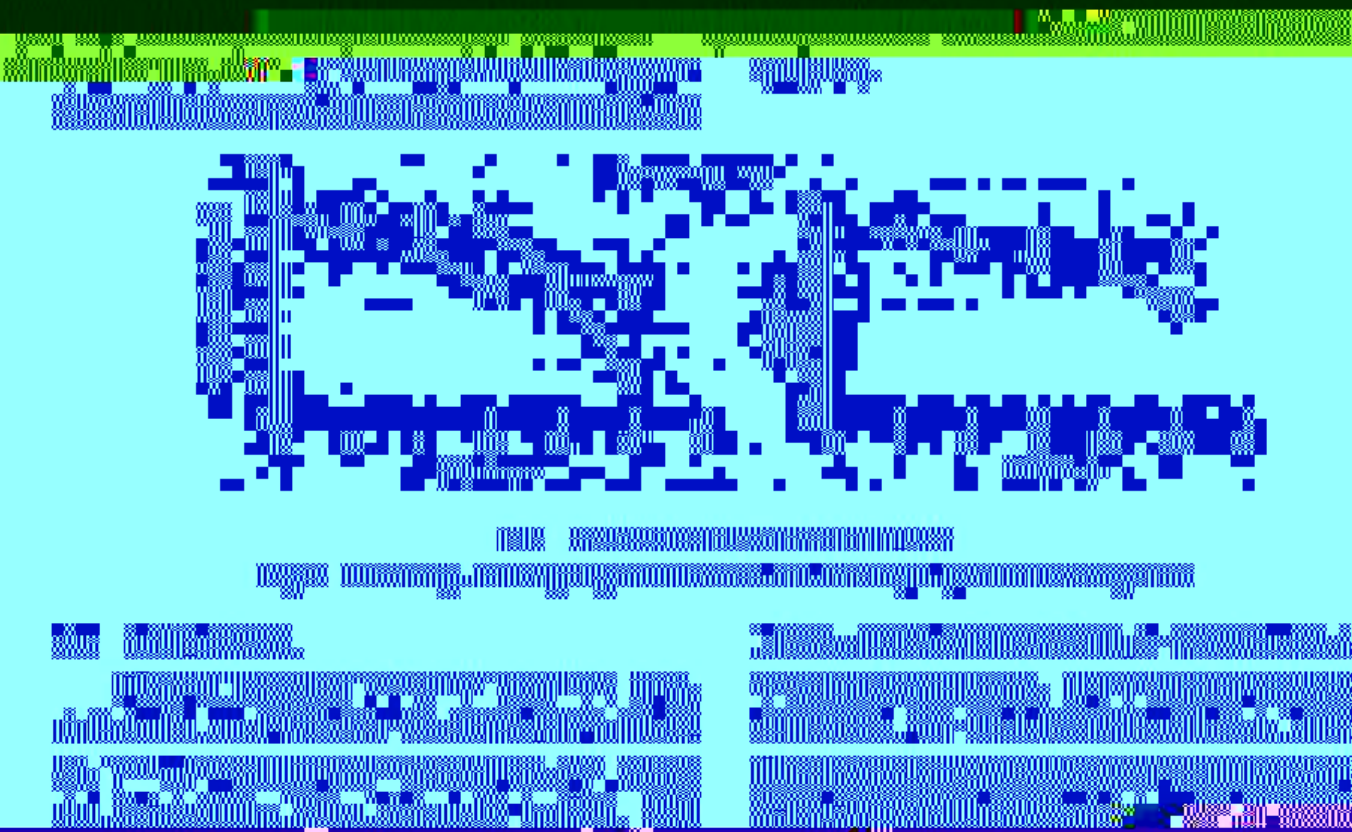


图 1 子实体内部结构示意图

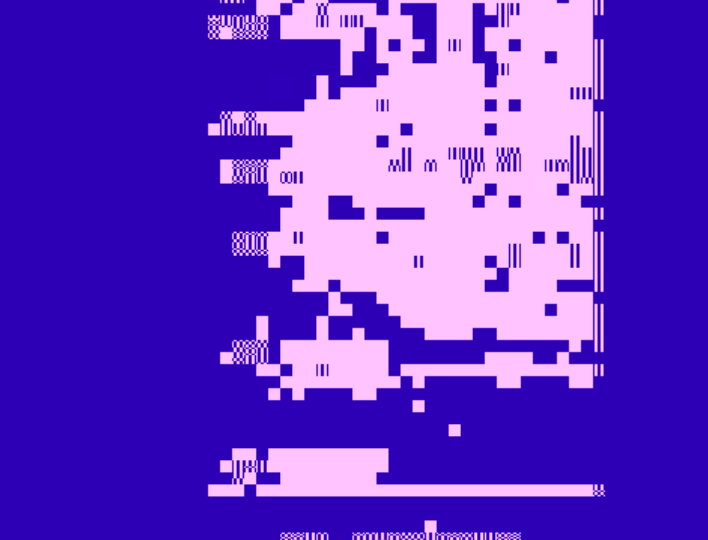


图 2 子实体内部结构示意图



图 3 不同低温处理子实体损伤率 (%)

草菇 V23 子实体的耐低温性能改良的初步研究

草菇 V23 子实体的耐低温性能改良的初步研究

草菇 V23 子实体的耐低温性能改良的初步研究

度为40%、pH值为7.5的条件下对突变菌株库进行3轮随机基因组重排,最终筛选出8株耐低温且遗传稳定的重排菌株。其中一株VF能正常出菇,其子实体在10℃条件下储藏期为20h,比原始菌株V23储存期延长了4h。由此可见,用基因组重排技术提高草菇的耐低温性能是有效可行的。

参考文献:

[1] Chang S T. Mushroom bioloy and mushroom products [M]. Hong Kong: The Chinese Univer Press, 1993: 3.

[2] 傅俊生. 草菇遗传规律研究 [J]. 福州: 福建农林大学, 2010.

[3] 杨新美. 中国食用菌栽培学 [M]. 北京: 农业出版社, 1988: 408-418.

[4] 吴国虹, 谢宝贵, 江玉娟, 肖开前, 王德娜, 彭超, 苏雅乘. 不同包装方式对1- MCP处理草菇的保鲜效应 [J]. 食用菌学报, 2014, 21(3): 60-65.

[5] 叶慈, 陈建勋, 余让才, 陈巧玲, 刘伟.  $\gamma$  辐照对草菇保鲜及其生理机制的研究 [J]. 核农学报, 2000, 14(1): 24-28.

[6] 魏要武, 陈东梅, 杨水莲, 吴毓高, 郑锦荣, 刘英, 袁善芸, 莫美华. 一种草菇菌种选育程序抗低温胁迫的突变筛选 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4): 1363-1368.

[7] 赵妍, 马丹丹, 姜威, 颜素雅, 陈胡杰. 草菇谷胱甘肽还原酶基因受低温影响的表达研究 [J]. 生物学杂志, 2015, 32(1): 44-47.

[8] Zhao J F, Li Y H, Zhang C, Yao Z Y, Zhang L, Bie X M, Lu F X, Lu Z X. Genome shuffling of *Bacillus amyloliquefaciens* for improving antimicrobial lipopeptide production and an analysis of relative gene expression using FQ RT-PCR [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39: 889-896.

[9] Gao X F, Zhao H, Zhang G H, He K Z, Jin Y L. Genome shuffling of clostridium acetobutylicum CICC 8012 for improved production of acetone - butanol - ethanol (ABE) [J]. Current Microbiology, 2012, 65(2): 128-132.

[20] Lv X A, Jin Y Y, Li Y D, Zhang H, Liang X L. Genome shuffling of *Streptomyces viridochromogenes* for improved production of actamycin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 641-648.

[21] Cao X H, Song Q, Wang C L, Hou L H. Genome shuffling of *Hevea brasiliensis* to improve flavour formation of soy sauce [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28: 1857-1862.

[22] Ge J P, Sun H B, Song Q, Ling H Z, Pang W X. A genome shuffling-generated *Streptococcus cerevisiae* isolate that ferments xylose and glucose to produce high levels of ethanol [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39: 777-787.

[23] 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.

[24] 褚莫健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 476.

[25] 王高良. 草菇的选育 [J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 44-47.



## Preliminary Study on Improving the Tolerance of *Volvariella volvacea* Strain V23 Substance to Low-temperature

ZHU Ziping<sup>1</sup> LI Na<sup>1</sup> TANG Xueming<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Evolutionary Ecology and Conservation/School of Life Science, Taizhou University, Taizhou, Zhejiang 318000; <sup>2</sup> Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106 )

**Abstract.** To improve the performance of *Volvariella volvacea* strain V23 during low-temperature storage, The study performed mutagenesis on the protoplasts of V23 via electronic beam and <sup>60</sup>Co - γ ray radiation, respectively. Mutants with enhanced tolerance to low temperature were selected after three rounds of genome shuffling. One strain VF displaying normal fruiting and stable heredity was successfully obtained. The fruitbody of strain VF could be successfully stored for 20h at 10℃, which was 25% longer than that of the original strain V23. The results proved that it is feasible to improve the low-temperature tolerance of *Volvariella volvacea* V23 using Genome shuffling technique. This work provides novel insights for cultivating edible fungi with enhanced performance under unfavorable environments.

**Keywords:** *Volvariella volvacea*, genome shuffling, protoplast, low temperature resistant strain





ISSN 1000-8551



9 771000 855167