



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108823107 A

(43)申请公布日 2018.11.16

(21)申请号 201810768050.2

C12R 1/645(2006.01)

(22)申请日 2018.07.13

(83)生物保藏信息

CGMCC No.15876 2018.06.25

(71)申请人 迁西县林中宝生物科技有限公司

地址 064300 河北省唐山市迁西县滦阳镇
张家店村154号

(72)发明人 李宝莹

(74)专利代理机构 唐山顺诚专利事务所(普通
合伙) 13106

代理人 于文顺

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

C12N 15/01(2006.01)

C12N 13/00(2006.01)

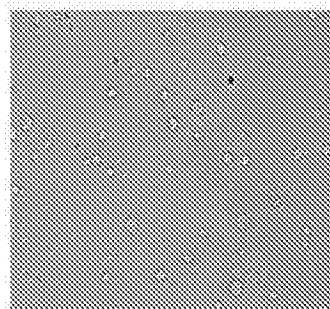
权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

一种利用ARTP诱变技术选育的白色栗蘑品
种及选育方法

(57)摘要

本发明涉及一种利用ARTP诱变技术选育的
白色栗蘑品种及选育方法,属于食用菌新品种选
育领域。技术方案是:命名为迁白M-520,在栗蘑
迁西1号菌株的基础上选育而成,该品种的菌株
在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物
中心的保藏登记入册编号:CGMCC No.15876。白
色栗蘑品种利用ARTP诱变技术选育,将10 μ L栗
蘑原生质体悬液载片放到ARTP诱变仪器固定位
置后,在气流量为8 SLM,诱变处理时间设为30-
40s条件下,可获得突变体。本发明的有益效果:
菌盖为白色,且栗蘑香味浓郁;加工煮熟后依然
为白色,为制作色、香、味俱全的美味菜肴提供
了一种新食材。



1. 一种白色栗蘑品种,命名为迁白M-520,在栗蘑迁西1号菌株的基础上,采用ARTP诱变技术选育而成,该品种的菌株在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏登记入册编号为:CGMCC No.15876。

2. 根据权利要求1所述的白色栗蘑品种,覆土栽培整株直径16~50cm,重1~10kg;菌盖直径2~5cm,菌叶厚2~6mm,菇型形如菊花,菇色为白色。

3. 一种权利要求1所述白色栗蘑品种的选育方法,利用ARTP诱变技术选育,其特征在于:将10 μ L栗蘑原生质体悬液载片放到ARTP诱变仪器固定位置后,在气流量为8 SLM,诱变处理时间设为30-40 s条件下,可获得突变体。

一种利用ARTP诱变技术选育的白色栗蘑品种及选育方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用ARTP诱变技术选育的白色栗蘑品种及选育方法,属于食用菌新品种选育领域。

背景技术

[0002] 栗蘑,学名灰树花,别称:贝叶多孔菌、舞茸、千佛菌、栗子蘑、莲花菇等;是一种珍稀食、药两用真菌,属担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、多孔菌科、树花菌属。我国栗蘑栽培研究始于上世纪八十年代,是河北省科学技术厅“八五”期间重点科技攻关项目——栗蘑仿野生栽培技术研究。1992年栗蘑栽培研究取得突破性进展,仿野生人工栽培栗蘑初获成功。目前,栗蘑的人工栽培品种主要有迁西1号,迁西3号等品种,菌盖颜色均为深灰色至灰黑色,品种较为单一,没有白色(浅色)品种。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种利用ARTP诱变技术选育的白色栗蘑品种及选育方法,菌盖为白色,且栗蘑香味浓郁;加工煮熟后依然为白色,为制作色、香、味俱全的美味菜肴提供了一种新食材,解决已有技术存在的上述问题。

[0004] 本发明目的是通过下面的技术方案实现的:

本发明提供的白色栗蘑品种,是在栗蘑迁西1号菌株的基础上,采用ARTP诱变技术选育而成,该品种被命名为“迁白M-520”,该品种的菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏中心登记入册编号:CGMCC No.15876。

[0005] 所述白色栗蘑品种,覆土栽培整株直径16~50cm,重1~10kg;菌盖直径2~5cm,菌叶厚2~6mm,菇型形如菊花,菇色为白色;该品种属于中温型品种,畸形菇少,转潮快,纤维少。

[0006] 所述白色栗蘑品种的选育方法,利用ARTP诱变技术选育,将10 μ L栗蘑原生质体悬液载片放到ARTP诱变仪器固定位置后,在气流量为8 SLM,诱变处理时间设为30-40 s条件下,可获得突变体。

[0007] 所述白色栗蘑品种利用ARTP诱变技术选育,包含如下步骤:

1. 制备下列培养基备用、准备实验药品:

- (1)PDA培养基:土豆(去皮煮汁)200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,水1000 mL,pH自然;
- (2)改良PDA培养基:土豆(去皮煮汁)200 g,葡萄糖20 g,硫酸镁1.5 g,蛋白胨3 g,磷酸二氢钾3 g,维生素B₁ 0.05 g,琼脂20 g,水1000 mL,pH自然;
- (3)再生培养基:土豆(去皮煮汁)200 g,甘露醇109.306 g,葡萄糖4 g,麦芽糖4 g,酵母粉4 g,蛋白胨4 g,琼脂15 g,水1000 mL,pH自然;
- (4)木屑煮汁培养基:木屑100 g,土豆(去皮煮汁)200 g,葡萄糖20 g,硫酸镁1.5 g,蛋白胨3 g,磷酸二氢钾3 g,维生素B₁ 0.05 g,琼脂20 g,水1000 mL,pH自然;

(5)液体培养基:土豆(去皮煮汁)200 g,葡萄糖20 g,硫酸镁1.5 g,蛋白胨3 g,磷酸二氢钾3 g,维生素B₁ 0.05 g,水1000 mL,pH自然;

准备实验药品:

甘油、甲醇、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素B₁、琼脂、蛋白胨、麦芽糖、酵母粉、甘露醇、凝胶贮液、TEMED、过硫酸铵、蔗糖、溴酚蓝、乙酸-1-萘酯、乙酸-2-萘酯、固蓝RR盐、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、甘氨酸、丙酮、超纯水、蒸馏水、酒精、溶壁酶,溶壁酶由广东微生物所生产;其他试剂均为市场购买的分析纯试剂;

2. 试验仪器及试剂配方:

ARTP诱变仪器,为诱变育种系统,市场上购买,思清源生物科技有限公司生产。

[0008] 试剂配方

(1)2%酶液配制:准确称取100 mg溶壁酶,溶于5 mL 0.6 M的甘露醇中,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌(现用现配);

(2)渗透压稳定剂(0.6 M甘露醇):准确称取109.306 g甘露醇,溶于800 mL超纯水,最后定容到1000 mL;

(3)凝胶贮液:上海生工所售的凝胶贮液(Acr/Bis=29:1);

(4)浓缩胶缓冲液(0.5 mol/L,pH 6.8):准确称取6.06 g Tris,溶于80 mL 超纯水,pH用盐酸调至6.8,最后定容到100 mL;

(5)分离胶缓冲液(1.5 mol/L,pH 8.9):准确称取18.16 g Tris,溶于80 mL超纯水,pH用盐酸调至8.9,最后定容到100 mL;

(6)电极缓冲液(0.025 mol/L Tris,0.2 mol/L甘氨酸):准确称取3.028 g Tris、14.414 g甘氨酸,溶于800 mL超纯水,最后定容到1000 mL;

(7)10% AP溶液:准确称取0.1 g过硫酸铵,溶于1.0 mL超纯水;

(8)TEMED:上海生工所售;

(9)pH 6.5磷酸缓冲液:准确称取10.69 g磷酸二氢钠、11.3 g磷酸氢二钠,溶于800 mL超纯水,最后定容到1000 mL;

(10)酯酶同工酶染色液:准确称取133.4 mg固蓝RR盐,溶于200 mL 0.1 mol/L,pH 6.5的磷酸缓冲液中,过滤待用,使用前称取66.7 mg乙酸-1-萘酯、66.7 mg乙酸-2-萘酯,溶于4 mL丙酮中,然后逐滴倒入上述滤液中,边加边搅拌使其均匀混合即可染色。

[0009] 3. 栗蘑菌丝体的培养

栗蘑迁西1号菌株,市场上购买,例如:迁西县林中宝生物科技有限公司生产的栗蘑迁西1号菌株,迁西1号是栗蘑菌株商品通用名;

将栗蘑迁西1号菌株接种在改良PDA培养基上活化7天,用直径5 mm的打孔器从活化菌种的边缘上打孔,挑取5块接种在液体培养基上,25℃恒温,静置培养10天,每天早晚手动摇晃一次,备用;

4. 栗蘑迁西1号原生质体的制备

(1)收集上述培养的新鲜的菌丝体,用四层纱布过滤,用0.6 M的甘露醇洗涤2次,再用滤纸吸掉菌丝体中多余的液体,将菌丝体收集到10 mL的EP管中;

(2)按每100 mg新鲜菌丝体加入1 mL的溶壁酶的计量,在菌丝中加入溶壁酶,34℃水浴,时间2 h,每30 min摇晃一次;

(3) 在酶解1 h后,观察原生质体的制备;

(4) 2 h之后,加入等体积0.6 M的甘露醇终止酶解,用400目细胞筛过滤,将滤液收集到EP管中,离心(室温、3000 rpm、10 min),得到原生质体;

(5) 将得到的原生质体用0.6 M的甘露醇洗涤2次,离心(室温、3000 rpm、10 min),弃去上清,再用0.6 M的甘露醇将其悬浮,得到原生质体悬液;

(6) 利用血球计数板对原生质体进行计数,将原生质体悬液浓度稀释到 1×10^7 个/mL;

5. 原生质体ARTP诱变与再生

(1) 打开ARTP诱变仪器(先开电源后开氦气)进行实验前预消毒灭菌;

(2) 在超净台中分别将七个金属样品载片置于酒精灯外焰各灼烧30 s,放到已灭菌的玻璃平板中冷却,取10 μ L原生质体悬液于载片;

(3) 将放置装有处理样品载片的平板移至ARTP 诱变系统操作仓,用无菌镊子将载片放到对应孔位,调节旋钮使载台上升,至载片距离气流端口2 mm处,并关闭仓门;

(4) 设置气流量和处理,点击开始按钮,开始处理样品;气流量为8 SLM,诱变处理时间设为40 s;

(5) 样品处理完毕,用无菌镊子将载片放至装有1 mL 0.6 M甘露醇的EP管中;将EP管在振荡器上震荡1 min,把附着在载片上的原生质体悬液洗脱到液体中,得到诱变处理的原生质体悬液;

(6) 将上述诱变后的原生质体悬液用0.6 M甘露醇进行稀释,取100 μ L稀释液涂布在再生培养基上,做好标记,25℃恒温培养,培养再生出的菌株;

6. 双核诱变子的筛选

将再生出的菌株逐一挑出,置于改良PDA培养基中培养,挑取菌丝制片,用显微镜镜检观察,以锁状联合为标准,判定菌株的单双核,有锁状联合的菌丝体为双核诱变菌丝;

7. 诱变子的拮抗实验

将筛选到的双核诱变菌株与亲本栗蘑迁西1号菌株在改良PDA培养基平板上进行活化;用打孔器(直径5 mm)在菌种的边缘上打孔,接种到PDA培养基平板上,对峙生长;每个处理三次重复;25℃培养15天后,观察结果;

8. 酯酶同工酶验证诱变子亲缘关系

(1) 菌丝的培养

将筛选获得的双核诱变菌株、栗蘑迁西1号菌株接种在改良PDA培养基,25℃恒温培养15天;

(2) 酯酶同工酶的制备

用刀片将培养的菌丝刮下,收集到2 mL EP管中,每1 g组织加入800 μ L稀释4倍的浓缩胶缓冲液,放入-80℃超低温冰箱中冰冻一晚;然后取出置于研钵中,加入石英砂充分研磨(整个过程在冰上进行);将研磨液离心(4℃,10000 rpm,10 min),取相同体积的上清液和蔗糖溶液(40%)混合,再加入少量0.1%的溴酚蓝溶液,用振荡器混匀,放到4℃冰箱中保存;

(3) 电泳及酶谱分析

采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),电极缓冲液为pH 为8.3的Tris-Gly;分离胶浓度为7.5%,pH为 8.9;浓缩胶浓度为4%,pH为 6.8;按常规方法进行电泳及染色;

电泳后根据不同菌株酶带迁移率(Rf)的不同,酶带的多少、酶带的宽窄、颜色的深浅可

以分析不同菌株间的差异;

酶带迁移率(RF)=酶带迁移距离/指示剂的迁移距离;

将染色酶带分为0=没有;1=较浅;2=中等;3=较深,统计各个菌株的酯酶同工酶信息,用NTSYSpc Version 2.1聚类分析软件,计算菌株间的遗传相似系数,并采用UPGMA法构建遗传树状聚类图;

9. 诱变子的出菇筛选

筛选获得原生质体诱变子及出发菌株栗蘑迁西1号菌株进行栽培出菇;

原种培养基配方:栗木屑80%、麦麸皮8%、石膏和糖各1%、沙壤土或壤土10%,质量比;

培养料配方:栗木屑70%、麸皮20%、生土8%、石膏1%、糖1%,质量比;

栽培方式:仿野生出菇——栽培菌袋菌丝满袋后,脱去塑料袋,将菌棒整齐地排列于事先挖好的畦内,菌棒间留适当间隙,在菌棒缝隙及周围填土,表面覆上1~2厘米的土层。

[0010] ARTP是常压室温等离子体(Atmospheric and Room Temperature Plasma)的简称,能够在大气压下产生温度在25-40℃之间的、具有高活性粒子(包括处于激发态的氢原子、氧原子、氮原子、OH自由基等)浓度的等离子体射流。

[0011] 保藏说明

建议分类名:灰树花;

拉丁名:

Grifola frondosa

参据的生物材料:迁白M-520

保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

保藏机构简称:CGMCC

地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号

保藏日期:2018年6月25日

保藏中心登记入册编号:CGMCC No.15876

本发明的有益效果:菌盖为白色,且栗蘑香味浓郁;加工煮熟后依然为白色,为制作色、香、味俱全的美味菜肴提供了一种新食材。

[0012] 说明书附图

图1为本发明实施例栗蘑迁西1号菌种的原生质体;

图2为本发明实施例栗蘑迁西1号菌种原生质体ARTP诱变致死率曲线;

图3为本发明实施例栗蘑迁西1号菌种诱变子再生菌落;

图4为本发明实施例诱变子的拮抗筛选;

图5为本发明实施例16个栗蘑诱变菌株酯酶同工酶酶谱图;

图6为本发明实施例16个栗蘑诱变菌株酯酶同工酶酶谱模式图;

图7为本发明实施例16个栗蘑诱变菌株酯酶同工酶聚类图;

图8为已有技术迁西1号栗蘑出菇图;

图9为本发明实施例迁白M-520与已有技术迁西1号栗蘑出菇图对比,右下白色的为本发明实施例迁白M-520;

图10为本发明实施例迁白M-520栗蘑出菇图。

具体实施方式

[0013] 以下通过实施例对本发明做进一步说明。

[0014] 本发明提供的白色栗蘑品种,是在栗蘑迁西1号菌株的基础上选育而成,该品种被命名为“迁白M-520”,该品种的菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏中心登记入册编号:CGMCC No.15876。

[0015] 所述白色栗蘑品种,覆土栽培整株直径16~50cm,重1~10kg;菌盖直径2~5cm,菌叶厚2~6mm,菇型形如菊花,菇色为白色;该品种属于中温型品种,畸形菇少,转潮快,纤维少。

[0016] 所述白色栗蘑品种的选育方法,利用ARTP诱变技术选育,将10 μ L栗蘑原生质体悬液载片放到ARTP诱变仪器固定位置后,在气流量为8 SLM,诱变处理时间设为30-40 s条件下,可获得突变体。

[0017] 所述白色栗蘑品种利用ARTP诱变技术选育,包含如下步骤:

1、制备下列培养基备用:

(1)PDA培养基:土豆(去皮煮汁)200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,水1000 mL,pH自然;

(2)改良PDA培养基:土豆(去皮煮汁)200 g,葡萄糖20 g,硫酸镁1.5 g,蛋白胨3 g,磷酸二氢钾3 g,维生素B₁ 0.05 g,琼脂20 g,水1000 mL,pH自然;

(3)再生培养基:土豆(去皮煮汁)200 g,甘露醇109.306 g,葡萄糖4 g,麦芽糖4 g,酵母粉4 g,蛋白胨4 g,琼脂15 g,水1000 mL,pH自然;

(4)木屑煮汁培养基:木屑100 g,土豆(去皮煮汁)200 g,葡萄糖20 g,硫酸镁1.5 g,蛋白胨3 g,磷酸二氢钾3 g,维生素B₁ 0.05 g,琼脂20 g,水1000 mL,pH自然;

(5)液体培养基:土豆(去皮煮汁)200 g,葡萄糖20 g,硫酸镁1.5 g,蛋白胨3 g,磷酸二氢钾3 g,维生素B₁ 0.05 g,水1000 mL,pH自然;

准备实验药品:

甘油、甲醇、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素B₁、琼脂、蛋白胨、麦芽糖、酵母粉、甘露醇、凝胶贮液、TEMED、过硫酸铵、蔗糖、溴酚蓝、乙酸-1-萘酯、乙酸-2-萘酯、固蓝RR盐、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、甘氨酸、丙酮、超纯水、蒸馏水、酒精、溶壁酶,溶壁酶由广东微生物所生产;其他试剂均为市场购买的分析纯试剂;

2、试验仪器及试剂配方:

ARTP诱变仪器,为诱变育种系统,市场上购买,思清源生物科技有限公司生产;

试剂配方

(1)2%酶液配制:准确称取100 mg溶壁酶,溶于5 mL 0.6 M的甘露醇中,0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌(现用现配);

(2)渗透压稳定剂(0.6 M甘露醇):准确称取109.306 g甘露醇,溶于800 mL超纯水,最后定容到1000 mL;

(3)凝胶贮液:上海生工所售的凝胶贮液(Acr/Bis=29:1);

(4)浓缩胶缓冲液(0.5 mol/L,pH 6.8):准确称取6.06 g Tris,溶于80 mL 超纯水,pH用盐酸调至6.8,最后定容到100 mL;

(5) 分离胶缓冲液 (1.5 mol/L, pH 8.9): 准确称取 18.16 g Tris, 溶于 80 mL 超纯水, pH 用盐酸调至 8.9, 最后定容到 100 mL;

(6) 电极缓冲液 (0.025 mol/L Tris, 0.2 mol/L 甘氨酸): 准确称取 3.028 g Tris、14.414 g 甘氨酸, 溶于 800 mL 超纯水, 最后定容到 1000 mL;

(7) 10% AP 溶液: 准确称取 0.1 g 过硫酸铵, 溶于 1.0 mL 超纯水;

(8) TEMED: 上海生工所售;

(9) pH 6.5 磷酸缓冲液: 准确称取 10.69 g 磷酸二氢钠、11.3 g 磷酸氢二钠, 溶于 800 mL 超纯水, 最后定容到 1000 mL;

(10) 酯酶同工酶染色液: 准确称取 133.4 mg 固蓝 RR 盐, 溶于 200 mL 0.1 mol/L, pH 6.5 的磷酸缓冲液中, 过滤待用, 使用前称取 66.7 mg 乙酸-1-萘酯、66.7 mg 乙酸-2-萘酯, 溶于 4 mL 丙酮中, 然后逐滴倒入上述滤液中, 边加边搅拌使其均匀混合即可染色;

3、栗蘑菌丝体的培养

栗蘑迁西 1 号菌株, 市场上购买, 例如: 迁西县林中宝生物科技有限公司生产的栗蘑迁西 1 号菌株, 迁西 1 号是栗蘑菌株商品通用名;

将栗蘑迁西 1 号菌株接种在改良 PDA 培养基上活化 7 天, 用直径 5 mm 的打孔器从活化菌种的边缘上打孔, 挑取 5 块接种在液体培养基上, 25℃ 恒温, 静置培养 10 天, 每天早晚手动摇晃一次, 备用;

4、栗蘑迁西 1 号原生质体的制备

首先进行菌丝体的培养; 将栗蘑迁西 1 号菌株接种在改良 PDA 培养基上活化 7 天, 用直径 5 mm 的打孔器从活化菌种的边缘上打孔, 挑取 5 块接种在液体培养基上, 25℃, 静置培养 10 天, 每天早晚手动摇晃一次;

原生质体的制备

(1) 收集上述培养的新鲜的菌丝体, 用四层纱布过滤, 用 0.6 M 的甘露醇洗涤 2 次, 再用滤纸吸掉菌丝体中多余的液体, 将菌丝体收集到 10 mL 的 EP 管中;

(2) 按每 100 mg 新鲜菌丝体加入 1 mL 的溶壁酶的计量, 在菌丝中加入溶壁酶, 34℃ 水浴, 时间 2 h, 每 30 min 摇晃一次;

(3) 在酶解 1 h 后, 观察原生质体的制备;

(4) 2 h 之后, 加入等体积 0.6 M 的甘露醇终止酶解, 用 400 目细胞筛过滤, 将滤液收集到 EP 管中, 离心 (室温、3000 rpm、10 min), 得到原生质体;

(5) 将得到的原生质体用 0.6 M 的甘露醇洗涤 2 次, 离心 (室温、3000 rpm、10 min), 弃去上清, 再用 0.6 M 的甘露醇将其悬浮, 得到原生质体悬液;

(6) 利用血球计数板对原生质体进行计数, 将原生质体悬液浓度稀释到 1×10^7 个/mL;

原生质体 ARTP 诱变与再生

(1) 打开 ARTP 诱变仪器 (先开电源后开氦气) 进行实验前预消毒灭菌;

(2) 在超净台中分别将七个金属样品载片置于酒精灯外焰各灼烧 30 s, 放到已灭菌的玻璃平板中冷却, 取 10 μ L 原生质体悬液于载片;

(3) 将放置装有处理样品载片的平板移至 ARTP 诱变系统操作仓, 用无菌镊子将载片放到对应孔位, 调节旋钮使载台上升, 至载片距离气流端口 2 mm 处, 并关闭仓门;

(4) 设置气流量和处理, 点击开始按钮, 开始处理样品; 气流量为 8 SLM, 处理时间分别

设为:0 s、10 s、20 s、30 s、40 s、50 s、60 s;

(5) 样品处理完毕,用无菌镊子将载片放至装有1 mL 0.6 M甘露醇的EP管中;将EP管在振荡器上震荡1 min,把附着在载片上的原生质体悬液洗脱到液体中,形成诱变的原生质体悬液;

(6) 将上述诱变的原生质体悬液用0.6 M甘露醇进行稀释,取100 μ L稀释液涂布在再生培养基上,做好标记,25℃恒温培养,培养再生出的菌株;

5、双核诱变子的筛选

将再生出的菌株逐一挑出,置于改良PDA培养基中培养,挑取菌丝制片,用显微镜镜检观察,以锁状联合为标准,判定菌株的单双核,有锁状联合的菌丝体为双核诱变菌丝;

6、诱变子的拮抗实验

将筛选到的双核诱变菌株与亲本栗蘑迁西1号菌株在改良PDA培养基平板上进行活化;用打孔器(直径5 mm)在菌种的边缘上打孔,接种到PDA培养基平板上,对峙生长;每个处理三次重复;25℃培养15天后,观察结果;

7、诱变子酯酶同工酶实验

菌丝的培养

将筛选获得的双核诱变菌株、栗蘑迁西1号菌株接种在改良PDA培养基,25℃恒温培养15天;

酯酶同工酶的提取

用刀片将培养的菌丝刮下,收集到2 mL EP管中,每1 g组织加入800 μ L稀释4倍的浓缩胶缓冲液,放入-80℃超低温冰箱中冰冻一晚;然后取出置于研钵中,加入石英砂充分研磨(整个过程在冰上进行);将研磨液离心(4℃,10000 rpm,10 min),取相同体积的上清液和蔗糖溶液(40%)混合,再加入少量0.1%的溴酚蓝溶液,用振荡器混匀,放到4℃冰箱中保存;

电泳及酶谱分析

采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),电极缓冲液为pH 为8.3的Tris-Gly;分离胶浓度为7.5%,pH为 8.9;浓缩胶浓度为4%,pH为 6.8;按常规方法进行电泳及染色;

电泳后根据不同菌株酶带迁移率(Rf)的不同,酶带的多少、酶带的宽窄、颜色的深浅可以分析不同菌株间的差异;

酶带迁移率(Rf)=酶带迁移距离/指示剂的迁移距离;

将染色酶带分为0=没有;1=较浅;2=中等;3=较深,统计各个菌株的酯酶同工酶信息,用NTSYSpc Version 2.1聚类分析软件,计算菌株间的遗传相似系数,并采用UPGMA法构建遗传树状聚类图;

8、诱变子的出菇

筛选获得原生质体诱变子及出发菌株栗蘑迁西1号菌株进行栽培出菇;

原种培养基配方:栗木屑80%、麦麸皮8%、石膏和糖各1%、沙壤土或壤土10%,质量比;

培养料配方:栗木屑70%、麸皮20%、生土8%、石膏1%、糖1%,质量比;

栽培方式:仿野生出菇——栽培菌袋菌丝满袋后,脱去塑料袋,将菌棒整齐地排列于事先挖好的畦内,菌棒间留适当间隙,在菌棒缝隙及周围填土,表面覆上1~2厘米的土层。

[0018] 一种利用ARTP诱变技术选育的白色栗蘑品种,采用上述方法培育而成;;覆土栽培整株直径16~50cm,重1~10kg;菌盖直径2~5cm,菌叶厚2~6mm,菇型形如菊花,菇色为白

色;该品种属于中温型品种,畸形菇少,转潮快,纤维少。

[0019] 本发明实施例实验结果与分析

1、栗蘑迁西1菌种号原生质体的制备

酶解2 h后,观察出发菌株栗蘑迁西1号原生质体释放情况,参照图1。原生质体透明无色,为轮廓分明的圆球状,大小不一。

[0020] 2、栗蘑迁西1号菌种原生质体ARTP诱变及再生

栗蘑迁西1号原生质体ARTP诱变致死率

诱变致死率曲线参照图2。处理时间0 s到30 s时,原生质体的致死率直线上升,到处理时间30 s时致死率达75.7%,40 s的致死率为80.0%,50 s致死率为84.4%,60 s致死率接近100%。

[0021] 根据致死率曲线,0 s到30 s时等离子体对原生质体的影响变化大,不稳定,到40 s时趋于平缓稳定,致死率较大,且存活的原生质体较多,筛选到突变菌株的可能性大,实验选取40 s为诱变最佳处理时间。

[0022] 栗蘑迁西1号原生质体诱变及再生结果

根据致死率曲线,选择40 s进行重复实验,将诱变处理40 s获得的原生质体悬液稀释3倍,吸取100 μ L均匀涂布于再生培养上,25℃培养。培养7天时间后,原生质体开始出现再生菌落,再生平板参照图3。将再生出来的单菌落挑出,转移至改良PDA培养基平板,扩大培养。共挑取菌落100个。

[0023] 3、栗蘑迁西1号菌种诱变子的单双核的筛选

在显微镜下观察到的双核菌丝具有锁状联合,菌丝粗壮、有光泽。通过单双核筛选,选出双核菌株51个,编号M401-M536。通过拮抗实验,作进一步筛选。

[0024] 4、栗蘑迁西1号菌种诱变子的拮抗实验

将51个双核菌株与出发菌株栗蘑迁西1号进行拮抗实验,通过观察诱变子与亲本之间拮抗现象,筛选出与双亲均能产生拮抗线的菌株,参照图4。共获得16个诱变菌株。

[0025] 5、栗蘑诱变子酯酶同工酶实验

供试16个栗蘑诱变菌株及出发菌株迁西1号菌株共检测出13条迁移率不同的酶带。从聚类分析图可以看出,诱变后代与出发菌株迁西1号的亲缘关系。其中M410、M412、M419、M513、M517、M518差异较小,相似系数为1.00,可初步认定为同一菌种。M415与迁西1号菌株亲缘关系比较近,应为同一菌株。

[0026] 通过酯酶同工酶聚类分析结果,最终获得诱变菌株11个品种。分别为:M407、M410、M413、M417、M418、M423、M425、M512、M520、M529、M533。

[0027] 参照附图5, 1-17条泳道分别代表迁西1号, M407、M408、M410、M411、M412、M415、M419、M423、M425、M512、M513、M517、M518、M520、M529、M533

参照附图6, 1-17条泳道分别代表迁西1号, M407、M408、M410、M411、M412、M415、M419、M423、M425、M512、M513、M517、M518、M520、M529、M533

参照附图7, 1-17条泳道分别代表迁西1号, M407、M408、M410、M411、M412、M415、M419、M423、M425、M512、M513、M517、M518、M520、M529、M533

出菇试验主要结果

记录供试菌株发菌结束后健康菌袋数量和出菇过程中菌袋的栗蘑产量和形态特征,详

见栗蘑出菇试验记录数据见表1。

表1 11个栗蘑菌株出菇实验记录表

栗蘑出菇实验记录表				
品种编号	菌袋数(袋)	菌袋干料重(斤)	栗蘑鲜重(斤)	转化率%
迁西1号	100	8.8	7.9	89.77
M407	120	10.56	10.1	95.64
M410	90	7.92	5	63.13
M413	140	12.32	5.6	45.45
M417	120	10.56	3.3	31.25
M418	120	10.56	6.42	60.8
M423	130	11.44	11.34	99.13
M425	130	11.44	9.08	79.37
M512	70	6.16	7.54	122.4
M520	50	4.4	4.56	103.6
M529	100	8.8	9.28	105.45
M533	70	6.16	5.5	89.29

[0028] 其中,M520生物转化率为103.6%,子实体突变为白色,其他诱变子仍为灰色、黑褐色。M520是本发明,称为迁白M-520。

[0029] 已有技术的栗蘑迁西1号,鲜品直径15~60cm,重1~10kg。菌柄分支多,菌盖直径2~7cm,菌肉厚度2~7mm,菌管长度≤1.5mm;菌盖深灰色至灰黑色,菌肉、菌管白色。韧性好不易破碎,口感脆嫩,香味浓郁。参照附图8。

[0030] 本发明栗蘑(迁白M-520)朵型中大型,覆土栽培整株直径16~50cm,重1~10kg。菌盖直径2~5cm,菌叶厚2~6mm,菌柄多为一级分枝,二级分枝少,菇型形如菊花,菇色为白色。该品种属于中温型品种,畸形菇少,转潮快,纤维少,商品性高,参照附图9、10。

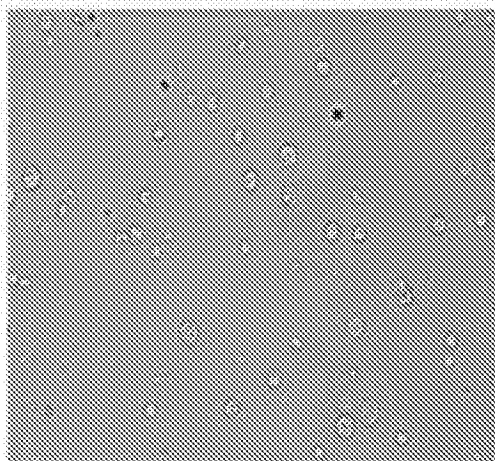


图1

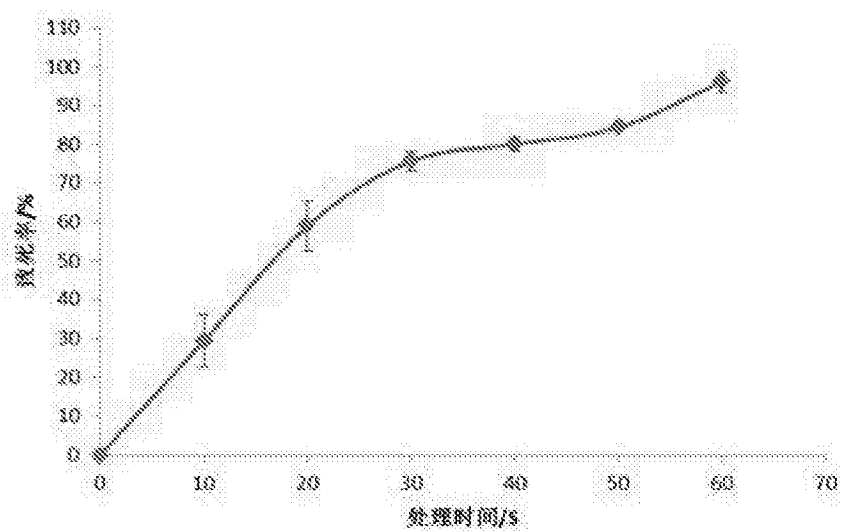


图2

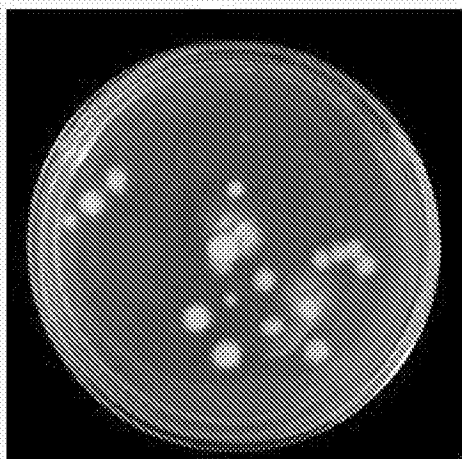


图3

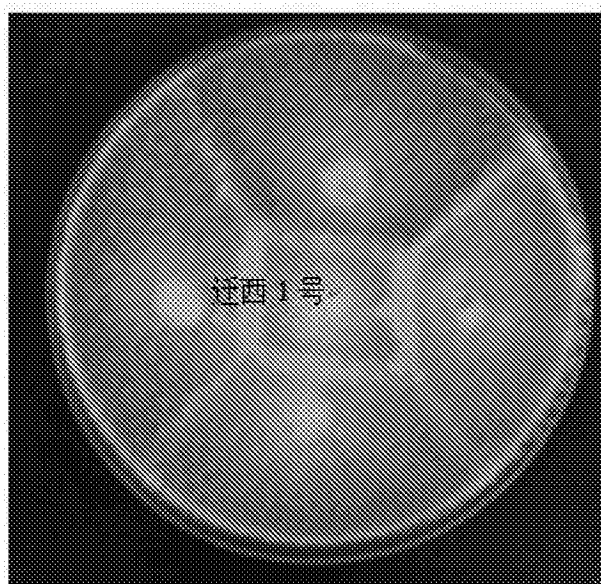


图4

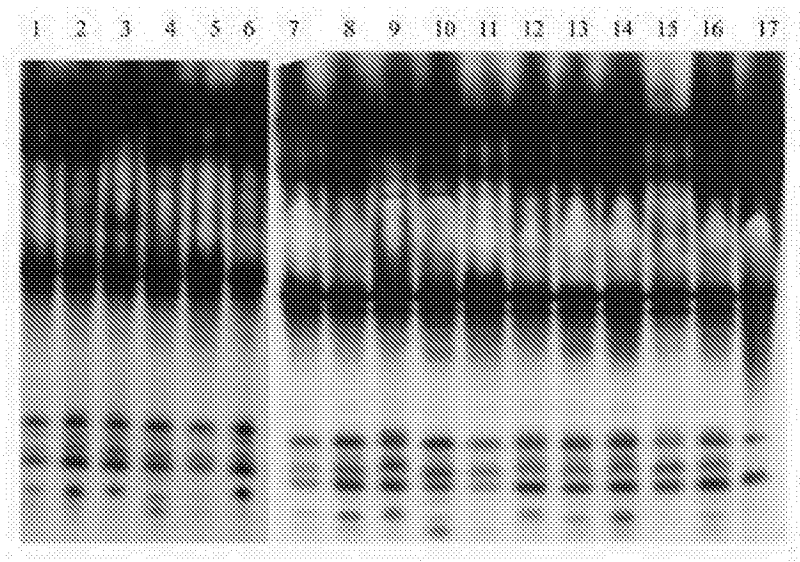


图5

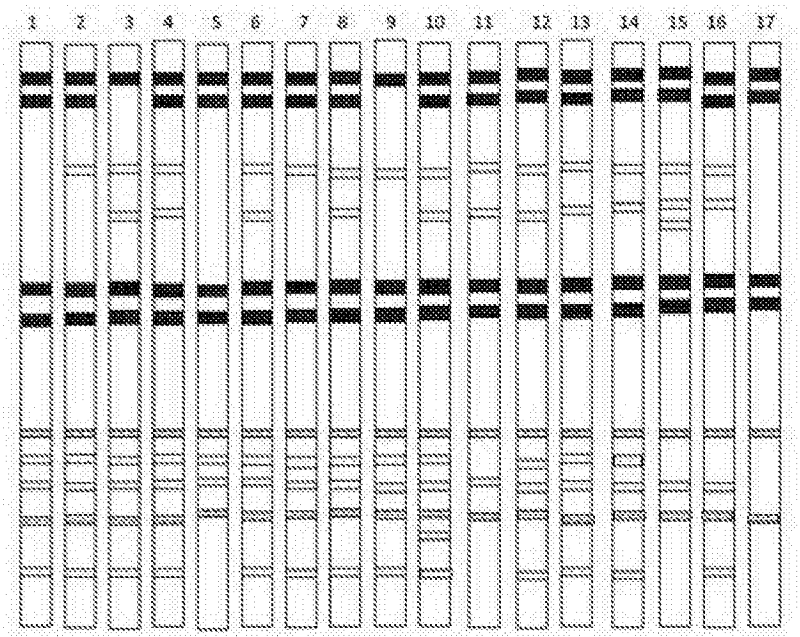


图6

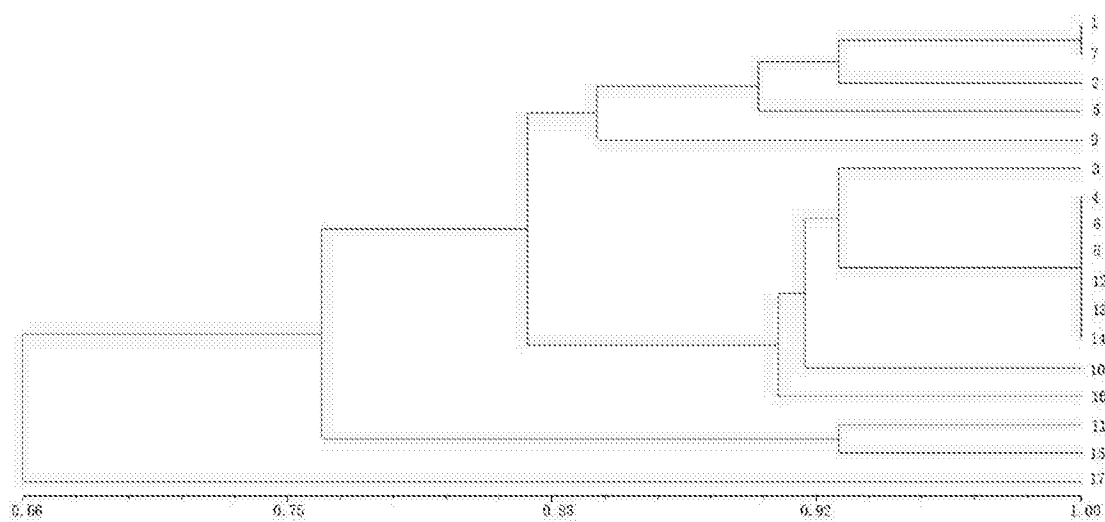


图7



图8



图9

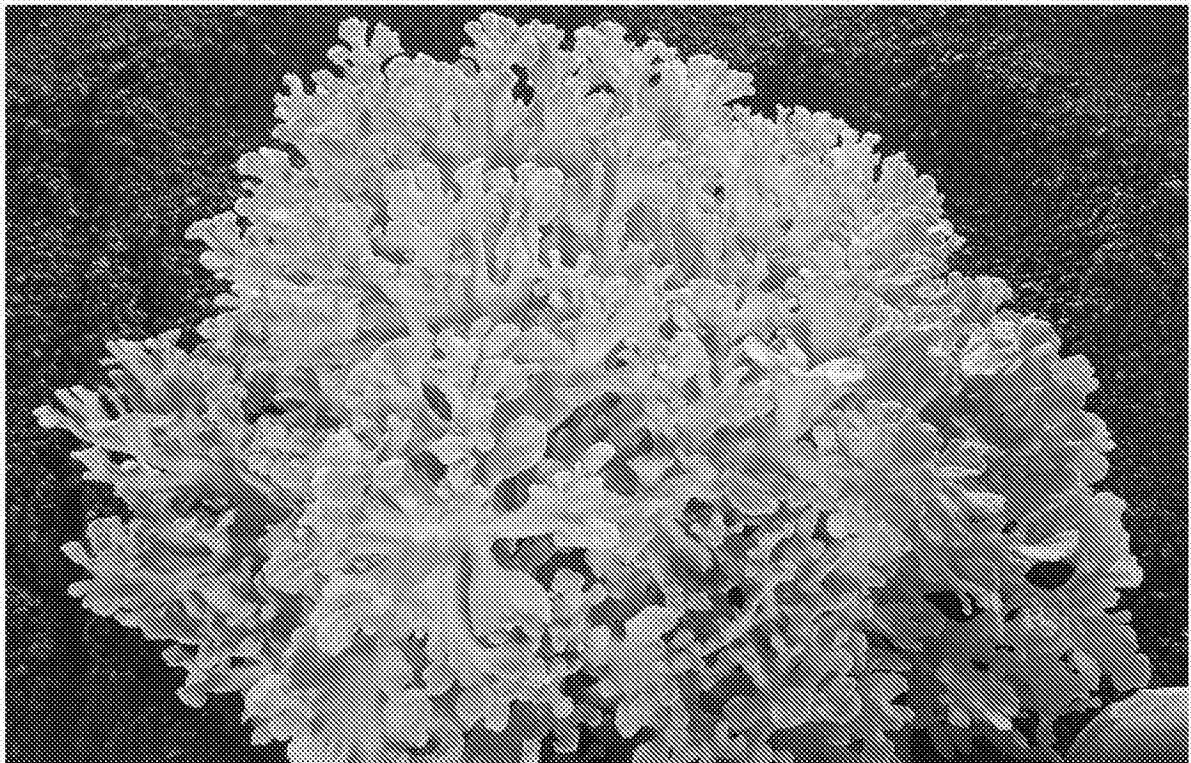


图10