

# 基质高利用率灵芝菌株筛选方法的研究

王天娇<sup>1,2</sup>, 唐传红<sup>1\*</sup>, 张劲松<sup>1\*</sup>, 杨焱<sup>1</sup>, 徐凯<sup>1</sup>, 刘艳芳<sup>1</sup>, 唐庆九<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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实验室, 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403; <sup>2</sup>上海海洋大学食品学院, 上海 201306

**摘要:** 通过测定 27 株灵芝菌株的菌丝体生长速度, 漆酶和纤维素酶相对活性及其栽培试验, 运用多元线性回归分析法建立了菌丝体生长速度、漆酶和纤维素酶相对活性与产量的关系, 确定出菌丝体的生长速度, 漆酶和纤维素酶相对活性对产量的贡献力。结果表明: 这些指标与产量有较高的线性相关。利用这些指标来预测杂交菌株的产量和选择灵芝杂交育种中的亲本, 具有简便、快速等优点, 可以有效缩短杂交育种的周期。

**关键词:** 灵芝; 杂交育种; 多元线性回归分析法; 筛选

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.010

## Screening of *Ganoderma lucidum* Strains Based on High Substrate Utilization

WANG Tian-jiao<sup>1,2</sup>, TANG Chuan-hong<sup>1\*</sup>, ZHANG Jing-song<sup>1\*</sup>,  
YANG Yan<sup>1</sup>, XU Kai<sup>1</sup>, LIU Yan-fang<sup>1</sup>, TANG Qing-jiu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Engineering Research Center of Edible Fungi; Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, P. R., China; Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; <sup>2</sup> College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China

**Abstract:** Twenty-seven strains of *Ganoderma lucidum* were verified to be different strains through somatic incompatibility. The correlations of mycelial growth rate and yield, the relative activity of laccase and cellulase as well as yield were established. To further understand the roles governing growth rate during cultivation, Pearson correlation analysis was used to evaluate data from the process. Comparison of yield to that of mycelial growth rate, relative activity of laccase and cellulase demonstrated high correlation with yield. The results indicated that the correlation between these factors and yield were in high linear correlation. The model of selecting parent strains for *Ganoderma lucidum* hybridization breeding was constructed, which was useful and economical.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*; hybridization breeding; multiple linear regression analysis; screening

灵芝 (*Ganoderma lucidum*), 是隶属于真菌界、担子菌亚门、担子菌纲、多孔菌目、灵芝菌科、灵芝属的真菌<sup>[1]</sup>。灵芝作为我国医药宝库中的瑰宝, 自古就有“仙草”、“瑞草”之称<sup>[2]</sup>。

在食用菌栽培生产中, 人们往往希望一个品种能同时集合多个菌株的优势, 达到对栽培资源的最大化利用。但是仅依靠自然界的自身进化, 速度太慢, 且往往不能达到理想的要求, 因此育种工作就显得极为重要<sup>[3]</sup>。食、药用菌常规育种方法有选择育种、杂交育种、诱变育种和原生质体融合育种, 近年来基因工程技术在食、药用菌育种中的应用也取得

了一定程度的进展<sup>[4]</sup>。杂交育种是当前食、药用菌育种中应用最广、效果最显著的一种手段, 但需要获得单核菌株。吴小平等<sup>[5]</sup>采用原生质体单核化技术获得了单核菌株, 试验证明它可用于杂交育种。而亲本的合理选择是杂交育种成败的一个关键环节<sup>[6,7]</sup>。

长期以来, 灵芝杂交育种中亲本菌株的选择主要是根据农艺性状进行选择, 如产量、抗逆性等, 但从对于基质的利用上寻找与基质分解相关的主要酶系, 如漆酶, 纤维素酶等活性对产量影响方面的研究工作不多。尽管育种技术不断发展, 选育方法不断创新, 但具有高基质利用率高酶活等突破性性状的灵芝菌株新品种仍然缺乏<sup>[8]</sup>。

近年来, 灵芝栽培生产的规模不断扩大, 然而在基质利用上低转化率的问题一直没有解决, 高基质

收稿日期: 2014-03-31 接受日期: 2014-09-05

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2011 第 1-2); 国家十二五科技支撑课题(2012BAD36B05)

\* 通讯作者 Tel: 86-21-62200754; E-mail: syja16@saas.sh.cn; tangchuanhong123@163.com

利用率灵芝菌株的选育研究工作开展的也较少。究其原因,可能主要是缺乏好的选育指标而使得这方面的研究工作停滞不前。少有的几篇报道主要研究了栽培过程中关键酶活的变化<sup>[3]</sup>。而通过测定菌丝体在平板上的生长速度,以及在选择性平板上的相对酶活来作为菌株筛选手段的研究鲜有报道<sup>[9]</sup>。因此探索高基质利用率灵芝菌株选育方法的研究具有很强的应用价值和科学价值。本文对 27 株灵芝菌株的菌丝体生长速度,漆酶和纤维素酶的相对活

性进行测定,并结合对其的栽培试验,期望建立这些参数与灵芝产量的关系,为获得高基质利用率灵芝菌株的筛选提供方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

供试 27 株灵芝菌株(表 1)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。

表 1 供试灵芝菌种

Table 1 Strains of *Ganoderma lucidum* used in this study

序号 Serial number	菌株编号 Strain No.	名称 Name	菌株编号 Strain No.	名称 Name	菌株编号 Strain No.
1	G0003	10	G0020	19	G0101
2	G0004	11	G0021	20	G0103
3	G0006	12	G0023	21	G0104
4	G0007	13	G0025	22	G0106
5	G0008	14	G0029	23	G0107
6	G0009	15	G0059	24	G0109
7	G0010	16	G0066	25	G0119
8	G0012	17	G0080	26	G0130
9	G0015	18	G0091	27	G0154

### 1.2 培养基

PDA 培养基:购自美国 Becton, Dickinson and Company,按照 39 g 溶于 1000 mL 蒸馏水的比例配制,121 °C 下灭菌 15 min 后备用。

马铃薯葡萄糖愈创木酚培养基(POD):在 PDA 培养基中加入愈创木酚,使终浓度为 0.04%,121 °C 下灭菌 15 min 后倒平板,备用。

羧甲基纤维素钠培养基(CMC-Na):5 g 羧甲基纤维素钠,1 g MgSO<sub>4</sub>,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,15 g 琼脂,补加蒸馏水至 1000 mL,121 °C 下灭菌 15 min 后备用。

栽培料培养基:60% 棉籽壳,15% 木屑,15% 麸皮,7% 玉米粉,0.5% 蔗糖,2.5% 碳酸钙,料水比为 1:1.3 左右,pH 自然。

### 1.3 菌株的生理生化特征

菌丝体生长速度测定:见参考文献<sup>[10]</sup>,生长第 10 d 时进行测定。漆酶相对活性测定:见参考文献<sup>[11,12]</sup>,生长第 7 d 时进行测定。羧甲基纤维素酶相对活性测定:见参考文献<sup>[13]</sup>生长第 12 d 时进行测定。

### 1.4 出菇试验

见参考文献<sup>[14]</sup>。

### 1.5 数据处理

试验数据采用 DPS v 7.05 和 SPSS 20.0 数据处理软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 灵芝菌株生理生化特征和出菇试验的比较

灵芝菌丝生长速度,漆酶和羧甲基纤维素酶相对活性,及出菇产量分别如表 2 所示,通过差异显著性分析可知:灵芝菌株三类生理生化特征和出菇产量在 5% 显著水平上,均存在差异性显著。灵芝菌丝生长速度最快的是 G0010 和 G0119,均为 1.60 cm/d;菌丝生长速度最慢的是 G0130,为 0.36 cm/d。漆酶相对活性最大的是 G0003 和 G0012,均为 0.85 cm/d;漆酶相对活性最小的是 G0119,为 0.10 cm/d。羧甲基纤维素酶相对活性最大的是 G0119,为 1.32 cm/d;羧甲基纤维素酶相对活性最小的是 G0130,为 0.08 cm/d。出菇产量最高的是 G0119,单袋平均产量为 51.59 g;出菇产量最低的是

G0130,单袋平均产量为 27.80 g。

通过表 2 分析可知,紧紧能够得出每一数据的极值以及数据之间的显著性关系,对于菌丝体生长

速度,漆酶和羧甲基纤维素酶相对活性以及出菇产量之间的关系较难找出规律,因此,需要在此基础上做进一步的深入分析。

表 2 27 株菌株菌丝生长速度,漆酶和羧甲基纤维素酶相对活性及出菇产量显著性分析

Table 2 Significance analysis of mycelial growth rate, laccase relative activity, CMCCase relative activity and yield of single-bag of 27 strains

菌株编号 Strain No.	菌丝体 Mycelial		漆酶 Laccase		羧甲基纤维素酶 CMCase		单袋 Single-bag	
	生长速度 Growth rate (cm/d)	5% 显著水平 5% Significant level	相对活性 Relative activity (cm/d)	5% 显著水平 5% Significant level	相对活性 Relative activity (cm/d)	5% 显著水平 5% Significant level	平均产量 Average yield (g)	5% 显著水平 5% Significant level
G0003	0.47 ± 0.03	jk	0.85 ± 0.03	a	0.24 ± 0.02	m	29.40 ± 2.32	klm
G0004	1.23 ± 0.01	bc	0.33 ± 0.02	lm	0.91 ± 0.03	c	45.54 ± 5.89	abcd
G0006	1.29 ± 0.04	b	0.29 ± 0.06	mn	0.93 ± 0.03	c	46.48 ± 2.15	abc
G0007	1.54 ± 0.02	a	0.17 ± 0.05	op	0.96 ± 0.03	c	44.24 ± 4.03	abcde
G0008	0.69 ± 0.01	hi	0.74 ± 0.04	bcd	0.45 ± 0.04	hi	32.76 ± 1.50	hijklm
G0009	0.74 ± 0.01	hi	0.76 ± 0.03	abc	0.40 ± 0.02	ijk	32.04 ± 1.14	ijklm
G0010	1.60 ± 0.04	a	0.44 ± 0.03	ijk	0.81 ± 0.03	d	45.07 ± 3.31	abcd
G0012	0.67 ± 0.04	hi	0.85 ± 0.03	a	0.34 ± 0.04	jkl	29.42 ± 1.85	klm
G0015	0.75 ± 0.03	hi	0.71 ± 0.08	bede	0.42 ± 0.08	hij	30.65 ± 3.03	jklm
G0020	1.12 ± 0.03	cdef	0.43 ± 0.03	jk	0.75 ± 0.03	de	42.43 ± 5.88	bedefg
G0021	0.67 ± 0.02	hi	0.65 ± 0.04	def	0.44 ± 0.02	hi	29.50 ± 5.07	jklm
G0023	1.15 ± 0.03	bede	0.56 ± 0.03	fgh	0.59 ± 0.06	g	38.24 ± 3.36	defghi
G0025	0.66 ± 0.08	i	0.75 ± 0.03	abc	0.32 ± 0.02	klm	32.33 ± 3.06	ijklm
G0029	0.60 ± 0.03	ij	0.78 ± 0.03	ab	0.31 ± 0.03	lm	28.37 ± 3.39	lm
G0059	1.16 ± 0.01	bede	0.51 ± 0.06	hij	0.69 ± 0.06	ef	39.87 ± 3.09	cdefgh
G0066	0.83 ± 0.02	gh	0.62 ± 0.03	efg	0.40 ± 0.03	ijk	30.35 ± 3.79	jklm
G0080	0.83 ± 0.01	gh	0.67 ± 0.08	cde	0.58 ± 0.08	g	34.96 ± 4.98	ghijklm
G0091	0.96 ± 0.02	fg	0.56 ± 0.05	fgh	0.61 ± 0.01	fg	35.34 ± 3.31	ghijkl
G0101	1.03 ± 0.03	def	0.52 ± 0.06	hij	0.48 ± 0.02	hi	36.44 ± 2.58	fghijk
G0103	0.96 ± 0.04	fg	0.41 ± 0.03	kl	0.71 ± 0.02	e	36.93 ± 2.35	efghij
G0104	1.17 ± 0.01	bcd	0.30 ± 0.03	mn	0.79 ± 0.03	d	43.18 ± 2.11	bedef
G0106	1.01 ± 0.02	ef	0.53 ± 0.09	ghi	0.45 ± 0.09	hi	36.09 ± 4.02	fghijk
G0107	0.63 ± 0.03	ij	0.67 ± 0.07	cde	0.49 ± 0.07	h	31.83 ± 3.13	ijklm
G0109	1.51 ± 0.06	a	0.20 ± 0.06	no	1.11 ± 0.06	b	49.85 ± 5.72	ab
G0119	1.60 ± 0.05	a	0.10 ± 0.06	p	1.32 ± 0.06	a	51.59 ± 3.36	a
G0130	0.36 ± 0.02	k	0.80 ± 0.03	ab	0.08 ± 0.04	n	27.80 ± 1.91	m
G0154	0.66 ± 0.02	i	0.65 ± 0.05	def	0.62 ± 0.06	fg	32.38 ± 3.58	ijklm

## 2.2 灵芝菌株菌丝体生长速度,漆酶相对活性和羧甲基纤维素酶相对活性与产量的关系

27 株菌株在 PDA 平板上的菌丝生长速度与产量的关系如图 1 所示。从图 1 可以看出,27 株菌株

的菌丝生长速度与单袋平均产量之间的相关系数  $R^2 = 0.8923$ ,表明菌丝生长速度与产量有较高的正相关,说明菌丝生长速度可作为预测菌株产量的一个指标。菌丝生长速度高的菌株,其灵芝的单袋平

均产量则较高。因此,可以用 PDA 平板上的菌丝生长速度作为预测菌株产量的一个指标。

对 27 株菌株的漆酶相对活性与单袋平均产量之间的相关性进行分析,结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,27 株菌株的漆酶相对活性与单袋平均产量之间的相关系数  $R^2 = 0.8771$ ,表明二者之间存在较高的线性相关。漆酶相对活性高的菌株,其灵芝的单袋平均产量则较低。因此,漆酶相对活性可以

作为预测菌株产量的一个指标。

对 27 株菌株的羧甲基纤维素酶相对活性与单袋平均产量之间的相关性进行分析,结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,27 株菌株的羧甲基纤维素酶相对活性与单袋平均产量之间的相关系数  $R^2 = 0.8979$ ,表明二者之间存在较高的线性相关。因此,羧甲基纤维素酶相对活性的高低可以作为预测菌株产量的一个指标。

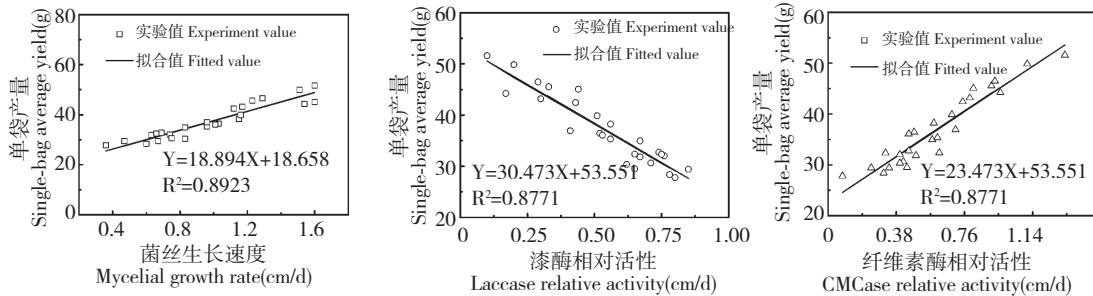


图 1 菌丝生长速度,漆酶相对活性和羧甲基纤维素酶相对活性与产量的关系

Fig. 1 The relationship between yield and mycelial growth rate, laccase relative activity, CMCase relative activity, respectively

### 2.3 灵芝菌株产量的多元线性回归模型构建

上述研究说明了菌株产量分别与菌丝生长速度,漆酶和羧甲基纤维素酶相对活性之间独立的两两之间的关系,为了进一步阐明 27 株菌株产量与菌丝生长速度,漆酶和羧甲基纤维素酶相对活性三者的内在联系,在上述研究的基础上利用多元线性回归分析方法对它们之间进行分析。多元线性回归分析是整体性的分析各解释变量的影响程度,并决定具有代表性的指标对灵芝产量的解释能力。以灵芝产量作为因变量,以菌丝生长速度,漆酶相对活性和羧甲基纤维素酶相对活性作为自变量,建立多元线性数学模型,模型公式如公式(1)所示。

$$C_{Yield} = B_0 + B_1 C_{PDA} + B_2 C_{POD} + B_3 C_{CMC} \quad (1)$$

其中: $C_{Yield}$ 是灵芝单袋产量(g), $C_{PDA}$ 是菌丝生长速度(cm/d), $C_{POD}$ 是漆酶相对活性(cm/d), $C_{CMC}$

是羧甲基纤维素酶相对活性(cm/d)。

运用 SPSS 20.0 软件进行多元线性回归分析,具体结果如表 3 所示。由表 3 可知,羧甲基纤维素酶相对活性,菌丝生长速度和漆酶相对活性对产量的贡献程度依次递减,这些变量具有显著的统计学意义。根据回归模型,可以得到产量与菌丝生长速度,漆酶和羧甲基纤维素酶相对活性的数学模型,线性方程如公式(2)所示。

$$C_{Yield} = 26.019 + 8.302C_{PDA} - 5.831C_{POD} + 10.013C_{CMC} \quad (2)$$

所有的指标中对产量贡献最大的是羧甲基纤维素酶相对活性,接下来分别是菌丝生长速度和漆酶相对活性。因此,可以根据此模型来快速筛选出高产且酶活高的灵芝菌株。

表 3 27 株菌株产量和生理生化指标关系的多元线性回归分析结果

Table 3 Results of multivariate linear regression analysis across yield and physiological and biochemical indexes of 27 strains

因变量 Dependent variable	自变量 Independent variable	回归系数 Regression coefficient	$R^2$
产量 Yield ( $C_{Yield}$ )	常数项 Constant term ( $B_0$ )	26.019	0.943
	菌丝生长速度 Mycelial growth rate ( $C_{PDA}$ )	8.302	
	漆酶相对活性 Laccase relative activity ( $C_{POD}$ )	-5.831	
	羧甲基纤维素酶相对活性 CMCase relative activity ( $C_{CMC}$ )	10.013	

### 3 讨论

在灵芝的杂交育种中,常通过同工酶分析<sup>[15]</sup>、配合力分析<sup>[16]</sup>以及多个与产量和质量相关的经济性状的测定来估算遗传距离大小,选择杂交亲本,通过出菇试验最终筛选获得具有杂交优势的优良菌株。王庆武、兰玉菲等通过对 17 个不同灵芝菌株的农艺性状、子实体形态特征、产量等进行综合分析比较,得出灵芝 P1 芝片大而厚可用于盆景栽种;泰灵 Y、日本赤芝及南灵 I 号芝片大小比较适中,可用于盆景和药用等<sup>[17]</sup>。林兴生、李开本等从 28 个灵芝菌株栽培特性比较中得到韩 1、韩 3 等几个具有生长周期短,子实体形态好,产量高,产孢子量大等良好的综合栽培性状的菌株<sup>[18]</sup>。肖自添等也从原基形成时间、单芝产量、菌丝生长等方面对 28 个灵芝菌株进行了研究,并得到了较好的效果<sup>[19]</sup>,研究表明日平、信州等为高产菌株,而美灵、合立更适合早产栽培<sup>[20]</sup>。以上的研究均是以栽培试验为基础,通过最终的结果来选育合适的菌株。这些选育方法需经过繁琐、周期较长的栽培试验,对于当前灵芝菌株的选育显得很滞后。根据以上的研究报道,为了建立一种省时高效的选育方法,本文通过测定 27 株灵芝菌株的菌丝生长速度,漆酶和纤维素酶的相对活性,分别建立了它们与产量的关系。并通过多元线性回归的方法将三个指标与产量的关系量化。结果表明,这些指标与产量之间有较高的线性相关,可用这些指标来预测菌株的产量,不需经过繁琐、周期较长的出菇试验,为灵芝杂交育种中亲本的选择建立了一个模式。用这种模式来选择灵芝杂交育种中的亲本,具有简便、快速的优点,可以缩短杂交育种的周期。

#### 参考文献

- 1 Shao LP (邵力平), Shen RX (沈瑞祥), Zhang SX (张素轩). *Fungal Taxonomy (真菌分类学)*. Beijing: China Forestry Publishing House, 1983. 1-3.
- 2 Raudaskoski M, Kothe E. Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. *Eukaryot Cell*, 2010, 9: 847-859.
- 3 Chen ST (陈世通), Li RC (李荣春). Present research on breeding methods of edible fungi and the problems in it as well as the prospects. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2012, 40: 5850-5852.
- 4 Liu RM, Zhong JJ. Ganoderic acid Mf and S induce mitochondrial mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa

- cells. *Process Biochem*, 2011, 18: 349-355.
- 5 Wu XP (吴小平), Liu F (刘方), Xie YR (谢玉荣), et al. Hybridization of *Ganoderma lucidum* by protoplast monokaryogenesis method. *Chin Agric Sci Bull (中国农学通报)*, 2009, 25(23): 64-69.
- 6 Cao Y, Wu SH, Dai YC. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi". *Fungal Divers*, 2012, 56: 49-62.
- 7 van der Nest MA, Slippers B, Stenlid J, et al. Characterization of the systems governing sexual and self-recognition in the white rot homobasidiomycete *Amylostereum areolatum*. *Current Genetics*, 2008, 53: 323-336.
- 8 Li CF. Quiros Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- 9 Chen YX (陈裕新), Xia ZL (夏志兰), Liu P (刘鹏), et al. Mating genotype analysis of *Ganoderma lucidum* populations. *Agric Sci Tech (中国农学通报)*, 2012, 28: 213-218.
- 10 Jiang YJ (江玉姬), Zhao SG (赵书光), Xie BG (谢宝贵), et al. Model of selecting parent strains for *Flammulina velutipes* hybridization breeding. *J Fujian Agric Forest Univ, Nat Sci (福建农林大学学报, 自科版)*, 2010, 39: 403-408.
- 11 Wang YL (王宜磊), Zhu T (朱陶), Deng ZX (邓振旭). Using O-methoxyphenol to fast screen laccase produced fungus. *Biotechnology (生物技术)*, 2007, 17: 40-42.
- 12 Wang H (王华), Liu XG (刘小刚), Luo H (罗华), et al. Screening of lignin-degrading fungi and study of lignin degradation of vineyard pruning. *Acta Agric Boreali-occidentalis Sin (西北农业学报)*, 2009, 18: 302-305.
- 13 Zhang P (张萍), Liang JG (梁建光), Yang LH (杨立红), et al. The research in biological characteristics of different strains of *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) sing. *Edible Fungi of China (中国食用菌)*, 2005, 24: 17-19.
- 14 Zhang LW (张利文). Cultivation technology of *Ganoderma lucidum*. *Cultiv Tech (栽培技术)*, 2002, 1: 17.
- 15 Lin FX (林范学), Cheng SM (程水明), Lin FC (林芳灿). Determination of combining ability of monokaryonic parents with different mating type in *Lentinula edodes*. *J Huazhong Agric Univ (华中农业大学学报)*, 2004, 23: 519-523.
- 16 Bok JW, Choi EC, Kim BK. Studies on protoplast fusion between *Lentinula edodes* and *Ganoderma lucidum*. *Arch Pharm Res*, 1994, 17: 492-496.