

研究报告

一种高富硒平菇的紫外诱变筛选及其营养强化的应用

孙举志, 李红英, 陈菲菲, 覃大吉, 问小龙, 邹迎春*

恩施土家族苗族自治州农业科学院, 湖北 恩施 445000

孙举志, 李红英, 陈菲菲, 覃大吉, 问小龙, 邹迎春. 一种高富硒平菇的紫外诱变筛选及其营养强化的应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2368-2380.

SUN Juzhi, LI Hongying, CHEN Feifei, QIN Daji, WEN Xiaolong, ZOU Yingchun. Screening of a selenium-enriching strain of *Pleurotus ostreatus* by ultraviolet mutagenesis and its application in nutrient enrichment[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2368-2380.

摘要:【背景】食用菌在自然状态下进行富硒培养难以达到硒营养强化的国家标准。【目的】通过紫外诱变技术筛选对硒具有高效富集和转化能力的菌株, 以提高其硒含量, 为富硒食用菌营养强化剂的产品开发奠定基础。【方法】通过硒抗性筛选, 确定诱变的出发菌株, 对其紫外辐照诱导发生变异, 并根据菌丝生长速率、子实体生物学效率、总硒和有机硒含量综合评估诱变菌株的优良特性。【结果】在硒浓度 100 mg/kg 和 120 mg/kg 的袋料栽培基质中诱变菌株 120-5 菌丝的生长速率分别为 1.27 cm/d 和 1.19 cm/d, 子实体总硒量分别为 199.77 mg/kg 和 224.15 mg/kg, 有机硒量分别为 198.83 mg/kg 和 223.56 mg/kg, 占总硒量 99.53%和 99.74%, 其硒含量均达到了富硒食用菌营养强化剂的国标要求。出发菌株 qiu-2020 在硒浓度 100 mg/kg 和 120 mg/kg 基质中的菌丝生长速率分别为 1.02 cm/d 和 0.88 cm/d, 在 120 mg/kg 时, 总硒量最高达 166.53 mg/kg, 仍低于国标要求。诱变菌株和出发菌株的子实体生物学效率在硒浓度 120 mg/kg 时分别为 92%和 77%, 两菌株的子实体农艺性状未发生变化。全基因组重测序分析表明, 菌株 120-5 在基因组上发生了单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、插入或缺失(insertion-deletion, InDel)以及基因组结构变异(structure variation, SV)。【结论】菌株 120-5 在基因组信息上发生了有效突变, 而且表现出强大的富硒能力, 可以作为硒营养强化的目标菌株。

关键词: 平菇; 紫外诱变; 富硒; 营养强化; 生物学效率

资助项目: 武汉市对口帮扶恩施项目(12602-2-120); 恩施州农科院青年创新基金(2022-005)

This work was supported by the Wuhan Counterpart Help Enshi Project (12602-2-120) and the Project of Youth Innovation Fund in Enshi Autonomous Prefecture Academy of Agricultural Sciences (2022-005).

*Corresponding author. E-mail: 18972438978@163.com

Received: 2023-10-07; Accepted: 2023-12-07; Published online: 2024-02-02

Screening of a selenium-enriching strain of *Pleurotus ostreatus* by ultraviolet mutagenesis and its application in nutrient enrichment

SUN Juzhi, LI Hongying, CHEN Feifei, QIN Daji, WEN Xiaolong, ZOU Yingchun*

Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Academy of Agricultural Sciences, Enshi 445000, Hubei, China

Abstract: [Background] The cultivation of selenium-enriching edible fungi in their natural habitats often fails to meet the national standards for nutrient enrichment. [Objective] To screen out a selenium-enriching strain of *Pleurotus ostreatus* by ultraviolet mutagenesis, so as to provide a foundation for the product development with selenium-enriching edible fungi. [Methods] The strain to be mutated was determined by selenium resistance examination and then exposed to ultraviolet irradiation. The mycelial growth rate and the biological efficiency, total and organic selenium content of fruiting bodies were determined to evaluate the performance of the mutant strain. [Results] In the media with 100 mg/kg and 120 mg/kg selenium, respectively, the strain 120-5 showed the mycelial growth rates of 1.27 cm/d and 1.19 cm/d and the total selenium content of 199.77 mg/kg and 224.15 mg/kg in the fruiting bodies of 120-5. The organic selenium content in the fruiting bodies in the two treatments reached 198.83 mg/kg and 223.56 mg/kg, accounting for 99.53% and 99.74% of the total selenium, respectively. These values met the national standards for nutrient enrichment. However, in the media with 100 mg/kg and 120 mg/kg selenium, the original strain qiu-2020 showed the mycelial growth rates of 1.02 cm/d and 0.88 cm/d, respectively. It is noteworthy that in the medium with 120 mg/kg selenium, the original strain achieved the highest selenium content of 166.53 mg/kg, which fell short of the national standards. In the presence of 120 mg/kg selenium, the biological efficiency of the mutant strain and the original strain reached 92% and 77%, respectively. Remarkably, the agronomic traits of both the mutant and original strains remained unaltered. The whole-genome resequencing results unveiled single nucleotide polymorphism (SNP), insertion-deletion (Indel), and structure variation (SV) between the mutant and original strains. [Conclusion] The strain 120-5 with significant genomic mutations showcased a robust capacity of selenium enrichment, serving as a compelling candidate for nutrient enrichment.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; ultraviolet mutagenesis; selenium enrichment; nutrient enrichment; biological efficiency

硒是一种必需微量元素,是生物体内多种酶的重要活性中心的关键组分,具有抗肿瘤、增强免疫力、抗氧化平衡等生物学功能,对于维持人体的正常生理功能具有重要作用^[1-2]。富硒食用

菌作为一种富含硒元素的健康食品,不仅保留了菌类食物的独特风味和纹理,还在硒元素的富集方面表现出色,对于人体的免疫调节、抗氧化和心血管健康,以及抵御氧化应激和预防慢性疾病

等方面具有重要作用^[3]。然而,传统的富硒食品存在产品形式单一、营养附加值低、核心竞争力弱等相关问题,而且市场还存在盲目跟风开发富硒产品的现象。普通富硒食用菌的产业发展因为生产技术受限和营养附加值不高而停滞不前。因此,开发富硒食用菌营养强化剂,使普通富硒产品的硒含量提升到营养强化剂的国家标准是提高硒产品营养附加值的有效途径,在硒食品精深加工方面有着广阔的应用前景。

富硒食用菌营养强化剂,作为融合生物学、营养学和食品科技的创新领域,在人类健康和营养改善方面具有巨大潜力,相比传统富硒食用菌具有营养价值高、产品用途广、经济效益高等优点^[4-5]。本研究以广泛消费的食用菌品种平菇(*Pleurotus ostreatus*)为对象,开展富硒食用菌营养强化剂的研究与应用。然而,未经驯化筛选的食用菌在硒富集方面均存在一定的局限性,硒含量难以达到相关标准,本研究旨在探索通过紫外诱变技术筛选获得高富硒平菇的可行性,为硒营养强化剂的产品开发和栽培生产提供优质菌株。

1 材料与方法

1.1 样品

高丰 428 (gao-428)、广抗 0411 (guang-0411)、秋美 2020 (qiu-2020)这 3 种平菇由山东省寿光市食用菌研究所提供,平菇 bio-52347 购自中国微生物菌种工程中心。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基参考文献[6]配制。加富 PDB 培养基(g/L): 葡萄糖 20.00, 蛋白胨 5.00, KH_2PO_4 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, 维生素 B1 0.05, pH 6.3。平菇袋料栽培配方(质量分数): 棉籽壳 49%, 玉米芯 30%, 麦麸 10%, 木屑 10%, 石灰 1%。

1.3 主要试剂和仪器

亚硒酸钠(Na_2SeO_3), 山东西亚化学工业有限公司。液相色谱原子荧光联用仪, 北京宝德仪器有限公司; 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 双层振荡培养箱, 金坛精达仪器制造有限公司; 人工气候箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 洁净工作台, 苏州净化设备有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司。

1.4 菌种的硒抗性筛选

采用浓度梯度法进行硒耐受性试验, 分别设置 0、2、4、6、8、10 mg/kg 的硒浓度梯度, 不添加硒(0 mg/kg)的实验组设为对照。将菌株 gao-428、guang-0411、qiu-2020 和 bio-52347 这 4 个平菇菌种分别接种到含 2 mg/kg 硒的固体培养基, 22 °C 恒温培养 7 d 后再转接到 4 mg/kg 硒的固体培养基培养。按照此方法逐级驯化, 探究不同菌株对硒的耐受能力, 每个梯度重复 5 组。以菌丝的生长速率为生长情况指标选择硒抗性强的菌株作为诱变的出发菌株。

1.5 紫外诱变

将出发菌株接种于加富 PDB 培养基, 菌丝面朝上, 26 °C 静置培养 12 d, 放入振荡培养箱, 170 r/min 振荡 15 min 充分摇碎菌丝, 经 0.5 cm 灭菌脱脂棉过滤, 收集菌丝悬液。用无菌水将菌丝悬液稀释 10 倍, 各吸取 5 mL 加入平板(直径 90 mm), 暴露在 20 W、253.7 nm 紫外灯下 30 cm 处, 分别照射 0、40、80、120、160、200、240、280 s, 每个水平 3 个平行, 为避免光复活现象, 整个辐照过程在暗室下的洁净工作台进行。辐照后各吸取 200 μL 菌悬液涂布于 PDA 培养基, 置于温度 22 °C、湿度 60% 生化培养箱避光培养。于 7 d 后观察, 记录菌落数并计算致死率, 根据菌株致死率选择最佳诱变时间。

致死率(%) = (对照组每 0.2 mL 菌落数 - 紫外

照射后每 0.2 mL 菌落数)/对照组每 0.2 mL 菌落数 $\times 100$ 。

1.6 诱变菌株的初筛

取经紫外照射 120 s 的菌悬液 200 μ L 涂布于含有 10 mg/kg 硒的 PDA 培养基, 未经紫外照射的设为对照, 做 3 个平行, 置于温度 22 $^{\circ}$ C、湿度 60% 的生化培养箱培养 25 d (单根菌丝繁殖形成菌落需要较长时间), 挑选 5 个菌落大、生长快、菌丝浓密、色泽正常的单菌落, 从每个菌落边缘挑取尖端菌丝转接到含 10 mg/kg 硒的 PDA 培养基, 每个处理做 3 个平行。通过测试这 5 个菌株的硒耐受能力, 选择硒耐受性较强的 3 个菌株进行复筛。

1.7 诱变菌株的复筛

将初筛得到的 3 个菌株接种到含 4 mg/kg 硒的加富 PDB 培养基, 25 $^{\circ}$ C、130 r/min 振荡培养 10 d, 测定菌丝生物总量、总硒含量。以菌丝生物量和硒含量为指标筛选生长能力和聚硒能力最强的菌株用于后续的富硒栽培试验。

1.8 诱变菌株的出菇实验

按照 1.2 中平菇袋料栽培的配比称取原料, 将 Na_2SeO_3 溶于水配制成一定浓度的硒溶液, 共设置 0、20、40、60、80、100、120 mg/kg 这 7 个硒浓度, 按照料水比 1:1.3 添加硒溶液到原料, 搅拌均匀, 闷堆 24 h 后装袋(14 cm \times 28 cm 聚丙烯塑料袋), 平均每袋装干物质 270 g, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 1 h 后冷却, 次日接种。

1.9 平菇菌丝生长速率的测定

采用“十”字交叉法测量菌丝生长速率。从平板底部划十字形, 垂直交叉测量菌落直径, 二者取平均值, 生长速率(cm/d)=平均直径(cm)/生长时间(d)。选择菌袋测量时, 从菌丝封面的位置开始向底部测量, 到菌丝延伸的顶端位置为伸长部分, 菌袋两侧对称位置各测量 1 次, 二者取平均值, 菌丝生长速率计算方法同上。

1.10 菌丝和子实体干质量计算

将摇瓶中的发酵液用布氏漏斗过滤, 收集菌球, 用超纯水反复冲洗 3 次, 以去除菌球表面的发酵液, 清洗干净后将菌球沥干, 然后平铺在滤纸表面, 吸干多余的水分, 最后放入冷冻干燥机, 真空冷冻干燥 2 d, 称重。子实体采收后直接放入恒温干燥箱, 55 $^{\circ}$ C 烘干 3 d, 称重。

1.11 总硒和有机硒检测

总硒检测参照食品安全国家标准 GB 5009.93—2017^[7], 按照氢化物原子荧光光谱法测定无机硒含量, 再由总硒减去无机硒即得有机硒含量, 进而计算出有机硒的百分比。根据 GB 1903.22—2016^[8]要求用以检测的样品为干粉, 因此, 采收的鲜菇均经过 55 $^{\circ}$ C 烘干后用粉碎机粉碎。

1.12 出发菌株和诱变菌株的基因组重测序

对出发菌株和诱变菌株两个样本进行全基因组重测序, 选择 GCA_029852705.2 作为近缘参考基因组, 通过 BWA v0.7.17 和 SAMTOOLS v1.7 软件, 将测序数据与参考基因组进行序列比对分析, 获得测序覆盖情况, 判断样品与参考序列的近缘情况。通过重测序获得目标微生物基因组的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)插入或缺失(insertion-deletion, InDel)以及基因组结构变异(structure variation, SV)一系列变异信息, 重测序及分析依托广东美格基因科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 不同平菇菌株的硒抗性筛选

在硒浓度为 0, 即无硒培养条件下, qiu-2020 菌丝生长速度最快, gao-428 和 guang-0411 次之, bio-52347 生长速度最慢(图 1)。随着硒浓度的增加, 在低浓度 2 mg/kg 时菌丝生长开始受到抑制, 当增加到 4 mg/kg, qiu-2020 和 gao-428 菌丝生长的抑制效应并未加强, 相较于 2 mg/kg 处理组

无显著性变化,而 *guang-0411* 和 *bio-52347* 菌丝的生长能力还有所恢复。当浓度增加到 6 mg/kg, *guang-0411*、*bio-52347* 和 *gao-428* 这 3 个菌株菌丝的生长速率相较于 4 mg/kg 并无显著变化, *qiu-2020* 的生长速率有所恢复,与对照组保持相当水平。当处理浓度为 8 mg/kg, 以上 4 个菌株的菌丝生长均受到明显的抑制,继续加大浓度到 10 mg/kg, 抑制进一步增强。在低硒和高硒浓度条件下 *qiu-2020* 生长速度均保持最大值,对硒表现出强大的耐受力,因此选择 *qiu-2020* 作为紫外诱变的出发菌株。

综上所述,高浓度硒对菌丝生长有强烈的抑制效应,低浓度硒对菌丝有轻微的抑制效应。但在较低的浓度范围(0–6 mg/kg),逐渐增加硒的浓度,菌丝的生长速率不会逐渐减小,即菌丝的生长速率与硒浓度之间不存在严格的负相关关系。这说明菌丝对硒浓度的生长响应存在一定的自我调节能力,这种自我调节反映了生物体对外部环境压力的适应性。

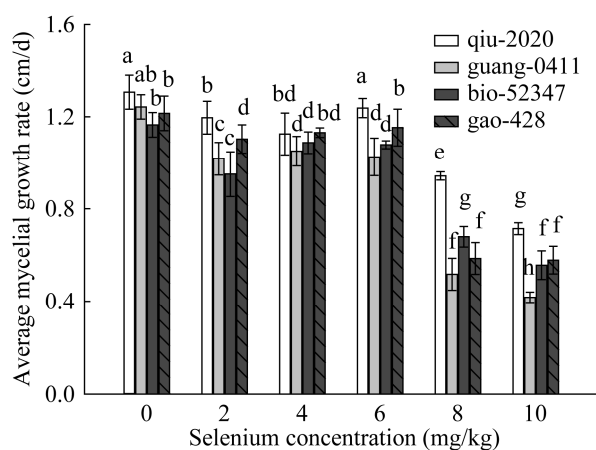


图 1 菌株在不同硒浓度的固体培养基中的菌丝生长速率 数据为平均值±标准差($n=5$); 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下同

Figure 1 The mycelial growth rate under different concentration of selenium treatment in solid medium. Values are means±SD ($n=5$); Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same below.

2.2 通过致死率确定紫外诱变的最佳强度

将出发菌株 *qiu-2020* 分别照射 0、40、80、120、160、200、240、280 s, 其存活率分别为 100%、71.40%、37.37%、16.17%、14.49%、12.82%、11.15%、8.37% (图 2)。在 120 s 之前存活率随着照射时间增加呈急剧下降趋势, 120 s 后下降变得缓慢, 直至 280 s 时存活率最低。根据前人的研究报道, 致死率为 85% 左右(即存活率 15% 左右)发生突变的概率最大^[9], 因此 120、160、200 s 均可作为适宜的照射时间。从整个存活率的变化趋势可以看出 120 s 为一个时间拐点, 因此, 最终选择 120 s 为最佳的处理时间, 以使菌株更大可能地发生正向突变。

2.3 诱变菌株的筛选结果

通过在含 10 mg/kg 硒的 PDA 培养基测试菌丝的生长能力, 获得了硒耐受力较强的菌株, 初筛结果详见图 3。菌株 120-5 菌丝生长最快, 其次为 120-2, 而 120-1、120-3、120-4 以及 *qiu-2020* 的菌丝生长相对较慢, 120-1 相对于 120-3、120-4 以及 *qiu-2020* 表现出较强的生长能力, 但差异不显著。综合考虑选择 120-5、120-2、120-1 为候选菌株, 用于下一步的复筛。

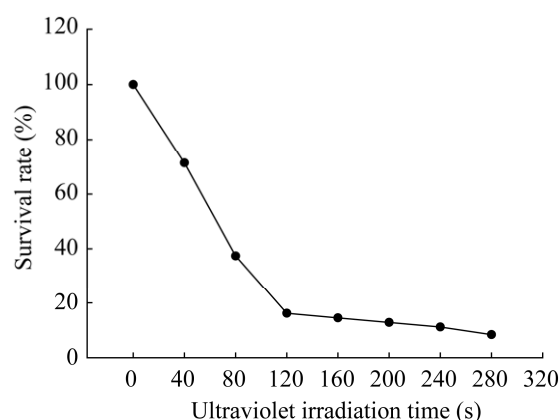


图 2 不同紫外照射时间下菌株的存活率

Figure 2 The survival rate of strain under different ultraviolet irradiation time.

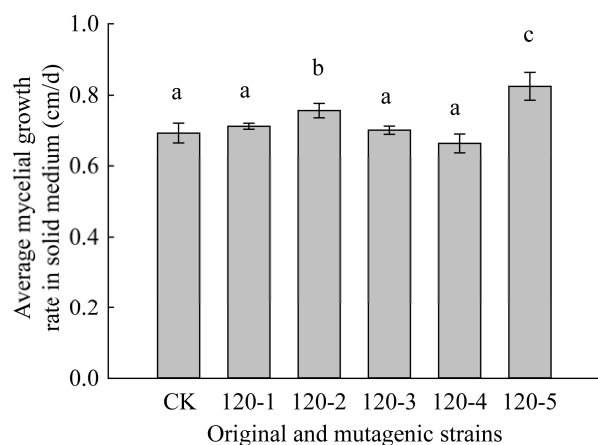


图 3 出发菌株和不同诱变菌株在硒固体培养基中的菌丝生长速率 CK: 出发菌株 qiu-2020, 下同
Figure 3 The mycelial growth rate of original strain and different mutagenic strains in solid medium with selenium. CK: Original strain qiu-2020. The same below.

对以上候选菌株进行富硒液体培养, 测试在不同培养环境下菌丝的生长力和硒富集力。qiu-2020、120-1、120-2、120-5 菌丝的干质量分别为 0.51、0.52、0.58、0.62 g, 其中菌株 120-5 菌丝生物量最大, 对照组菌株 qiu-2020 和 120-1 的生物量最低(图 4)。进一步检测菌丝体的总硒含量, 结果如图 5 所示, 菌株 qiu-2020、120-1、

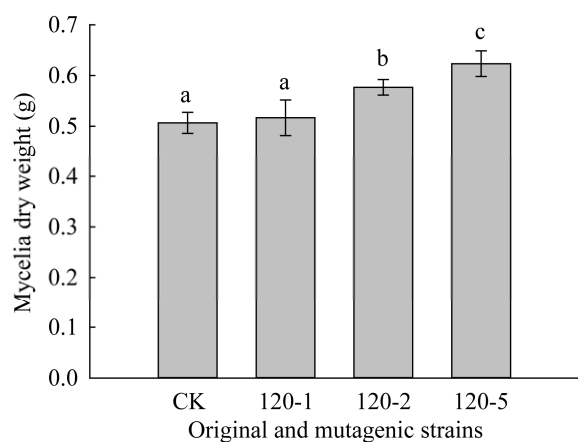


图 4 出发菌株和不同诱变菌株通过富硒液体培养获得的菌丝干质量

Figure 4 The dry mass of mycelia obtained by selenium-enriched liquid culture with original strain and different mutagenic strains.

120-2、120-5 的硒含量分别为 1 514、1 637、1 660、1 670 mg/kg, 诱变组菌株的硒含量相比对照组都具有显著性差异, 表现出较强的硒富集力, 其中 120-5 硒含量最高, 诱变组之间菌株 120-1、120-2、120-5 无显著性差异。鉴于固液两次富硒驯化培养菌株 120-5 均表现出优异的硒耐受力和富集力, 因此, 确定菌株 120-5 为诱变所得的目标菌株。

2.4 出发菌株和诱变菌株在菌丝生长阶段的差异

如图 6 所示, 出发菌株 qiu-2020 和诱变菌

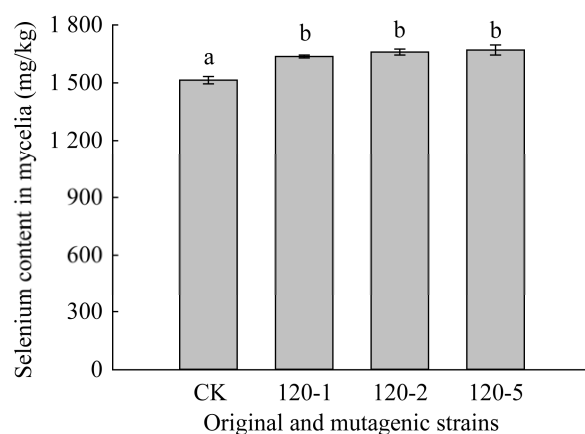


图 5 出发菌株和不同诱变菌株菌丝体的总硒含量
Figure 5 The total selenium in mycelia of original strain and different mutagenic strains.

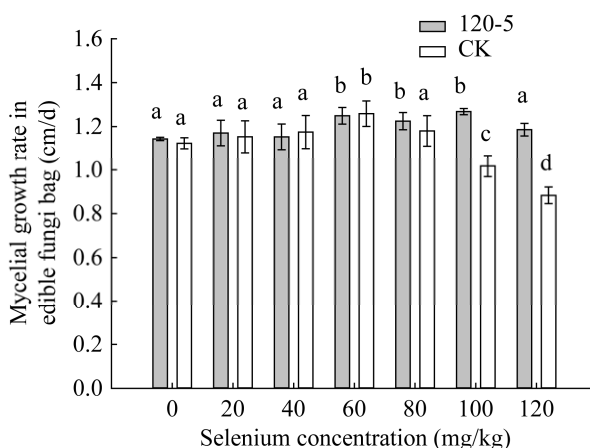


图 6 不同硒浓度菌袋中菌丝的生长速率
Figure 6 The mycelial growth rate in different concentration of selenium within edible fungi bag.

株 120-5 在 20 mg/kg 和 40 mg/kg 含硒基质中的菌丝生长速率相比无硒条件下无明显变化,说明低浓度硒对菌丝的生长无显著影响。当硒浓度为 60 mg/kg 时, qiu-2020 和 120-5 的生长速率都有所增加, 而且二者之间保持相近的生长速率, 分别为 1.26 cm/d 和 1.25 cm/d; 随着浓度升高至 80、100、120 mg/kg, 对照 qiu-2020 的菌丝生长速率逐渐减小, 到 120 mg/kg 时达到最低, 为 0.88 cm/d; 菌株 120-5 在硒浓度 80 mg/kg 和 100 mg/kg, 菌丝的生长速率与 60 mg/kg 时保持相当水平, 仍然表现出强劲的生长力, 而且在 100 mg/kg 达到最大值 1.27 cm/d; 当硒浓度升高至 120 mg/kg, 菌株 120-5 菌丝的生长速率开始下降, 但与无硒条件下保持在相同水平。综上可知, 随着硒浓度的增加, 出发菌株 qiu-2020 的生长速率整体表现出低浓度不变、中间浓度升高、高浓度下降的趋势。菌株 120-5 在硒浓度 80、100、120 mg/kg 时菌丝生长速率均显著高于 qiu-2020, 由此可见, 菌株 120-5 相比出发菌株在袋料中仍具有较强的耐硒能力, 有实际的生产应用价值。

2.5 出发菌株和诱变菌株在子实体生长阶段的差异

经过菌丝的培养阶段, 子实体逐渐发育成熟, 本研究统计分析了在无硒生长条件下出发菌株和诱变菌株的农艺性状, 具体统计结果如表 1 所示, 2 个菌株的菌盖直径、菌盖厚度、菌柄长度、菌柄直径均无显著差异, 菇体含水量均保持在 84% 左右, 由此可知, 诱变菌株 120-5 在农艺性状上并未发生变化, 与出发菌株在表型上保持一致。

生物学效率是食用菌对栽培原料的利用和转化能力的体现, 也是衡量子实体产量的直接指标。如图 7 所示, 随着硒浓度的升高, 菌株 120-5 在 0–120 mg/kg 硒浓度范围内子实体的生物学效率均未发生显著变化, 也即子实体产量无明显变化; 菌株 qiu-2020 在 0–100 mg/kg 硒浓度

范围内生物学效率未发生显著改变, 且该浓度范围内两菌株之间的生物学效率均无明显差异; 当硒浓度为 120 mg/kg 时, 菌株 qiu-2020 和 120-5 的生物学效率分别为 77% 和 92%, 菌株 qiu-2020 的生物学效率显著下降。说明在高硒浓度下, 菌株 120-5 依然保持了较强的耐硒能力, 而菌株 qiu-2020 由于耐硒能力相对较弱, 子实体的生长开始受到抑制。

表 1 出发菌株和诱变菌株的农艺性状比较

Table 1 The comparison of agronomic characters between original and mutant strains

农艺性状 Agronomic characters	菌株 Strain	
	qiu-2020	120-5
菌盖直径 Pileus diameter (cm)	8.783±0.207a	8.669±0.266a
菌盖厚度 Pileus thickness (cm)	0.619±0.146b	0.639±0.142b
菌柄长度 Stipe length (cm)	4.417±0.366c	4.585±0.501c
菌柄直径 Stipe diameter (cm)	0.714±0.090d	0.743±0.098d
鲜重/袋 Fresh weight (g)	246.083±14.652e	250.628±13.109e
干重/袋 Dry weight (g)	40.209±3.760f	40.498±4.273f
菇体含水量 Water content (%)	83.622±1.650g	84.090±1.368g

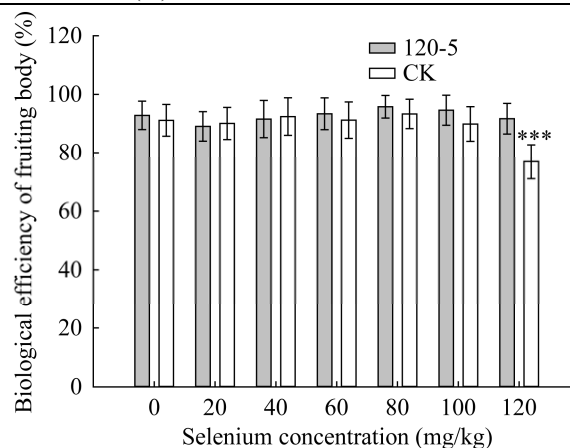


图 7 不同硒浓度培养条件下子实体的生物学效率
Figure 7 The biological efficiency of fruiting body under different concentration of selenium treatment.
***: $P < 0.001$.

2.6 子实体中总硒和有机硒含量的检测分析

硒通过食用菌菌丝体吸收和转化后在食用菌的子实体中得到累积。子实体总硒的检测分析表明,随着硒处理浓度的升高,其总硒含量呈现上升趋势,子实体硒含量与硒处理浓度之间呈现正相关性(图 8)。其中菌株 120-5 在每个浓度下总硒含量都高于对照组 qiu-2020,而且在 100、120 mg/kg 硒浓度下,120-5 的总硒含量分别为 199.77 mg/kg 和 224.15 mg/kg,符合国标要求。国标(GB1903.22—2016)规定,富硒食用菌作为营养强化剂的标准为 $180 \leq \text{总硒} < 400 \text{ mg/kg}$,有机硒占比 $\geq 98\%$ ^[8]。然而,菌株 qiu-2020 在硒处理浓度 100 mg/kg 和 120 mg/kg 时其总硒含量分别为 137.57 mg/kg 和 166.53 mg/kg,未达国家标准。当硒处理浓度为 80 mg/kg 时,菌株 120-5 和 qiu-2020 总硒量分别为 152.86 mg/kg 和 104.00 mg/kg,在 80、100 和 120 mg/kg,菌株 120-5 相较于 qiu-2020 的总硒量分别提升 46.15%、45.21%和 34.60%。

对 100 mg/kg 和 120 mg/kg 硒处理浓度下菌株 120-5 的子实体进行有机硒检测,结果如图 9 所示。当处理浓度为 100 mg/kg 时,子实体总硒

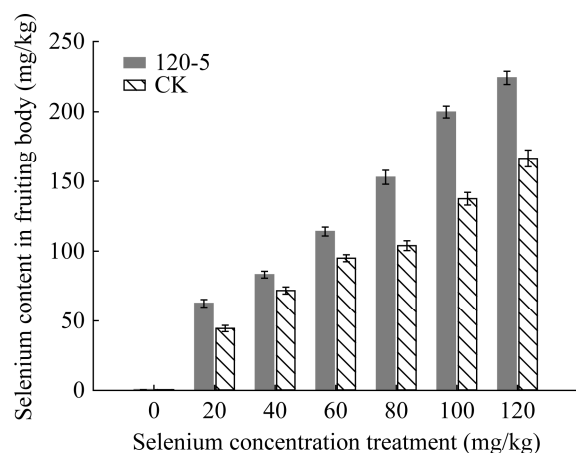


图 8 不同硒浓度培养条件下子实体的总硒含量
Figure 8 The total selenium in fruiting body under different concentration of selenium treatment.

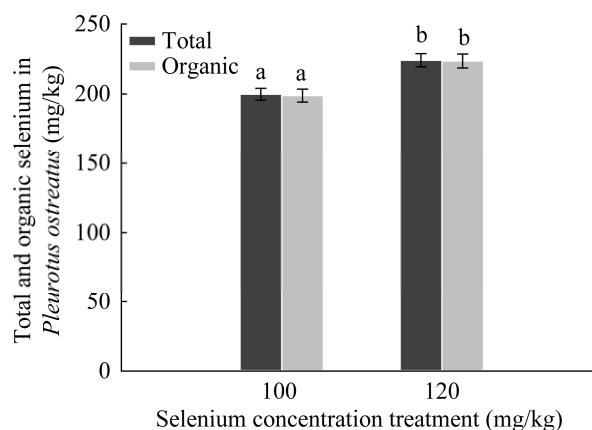


图 9 平菇子实体中总硒和有机硒的含量

Figure 9 Total and organic selenium content in fruiting body of *Pleurotus ostreatus*.

量 199.77 mg/kg、有机硒量 198.83 mg/kg, 占总硒量 99.53%; 处理浓度为 120 mg/kg 时, 子实体总硒量 224.15 mg/kg、有机硒量 223.56 mg/kg, 占总硒量 99.74%。由此可知, 诱变菌株 120-5 具有高富硒和高生物活性的优点, 可作为营养强化剂富硒食用菌的应用及生产的目标菌株, 开发价值大, 有广阔的应用前景。

2.7 通过基因组重测序分析诱变菌株的变异位点

为了从基因组层面鉴定分析诱变菌株是否发生了遗传变异, 本研究以出发菌株 qiu-2020 和诱变菌株 120-5 为研究对象, 以 GCA_029852705.2 基因组为参考, 对菌株 qiu-2020 和 120-5 进行全基因组重测序。SNP 检测及统计结果显示(表 2, 图 10), 菌株 120-5 含有 166 896 个 SNP 位点, 其中同义突变位点 42 678 个, 非同义突变位点 52 643 个, 非编码区 SNP 位点 71 575 个; 菌株 qiu-2020 含有 169 576 个 SNP 位点, 其中同义突变位点 43 626 个, 非同义突变位点 53 541 个, 非编码区 SNP 位点 72 409 个(表 2)。SNP 类型统计显示, 菌株 120-5 含有 T→C 置换位点 29 419 个, G→C 颠换位点 6 417 个, G→A 置换位点 28 288 个; 菌株 qiu-2020 含有 T→C 置换位点 29 937 个, G→C 颠换位点 6 595 个, G→A 置换位点 28 889 个。

(图 10)。

InDel 位点统计结果显示, 菌株 120-5 含有 InDel 总数 11 844 个, 其中插入位点 6 519 个, 缺失位点 5 325 个; 菌株 qiu-2020 含有 InDel 总数 11 905 个, 其中插入位点 6 608 个, 缺失位点 5 297 个(图 11)。

基因组结构变异 SV 检测结果显示, 菌株 120-5 含有 1 000 bp 以上的 SV 数 172 个, 700–800 bp 的 SV 数 29 个, 100–200 bp 的 SV 数 27 个; 菌株 qiu-2020 含有 1 000 bp 以上的 SV 数 167 个, 700–800 bp 的 SV 数 32 个, 100–200 bp 的 SV 数 24 个(图 12)。

表 2 出发菌株和诱变菌株的 SNP 功能注释

Table 2 The SNP functional annotation of original and mutant strains

SNP 类型 SNP type	Strain	
	qiu-2020	120-5
参考基因组 Reference genome	GCA_029852705.2	GCA_029852705.2
非编码区 SNP ncSNP	72 409	71 575
非同义突变 SNP nsSNP	53 541	52 643
同义突变 SNP sSNP	43 626	42 678
总数 Total	169 576	166 896

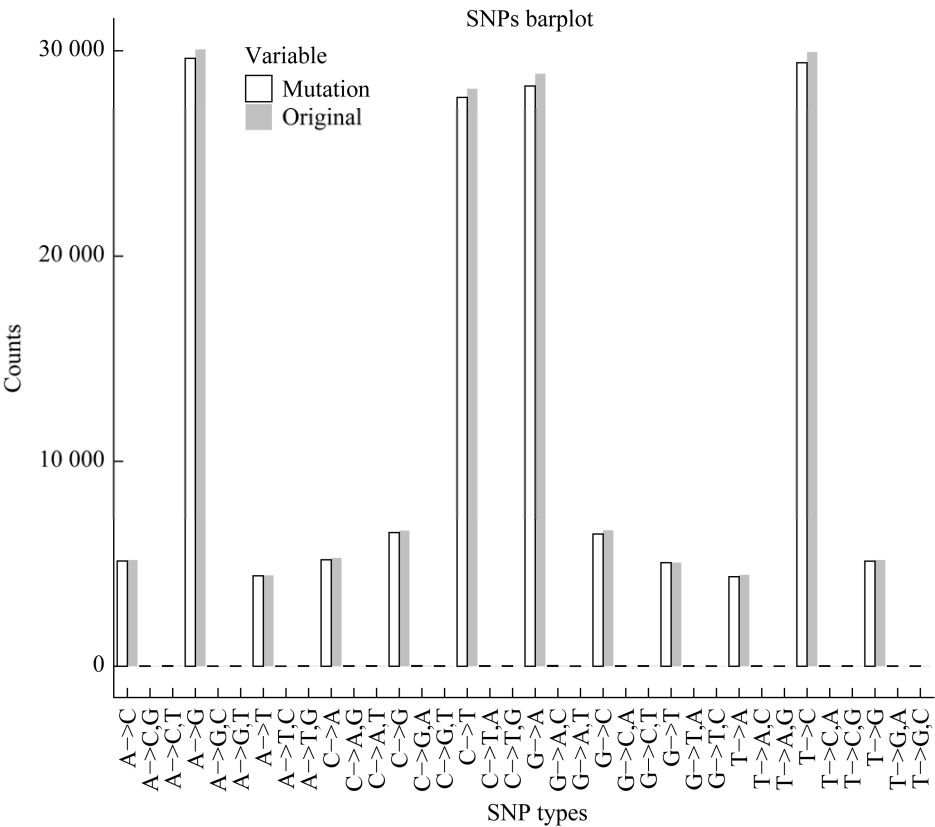


图 10 出发菌株和诱变菌株的 SNP 统计图

Figure 10 The SNP statistics of original and mutagenic strains.

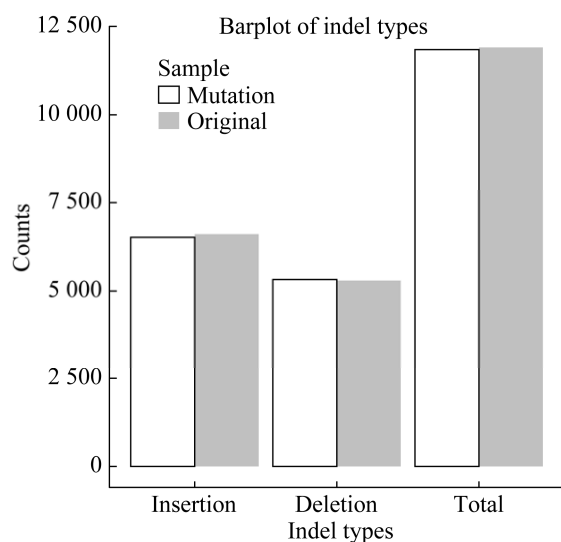


图 11 出发菌株和诱变菌株的 InDel 统计图
Figure 11 The InDel statistics of original and mutagenic strains.

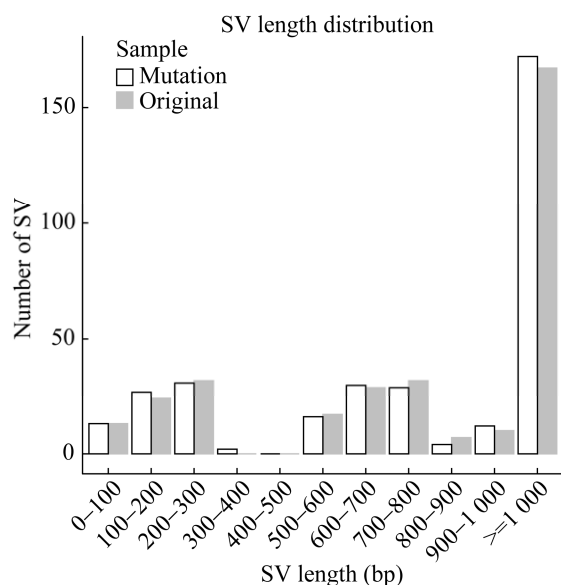


图 12 出发菌株和诱变菌株的 SV 长度分布图
Figure 12 SV length distribution map of original and mutagenic strains.

以上结果说明, 出发菌株 qiu-2020 经过诱变在基因组信息上发生了有效突变, 所得诱变菌株 120-5 符合变异菌株的一些基本特性, 遂将其命名为秋平 120-5。这些变异可能影响到基因的

调控、蛋白质结构和功能等方面, 与菌株 120-5 特征相关的基因可能包括参与代谢途径的酶、调控菌株适应环境的转录因子以及与抗氧化和非生物胁迫有关的基因。相关通路可能涉及硒的吸收转运、能量代谢、合成途径等。

3 讨论与结论

3.1 袋料栽培中菌丝的生长情况及子实体生物学效率

根据菌丝在不同硒浓度的袋料基质中的生长情况可以看出, 出发菌株在低硒条件下菌丝生长力增强, 高硒条件下菌丝生长力减弱, 与前人的研究报道基本相符。黄春燕等研究表明平菇菌丝在低硒浓度的固体培养基质生长良好, 高浓度硒会直接抑制菌丝的生长^[10], 这一结果与杏鲍菇在不同硒浓度处理下菌丝的生物量变化趋势也相符合^[11], 说明食用菌菌丝的生长与硒浓度之间均存在普遍的剂量效应关系。不同菌株对硒的敏感性和抗性存在差异, 诱变菌株 120-5 在高硒条件下仍然表现出强大的硒抗性, 且依赖于一定的硒浓度。

菌株 120-5 的生物学效率在 0–120 mg/kg 硒浓度范围内均未发生明显变化, 菌株 qiu-2020 在 100 mg/kg 硒浓度下子实体生物学效率并未发生显著变化, 在 120 mg/kg 硒浓度时生物学效率开始下降(图 7)。结合菌丝的生长情况(图 6), 菌丝生长速率与子实体产量之间存在着一种非线性的关系。当菌丝生长速率发生较小变化时, 子实体产量不会有明显的改变, 这可能是因为菌丝在调整自身代谢过程以适应新的生长条件。然而, 当菌丝生长速率发生较大变化时, 子实体产量会相应地改变。这一现象反映了食用菌生长发育的复杂性和菌丝-子实体之间的紧密联系。

3.2 菌丝体和子实体对硒的有效吸收和转化

子实体总硒检测结果显示, 菌株 120-5 富硒

能力显著强于菌株 qiu-2020 (图 8), 在 20–60 mg/kg 硒处理下, 尽管菌株 120-5 和 qiu-2020 的菌丝生长能力保持相近水平(图 6), 但是子实体硒含量存在差异(图 8)。同样地, 在菌丝体富硒培养过程中, 菌株 120-1 与 qiu-2020 的菌丝生物量没有差异(图 4), 但是 120-1 菌丝体总硒含量明显高于对照组 qiu-2020 (图 5)。相关结果与刘碧容的研究保持一致, 其对平菇菌丝体进行富硒液体培养的结果表明, 在一定浓度范围的亚硒酸钠液体培养基中菌丝干质量无明显变化, 但是总硒含量却有显著性差异^[12]。菌丝的生长能力只是该菌株对硒耐受力的一种直观体现, 而不同菌株对硒的有效吸收和转化能力存在差异, 这种差异可能涉及到菌株内部的各项代谢活动。

诱变菌株 120-5 获得了强大的硒富集能力和转化能力, 将绝大部分吸收的无机硒转化为有机硒最终在子实体中得到累积(图 9)。在这个过程中, 菌丝体通过调节内部氨基酸代谢、脂类代谢等途径中的相关酶活性和基因表达, 将无机硒转化为有机硒的形式^[13]。通过酯化、脱氧、脱硫等系列化学反应, 与多糖或蛋白质等大分子物质结合在一起最终形成有机硒化合物^[14]。尚德静研究证实了硒多糖形成的分子机理是因为硒取代了多糖中甲氧基的甲基, 并以硒氧双键的方式与之结合在一起^[15]。这个转化过程涉及多个生物化学反应和代谢途径的紧密调控, 为菌丝体到子实体的有机硒转化提供了基础。

3.3 富硒食用菌营养强化剂研究的重要性与挑战

硒在食用菌体内以有机形式存在, 有助于提高其生物利用率, 从而能更有效地满足人体对硒的需求^[16]。食用菌还含有丰富的蛋白质、氨基酸、多糖等多种营养成分, 同时硒元素可以进一步提升其含量起到强化营养品质的功效^[17-18]。人们可以同时获得多种有益营养, 实现全面的营养

强化。然而, 尽管富硒食用菌营养强化剂的应用前景广阔, 但在实际推广和应用过程中仍然面临一系列挑战。

首先, 食用菌的品种选择和改良是一个关键问题。不同食用菌品种在硒富集能力上存在差异, 部分品种可能不适宜作为营养强化剂的原材料。因此, 需要通过系统性的品种筛选和育种方法, 培育出硒富集能力更强的优质品种。另外, 硒源的合理选择也至关重要, 不同形态的硒具有不同的生物利用效率, 将适宜形态的硒添加到培养基质可以实现硒的高效富集和转化^[19-20]。

其次, 有机硒形态的检测分析需要加强。硒存在多种不同的有机形态, 如硒蛋白、硒多糖、硒代氨基酸等^[21-23]。这些有机形态具有不同的生物利用度和生物活性, 通过检测分析有机硒形态, 便于评估其在人体内的转化和利用情况以及富硒食用菌的品质和安全性。此外, 食用菌的硒吸收和积累机制尚需深入研究, 以优化培养条件和改良栽培技术, 从而提高硒富集效率。

REFERENCES

- [1] COMBS GF Jr. Selenium in global food systems[J]. The British Journal of Nutrition, 2001, 85(5): 517-547.
- [2] MATIJAŠEVIĆ D, PANTIĆ M, STANISAVLJEVIĆ N, JEVTIĆ S, RAJIĆ N, LEVIĆ S, NEDOVIĆ V, NIKŠIĆ M. *Coriolus versicolor* mushroom grown on selenium-rich zeolite tuff as a potential novel food supplement[J]. Food Technology and Biotechnology, 2021, 60(1): 67-79.
- [3] 胡婷, 惠改芳, 赵桂慎, 郭岩彬. 富硒食用菌研究进展[J]. 食用菌学报, 2019, 26(1): 68-76.
HU T, HUI GF, ZHAO GS, GUO YB. Advances in selenium-enriched edible fungi[J]. Acta Edulis Fungi, 2019, 26(1): 68-76 (in Chinese).
- [4] BHATIA P, AURELI F, D'AMATO M, PRAKASH R, CAMEOTRA SS, NAGARAJA TP, CUBADDA F.

- Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues[J]. *Food Chemistry*, 2013, 140(1/2): 225-230.
- [5] 郭洁, 周晓华, 王炯, 魏亮亮, 魏红, 张迪, 孙江南, 贾斌, 刘进玺, 王铁良. 硒营养强化对香菇营养品质影响研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(23): 7782-7787.
- GUO J, ZHOU XH, WANG J, WEI LL, WEI H, ZHANG D, SUN JN, JIA B, LIU JX, WANG TL. Effects of selenium nutrition enhancement on the nutritional quality of *Lentinus edodes*[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(23): 7782-7787 (in Chinese).
- [6] 宋盼盼, 赵妍, 李治平, 董沁, 杨焕玲, 陈明杰. 硒对镉胁迫下大球盖菇菌丝生长的影响[J]. *菌物学报*, 2021, 40(9): 2402-2411.
- SONG PP, ZHAO Y, LI ZP, DONG Q, YANG HL, CHEN MJ. Effects of exogenous selenium on the mycelial growth of *Stropharia rugosoannulata* under cadmium stress[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(9): 2402-2411 (in Chinese).
- [7] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中硒的测定: GB 5009.93—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. National standards of food safety: the determination of selenium in foods: GB 5009.93—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [8] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品营养强化剂 富硒食用菌粉: GB 1903.22—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. Food safety national standard food nutrition enhancers: Se-enriched edible fungi powder: GB 1903.22—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [9] 周晓东. 北虫草菌丝体诱变及优良菌株筛选[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2013.
- ZHOU XD. Mutagenizing of *Cordyceps militaris* by ultraviolet irradiation on mycelial and selection of fine strains[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [10] 黄春燕, 万鲁长, 张海兰, 单洪涛, 郭惠东, 郭洪军, 周学政, 张柏松. 高温富硒平菇栽培技术研究[J]. *山东农业科学*, 2013, 45(11): 63-65.
- HUANG CY, WAN LC, ZHANG HL, SHAN HT, GUO HD, GUO HJ, ZHOU XZ, ZHANG BS. Study on cultivation techniques of high temperature selenium-enriched *Pleurotus ostreatus*[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, 45(11): 63-65 (in Chinese).
- [11] KIM YH, LEE HS, KWON HJ, PATNAIK BB, NAM KW, HAN YS, BANG IS, HAN MD. Effects of different selenium levels on growth and regulation of laccase and versatile peroxidase in white-rot fungus, *Pleurotus eryngii*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(7): 2101-2109.
- [12] 刘壁容. 平菇液体发酵富硒菌丝体培养研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2005.
- LIU BR. Research on the selenium-rich mycelium of *Pleurotus ostreatus* by liquid fermentation[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2005 (in Chinese).
- [13] LI XL, YAN LJ, LI Q, TAN H, ZHOU J, MIAO RY, YE L, PENG WH, ZHANG XP, TAN W, ZHANG B. Transcriptional profiling of *Auricularia cornea* in selenium accumulation[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 5641.
- [14] WANG L, LI XY, WANG BB. Synthesis, characterization and antioxidant activity of selenium modified polysaccharides from *Hohenbuehelia serotina*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 1362-1368.
- [15] 尚德静. 灵芝有机硒的生物转化及灵芝硒多糖的硒活性结构分析、抑癌作用的研究[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2000.
- SHANG DJ. Biotransformation of selenium and Se activity structure of polysaccharide containing selenium in *Ganoderma Lucidum* [D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2000 (in Chinese).
- [16] ZHOU F, YANG WX, WANG MK, MIAO YX, CUI ZW, LI Z, LIANG DL. Effects of selenium application on Se content and speciation in *Lentinula edodes*[J]. *Food Chemistry*, 2018, 265: 182-188.
- [17] 龚曦珊, 陈青君, 张国庆, 张佳艳, 赵亚京, 张娇, 赵

- 敏睿. 硒对大球盖菇菌丝生长、子实体农艺性状和营养品质的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4522-4532.
- GONG XS, CHEN QJ, ZHANG GQ, ZHANG JY, ZHAO YJ, ZHANG J, ZHAO MR. Selenium affects the mycelial growth, agronomic traits, and nutritional quality of *Stropharia rugosoannulata*[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4522-4532 (in Chinese).
- [18] 李红英, 陈菲菲, 孙举志, 殷红清, 问小龙, 向极轩. 硒对香菇品质的影响[J]. 北方园艺, 2022, 12: 106-113.
- LI HY, CHEN FF, SUN JZ, YING HQ, WEN XL, XIANG JQ. Effects of selenium on *Lentinus edodes* quality[J]. Northern Horticulture, 2022, 12: 106-113 (in Chinese).
- [19] HU T, HUI GF, LI HF, G YB. Selenium biofortification in *Hericius erinaceus* (Lion's Mane mushroom) and its *in vitro* bioaccessibility[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127287.
- [20] MILETIĆ D, TURLO J, PODSADNI P, PANTIĆ M, NEDOVIĆ V, LEVIĆ S, NIKŠIĆ M. Selenium-enriched *Coriolus versicolor* mushroom biomass: potential novel food supplement with improved selenium bioavailability[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(11): 5122-5130.
- [21] LI J, WEN S, ZHANG BY, WANG FH. Selenium enrichment of the edible medicinal mushroom *Antrodia camphorata* by submerged fermentation[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2023, 28(7): 3036.
- [22] 王明洋. 富硒杏鲍菇品质特性及其硒的化学形态研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
- WANG MY. Study on quality characteristics of selenium-enriched *Pleurotus eryngii* and chemical speciation of selenium[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [23] 周菲. 食用菌对外源硒的吸收转化及含硒菌糠在生物强化中的再利用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2022.
- ZHOU F. Study on absorption and transformation of exogenous selenium by edible fungi and reuse of selenium-containing mushroom bran in biological enhancement[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2022 (in Chinese).