

# 四种抗菌素对侧耳科三种食用菌菌丝生长的影响

张国广<sup>1</sup>, 王丽霞<sup>2</sup>, 黄淑惠<sup>1</sup>, 贺春华<sup>1</sup>, 黄燕萍<sup>1</sup>, 邹金美<sup>1</sup>

(1.漳州师范学院 生物系, 福建 漳州 363000; 2.漯河市农业科学院, 河南 漯河 462000)

**摘要:** 该研究测试了卡那霉素、头孢霉素、氨苄青霉素、潮霉素 4 种抗菌素对秀珍菇、平菇和杏鲍菇菌丝生长的影响。结果表明: 卡那霉素、头孢霉素、氨苄青霉素对 3 种食用菌菌丝生长及菌落形态基本没有影响, 有些浓度处理对菌丝生长还具有微弱的促进作用。潮霉素对 3 种食用菌菌丝生长有很大的抑制作用, 12.5 mg/L 的潮霉素能够完全抑制秀珍菇的菌丝生长, 50 mg/L 的潮霉素能够完全抑制平菇和杏鲍菇菌丝的生长, 研究结果为进一步建立 3 种食用菌的农杆菌介导的遗传转化体系打下了基础。

**关键词:** 平菇; 秀珍菇; 杏鲍菇; 抗菌素; 菌丝生长速度

**中图分类号:** S 646.1<sup>+</sup>4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)02-0215-03

随着对食药菌遗传转化研究的深入, 目前已报道多种栽培食用菌, 如糙皮侧耳、双孢蘑菇、杨树菇、草菇、香菇、杏鲍菇等开始了基因转化的研究<sup>[1-2]</sup>。根癌农杆菌介导的遗传转化是在植物基因转化中广泛采用的成熟技术, 自 Bundock 等<sup>3</sup> 采用根癌农杆菌介导方法对酿酒酵母实现基因转化以来, 这项技术已逐渐被应用于丝状真菌的遗传操作, 迄今为止已在 10 多种真菌上取得成功<sup>4)</sup>。该研究主要探讨了农杆菌介导转化方法中 4 种常用抗生素对侧耳科 3 种食用菌菌丝体生长的影响, 为进一步建立农杆菌介导的遗传转化体系打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*)、秀珍菇 (*Pleurotus geesteranus*) 和杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii*) 母种保存于课题组实验室。头孢霉素 (*Cefotaxime*)、卡那霉素 (*Kanamycin*)、潮霉素 (*Hygromycin B*)、氨苄青霉素 (*Ampicillin*) 购自厦门鑫上生物公司; 葡萄糖,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$  等药剂购自国药集团; 马铃薯购于市场。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养板的准备 采用 PDA 培养基。抗生素平板的制备采用平板加药法, 抗生素的浓度: 头孢霉素 50、

100、200、300 mg/L; 氨苄青霉素 25、50、100、200 mg/L; 卡那霉素 25、50、75、100 mg/L; 潮霉素 3、6、9、12、5、30、40、50 mg/L。

1.2.2 菌种的活化及接种 在无抗培养基上将 3 种食用菌母种活化。取无抗板, 从保存的菌种试管斜面上挑取菌丝接种在平板的中央, 置于 28℃ 培养箱中培养, 待菌丝将要长满平板时使用。接种时用打孔器 (4 mm) 在平板相同直径的圆圈上打菌丝块接种在制备好的抗性平板的中央, 置于 28℃ 的培养箱中避光培养, 同时接种无抗的 PDA 平板作为对照。

1.2.3 菌丝生长情况 每隔 24 h 观察 1 次, 观察菌丝生长势, 至其中一种处理菌丝长满培养皿后测量所有处理的菌丝生长长度。按照公式计算菌丝生长率 (mm/d) 和不同浓度的 4 种抗生素对菌丝生长的抑制率 (%)。菌丝生长率 (mm/d) = (菌丝生长长度 - 接种的菌片半径) / 培养天数。抑制率 (%) = [(对照菌丝生长率 - 抗生素处理菌丝生长率) / 对照菌丝生长率] × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 头孢霉素和氨苄青霉素对食用菌菌丝生长的影响

由表 1、2 可知, 在农杆菌介导的植物转化中常用来抑制农杆菌生长的头孢霉素和氨苄青霉素对 3 种食用菌菌丝生长的影响不同, 在试验的浓度范围内头孢霉素对秀珍菇和杏鲍菇的生长基本没有抑制作用, 反而有稍微的促进作用, 仅仅对平菇的生长有较小的抑制作用; 氨苄青霉素对 3 种食用菌的菌丝生长在一定浓度下均有一定的促进作用。3 种菌丝在附加头孢霉素和氨苄青霉素的培养基中, 菌丝厚实致密, 健壮洁白, 与各自对照相比均没有明显差别。

### 2.2 卡那霉素对杏鲍菇菌丝生长的影响

由表 3 知, 卡那霉素在试验浓度范围内对秀珍菇和杏鲍菇的菌丝生长具有一定的促进作用, 仅仅对平菇的菌

第一作者简介: 张国广 (1973-), 男, 讲师, 现主要从事菌物研究工作。

通讯作者: 邹金美 (1973-), 女, 福建南平人, 硕士, 讲师, 现主要从事园艺植物生物技术方面研究工作。E-mail: jimmy709@126.com。

基金项目: 福建省教育厅资助项目 (2007F5098); 漳州师范学院大学生创新资助项目 (08xscxssy xm19)。

收稿日期: 2009-08-24

丝生长有不同程度的抑制。各处理中的菌丝生长浓密, 洁白, 边缘整齐, 与对照的菌丝生长形态无明显区别。

表1 头孢霉素对3种食用菌菌丝生长的影响

头孢霉 素浓度 / mg · L <sup>-1</sup>	秀珍菇		平菇		杏鲍菇	
	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %
0	3.157	0	3.780	0	4.085	0
50	3.126	0.98	3.865	-2.25	4.377	-7.15
100	3.141	0.51	3.725	1.46	4.076	0.22
200	3.389	-7.35	3.515	7.01	4.190	-2.57
300	3.484	-10.36	3.640	3.70	4.192	-2.62

表2 氨苄青霉素对3种食用菌菌丝生长的影响

氨苄青霉 素浓度 / mg · L <sup>-1</sup>	秀珍菇		平菇		杏鲍菇	
	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %
0	5.524	0	4.280	0	4.086	0
25	5.691	-3.02	4.555	-6.42	4.333	-6.05
50	5.557	-0.60	4.255	0.58	4.121	-0.86
100	5.612	-1.59	4.315	-0.82	4.152	-1.62
200	5.364	2.90	4.575	-6.89	3.956	3.18

表3 卡那霉素对3种食用菌菌丝生长的影响

卡那霉 素浓度 / mg · L <sup>-1</sup>	秀珍菇		平菇		杏鲍菇	
	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %
0	3.457	0	4.28	0	3.965	0
25	3.665	-6.02	3.97	7.24	3.974	-0.23
50	3.625	-4.86	4.26	0.47	4.285	-8.07
75	3.558	-2.92	4.17	2.57	4.222	-6.48
100	3.466	-0.26	4.21	1.64	4.267	-7.61

### 2.3 潮霉素对3种食用菌菌丝生长的影响

由表4可知, 潮霉素对3种食用菌菌丝生长的抑制作用很大, 秀珍菇对潮霉素比较敏感, 在潮霉素浓度为12.5 mg/L时能完全抑制秀珍菇菌丝的生长; 平菇和杏鲍菇菌丝的生长在潮霉素浓度为50 mg/L时受到完全抑制。潮霉素对菌丝形态影响也很大, 菌丝在不同浓度潮霉素的平板中均生长的细弱无力。

表4 潮霉素对3种食用菌菌丝生长的影响

潮霉素 浓度 / mg · L <sup>-1</sup>	秀珍菇		平菇		杏鲍菇	
	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %	菌丝生长率 / mm · d <sup>-1</sup>	抑制率 / %
0	2.762	0	3.98	0	3.786	0
6	0.856	69.01	2.803	29.58	2.241	40.81
9	0.024	99.13	—	—	1.774	53.14
12.5	0	100	1.465	63.20	1.608	57.53
30	—	—	0.465	88.32	1.233	67.43
40	—	—	0.381	90.42	0.614	83.78
50	—	—	0	100	0	100

注: 表中“—”指试验没有进行。

## 3 讨论

根癌农杆菌介导转化技术在植物转基因研究中广泛应用, 食用菌转基因研究中部分借鉴了植物转基因的技术, 已有研究表明根癌农杆菌转化方法在真菌转基因中同样有效<sup>[4]</sup>, 该技术应用的前提条件之一是要了解转化对象对于基因工程常用抗生素的敏感性。氨苄青霉素和头孢霉素在植物转基因中一般是用来清除转化后筛选培养基中多余的农杆菌, 理想的用于抑制农杆菌生长的抗生素应该是既能有效抑制农杆菌生长又不会对

转化对象的生长造成障碍, 该研究表明在试验的浓度范围内2种抗生素对3种食用菌菌丝的生长基本没有影响, 在一定的浓度下反而具有促进作用, 这可能是与2种抗生素具有类植物激素活性有关, 该结果表明2种抗生素均可以在基因转化中用于对农杆菌的抑制。另外在液体菌种的工厂化应用中, 液体菌种最容易被细菌污染, 该研究结果也为2种抗生素在培养液体菌种及纯化菌种时作为细菌抑制剂提供了依据。

卡那霉素和潮霉素是目前植物基因工程中作为选择标记被广泛应用的筛选抗生素, 其作用是在一定的选择压力下把转化体选择出来。要达到这一目的, 首先对筛选抗生素的适宜浓度做相应研究, 找到一个使未转化细胞不能生长而又不影响转化细胞生长的合适浓度, 从而把转化细胞筛选出来。该研究发现卡那霉素对3种食用菌菌丝的生长没有任何影响, 在试验浓度的范围内反而还有一定的促进作用。卡那霉素属于氨基糖苷类抗生素, 可以与细菌核糖体30S小亚基结合从而阻止细菌蛋白质的合成, 应用于植物转基因时, 卡那霉素能干扰非转化植物细胞中叶绿体及线粒体内的蛋白质合成, 引起植物绿色器官的黄化和能量供应不足, 最终导致非转化细胞的死亡<sup>[9]</sup>。但也发现一些重要的单子叶禾谷类植物如小麦、水稻、玉米、大麦等对卡那霉素也具有较高的天然抗性<sup>[9]</sup>, 因此这些植物转化中不能选择卡那霉素作为筛选抗生素。该研究中3种食用菌对卡那霉素同样不敏感, 不能作为基因转化中的筛选抗生素使用。潮霉素广泛应用于上述对卡那霉素不敏感的植物转基因研究中, 其毒性机理主要是干扰植物细胞叶绿体和线粒体中的核糖体与延长因子EF-2的结合, 从而抑制2个主要细胞器内的肽链的延长, 使2个重要细胞器的正常功能受损, 从而抑制了植物细胞的形成和生长。在丝状真菌的转基因研究中, 潮霉素得到了较多应用<sup>[7-8]</sup>, 该结果表明潮霉素可以作为秀珍菇、平菇和杏鲍菇的抗性转化子的筛选抗生素。

### 参考文献

- [1] 徐晓晶, 张竞, 李曦等. 人小肠三叶因子在糙皮侧耳中的整合、表达及检测[J]. 微生物学报, 2004, 44(5): 609-612.
- [2] 郭丽琼, 杨飞芸, 熊盛等. 草菇基因枪法遗传转化体系的建立[J]. 园艺学报, 2005, 32(5): 828-833.
- [3] Bundock P, Dulk-Ras A, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. EMBO J, 1995, 14: 3206-3214.
- [4] 杨长得, 刘刚, 郑易之等. 根癌农杆菌在丝状真菌转化中的应用[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(5): 784-787.
- [5] 王紫萱, 易自力. 卡那霉素在植物转基因中的应用及其抗性基因的生物安全性评价[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 9-13.
- [6] 奚亚军, 范学科, 侯文胜等. 小麦遗传转化中潮霉素适宜筛选浓度的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(1): 3-7.
- [7] 张学伟, 王笑梅, 李明春等. 以潮霉素B抗性为选择标记的深黄被孢霉原生质体转化[J]. 生物工程学报, 2007, 23(3): 264-268.
- [8] 胡乐琴, 潘迎捷. 香菇对潮霉素的抗性实验[J]. 微生物杂志, 2007, 23(4): 14-16.

# 利用板栗苞壳栽培灵芝的试验

覃宝山, 覃勇荣, 陆曾龙, 曹小燕

(河池学院 化学与生命科学系, 广西 宜州 546300)

**摘要:** 分别以板栗苞壳、甘蔗渣、杂木屑、桑枝屑等为原料, 设置 4 个配方进行灵芝栽培试验, 从菌丝生长状况、出芝性能和商品性状等方面进行对比分析。结果表明: 灵芝在以板栗苞壳为主料的培养基上长势良好, 出芝性能较佳, 商品性状较好, 综合指标与以甘蔗渣为主料栽培的相当, 而高于杂木屑和桑枝屑。

**关键词:** 板栗苞壳; 灵芝; 栽培; 试验

**中图分类号:** S 646.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2010)02-0217-03

灵芝是灵芝属(*Ganoderma* Karst)真菌的总称, 又名灵芝草、丹芝、神芝等<sup>[1]</sup>。在分类学上属于真菌门, 担子菌亚门, 层菌纲, 非褶菌目, 灵芝属。灵芝是著名的药用真菌, 药效显著, 临床上常用于健脑、保肝、解毒, 治疗神经衰弱、慢性肝炎和消化不良等疾病, 对防止血管硬化

和调节血压也有一定的疗效<sup>[2]</sup>。除药用外, 灵芝还有很高的观赏价值, 可用于制作工艺或盆景。

我国人工栽培灵芝的常用方法有段木栽培和代料栽培。由于段木栽培造成森林资源的浪费和原生林的破坏, 所以逐渐被代料栽培所取代。所谓代料栽培, 就是利用农、牧、林等产品的下脚料作为原料栽培食用菌或药用菌的栽培方式。据报道, 可用于栽培灵芝的主要原料有: 杂木屑、桑枝、棉籽、甘蔗渣、玉米芯、花生壳等<sup>[3-5]</sup>。板栗苞壳是板栗坚果外球形的密生针状长刺的总苞, 目前, 利用板栗苞壳栽培灵芝的试验研究国内鲜有报道。板栗是桂西北地区的主要农副产品之一<sup>[6]</sup>, 种植面积约  $2.1 \times 10^4$   $\text{hm}^2$ , 每年产有大量的板栗苞壳, 除少数用作薪柴外, 其余则丢弃林中, 任其腐烂或就地焚烧,

**第一作者简介:** 覃宝山(1967—), 男, 本科, 讲师, 现主要从事食用菌栽培教学与研究。E-mail: hexyqbs3@163.com.

**通讯作者:** 覃勇荣(1963—), 男, 硕士, 教授, 现主要从事喀斯特地区生态恢复与资源开发利用研究工作。E-mail: hexyqyr@126.com.

**基金项目:** 广西高校重点建设实验室资助项目(桂教科研[2006]4号); 河池学院科研立项课题资助项目(2007A-N005)。

**收稿日期:** 2009-09-20

## Effect of Four Kinds of Antibiotics on the Mycelium Growth of Three Edible Fungi of *Pleurotus*

ZHANG Guo-guang<sup>1</sup>, WANG Li-xia<sup>2</sup>, HUANG Shu-hui<sup>1</sup>, HE Chun-hua<sup>1</sup>, HUANG Yan-ping<sup>1</sup>, ZOU Jin-mei<sup>1</sup>  
(1. Biology Department of Zhangzhou Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000; 2. Luohe Academy of Agricultural Science, Luohe, Henan 462000)

**Abstract:** The investigations were carried out that effect of four kind antibiotics, including kanamycin, ampicillin, ceftaxime and hygromycin on mycelia growth of three edible fungi *Pleurotus* species such as *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus geesteranus*. The results showed that it were no significant influence that cefotaxime, kanamycin and ampicillin against three kind edible mushroom mycelial growth rate and clone morphology, moreover some treatment within the scope of experimental concentration can weakly promote the mycelial growth. Hygromycin strongly inhibited mycelial growth of three pleurotus species, and 12.5 mg/L of hygromycin can completely inhibit the growth of mycelia of *P. geesteranus*, and it need 50 mg/L hygromycin for achieving the aim of complete inhibition of the mycelia growth of *P. eryngii* and *P. ostreatus*. The results laid a foundation of further study on the construction of *Agrobacterium Tumefaciens* - mediated genetic transformation system of three *Pleurotus* species.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus geesteranus*; *Pleurotus eryngii*; antibiotics; mycelium growth rate