

真姬菇菌丝体对四种抗生素的敏感性研究

邹金美¹, 王 栩², 黄世玉¹, 陈 瑾¹, 张国广¹

(1. 漳州师范学院 生物系, 福建 漳州 363000; 2. 朝阳师范专科学校 生化工程系, 辽宁 朝阳 122000)

摘 要:检测了真姬菇菌丝对卡那霉素、头孢霉素、氨苄霉素、潮霉素的敏感性。结果表明:卡那霉素、头孢霉素、氨苄青霉素对真姬菇菌丝生长基本没有影响,与对照比较 3 种抗生素不同浓度对菌丝生长的影响效应均没有显著性差异。真姬菇菌丝对潮霉素非常敏感,10 mg/L 的潮霉素能够完全抑制真姬菇的菌丝生长,研究结果为进一步建立真姬菇的农杆菌介导的遗传转化打下了基础。

关键词:真姬菇; 抗生素; 菌丝生长速度

中图分类号: S 646.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)18-0201-03

真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*)隶属于担子菌门,层菌纲,伞菌目,白蘑科,玉蕈属。其形态美观,质地脆嫩,味道鲜美,深受人们青睐^[1]。但真姬菇的人工栽培周期较长,其中菌丝后熟阶段需要近 2 个月,深入研究该菇种的生长发育机理有助于在其人工栽培中采用更科学、高效的管理措施以获得高品质的商品菇。基因遗传转化作为一种技术手段能使人们更好的阐明食用菌生长发育的机理,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遗传转化的研究^[2-3]。根癌农杆菌介导的遗传转化是在植物基因遗传转化中采用的成熟技术,这项技术已在 10 多种真菌上取得成功^[4]。该研究检测了真姬菇菌丝体对农杆菌介导转化方法中常用抗生素的敏感性,为进一步建立农杆菌介导的真姬菇遗传转化打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*)母种购自福建省三明真菌所,经扩繁后保存于漳州师范学院生物系实验室。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, KH_2PO_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 基础培养基采用马铃薯综合培

养基。抗生素的浓度设计分别是头孢霉素 50、100、200、300 mg/L 浓度梯度;氨苄青霉素 25、50、100、200 mg/L 浓度梯度;卡那霉素 25、50、75、100 mg/L 浓度梯度;潮霉素 2、4、6、8、10 mg/L 等浓度梯度;每种抗生素均设计无抗 PDA 对照,3 次重复。

1.2.2 菌种的活化及接种 在无抗培养基上将真姬菇母种活化。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和对照平板的中央,置于 28℃ 的培养箱中避光培养。

1.2.3 菌丝生长状态观察及数据记录和处理 接种后每隔 24 h 观察并记录形态、色泽、密度及生长量等情况,至其中一种处理菌丝长满培养皿后,在平板背面划十字,用游标卡尺测量所有处理的菌丝生长长度。按照以下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/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%。将记录的菌丝生长率结果进行方差分析,用 Tukey 法比较差异显著性。

2 结果与分析

2.1 头孢霉素和氨苄青霉素对真姬菇菌丝生长的影响

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(表 1)和氨苄青霉素(表 2)。在试验的浓度范围内对真姬菇的生长没有抑制作用,反而有一定的促进作用,但并没有显著性差异。在附加头孢霉素和氨苄青霉素的培养板中真姬菇菌丝生长形态厚实致密,健壮洁白,与对照相比均没有明显差别。

第一作者简介:邹金美(1973-),女,硕士,讲师,现主要从事园艺植物生物技术研究工作。E-mail:jimmy709@126.com。

通讯作者:张国广(1973-),男,博士,讲师,现主要从事菌物研究工作。E-mail:zhanggg709@126.com。

基金项目:福建省教育厅 A 类科技资助项目(JA09168)。

收稿日期:2010-06-12

表 1 头孢霉素对真姬菇菌丝生长的影响

头孢霉素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	50	100	200	300
菌丝生长率/ $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$	$1.74 \pm 0.15 \text{ a}$	$1.94 \pm 0.19 \text{ a}$	$1.86 \pm 0.05 \text{ a}$	$2.18 \pm 0.03 \text{ a}$	$2.09 \pm 0.05 \text{ a}$
抑制率/%	0	-11.5	-6.9	-25.3	-20.1

注:菌丝生长率后不同小写字母表示差异显著,相同小写字母表示差异没有达到显著水平,下同。

表 2 氨苄青霉素对真姬菇菌丝生长的影响

氨苄青霉素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	25	50	100	200
菌丝生长率/ $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$	$1.87 \pm 0.19 \text{ a}$	$2.31 \pm 0.11 \text{ a}$	$2.21 \pm 0.24 \text{ a}$	$2.03 \pm 0.08 \text{ a}$	$2.11 \pm 0.27 \text{ a}$
抑制率/%	0	-23.5	-18.2	-8.6	-12.8

2.2 卡那霉素对真姬菇菌丝生长的影响

植物转化中常用来作为抗性转化子筛选的卡那霉素在试验浓度范围内对真姬菇菌丝生长没有抑制效应,反而有一定的促进效应,但没有达到显著性差异(表 3)。各处理中的菌丝生长浓密、洁白,与对照中的菌丝生长形态无明显区别。

表 3 卡那霉素对真姬菇菌丝生长的影响

卡那霉素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	25	50	75	100
菌丝生长率/ $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$	$1.80 \pm 0.10 \text{ a}$	$2.33 \pm 0.17 \text{ a}$	$2.05 \pm 0.17 \text{ a}$	$2.26 \pm 0.09 \text{ a}$	$1.99 \pm 0.12 \text{ a}$
抑制率/%	0	-29.4	-13.9	-25.6	-10.6

表 4 潮霉素对真姬菇菌丝生长的影响

潮霉素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0	2	4	6	8	10
菌丝生长率/ $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$	$2.73 \pm 0.02 \text{ a}$	$2.43 \pm 0.01 \text{ b}$	$1.52 \pm 0.02 \text{ c}$	$1.27 \pm 0.09 \text{ d}$	$0.72 \pm 0.09 \text{ e}$	0 f
抑制率/%	0	11.0	44.3	53.5	73.6	100

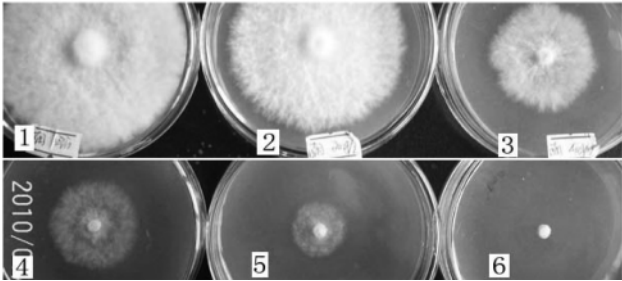


图 1 真姬菇在含不同浓度潮霉素的培养基中的生长形态

注:1 对照;2、3、4、5、6 分别指培养基中添加 2、4、6、8、10 mg/L 的潮霉素。

3 讨论

食用菌转基因研究中借鉴了植物转基因的技术,且根癌农杆菌转化方法在真菌转基因中同样有效^[4],该技术应用的前提条件之一是要了解研究对象或此外植体对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 种抗生素对真姬菇菌丝的生长基本没有影响,表明 2 种抗生素均可以在真姬菇基因转化中用于对农杆菌的抑制。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

2.3 潮霉素对真姬菇菌丝生长的影响

真姬菇对潮霉素比较敏感(表 4),随着浓度的增加菌丝生长受到明显的抑制,且相互间的差异具有显著性,在潮霉素浓度为 10 mg/L 时能完全抑制真姬菇菌丝的生长。潮霉素对菌丝形态影响也很大,在潮霉素浓度大于 2 mg/L 的平板中菌丝均生长细弱无力。

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。该研究结果表明,卡那霉素对真姬菇菌丝的生长没有明显的抑制效应,提示卡那霉素不能作为真姬菇基因转化中的筛选抗生素使用。潮霉素广泛应用于一些如小麦、水稻和玉米等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,潮霉素也得到了较多应用^[5-6],该研究结果表明,真姬菇对潮霉素比较敏感, 10 mg/L 的潮霉素完全可以抑制菌丝体的生长,可以选择潮霉素作为真姬菇的遗传转化抗性转化子的筛选抗生素。

参考文献

[1] 吕作舟. 食用菌栽培学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:304.
[2] 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.
[3] 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.
[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] 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.
[6] 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.

常见食用菌子实体中壳聚糖的提取和检测

张淑红

(唐山师范学院 生命科学系, 河北 唐山 063000)

摘要:采用微波技术从平菇、香菇和白灵菇子实体中提取壳聚糖,利用荧光素分光光度法检测其含量。结果表明:微波技术适合提取食用菌子实体壳聚糖。3种食用菌中,白灵菇子实体壳聚糖的得率最高,达到子实体湿重的1.55%,具有进一步开发研究的价值。

关键词:微波技术;食用菌;子实体;壳聚糖

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0203-02

壳聚糖(Chitosan, CS)是甲壳素的脱乙酰化产物,自然界唯一大量存在的碱性多糖,由于具有生物相容性、可生物降解性、无毒副性及天然广谱抗菌力等,因此广泛应用于农业^[1-2]、医药^[3-4]、食品^[5]以及纺织^[6]等领域。工业生产中,壳聚糖主要是以虾、蟹壳为原料,但提取的壳聚糖具有脱乙酰度不稳定等缺陷^[7]。目前研究者发现在子囊菌纲、担子菌纲和半知菌纲等真菌细胞壁中壳聚糖的含量也是十分可观的,并且已经成功提取到质量较高的产品^[8]。关于食用菌壳聚糖的提取研究大部分是以菌丝体为材料进行的^[9],食用菌子实体壳聚糖的提取还少见报道。壳聚糖作为真菌的结构物质在不同的生长阶段其结构与性质可能不同,有研究报道^[10],糙皮侧耳子实体壳聚糖的杀菌率比糙皮侧耳菌丝壳聚糖的杀菌率高。因此,现以常见的食用菌子实体为材料提取壳聚糖并进行定量测定与比较,为食用菌子实体壳聚糖

的提取提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

平菇、香菇、白灵菇子实体均由市场购买;壳聚糖购自浙江澳兴生物科技有限公司, $M_r = 5.0 \times 10^4$, 脱乙酰度 93.78%; 荧光素购自 Bio Basic Inc.; 盐酸、氢氧化钠、冰醋酸、乙醇、磷酸、硼酸、甲基红、甲基橙均为分析纯。

1.2 样品壳聚糖的提取

采用微波技术提取3种食用菌子实体壳聚糖。称取10.00 g 原料于500 mL 锥形瓶,加入200 mL 7% NaOH 溶液,50℃处理3 h后,离心洗涤至上清液无色。向沉淀中加入20%氢氧化钠溶液,在中高微波火力下处理20 min后,离心洗涤沉淀至上清液呈中性。向沉淀中加入50 mL 5%乙酸溶液,100℃下处理5 h,离心分离。调节pH值为8~10,此时出现大量白色絮状沉淀,离心,无离子水洗涤沉淀至上清液呈中性。沉淀即所提取的样品壳聚糖,用1%醋酸溶液溶解^[10-11]。

1.3 样品壳聚糖的紫外吸收光谱

稀释样品壳聚糖溶液浓度为0.1%,以1%的乙酸溶液为空白对照,利用紫外可见分光光度计,于200~

作者简介:张淑红(1978-),女,河北石家庄人,硕士,讲师,现主要从事生物化学与分子生物学研究工作。E-mail: zsh3535@yahoo.com.cn。

基金项目:河北省教育厅资助项目(Z2008133)。

收稿日期:2010-06-21

Study of Sensitivity of Mycelia of *Hypsizygus marmoreus* Against Four Kinds of Antibiotics

ZOU Jin-mei¹, WANG Xu², HUANG Shi-yu¹, CHEN Ying¹, ZHANG Guo-guang¹

(1. Biology Department, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000; 2. Department of Biochemical Engineering, Chaoyang Normal College, Chaoyang, Liaoning 122000)

Abstract: The investigations were carried out that effect of four kind antibiotics, including kanamycin, ampicillin, ceftaxime and hygromycin on mycelia growth of *Hypsizygus marmoreus*. The results showed that it were no significant influence that cefotaxime, kanamycin and ampicillin against mycelia growth rate and clone morphology of *Hypsizygus marmoreus*. Hygromycin strongly inhibited mycelia growth of *Hypsizygus marmoreus*, and 10 mg/L of hygromycin can completely inhibit the growth of mycelia. The results laid a foundation of further study on the construction of *Agrobacterium Tumefaciens*-mediated genetic transformation system of *Hypsizygus marmoreus*.

Key words: *Hypsizygus marmoreus*; antibiotics; mycelium growth rate