原生质体紫外诱变选育猴头菌株

王 谦[1],马旭光[1],刘 敏[1],杨淑琴[2]

(1.河北大学 生命科学学院,河北 保定 071002;2.河北省优抚医院,河北 石家庄 050051)

摘 要:以河北大学食药用真菌研究所保藏的猴头(*Hericium erinaceus*)He001 菌株为试材,对其进行原生质体紫外诱变处理,共获得 273 株再生菌株,初筛获得 14 株再生菌株与出发菌株有明显拮抗现象,进一步筛选出 8 株再生菌株菌丝长速优于出发菌株,并通过酯酶同工酶电泳技术对该 8 株菌株进行菌种真实性鉴定。结果表明:8 株菌株共检测到 4 谱带,分布于迁移率在 0.41～0.59 之间;H035 与出发菌株的联合系数为 0.33,与 He001 遗传差异最大;同时它在栽培常用培养基上长速优于出发菌株,差异达到了极显著水平,因此初步认定其为优良的再生变异菌株。

关键词:猴头;原生质体;紫外诱变处理;酯酶同工酶

中图分类号:S 646 **文献标识码**:A **文章编号**:1001－0009(2014)16－0145－03

猴头(*Hericium erinaceus*)属担子菌门(Basidiomycota)层菌纲(Hymenomycetes)多孔菌目(Polyporales)猴头菌科(Hericiaceae)猴头菌属(*Hericium*),是著名的食药兼用菌。猴头菌性平、味甘,入脾、胃经,能利五脏、助消化,具有健脾、养胃、安神、抗癌等功效。近代医学研究表明,猴头能够提高巨噬细胞吞噬能力[1-2],从而增强机体免疫和抗癌功能[3-4]。另外,有研究发现猴头具有降血糖和延缓衰老的作用[3-4]。基于猴头优秀的食药用功效,近年来对其需求不断增大,其栽培技术的研究也得到了越来越多的重视。选育 1 株生产性能好的菌株能够极大地促进猴头的产量、提高其经济效益,这方面的研究一直是猴头栽培技术研究的重点。

原生质体技术是通过制备具有生物全能性的原生质体,并结合诱变、杂交、转基因等技术培育变异新类型的生物技术。其中原生质体紫外诱变技术以其周期短、操作简便的优点被广泛采用。采用此技术对该试验室保藏菌株进行诱变处理,筛选出 1 株生长性能优良的再生变异菌株,并结合酯酶同工酶电泳技术对该菌种真实性进行鉴定,以期为猴头栽培技术优化研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试猴头 He001 为河北大学食药用真菌研究所保

第一作者简介:王谦(1962-),男,本科,研究员,现主要从事食药用真菌研究与开发工作。E-mail:wq6203_cn@126.com.

基金项目:河北省生物工程重点学科资助项目。

收稿日期:2014－04－18

23℃最好。垛内的温度要控制在 23～27℃之间,室内和垛内的温度最高不能超过 27℃,超过时要立即倒垛降温。倒垛时上、下层放的菌袋往中间倒,垛中间的往垛两头和上、下层倒,倒垛时若发现有杂菌污染,轻度的用新洁尔灭,或甲醛液向杂菌表面注射,将杂菌盖住。通风:在正常情况下,室内垛内温度不高,每天通风 3 次(早、中、晚各 1 次),每次通风 40～50 min,在 5～6 d 内倒 2 次,以控制垛内温度升高。

在适宜的温度和空气新鲜的条件下,菌丝生长 15～16 d,就能长满菌袋。若是玉米芯原料,再延长培养 3～4 d,原料是高粱壳的,再延长培养 7～8 d。等整个菌袋呈白色柱体并有原基出现时,就可以把菌袋两头打开,露出两头料面,进行出菇管理。

6 子实体阶段的管理

在出菇前,要向空间喷雾状水,地面洒水,使室内空气相对湿度控制在 90%左右,以防止料面干燥,不易形成菇蕾。菇蕾形成时所要求的温度,高温型品种 24～30℃,中温型 18～22℃,低温型 10～18℃。形成菇蕾时,要求有温差的刺激,昼夜温差在 8～10℃为好。出菇时的温度高温型为 22～24℃,中温型为 18～22℃。低温型 14～16℃最为适宜,生长得最快。

控制好以上条件,开袋 3～4 d 后,袋料的两端料面上,就能形成满满 1 层菇蕾。菇蕾形成后,室内空气湿度要求在 85%～90%,加大通风量,控制空气中的二氧化碳浓度(0.1%为适宜)。当菇盖长到 20～25 mm 时便可适时采收。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

存菌株。

PSA加富培养基:去皮马铃薯200 g、蔗糖20 g、麸皮20 g、琼脂20 g、用蒸馏水定容至1 000 mL,pH自然。液体培养基:去皮马铃薯200 g、KH_2PO_4 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、$CaCO_3$ 0.1 g、维生素B_1 0.12 g、琼脂1.0 g、用蒸馏水定容至1 000 mL,pH自然。再生培养基:去皮马铃薯200 g、KH_2PO_4 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、$CaCO_3$ 0.1 g、维生素B_1 0.12 g、琼脂20 g、用蒸馏水定容至1 000 mL,pH自然。原种培养基:棉籽皮85%、麸皮14%、生石灰1%、料水比1∶1.2。栽培培养基:杂木屑60%、棉籽皮25%、麸皮14%、生石灰1%、料水比1∶1.2。

1.2　试验方法

1.2.1　菌丝体的制备　将保藏于PSA加富培养基上的菌株He001转接到液体培养基中,接种后黑暗条件下静置20 h,180 r/min,离心15 min 25℃条件下培养7 d,即获得用于原生质体制备的菌丝体培养物。

1.2.2　原生质体的制备与纯化　混合酶液的制备:用浓度为109 g/L的甘露醇溶液分别配制浓度均为12 g/L的纤维素酶和蜗牛酶酶液,等体积混合后0.45 μm微孔滤膜过滤除菌得混合酶液备用[5]。菌丝体培养物8 000 r/min离心10 min,收集沉淀,按照每300 mg湿菌丝对应混合酶液1.5 mL的比例[5-6]添加混合酶液,30℃条件下恒温酶解180 min[5-6]。酶解后用灭菌脱脂棉过滤得滤液,将原生质体悬液稀释成10^5个/mL,血球计数板计数。

1.2.3　原生质体紫外诱变处理　吸取稀释好的原生质体悬液1 mL置于直径为90 mm的无菌平板内用紫外灯(功率15 W,照射距离30 cm)进行照射,照射时间40 s[5-6],将处理后的悬液涂布于再生培养基上,避光,25℃条件下培养10 d,从而获得再生菌株。

1.2.4　再生菌株的初筛　将再生菌株与出发菌株接入PSA加富培养基平板上,不同菌株菌块间隔2 cm左右,25℃避光培养10 d,观察拮抗现象。

1.2.5　再生菌株的复筛　原种的制备:将原种培养基混合后装入17 cm×32 cm×0.05 cm聚丙烯塑料袋中,每袋干料约400 g,121℃,0.15 MPa灭菌2.5 h,待菌袋冷至室温时,无菌条件下进行接种。将具有明显拮抗现象的菌株同样大小菌块接种到栽培培养基上,空气湿度50%～60%、避光培养,每天通风1 h,进行菌丝营养生长阶段培养[7]。待菌丝长满菌袋后备用。

1.2.6　栽培种的制备　按照10%的接种量将原种接种于栽培培养基上,待菌丝长满培养料横切表面时开始划线,以后每隔5 d划线以记录菌丝前沿位置,从而计算菌丝长速。筛选出长速优于出发菌株的再生菌株。

1.2.7　酯酶同工酶电泳鉴定菌株菌种真实性　参照相关国家标准方法[8],使用上述液体培养基通过液体培养8 d获得菌丝体;分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为3.6%,点样量40 μL,指示剂进入分离胶后,电流由20 mA增加至40 mA[9]。电泳结束后计算酶带迁移率和菌株间的联合系数(S)[10]。$S = c/(a+b-c)$,其中,a为A菌株酶带数,b为B菌株酶带数,c为2菌株共有的酶带数。

2　结果与分析

2.1　再生菌株复筛

经过原生质体紫外诱变处理共获得273株再生菌株,经过拮抗试验,筛选出与出发菌株有明显拮抗现象的再生菌株14株。14株初筛选出的再生菌株与出发菌株在栽培培养基上长速结果见表1。

表1　　猴头菌株长速对比

Table 1　*Hericium erinaceus* strains' mycelia growth speed comparison

菌株编号	菌丝长速 /mm·d^{-1}	多重比较结果 $P<0.05$	$P<0.01$
H035	5.55±0.27	a	A
H155	5.07±0.23	ab	AB
H037	4.79±0.23	b	AB
H014	4.51±0.22	bc	B
H013	4.21±0.12	bc	B
H042	4.09±0.22	c	BC
H011	3.91±0.26	cd	BC
H034	3.88±0.20	cd	BC
He001	3.59±0.20	cd	BC
H098	3.38±0.11	d	C
H137	3.13±0.17	de	CD
H189	3.03±0.20	de	CD
H206	2.90±0.23	de	CD
H207	2.55±0.21	e	D
H222	1.74±0.29	f	D

注:表中数据表示为平均值±标准差。

Note: Values are shown as mean ± SD.

由表1可见,长速优于He001的再生菌株共8株,依次为:H035＞H155＞H037＞H014＞H013＞H042＞H011＞H034＞He001。其中,H035和H155菌株长速与其它菌株差异显著,但H035和H155二者之间差异不显著;H014、H013、H042、H011、H034、He001之间长速差异不显著,因此选择H035、H155、H037、H014、H013、H042、H011、H034这8株菌株与出发菌株He001进行酯酶同工酶电泳以鉴定其菌种真实性。

2.2　再生菌株菌种真实性鉴定

He001与再生菌株H011、H013、H014、H034、H035、H037、H042、H155的酯酶同工酶电泳图谱见图1。由图1可知,上述8株菌株共有4条谱带,谱带分布于迁移率在0.41～0.59范围内,谱带分布集中,只需划分为

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

1 个区即可,其中位于迁移率 0.52 处的谱带为 8 个猴头菌株的基本特征性谱带。其中酶带宽、颜色深说明该酶表达活性高,相反表示酶带表达活性低。

He001 与 H034 在迁移率 0.52 处有 1 个共有酶带;而 He001 在迁移率 0.41 处有 1 个酶带,H034 没有其它酶带。因此,2 个菌株的联合系数为 0.50。

He001 与 H035 在迁移率 0.52 处有 1 个共有酶带;而 He001 在迁移率 0.41 处有 1 个酶带,H035 在迁移率 0.55 处有 1 个酶带。因此,2 个菌株的联合系数为 0.33。

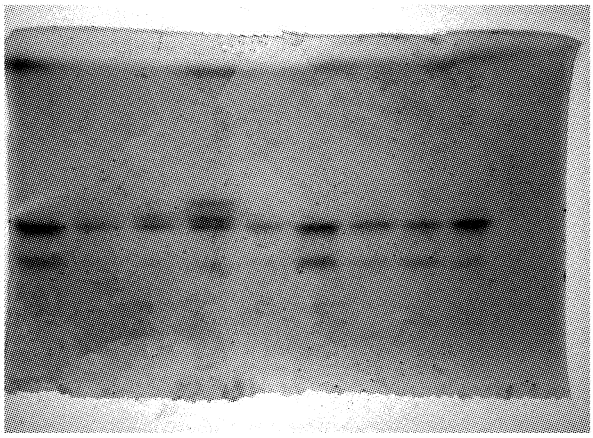


图 1 供试菌株酯酶同工酶电泳图谱

Fig. 1 Esterase isozyme profiles of *Hericium erinaceus* strains

He001 与 H155 在迁移率 0.41 和 0.52 处各有 1 个共有酶带;而 H155 在迁移率 0.55 和 0.59 处各有 1 个特有酶带,He001 没有其它酶带。因此,2 个菌株的联合系数为 0.50。

H011、H013、H014、H037、H042 与 He001 酶带位置和数量均相同。因此,它们与 He001 的联合系数均为 1.00。

3 结论

该研究结果表明,H034、H035 和 H155 与出发菌株 He001 具有一定的遗传距离,系为不同菌株,且 H035 与 He001 的联系系数为 0.33,低于 0.50,遗传距离最大。结合复筛结果,H035 在栽培培养基上长速优于 He001,达到了差异极显著水平,在生产上能够有效缩短制种周期,初步认为其为性状优良的再生变异菌株。但最终对其生产性能的评价还需要结合生物转化率以及子实体营养成分含量的对比结果。

参考文献

[1] 任大明,杜志强,李秀娜,等. 猴头菌丝多糖免疫调节和抗氧化功能研究[J]. 沈阳农业大学学报,2007,38(3):370-374.

[2] 吴迪,张劲松,蒋俊,等. 不同产地猴头菌子实体粗多糖特征及其刺激巨噬细胞产生 NO 的活性[J]. 食用菌学报,2011,18(4):59-62.

[3] 吴云艳,宋慧,马福. 猴头菌属(*Hericium*)真菌多糖的研究进展[J]. 吉林农业大学学报,2005,27(6):621-626.

[4] 袁胜东,罗霞,俞梦瑶,等. 猴头生物活性成分及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(15):8926-8928.

[5] 李艳红,李莉. 原生质体紫外诱变选育猴头菌新菌株的研究[J]. 山东农业科学,2006(2):42-43.

[6] 张卉,李长彪,陈明波,等. 原生质体紫外诱变选育姬松茸新菌株[J]. 微生物学杂志,2004,24(6):56-57.

[7] DB33/T 384.2-2002. 无公害猴头菇(第 2 部分)栽培技术操作规范[S].

[8] NY/T 1097-2006. 食用菌菌种真实性鉴定:酯酶同工酶电泳法[S].

[9] 林兴生,李开本,陈体强,等. 11 个灵芝菌株的栽培性状和酯酶同工酶研究[J]. 江西农业大学学报,2001,23(1):80-84.

[10] 訾惠君,刘连强,王文志,等. 12 个黄伞菌株的酯酶同工酶分析[J]. 安徽农业科学,2009,37(23):10897-10899.

Selection for a *Hericium erinaceus* Mutant Strain in the Way of Protoplasts Being Exposed to the UV Radiation

WANG Qian[1], MA Xu-guang[1], LIU Min[1], YANG Shu-qin[2]

(1. College of Life Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002; 2. Special Care Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050051)

Abstract: Use *Hericium erinaceus* He001 that stored in Institute of Medicinal Fungi of Heibei University, 273 strains were regenerated in the process of protoplasts of He001 being exposed to the UV radiation. 14 strains were filtered out based on the mycelial antagonistic symbols, and 8 strains, of which mycelial growth rates were higher than the original, were chosen to detect their esterase isozyme to confirm whether they were genetically different from the original. The results showed that there were four bands of esterase isozyme located in the range of the migration rate between 0.41 and 0.59 in all. The association coefficient between H035 and He001 was 0.33, which was the smallest and meant H035 was genetically different from He001. Besides, the mycelia growth rate of strain H035 was higher than He001, and the difference was extremely significant. On the basis of all facts above, H035 was confirmed to be a mutant strain.

Key words: *Hericium erinaceus*; protoplasts; exposition to UV radiation; esterase isozyme profiles

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn