

一种室内快速检测黑木耳菌丝活力的方法

李 红, 张 敏, 肖 千 明

(辽宁省农业科学院 微生物工程中心, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:为了提高黑木耳的选种效率, 利用 TTC-脱氢酶还原法检测黑木耳菌丝活力, 并利用液体深层培养和栽培试验进行验证。结果表明: TTC 试验结论与液体深层培养试验和栽培试验结论一致, 试验表明 M10 菌株细胞活力最强, M14 菌株细胞活力最弱, 证明了 TTC 试验结论的可靠性, 此方法可在室内快速检测黑木耳菌丝活力。

关键词: TTC; 脱氢酶活性; 黑木耳; 菌丝活力

中图分类号: S 646.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2016)24-0136-04

TTC-脱氢酶还原法的原理是以氧化还原性染料 TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)作为指示剂, 使无色的 TTC 在活性微生物细胞内充当最终受体^[1-4]。当微生物细胞内有生物氧化(即脱氢反应)时, TTC 便接受氢原子而被还原成红色的三苯基甲臍(tiphenyl formazone, TF), 再使用有机溶剂萃取出 TF 于 485 nm 波长下测其吸光度或光密度, 以光吸收值或 TTC 反应速率反映脱氢酶活性^[5-7]。脱氢酶的活性反映了微生物及其对有机物的代谢能力。该法最早运用于植物种子活性的鉴定, 后来逐步用于植物的根系、茎叶和花粉等部位的活性检测。刘淑琴等^[3]通过 TTC 法测定了蛹虫草 3 个菌株的脱氢酶活性, 发现蛹虫草液体菌种脱氢酶含量高时, 其子实体的产量亦高, 初步提出了 TTC-脱氢酶还原法可以运用于蛹虫草菌种选育; 林清泉等^[4]测定了蛹虫草不同菌株的脱氢酶活性, 发现正常菌株的脱氢酶活性高于退化菌株, 可用作退化菌株与正常菌株的鉴别指标, 从而运用于蛹虫草优良菌种的筛选。

该研究采用 TTC-脱氢酶还原法检测黑木耳菌丝活力, 与传统的依据菌丝特征检测菌种活力相比, 共具有

测定结果稳定可靠、重现性好、准确度高、操作方便、速度快等优点。

1 材料与方法

1.1 供试菌株共 10 株, 具体名称与来源见表 1。

表 1 供试菌株

菌株编号	名称	来源
Strain	Name	Source
M2	“998”	大连全禾菌业
M4	“康达 1 号”	辽宁三友农业生物科技有限公司
M10	“黑 29”	黑龙江省微生物研究所
M11	“黑厚圆”	辽宁三友农业生物科技有限公司
M13	“纯黑山”	辽宁三友农业生物科技有限公司
M14	“木 1”	辽宁三友农业生物科技有限公司
M23	“丰产王”	辽宁省农科院食用菌研究所
M26	“长白 7 号”	辽宁省农科院食用菌研究所
M28	“木 889”	大连全禾菌业
M32	“黑威 15”	辽宁三友农业生物科技有限公司

供试试剂: Tris-HCl 缓冲液(pH 8.4)、TTC 溶液(0.5%红四氮唑)、生理盐水(0.85%)、无水乙醇、Tris-HCl 缓冲液和 TTC 液要随配随用。

供试培养基: 液体深层培养基, 去皮马铃薯 20%、葡萄糖 2%、蛋白胨 0.3%、KH₂PO₄ 0.3%、MgSO₄ · 7H₂O 0.15%、维生素 B₁ 适量; 栽培培养料, 木屑 85.5%、麸皮 10%、豆饼粉 2%、石膏 1%、石灰 1.2%、磷酸二氢钾 0.3%。

1.2 试验方法

1.2.1 准备测试样品 将筛选菌株于母种平板培养基 23 ℃下, 培养 10 d 后, 切取平板上的菌块(1 cm × 1 cm) 2 块, 转至液体深层培养基中, 23 ℃下, 150 r · min⁻¹ 震荡

第一作者简介: 李红(1979-), 女, 满族, 辽宁开原人, 硕士, 助理研究员, 现主要从事食用菌菌种选育等研究工作。E-mail: Lee_hong123@163.com.

责任作者: 张敏(1972-), 女, 辽宁铁岭人, 博士, 研究员, 现主要从事食用菌育种及栽培等研究工作。E-mail: zhangmindun@163.com.

基金项目: 辽宁省科学事业公益研究基金资助项目(2012005010)。

收稿日期: 2016-09-26

培养 6 d。取菌液 2 mL 于离心管中,4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,去除上清以提取菌丝。以 1 mL 生理盐水冲洗菌丝,4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 去除上清液,重复 4 次。称量离心后的菌丝,配成 0.15 g·mL⁻¹ 的待用菌液。

1.2.2 酶活力测试 取待用菌液、pH 8.4 的 Tris-HCl 缓冲液和 TTC 溶液各 400 μL 至离心管中,于 37 ℃ 反应 3 h。反应完成后立即将样品放置冰上,4 ℃ 离心再水洗 2 次,在离心后的细胞沉淀中加入 1 mL 无水乙醇萃取剂,室温下从细胞中提取 TF。12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后,取上清 200 μL 于 752N 型紫外分光光度计上测定 OD₄₈₅,每处理 3 次重复。当微生物细胞内有脱氢反应时,TTC 便接受氢原子而被还原成红色的三苯基甲臜(TF),再使用无水乙醇萃取 TF,于 485 nm 波长下测其吸光度,以光吸收值反映脱氢酶活性,光吸收值越大,脱氢酶的活性越高。

1.2.3 液体深层培养 将活化的黑木耳菌丝切下 0.5 cm² 菌块,接种于液体深层培养基中,每个品种接 4 瓶,23 ℃ 摇床培养,转数 150 r·min⁻¹。为了菌株生长的同步性,每品种再转接一次液体深层培养基,按上述条件继续培养。观察菌丝生长情况、萌动时间、平均满瓶时间及菌丝生长的均一性等,同时测定菌球大小、菌球密度、菌丝体干质量等指标。

1.2.4 栽培试验 配制袋栽基质后冷却处理,次日接种,每种菌株接种 200 袋,按露地全光标准栽培模式管理,定时扎眼、催芽,观察记录菌丝长势、污染代数、满袋时间、从芽到耳片分化的时间、子实体生长状况等^[8]。按《无公害食品食用菌栽培基质安全技术要求》来评价产品性状和质量。

1.3 项目测定

菌球大小:随机取培养基中菌球 30~50 个置于培养皿中紧密排成一行,测量总直径,求出菌球平均直径,重复 3 次;菌球密度:取 10 mL 培养液,按一定比例准确稀释,摇匀后取一定量在直径为 9 cm 的培养皿中摊匀,培养皿下垫方格纸,进行计数,求出每毫克培养液中菌球个数。每次处理重复 3 次;菌丝体干质量:将培养好的菌液,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,用蒸馏水洗涤菌球,3 000 r·min⁻¹ 再离心后将菌球置于 60 ℃ 恒温干燥箱内烘干至恒重,称量。

2 结果与分析

2.1 酶活力测试

由图 1 可知,M10 菌株 OD₄₈₅ 最大,达到 0.79,说明 M10 菌株三苯基甲臜(TF)的量最多,酶活力最强,而 M14 菌株 TF 量最少,OD₄₈₅ 为 0.44,说明 M14 菌株酶活力最弱。

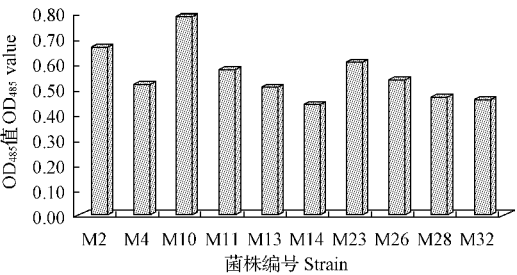


图 1 不同黑木耳菌株 OD₄₈₅ 值

Fig. 1 OD₄₈₅ value of *Auricularia auricular-judae*

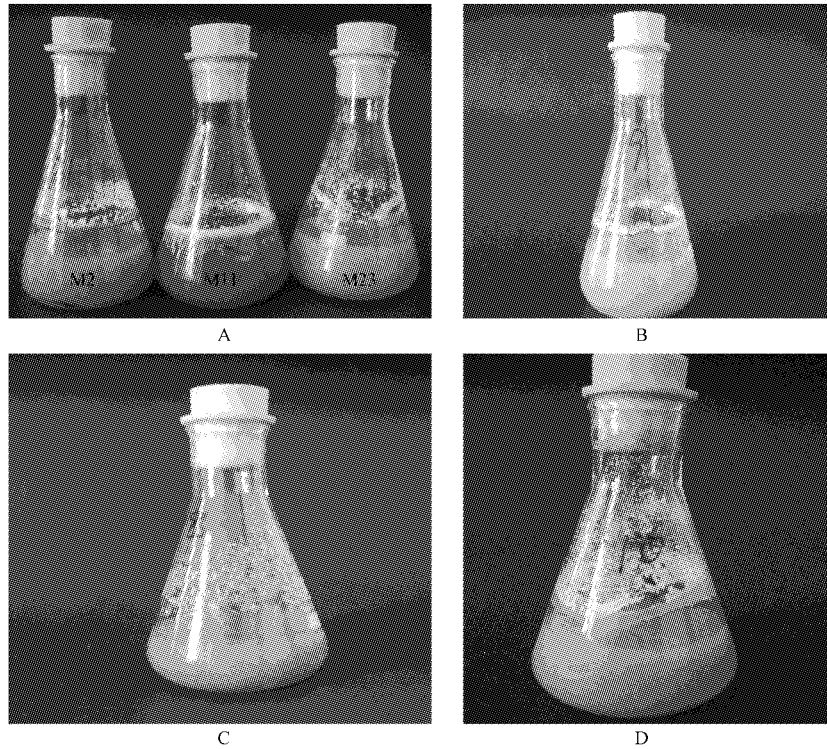
2.2 液体深层培养

从表 2、图 2 可以看出,M10 菌株菌球密度最大,达到 4 957 个·(100mL)⁻¹,菌丝体干质量亦最大,达到 2.445 g·L⁻¹,菌球较细小,萌动时间快;M14 菌株菌丝体干质量最小,为 1.669 g·L⁻¹,萌动时间中等,菌球较小,其它菌株差异不大。

表 2 不同黑木耳菌株液体深层培养的生长情况

Table 2 Growth conditions of selected *Auricularia auricular-judae* in liquid culture

菌株编号 Strain	菌球直径 Diameter of hypha ball /mm	菌球密度 Density of hypha ball /(个·(100mL) ⁻¹)	菌丝体干质量 Dry weight of hypha /(g·L ⁻¹)	菌丝萌动时间 Time of hypha growth	菌球生长情况 Conditions of hypha growth	发酵液性状 Conditions of liquid culture
M2	2.13	4 157	1.461	第 4 天	球状细小,黄白色	黄白色,清亮透明
M4	2.06	3 452	1.792	第 4 天	球状细小,乳白色	黄白色,清亮透明
M10	1.53	4 957	2.445	第 3 天	球状细小,乳白色	黄褐色,清亮透明
M11	1.84	3 934	1.832	第 4 天	球状较小,黄褐色	棕褐色,清亮透明
M13	1.93	4 612	2.247	第 3 天	球状细小,透明	黄褐色,清亮透明
M14	2.72	3 740	1.669	第 4 天	球状较小,乳白色	黄褐色,浑浊
M23	2.15	4 200	2.107	第 3 天	球状细小,乳白色	黄白色,浑浊
M26	1.85	3 600	2.134	第 3 天	球状细小,黄白色	黄褐色,浑浊
M28	2.21	3 150	1.853	第 4 天	球状中等,黄白色	黄白色,浑浊
M32	1.96	3 849	2.076	第 3 天	球状细小,黄白色	黄褐色,浑浊



注:A. M2、M11、M23 菌株液体深层培养菌丝生长情况;B. M4 菌株液体深层培养菌丝生长情况;C. M13 菌株液体深层培养菌丝生长情况;D. M32 菌株液体深层培养菌丝生长情况。

Note: A. Growth conditions of the M2 strain, M11 strain and M23 strain in liquid culture; B. Growth conditions of the M4 strain in liquid culture; C. Growth conditions of the M13 strain in liquid culture; D. Growth conditions of the M32 strain in liquid culture.

图 2 部分黑木耳菌株液体深层培养菌丝生长情况

Fig. 2 Growth conditions of selected *Auricularia auricular-judae* in liquid culture

2.3 栽培试验

由表 3 可知, M10 菌株子实体元宝状, 耳片厚、黑, 有筋, 现耳时间早, 出耳整齐, 污染率低, 平均每袋干耳

产量可达 55 g, 产量最高, 品质最好; M14 菌株污染率最高, 产量最低。

表 3 不同黑木耳菌株子实体生长情况及产量

Fruit grow conditions and yield of selected <i>Auricularia auricular-judae</i>							
菌株编号	现耳时间	出耳整齐度	耳片颜色	耳片形状	干耳厚	污染袋数	每袋产量
Strain	Time of fruit grow/d	Uniformity of fruit grow/%	Color of fruit	Shape of fruit	Thickness of dry fruit/cm	Number of pollution	Bag yield/g
M2	10	100	黑灰	单片, 元宝状	0.21	5	40
M4	13	100	黑灰	单片, 碗状	0.36	6	38
M10	9	100	黑灰	单片, 元宝状	0.33	3	55
M11	9	100	黑灰	单片, 边缘齐	0.28	5	48
M13	11	100	暗灰	单片, 圆边	0.34	4	36
M14	15	100	黑灰	单片, 碗状	0.25	7	29
M23	10	100	灰褐	单片, 元宝状	0.30	5	45
M26	11	100	黑灰	单片, 边缘齐	0.29	4	35
M28	12	100	黑灰	单片, 碗状	0.38	6	31
M32	13	100	黑灰	单片, 碗状	0.24	7	36

3 结论

由该试验可知, M10 菌株的菌丝干质量最大, 达到 $2.445\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 M14 菌株的菌丝干质量最小, 为 $1.669\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; M10 菌株子实产量最高, 品质最好, 而 M14 菌株污染率最高, 产量最低。综上所述, TTC 试验结论与上述 2 个试验结论一致, 表明 M10 菌株细胞活力

最强, M14 菌株细胞活力最弱, 同时也证明 TTC 试验结论的可靠性。

参考文献

[1] 黄春华, 郑壮丽, 梅彩英. 蛹虫草 TTC-脱氢酶测定方法的优化[J]. 环境昆虫学报, 2011, 33(3): 321-328.
[2] 赵连梅, 池勇志, 张春青. TTC-脱氢酶活性测定中标准曲线的影响因素研究[J]. 实验室科学, 2009(4): 72-74.

药用真菌桑黄(*I. sanghuang*)母种培养基的筛选龚光禄¹, 桂 阳¹, 雷 震², 朱国胜¹

(1. 贵州省农作物品种资源研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州惠丰蚕业发展有限公司, 贵州 施秉 556200)

摘 要:以桑黄(*Inonotus sanghuang*)菌种为试材, 采用 PDA 培养基为对照, 设计 5 种不同的母种培养基, 研究了不同培养基对桑黄菌丝生长的影响。结果表明: 配方为木屑 100 g, 马铃薯 100 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 10 g, 水 1 000 mL, pH 自然, 为桑黄母种最适的培养基。

关键词:桑黄; 母种培养基; 生长特性; 筛选

中图分类号:Q 949.32 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)24-0139-03

桑黄主要分布于中美洲、非洲和东亚如中国、日本和韩国等地, 在日本被称为 Meshimakobu 或 Mesima, 在韩国被称为 Sang Hwang, 在中国又称桑臣、桑耳或胡孙眼, 中国传统中医中也有“松根”的别称^[1]。中文“桑黄”通常指的是针层孔菌属(*Phellinus* Quel.)里的火木层孔

菌(*Phellinus igniarius*)、裂蹄木层孔菌(*Phellinus linteus*)、鲍氏层孔菌(*Phellinus baumii* Pilat)3 个种^[2]。在整个东亚地区, 桑黄被广泛用于疾病的预防和治疗, 传统中医中, 桑黄多用于治疗血崩、血淋、脐腹涩痛、脱肛泻血、带下、闭经等妇科疾病^[3]。现代科学研究表明桑黄具有很强的药用价值, 很多成熟产品已经投放市场用于增强免疫力和防治癌症^[1]。

桑黄(*Inonotus sanghuang* Sheng H. Wu, T. hatt & Y. C. Dai)为 2012 年吴声华命名的世界新种, 寄生于桑树上, 其子实体菌盖多数叠生在一起, 马蹄形或不规则形, 幼时柠檬黄至金黄色, 老时土黄色或黄棕色^[4]。2013 年课题组在贵州桑蚕区的老桑树上采集到了类似的菌株, 经过鉴定为桑黄(*I. sanghuang*), 为贵州的新记录种, 并开展了一些列的研究。现着重对桑黄(*I. sanghuang*)

第一作者简介:龚光禄(1985-), 男, 硕士, 研究方向为食药真菌。E-mail: gongguanglu0923@163.com.

责任作者:朱国胜(1971-)男, 博士, 研究员, 研究方向为药用植物伴生菌及食药真菌。E-mail: zgsah@163.com.

基金项目:贵州省农业科技攻关资助项目(黔科合 NY 字[2012]3021 号); 创新能力建设与专项计划资助项目(黔科合服企[2014]4006 号); 贵阳市与省农科院农业科技合作资助项目(院地农科合字[2014]3 号)。

收稿日期:2016-08-04

[3] 刘淑琴, 宫文超, 李春燕. TTC 法细胞酶活力测试技术在北虫草选育中应用[J]. 食用菌, 2005(2): 12-13.

[4] 林清泉, 丘雪红, 郑壮丽, 等. 蛹虫草退化菌株的特征研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(5): 670-677.

[5] 郭俊霞, 李青苗, 曾军秀, 等. 不同来源北虫草菌种的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(22): 9229-9230.

[6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

[7] 何国维, 李伟光, 王瑞雪, 等. 利用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)测定细胞活力的方法与应用[J]. 军事医学, 2014, 38(5): 388-391.

[8] 王立枫, 许修宏, 刘华晶, 等. 黑龙江地区野生黑木耳菌种的指纹分析[J]. 东北农业大学学报, 2011, 4(2): 109-114.

A Fast Test Means of *Auricularia auricular-judae* Hypha Activity in Laboratory

LI Hong, ZHANG Min, XIAO Qianming

(Microbial Engineering Center, Liaoning Academy of Agricultural Science, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: In order to improve *Auricularia auricular-judae* breeding efficiency and cost savings, TTC-dehydrogenase measurement was used to detect *Auricularia auricular-judae* mycelium vitality, and were verified by liquid submerged culture and cultivation test. The results showed that the TTC experiment conclusion with the liquid submerged culture and cultivation test conclusions were consistent, strain M10 cell vitality was the strongest, M14 strain cell vitality was the weakest, TTC-dehydrogenase measurement was proved to reliability. It provided a method of fast detection *Auricularia auricular-judae* mycelium activity in laboratory.

Keywords: TTC; dehydrogenase activity; *Auricularia auricular-judae*; hyphae activity