

木耳种质资源最佳保藏方法

孟秀秀^{1,2}, 李 晓¹

(1. 吉林农业大学 教育部食药食用菌工程研究中心, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以干木耳子实体为试材,采用常温、4℃、-18℃及液氮等方法对子实体进行保藏,1年后进行组织分离、孢子收集、出耳试验以及酸性蛋白酶、漆酶活性试验,研究保藏方式对木耳子实体的影响。结果表明:耳片组织分离后获得菌丝与继代保藏菌丝无拮抗现象,子实体保藏在菌落形态、菌丝生长速度、分解木屑料能力和酶活性方面均优于继代保藏效果;菌落浓度、漆酶和酸性蛋白酶活性与保藏方式相关性显著,可以作为保藏方式的评价指标,漆酶与菌丝分解木屑速度、催芽率和产量相关性显著,漆酶活性越高,菌丝分解木屑速度越快、催芽率越高、产量越高;无保护剂液氮保藏孢子萌发率最高。木耳子实体保藏简单,并能够更好地保持品种性状,其中无保护剂液氮保藏为最佳保藏方式。

关键词:木耳;胶质菌;资源库;保藏

中图分类号:S 646.602.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)15-0141-04

中国是胶质类食用菌生产和消费大国,黑木耳、毛木耳以及银耳的生产总量仅次于双孢菇和香菇,是中国第三大栽培食用菌类,也是中国主要的出口食用菌^[1-2]。木耳等胶质菌类子实体不同于其它食用菌,其子实体干制后处于休眠状态,组织和孢子在适宜的条件下均可重新生长,其干制子实体可以直接进行组织分离得到活力更佳的纯菌种,泡发后子实体可以直接进行孢子收集,用于育种研究。传统木耳菌丝体继代保藏菌种,易退化、老化^[3-4],而且经常转接试管增加了大量时间及污染的概率,如果需要孢子时还需要栽培出耳,增加了育种时间。如何提高木耳菌种的保藏效果、加快育种进程,已成为现阶段亟需解决的问题。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黑木耳子实体、菌丝体是由吉林农业大

学食药食用菌教育部工程中心提供的国家审定品种“吉 AU1 号”。

1.2 试验方法

1.2.1 继代保藏与子实体保藏

选取七八分熟、朵型好、色泽黑、生长健壮、无病虫害的第一茬耳自然风干。将干制后的子实体分别装入离心管内放置于常温、4℃、-18℃及无保护剂和 10% 甘油保护剂液氮罐中。以菌丝体继代保藏为对照组。

1.2.2 组织分离

保藏后耳片常温下放置 24 h 后进行组织分离,将耳片表面用 75% 酒精进行消毒并在无菌条件下分离^[5],分离组织接入 PDA 培养基内,置于 26℃ 恒温培养箱内进行培养。每组处理 3 次重复。

1.3 项目测定

1.3.1 孢子收集及萌发率测定

干耳片表面消毒后在无菌水内浸泡 3 h,取出用无菌滤纸将表面水擦干,采用悬挂法进行孢子收集。将收集到的孢子,接入 PDA 平板培养基内,每隔 12 h 观察 1 次孢子状态,以 1 cm² 培

第一作者简介:孟秀秀(1991-),女,硕士研究生,研究方向为食用菌栽培与育种。E-mail:mxjia@163.com.

收稿日期:2017-03-14

培养基内孢子数量计算孢子萌发情况及萌发率,并拍照记录。

1.3.2 菌丝生长速度及分解木屑能力

菌丝生长速度测定培养基为 PDA,木屑分解能力配方为:木屑 85%、麦麸 12%、豆粉 2%、石膏 0.5%、石灰 0.5%^[6]。每 24 h 记录 1 次培养皿及木屑试管内菌丝生长速度。

1.3.3 酸性蛋白酶和漆酶活性测定

对发酵菌丝体采用 Folin 法^[7]在 24 ℃ 条件下进行胞外酶活性测定,接种后每 8 d 进行 1 次测定;以 ABTS 为底物的方法^[8-9]在 37 ℃ 条件下进行漆酶活性测定,每组 5 次重复。

1.3.4 农艺性状分析

以枝条菌种为原种,栽培种配方为木屑 85%、麦麸 12%、豆粉 1.5%、石膏 1%、石灰 0.5%,灭菌前 pH 7.5。每处理 30 次重复。自菌包培养阶段开始记录各农艺性状。

2 结果与分析

2.1 继代保藏与子实体保藏比较

继代保藏与子实体保藏重新获得菌丝体间无拮抗现象,同时在菌落洁白度(图 1)、生长速度、分解木屑料能力和酶活方面较子实体保藏差,产量低于子实体保藏、品质上无显著性差异(表 1)。

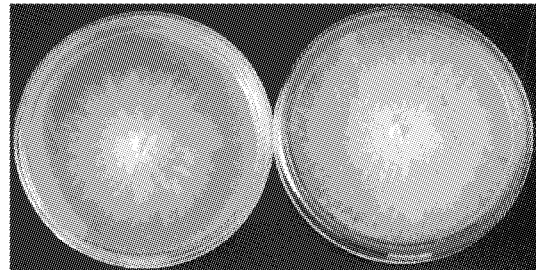


图 1 不同保藏方式菌落形态比较

Fig. 1 Colonial morphology of mycelia preserved with different methods

表 1

继代保藏与子实体保藏比较

Table 1 Comparison between cultures obtained by sub-culturing method and preserved fruiting bodies

处理 Treatment	菌丝生长速度 Mycelial growth rate/(cm · d ⁻¹)	分解木屑料速度 Saw-dust decomposing ability/(cm · d ⁻¹)	菌落密度 Colonial morphology
继代保藏 Sub-culturing	0.410 0±0.005a	0.380 0±0.006a	+
子实体保藏 Preserved fruiting bodies	0.471 6±0.005a	0.405 2±0.005a	++

注:采用 Duncan's multiple range test 方法分析,同一列不同字母表示显著性差异($P=0.01, n=3$),“+”表示菌落浓密程度。下同。

Note: Duncan's multiple range test is used for analysis, values in a column bearing different letters differ significantly ($P=0.01, n=3$), ‘+’ means thickness of mycelia. The same below.

2.2 不同保藏方式组织分离、孢子萌发和菌落形态比较

由图 2、表 2 可知,耳片在 10%甘油作为保护剂条件下在液氮中保藏 1 年后耳片胶质发生改变,无法进行孢子收集和组织分离获得菌丝体;耳片在无保护剂的液氮中保藏 1 年后可以通过组织分离获得菌种,且其孢子萌发速度和萌发率比其它保藏方式高,是育种材料保藏的最佳方式。组织分离获得菌种经纯化后,菌落形态有明显差别,其中无保护剂液氮保藏菌落最浓密,4 ℃ 最稀疏;同时,无保护剂液氮保藏耳片孢子萌发最快,且萌发率最高,常温保藏耳片孢子萌发最慢,且萌发率最低。

2.3 不同保藏方式生长速度、分解木屑能力比较

由表 3 可知,经过处理耳片重新获得菌丝体

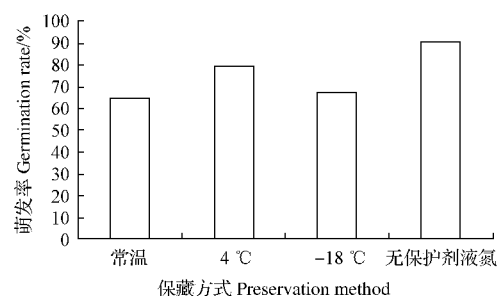


图 2 不同保藏方式 48 h 孢子萌发率

Fig. 2 Germination rate after 48 hours with different preservation methods

后其生长速度及分解木屑料能力均存在差异,4 ℃ 保藏菌丝生长速度最大,常温保藏耳片获得菌丝分解木屑料能力最强,对照组在菌丝生长速度及分解木料能力方面均低于处理组。

表 2 不同保藏方法组织分离、孢子萌发和菌落状态比较

Table 2 Comparison of tissue isolation, spore germination and colonial morphology among fruiting bodies preserved with different methods

处理 Treatment	组织分离 Issue isolation			孢子萌发 Spore germination			萌发率 Germination ratio/%	菌落浓度 Colonial morphology
	12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h		
常温 Room temperature	无变化	萌发		无变化	萌发		85.6	++
4 ℃	无变化	萌发		萌发			91.4	+
−18 ℃	无变化	无变化	萌发	萌发			86.2	++
无保护剂液氮								
Liquid N ₂ without protective agent	无变化	萌发		萌发			90.6	+++
液氮(10%甘油)								
Liquid N ₂ with 10% glycerin	无变化	无变化	无变化	未收集到孢子			0	—

表 3 菌丝生长速度、分解木屑能力比较

Table 3 Comparison of growth rate and saw-dust decomposing ability cm · d⁻¹

处理 Treatment	菌丝生长速度 Mycelium growth rate	分解木屑料速度 Saw-dust decomposing speed
CK	0.423 0±0.021a	0.298 6±0.008a
常温 Room temperature	0.436 3±0.017a	0.403 0±0.008b
4 ℃	0.570 0±0.020b	0.406 7±0.013b
−18 ℃	0.453 3±0.020a	0.399 6±0.006b
无保护剂液氮 Liquid N ₂ without protective agent	0.430 0±0.010a	0.401 3±0.008c

2.4 不同保藏酸性蛋白酶、漆酶活性比较

由图 3、4 可知,继代保藏酸性蛋白酶活性最高,漆酶活性最低;无保护剂液氮保藏漆酶活性最高。酸性蛋白酶活性和漆酶活性与保藏方式相关性显著,可作为保藏方式的评价指标。

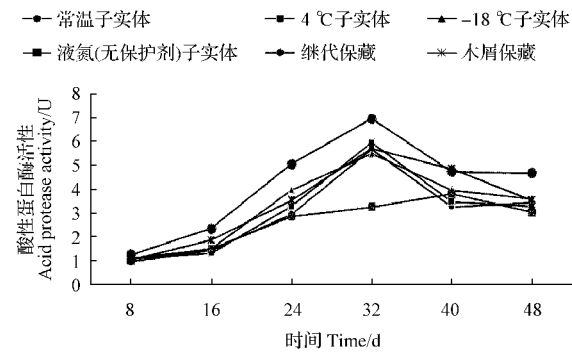


图 3 酸性蛋白酶活性比较

Fig. 3 Comparison of acid protease activities

2.5 农艺性状分析

由表 4 可知,子实体保藏其耳芽形成时间、原基形成时间及一致性方面均优于继代保藏,同时产量高于继代保藏,质量无明显差异性;子实体保藏中 4 ℃保藏及液氮无保护剂保藏耳芽形成集中,无保护剂液氮产量最高、−18 ℃产量最低,这与酶活结论一致。

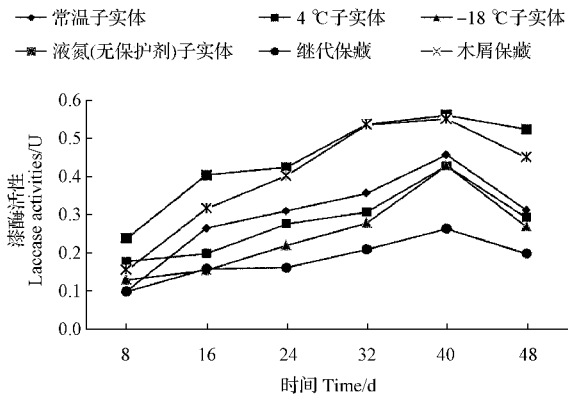


图 4 漆酶活性比较

Fig. 4 Comparison of laccase activities

3 讨论

通过子实体保藏与继代保藏方法对比,发现子实体保藏优于继代培养。木耳子实体在 10% 甘油中或许因为有机溶剂使胶质结构发生改变,无法组织分离获得菌丝体,也无法收集到孢子,不能作为木耳种质资源的保藏方式。酸性蛋白酶活性、漆酶活性、菌落密度和分解木屑速度均可作为保藏方式的评价指标,其中漆酶为最佳评价指标。漆酶活性与产量相关性显著与相关报道^[7,10]漆酶

表 4

不同保藏方式产量比较

Table 4

Comparison of yield with different preservation methods

处理 Treatment	采集数量 Number of pieces of fruiting bodies picked/(片·包 ⁻¹)						出芽率	转化率
	第一茬	第二茬	第三茬	第四茬	第五茬	第六茬	Pinning	Transformation
	1 st flush	2 nd flush	3 rd flush	4 th flush	5 th flush	6 th flush	ratio/%	rate/%
继代 Sub-culturing	17	58	46	43	24	16	87.2	129.0
常温 Room temperature	18	50	43	37	32	26	88.0	130.4
4 ℃	13	86	98	15	—	—	90.6	139.6
—18 ℃	10	53	48	42	27	25	87.6	129.8
无保护剂液氮 Liquid N ₂ without protective agent	24	82	87	19	—	—	90.6	140.6

活性与产量呈正相关结论一致。

该研究表明,子实体作为种质资源保藏的主体操作简单,且能更好的保持原有种性,同时相关文献报道,木耳子实体保藏 30 年后仍可以分离出纯菌丝体,在木耳种质资源库的建立中,子实体较菌丝体更适合作为保藏主体。

参考文献

- [1] 李玉. 中国黑木耳[M]. 长春: 长春出版社, 2001: 12-26.
[2] 李黎. 中国木耳栽培种质资源的遗传多样性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
[3] 杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1988: 167-180.

- [4] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 36-48.
[5] 李晓, 孟秀秀, 代月婷. 黑木耳简单快速组织分离新法[J]. 中国食用菌, 2014, 33(56): 11-12.
[6] 张介驰, 戴肖东, 张丕奇. 黑木耳菌种保藏方法的比较研究[J]. 中国食用菌, 2007, 26(5): 16-18.
[7] 韩增华, 张丕奇, 孔祥辉. 黑木耳胞外酶活变化与栽培性状比较的研究[J]. 食用菌学报, 2007, 14(4): 41-46.
[8] 赵爽, 刘宇, 许峰. 姬松茸 4 个品种菌丝体的生物酶活性测定[J]. 中国食用菌, 2010, 29(3): 32-33.
[9] 张金霞, 张树庭. 草菇菌种保藏效果鉴定的研究[J]. 中国食用菌, 1992(4): 3.
[10] 刘新锐, 宋秀高, 邱昌颖. 不同保藏方法对香菇菌种酶活性影响[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(1): 170-174.

Optimum Preservation Method of Germplasm Resources of *Auricularia auricular-judae*

MENG Xiuxiu^{1,2}, LI Xiao¹

(1. Engineering Research Centre of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Dry fruiting bodies were used as research material, the fruiting bodies were preserved in room temperature, 4 ℃, -18 ℃ and liquid nitrogen (N₂) and taken out in one year for tissue isolation, spore collection, fruiting experiment, as well as acid protease and laccase activity testing, with mycelia preserved with normal sub-culturing method as control. The effect of the preservation method on the fruiting body was studied. The results showed that colony morphology, the mycelial growth rate, sawdust decomposing ability and enzymatic activity were all better than that of the subculture. Colony concentration, laccase and acid protease were the main factors affecting the mycelium growth. The correlation between the activity and the preservation method was significant. The correlation between laccase and mycelium decomposition speed, germination rate and yield was significant. The higher the laccase activity, the faster the mycelium decomposed wood chips, the higher the germination rate, the higher the yield, the higher the spore germination rate. Liquid N₂ without protective agent had the highest spore germination rate. The results showed that the fruiting bodies of the fungus were simple and had better preservation of the traits of the cultivars, and the unprotected liquid nitrogen was the best preservation method.

Keywords: *Auricularia auricular-judae*; gelatinous fungi; germplasm resource; preservation