

李艳丽, 金周雨, 李 玉. 刺芹侧耳原生质体的再生及多糖含量差异[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 255–257.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.073

刺芹侧耳原生质体的再生及多糖含量差异

李艳丽¹, 金周雨¹, 李 玉²

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林长春 130118; 2. 食药菌教育部工程研究中心, 吉林长春 130118)

摘要:采用溶壁酶进行刺芹侧耳菌丝原生质体的制备, 研究培养基、渗透压稳定剂和稀释剂 PPRL 对原生质体再生率的影响, 以从中筛选原生质体再生的最佳培养条件。对再生菌丝进行发酵培养, 提取原生质体再生菌株菌丝胞内多糖(IPS)、发酵液胞外多糖(EPS), 并进行含量测定。结果表明: 最佳再生培养基为 PPR, 渗透压稳定剂、稀释剂均为 0.6 mol/L 甘露醇; 此时原生质体经过 14 d 左右的培养可再生出白色菌落, 再生率为 0.76%; 原生质体再生菌丝 IPS、EPS 含量差异明显, 多株高于亲本菌株。研究结果为刺芹侧耳高产多糖菌株的选育奠定了前期基础。

关键词:刺芹侧耳; 多糖含量; 原生质体; 再生率

中图分类号: S646.1⁺41.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0255-03

刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*) 别称杏鲍菇, 是一种珍稀美味食用菌^[1], 它不但营养丰富^[2], 而且具有保健功能^[3-5]。近年的研究表明, 刺芹侧耳富含药理学活性的多糖, 展现了较强的抗氧化作用^[6]、抗肿瘤活性^[7-8]以及降脂活性^[9]。因此可知, 刺芹侧耳及其多糖已经逐渐成为人们研究的热点。

原生质体是一种具有生物全能性的细胞, 在食用菌的遗传育种领域具有重要应用^[10-12]。本研究探索再生条件对刺芹侧耳原生质体再生率的影响, 旨在筛选出再生率最高的培养条件; 同时对原生质体再生菌株菌丝胞内多糖(IPS)、发酵液胞外多糖(EPS)进行提取, 并测定其含量, 以期对刺芹侧耳高产多糖菌株的选育奠定前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株为刺芹侧耳菌株 HB3, 购自吉林省高新技术园区。溶壁酶购自广东省微生物研究所。

培养基及其配方如下。PDR: 200 g 马铃薯、2 g 葡萄糖、20 g 琼脂粉、0.6 mol/L 甘露醇, 用蒸馏水补足至 1 000 mL。

POR: 在 PDR 中添加 3 g KH_2PO_4 、1.5 g MgSO_4 、10 mg 维生素 B₁。PPR: 在 POR 中添加 2 g 蛋白胨、2 g 酵母膏。CMR: 20 g 葡萄糖、2 g 蛋白胨、2 g 酵母膏、0.46 g KH_2PO_4 、1.0 g K_2HPO_4 、0.5 g MgSO_4 、20 g 琼脂粉、0.6 mol/L 甘露醇, 用蒸

馏水补足至 1 000 mL。PMR: 10 g 麦芽糖、4 g 葡萄糖、4 g 酵母膏、1.0 g KH_2PO_4 、1.0 g MgSO_4 、10 g 可溶性淀粉、20 g 琼脂粉、0.6 mol/L 甘露醇, 用蒸馏水补足至 1 000 mL。YPR: 30 g 玉米粉、20 g 葡萄糖、1.0 g 蛋白胨、1.0 g KH_2PO_4 、0.5 g MgSO_4 、20 g 琼脂粉、0.6 mol/L 甘露醇, 用蒸馏水补足至 1 000 mL。

以上培养基于 121 ℃ 高压灭菌 20 min, 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 原生质体的制备 采用相应文献的方法^[13]。

1.2.2 原生质体的再生 将原生质体悬液用 0.6 mol/L 甘露醇适当稀释, 取 100 μL 涂布于再生培养基中, 置于 25 ℃ 恒温培养箱中避光培养, 同时用蒸馏水稀释原生质体悬液作为空白对照。再生率计算公式:

再生率 = 再生培养基中菌落数/涂布的原生质体数 × 100%。

1.2.3 培养基种类对再生率的影响 用“1.1”节中培养基进行原生质体再生, 考察其对再生率的影响。

1.2.4 渗透压稳定剂对再生率的影响 以甘露醇、蔗糖、 MgSO_4 、NaCl 作为渗透压稳定剂, 分别考察其在浓度为 0.4、0.6、0.8 mol/L 时对再生率的影响。

1.2.5 PPRL 对再生率的影响 PPRL 为 PPR 的液体培养基, 考察其对原生质体再生率的影响。

1.2.6 再生菌株多糖的发酵培养、提取及含量的测定 随机筛选原生质体再生菌株 10 株(编号为 SH1 至 SH10), 先经 PPA(无 0.6 mol/L 甘露醇的 PPR)活化培养, 然后用直径 1 cm 打孔器取出 2 块菌丝, 接种在 CMA(无 0.6 mol/L 甘露醇的 CMR 液体培养基)中, 于 25 ℃、160 r/min 培养 5~6 d,

收稿日期: 2015-04-28

基金项目: 吉林农业大学科研启动基金(编号: 201030)。

作者简介: 李艳丽(1978—), 女, 吉林松原人, 博士, 副教授, 研究方向为食用菌种质资源创新与生理活性物质开发。E-mail: nongdalyl@163.com。

参考文献:

- [1] 张绍铃, 徐义流, 陈迪新, 等. 梨树授粉不结实的原因及授粉品种的选择[J]. 中国南方果树, 2002, 31(6): 52-54.
- [2] 关军锋. 果实品质研究[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2001: 412-414.

- [3] 龙淑珍, 何永群. 荔枝可滴定酸与维生素 C 的测定及其相关性[J]. 广西农业科学, 2002(4): 188-189.
- [4] 李 军. 钼蓝比色法测定还原型维生素 C[J]. 食品科学, 2000, 21(8): 42-45.
- [5] 周先章. 翠冠梨人工授粉技术[J]. 浙江柑橘, 2005, 22(3): 40-41.

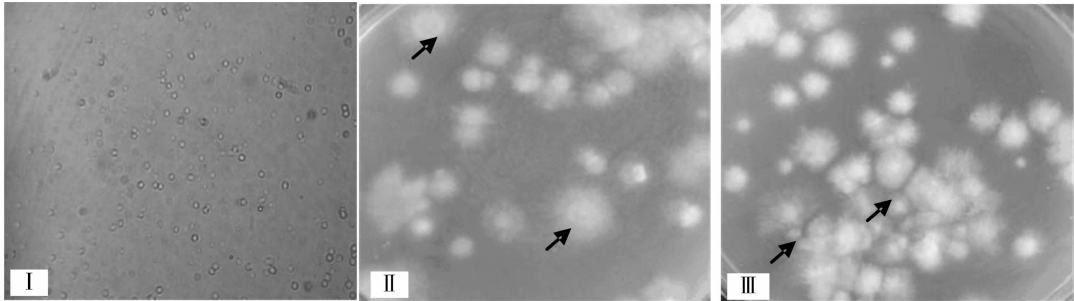
转接至 CMA 加富培养基(CMA 中添加 20 g 玉米浸汁)中,于 25 ℃、160 r/min 培养 9 d,真空抽滤菌丝,冷冻干燥。采用相应文献方法提取 IPS、EPS^[14],采用苯酚硫酸法测定含量^[15]。

2 结果与分析

2.1 原生质体的制备及再生

由图 1 可见:镜检下原生质体呈现球状,无残余菌丝片段,说明采用本试验方法可获得纯净的刺芹侧耳原生质体,且

产量较高,达到 6.34×10^7 个/mL。经过 12~14 d 的培养,原生质体可以萌发出幼眼可见的白色菌落,空白对照则无再生菌落生长,进一步说明原生质体纯化较好。经过一段时间的培养,可见菌落形态各异,或浓密,或稀疏,且大小不等。有的菌落形态较特殊,中心、外周突起,形成 1 个环状凹陷(图 1—II 中箭头指示);有的菌落间会产生拮抗(图 1—III 中箭头指示)。这些现象表明,再生菌落之间遗传性状差异明显。



I—纯化的原生质体; II、III—再生菌落
图1 刺芹侧耳原生质体的制备及再生(400×)

2.2 培养基种类对再生率的影响

培养基种类对再生率的影响如图 2 所示:PPR 培养基再生率最高,为 0.76%;其次是 PMR、YPR、CMR,再生率与 PPR 相差不明显;再次是 POR、PDR,它们的再生率明显偏低,PDR 的再生率仅为 0.32%。

此外,原生质体在不同培养基中再生菌落时间并不一致。在 YPR 中约 12 d,而在其他培养基中约 14 d,可见再生培养基成分对原生质体再生率有较大影响。综上可知,PPR、PMR、YPR、CMR 均有利于原生质体的再生,可作为再生培养基使用,本试验选取 PPR 作为最终再生培养基。

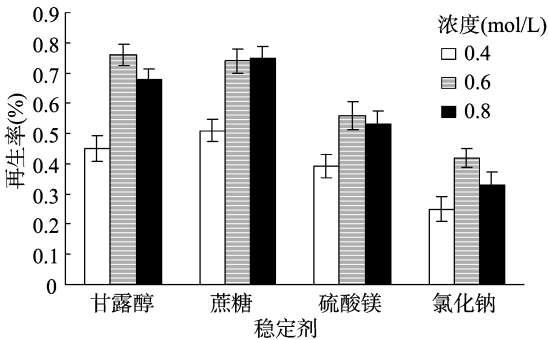


图3 渗透压稳定剂对再生率的影响

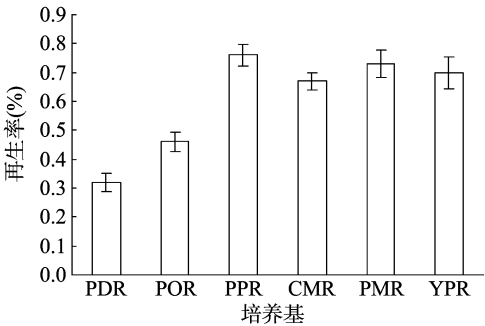


图2 再生培养基对再生率的影响

2.3 渗透压稳定剂对再生率的影响

由图 3 可知:甘露醇、蔗糖作为渗透压稳定剂的再生率明显高于无机渗透压稳定剂 $MgSO_4$ 、 $NaCl$,且再生率与渗透压稳定剂的浓度明显相关,当浓度为 0.6 mol/L 时(除 0.8 mol/L 蔗糖),原生质体的再生率最高,其次是 0.8 mol/L,浓度为 0.4 mol/L 时再生率最低。0.6 mol/L 的甘露醇再生率达到 0.76%,0.4 mol/L $NaCl$ 再生率仅为 0.25%。综上可知,0.6 mol/L 甘露醇、0.6~0.8 mol/L 蔗糖均有助于刺芹侧耳原生质体的再生,可作为渗透压稳定剂使用,因此本试验选取 0.6 mol/L 甘露醇作为最终的渗透压稳定剂。

2.4 PPRL 对再生率的影响

由图 4 可知:PPRL 作为稀释剂,再生率明显低于 0.6 mol/L 甘露醇,仅为 0.46%,说明 0.6 mol/L 甘露醇更有利于原生质体的再生。

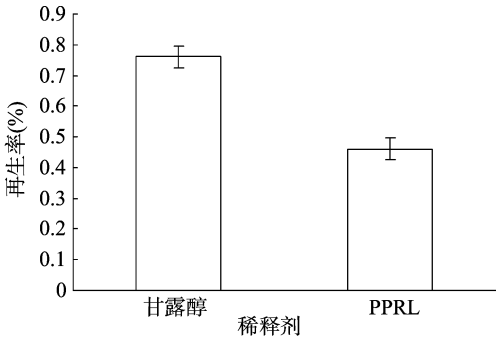


图4 原生质体稀释剂对再生率的影响

2.5 多糖含量的测定结果

由表 1 可知:原生质体再生菌株与亲本菌株的 IPS、EPS 含量差异均较大,有 4 株再生菌株 IPS 含量高于亲本菌株 HB3,分别为 SH3、SH4、SH5、SH7,其中 SH7 最高,为 (127.8 ± 3.2) mg/g,比亲本菌株高 34.8%;有 6 株再生菌株 EPS 含量高于亲本菌株,分别为 SH1、SH2、SH4、SH6、SH8、SH9,其中

SH9 的 EPS 含量最高,为(324.4 ± 8.3) mg/L,比亲本菌株高 42.1%。其他几株菌株的 IPS、EPS 含量或接近或低于亲本菌株。

表 1 原生质体再生菌株、亲本菌株的 IPS、EPS 含量

菌株	IPS 含量 (mg/g)	EPS 含量 (mg/L)
HB3	94.8 ± 2.5	228.3 ± 6.1
SH1	77.5 ± 1.1	278.3 ± 7.8
SH2	79.8 ± 1.7	277.4 ± 8.4
SH3	105.8 ± 1.8	215.3 ± 7.3
SH4	104.3 ± 3.4	229.1 ± 7.5
SH5	103.5 ± 2.2	194.9 ± 6.2
SH6	90.4 ± 2.6	281.0 ± 8.2
SH7	127.8 ± 3.2	206.3 ± 7.0
SH8	86.8 ± 2.0	285.4 ± 7.9
SH9	85.5 ± 3.1	324.4 ± 8.3
SH10	83.6 ± 2.8	182.1 ± 5.5

3 讨论与结论

原生质体酶解后需要过滤纯化除去残余的菌丝片段,以减少对原生质体后续操作的影响。本研究通过溶壁酶制备系统较好地实现了原生质体的纯化。原生质体再生受到多种因素的影响^[16-18],但有关刺芹侧耳原生质体最佳再生条件的研究鲜有报道。

本研究设计了不同的培养基、渗透压稳定剂及稀释剂,以期筛选最佳再生条件。结果显示:PPR 培养基为最佳再生培养基,再生率是 PDR 的 2.37 倍。笔者认为,与 PDR 相比,PPR 含有蛋白胨、酵母膏等营养物质,它们更有利于原生质体再生为菌丝。0.6 mol/L 甘露醇作为最佳渗透压稳定剂,再生率比 0.4 mol/L NaCl 高 2.04 倍。一般认为,有机渗透压稳定剂比无机渗透压稳定剂更有利于食用菌原生质体的再生^[16-17],本试验结果与其一致。有报道称,真菌细胞壁成分主要为葡萄糖、几丁质^[19];笔者认为,甘露醇、蔗糖等糖醇类有机渗透压稳定剂更有利于转化为真菌的细胞壁物质,这是再生率高的主要原因。

再生菌株、亲本菌株 IPS、EPS 含量测定结果表明,经原生质体再生的菌丝多糖含量与亲株相比差异明显,有几株多糖含量分别高于亲株,暗示其遗传物质可能发生了变异,这点通过再生菌丝的形态和菌丝间拮抗也可以得到初步证实。通过原生质体再生筛选刺芹侧耳高产多糖菌株鲜有报道,因此这些菌株的获得具有一定的理论和实际参考价值。

参考文献:

[1] 郭美英. 珍稀食用菌杏鲍菇生物学特性的研究[J]. 福建农业学报,1998,13(3):45-50.

[2] Reis F S,Barros L,Martins A,et al. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms;an inter - species comparative study [J]. Food and Chemical Toxicology,2012,50(2):191-197.

[3] Mori K,Kobayashi C,Tomita T,et al. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake),and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E - deficient mice[J]. Nutrition Research,2008,28(5):335 -

342.

[4] Cha W S,Park S S,Kim S J,et al. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid - state conditions using corn cob[J]. Bioresource Technology,2010,101(16):6475-6481.

[5] Han E H,Hwang Y P,Kim H G,et al. Inhibitory effect of *Pleurotus eryngii* extracts on the activities of allergic mediators in antigen - stimulated mast cells[J]. Food and Chemical Toxicology,2011,49(6):1416-1425.

[6] Liu X,Zhou B,Lin R,et al. Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus* sp. mycelium[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2010,47(2):116-119.

[7] Shenbhagaraman R,Jagadish L K,Premalatha K,et al. Optimization of extracellular glucan production from *Pleurotus eryngii* and its impact on angiogenesis [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2012,50(4):957-964.

[8] Jing X Y,Mao D B,Geng L J,et al. Medium optimization,molecular characterization,and bioactivity of exopolysaccharides from *Pleurotus eryngii*[J]. Archives of Microbiology,2013,195(10/11):749-757.

[9] Chen J J,Yong Y Y,Xia X,et al. The excreted polysaccharide of *Pleurotus eryngii* inhibits the foam - cell formation via down - regulation of CD36[J]. Carbohydrate Polymers,2014,112(21):16-23.

[10] Kuo C Y,Huang C T. A reliable transformation method and heterologous expression of beta - glucuronidase in *Lentinula edodes* [J]. Journal of Microbiological Methods,2008,72(2):111-115.

[11] Zhang J J,Shi L,Chen H,et al. An efficient Agrobacterium - mediated transformation method for the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*[J]. Microbiological Research,2014,169(9/10):741-748.

[12] Sun S J,Li X J,Ruan L Y,et al. A novel breeding strategy for new strains of *Hypsizygus marmoreus* and *Grifola frondosa* based on ligninolytic enzymes [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2014,30(7):2005-2013.

[13] 李艳丽,金周雨,李 玉. 刺芹侧耳原生质体酶解条件的优化 [J]. 食品科学,2010,31(10):155-158.

[14] Shih I L,Pan K,Hsieh C Y. Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*[J]. Process Biochemistry,2006,41(5):1129-1135.

[15] Dubois M,Gilles K A,Hamilton J K,et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry,1956,28(3):350-356.

[16] Yan P S,Jiang J H,Cui W S. Characterization of protoplasts prepared from the edible fungus, *Stropharia rugoso - annulata* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2004,20(2):173-177.

[17] 韩华丽,郭成金. 黄伞原生质体制备与再生条件研究[J]. 天津师范大学学报:自然科学版,2008,28(4):9-12.

[18] 陈 鹏,郭成金. 金针菇原生质体制备和再生探究[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):200-204.

[19] 邱景芸,廖汉泉,吴月嫦. 一种溶高等担子菌细胞壁酶的制备 [J]. 遗传,1982,4(4):13-14,24.