

杨焕玲, 查磊, 赵妍, 等. 新型香菇母种培养基的筛选[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(3): 124–126.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.031

新型香菇母种培养基的筛选

杨焕玲^{1,2}, 查磊², 赵妍², 黄建春², 隗加香², 陈明杰^{1,2}

(1. 南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095; 2. 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403)

摘要:以香菇菌株 18 为材料, 通过对不同培养基的香菇菌丝生长状况的评价、菌丝生长速度及生物量的分析, 以筛选出新型的香菇母种培养基。结果表明, 与基础 PDA 培养基相比, 添加海藻糖的新型培养基对香菇菌丝的生长具有一定的积极作用, 能够促进菌丝的生长速度, 有助于菌丝生物量的增加, 但不改变其蛋白质组成。综合来看, PDA 培养基(马铃薯 200 g, 琼脂 15 g, 葡萄糖 10 g, 海藻糖 10 g, 蒸馏水 1 000 mL)、PTA-2 培养基(马铃薯 200 g, 琼脂 15 g, 海藻糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL)更适合香菇 18 菌丝的培养。

关键词:香菇; 培养基; 生长速度; 生物量; SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)

中图分类号: S646.1⁺20.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)03-0124-03

香菇(*Lentinula edodes*)在分类学上属于担子菌门(Basidiomycota)、伞菌纲(Agaricomycetes)、伞菌目(Agaricales)、光茸菌科(Omphalotaceae)、香菇属(*Lentinula*) (Available online: <http://www.mycobank.org/>)。香菇味道鲜美, 肉质细嫩, 具有独特的香气和丰富的营养, 含有较高的蛋白质、维生素以及多种类型的矿质元素, 有着山珍、菇中之王等美称^[1-2]。香菇具有延缓衰老、防癌抗癌、降血脂血压及胆固醇、提高机体免疫功能等作用^[3], 因此香菇具有很高的食用价值, 市场广阔, 是世界上第二大食用菌, 提高其产量及品质具有重要意义^[4]。

食用菌的培养基是保藏菌种的关键, 同时也是生产上获得高产稳产的重要前提^[5-6]。目前, 香菇常使用的固体培养基主要为马铃薯葡萄糖培养基(PDA 培养基)^[7], 同时也存在其他少数类型的培养基, 例如用农副产品或金银花藤浸出液制作的香菇母种培养基^[8-9], 富硒香菇液体培养基^[10-11], 产多糖的液体发酵培养基^[12], 碳源、氮源等优化的香菇培养基^[13-14]等。海藻糖是一种非还原性二糖, 广泛存在于各种生物体内, 能够增强生物体对高温、脱水、干旱、冷冻、高渗透性、重金属及有毒试剂等逆境的抵抗能力^[15]。通过外源添加的方式, 海藻糖在菌体外部形成保护膜, 能起到较好的非特异性保护细胞, 使生物膜和蛋白质等在不良环境中免受伤害, 并且使菌体不受自身代谢产物影响的作用^[16-17]。本试验采用添加海藻糖的培养基, 对香菇 18 菌株进行培养, 将它与常用的基础 PDA 培养基进行比较, 筛选最佳培养基, 不仅丰富了生产上的培养基种类, 也在菌种保藏、交替使用培养基防止菌种退化及菌种抗逆等方面具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

香菇菌株 18 由上海市农业科学院食用菌研究所提供。

1.2 培养基种类

PDA 固体培养基: 马铃薯 200 g, 琼脂 15 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

PDA 液体培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

PDTA 固体培养基: 马铃薯 200 g, 琼脂 15 g, 葡萄糖 10 g, 海藻糖 10 g, 蒸馏水 1 000 mL。

PDTA 液体培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 10 g, 海藻糖 10 g, 蒸馏水 1 000 mL。

PTA-2 固体培养基: 马铃薯 200 g, 琼脂 15 g, 海藻糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

PTA-2 液体培养基: 马铃薯 200 g, 海藻糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

PTA-5 固体培养基: 马铃薯 200 g, 琼脂 15 g, 海藻糖 50 g, 蒸馏水 1 000 mL。

PTA-5 液体培养基: 马铃薯 200 g, 海藻糖 50 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.3 固体及液体培养方法

所有培养基均在 121 ℃ 下灭菌 20 min, 冷却后待接种。在紫外线灭菌 30 min 后的超净工作台上, 选用相同生长状况的香菇菌丝进行接种。固体培养在 25 ℃ 恒温培养箱中黑暗条件下进行培养, 液体培养在 25 ℃、150 r/min 转速的恒温摇床中黑暗条件下进行培养。

1.4 香菇菌丝生长情况及蛋白组成的测定

1.4.1 菌丝生长状态及生长速度的测定 在长满菌丝的 PDA 固体培养基上, 分别用直径为 5 mm 的打孔器沿菌落边缘打孔, 将菌块接种于不同类型的固体培养基上, 在 25 ℃ 黑暗条件下进行培养, 每天定时观察菌丝的生长形态^[18]。分别在接种后培养 4、6、8 d 用十字交叉法测量菌落半径, 菌落半径差值(mm)与生长时间(d)的比值即为菌丝生长速度

收稿日期: 2018-08-31

基金项目: 国家食用菌产业技术体系建设专项(编号: CARS-20)。

作者简介: 杨焕玲(1994—), 女, 山东泰安人, 硕士, 主要从事食用菌生理生化研究。E-mail: 2016816126@njau.edu.cn。

通信作者: 陈明杰, 博士, 研究员, 主要从事食用菌栽培及生理研究。E-mail: mjchen@saas.sh.cn。

(mm/d)。每组重复 3 次,计算菌丝平均生长速度并且在培养 10 d 时对菌丝菌落形态进行拍照。

1.4.2 菌丝生物量的测定 接种后的液体培养基在 25 ℃ 恒温摇床中黑暗条件下培养到 10 d 时,菌丝基本长满摇瓶,处于生长旺盛阶段,10 d 时收集香菇菌丝。用烘干至恒质量(m_1)的滤纸过滤,将菌丝体与滤纸共同烘干至恒质量(m_2),计算菌丝体干质量 $m = m_2 - m_1$,每个处理设置 3 次重复。

1.4.3 SDS-PAGE 电泳分析 将在液体培养基中培养 10 d 的菌丝进行收集,采用 TCA(三氯乙酸)/丙酮法提取蛋白质,并用浓度为 12.5% 的凝胶进行 SDS-PAGE 电泳分析蛋白质组成。

2 结果与分析

2.1.1 不同培养基对香菇菌丝生长状况的影响 将接种后的培养皿置于 25 ℃ 培养箱中黑暗条件下培养,分别在接种后

4、6、8、10 d 比较观察菌丝生长状态,记录菌丝色泽、边缘整齐度以及菌落长势,并划分如下长势等级:菌丝洁白粗壮,菌落浓密,菌丝分支多且密,长势好,边缘整齐则标记为 +++;菌丝中等粗壮,菌落浓密,微黄,菌丝分支中等,边缘较整齐记为 ++;菌丝纤细绒毛状,微黄至黄褐色,菌落稀疏,边缘不整齐则记为 +^[19]。

香菇在 4 种培养基上 10 d 的生长状况见图 1,菌丝生长状况评价见表 1。香菇菌丝在 PDA 培养基上生长状况良好,菌丝洁白微黄,菌落较稀疏,菌丝中等粗壮且分支中等,边缘整齐;在 PDTA 培养基上长势较好,菌丝洁白微黄,菌丝中等粗壮且菌落较浓密,菌落边缘整齐;在 PTA-2 培养基上长势最好,菌丝洁白粗壮,菌落浓密,菌丝分支多且密,边缘整齐;在 PTA-5 培养基上长势良好,菌丝洁白微黄,菌落较浓密,菌丝分叉多,边缘整齐。

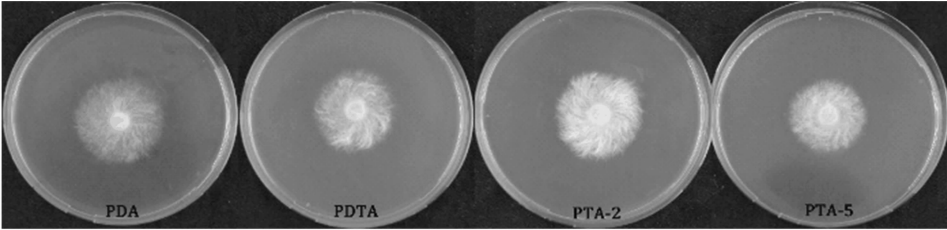


图1 不同培养基上香菇的菌落生长形态

表 1 不同培养基上的香菇菌丝和菌落生长状况

培养基	色泽	边缘整齐度	菌丝分叉	菌落疏密程度	长势
PDA	洁白微黄	整齐	一般	较稀疏	++
PDTA	洁白微黄	整齐	较多	密集	++
PTA-2	洁白	整齐	较多	密集	+++
PTA-5	洁白微黄	整齐	较多	密集	++

2.1.2 不同培养基对香菇菌丝生长速度的影响 香菇在不同的培养基上的菌丝生长速度测定结果(图 2)表明,添加海藻糖的培养基对菌丝的生长速度具有不同程度的提高作用。以基础培养基 PDA 为对照,添加海藻糖的培养基中菌丝生长速度与对照具有显著性差异,其中 PDTA 培养基中菌丝生长速度与对照具有极显著性差异。

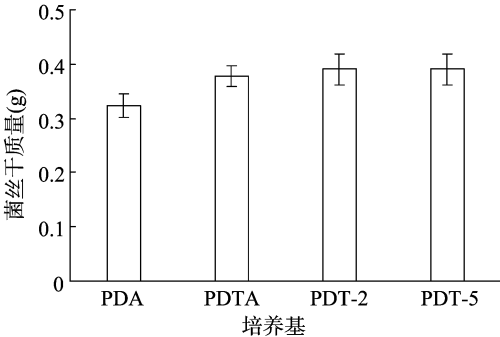


图3 不同培养基上香菇菌丝生物量

度提高,但均未达到显著性差异。

2.1.4 SDS-PAGE 电泳 收集不同培养基培养的香菇菌丝,采用 TCA/丙酮法提取蛋白质后进行 SDS-PAGE 电泳,结果(图 4)表明,新培养基的菌丝蛋白质条带组成与基础培养基培养的菌丝蛋白质条带组成无区别,说明添加海藻糖的

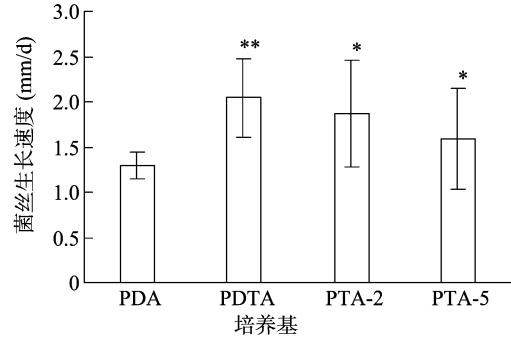


图2 不同培养基上香菇菌丝的生长速度

2.1.3 不同培养基对香菇菌丝生物量的影响 香菇在不同的培养基中培养的菌丝生物量测定结果(图 3)表明,添加海藻糖的培养基对菌丝生物量具有不同程度的提高作用。与对照相比,香菇在不同培养基中培养后的生物量均有一定程

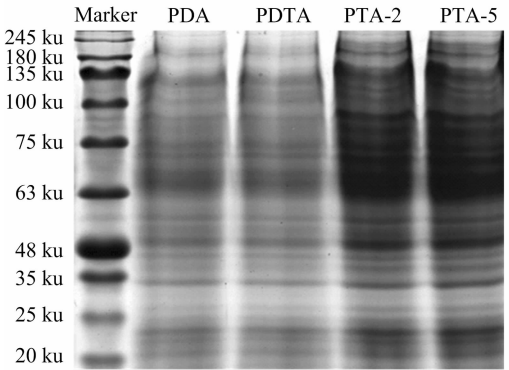


图4 不同培养基中香菇菌丝的 SDS-PAGE 电泳结果

培养基并不会改变香菇菌丝的蛋白质组成。

3 讨论与结论

香菇新型母种培养基的筛选对香菇菌种的保藏以及生产上高产的稳定性具有重要影响。添加海藻糖的培养基能为香菇菌丝生长提供良好的营养和空间环境,且制作方法简单,能够显著加快菌丝的生长,一定程度上提高菌丝生物量,具有间接增加经济效益的潜力。海藻糖作为一种稳定的非还原性二糖,具有防止蛋白质变性^[20]的作用,而且积累到一定的水平,会响应于高温^[21-22]、碳和氮饥饿^[23-25]、氧自由基^[26]、脱水^[27-28]、冷胁迫^[29]、冷冻^[28]、甲苯及乙醇^[30]等引发的胁迫性应激^[20,31-32]。添加海藻糖培养基的使用,不但能够为香菇菌丝提供营养来源,而且有助于增强香菇菌丝在培养过程中应对胁迫条件的能力。试验以普通 PDA 培养基为对照,对不同培养基培养的香菇菌丝生长状况进行评价,对菌丝生长速度及生物量进行分析,结果表明,香菇菌丝较适合在 PDTA 培养基、PTA-2 培养基上生长。综上,本试验中香菇新型母种培养基可以为深入开展食用菌菌种保藏技术提供参考,同时也揭示了外源添加海藻糖的培养基具有一定的开发潜力。

参考文献:

- [1]戴玉成,杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订[J]. 菌物学报,2008,27(6):801-824.
- [2]刘春如,易 诚. 香菇的营养价值和药用价值[J]. 中国林副特产,2002(1):52-53.
- [3]杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京:农业出版社,1988.
- [4]毛赛飞,潘育东,陈昌凤. 为害香菇的瘿蚊特征、特性和生活史[J]. 食药菌,2017,25(2):143-144.
- [5]徐瑞雅,齐志广,贾耐兵,等. 食用菌最佳母种培养基的筛选[J]. 河北农业科学,2007,11(1):23-24.
- [6]赵俊霞,王立安,齐志广. 四种食用菌母种培养基的筛选[J]. 食用菌,2003,25(2):18,20.
- [7]何培新,张定法,孟 丽,等. 食用菌母种培养基的试剂化制备及应用[J]. 中国食用菌,2000,19(2):7-8.
- [8]李秋信,苑建芳,李振智,等. 金银花藤香菇母种培养基优化试验[J]. 食用菌,2018,40(3):43-44,65.
- [9]何培新,张定法,孟 丽,等. 食用菌母种培养基的试剂化制备及应用效果[J]. 河南农业科学,2000,29(1):22-23.
- [10]李翠丽,陈文强,乔艳明. 秦巴山区低温型香菇的耐受力及富硒液体培养基优化[J]. 食品工业科技,2017,38(10):189-193.
- [11]彭 浩,乔艳明,陈文强,等. 用 $L_9(3^4)$ 正交实验筛选富硒香菇液体培养基[J]. 北方园艺,2014(15):152-157.
- [12]马银鹏,于丽萍,马 鸣,等. 香菇液体培养基优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2017,38(16):10-14.
- [13]覃宝山,覃勇荣,黄春风,等. 香菇培养基主要营养物质筛选及培养条件的优化[J]. 中国园艺文摘,2017,33(8):1-4.
- [14]秦秀丽. 香菇菌种液体培养基的优化[J]. 特产研究,2008,30(4):49-50.
- [15]冷亚君. 海藻糖及真菌海藻糖酶的研究现状与展望[J]. 贵州农业科学,2009,37(5):79-82.
- [16]王 芳,康 超,林 静,等. 海藻糖对乳酸杆菌耐热和室温贮存保护作用的研究[J]. 中国饲料,2017(10):17-19.

- [17]张兰馨,张部昌. 海藻糖分子的细胞保护作用研究进展[J]. 中国医药生物技术,2008,3(6):465-467.
- [18]杨 慧,尚晓冬,王瑞霞,等. 蒸馏水与液氮保藏金针菇菌种特性的比较[J]. 食用菌学报,2010,17(4):23-25.
- [19]朱翠玲. 中国新记录种鳞柄伞 *Agaricus flocculosipes* 急性毒性、营养成分及培养特性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2014.
- [20]Hallsworth J E, Magan N. Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi[J]. Letters in Applied Microbiology, 1994,18(1):8-11.
- [21]Eleutherio E C A, Araujo P S, Panek A D. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochim Biophys Acta,1993,1156(3):263-266.
- [22]Hottiger T, Virgilio C D, Hall M N, et al. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro [J]. Eur J Biochem, 1994,219(1/2):187-193.
- [23]Parrou J L, Enjalbert B, Plourde L, et al. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 1999,15(3):191-203.
- [24]Pinho C A D, Lourdes M D, Polizeli T M, et al. Mobilisation of trehalose in mutants of the cyclic AMP signalling pathway, *cr-1* (CRISP-1) and *mcb* (microcycle conidiation), of *Neurospora crassa* [J]. Fems Microbiology Letters,2001,199(1):85-89.
- [25]Fillinger S, Chareroche M K, Dijk P V, et al. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [J]. Microbiology,2001,147(7):1851-1862.
- [26]Benaroudj N, Lee D H, Goldberg A L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals[J]. The Journal of Biological Chemistry,2001,276(26):24261-24267.
- [27]Crowe J H, Crowe L M, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose [J]. Science, 1984,223(4637):701-703.
- [28]Shima J, Hino A, Yamada - Iyo C, et al. Stress Tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999,65(7):2841-2846.
- [29]Robinson C H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi [J]. New Phytologist,2001,151(2):341-353.
- [30]Bhaganna P, Volkens R J M, Bell A N, et al. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells [J]. Microbial Biotechnology,2010,3(6):701-716.
- [31]Harman G E, Jin X, Stasz T E, et al. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control [J]. Biological Control, 1991,1(1):23-28.
- [32]Kar J R, Hallsworth J E, Singhal R S. Fermentative production of glycine betaine and trehalose from acid whey using *Actinopolyspora halophila* (MTCC 263) [J]. Environmental Technology & Innovation,2015,3:68-76.