

灰树花紫外诱变育种研究^{*}

徐志祥, 李 刚, 李宝健

(中山大学生命科学学院 // 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 应用原生质体紫外诱变技术, 对灰树花菌株 Gr1 进行了紫外诱变处理。经过粗筛和精筛后, 从 50 株诱变株中选出两株多糖含量和产量明显优于原始菌株的突变株 Gr1a 和 Gr1g, 其产量分别为 1.74% 和 1.62%, 多糖质量含量 (w) 分别为 11.67% 和 12.01%。经过摇瓶试验以及发酵试验, 两株诱变菌株 Gr1a 和 Gr1g 菌丝得率和多糖含量都很稳定, 表明所得突变株是比原始菌株更优秀的稳定高产、高多糖含量的新菌株。

关键词: 灰树花; 紫外诱变育种; 发酵;

中图分类号: S567.035 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 02-0084-04

灰树花 *Grifola frondosa* 是一种珍贵的大型药用真菌, 在日本俗称舞茸。它隶属于真菌门 Eumycota、担子菌亚门 Basidiomycotina、非褶菌目 Aphyllophorales、多孔菌科 Polyporaceae、多孔菌属 *Polyporus*^[1]。

大量的药理和临床试验, 已经证明灰树花的药效十分广泛, 且无任何毒副作用。灰树花具有免疫调节和抗肿瘤作用, 还可用来治疗肝硬化腹水、糖尿病、高血压等疾病。^[1-5]

原生质体诱变技术是一种行之有效的育种新方法^[6-8]。到目前为止, 在许多生物中, 原生质体诱变育种被广泛采用。在丝状真菌中也有许多成功的报道, 这为丝状真菌的遗传育种开辟了一条更为有效的途径^[9-12]。

本文利用原生质体诱变技术对灰树花菌种进行了诱变育种, 并且对诱变株进行了摇瓶培养试验和发酵罐试验, 试图培育出生长更快、产量和多糖含量更高的灰树花新菌种。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 灰树花菌种 灰树花菌种 Gr1 为本实验室保存菌种。

1.1.2 溶壁酶 (Lywallzyme) 购自广东省微生物研究所。

1.1.3 PDA 培养基 (w/%) 土豆 20, 葡萄糖 2, 磷酸二氢钾 0.1, 硫酸镁 0.05。

1.1.4 灰树花再生培养基 PDA 培养基中加入

0.6 mol/L 甘露醇。

1.2 实验方法

1.2.1 灰树花原生质体制备方法 将新鲜的灰树花菌丝体过滤, 取适量的菌丝体放于一定浓度的溶壁酶中, 在适当温度的水浴中反应, 每克湿菌丝体加酶液 1 mL。在酶液作用的不同时间用显微镜检测原生质体数量。

1.2.2 原生质体诱变方法 取 1.0×10^6 灰树花原生质体均匀涂于再生培养基中, 在紫外线下 (20 W) 照射适当时间, 照射距离为 40 cm, 然后置于温室避光培养 7 d。

1.2.3 菌粉得率计算方法 将诱变菌株切 1 cm² 左右至 100 g PDA 液体培养基中, 振荡培养 7 d, 过滤得湿菌丝体, 烘干称量, 以 100 g 培养基中得菌粉干重计算得率。

1.2.4 多糖测定方法 采用硫酸苯酚法测定多糖含量^[13]。

2 结果和分析

2.1 灰树花原生质体制备

采用如下条件制备原生质体, 温度为 25 ℃, 酶质量分数为 3%, 反应时间为 3 h。用血球计数板对原生质体进行计数。制备的原生质体的照片如图 1 所示。

2.2 原生质体紫外诱变选育优质高产灰树花新菌株

2.2.1 原生质体紫外诱变效应曲线及紫外线诱变剂量的选择 取 20 个 9 cm 平皿, 每皿分别装有新制备的 10^6 个/mL 的原生质体悬液 5 mL。每两个为

* 收稿日期: 2003-06-13

基金项目: 广州市科委重大科技攻关资助项目 (2001-Z-006-01)

作者简介: 徐志祥 (1975 年生), 男, 博士, 通讯联系人, 李宝健; E-mail: xuzhixiang123@163.net

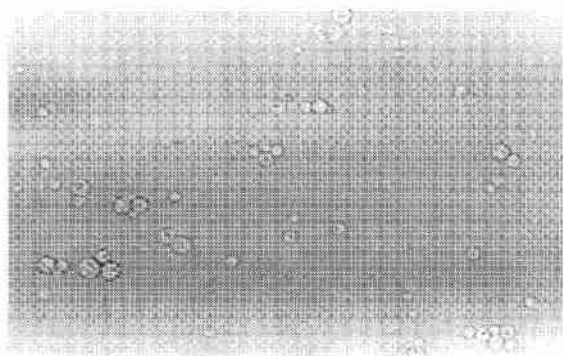


图 1 25 ℃ $w=3\%$ 酶浓度酶解 3 h 条件下制备的原生质体

Fig 1 The protoplasts after digestion for three hour at 25 ℃ with $w=3\%$ enzyme

1 组，共分为 10 组。分别照射 0、5、10、15、20、25、30、45、60、150 s，然后每皿取 1 mL 适当稀释后涂平板。平板用黑布包裹后置于黑暗闭光的 28 ℃ 恒温箱培养。待平板长出菌落后，菌落计数。每组以两个皿菌落数的平均值作为该组的菌落数。以照射时间为横坐标，以再生菌落数为纵坐标，画

出灰树花原生质体紫外诱变剂量效应曲线，结果如图 2 所示。

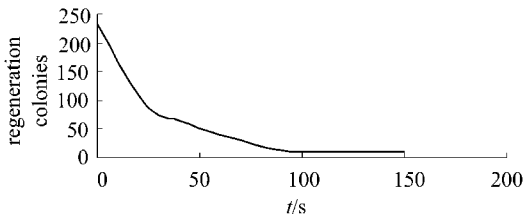


图 2 灰树花原生质体紫外诱变剂量效应曲线
Fig 2 The effect curve of UV mutagenesis dosage on *Grifola frondosa* protoplasts

由图 2 可以看出，灰树花原生质体经紫外线照射后，再生菌落数开始减少。在 0~50 s 照射时间内，曲线的变化很剧烈。50 s 以后，曲线的下降趋于平缓。根据上述结果我们测出灰树花原生质体半致死率时的照射剂量约为 20 s。

原生质体在紫外诱变后的再生情况如图 3 所示。

2.2.2 灰树花诱变株的初筛 以 20 s (图 3 (b)) 作为照射剂量诱变灰树花原生质体，连续诱变 10

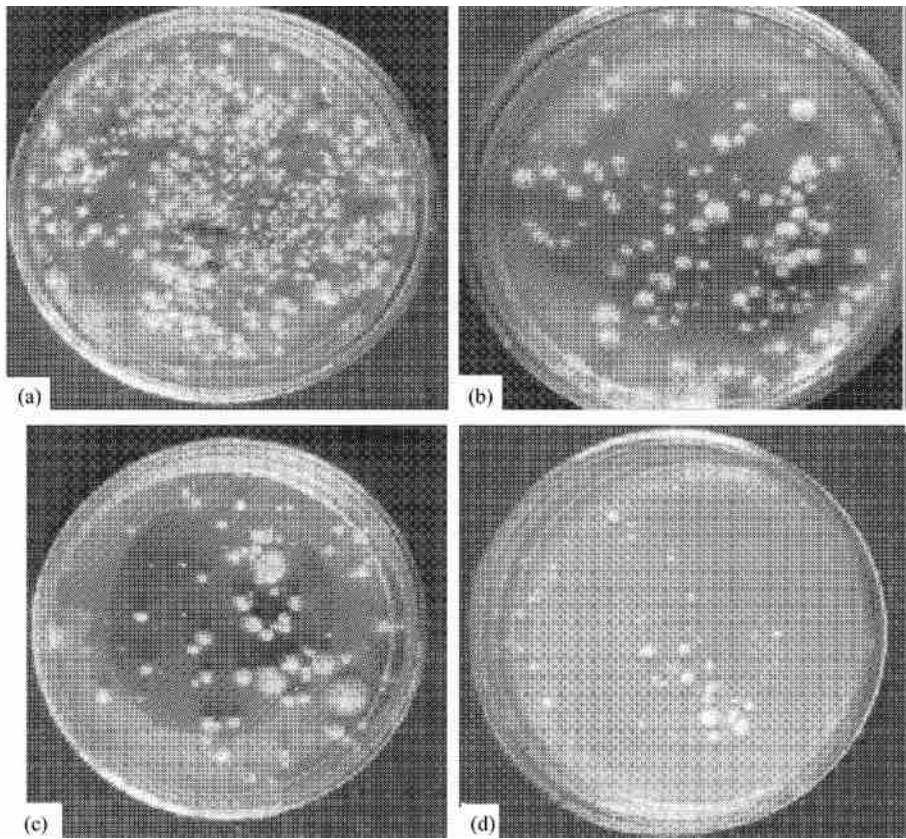


图 3 无紫外照射和有紫外照射时再生菌落的情况

Fig 3 Regeneration without UV irradiation and with UV irradiation

(a) 无紫外照射; (b) 紫外照射 20 s; (c) 紫外照射 40 s; (d) 紫外照射 70 s

批，每批稀释后涂 5 个平皿。将再生的单菌落分别接种至新的平皿中。原生质体诱变后形成的再生菌落在菌落直径和生长活力方面都有较大差异，在新的平皿中生长的菌株选出 50 株菌落直径最大、生长最旺盛的诱变株。

(1) 灰树花诱变株的生长比较。将 50 株诱变株每株接两个斜面 and 两个三角瓶培养，26℃斜面培养 10 d，测量每天生长的长度，计算出菌丝生长速率（cm/日）。摇瓶培养按二级发酵方式培养至发酵终点，计算菌丝得率。综合菌丝生长速率、菌丝得率两项数据，从 50 株诱变株中选出最好的 8 株。根据诱变时的原始批次和编号，这 8 株菌分别命名为：Gr1a, Gr1b, Gr1c, Gr1d, Gr1e, Gr1f, Gr1g, Gr1h。

(2) 高产、高多糖质量分数诱变株的获得。取上述 8 株灰树花诱变株进行摇瓶发酵试验，接种量相同，分别记录发酵周期、菌粉得率并测定其多糖

质量分数。发酵周期以菌丝量不再增加发酵终点判断标准。连续进行 3 次发酵试验，取其平均值，结果如表 1 所示。

根据表 1 结果，从中选出发酵周期、菌粉得率、多糖含量 3 项指标都优于原始菌株的两株灰树花诱变株，即 Gr1a 和 Gr1g。而且经方差统计分析，其差异具有显著性。

(3) 灰树花诱变株的遗传稳定性试验。鉴于突变菌株的性状常常不稳定，尤其是在连续继代培养时。为了检测所得两株灰树花突变株性状是否稳定，我们将上述两株突变株连续转接 6 代，每代均进行摇瓶培养，结果如表 2 所示。

由表 2 可以看出，两株诱变菌株 Gr1a 和 Gr1g 菌丝得率和多糖质量分数都很稳定，而且 6 批发酵试验中 Gr1a 和 Gr1g 基本上每次在产量和多糖质量分数上都显著超过原始菌株。说明筛选出的这两株诱变菌种在产量上和质量上都很稳定。

表 1 8 株诱变株的发酵周期、菌粉得率和多糖质量分数的比较

Tah 1 The comparison of fermentation cycle, mycelial yield and polysaccharide content of 8 mutants

项目	Gr1a	Gr1b	Gr1c	Gr1d	Gr1e	Gr1f	Gr1g	Gr1h	原始菌株
发酵周期/h	180	204	170	240	198	216	160	190	192
菌丝得率/%	1.74	1.16	1.78	1.05	1.32	0.87	1.62	0.79	1.47
w(多糖)/%	11.67	12.22	9.66	11.85	8.41	10.23	12.01	7.89	10.05

表 2 Gr1a 和 Gr1g 连续进行 6 代摇瓶培养的菌粉得率和多糖质量分数比较

Tah 2 The comparison of mycelial yield and polysacchride content after 6 continuous shaking bottle culture of Gr1a and Gr1g

项目	1	2	3	4	5	6	平均值
Gr1a 菌丝得率/%	1.75	1.59	1.66	1.44	1.72	1.69	1.64
w(Gr1a 多糖)/%	11.11	12.23	10.55	10.23	11.58	11.76	11.24
Gr1g 菌丝得率/%	1.58	1.72	1.44	1.73	1.77	1.64	1.65
w(Gr1g 多糖)/%	12.33	11.35	10.90	11.68	12.15	12.21	11.77

3 讨论

丝状真菌菌丝为多细胞，不宜作诱变材料。去除细胞壁的原生质体对外界环境比较敏感，经诱变剂处理以后容易发生突变，而且原生质体诱变技术一般能保持原有菌种的主要生物学性状特点，并且育种周期短，突变株生物学性状比较稳定，不易退化。因此，原生质体诱变育种方法已成为当前丝状真菌育种的一种主要方法。

诱变法选育菌种工作量较大，要筛选到一株性能优异稳定的菌株，需要做大量工作。利用粗筛方法，首先筛选生长旺盛、生长速率快的菌株，缩小了筛选范围，再利用精筛方法，进一步缩小筛选范

围，最后对 8 株诱变株进行详细、系统的研究，并从中筛选到所需菌株。这种筛选方法大大降低了工作量，并且工作效率高。

本文应用灰树花原生质体作为诱变的材料，结果表明，与其他的丝状真菌一样，利用这种方法进行灰树花的菌种改良是可行的。我们用灰树花菌株 Gr1 作为出发菌株。采用 20 s 作为诱变时间，对灰树花菌株 Gr1 进行了紫外诱变处理。诱变株 Gr1a 和 Gr1g 产量分别为 1.74%和 1.62%，多糖质量分数分别为 11.67%和 12.01%。经过 6 代 PDA 斜面继代培养以及摇瓶试验，Gr1a 和 Gr1g 基本上每次在产量和多糖质量分数上都明显超过原始菌株。说明筛选出的这两株诱变菌种在产量上和质量上都很

稳定。而且多糖质量分数和产量均高于文献中报道的的其他灰树花菌种的产量和多糖质量分数。

参考文献：

[1] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 707— 717.

[2] 邢增涛. 灰树花多糖研究进展[J]. 食用菌学报, 1999, 6(3): 54— 58.

[3] 徐泽平. 灰树花多糖免疫调节和抗癌活性[J]. 微生物学通报, 1999, 26(2): 156.

[4] IWA O S, KOICHI H, SHOZO O, et al. Antitumor and immunomodulating activities of a β -glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* [J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(2): 410— 413.

[5] KYOKO A, HIROAKI N, MASAMICHI O, et al. Blood pressure-lowering activity present in the fruit body of *Grifola frondosa*[J]. Chem Pharm Bull 1988, 36(3): 1000— 1006.

[6] LEE J S. Release, regeneration and mutant induction of *Pleurotus cornucopiae* (“Tamogitake”) protoplasts[J]. Agric

Biol Chem, 1988, 52(7): 1877— 1878.

[7] HOMOLKA L. Use of protoplasts in the improvement of filamentous fungi: Mutagenization of protoplasts of *Oudemansiella mucida* for strain improvement enhanced mucidin production (En)[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 23(2): 166— 189.

[8] JUNWEI C. Ultraviolet mutagenesis of the cellulase producer *Aspergillus niger* using protoplast industrial strain improvement [J]. FEMS Microbiol Lett, 1988, 50(1): 1— 4.

[9] 王竞. 紫外线诱变原生质体选育柠檬酸生产菌[J]. 天津微生物, 1993(1): 1— 6.

[10] 鲁迎新. 扩展青霉原生质体的诱变育种[J]. 微生物学通讯, 1989(2): 11— 15.

[11] 张泉渡. 荨麻青霉原生质体紫外辐射对产量的影响[J]. 微生物学杂志, 1988, 8(1): 44— 45.

[12] 李刚. 原生质体紫外诱变选育灵芝新种研究[J]. 微生物学报, 2001, 141(2): 229— 232.

[13] 徐志祥, 李刚, 李宝健. 苯酚— 硫酸法测定灵芝多糖含量的条件研究[J]. 食用菌, 2000(1): 6— 8.

UV Induced Mutagenesis of *Grifola frondosa*

XU Zhi xiang, LI Gang, LI Bao jian

(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education // School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: In order to exploit the potential of *Grifola frondosa*’s production, a UV induced mutagenesis was carried out for *Grifola frondosa* strain “Gr1” using protoplast. By preliminary screening and intensive screening from 50 mutants, we obtained two mutants, production reaching 1. 74% and 1. 62% and polysaccharides contents reaching 11. 67% (w) and 12. 01% (w). Results of continued cultivation for 6 generations on PDA slants and subsequent tests of shaking bottles, showed that these two mutants are good strains with steady properties, high yield and high content of polysaccharides.

Key words: *Grifola frondosa*; submerged culture; UV induced mutagenesis