



姜宁,章炉军,谭琦,等.香菇菌丝体对四种抗生素的敏感性[J].黑龙江农业科学,2019(8):119-123.

香菇菌丝体对四种抗生素的敏感性

姜宁,章炉军,谭琦,尚晓冬,董浩然

(上海市农业科学院 食用菌研究所,国家食用菌工程技术研究中心,上海 201403)

摘要:为探究4种常用抗生素对香菇菌丝体生长的影响,筛选适用于香菇遗传转化的抗生素。本研究以香菇[*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]沪香F2双核菌丝以及其原生质体单核菌丝为材料,通过测试两者在含有不同种类、不同浓度下抗生素培养皿中的生长速率以及抑制率,探究香菇单双核菌丝对氨苄青霉素、卡那霉素、头孢霉素、潮霉素4种抗生素的敏感性。结果表明:氨苄青霉素、卡那霉素、头孢霉素对香菇单双核菌丝生长以及菌落形态基本没有影响,潮霉素对香菇单双核菌丝生长有强烈的抑制作用,12 mg·L⁻¹的潮霉素能够完全抑制香菇双核菌丝的生长,14 mg·L⁻¹的潮霉素能够完全抑制香菇单核菌丝的生长。卡那霉素不能作为香菇遗传转化的筛选抗生素使用;潮霉素可以用作香菇遗传转化的筛选抗生素;氨苄青霉素和头孢霉素均可以用于对农杆菌的抑制。

关键词:香菇菌丝;抗生素;生长速率;抑制率

香菇[*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler],俗称香蕈、花菇、冬菇等,属真菌界,担子菌门,伞菌纲,伞菌目,光茸菌科,香菇属,是世界第二大宗食

用菌^[1]。其味道鲜美,营养丰富,还具有多种保健功效,也是目前国内进行规模生产的主要食用菌之一^[2]。随着两个香菇全基因组测序的完成和公布^[3-4],香菇的遗传及功能基因研究也将成为热点。近年来,农杆菌介导的遗传转化已逐渐被应用于食用菌的领域中,目前,农杆菌的介导转化技术在双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)^[5]、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)^[6]、刺芹侧耳(*P. eryngii*)^[7]、金针菇[*Flammulina velutipes* (FR.) Singer]^[8]、

收稿日期:2019-03-23

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-20);上海市食用菌产业技术体系建设专项资金资助(沪农科产字(2019)第9号)。

第一作者简介:姜宁(1991-),男,硕士,研究实习生,从事食用菌遗传育种研究。E-mail:303526435@qq.com。

Analysis of Soluble Sugar Content and Composition on Fruit of Different Jujube Varieties

WANG Jian-yu, WANG Zhen-lei, LIN Min-juan

(College of Plant Science, Tarim University, National and Local Joint Engineering Laboratory for High-Quality Cultivation and Deep Processing Technology of Characteristic Fruit Trees in Southern Xinjiang, Xinjiang Production and Construction Corps Southern Xinjiang Characteristic Fruit Production Engineering Laboratory, Key Laboratory of Bioresource Resources Protection and Utilization in Tarim Basin, Xinjiang Production and Construction Corps, Alar 843300, China)

Abstract: In order to further develop jujube resources, we studied the sugar content and the composition ratio of 12 jujube cultivar by using HPLC method. The results showed that the sugar content of jujube, the contents and proportions of soluble sugar, glucose, fructose and sucrose in fruits of different jujube varieties were different, the range of soluble sugar was 55.53%-85.66%, glucose was 10.19%-30.19%, fructose was 12.95%-27.12% and sucrose was 15.73%-66.87%. The ratio of reducing sugar to total soluble sugar was between 1:1.28 and 1:3.92, and the ratio of sucrose to total soluble sugar is between 1:1.34 and 1:4.59. Beipeixiao, Shanghai baipu, Baodeyouzao and Xuanchengyuanzao were reducing sugar accumulation type. Jinai 1 and Zhongyangmuzao were intermediate type, Tengzhoutangzao, Yongchengchanghong, Bopizao, Zhongningxiaoyuanzao, Xiangfenmuzao Yiwudazao were sucrose accumulation type.

Keywords: jujube; reducing sugar; glucose; fructose

香菇^[9]等食用菌中已取得了一定的成果。在食用菌的遗传转化过程中,选择合适的筛选标记至关重要,同时农杆菌在完成侵染受体材料后,如何抑制农杆菌并且不影响受体菌丝的生长也是很关键的一部分。为此,本研究主要探讨了农杆菌介导转化方法中 4 种常用的抗生素对香菇单双核菌丝体生长的影响,为进一步建立农杆菌介导的香菇遗传转化体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 香菇品种“沪香 F2”母种以及其原生质体单核体保藏于上海市农业科学院食用菌研究所良种创新与繁育研究室。

1.1.2 试剂 氨苄青霉素(Ampicillin)、卡那霉素(Kanamycin)、头孢霉素(Cefotaxime)、潮霉素(Hygromycin B)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;马铃薯土豆琼脂(PDA)培养基购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 含有抗生素培养基的配制 抗生素培养皿的制备采用培养皿加药法,将 39 g PDA 粉末悬浮于 1 L 蒸馏水中,彻底混合,用快速搅拌的方法加热 1 min,使粉末完全溶解,在 121 ℃ 灭菌 15 min,冷却至 45~50 ℃ 加入抗生素。抗生素的浓度分别:氨苄青霉素 0, 25, 50, 75, 100, 125 mg·L⁻¹;卡那霉素 0,25,50,75,100,125 mg·L⁻¹;头孢霉素 0,100,200,300,400,500 mg·L⁻¹;潮霉素 0,6,8,10,12,14 mg·L⁻¹。

1.2.2 菌种的活化与接种 从保藏菌种的试管里挑取菌丝,接种于新鲜 PDA 培养皿中央,封口膜封口,置于 25 ℃ 培养房培养 10~14 d,待菌丝将要长满培养皿时使用。接种时用半径为 3 mm 打孔器在活化培养皿的相同半径的位置上依次打孔,挑取打孔菌块接种到制备好的 4 种不同抗生素的培养皿中央,用封口膜将培养皿封口。每个浓度梯度接种 3 组平行对照,置于 25 ℃ 培养房中避光培养。同时将打孔菌块接种到没有添加抗生素的培养皿,封口,相同条件下培养,作为对照。

1.2.3 菌丝生长状况及生长速度测定 每隔 24 h 观察一次加入不同抗生素培养皿的菌丝生长

情况,与接种的无抗性的 PDA 培养皿菌丝进行比较。待菌丝生长 10 d 后,测量所有抗生素处理后的菌丝生长长度(mm)以及未加抗生素的对照菌丝的生长长度。按照以下公式计算菌丝生长速率(%) and 不同浓度下的 4 种抗生素对菌丝生长的抑制率(%)。

菌丝生长速率(mm·d⁻¹)=(菌丝生长长度—打孔器接种菌块半径)/菌丝培养天数

抑制率(%)=[(对照菌丝生长速率—抗生素处理菌丝生长速率)/对照菌丝生长速率]×100

1.2.4 数据分析 利用 WPS Office 2010 软件统计菌丝的生长速率和抑制率。

2 结果与分析

2.1 氨苄青霉素对香菇菌丝生长的影响

由表 1 可知,氨苄青霉素对香菇菌丝生长的抑制作用不明显,单双核菌丝抑制率均低于 10%。在试验的浓度范围内,随着氨苄青霉素浓度的升高,氨苄青霉素对香菇双核菌丝抑制率也随之略微增加。在附加氨苄青霉素的培养皿中,菌丝厚实健壮,致密洁白,生长旺盛,均匀平滑,与对照组菌丝无明显差异。

表 1 氨苄青霉素对香菇菌丝生长的影响
Table 1 Effect of ampicillin on the mycelia growth of *Lentinula edodes*

菌丝类型	浓度	菌丝长度	生长速率	抑制率
Mycelia	Concentration/ type (mg·L ⁻¹)	Mycelia length/ mm	Growth speed/ (mm·d ⁻¹)	Inhibition rate/%
双核菌丝 Dikonyon mycelia	0(CK)	35.3	3.53	0
	25	33.0	3.30	6.52
	50	34.3	3.43	2.83
	75	33.7	3.37	4.53
	100	33.3	3.33	5.67
单核菌丝 Monokary on mycelia	125	32.0	3.20	9.35
	0(CK)	16.3	1.63	0
	25	16.0	1.60	1.84
	50	16.0	1.60	1.84
	75	17.0	1.70	-4.29
	100	15.3	1.53	6.13
	125	16.0	1.60	1.84

2.2 卡那霉素对香菇菌丝生长的影响

由表2可知,卡那霉素在试验的浓度范围内对香菇菌丝生长具有微弱的抑制作用,仅在125 mg·L⁻¹的浓度下,双核菌丝抑制率高于10%。经过抗生素处理的菌丝生长正常,洁白浓密,形态均一、稳定,边缘整齐,与对照组菌丝生长状况无明显差异。

表2 卡那霉素对香菇菌丝生长的影响
Table 2 Effect of kanamycin on the mycelia growth of *Lentinula edodes*

菌丝类型	浓度	菌丝长度	生长速率	抑制率
Mycelia	Concentration/	Mycelia	Growth	Inhibition
type	(mg·L ⁻¹)	length/ mm	speed/ (mm·d ⁻¹)	rate/%
双核菌丝	0(CK)	35.3	3.53	0
Dikonyon	25	35.3	3.53	0
mycelia	50	33.0	3.30	6.52
	75	33.7	3.37	4.53
	100	33.7	3.37	4.53
	125	30.3	3.03	14.16
单核菌丝	0(CK)	16.3	1.63	0
Monokary	25	17.0	1.70	-4.30
on mycelia	50	16.3	1.63	0
	75	15.7	1.57	3.68
	100	15.7	1.57	3.68
	125	15.7	1.57	3.68

2.3 头孢霉素对香菇菌丝生长的影响

由表3可知,农杆菌介导的食用菌转化中常用来抑制农杆菌生长的头孢霉素,在浓度小于500 mg·L⁻¹时,对香菇菌丝没有明显的抑制作用,敏感度低,在各试验浓度的培养皿中,单双核菌丝都能正常生长,长势旺盛,形态规则,与对照组菌丝没有显著差异。

2.4 潮霉素对香菇菌丝生长的影响

由表4可知,香菇单双核菌丝均对潮霉素非常敏感,随着潮霉素浓度的提高,菌丝的生长速率显著降低,抑制率也随之提高,当潮霉素浓度达到12 mg·L⁻¹,双核菌丝抑制率达到100%。当潮霉素浓度达到14 mg·L⁻¹时,单核菌丝的生长被完全抑制。潮霉素对香菇菌丝的形态影响非常大,在低浓度的潮霉素培养皿中,菌丝稀疏细弱,颜色

发黄;在高浓度的潮霉素培养皿中,接种块颜色变深,菌丝不生长,甚至死亡。

表3 头孢霉素对香菇菌丝生长的影响
Table 3 Effect of cefotaxime on the mycelia growth of *Lentinula edodes*

菌丝类型	浓度	菌丝长度	生长速率	抑制率
Mycelia	Concentration/	Mycelia	Growth	Inhibition
type	(mg·L ⁻¹)	length/ mm	speed/ (mm·d ⁻¹)	rate/%
双核菌丝	0(CK)	35.3	3.53	0
Dikonyon	100	35.3	3.53	0
mycelia	200	34.0	3.40	3.68
	300	33.3	3.33	5.67
	400	33.3	3.33	5.67
	500	31.3	3.13	11.33
单核菌丝	0(CK)	16.3	1.63	0
Monokary	100	17.7	1.77	-8.59
on mycelia	200	16.7	1.67	-2.45
	300	17.0	1.70	-4.29
	400	16.0	1.60	1.84
	500	15.7	1.57	3.68

表4 潮霉素对香菇菌丝生长的影响
Table 4 Effect of hygromycin on the mycelia growth of *Lentinula edodes*

菌丝类型	浓度	菌丝长度	生长速率	抑制率
Mycelia	Concentration/	Mycelia	Growth	Inhibition
type	(mg·L ⁻¹)	length/ mm	speed/ (mm·d ⁻¹)	rate/%
双核菌丝	0(CK)	35.3	3.53	0
Dikonyon	6	7.70	0.77	78.19
mycelia	8	6.70	0.67	81.02
	10	1.20	0.12	96.60
	12	0	0	100.00
	14	0	0	100.00
单核菌丝	0(CK)	16.3	1.63	0
Monokary	6	7.67	0.77	52.76
on mycelia	8	7.33	0.73	55.21
	10	4.67	0.47	71.17
	12	1.00	0.10	93.87
	14	0	0	100.00

3 结论与讨论

农杆菌介导的遗传转化法,相较于食用菌常用的遗传转化方法(电激转化法^[10],PEG介导转化法^[11],基因枪转化法^[12],限制性内切酶介导的DNA转化法^[13]),有着受体材料类型多(原生质体,菌丝,孢子,菌褶组织等)、单拷贝随机插入稳定、转化效率高等优点。该技术应用的前提条件之一是要了解转化受体对于基因工程常用抗生素(氨苄青霉素、卡那霉素、头孢霉素、潮霉素)的敏感性。

卡那霉素是植物基因工程中作为筛选标记被广泛应用的抗生素,筛选标记基因是帮助遗传转化的生物工程体进行筛选和鉴定的一类外源基因,在选择压力下,不含标记基因及其产物的非转化细胞和组织死亡,而转化细胞由于具有抗性,可以继续存活,因而有利于从大量的非转化细胞和组织中选择中转化克隆^[14]。该研究发现在各种不同试验浓度下,香菇单双核菌丝均没有明显的抑制效果,菌丝体仍然能够正常生长。卡那霉素能对遗传转化的植物进行筛选的实质是通过卡那霉素抗性基因起作用的,卡那霉素抗性基因即新霉素磷酸转移酶基因,亦可称为氨基糖苷酸转移酶基因,它编码的产物氨基糖苷酸转移酶能对卡那霉素具有抗性。在被应用于植物遗传转化的筛选时,卡那霉素能干扰植物细胞中叶绿体及线粒体内的蛋白质的合成,引起植物绿色器官的黄化,最终导致植物细胞的死亡^[15]。本研究表明香菇菌丝体对卡那霉素不敏感,不能作为香菇遗传转化的筛选抗生素使用。

潮霉素也是植物中应用比较广泛的筛选抗生素,其作用机理是潮霉素可以稳定核糖体大亚基上的tRNA结合位点,导致空载tRNA不能脱离核糖体,进而影响细胞蛋白质的翻译,从而抑制植物细胞的形成和生长^[16]。潮霉素抗性基因

可编码一种潮霉素磷酸转移酶,这种酶可使潮霉素发生磷酸化而失活,从而使转化子不受潮霉素的毒害作用,最终达到筛选目的。在丝状真菌的遗传转化研究中,潮霉素作为筛选标记得到了较多的应用^[17-18]。本研究结果表明,香菇单双核菌

丝对潮霉素的敏感性有差异,双核体菌丝对潮霉素更敏感,潮霉素可以作为香菇菌丝体遗传转化的筛选抗生素。

氨苄青霉素和头孢霉素在遗传转化的试验中一般是用来清除侵染完成后多余的农杆菌,理想的用于抑制农杆菌生长的抗生素应该是既不会对转化受体的生长造成影响,又能高效的抑制农杆菌生长。Hanhineva等^[19]以及范春节等^[20]的研究表明头孢霉素对外植体的分化有毒害作用,但Lin等^[21]曾报道适当浓度的头孢霉素能促进愈伤组织的分化与生长,小麦的抗生素研究发现,100 mg·L⁻¹的头孢霉素可以改善愈伤的生长、形态发生以及器官发生,并且显著的提高了再生率,Yepes^[22]的苹果品种的抗生素试验中也发现250 mg·L⁻¹的头孢霉素可以提高再生率。本研究表明在试验的浓度范围内,氨苄青霉素和头孢霉素对香菇菌丝的生长基本没有影响,但没有发现在一定的浓度下反而有促进菌丝生长的作用。该结果表明两种抗生素均可以在遗传转化中用于对农杆菌的抑制,同时也不会对受体菌丝的生长造成影响。

参考文献:

- [1] 聂林林.香菇热泵除湿干燥技术的研究[D].郑州:河南工业大学,2015.
- [2] 刘春如.香菇的分布概况及生物学特性[J].中国林副特产,2001(4):32-33.
- [3] Chen L,Gong Y,Cai Y,et al. Genome sequence of the edible cultivated mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation[J]. Plos One,2016,11(8).
- [4] Shim D,Park S G,Kim K,et al. Whole genome de novo,sequencing and genome annotation of the world popular cultivated edible mushroom,*Lentinula edodes*[J]. Journal of Biotechnology,2016,223:24-25.
- [5] 胡乐琴,潘迎捷.食用菌分子转化研究状况[J].中国食用菌,2006,25(4):7-10.
- [6] 黄小丹,柳建良.食用菌分子生物学研究进展[J].仲恺农业工程学院学报,2009,22(3):53-58.
- [7] 盛立柱,宋冰,戴月婷,等.农杆菌介导的刺芹侧耳遗传转化体系的建立[J].菌物学报,2015,34(4):653-661.
- [8] 康林芝,林俊芳,黄秀琴,等.紫杉烯合酶基因遗传转化金针菇的研究[J].食品工业科技,2013,34(2):190-193.

- [9] 姜宁,宋春艳,刘建雨,等.农杆菌介导香菇菌丝遗传转化体系的研究[J].菌物学报,2017,36(11):1514-1523.
- [10] Rhee M D V D, Graça P M A, Huizing H J, et al. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance[J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1996, 250(3): 252-258.
- [11] Yin Y, Liu Y, Jin H, et al. Polyethylene glycol-mediated transformation of fused egfp-hph gene under the control of gpd promoter in *Pleurotus eryngii* [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(10): 1895-1900.
- [12] Sunagawa M, Magae Y. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment[J]. Fems Microbiology Letters, 2002, 211(2): 143-146.
- [13] Cummings W J, Celerin M, Crodian J, et al. Insertional mutagenesis in *Coprinus cinereus*; Use of a dominant selectable marker to generate tagged, sporulation-defective mutants[J]. Current Genetics, 1999, 36(6): 371-382.
- [14] 徐茂军. 转基因植物中卡那霉素抗性(KANR)标记基因的生物安全性[J]. 生物学通报, 2001, 36(2): 18-19.
- [15] 王紫萱, 易自力. 卡那霉素在植物转基因中的应用及其抗性基因的生物安全性评价[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 9-13.
- [16] 杨桥, 蔺自敏, 侯译文, 等. 小麦遗传转化中潮霉素筛选体系的建立及应用[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(3): 304-310.
- [17] 张学炜, 王笑梅, 李明春, 等. 以潮霉素 B 抗性为选择标记的深黄被孢霉原生质体转化[J]. 生物工程学报, 2007, 23(3): 462-466.
- [18] Michiels C B, Hooykaas P J, Ca V D H, et al. Agrobacterium-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori* [J]. Nature Protocols, 2008, 3(10): 1671-8.
- [19] Hanhineva K J, Kärenlampi S O. Production of transgenic strawberries by temporary immersion bioreactor system and verification by TAIL-PCR [J]. BMC Biotechnology, 2007, 7(1): 11.
- [20] 范春节. 尾尖梭再生体系及农杆菌介导的转基因体系研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2008.
- [21] Lin J J, Assad-garcia N, Kuo J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens*, cells [J]. Plant Science, 1995, 109(2): 171-177.
- [22] Yepes L M, Aldwinle H S. Factors that effect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 1994, 37(3): 257-269.

Sensitivity of Mycelia of *Lentinula edodes* Against Four Antibiotics

JIANG Ning, ZHANG Lu-jun, TAN Qi, SHANG Xiao-dong, DONG Hao-ran

(Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China)

Abstract: In order to investigate the effects of four antibiotics on the mycelium growth of *Lentinula edodes*, screen out suitable antibiotics for genetic transformation of *Lentinula edodes*, we used the mycelium of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler-huxiang F2 as material, growth rates and inhibition rates were measured in petri dishes containing different types and concentration, the research aimed to investigate that resistance of mycelia of *Lentinula edodes* against four kind antibiotics, including ampicillin, kanamycin, cefotaxime and hygromycin. The results showed that ampicillin, kanamycin, cefotaxime had no effect on mycelia growth and colony morphology of *Lentinula edodes*, hygromycin had a strong inhibitory effect on the growth of mushroom mycelium, hygromycin at $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could completely inhibit the growth of *Lentinula edodes* dikaryon mycelia, hygromycin at $14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could completely inhibit the growth of *Lentinula edodes* monokaryon mycelia. Kanamycin cannot be used as a screening antibiotic for genetic transformation of *Lentinula edodes*. HydrAMYCIN can be used as a screening antibiotic for genetic transformation of *Lentinula edodes*. Ampicillin and cefotaxime could be used to inhibit *Agrobacterium*.

Keywords: mycelium of *Lentinula edodes*; antibiotics; growth rates; inhibition rates