

海藻糖对草菇菌种的低温保护效应研究

王永红¹ 郭俊¹ 陈美标¹ 姚青² 朱红惠^{1*}

(1. 广东省微生物研究所 广东省微生物菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(2. 华南农业大学园艺学院 广州 510642)

摘要: 以生存活力和生长速度、厚垣孢子形成、次生代谢产物变化和基因指纹图谱方法分析了采用海藻糖溶液低温保藏草菇菌种的效果。结果显示: 不耐受低温的草菇菌种在海藻糖溶液的保护下, 能够在4~6℃下具有生存活性至少8个月以上, 而且经过低温的草菇菌种其分泌的次生代谢产物种类与采用目前常规保藏方法保藏的草菇菌种一致, 遗传稳定性测试结果也显示经过了海藻糖溶液低温保护的草菇菌种的基因指纹图谱没有发生改变; 同时采用海藻糖溶液保护的草菇菌种, 在4~6℃低温下保藏8个月后活化, 活化后的菌种采用清水低温保藏, 1个月后仍然具有生存活性, 并能产生厚垣孢子。

关键词: 海藻糖, 4~6℃, 生存活性, 基因指纹图谱, 次生代谢产物

Effect of Trehalose in Protecting Straw Mushroom (*Volvariella volvacea*) at Low Temperature

WANG Yong-Hong¹ GUO Jun¹ CHEN Mei-Biao¹ YAO Qing² ZHU Hong-Hui^{1*}

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

(2. College of Horticulture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642)

Abstract: In order to evaluate the effect of trehalose in protecting straw mushroom (*Volvariella volvacea*) strain at low temperature, the viability, growth rate, chlamyospore, metabolites, and genetic fingerprinting of *Volvariella volvacea* was tested. Results showed that straw mushroom strain remained viable at 4~6℃ at least for 8 months under trehalose preservation. HPLC analysis of metabolites and molecular fingerprinting indicated that trehalose didn't change the genetics character of *Volvariella volvacea*. The recovered straw mushroom strain stored at 4~6℃ for 8 months with the trehalose preservation kept viable and produce chlamyospores when stored in water for one month.

Keywords: Trehalose, 4~6℃, Viability, Genetic fingerprinting, Metabolites

草菇 (*Volvariella volvacea* (Bull ex Fr.) Sing) 属于喜高温担子菌, 菌丝对低温很敏感, 在低温条件

下会发生自溶而导致死亡, 子实体也会发软、液化直至腐烂, 失去活力, 甚至死亡^[1, 2]。这表明, 草菇

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(No.C04100159); 广东省自然科学基金研究团队项目(No.E05202480); 广东省自然科学基金项目(No. 06020229)

* 通讯作者: Tel: 020-35973334; 信箱: zhuhonghui66@163.net

收稿日期: 2007-04-11; 接受日期: 2007-06-11

难以像其他的菌种一样在 0℃~5℃ 条件下长期保藏。目前草菇的菌种保藏方法主要包括传代培养保藏、液体石蜡覆盖保藏、栽培保藏、液氮超低温保藏、悬液保藏和自然基质简易保藏等。生产上常用的传代培养保藏法,是将菌种置于 15℃~20℃ 条件下保藏,每隔 3~6 个月转管 1 次。这一技术提供了一个简便有效的短期保藏方法,但也增加了菌种产生污染和形态、生理特征发生变异的风险^[3]。液氮超低温保藏是最可靠和有效的方法^[4],但由于需要昂贵的设备和高成本的液氮,该技术在一般的食用菌生产企业难以实施。显然,建立一种长期有效且易于推广的草菇菌种低温保藏方法,将会对草菇产业的发展起到积极的推动作用。

李育岳等^[5]对草菇菌种的低温保藏进行了研究,认为草菇的厚垣孢子可以作为草菇菌种保藏的材料;陈明杰等^[6, 7]则对草菇在低温保藏条件下的自溶现象从遗传水平上进行了研究。不过在低温条件下长期有效保藏草菇菌种的方法还未见报道。

海藻糖是两个分子的葡萄糖以糖苷键连接起来的非还原性双糖,广泛地存在于细菌、真菌和植物中。大量的研究表明,在冷冻、冷藏、干燥脱水等胁迫条件下,海藻糖可以防止蛋白质变性,保护细胞免受危害^[8]。尽管目前未见到海藻糖在食用菌低温保藏中应用的报道,但是在双歧杆菌、乳酸菌上的低温保护效应已经得到深入研究^[9, 10, 11]。基于这一背景,我们推测利用海藻糖的保护效应,有可能使得草菇在低温下长期存活,从而实现草菇的低温保藏目的。因此,本研究选用海藻糖溶液作为低温保护剂,研究低温条件下海藻糖对草菇菌种保藏的保护效应,以及草菇的代谢、遗传稳定性,以期对草菇菌种低温保藏提供有效的途径。

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

1.1.1 综合马铃薯斜面培养基: 20%马铃薯浸液 1 L, 葡萄糖 20 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, Vitamin B1 微量, 琼脂 15 g, pH 6.0。

1.1.2 海藻糖溶液的准备: 配制 10%~40%浓度的海藻糖溶液,完全溶解后过滤灭菌。海藻糖从广州市华柏食品添加剂有限公司购买。

1.2 草菇菌种的培养

草菇(*Volvariella volvacea*)菌种 V9715 为本所菌种保藏中心提供。将草菇菌种 V9715 接种到新鲜的

综合马铃薯斜面培养基上,培养 7~14 d 后备用。

1.3 草菇菌种的低温保藏

将过滤灭菌后的海藻糖溶液用灭菌的移液管转移到准备好的草菇菌种试管斜面中,每管加入海藻糖溶液 8 mL,另设一个用清水代替海藻糖溶液的对照。将试管斜面放在 4~6℃ 冷库中进行长期保存。

1.4 生存活性测定

试验一: 每个月用接种针从低温保存的草菇试管斜面中挖取一小块菌块,放在准备好的综合马铃薯平板上,28℃ 培养箱中培养,观察草菇菌种的菌丝生长速度和厚垣孢子产生情况,直至 8 个月。以 10~15℃ 斜面常规保藏的草菇菌种作为对照。

试验二: 取海藻糖处理的低温保藏 8 个月的草菇菌种一小块,放入新的综合马铃薯斜面试管中,28℃ 活化生长 7 d 后再加入海藻糖溶液低温保藏,同时设一个加清水的处理,按前述方法测定生存活性。以 10~15℃ 斜面常规保藏的草菇菌种作为对照。

1.5 次生代谢产物测定

从海藻糖处理的低温保藏 8 个月的草菇试管斜面中挖取一小块菌块,放在准备好的综合马铃薯平板上,28℃ 培养箱中培养,取平板上生长的草菇菌丝体,用沸水进行提取 15 h,离心取上清液,反复多次,直至提取液色淡,并将几次沸水提取液混合。将沸水提取液浓缩,并调节 pH 至 7.0,然后用提取剂定容至 2 mL,进行 HPLC 分析。采用 Waters 510, 996 二极管阵列检测器,Empower 数据处理系统;分析柱采用 HyperClone 5u ODS(C18), 4.6 mm × 250 mm;梯度洗脱: A-水; B-甲醇; 0~10 min: 10%B; 10~20 min: 80%B; 检测波长: 254 nm。

1.6 遗传稳定性分析

采用 ERIC-PCR(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) 分子指纹图谱分析菌株的遗传稳定性。

DNA 的提取: 参照 Borroso 等(1995)描述的方法进行。

ERIC-PCR 扩增: 扩增引物为 ERIC1R (3'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA25) 和 ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3)。引物合成由大连宝生物公司进行,扩增反应的试剂盒购买于大连宝生物公司。

PCR 反应体系: 总体积为 25 μL,包括 2 μL dNTP(2.5 mmol/L)、2.5 μL 10×Buffer、1.5 μL MgCl₂(25 mmol/L)、1.5 μL ERIC1R(12.5 pmol/PL)、1.5 μL

ERIC2 (12.5 pmol/L)、80 ng 模板 DNA 1 μ L 和 0.13 μ L Taq 酶(5 U/ μ L)。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 7 min 后, 进行 35 次 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、52 $^{\circ}$ C 退火 1 min、65 $^{\circ}$ C 延伸 8 min), 最后 65 $^{\circ}$ C 延伸 16 min。

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 ERIC-PCR 扩增结果。

2 结果与分析

2.1 海藻糖低温保藏后的生存活性

在生存活性测定的试验一中, 发现草菇菌种经低温保藏 1~8 个月后仍能生长, 并产生厚垣孢子(图 1)。从图 1 可以看出, 在海藻糖的保护下, 草菇菌种在 4~6 $^{\circ}$ C 保藏 8 个月后, 其生存活性与采用常规保藏的菌种相同, 两者的菌丝生长速率、厚垣孢子的形成没有差别。但是, 用清水代替海藻糖在 4~6 $^{\circ}$ C 保藏 1 个月, 检测时菌丝就不能生长(图片未提供)。这表明, 草菇确实为喜高温的真菌类型, 低温能产生致命伤害, 而海藻糖能起到一定的低温保护效应。

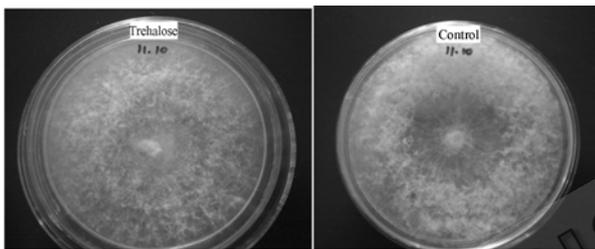


图 1 海藻糖低温保藏与常规保藏的草菇菌种生存能力比较

Fig. 1 Comparison of the viability of straw mushroom between low temperature preservation with trehalose and conventional preservation

A: 4~6 $^{\circ}$ C 海藻糖保藏草菇菌种 8 个月; B: 15~20 $^{\circ}$ C 常规保藏 3 个月
A: Preservation at 4~6 $^{\circ}$ C with trehalose for 8 months; B: Conventional preservation at 15~20 $^{\circ}$ C for 3 months

生存活性测定的试验二的结果进一步证实了海藻糖对草菇菌种的低温保护效应(表 1)。从表 1 看出,

用海藻糖低温保藏 8 个月后活化的草菇斜面菌种, 再加入清水和海藻糖, 放入 4~6 $^{\circ}$ C 低温保藏 1 个月后, 菌种都能够正常生长(图 2), 甚至比 10~15 $^{\circ}$ C 的常规保藏的效果更好, 表现在前两者的菌丝生长比后者提前 2 天。

如前所述, 在生存活性测定的试验一中, 清水低温保藏 1 个月后菌丝不能生长。与此相反, 在经过海藻糖低温保藏 8 个月后, 用清水低温保藏 1 个月的菌丝却能够生长(表 1, 图 2), 这显然是前期海藻糖低温保藏 8 个月的后效在起作用。而且, 其生长速率稍快于仍用海藻糖低温保藏 1 个月的处理, 但厚垣孢子较少(表 1)。

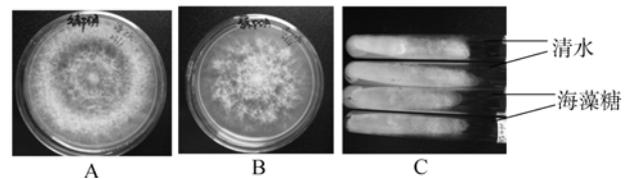


图 2 海藻糖溶液低温保藏草菇菌种的生存活性

Fig. 2 Viability of straw mushroom preserved at low temperature with trehalose solution

A: 海藻糖低温保藏 8 个月后活化, 再用清水低温保藏 1 个月;
B: 海藻糖低温保藏 8 个月后活化, 再用海藻糖低温保藏 1 个月;
C: 14 天后两者的厚垣孢子产生情况

A: Activation after low temperature storage with trehalose for 8 months, followed by storage in water at low temperature for 1 month;
B: Activation after low temperature storage with trehalose for 8 months, followed by storage in trehalose at low temperature for 1 month;
C: Chlamyospore production after preservation for 14 days

2.2 海藻糖低温保藏对菌丝代谢产物的影响

图 3 是海藻糖低温保藏 8 个月的菌种和 15~20 $^{\circ}$ C 常规保藏 3 个月的菌种活化后, 菌丝中水溶性代谢产物的 HPLC 图谱。从时间上看, 采用海藻糖溶液低温保藏的草菇菌种 HPLC 图谱上出现了 a、b、c、d、e、f、g 共 7 种产物, 采用目前草菇菌种常规的保藏方法(15~20 $^{\circ}$ C 斜面保藏)保藏的草菇菌种其 HPLC 图谱上也出现了 a、b、c、d、e、f、g 共 7 种产物, 而且代表次生代谢产物种类的波峰出现的时

表 1 海藻糖溶液低温保藏草菇菌种的效果

Table 1 Effect of low temperature preservation of straw mushroom with trehalose solution

处理 Control	菌落直径 Colony diameter (mm)				厚垣孢子 Chlamyospore
	2d	3d	4d	5d	
海藻糖低温 8 个月+活化生长 7 天+ 海藻糖低温 1 个月	开始生长	20	40	长满平板	有, 多
海藻糖低温 8 个月+活化生长 7 天+ 清水低温 1 个月	开始生长	25	50	长满平板	有, 少
10~15 $^{\circ}$ C 常规保藏 3 个月	0	0	开始生长	20	有

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

间一致, 这表明水溶性次生代谢产物的种类并未因海藻糖的低温保藏而发生改变。另一方面, 从图 3 可以看出 7 种产物的波峰面积和高度在 2 种保藏条件下的变化并不一致, 这些差异表明在采用 HPLC 测定时, 进样时的量可能有差异, 而次生代谢产物种类并没有发生改变。

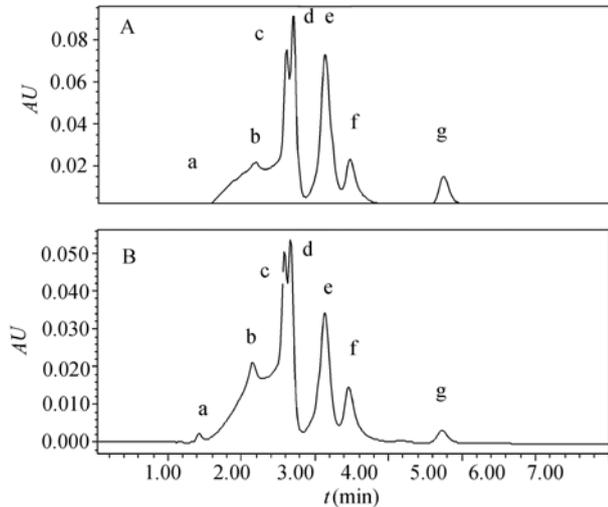


图3 活化生长的草菇菌丝中水溶性代谢产物的 HPLC 图谱
Fig. 3 HPLC profile of soluble metabolites in straw mushroom's mycelium

A: 15~20 常规保藏; B: 海藻糖低温保藏

A: Conventional preservation at 15~20 ;

B: Trehalose preservation at low temperature

2.3 海藻糖低温保藏对遗传稳定性的影响

利用活化后菌丝的分子指纹图谱进行基因的遗传稳定性分析, 可以与代谢产物的 HPLC 分析结果相互印证。从 ERIC-PCR 凝胶电泳图谱(图 4)可以看

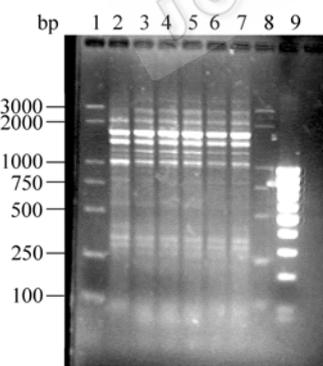


图 4 采用海藻糖溶液 4°C 保藏 8 个月后草菇菌种遗传指纹图谱的情况

Fig. 4 Molecular fingerprinting of straw mushroom preserved in trehalose solution at 4°C for 8 months

Lane 1, 8: DLM-3000 M; Lane 2~5: 海藻糖低温保藏; Lane 6~7: 15~20 常规保藏; Lane 9: 100bp M

Lane 1, 8: DLM-3000 M; Lane 2~5: Trehalose preservation at low temperature; Lane 6~7: Conventional preservation at 15~20 ; Lane 9: 100bp M

出, 海藻糖低温保藏 8 个月的草菇菌种的 DNA 条带的数量、亮度与 15~20 常规保藏 3 个月的菌种没有差异。最亮的三条主带(1.8 kb、1.6 kb 和 1.0 kb)的位置也没有变化。这表明, 在海藻糖的保护下, 草菇菌种的遗传稳定性没有发生改变, 遗传性状是稳定的。

3 讨论

3.1 海藻糖的低温保护效应与机制

本实验的结果表明, 一定浓度的海藻糖溶液在低温条件下对草菇菌种具有保护效应, 使得菌种在 4~6 °C 保藏至少 8 个月(图 1), 这远大于 10~15 °C 常规保藏的 3 个月。在研究中我们发现利用海藻糖溶液保藏后的草菇菌种活化后再用清水保藏, 能在 4~6 °C 下保藏至少 1 个月, 其原因可能是海藻糖已经渗透到草菇菌丝中, 能够保护草菇菌丝耐受低温的伤害, 保护蛋白和膜不受到伤害。Gadd 等人(1987)报道, 高浓度的海藻糖溶液能够防止酵母细胞产生自溶。由此推测海藻糖溶液对草菇菌种的低温保护另一种可能就是海藻糖溶液能防止草菇菌丝的自溶, 从而达到长期保藏的目的。关于海藻糖溶液对草菇的低温保护机理, 仍有许多问题值得研究, 例如, 海藻糖以何种方式进入草菇菌丝(直接进入, 还是降解、进入、再合成)? 以及海藻糖在草菇菌丝中的存在形态(游离态还是结合态)是什么?

3.2 代谢产物的浓度产生变化的原因

本实验结果显示, 经过海藻糖低温保护的草菇菌种的次生代谢产物种类虽然和常规保藏方法的一致, 但是其浓度不同。这种差异可能来源于两种影响因素: 一是提取次生代谢产物时, 两种处理所用的菌丝量有区别, 提取到的次生代谢产物浓度也不同; 二是海藻糖进入菌丝后对真菌的糖代谢和其他相关的代谢过程产生影响, 引起了次生代谢浓度的差异。

3.3 海藻糖低温保护草菇菌种的应用前景

食用菌菌种是食用菌产业的源头, 食用菌同其他微生物一样繁殖速度快, 变异频率高。因此, 对食用菌来讲, 保持菌种的形态型和基因型是非常重要的。目前食用菌菌种的保藏大多采用试管斜面, 在 4°C 冰箱保藏, 这些保藏方法都需要 3~4 个月转管 1 次, 费时费力, 且菌种容易污染和退化。而且有些高温食用菌由于不能忍受低温只能保藏在常温条件下, 这对菌种的保藏也造成不便。因此寻找更有效、安全可靠的菌种保藏新技术是我国乃至世界食用菌产

业急需解决的重大基础研究问题。本研究的方法虽然只是研究了对草菇的效果,但从理论上为食用菌菌种的保藏提供了新的方法,有望在今后用于其他食用菌菌种的保藏。

参 考 文 献

- [1] Chang ST, Hayes WA (eds.). *The Biology and Cultivation of Edible Mushroom*. New York: Academic Press. 1978, pp.1-851
- [2] Chang ST, Buswell JA, Chiu SW (eds.). *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Hong Kong: The Chinese University Press. 1993, pp. 1-865
- [3] Jong SC, Davis EE. Germoplasm preservation of edible fungi in culture through cryogenic storage, in: P.J. West, D.J. Royse, R.B. Beelman (eds.), *Cultivating Edible Fungi*, Elsevier, New York, 1986, pp.213-225.
- [4] Chvostova VF, Nerud L, Homolka. Viability of wood-inhabiting basidiomycetes following cryogenic preservation. *Folia Microbiologica*. 1995, **40**: 193-197.
- [5] 李育岳, 汪麟. 低温保藏草菇种的研究. *食用菌*, 1989, **11** (5): 16.
- [6] 陈明杰, 谭琦, 严培兰. 草菇低温诱导基因的分离. *菌物系统*, 1998, **17** (4): 327-330.
- [7] 张涿, 贾新成, 陈明杰. 草菇低温诱导蛋白研究初探. *菌物系统*, 2000, **19** (4): 580-582.
- [8] Paul BC, Danforth PM, Peter R, *et al.*, Stabilization and Preservation of *Lactobacillus acidophilus* in Saccharide Matrices. *Cryobiology*, 2000, **41**, 17-24
- [9] 葛宇, 赖承兴, 张文艳, 等. 海藻糖对保加利亚乳杆菌保护应用的研究, *食品科学*, 2002, **23**(7): 55-58
- [10] 戴秀玉, 沈义国, 周坚. 海藻糖对乳酸菌的抗逆保护研究, *微生物学通报*, 2001, **28**(2): 46-50
- [11] 温期聪, 袁杰利, 李兵, 等. 海藻糖对双歧杆菌 DM8504 菌株冷冻干燥保护效果的研究, *中国微生物学杂志*, 1997, **9** (2): 37-39
- [12] Borroso G, Perennes D, Labarere JA. Miniprep method for RFLP analysis and ds RNAs detection perfected in the cultivated fungus *Agrocybe aegerita*. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, 1995, pp.87-941
- [13] Gadd, GM, Chalmers K, Reed RH. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 1987, **48**: 249-254

新辟栏目介绍

教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2~5 张, 文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版 (1974~2006) 一张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:
电话/传真:(010) 64117524 联系人: 李平 胡丹
E-mail: wswxtb@163.com

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>