

采用 He-Ne 激光诱变选育速生高产茯苓菌

薛正莲 潘文洁 杨超英

(安徽工程科技学院生化工程系,安徽芜湖 241000)

摘要 采用 He-Ne 激光对茯苓菌 F9 进行了 2 次照射诱变处理,选育到 2 株生长速率和产量均有较大提高的二次激光诱变株 F2.10 及 F2.9。它们在 PDA 平板上培养 4 d,生长速率分别比原始菌株 F9 提高了 91.1% 和 86.8%。摇瓶发酵周期缩短了 2 d 左右,摇瓶发酵 5 d 后,它们的生物量最高,分别达到 39.1 g/100 mL 和 37.7 g/100 mL,比原始菌株 F9 培养 7 d 的最高生物量 24 g/100 mL 分别提高了 62.9% 和 57.1%。经传代培养分析,诱变株的产量性状稳定。表明激光诱变是获得高产茯苓菌的有效途径。

关键词 茯苓, He-Ne 激光, 诱变, 生物量

茯苓属担子菌纲真菌,是一种珍贵的药食两用菌,它含有 β -茯苓聚糖、茯苓酸、块苓酸等三萜类物质和胆碱、卵磷脂、麦角甾醇、 β -茯苓聚醇等多种活性物质,具有益脾、促胃、祛湿、安神、生津等功能^[1],特别是近年来的研究显示,茯苓中的多糖具有抗诱变、抗肿瘤、增强免疫等活性^[2],因此其开发价值及应用前景远大。但目前国内外茯苓菌的生产均采用传统的野生或人工种植,此法生产周期长,同时受产地及条件的限制,很难在短时间内大量地获得标准一致的茯苓菌。液体发酵培养具有无比的优越性。虽然近期有一些关于茯苓液体发酵条件初步研究的报道^[3,4],但其液体培养周期仍然较长,生物量亦处于低水平。因此采用高新技术,选育出生长速度快,产量高的茯苓菌株具有重要的现实意义。

激光作为一种新的诱变剂,对生物体会产生热、压力、光、电磁场等多种效应,是一种在微生物遗传育种领域中极有应用前景的新型诱变因子^[5,6]。低能量的 He-Ne 激光具有促进细胞生长,提高产量,获得遗传性能稳定突变株等优势,目前应用最为普遍^[6,7]。文中应用 He-Ne 激光对茯苓真菌辐射所产生的诱变效应进行了初步的研究,并选育出 2 株生长速度快,遗传性能稳定的高产株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株

茯苓 9 号(Poria cocos-9)简称 F9,由华中农业大学菌种保藏中心提供。

1.1.2 He-Ne 激光器

南京激光仪器厂生产的 HJ-213 型 He-Ne 激光器,腔长 1m,波长 632.8 nm,光斑直径 0.5 cm。

1.1.3 培养基

斜面及平板培养基:PDA 培养基^[8];液体摇瓶培养基:PDA 中除去琼脂。

1.2 方法

1.2.1 孢子悬浮液的制备

在出发菌株和一次诱变株斜面试管中注入无菌生理盐水,振荡后用无菌脱脂棉过滤,制成浓度约为 10^7 个/mL 的孢子悬液。

1.2.2 He-Ne 激光诱变

1.2.2.1 照射过程:将 0.2 mL 菌悬液置于已灭菌的小指管中(0.8 cm×7 cm),分别在不同功率下照射 20 min 及在适当功率下照射不同时间。

1.2.2.2 照射后处理:取照射后的菌液,用生理盐水稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 浓度,将 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度取 0.1 mL 涂平板,每个稀释度涂 3 个平板(同样操作未经照射的对照菌液)。将涂好的平板于 28℃ 培养 4 d 后,计数计算致死率,并通过测量各菌落直径大小计算正变率,其中诱变株菌落直径大于原菌株菌落直径的为正突变株,正变率为正突变菌落数占总菌落数的比例。

1.2.2.3 初筛:挑取生长速度快、菌落大的正突变株 0.4 cm² 小块于 PDA 平板上,28℃ 培养 3 d 后,开始连续测量菌落直径,直至菌落长满 9 cm 的平板,以进一步选出高速生长的正变株。

1.2.2.3 复筛:挑取部分初筛获得的正变株,经 3 次传代培养后,切取 0.5 cm² 方块 2 块于 80 mL 液体培养基中(250 mL 三角烧瓶),在 28℃、150 r/min 恒温振荡培养,取培养不同时间的培养液用 80 目铜筛过滤,收集菌丝体用蒸馏水洗涤 3 次,4 000 r/min 离

第一作者:硕士,副教授。

收稿时间 2004-07-20,改回时间 2004-11-02

心 10 min ,得菌丝体称鲜重。

1.2.3 遗传稳定性分析

将所选诱变株连续转接 7 代 ,摇瓶发酵 ,测定其生物量大小 ,观察其遗传稳定性能。

2 结果与讨论

2.1 一次激光照射诱变结果

低功率的 He-Ne 激光可诱发生物体染色体畸变 ,造成 DNA 分子的损伤与改变 ,从而造成细胞遗传物质结构的改变^[6]。在一定条件下 ,微生物受激光辐射产生的生长刺激作用与激光的辐射强度有密切关系 ,在某一辐射强度处会有一最佳生长刺激作用 ,强度继续增加 ,则微生物生长刺激作用会受破坏 ,甚至出现生长抑制和致死效率 ,不同照射功率和剂量对茯苓 F9 菌株致死率和正变率的影响分别见表 1 和表 2。

表 1 不同照射功率下 F9 的致死率和正变率¹⁾
(照射时间为 20 min)

功率/mW	5	6	7	8	9
致死率/%	22.1	28.5	38.4	53.4	67.6
正变率/%	25.2	31.5	41.3	15.1	9.4

1)总菌数平均为 11(根据实验结果 10⁻⁵的稀释度较合理 ,计数等操作方便)表 2 同。

由表 1 可知 ,孢子致死率随照射功率的增加而增大 ,但 8mW 和 9mW 高功率致死率增加的幅度明显高于低功率 ,而照射功率低的正变率普遍比照射功率高时高。在本实验条件下 ,7mW 功率对茯苓菌丝体生长刺激作用最明显 ,照射后的正变率最高 ,达 41.3% ,在以下的激光照射处理过程中 ,固定照射功率为 7mW。

表 2 不同照射剂量下 F9 的致死率和正变率

剂量/min	5	10	15	20	25	30
致死率/%	13.2	26.3	32.4	39.3	44.6	64.7
正变率/%	14.3	21.1	32.5	40.2	43.5	25.5

表 4 一次诱变株摇瓶培养的生物量 g/100 mL

菌株号	F9(对照)	F3	F5	F7	F8	F10	F11	F13	F14
4 d 生物量鲜重	14.9	20.9	23.4	22.3	23.3	21.1	21.6	26.1	21.3
5 d 生物量鲜重	20.1	23.8	27.9	26.2	28.4	25.9	26.5	30.6	26.4
6 d 生物量鲜重	23.4	25.1	28.7	27.6	29.2	26.6	27.8	31.2	27.1

由表 4 可知 ,所选的一次诱变株摇瓶发酵的生物量均高于对照菌 ,发酵周期也比对照短 ,摇瓶第 5 d 的生物量基本达到平衡。其中 F13 号菌的生物量最高 ,在摇瓶第 6 d 达到 31.2 g/100 mL ,比对照的 23.4 g/100 mL 增加了 33.3% ,以 F13 号菌(定名为 F9A)作为出发菌株进行二次激光诱变 ,以进一步提

由表 2 看出 ,随照射剂量的增加致死率也随之增大 ,照射 25 min 时的正变率最高 ,为最佳的诱变剂量。

从上述不同照射剂量的处理批量中挑选 50 株比对照生长快、菌落大的正变株 ,分别接取 0.4 cm² 小菌块于 PDA 平板(每株接 3 个平行) ,28℃ 培养 3 d 后 ,开始连续测菌落直径 ,从中选出 15 株具有明显生长优势的正变株 ,记录结果见表 3。

表 3 He-Ne 激光一次照射对茯苓菌生长速率的影响 cm

菌株号	3 d 菌落直径	4 d 菌落直径	5 d 菌落直径	6 d 菌落直径
F1(5 min)	2.51	3.72	5.43	7.51
F2(10 min)	2.43	3.81	5.64	7.63
F3(15 min)	2.85	4.11	5.96	8.16
F4(15 min)	2.72	3.96	5.55	7.64
F5(20 min)	3.13	4.45	6.47	8.71
F6(20 min)	2.96	4.04	5.72	7.85
F7(20 min)	3.27	4.33	6.23	8.36
F8(25 min)	3.35	4.72	6.89	—
F9(25 min)	2.88	3.95	5.62	7.82
F10(25 min)	3.09	4.26	6.15	8.26
F11(25 min)	3.12	4.22	6.34	8.47
F12(25 min)	2.98	4.13	5.97	7.93
F13(25 min)	3.46	4.98	7.18	—
F14(30 min)	3.01	4.13	6.09	8.24
F15(30 min)	2.83	4.04	5.85	7.93
F9(对照)	2.25	3.47	5.01	6.72

注 :表内数据为 3 次平均值 ;“—”表示菌丝已长满平板 ,以下均相同。

由表 3 可看出 ,F9 经一次激光照射后 ,所选的 15 株诱变株在 PDA 平板上的生长速度均有较大提高 ,照射时间在 20~25 min 时更易获得速生菌株 ,照射 25 min 后 ,选出的 F13 培养 5 d 后菌落直径达 7.18 cm ,比对照 F9 的 5.01 cm 增大了 43.3%。

从表 3 中挑选 8 株培养 6 d ,菌落直径在 8 cm 以上的正变株 ,经 3 代培养后 ,做摇瓶培养 4 d 后连续测生物量 ,结果如表 4。

高其产率。

2.2 二次激光照射诱变结果

在 7mW 功率下对 F9A 菌株分别照射 10 min、15 min、20 min、25 min 和 30 min ,按同样的筛选方法 ,最终选出 15 株平板生长速率明显强于 F9A 菌株的二次诱变株。由表 5 看出 ,所选的 15 株二次诱变株在

平板上的生长速度都有进一步的提高,但提高的幅度要小于第1次诱变,照射时间在15 min时更易获得速生菌株,培养4 d后,照射15 min的F2.10和F2.9菌落直径分别达6.67 cm和6.52 cm,比一次诱变株F9A的5.02 cm增大了32.9%和29.9%,比原始菌株F9的3.49 cm增大了91.1%和86.8%。

从表5中挑选7株培养5 d菌落直径在8 cm以上的正变株,经3代培养后,做摇瓶培养,3 d后连续测生物量,结果如表6所示。

由表6可看出,二次诱变株摇瓶发酵的生物量均高于一次诱变株F9A,摇瓶发酵周期也有所缩短,摇瓶至第4 d,生物量基本达到平衡。其中F2.10和F2.9号菌的生物量最高,摇瓶至第5 d分别达到38.7 g/100 mL和37.3 g/100 mL。以F2.10和F2.9号菌作为2次激光照射获得的最佳诱变株,对它们的遗传稳定性能作进一步分析。

2.3 诱变株遗传稳定性实验

将2次诱变获得的生长性能较好的2株诱变株

表6 二次诱变株摇瓶培养生物量 g/100 mL

菌株号	F9	F9A	F2.3	F2.6	F2.7	F2.8	F2.9	F2.10	F2.12
3 d生物量鲜重	10.1	18.1	24.4	26.3	23.3	23.1	26.8	28.9	24.9
4 d生物量鲜重	14.8	25.9	31.8	35.3	32.1	31.3	35.9	37.1	32.7
5 d生物量鲜重	20.3	30.1	33.1	36.1	33.2	32.9	37.3	38.7	34.4

表7 两次诱变株传代的实验结果

传代次数	1	2	3	4	5	6	7
F2.10 生物量/(g·(100 mL) ⁻¹)	38.4	38.8	37.8	37.5	38.2	37.9	37.7
F2.9 生物量/(g·(100 mL) ⁻¹)	37.2	36.7	37.5	37.1	37.7	37.2	37.4

由表7可见,二次诱变菌株传代培养后,摇瓶生物量稳定,表明所选育的F2.10和F2.9诱变株具有良好的遗传稳定性。

2.4 诱变株与原始菌株发酵特性的比较

根据筛选与稳定性分析结果,确定F2.10、F2.9为最佳诱变株,将此2菌与原始菌株F9的发酵特性进行比较,结果见图1。

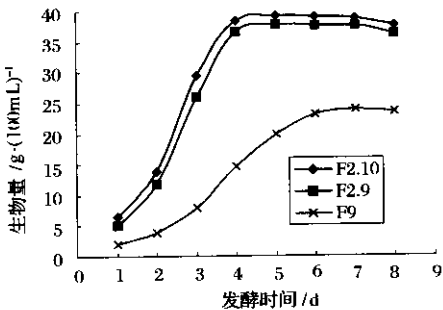


图1 各菌株发酵时间与生物量之间关系

连续7次传代后,分别进行摇瓶发酵5 d,测生物量,结果如表7所示。

表5 He-Ne激光二次照射对茯苓菌生长速率的影响 cm

菌株号	3 d菌落直径	4 d菌落直径	5 d菌落直径
F9	2.27	3.49	5.11
F9A	3.43	5.02	7.15
F2.1(10 min)	3.59	5.57	7.84
F2.2(10 min)	3.68	5.43	7.63
F2.3(10 min)	3.87	5.98	8.54
F2.4(10 min)	3.61	5.41	7.55
F2.5(15 min)	3.76	5.71	7.87
F2.6(15 min)	4.03	6.31	8.79
F2.7(15 min)	3.62	5.96	8.36
F2.8(15 min)	3.75	6.05	8.48
F2.9(15 min)	3.99	6.52	—
F2.10(15 min)	4.15	6.67	—
F2.11(20 min)	3.61	5.53	7.78
F2.12(20 min)	4.02	6.29	8.62
F2.13(25 min)	3.63	5.57	7.67
F2.14(25 min)	3.57	5.48	7.49
F2.15(30 min)	3.68	5.61	7.71

由图1看出,原始菌株F9摇瓶培养至6~7 d,生物量基本稳定,最高达到24 g/100 mL,而诱变株F2.10和F2.9摇瓶培养至4~5 d,生物量就基本稳定,最高分别达到39.1 g/100 mL和37.7 g/100 mL,比原始菌株F9的最高生物量24 g/100 mL分别提高了62.9%和57.1%。可见诱变株的生长速度和生物量比原始菌株都有较大提高。

3 结 论

原始菌株F9经7mW功率激光依次照射25 min和15 min诱变处理后,获得了2株生长速度和产量均有较大提高的二次激光诱变株F2.10和F2.9。它们在PDA平板上培养4 d,生长速率分别比原始菌株F9提高了91.1%和86.8%,摇瓶发酵周期也缩短了2 d左右,摇瓶培养5 d后,它们的生物量最高,分别达到39.1 g/100 mL和37.7 g/100 mL,比原始菌株

F9 培养 7 d 的最高生物量 24 g/100 mL 分别提高了 62.9% 和 57.1%。经传代培养分析,诱变株的产量性状稳定。这表明 He-Ne 激光对茯苓菌的诱发突变作用显著,是获得速生高产茯苓菌株的有效途径,且其诱变株具有良好的遗传稳定性。

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
- 2 张文文,黄金龙.茯苓多糖的抗肿瘤作用[J].中草药,1999,30(7):13~14
- 3 王 谦,冀 宏.中国食用菌[J].茯苓的研究及其动物免疫学观察,2002,21(2):41~42
- 4 刘忠义,曾虹燕.茯苓液体培养研究初探[J].湘潭大学自然科学学报,2002,24(4):49~51
- 5 向 洋.激光生物学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1995
- 6 陈云琳,刘晓娟.激光诱变微生物技术的研究进展[J].生物物理学报,2003,19(4):353~358
- 7 李耀维,冯文新,张素梅.He-Ne 激光对金针菇 SOD 高产株的诱变效应[J].激光生物学报,2002,11(4):283~286
- 8 沈 萍,范秀容,李广武.微生物学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1999

Studies on the Screening of Fast Growing and High Yielding *Poria cocos* Strains by Using He-Ne Laser Irradiation

Xue Zhenglian Pan Wenjie Yang Chaoying

(Dept ment of Biochem.Engineering , Anhui University of Technology and Science , Wuhu , 241000 , China)

ABSTRACT Two *Poria cocos* mutants F2.10 , F2.9 whose mycelia growth speed and yield were much higher than that of the parental strain F9 ,were obtained by twice irradiation using He-Ne laser. Their mycelia growth rate was increased by 91.1% and 86.8% respectively when cultured for 4 days on PDA plates. Their biomass could reached 39.1g/100 mL and 37.7g/100 mL after 5-day fermentation , which was increased by 62.9% and 57.1% respectively compared with 24g/100 mL of the original strain F9. The mutants have good hereditary stability sub-culturing after several times. Our results showed that laser - inducing was an effective ways for screening excellent *Poria cocos* strains.

Key words *Poria cocos* , He-Ne laser , induced mutation , biomass

政策法规标准

我国食品包装安全环保认证即将出台

目前,我国食品的包装以塑料袋为主,其中存在的安全隐患危及消费者的健康。聚氯乙烯塑料袋因在制作过程中加入增塑剂而产生毒性,塑料制品中由于加入含硬脂酸铅的稳定剂,容易造成人体积蓄性铅中毒,从而危害消费者健康。

在食品包装中,塑料薄膜、纸、金属等包装材料占总成分的 70%,粘合剂占 10%,包装印刷时,油墨及其他物质占 20%。按传统工艺制造的食品包装物不可避免地掺杂苯、甲苯等有害溶剂,虽然其决大多数都在制造中挥发了,但少量溶剂会残留在复合膜之间,随着时间推移而渗入食品中,使食品变质、变味。据了解,在欧美,软包装的粘合剂已经逐渐转向水性或无溶剂产品,而醇溶油墨取代甲苯油墨也在欧美、韩国成为主要的发展趋势。在相应的法规方面,美国以及欧盟都在相关法律中明确规定了用于食品或药品包装的粘合剂和油墨类型,只要是法规中没有提到的化学品,一律禁用。虽然我国食品卫生法已经实行多年,但对包装材料的生产、加工和使用缺乏有效的管理,市场上很多食品包装材料难以符合国家对食品安全、卫生和环保方面的要求,在一定程度上对我国食品包装行业形成贸易壁垒,制约了我国食品的出口。

基于食品包装安全存在的问题,国家相关部门的管理尤为重要。目前我国已制定了 30 多项基本涵盖食品包装类产品的所有种类的国家标准。鉴于我国食品包装行业的现状和我国食品出口贸易的迫切要求,目前中国标准认证中心联合相关检测机构和企业,制定了食品及容器类产品安全环保认证的技术要求和实施规则,经国家认监委备案,将于 2005 年 9 月 19 日正式实施。但该认证不是国家强制性认证,在执行方面会受到一定的制约,而这种制约将对食品包装安全管理提出新的要求。