

褐环乳牛肝菌在液体摇瓶培养过程中 菌丝体活力指标的筛选研究

李 敏, 闫 伟

(内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要:以褐环乳牛肝菌为试验材料, 从酶学的角度, 通过测定超氧化物歧化酶(SOD)与酸性磷酸酶(ACP)活性、脯氨酸(Pro)与丙二醛(MDA)含量以及相对电导率的变化, 研究了菌丝体培养过程中菌丝体活力与这几项测试指标的关联性, 为对供试菌株在液体培养条件下的菌丝体活力进行评价探索可行方法。结果表明, 菌丝体的酸性磷酸酶活性与菌丝体生物量变化趋势有较好的一致性; 菌丝体相对电导率在菌丝体生长最旺盛时, 其值最低。这两项指标可作为反映菌丝体活力的指标。超氧化物歧化酶活性、脯氨酸与丙二醛含量也可作为反映菌丝体活力的参考指标。

关键词:褐环乳牛肝菌; 菌丝体活力; 电导率; 酸性磷酸酶

中图分类号: S432.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)05-0176-04

Study on the Activity Indexes Selection of *Suillus luteus* in the Liquid Culture

LI Min, YAN Wei

(College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract: The relativity between mycelial activity and several indexes were studied by determining the activity of SOD and ACP, the content of Pro and MDA and relative conductance of *Suillus luteus* (L.: Fr.) Gray mycelia. The results showed that the mycelial ACP activity was consistent preferably with the change of mycelial biomass. The mycelial relative conductance was the lowest when the mycelia grew fastest. These two indexes could be regarded as mycelial activity indexes. SOD activity and the content of Pro and MDA could also be regarded as referenced indexes of mycelial activity.

Key words: *Suillus luteus*; Mycelial activity; Relative conductance; ACP

菌根被认为是森林生态系统中的主要因子^[1], 外生菌根真菌与许多森林树木根系的互惠共生对植物的健康和营养是至关重要的。另外, 即使在自然接种体存在的条件下, 用外生菌根真菌进行人工接种可以保证生产均匀健康的苗木^[2]。有证据表明, 菌根通过增加营养的吸收可以帮助植物定殖, 在干旱条件下生存下来^[3]。一个有效的接种体可以改善土壤微生物的特性, 不仅对植物的成长起到决定性的作用, 还可以改善土壤的质量及理化性质^[4-6]。

菌根真菌对树木的积极作用说明接种菌根真菌对促进树木的生长是一种有效的手段, 其潜力很大。但目前菌丝体的大量扩繁及菌剂生产受到一定的限制。通过液体培养可比固体培养更快速地扩繁菌丝体, 但如何对菌丝体的活力进行测试和评价, 如何确

定最佳培养期, 不仅对菌剂质量评价是一个很关键的指标, 而且也是目前尚未解决的问题。本研究选用褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus* (L.: Fr.) Gray) 为对象, 对其在液体摇瓶培养条件下的菌丝体活力评价进行了试验和探索。

1 材料和方法

1.1 菌株

褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus* (L.: Fr.) Gray), 本研究室分离保存菌种。

1.2 培养基

a. Pachlewski 固体培养基: 葡萄糖 2%, 酒石酸铵 0.25%, 硫酸镁 0.05%, 磷酸二氢钾 0.1%, 麦芽汁 1.5%, 柠檬酸铁 0.003%, 微量元素 1 mL, 0.004%

收稿日期: 2007-03-05

基金项目: 国家科技部推广项目(2005EC000086); 内蒙古学科带头人(20050802)

作者简介: 李 敏(1979-), 女, 内蒙古巴彦淖尔人, 在读博士, 主要从事菌根真菌的液体发酵研究

通讯作者: 闫 伟(1959-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 博士, 主要从事林业与菌根基础理论及应用技术研究。

VB₁ 1 mL, 琼脂 1.8%

b. 液体培养基: 葡萄糖 1%, 麦芽汁 1%, 蛋白胨 0.2%, 酵母浸膏 0.5%, 磷酸二氢钾 0.05%, 柠檬酸 0.01%, 氯化钙 0.05%, 磷酸氢二铵 0.025%, 1% Fe-Cl₃ 0.12%, 0.04% VB₁ 2.5%。

1.3 培养方法

将 4℃ 冰箱中保存的试管斜面菌种取出, 室温下缓菌 1 d, 挑取斜面边缘菌丝转接于 Pachlewski 平板培养基上, 长出菌丝后再连续转接 2~3 次, 25℃ 暗培养 7 d 备用。平板菌丝长好后, 接入装有 50 mL 改良 MMN 液体培养基的 500 mL 三角瓶中培养 10 d, 用分散机(IKA T 18 basic) 10 000 r/min 粉碎 1 min, 随后定量接入装有 50 mL 液体培养基的 500 mL 摇瓶中培养。

1.4 取样时间

从接种第 5 天起每隔 1 d 取样测量菌丝体生物量及几种生理生化指标, 取至第 18 天, 共测 7 次。

1.5 菌丝活力指标及生物量测定方法

1.5.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 氮蓝四唑(NBT)光化还原法; 丙二醛(MDA)含量测定: 硫代巴比妥酸(TBA)法; 脯氨酸(Pro.)含量测定: 磺基水杨酸法; 酸性磷酸酶(ACP)活性测定: 对硝基苯磷酸二钠法^[7,8]。

1.5.2 电导率(膜透性)测定 电导率仪法。

1.5.3 菌丝生物量测定 采用干质量法测定。取发酵液过滤, 菌丝体用无菌水冲洗数次, 在 60℃ 烘箱内烘干至恒重称重。

2 结果与分析

2.1 菌丝体生物量随菌丝培养的变化

由图 1 可见, 褐环乳牛肝菌在培养过程中, 菌丝体生物量从接种始至第 5 天是缓慢增长的, 从第 5 天至第 9 天, 菌丝体进入指数生长期, 生物量迅速增加并达到最大值, 之后数日生物量基本保持稳定状态, 至第 14 天随着前期微生物的迅速生长繁殖, 培养液中的营养物质被大量消耗, 抑制菌丝体代谢活性的产物不断积累, 菌丝体开始老化, 菌丝细胞产生自溶, 致使生物量呈现下降趋势。由此可见, 褐环乳牛肝菌的最佳液体培养时间应在 10 d 左右, 此期内不仅菌丝体的增殖速率处于高峰状态, 而且菌丝细胞也处于活性最高状态。

2.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性随菌丝培养的变化

由图 2 可见, SOD 活性在菌丝体培养初期就处于较高值状态, 这可能是由于菌丝体在高速粉碎

(10 000 r/min) 时受到的机械破坏较严重, 而引起菌丝体内抗氧化酶活性升高所致, 是生物的保护性反应。SOD 是一种典型的诱导酶, 同时作为体内抗氧化酶系统的主要成分之一^[9], 出现活性增高反应是可能的。

接种后第 5 天, 菌丝体生物量积累进入指数增长期, 其 SOD 活性呈现上升趋势, 到指数生长中期, 约 7 d 时达到最大值。至第 11 天, 菌丝体的 SOD 活性都保持相对较高水平。之后从接种培养第 11 天至第 17 天, 随着菌丝的老化以及培养液中溶解氧的降低, SOD 作为好气生物防御氧伤害的细胞保护酶, 在菌丝体内的活性呈逐渐下降趋势, 特别是从第 15 天以后, SOD 活性下降的更快。这一结果与石磊等^[10]对 SOD 在微生物中的含量及分布的研究结果基本一致。

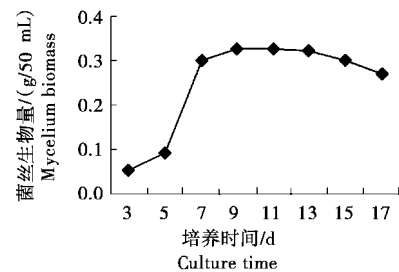


图 1 菌丝培养过程中生物量变化

Fig. 1 Change of biomass during the liquid culture

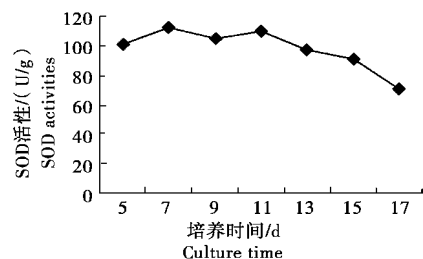


图 2 菌丝培养过程中 SOD 活性变化

Fig. 2 Change of SOD activities during the liquid culture

2.3 丙二醛(MDA)含量随菌丝培养的变化

由图 3 可知, 在菌丝培养过程中, MDA 含量总体上呈上升趋势。这是由于菌丝细胞在老化过程中产生的超氧化物自由基诱导膜质中的不饱和脂肪酸发生膜质过氧化作用, 在膜质过氧化作用中产生了丙二醛, 丙二醛含量的多少可以反映体内膜质过氧化化的程度, 丙二醛含量越高, 表明细胞质膜伤害越重。同时, 丙二醛能强烈地与细胞内各种成分发生反应, 因而引起酶和膜的严重损伤, 膜电阻及膜的流动性降低, 最终导致了膜的结构及生理完整性的破坏, 从而引起菌丝的衰老。已经证明, 衰老时膜脂过氧化作用增强, 内源抵御活性氧毒害的能力下降。许多研究也表明, 随着组织的衰老, 其体内 MDA 含

量是逐渐增加的^[11,12]。

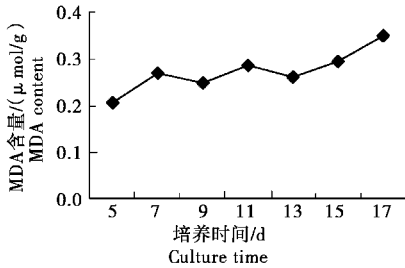


图3 菌丝培养过程中MDA含量变化

Fig. 3 Change of MDA content during the liquid culture

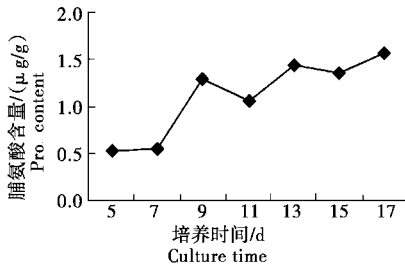


图4 菌丝培养过程中脯氨酸含量变化

Fig. 4 Change of Pro content during the liquid culture

2.4 脯氨酸(Pro)含量随菌丝培养的变化

测定生物体内游离脯氨酸的含量,在一定程度上可以判断逆境对该生物体的危害程度。在正常环境条件下,生物体内游离脯氨酸含量较低,但在生物衰老时,其体内游离脯氨酸含量可增加数倍。在本试验中,褐环乳牛肝菌在定量的营养液中培养,随着菌丝体在生长过程中对营养物质的不断代谢消耗,细胞增殖速度逐渐变缓,特别在培养后期,菌丝体开始老化,细胞出现自溶,培养基中会产生大量不利于菌丝生长的有害物质,由此导致游离脯氨酸在培养液中的大量产生和积累,如图4所示。本试验结果表明,在菌丝的培养过程中,脯氨酸含量总体上呈逐渐上升趋势。

2.5 酸性磷酸酶(ACP)活性随菌丝培养的变化

由图5可知,从接种培养第5天至第11天,菌丝生物量处于指数增长期间,菌丝体中的酸性磷酸酶活性明显呈上升趋势。培养11d之后,随着菌丝体生物量的下降,酶活性也开始逐渐下降。这说明褐环乳牛肝菌对酸性磷酸酶的分泌作用与菌丝活性相关,处于旺盛生长中的菌丝体,分泌酸性磷酸酶的作用亦强。很多研究表明菌根真菌可分泌磷酸酶^[13,14],可使土壤中磷酸酶活性增强,促进对难溶性磷的活化,从而促进树木对磷营养的吸收。

2.6 电导率(膜透性)随菌丝培养的变化

菌丝体内可溶性物质或电解质水通过细胞膜外渗,渗漏越多,细胞膜的完整性越低,电导率就越高。这样可以利用电导率数值来反映菌丝细胞质渗漏情

况,定量地描述菌丝活力。

由图6可见,褐环乳牛肝菌在培养初期,菌丝电导率较高,这可能是由于接种时菌丝被高速粉碎,细胞内可溶性物质大量产生,导致相对电导率较高。在菌丝体逐渐恢复生长,代谢旺盛,生物量增长达到最高时,相对电导率下降到最低点。以后随着菌丝体增殖减弱、活力降低,菌丝开始老化,细胞质的完整性变差,渗漏严重,电导率逐渐上升,至17d菌丝的电导率值达到最大,说明菌丝体已丧失生长能力。一般地说,随着菌丝老化,细胞质的完整性变差,渗漏严重,电导率较高。因此,菌丝在老化过程中,相对电导率越大,菌丝活力就越低。从图6可以看出,褐环乳牛肝菌在培养9d左右电导率最低,说明此时菌丝活力达到最大。

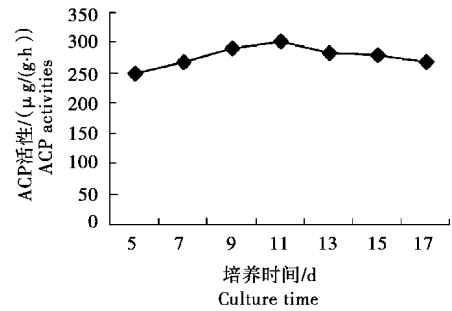


图5 菌丝培养过程中ACP活性变化

Fig. 5 Change of ACP activities during the liquid culture

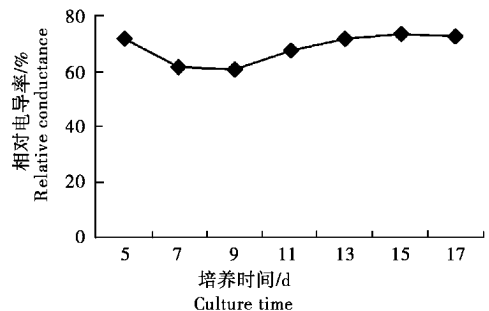


图6 菌丝培养过程中相对电导率变化图

Fig. 6 Change of relative conductance during the liquid culture

3 结论

褐环乳牛肝菌在液体摇瓶培养过程中,菌丝体在第5天至第9天处于对数生长期,菌丝体生物量以几何级数增加,菌丝活力最强,第9天至第11天基本维持稳定,之后逐渐下降。从菌丝培养过程中几种生理生化指标来看,ACP活性在培养11d时达到最大;电导率在第9天达到最低,说明此期间菌丝活力最大。而SOD,MDA及Pro随着菌丝的老化,虽然总体上呈下降或上升的趋势,但变化不稳定,只能作为菌丝体活力的参考指标。综合各生理生化指标

与菌丝体生物量变化的相关规律, 酸性磷酸酶与电导率能较准确地反映菌丝的衰老过程, 可作为间接对菌丝体活力进行测试的可行方法。

参考文献:

- [1] Rossi M J, Souza J A R, Oliveira V L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 175–181.
- [2] Luciana da Silva Rodrigues, Maria Catarina Megumi Kasuya, Arnaldo Chaer Borges. Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel[J]. Mycorrhiza, 1999, 8: 263–266.
- [3] Caravaca F, Barea J M, Palenzuela J, et al. Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Appl Soil Ecol, 2003, 22: 103–111.
- [4] Molina R, Trappe J M. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi[J]. For Sci, 1982, 28: 423–458.
- [5] Caravaca F, Barea J M, Figueroa D, et al. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for reafforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters[J]. Appl Soil Ecol, 2002, 20: 107–118.
- [6] Carrillo Garc a A, Luz J L, Bashan Y, et al. Nurse plants, mycorrhizae, and plant establishment in a disturbed area of the Sonoran desert[J]. Restor Ecol, 1999, 7: 321–335.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [8] 萧浪涛, 王三根. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [9] 夏铁骑. 自由基、活性氧、SOD 及植物衰老机理研究的现状与进展[J]. 濮阳职业技术学院学报, 2005, 18(2): 23–24.
- [10] 石 磊, 杨秀艳, 赵丽华. 超氧化物歧化酶在微生物中的含量及分布情况[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2005, 26(7): 794.
- [11] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutase[J]. Plant Physiol, 1993, 101: 7–12.
- [12] 华 春, 王仁雷. 杂交稻及其三系叶片衰老过程中 SOD, CAT 活性和 MDA 含量的变化[J]. 西北植物学报, 2003, 23(3): 406–409.
- [13] 宋勇春, 李晓林, 冯 固. 菌根真菌磷酸酶活性对红三叶草生境中土壤有机磷亏缺的影响[J]. 生态学报, 2001, 21(7): 1130–1135.
- [14] 苏友波, 王 贺, 张俊伶, 等. 丛枝菌根对三叶草根际磷酸酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 1998, 4(3): 264–270.