

# N<sup>+</sup> 离子束注入诱变选育桑黄菌株的研究

全卫丰, 汪洁, 刘广建, 薛璟 (江苏省苏微微生物研究有限公司, 江苏无锡 214063)

**摘要** [目的] 研究 N<sup>+</sup> 离子注入诱变选育桑黄菌株, 提高桑黄菌的产量。[方法] 通过对 N<sup>+</sup> 离子注入诱变后桑黄孢子的存活率以及突变率的研究确定离子注入的最适剂量, 诱变后用拮抗试验结合酯酶同工酶谱分析验证菌株发生突变, 之后分别以菌丝形态、菌丝生长速度、液体发酵菌丝体生物量以及液体发酵胞外多糖产量为参数进行变异菌株的筛选。[结果] 确定了离子注入诱变桑黄适宜参数: 注入剂量  $2.00 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>, 注入能量 20 KeV。得到 1 株高产桑黄菌株 PI 126, 其生物量和多糖产量分别为 23.7 和 7.6 g/L, 比出发菌株相应产量显著提高。经平板传代, 10 代后变异菌株的遗传性状较稳定, 无明显回复突变。[结论] 低能离子束注入技术用于桑黄育种是可行的。

**关键词** 离子注入; 桑黄; 育种

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)01-00107-03

## Study on Breeding *Phellinus igniarius* by N<sup>+</sup> Implantation

QUAN Wei-feng et al (Jiangsu Suwei Microorganism Research Limited Company, Wuxi, Jiangsu 214063)

**Abstract** [Objective] To breed *Phellinus igniarius* and improved *P. igniarius* yield by N<sup>+</sup> implantation. [Method] The optimum dosage of ion implantation was obtained through research on survival rate and mutation rate of *P. igniarius* spore after induction of N<sup>+</sup> implantation. After mutation, antagonistic test combined with analysis of esterase isozymes to verify strain mutation, with mycelial morphology, growth rate, liquid fermentation mycelial biomass and extracellular polysaccharide yield as parameters to screen variant strain. [Result] The appropriate parameters of the ion implantation mutagenesis *P. igniarius* were determined: implantation dosage  $2.00 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>, injection energy 20 KeV. A high-yielding strain of *P. igniarius* called PI 126 was obtained, whose biomass and polysaccharide production are 23.7 g/L and 7.6 g/L respectively, and the mutant genetic traits are stable after ten generation. [Conclusion] Low energy ion beam implantation is feasible for breeding of *P. igniarius*.

**Key words** Ion implantation; *Phellinus igniarius*; Breeding

桑黄 [*Phellinus igniarius* (L. ex. Fr) Quel], 学名: 鲍氏层孔菌, 属于担子菌亚门层菌纲多孔菌目多孔菌科针层孔菌属类真菌<sup>[1]</sup>。桑黄具有抗菌、抗癌、抗纤维化、抗氧化以及免疫调节等多种药理作用<sup>[2]</sup>, 尤其是其抗癌作用。桑黄是目前国际公认的生物抗癌物质中有效率最高的药用真菌(其对小鼠肉瘤 S180 的抑制率为 96.7%)<sup>[3]</sup>。桑黄胞外多糖(PIEP)是桑黄中的主要功能性成分之一, 具有明显的抗肿瘤活性和脂质过氧化作用<sup>[4]</sup>。

离子束注入技术是近年来发展起来的一类新型诱变育种手段, 具有变异幅度大、突变率较高、突变谱较广、突变体的遗传性能较稳定、回复突变率低等优点, 目前在微生物以及作物育种中得到成功应用<sup>[5]</sup>。为此, 笔者对 N<sup>+</sup> 离子注入诱变选育桑黄菌株进行了研究, 旨在为提高桑黄菌产量提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验菌株。**桑黄菌株 1 株(保藏号: 52363)购自中国农业科学院。

**1.1.2 培养基。**PDA 固体培养基: 马铃薯汁 200.0 g(煮沸后纱布过滤去汁), 葡萄糖 20.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, 琼脂 20.0 g, 水 1 L, pH 自然。种子培养基和发酵培养基: 马铃薯汁 200.0 g(煮沸后纱布过滤去汁), 葡萄糖 20.0 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, 水 1.0 L, pH 自然。

**1.1.3 主要仪器。**DYCZ30 型电泳仪, 北京市六一仪器厂生产; 回转式摇床, 上海跃进医疗器械厂生产; 722N 型可见

分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司生产; LZD-900 型离子注入机。

### 1.2 方法

**1.2.1 低能 N<sup>+</sup> 离子注入诱变。**

**1.2.1.1 注入前处理。**取 0.02 g 桑黄孢子粉, 用 5.0 ml 5% 氯胺 T 溶液浸泡 5 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 无菌水洗涤、离心, 重复 3 次, 加水定容至 10.0 ml。无菌水稀释, 配制成浓度为 10<sup>4</sup> 个/ml 级的孢子悬液。取 0.1 ml 均匀涂布无菌平皿中央, 置于超净台由无菌风吹干, 经镜检孢子无重叠后立即进行低能 N<sup>+</sup> 离子注入。

**1.2.1.2 N<sup>+</sup> 离子注入。**离子注入前开机预热 2 h, 紫外线对靶室持续消毒 30 min, 调节靶室真空度为  $1 \times 10^{-3}$  Pa, 注入物质 N<sup>+</sup> 离子提前加速到 20 KeV, 然后以  $2 \times 10^{15}$  ions/(cm<sup>2</sup> · s) 的脉冲率对样品进行剂量为  $25 \times 10^{14}$ 、 $50 \times 10^{14}$ 、 $100 \times 10^{14}$ 、 $150 \times 10^{14}$ 、 $200 \times 10^{14}$ 、 $250 \times 10^{14}$ 、 $300 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup> 的注入。试验组采用间歇式脉冲注入, 连续注入 5 s 后间隔 15 s, 对照组置于靶室真空中, 不经离子注入。

**1.2.1.3 离子注入后孢子存活量统计。**离子注入后, 用 1.0 ml 无菌水洗脱培养皿内孢子, 取 0.1 ml 洗脱液均匀涂布于 PDA 平面固体培养基上, 28 ℃ 避光培养 72 h 后孢子萌发形成菌落, 计数。对照组做相同处理。绘制存活率曲线。

**1.2.2 N<sup>+</sup> 离子注入对菌株突变率的影响。**以供试桑黄菌株作为对照, 对接受离子注入诱变后形成的菌落进行液体发酵, 每个剂量随机挑取 20 个菌株, 28 ℃ 培养 6 d 后考察菌株的生物量。生物量高于对照 5% 以上的为正突变, 低于对照 5% 以上的为负突变, 否则为无义突变。

**1.2.3 诱变菌株的筛选。**

**1.2.3.1 初筛。**挑取菌丝浓密、生长健壮的菌落,培养后镜检观察锁状联合,同时与出发菌株进行拮抗试验和酯酶同工酶试验<sup>[6]</sup>,观察拮抗试验现象,计算酶谱相似度( $T$ )和联合系数( $S$ )<sup>[7]</sup>。拮抗试验呈显阳性(表现为隆起型、隔离型、沟型)时认定为发生突变,反之舍弃。

### 1.2.3.2 复筛。

(1)菌丝生长速度比较试验。将确定发生突变的菌株进行生长速度试验,用打孔器取直径相同的圆形菌块,接种于PDA培养基中央,观察菌丝萌发时间,记录和测定菌丝生长速度,剔除生长速度小于对照组生长速度50%的菌株。

(2)菌株液体发酵生物量比较。菌株接种于种子培养液中,旋转式摇床140 r/min、28℃避光培养7 d左右,以5%的接种量接种于100 ml发酵培养基中,相同条件下培养3~4 d,4 000 r/min离心15 min,收集菌丝体,烘干至恒重,称量。

(3)胞外多糖含量测定。取1.0 ml发酵上清液,加4.0 ml无水乙醇,充分振荡后放入4℃冰箱中过夜。采用蒽酮-硫酸法测定桑黄多糖含量<sup>[8]</sup>。

**1.2.4 遗传稳定性试验。**将筛选出的高产菌株传代培养10代后按照“1.2.3.2”的方法进行试验,测定其菌丝生长速度、生物量、多糖产量等指标,选取各项指标无明显退化的菌株。

## 2 结果与分析

**2.1  $N^+$ 注入对桑黄孢子存活量的影响** 离子注入的质量沉积、电荷交换效应、效应能量沉积效应在不同阶段所起的作用不同<sup>[9]</sup>。注入剂量在 $1.25 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>以下时,桑黄孢子的存活率随着注入剂量的增大而迅速减小,这可能是因为离子束注入剂量较小时,能量沉积效应起主要作用,导致DNA链断裂和细胞膜过氧化反应,动量传递通过细胞表面的溅射与刻蚀,对细胞壁、细胞膜进行修饰致使其细胞损伤、突变、死亡,使得生物体DNA损伤造成成活率下降。离子束注入剂量中等或适宜时,大量离子的库仑斥力形成保护屏障,可排斥一定剂量离子注入;同时堆积的电荷形成弱电场,可激活生物体内各种酶和诱导修复机制的启动,对生物体具有保护作用,有可能使生物体产生有利于生长发育的变化,提高成活率<sup>[10]</sup>。该试验中,在剂量为 $2.00 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>时成活率达到相应的小峰值。当离子束注入剂量进一步提高,电荷的大量堆积达到一定临界值后,将会导致库仑保护屏障崩溃,对离子注入具有保护作用的屏障消失,离子辐射的损伤超过生物体的修复能力,致使孢子存活率又迅速下降接近全部死亡。

**2.2  $N^+$ 离子注入对菌株突变率的影响** 由图2可知,桑黄菌株的突变率随着 $N^+$ 离子注入剂量的增大而呈上升趋势,剂量达到 $2.50 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>时突变率达到最大值,而后又略微下降,这可能是因为在该剂量范围内,染色体在库仑保护屏障的作用下进行不完全损伤修复,导致DNA发生较高概率的突变<sup>[10]</sup>。注入剂量在 $2.00 \times 10^{16} \sim 2.50 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>时,菌株突变率高于50%,诱变效率较高。桑黄菌株的正突变率随着注入剂量的增加而先上升后下降,在注入剂量为 $2.00 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>时达到峰值(23.43%),正突变

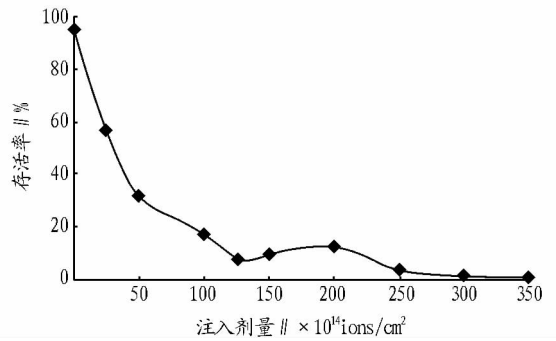


图1 桑黄孢子在不同 $N^+$ 离子注入剂量下的存活率曲线  
效率最高。在注入剂量为 $2.00 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>时,菌株的突变率和正突变率均较高,所以选定该剂量作为诱变的适宜剂量。

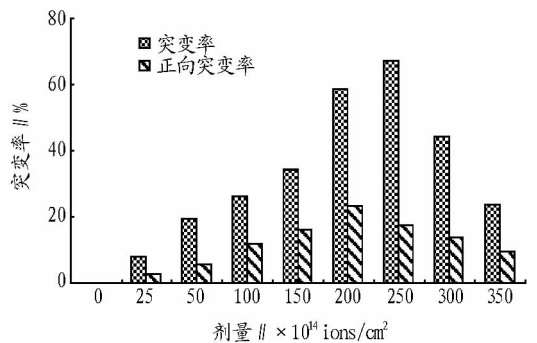


图2 不同 $N^+$ 离子注入剂量对菌株突变率的影响

**2.3 初筛和复筛结果** 弃去生长速度小于对照组50%、菌丝稀疏的菌株,得到25株菌株,较对照组生长速度快的菌株有10株,分别为PI 105、PI 113、PI 126、PI 106、PI 135、PI 129、PI 107、PI 121、PI 130和PI 108,其中除PI 107号菌株外,其他菌株菌丝均鲜黄且健壮,满板时间较短(表1)。

表1 生长速度试验结果

编号	菌丝生长速度//mm/d	菌丝长势
PI 105	6.50 ± 0.01 aA	+++
PI 113	6.50 ± 0.02 aA	++
PI 126	6.50 ± 0.01 aA	+++
PI 106	6.50 ± 0.03 aA	+++
PI 135	6.38 ± 0.02 aA	+++
PI 129	6.38 ± 0.01 aA	+++
PI 107	6.35 ± 0.03 bAB	+
PI 121	6.35 ± 0.01 bAB	++
PI 130	6.32 ± 0.03 bAB	+++
PI 108	6.31 ± 0.02 bB	+++
CK	6.16 ± 0.02	++

注:数据为平均值和标准差( $n=5$ )。同列数据后不同大、小写字母分别表示在0.01、0.05水平差异显著;+++表示菌丝长势旺盛,鲜黄浓密;++表示菌丝鲜黄细密;+表示菌丝黄褐色稀疏。

对所得菌株进行液体发酵试验。由表2可知,液体发酵生物量及多糖产量均显著高于对照组的菌株有3株,分别为PI 113、PI 106和PI 126。综合菌株的生长速度、菌丝在PDA固体培养基的生长情况以及液体发酵生物量和多糖含量等情况,最终筛选得到菌株PI 106和PI 126。

表 2 菌株液体发酵试验结果 g/L

编号	生物量	胞外多糖产量
PI 105	24.6 ± 0.3 aA	4.2 ± 0.3 bAB
PI 113	23.7 ± 0.2 aA	7.5 ± 0.2 aA
PI 126	23.7 ± 0.1 aA	7.6 ± 0.1 aA
PI 106	21.6 ± 0.2 aA	6.5 ± 0.1 aA
PI 135	20.7 ± 0.1 aB	7.0 ± 0.2 aA
PI 129	14.1 ± 0.3 aA	4.2 ± 0.3 aB
PI 107	13.8 ± 0.3 aAB	4.5 ± 0.3 aAB
PI 121	12.0 ± 0.2 bB	3.8 ± 0.2 bB
PI 130	11.8 ± 0.1 bB	3.5 ± 0.1 bB
CK	12.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1

注:数据为平均值和标准差(n=3);同列数据后不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平差异显著。

**2.4 遗传稳定性试验结果** 由表 3 可见,新菌株 PI 106 和 PI 126 在传代至第 5、10 代后,以液体发酵生物量、多糖产量等参数均未出现显著降低,遗传性状稳定,而 PI 126 的各项试验参数均优于 PI 106。

表 3 遗传稳定性试验结果(n=3) g/L

菌株	生物量			多糖产量		
	第 1 代	第 5 代	第 10 代	第 1 代	第 5 代	第 10 代
PI 106	21.6	21.3	21.4	6.5	6.5	6.6
PI 126	23.7	23.6	23.4	7.6	7.0	7.1

### 3 讨论

离子束注入诱变具有质量、能量双重诱变效应的特征,不同于射线辐射,离子注入引发的生物效应既有能量沉积和动量传递,又有元素质量沉积,注入离子的不同电荷数、质量数、能量、剂量组合提供了众多诱变条件,通过这种电、能、质的联合作用,强烈影响生物细胞的生理生化特性,以引起基因突变,所以变异幅度大,有较高的突变率和较广的突变谱,突变体的遗传性能较稳定,回复突变率低。

(上接第 106 页)

分(茎叶、果实)质量分数和地下部分(根)质量分数的比值。富集系数用来衡量植株对生产环境中某种元素的吸收富集能力。转运系数用来衡量植株对生产环境中某种元素的迁移转运能力。由表 3 可知,紫茎泽兰对 Mg、Ni、Pb 有较强的富集能力,根部的富集系数都大于 1,但是茎叶对这 3 种元素的富集系数均小,使得其转运系数较小。紫茎泽兰对 Cr 的富集系数、转运系数均大于 1,可以用于煤渣污染土壤重金属 Cr 的修复治理。

表 3 富集系数和转运系数

系数	部位	Mg	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Pb
富集系数	根	3.432	0.960	0.439	0.151	2.137	0.605	1.376
	茎	1.525	1.445	0.132	0.033	0.138	0.645	0.225
	叶	2.317	1.037	0.244	0.017	0.128	0.372	0.209
转运系数		0.538	1.333	0.403	0.178	0.063	0.884	0.159

### 3 讨论

煤渣污染可以造成土壤中多种重金属含量超标。植物修复技术是治理重金属污染的重要手段。该研究检测了煤

渣污染土壤中重金属含量,进一步研究了紫茎泽兰对受污染土壤重金属的富集、修复特性。结果表明,受煤渣污染土壤中重金属含量大小顺序为 Fe > Mg > Cu > Ni > Cr > Mn > Ni,其中 Cr 污染达到 II 级标准。紫茎泽兰对多种重金属有一定的耐受性,能够在较高浓度的重金属污染土壤上生长,而且对多种重金属有一定的富集作用,特别是对 Mg、Cr、Ni、Pb 的富集系数均大于 1,对 Cr 的转运系数为 1.333,可以作为煤渣污染土壤 Cr 的修复植物。

### 参考文献

- [1] 陈士瑜,陈惠. 菇菌栽培手册[K]. 北京:科学技术出版社,2003:270-271.
- [2] 周村山,马海乐. 桑黄及其药理作用研究进展[J]. 食用菌,2003(2):50-51.
- [3] IKEKAWA T, NAKANISHI M, UEHARA N, et al. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *phellinus linteus*[J]. Gann, 1968, 59:155-157.
- [4] 郑立军,沈业寿,李俊虬,等. 桑黄胞外多糖药理活性的初步研究[J]. 食品科学,2007,28(1):318-321.
- [5] 吴丽芳,李红,余增亮. 离子束在生命科学中的应用[J]. 激光生物学报,1999,8(4):298-304.
- [6] 黄晨阳,张金霞,陈强,等. 食用菌菌种真实性鉴定酯酶同工酶电泳法(NY/T1097-2006)[S]. 北京:中国农业出版社,2006.
- [7] 林兴生,李开本,陈体强,等. 11 个灵芝菌株的栽培性状和酯酶同工酶研究[J]. 江西农业大学学报,2001,23(1):80-84.
- [8] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(第 1 部)[S]. 北京:电子工业出版社,2005:130.
- [9] 宋道军,姚建铭,邵春林,等. 离子注入微生物产生马鞍型存活曲线的可能作用机制[J]. 核技术,1999,22(3):130-132.
- [10] LI S C, YAO J M, YU Z L. Studies on mutation breeding of high-yielding xylanase strains by low energy ion beam implantation[J]. Plasma Science and Technology, 2007, 9(2):248-251.
- [11] LIU G J, MENG Y T, YANG S L, et al. Screening of biocontrol strain *Bacillus subtilis* by N<sup>+</sup> ion beam implantation[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(8):1658-1663.
- [12] 孙国琴,邢丽萍,王玉芬,等. 离子束注入技术在食用菌育种上的应用进展[J]. 内蒙古农业科技,2011(3):103-104,112.
- [13] 王创云,王陆军,秦作霞,等. N<sup>-</sup>离子束注入玉米自交系变异的生物学效应与分子标记分析[J]. 华北农学报,2011(5):131-134.
- [14] 孙鸿举,刘倩,张娜. 低能离子注入对仙客来幼苗生长发育的影响[J]. 内蒙古农业科技,2011(6):26-29.