

生化标记在河北省栽培平菇种质资源鉴别中的应用研究

郑素月, 张庆桥

(河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056038)

摘要: 采用体细胞营养亲和测定和酯酶同工酶分析对河北省广泛栽培的 54 个平菇菌株进行了种质鉴别和遗传多样性研究。结果表明: 54 个平菇菌株经营养亲和测定划分成了 12 个不同营养亲和群, 酯酶同工酶分析结果表明, 同一营养亲和群内菌株酯酶同工酶酶谱相同, 不同营养亲和群菌株酯酶同工酶酶谱有差异。聚类分析结果表明, 不同营养亲和群菌株相似系数为 53%~91%。

关键词: 河北省; 栽培平菇; 营养亲和群; 酯酶同工酶

中图分类号: S 646.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0162-03

平菇是世界性分布和栽培的食用菌, 也是我国主要栽培和出口创汇菇类之一。近年来, 随着食用菌产业的发展, 平菇栽培种类增多, 相互引种、各自命名导致了栽培品种菌种混杂、种源不清、同物异名严重、老化退化和假冒伪劣菌种充斥市场, 制约食用菌产业的发展。随着科学技术的迅猛发展, 许多生化和分子生物学手段已在食用菌种质资源研究中得到了广泛应用^[1-3]。

营养不亲和系统是一种识别异己的遗传系统, 在多数真菌中, 该系统能引起遗传上明显不同的个体在交接区产生特征性的拮抗反应^[4]。Leslie^[5]将所有没有拮抗的亲菌株定义为一个营养亲和群 (Vegetative Compatible Group, VCG)。长期以来拮抗被广泛用于菌株的鉴别及群体遗传学等研究。同工酶方法以其简便快速等特点成为从蛋白质分子水平上研究生物群体遗传分化的重要手段之一, 已被广泛应用于各种食用菌的鉴别和遗传多样性研究^[6-11]。该研究采用营养亲和和测定和酯酶同工酶分析方法, 对收集的河北省平菇生产菌株进行鉴别及遗传多样性分析, 旨在解决河北省栽培平菇菌株品种混乱现象, 为平菇生产提供种源清楚的菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试平菇菌株共 54 个, 菌株编号及名称见表 1。所有供试材料分别收集于河北省北部、中部和南部不

同地区, 包括承德地区、保定地区、石家庄地区及邯郸地区。供试培养基: PDA 综合培养基, 配方为: 马铃薯 (去皮) 200 g; 葡萄糖 20 g; 琼脂 18 g; 磷酸二氢钾 2 g; 硫酸镁 0.5 g; 维生素 B₁ 2 片 (20 mg); 水 1 000 mL。

表 1 供试菌株

序号	原号	序号	原号	序号	原号	序号	原号	序号	原号
1	黑平 815	12	黑平 04	23	广温平菇	34	满城野生	45	四季美
2	新平 51	13	615	24	平菇 208	35	冀农 11	46	优 4
3	冀优 26	14	581	25	89	36	杂 201	47	紫袍
4	超级 100	15	抗 2	26	99	37	1349	48	川杂 26
5	灰平 320	16	2026	27	早秋 615	38	9400	49	泰丰黑平
6	2005	17	农平 8 号	28	T803	39	奥黑	50	高平 88
7	夏抗 8	18	3 号	29	玉灵芝	40	HP-1-1	51	九华 191
8	2061	19	平菇 206	30	太空 2 号	41	双抗黑平	52	558
9	特抗黑平	20	黑平王	31	黑龙 999	42	新平 106	53	科大黑平
10	602	21	2002	32	雪美	43	265	54	宝丰 13
11	美 D28	22	2005	33	灰白平菇	44	法引黑平		

1.2 试验方法

1.2.1 体细胞亲和性测定 按 Burgess^[12] 所述, 略加改进。将 PDA 综合培养基倒入 90 mm 平皿内, 每个平皿大约 25 mL, 待凝固后, 用打孔器取活化菌株菌落边缘生长旺盛的同龄菌种接种于 PDA 综合培养基平板上, 每平板接种 5~7 个菌种块, 25℃倒置暗光培养至菌丝长满平板, 观察并记录 2 个菌株菌丝生长交界处的拮抗反应情况。

1.2.2 同工酶电泳 菌丝体培养及样品处理: 将菌种活化后接种于 PDA 固体平板培养基中, 隔膜培养, 取菌丝体, 称重后冰浴研磨。每克湿菌丝加入 2 mL pH 7.5 的磷酸缓冲液, 于 12 000 r/min、4℃离心 5 min, 取上清液备用。电泳及染色: 采用垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 电泳条件及染色参照胡能书^[13]。应用 NTSYS pc 2.10e 软件包进行聚类分析。

第一作者简介: 郑素月 (1969), 女, 河北石家庄人, 博士, 副教授, 现主要从事食用菌教学与科研工作。

基金项目: 河北省科技支撑计划资助项目 (06220116D)。

收稿日期: 2011-04-28

2 结果与分析

2.1 体细胞亲和性测定结果

该试验测定了 54 个平菇菌株两两之间的拮抗反应情况, 部分菌株的拮抗反应见图 1。根据菌丝交界处是否产生拮抗反应, 将菌株间无拮抗的划为同一营养亲和群, 菌株间有拮抗的为不同的营养亲和群, 以此将 54 个供试菌株分为 12 个不同营养亲和群, 其中第一营养亲和群包括“89、灰平 320、615、3 号、2005、平菇 208、早秋 615、川杂 26、宝丰 13”9 个菌株; 第二营养亲和群包括“99、黑平 815、冀优 26、超级 100、广温平菇、黑龙 999、奥黑、法引黑平、优 4、泰丰黑平、科大黑平、平菇 206、特抗黑平、602、581”15 个菌株; 第三营养亲和群包括“太空 2 号、2005、2061、黑平 04、抗 2、2026、黑平王、2002、灰白平菇、杂 201、双抗黑平、新平 106、265”13 个菌株; 第四营养亲和群包括“冀农 11、新平 51、美 D28、农平 8 号、雪美、1349、9400、九华 191”8 个菌株; 第五营养亲和群包括“T803 和四季美”2 个菌株; 第六至第十二营养亲和群各包括 1 个菌株, 分别为“夏抗 8、满城野生、玉灵芝、HP-1-1、紫袍、高平 88 和 558”。

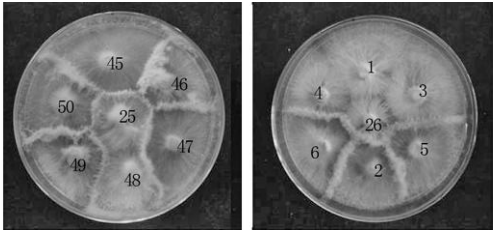


图 1 平菇部分菌株间拮抗测定结果

Fig. 1 The results of anta gonism

注: 图中数字代表菌株见表 1 下同。

Note: No. indicated the strains as in table 1, the same below.

2.2 酯酶同工酶的表型分析

将 12 个不同营养亲和群内和群间菌株分别进行酯酶同工酶电泳, 结果表明, 同一营养亲和群内的菌株间酯酶同工酶条带相同, 部分菌株电泳结果见图 2; 不同营养亲和群间, 即相互有拮抗的菌株酯酶同工酶有差异, 见图 3。12 个营养亲和群菌株共检测到 21 条相对迁移率不同的条带, 各个菌株具有 3 ~ 7 条不等的酶带数。

2.3 聚类分析

将分子量在同一位置的条带作为同一条带, 存在的记为 1, 不存在的记为 0。用 NTSYS pc 2. 10e 中的聚类分析方法构建树状图, 见图 4。由图 4 可知, 12 个营养不亲和群酯酶同工酶存在多样性, 相似系数在 53% ~ 91% 之间。

3 结论

据体细胞亲和性测定试验, 供试的 54 个平菇生产菌株可以划分为 12 个营养亲和群, 其余 42 个为此 12 个菌株的同物异名, 其中大部分菌株集中在以“89、99、太空 2 号和冀农 11”为代表的营养亲和群内。

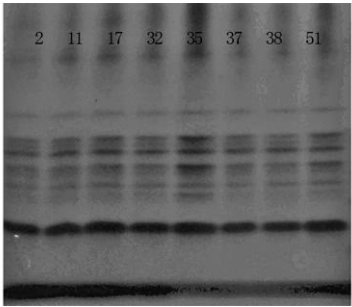


图 2 第四营养亲和群菌株酯酶同工酶图谱

Fig. 2 The esterase zymograms of the fourth VCG

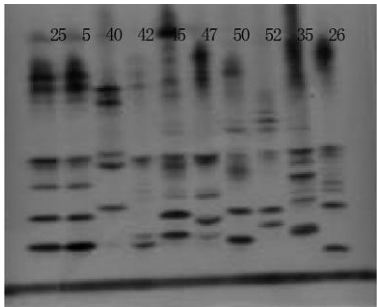


图 3 不同营养亲和群间的酯酶同工酶图谱

Fig. 3 The esterase zymograms of the different VCG

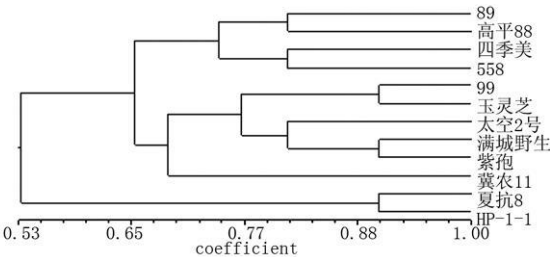


图 4 供试平菇菌株的聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram based on esterase isozyme cluster analysis of the 12 VCG strains

酯酶同工酶电泳表型分析结果进一步表明, 同一营养亲和群内菌株酯酶同工酶酶谱完全相同, 不同营养亲和群间的 12 个代表菌株酯酶同工酶酶谱有差别, 具有较丰富的多态性, 酶谱条带相似系数在 53% ~ 91% 之间。

参考文献

[1] Bonde M R, Micales J A, Pereson G L. The use of isozyme analysis for the identification of plant pathogenic fungi[J]. Plant Disease, 1993, 77: 961.
[2] May B, Royse D J. Interspecific allozyme variation within the fungal genus *Pleurotus*[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1988, 90: 29-36.
[3] Royse D J, May B. Use of isozyme variation to identity genotypic chasses of *Agaricus brunescon*s[M]. Mycologia, 1992, 74(1): 93-102.
[4] 陈强, 李翠新, 李辉平, 等. 真菌营养不亲和和研究进展[J]. 食用菌学报, 2007, 14(1): 73-77.
[5] Leslie J F. Fungal Vegetative Compatibility [J]. Annual Review of

北冬虫夏草液体菌种制备工艺研究

方华舟, 李淑玲, 左雪枝, 安冬梅, 路彩云, 李文君

(荆楚理工学院 生物工程学院 湖北 荆门 448000)

摘要: 以培养液营养成分的不同溶解状态、不同口径及培养容器、不同装液量、不同接种量、不同震荡频率等为研究对象, 探索北冬虫夏草液体菌种制备适宜工艺参数。结果表明: 培养液中各营养成分呈溶液或均匀分布状态, 培养瓶壁倾斜, 装液量小于 1/2、接种量 0.5%、多 1 接种单位、震荡频率 120 r/min 最佳。

关键词: 北冬虫夏草; 液体菌种; 工艺参数; 菌球; 生物量

中图分类号: S 567.3⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)14-0164-04

北冬虫夏草(*Cordyceps militaris* (L.) Link)又名蛹虫草, 为冬虫夏草的近缘种, 属真菌门、子囊菌亚门、核菌纲、麦角菌目、麦角菌科、虫草属的模式种^[1]。研究证实, 北冬虫夏草蛋白质含量高, 氨基酸种类齐全, 尤其人体必需的全部 8 种氨基酸含量高达其氨基酸总量的 35.47%, 且比例恰当; 已查明含有 21 种微量元素, 其中硒、铁、锌、锰、钼、钙等含量丰富; 维生素类物质 VA、VB₂、VE、VD₃、VB₁、VB₆、VC 等含量超过或显著

超过天然冬虫夏草等; 同时还查明, 其所含虫草活性成分如虫草酸、虫草素、虫草多糖、超氧化物歧化酶(SOD)、腺苷等含量达到或明显高于天然冬虫夏草^[2], 被誉为虫草属真菌的后起之秀, 对消除疲劳、缓解紧张、提高人体免疫力及预防和治疗慢性支气管炎、各种肝炎、高血压、心脑血管疾病、肾炎肾衰、癌症肿瘤、性功能障碍等有着显著作用, 是我国历史上珍稀名贵药用真菌^[1-3], 具有十分重要的滋补、保健及药用价值。

近年来, 随着种植技术的深入研究, 尤其以液体菌种代替固体菌种、液体菌种直接代替栽培种等制种技术的应用, 极大地促进了人工种植北冬虫夏草的发展。然而, 北冬虫夏草液体菌种的制作工艺及其技术参数目前仍报道较少。现拟对其制作工艺及其参数进行系列研究, 并努力模拟一般种植户简陋条件, 对各工艺参数进

第一作者简介: 方华舟(1965-), 男, 副教授, 湖北罗田人, 研究方向为食用菌与农业微生物学。E-mail: fanghuazhou2000@yahoo.com.cn.

基金项目: 湖北省荆门市科技局研究与推广资助项目(2010-4-2010S21)。

收稿日期: 2011-04-13

Phytopathology, 1993, 31(1): 127-150.

[6] 杨立红, 黄清荣, 梁建光等. 白平菇不同菌株的酯酶同工酶分析及优良菌株筛选[J]. 食用菌学报, 2004, 11(2): 41-44.

[7] 叶明, 叶生梅, 戚中田等. 香菇(*Lentinula edodes*)双单杂交后代不同发育阶段酯酶同工酶研究[J]. 微生物学杂志, 2004, 5(1): 54-56.

[8] 冯改静, 李明, 田景花等. 6 个白灵菇菌株酯酶和过氧化物同工酶分析[J]. 食用菌, 2006(6): 10-12.

[9] 蔡为明, 方菊莲, 杜新法等. 双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)菌株的低温结实形状及酯酶同工酶比较研究[J]. 浙江农业学报, 2001, 13(3): 130-132.

[10] 任桂梅, 陈国梁, 高小朋等. 陕北羊肚菌不同生长期酯酶同工酶的分析[J]. 延安大学学报, 2005, 24(1): 78-79.

[11] 陈文强, 邓百万, 丁锐等. 猴头不同菌株酯酶同工酶研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(5): 916-917.

[12] Burgess B T, Bihon W, Wingfield M J, et al. A simple and rapid method to determine vegetative compatibility groups in fungi[J]. Supplement to Mycologia, 2009 60(6).

[13] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 52-58.

Study on Biochemical Marker in the Identification of Cultivated Oyster Mushroom in Hebei Province

ZHENG Si-yue, ZHANG Qing-qiao

(College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038)

Abstract: Vegetative compatible and esterase isozyme electrophoresis were employed on the taxonomic identification and genetic diversity of 54 cultivated oyster mushroom strains from Hebei province. The results showed that 54 tested strains were divided into 12 different vegetative compatibility groups according to antagonism reaction. The esterase isozyme electrophoresis analysis showed that the different isozymograms were in the strains of different VCG and the same isozymograms were in the strains of same VCG. Cluster analysis showed that the similar coefficient of different strains of VCG was 53%~91%.

Key words: Hebei province; cultivated oyster mushroom; vegetative compatible group; isozyme analysis