

# 食用菌同工酶遗传多样性研究

刘娜, 张敏, 李超, 肖军, 宋莹, 李红

(辽宁省农业科学院 食用菌研究所, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:**以人工栽培食用菌3个菇种(滑菇、杏鲍菇、金针菇)的18个主要栽培菌株为试材,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,比较分析了其酯酶同工酶谱特征。结果表明:3个菇种分别具有自己的特征酶带,种内菌株间酶带数目、 $R_f$ 值存在差异,表明菌株间遗传基础存在差别,没有同种异名的现象。因此利用酯酶同工酶判定食用菌种的分类地位和种内菌株间差异是一种可行的方法。

**关键词:**滑菇;杏鲍菇;金针菇;酯酶同工酶;聚类分析

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0131-04

同工酶是指催化化学反应相同而结构及理化性质不同的一组酶,它广泛存在于生物体中,酶的表达受遗传基因的调控,因此反映了编码蛋白质的DNA序列信息<sup>[1]</sup>。目前同工酶电泳分析在食药用真菌的分类鉴定和育种中的应用日益广泛,国内外都有类似的研究报道。该研究选用滑菇、杏鲍菇、金针菇3个菇种的18个菌株为研究对象,通过分析不同菇种种内酶带差异,界定其亲缘关系,改善目前市场上食用菌分类不清、同种异名的现象。以期对不同菇种的良好选育、种性鉴定及菌种管理等工作提供科学依据,对深入研究食用菌的遗传代谢提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 滑菇菌种 “C3-1”、“辽滑”(辽宁省农业科学院食用菌研究所)、“N108”(大连宝野农业发展有限公司)、“EH”(葫芦岛农函大玄宇食用菌野驯繁育有限公司)、“盖滑”(大连盖世食品有限公司)、“N12”(沈阳天德现代农业科技)。分别以H1、H2、H3、H4、H5、H6表示。

1.1.2 杏鲍菇菌种 “杏鲍390”(山东省寿光市食用菌研究所)、“健源杏鲍1号”(朝阳健源食用菌有限公司)、“杏美1号”(山东省寿光市食用菌研究所)、“杏2”(福建三明食用菌研究所)、“辽引杏鲍菇1号”(辽宁省农业科学院食用菌研究所)、“盖引杏鲍菇1号”(大连盖世食品有限公司)。分别以X1、X2、X3、X4、X5、X6表示。

1.1.3 金针菇菌种 “恒生金针菇1号”(沈阳恒生农业发展有限公司)、“金411”、“851”、“F21”、“韩金针”、“18-1”

(辽宁省农业科学院食用菌研究所)。分别以J1、J2、J3、J4、J5、J6表示。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品的制备 将生长在PDA培养基上培养相同时间的菌丝刮下,用清水清洗3次,用吸水纸吸去多余水分。称重0.5 g后移至离心管内,在-20℃冰冻24 h后,加入等量研磨液和少量石英砂,在冰浴下研磨成匀浆,4℃离心(10 000 r/min) 20 min,取上清液-20℃下保存,电泳前4℃解冻。

1.2.2 电泳 采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行酯酶同工酶分析。浓缩胶浓度为3%,分离胶浓度为7.5%,在4℃下电泳。初始电压为100 V/板,进入分离胶后电压为150 V/板。当溴酚兰指示剂迁移至末端1 cm左右时,停止电泳。酯酶染色采用坚牢蓝,底物为 $\alpha$ -乙酸萘酯和 $\beta$ -乙酸萘酯<sup>[2]</sup>。

### 1.3 数据分析

试验数据参考王守现等<sup>[3]</sup>、王波等<sup>[4]</sup>文献,利用DPS软件进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 滑菇酯酶同工酶分析

由图1和表1可知,6个滑菇菌株的酶带数量在6~9条不等,多为8条和9条,H6的酶带最少只有6条。6个菌株共检测到16条迁移速度不同的酶带, $R_f$ 在0.087~0.750,其中 $R_f$ 为0.453、0.628和0.667是菌株H3的特有酶带; $R_f$ 为0.297和0.326是菌株H4的特有酶带。 $R_f$ 为0.087、0.134和0.552是菌株共同拥有的酶带,可作为滑菇酯酶同工酶的特征酶带。

由图2可知,滑菇在相异系数为0.520时分为4类:第1类包括H1;第2类包括H2、H6、H5;第3类包括H4;第4类包括H3。其中H3、H4与其它4个菌株的相

**第一作者简介:**刘娜(1981-),女,硕士研究生,研究方向为食用菌育种及栽培。E-mail:liuna929@163.com

**收稿日期:**2015-09-24

异系数最大,说明与其它菌株亲缘关系较远。因此说明6个菌株为滑菇的不同品种。

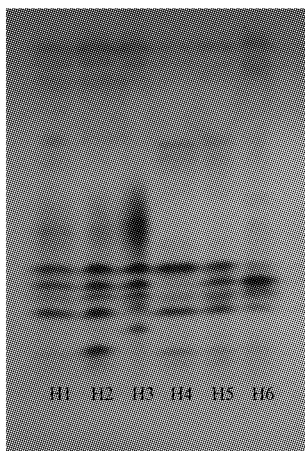


图1 滑菇酯酶同工酶图谱

Fig. 1 Esterase isozyme zymogram of *P. microspora*

表1 滑菇酯酶同工酶的相对迁移率( $R_f$ 值)

Table 1 The relative  $R_f$  of *P. microspora*

谱带号 Bands	H1	H2	H3	H4	H5	H6
1	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087	0.087
2	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134	0.134
3	0.285	—	—	—	0.285	—
4	—	—	—	0.297	—	—
5	—	—	—	0.326	—	—
6	—	—	0.453	—	—	—
7	0.471	0.471	—	—	—	—
8	—	—	0.483	—	—	—
9	0.552	0.552	0.552	0.552	0.552	0.552
10	0.581	0.581	0.581	—	0.581	0.581
11	—	0.605	0.605	—	0.605	—
12	—	—	0.628	—	—	—
13	0.640	0.640	—	0.640	0.640	0.640
14	—	—	0.677	—	—	—
15	—	0.721	—	0.721	0.721	0.721
16	—	—	—	0.750	0.750	—

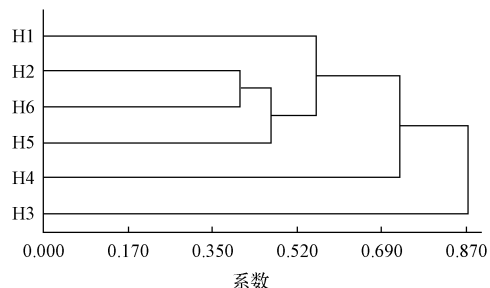


图2 滑菇酯酶同工酶树状聚类图

Fig. 2 The dendrogram of *P. microspora*

## 2.2 杏鲍菇酯酶同工酶分析

由图3和表2可知,杏鲍菇的酶带很多,数量在9~13条不等,共检测到24条迁移速度不同的酶带, $R_f$ 在

0.045~0.708, $R_f$ 为0.124、0.402和0.424是菌株共同拥有的酶带,可作为杏鲍菇酯酶同工酶的特征酶带。X1和X6的酶带数量和位置相似,但是宽窄、深浅有所不同,说明酶的活力不同,2个菌株之间遗传差异较小。而X1、X3、X5和X6有8条共有的酶带, $R_f$ 分别为0.045、0.124、0.402、0.424、0.449、0.466、0.494、0.517,说明菌株间具有相同的遗传基础。

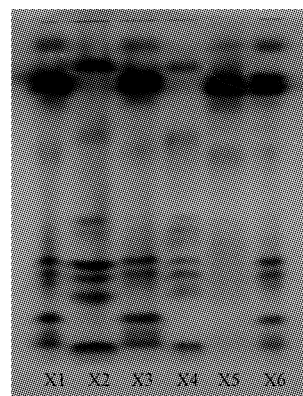


图3 杏鲍菇酯酶同工酶图谱

Fig. 3 Esterase isozyme zymogram of *P. eryngii*

表2 杏鲍菇酯酶同工酶的相对迁移率( $R_f$ 值)

Table 2 The relative  $R_f$  of *P. eryngii*

谱带号 Bands	X1	X2	X3	X4	X5	X6
1	0.045	—	0.045	—	0.045	0.045
2	—	0.084	—	0.084	—	—
3	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124	0.124
4	—	—	0.157	—	—	—
5	—	—	—	—	0.169	—
6	—	0.230	—	0.230	—	—
7	0.247	—	0.247	—	—	—
8	—	—	—	—	0.275	0.275
9	0.402	0.402	0.402	0.402	0.402	0.402
10	0.424	0.424	0.424	0.424	0.424	0.424
11	0.449	—	0.449	0.449	0.449	0.449
12	0.466	—	0.466	—	0.466	0.466
13	0.494	—	0.494	0.494	0.494	0.494
14	—	0.5	—	—	—	—
15	0.517	—	0.517	0.517	0.517	0.517
16	0.534	0.534	—	—	0.534	0.534
17	—	—	0.545	—	—	—
18	—	—	0.562	—	—	—
19	—	0.573	—	—	—	—
20	0.618	—	0.618	—	—	0.618
21	0.652	—	0.652	—	—	—
22	0.669	—	0.669	—	—	0.669
23	—	0.680	—	0.680	—	—
24	—	0.708	—	—	—	—

由图4可知,杏鲍菇在相异系数为0.40时分为4类:第1类包括X1、X6、X5;第2类包括X3;第3类包括X2;第4类包括X4。其中X1和X6相异系数最小,说明

2个菌株之间遗传差异小,亲缘关系近。X2和X4在相异系数0.70时归为一类,说明与其它菌株遗传差异大,亲缘关系远。说明6个杏鲍菇菌株间虽然有彼此相同的酶带,但是又有属于各自的特征酶带,没有同种异名现象。

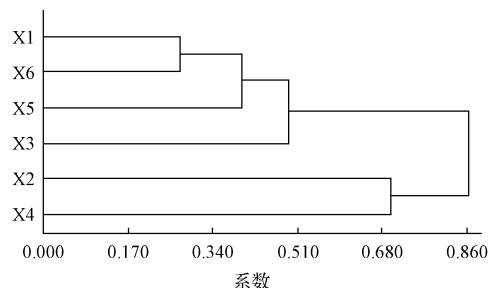


图4 杏鲍菇酯酶同工酶树状聚类图

Fig. 4 The dendrogram of *P. eryngii*

### 2.3 金针菇酯酶同工酶分析

由图5和表3可知,6个菌株的酶带数和酶活性有较明显的差异,酶带数量在5~10条不等,共检测到

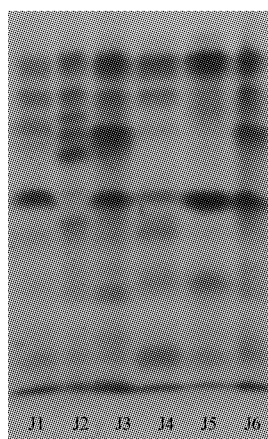


图5 金针菇酯酶同工酶图谱

Fig. 5 Esterase isozyme zymogram of *F. velutipes*

表3 金针菇酯酶同工酶的相对迁移率(Rf值)

Table 3 The relative Rf of *F. velutipes*

谱带号 Bands	相对迁移率(Rf值) The relative Rf					
	J1	J2	J3	J4	J5	J6
1	0.560	0.560	0.560	0.560	0.560	0.560
2	0.599	0.599	0.599	0.599	0.599	0.599
3	—	0.629	—	—	—	—
4	0.642	—	—	—	—	—
5	—	0.656	0.656	0.656	—	0.656
6	0.669	—	—	—	—	—
7	—	0.682	—	—	—	—
8	0.742	0.742	0.742	0.742	0.742	0.742
9	—	0.775	0.775	—	—	0.775
10	0.801	—	0.801	0.801	—	—
11	—	0.838	0.838	—	—	0.838
12	0.858	—	—	0.858	0.858	—
13	—	0.868	0.868	—	—	0.868
14	—	—	0.94	—	—	—
15	0.967	0.967	0.967	0.967	0.967	0.967

15条迁移速度不同的酶带,Rf在0.560~0.967,Rf为0.560、0.599、0.742和0.967是菌株共同拥有的酶带,可作为金针菇酯酶同工酶的特征酶带。Rf为0.642和0.669是J1的特有酶带;Rf为0.629和0.682是J2的特有酶带;Rf为0.940是J3的特有酶带。J5的酶带只有5条,说明与其它菌株差异大。

由图6可知,金针菇在相异系数为0.600时分为3类:第1类包括J1和J4;第2类包括J5;第3类包括J2、J6和J3。其中J2和J6相异系数最小,说明2个菌株之间遗传差异小,J5与其它5个菌株的相异系数最大,说明与其它菌株遗传差异大,亲缘关系远。因此可推断6个金针菇菌株属于不同品种。

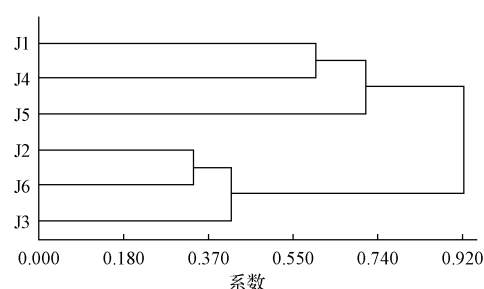


图6 金针菇酯酶同工酶树状聚类图

Fig. 6 The dendrogram of *F. velutipes*

### 3 结论与讨论

同工酶分析作为分子遗传标记技术之一,不仅被广泛用于动植物的遗传分析、生理生化研究,而且被作为化学分类的重要指标。应用到真菌的分类鉴定研究中,弥补了菌落形态与颜色、孢子形态、子实体形态等传统真菌分类的不足,且简单易行,已逐渐成为该领域常用而重要的工具,特别是在属内种间以及品种之间的分类鉴定中是非常有效的<sup>[5]</sup>。

同工酶酶谱研究表明,滑菇、杏鲍菇和金针菇的酯酶同工酶均具有其特征酶带,可作为判定菌种是否为这3种菇的依据。在供试的不同菇种种内没有同名异种的现象,它们的遗传基础都存在差异<sup>[6]</sup>。

利用聚类分析软件分析同工酶酶谱,使分析结果更为直观、客观和规范。不仅能够准确地反映菌株间分子水平上的遗传差异,展示菌株间遗传相关性,而且为不同菌株的分类、鉴定、管理和育种提供了明确的科学依据<sup>[7]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 刘贵巧,张翠锦,曹庆彬. 9个平菇菌株的生长特性与酯酶同工酶活性研究[J]. 江苏农业科学, 2010(2): 265-266.
- [2] 张敏,肖天明,李红,等. 滑菇主要栽培品种间亲缘关系的同工酶研究[J]. 辽宁农业科学, 2010(4): 25-27.
- [3] 王守现,刘宇,张英春,等. 六个灰树花菌株遗传多样性分析[J]. 北方园艺, 2010(1): 201-204.
- [4] 王波,彭卫红,甘炳成. 金针菇33个菌株遗传多样性与组织分离菌株鉴定的酯酶同工酶分析[J]. 西南农业学报, 2008, 21(2): 448-450.

DOI:10.11937/bfyy.201601035

# 黄芩总黄酮含量的累积规律研究

姜明亮, 王景然, 全雪丽, 吴松权

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘 要:**以一年生和二年生黄芩为试材,研究了不同部位、不同生长时期总黄酮含量的累积规律,以期为黄芩的种植和确定最佳采收时期提供参考。结果表明:黄芩总黄酮含量“根>叶>茎”;在一年生和二年生黄芩中的累积规律不同,其中一年生黄芩根总黄酮含量在9月份最高、达到46.97 mg/g,二年生黄芩根总黄酮含量在6月份最高、达到54.50 mg/g,显著高于其它时期;因此,确定一年生黄芩最佳采收时期为9月份,二年生黄芩最佳采收时期为6月份。

**关键词:**黄芩;总黄酮;累积规律

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0134-03

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)属唇形科黄芩属多年生草本植物,本名“芩”,现为芩草,因草色发黄而得名“黄芩”,别名黄金茶、山茶根。黄芩是最普遍的多用途药材之一,始载于《神农本草经》,列为中品<sup>[1]</sup>。黄芩是中医临床常用的中药品种之一,距今为止已有两千多年的栽培和应用历史,2010版《中华人民共和国药典》规定以唇形科草本植物黄芩干燥根为正品黄芩<sup>[2]</sup>。黄芩以根入药,有除湿祛热、泻火解毒、镇静抗炎、安胎止血等功效<sup>[3-4]</sup>。

**第一作者简介:**姜明亮(1990-),男,吉林农安人,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail:jml005@163.com.

**责任作者:**吴松权(1972-),男,黑龙江鸡西人,博士,副教授,现主要从事植物种质等研究工作。E-mail:arswsq@ybu.edu.cn.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(21462044)。

**收稿日期:**2015-09-22

黄芩的主要有效成分是黄酮类化合物,是黄芩活性的主要物质基础。现已发现120多种黄酮类化合物<sup>[5]</sup>,具有抗氧化、抗肿瘤、抗微生物、抗HIV和清除自由基等多种作用,而且不产生抗药性,生物安全性高<sup>[6-9]</sup>。正是由于黄芩显著的临床疗效,近年来国内外市场对黄芩药材的需求量日益增多,导致野生黄芩被大量采挖,野生资源遭到严重破坏,因而黄芩现已被列为国家重点保护野生药材三级保护植物<sup>[10]</sup>。目前,黄芩药材主要来源于人工栽培,但是种植面积较分散,同时种植者缺乏栽培经验,导致黄芩产量较低、质量较差,而且不同产地的黄芩有效成分含量也有较大差异<sup>[11]</sup>。该研究分析了一年生和二年生黄芩不同部位、不同生长时期总黄酮含量的动态变化,探究一年生和二年生黄芩总黄酮的累积规律,以期为黄芩的种植和采收提供理论参考依据。

[5] 杨立红,黄清荣,辛晓林,等.食用菌菌种选育中酯酶同工酶的应用研究[J].食用菌,2005(6):12-14.

[6] 杨立红,黄清荣,刘新海,等.食用菌菌种纯度的酯酶同工酶电泳测

定[J].西南农业大学学报,2005,27(1):128-135.

[7] 皆惠君,刘连强,王文治,等.12个黄伞菌株的酯酶同工酶分析[J].安徽农业科学,2009,37(23):10897-10899.

## Study on Genetic Diversity of Esterase Isozyme of Edible Mushroom

LIU Na, ZHANG Min, LI Chao, XIAO Jun, SONG Ying, LI Hong

(Edible Fungi Research Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** The esterase isozyme was performed by PAGE to analyze the genetic diversity of 18 different cultivation strains of *Pholiota microspora*, *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*. The results showed that the three species had special characteristic bands, respectively. The chosen introspecific strains were different in esozyme number and *Rf* value. Thus, the experiment showed introspecific strains had different genetic background, and no synonym was found. In conclusion, esterase isozyme analysis was an effective way in species verification and introspecies differentiation.

**Keywords:** *Pholiota microspora*; *Pleurotus eryngii*; *Flammulina velutipes*; esterase isozyme; cluster analysis