

平菇长速、长相与酯酶同工酶、可溶性蛋白含量关系的探究

刘贵巧, 米青荣, 黄慧敏

(河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056002)

摘要: 试验对 9 个平菇菌株进行了菌丝长速、长相、酯酶同工酶、可溶性蛋白的测定。结果表明: 9 个菌株中同名的 2 个菌株, 其中之一已经出现了退化, 菌丝长速减缓、可溶性蛋白含量降低, 接种到同一培养基上的 3 个重复之间长相存在差异, 但酯酶同工酶酶谱没有变化。同时发现不同的平菇品种间其菌丝长相、长速、可溶性蛋白含量、酯酶同工酶酶谱存在差异, 长速较快的品种, 有可溶性蛋白含量较高、酯酶同工酶酶带数量相对较多的趋势。

关键词: 平菇; 长速; 长相; 酯酶同工酶; 可溶性蛋白

中图分类号: S 646.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0194-03

近年来, 食用菌菌种退化现象时有发生, 轻者造成减产, 重者绝收, 给食用菌生产带来了极大的负面影响, 因此及早发现退化菌株是食用菌菌种生产的首要任务。试验通过探究平菇品种长速、长相、酯酶的酶带及可溶性蛋白含量之间的关系, 旨在探讨其代谢的内在联系,

为菌种长相及早发现菌种退化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

1 号(平菇 518)、2 号(黑平 04)、3 号(平菇 615) 购于某食用菌公司。4 号(抗病 2 号)、5 号(美 D28)、6 号(平菇 615)、7 号(特抗黑平)、8 号(超级 100)、9 号(夏抗 8 号) 购于另一家食用菌公司。

1.2 主要仪器设备

冰箱、离心机、电泳仪、电泳槽、研钵、电子天平、紫外分光光度计、恒温水浴锅等。

第一作者简介: 刘贵巧(1969-), 女, 河北邢台人, 硕士, 副教授, 现主要从事微生物与食用菌的教学与科研工作。E-mail: keli1966@sina.com。

收稿日期: 2009-11-20

为 E₁: 酵母粉 1 g, 蔗糖 4 g, 琼脂 3 g; 最佳二级培养基配方为 C₂: 木屑 60%, 棉籽壳 18%, 麸皮 20%, 石膏 1%, 蔗糖 1%; 最适 pH 7.5。

参考文献

[1] 国家卫生部和国家中医药管理局. 中华本草[M]. 1 卷, 上海: 上

海科学技术出版社, 1999.

[2] 刘波. 中国药用真菌[M]. 太原: 山西人民出版社, 1974: 71-72.

[3] 赵桂云, 律凤霞, 龚振杰. 鸡腿菇液体培养基配方筛选[J]. 食用菌, 2004, 26(6): 15-16.

[4] 桂馨, 敬化. 食用菌栽培制种实用技术[M]. 中国食用菌专业协会, 1988: 83-100.

Effect of Different pH Values and Culture Medium on Mycelial Growth of *Phellinus*

JIANG Ming¹, LIU Yan², WANG Weigong³, ZHAO Guirun¹

(1. Biology Department, Mudanjiang Teachers College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012; 2. No. 1 Middle School of Muling, Muling, Heilongjiang 157500; 3. 35th Secondary School of Daqing, Daqing, Heilongjiang 163515)

Abstract: The effect of different mediums and different pH on the mycelial growth of *Phellinus*. The results showed that the best liquid medium was C₀: Starch 18 g, Glucose 12 g, Yeast 1.2 g, K₂HPO₄ 1.2 g, MgSO₄ 0.6 g; the best first-degree medium was E₁: Yeast 1 g, Sucrose 4 g, Agar 3 g; the best second-degree medium was C₂: sawdust 60%, Cotton seed hull 18%, bran 20%, gypsum 1%, sucrose 1%; the best pH 7.5.

Key words: *Phellinus*; pH; formula

1.3 试验方法

1.3.1 菌株长速、长相的测定 将搜集来的 9 个平菇试管菌种, 分别接种到固体 PDA 平板培养基上, 25℃恒温箱活化培养, 待菌丝长满培养皿后, 在超净工作台上, 于菌落的边缘处用打孔器打孔, 然后将打孔器取下的菌块分别接种到新制备的 PDA 平板的中央, 每号样品接 3 个平皿, 每个培养皿接菌 1 块, 然后将培养皿放置到 25℃恒温箱培养, 4 d 后, 量取每个培养皿内的菌落直径, 每号样品取 3 个平皿的平均值, 同时观察并记录每个培养皿内菌丝的长相。

1.3.2 菌株酯酶同工酶测定 样品处理: 将搜集来的平菇试管菌种, 接种到固体斜面培养基上, 于 25℃恒温箱活化培养, 然后接种到三角瓶液体 PDA 培养基上 25℃培养, 待形成厚厚的菌膜后, 取出菌膜, 用吸水纸吸干表面水分, 用电子天平称量 1.0 g, 放入研钵, 加入 pH 7.5 的磷酸缓冲液 0.6 mL 于冰块表面研磨, 然后将其放入离心管, 用 0.4 mL 缓冲液冲洗研钵, 再放入离心管, 在 12 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液备用。垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳: 组装电泳板并放入电泳槽固定, 用 2.5% 的水琼脂封闭电泳板与胶条连接面, 向两层电泳板之间灌入分离胶 6 mL, 待其凝固后用滤纸吸取分离胶表面水, 灌入浓缩胶 4 mL, 将点样梳插入浓缩胶。浓缩胶凝固后取出点样梳, 形成点样孔, 将离心后的样品取上清液分别加入点样孔, 点样量为 30 μL, 顺序依次为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 号。用磷酸缓冲液覆盖样品, 在液面表面加入溴酚蓝做指示剂。然后向电泳槽中加入 tris-甘氨酸电极缓冲液, 接通电泳仪采用稳流的形式, 浓缩胶电流为 24 mA, 分离胶电流为 36 mA。用酯酶染色液(乙酸-1-萘酯、乙酸-2-萘酯)处理胶片 20~ 30 min, 直到出现清晰的酶带, 将胶片用水冲洗, 拍照, 测量并计算每条带的迁移率。

迁移率= $\frac{\text{点样孔到酶带之间的距离}}{\text{点样孔到溴酚蓝指示剂带之间的距离}}$

1.3.3 平菇不同品种可溶性蛋白含量的测定 菌丝体提取液的制备: 将不同平菇品种接种到 PDA 液体培养基上静止培养, 待形成厚厚的菌膜后, 分别取出菌丝体用自来水冲洗, 用滤纸吸干表面水分, 然后分别称取菌丝体 1.0 g 放入研钵中, 加入 2.5 mL pH 7.0 磷酸缓冲液研磨成匀浆, 然后转移到离心管中, 在 8 000 r/min 下离心 5 min, 弃去沉淀即得待测菌丝体提取液。可溶性蛋白含量的测定: 标准曲线的制作。取 6 支干净的试管标号 1、2、3、4、5、6, 分别依次加入标准蛋白溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 再依次加入蒸馏水 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0 mL, 然后 6 支试管均加入 5.0 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂, 这样 6 支试管中蛋白的含量依次是 0、20、40、60、80 μg, 摇匀混合, 放置 2 min 后在 595 nm 波长

下比色, 记录各管测定的光密度值 OD, 并以标准蛋白含量(μg) 为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 用 Excel 软件绘制出标准曲线(或计算回归方程)。然后取每代菌丝体的提取液 0.1 mL 分别加入到试管中, 空白对照管加 0.1 mL pH 7.0 磷酸缓冲液, 各管均加入考马斯亮蓝 G-250 试剂 5.0 mL, 0.9 mL 蒸馏水, 摇匀, 2 min 后在 595 nm 波长下比色测定光密度值 OD, 并通过回归方程计算出每代菌丝体可溶性蛋白的含量。

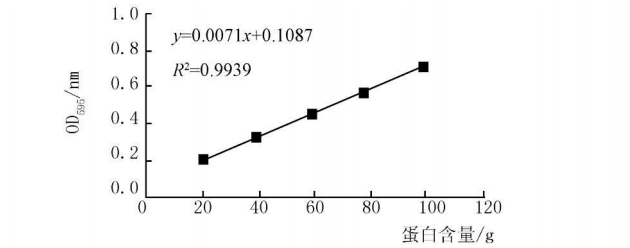


图1 可溶性蛋白的标准曲线

计算公式如下: 可溶性蛋白含量(μg/g) = $(C \times V_T) / (1\ 000V_s \times WF)$ 式中: C -回归方程计算值, μg; V_T -提取液总体积, mL; WF -样品鲜重, g; V_s -测定时取样量, mL。

2 结果与分析

2.1 不同平菇品种的菌丝长相

由表 1 可以看出, 平菇的不同品种间长相存在差异, 主要表现在菌丝生长的是否均匀一致, 气生菌丝生长的旺盛程度、色素产量的多少、接种块周围菌丝稀疏区域的大小等。2 号与 4 号名称虽为不同品种, 但我们通过酯酶测定、菌种拮抗性鉴别等试验表明它们确为同一品种。在长相上这 2 个品种也一致。3 号、6 号为同一名称的品种, 经过酯酶测定、拮抗性试验确实如此, 但菌种长相略存在差异。6 号菌种的 3 个重复间生长一致, 但 3 号菌种 3 个重复间长相各异。

表 1 平菇品种的菌丝长相数据

品种代号	长相
1 号	接种块周围有较小的菌丝稀疏区, 无褐色色素
2 号	接种块周围有大量的菌丝稀疏区, 较少褐色色素
3 号	3 个平皿生长不一, 一是接种块周围有大量的菌丝稀疏区, 褐色色素明显、量大; 二是稀疏区较小, 有少量褐色色素; 三是稀疏区较小, 无褐色色素
4 号	接种块周围有大量的菌丝稀疏区, 有少量褐色色素
5 号	接种块无菌丝稀疏区, 气生菌丝旺盛, 有少量褐色色素
6 号	接种块周围菌丝稀疏区较少, 气生菌丝旺盛, 无褐色色素
7 号	菌丝接种块周围菌丝稀疏区较少类似于无, 气生菌丝旺盛, 无褐色色素
8 号	3 个平皿菌丝生长不一, 一是接种块周围有大量的菌丝稀疏区, 菌落边缘有少量褐色色素, 二是稀疏区较小, 气生菌丝旺盛, 无褐色色素; 三是菌丝生长均匀一致, 无褐色色素
9 号	气生菌丝少, 菌丝生长均匀一致, 无黄褐色色素生长

由表 2 可以看出, 1 号、2 号、3 号、5 号、7 号、8 号、9 号品种的酶带数量、迁移率存在明显差别, 说明不同的平菇品种酯酶同工酶酶谱存在特异性。而 2 号、4 号酶带数量及迁移率都一致, 3 号、6 号酶带数量及迁移率一

致,说明 2 号、4 号为同一品种,3 号、6 号为同一品种,因此酯酶作为平菇品种鉴别的依据具有一定的可靠性。

2.2 不同平菇品种的酯酶同工酶测定结果

表 2 9 个平菇菌株酯酶同工酶迁移率数据表

样品	R ₁₁	R ₁₂	R ₁₃	R ₁₄	R ₁₅	R ₁₆	R ₁₇	R ₁₈	R ₁₉	R ₁₁₀	R ₁₁₁
1 号	5.0		7.2	7.3			8.3	8.5			9.5
2 号	5.0		7.2	7.3					9.0	9.2	
3 号	5.0		7.2	7.3			8.3	8.5	9.0	9.2	
4 号	5.0		7.2	7.3					9.0	9.2	
5 号	5.0		7.2	7.3	7.6	7.7	8.3	8.5	9.0	9.2	
6 号	5.0		7.2	7.3			8.3	8.5	9.0	9.2	
7 号	5.0		7.2	7.3	7.6	7.7	8.3	8.5			
8 号	5.0		7.2	7.3	7.6	7.7	8.3	8.5	9.0		9.5
9 号	5.0	5.5	7.2	7.3	7.6	7.7	8.3	8.5			9.5

2.3 不同平菇品种的酯酶同工酶酶带数量、菌丝长速、可溶性蛋白含量

表 3 不同平菇品种的酯酶同工酶酶带数量、菌丝长速、可溶性蛋白含量数据表

平菇品种	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	8 号	9 号
菌丝长速/cm	4.51	5.13	4.23	5.14	6.68	5.85	6.00	6.65	6.70
酶带数量/个	6	5	7	5	9	7	7	9	9
可溶性蛋白含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1.39	1.41	0.89	1.42	2.07	1.69	1.86	2.00	2.09

由表 3 可以看出,平菇不同品种间长速存在差异,5 号、7 号、8 号、9 号长速相对较快,1 号、2 号、3 号相对长速较慢。2 号、4 号为同一品种,长速一致,3 号、6 号虽为同一品种但长速存在差异,3 号长速较慢,可能为退化菌株。从品种酯酶同工酶酶带数量与长速的关系来看,长速较快的菌株相对酶带数量较多,但不是所有品种都符合这个规律。由可溶性蛋白含量测定试验看出,不同的品种间可溶性蛋白含量存在差异,长速较快的菌株可溶性蛋白含量相对较高,而长速慢的菌株可溶性蛋白含量较低,同一品种的 2 号、4 号菌株,可溶性蛋白含量相近,

同一品种的 3 号、6 号菌株,长速慢的 3 号可溶性蛋白含量明显低于 6 号。

由菌丝长相与长速及可溶性蛋白含量的关系来看,长速较快、可溶性蛋白含量较高的 5 号、7 号、9 号菌种接种后菌丝生长均匀、色素产生量小、接种块周围菌丝稀疏区域小。但品种之间存在差异,这个规律不适应于所有品种,由 3 号、6 号菌丝长速、长相与可溶性蛋白含量来看,同一菌株,菌种退化后,长速较慢,可溶性蛋白含量减少,接种到同样的培养基上后,菌种长相不一。

3 讨论

菌丝长相与长速及可溶性蛋白含量的关系来看,长速较快、可溶性蛋白含量较高的 5 号、7 号、9 号菌种接种后菌丝生长均匀、色素产生量小、接种块周围菌丝稀疏区域小。但品种之间存在差异,这个规律不适应于所有品种,由 3 号、6 号菌丝长速、长相与可溶性蛋白含量来看,同一菌株,菌种退化后,长速较慢,可溶性蛋白含量减少,接种到同样的培养基上后,菌种长相不一。

菌株退化后长速减缓,接种到同一培养基上后,会出现长相不一现象,可溶性蛋白含量降低,但酯酶同工酶酶谱没有改变,至于会不会影响其它酶类活性,有待进一步研究。

参考文献

[1] 郑素月,张金霞,黄晨阳.中国栽培平菇的酯酶同工酶分析[J].食用菌学报,2003,10(4):1-6.
[2] 霍云凤,王振河,王斌.白灵菇不同栽培菌株的酯酶同工酶多态性分析[J].安徽农业科学,2005,33(4):614-615.
[3] 姜性坚,王利群,熊辉.金针菇菌株的酯酶同工酶分析[J].食用菌学报,1997(4):37-42.
[4] 冯洁,陈其.棉株体内几种生化物质与抗枯萎病之间关系的初步研究[J].植物病理学报,1991,21(4):291-297.

Research for the Relationship Between Growth Speed, Looks and Esterase Isozyme, Soluble Protein Content in Several Strains of *Pleurotus ostreatus*

LIU Gui-qiao, MI Qing-rong, HUANG Hui-min
(Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056001)

Abstract: The growth rate, looks, esterase isozyme, and soluble protein content of nine strains of *Pleurotus ostreatus* were determined. The results showed that two of the nine mushroom strains, have the same name, and one of them had degenerate. It grows slowly, has a low soluble protein content and an unstable look. But has the same Esterase isozyme to the normals. At the same time, we also find that different varieties of mushroom has different growing speed, looks, esterase isozyme and soluble protein content. The ones who grow fast may have a high soluble protein content and more quantity enzyme bands in their esterase isozyme.

Key words: *Pleurotus Ostreatus*; growth characteristics; esterase isozyme; soluble protein content