

继代培养对蛹虫草菌丝生长速度及酯酶同工酶的影响

郑素月¹, 郝俊灵², 王建伟²

(1. 河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056038; 2. 邯郸市农业环境与农产品质量监督管理站, 河北 邯郸 056002)

摘要:以蛹虫草菌株为试材, 通过垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳和菌丝生长速度测定, 对不同代次蛹虫草菌丝生长速度和菌株酯酶同工酶表现型进行比较分析, 旨在寻找蛹虫草菌种退化机理。结果表明: 不同代次蛹虫草的菌丝生长速度差异不显著, 而酯酶同工酶酶谱发生较大变异。9个菌株共有3条迁移率不同的条带, 分别为0.63、0.65和0.67, 其中F₁、F₃、F₄和F₅代菌株出现第2、3条酶带, 迁移率分别为0.65和0.67, 而F₂、F₆、F₇、F₈、F₉代菌株发生变异, 迁移率为0.67的条带消失, 菌株酶谱条带中产生了迁移率为0.63的新条带。

关键词:蛹虫草; 继代培养; 菌丝生长速度; 酯酶同工酶

中图分类号:S 567.3⁺9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)10-0136-02

蛹虫草是虫草结合的药用真菌, 是一种具有广泛开发前景的珍稀药用保健产品, 也是我国名贵的中药材之一。目前蛹虫草已实现大规模人工栽培, 对其资源的研究与开发在近几十年取得了很大进展, 已逐渐成为野生资源不断减少, 亟需保护的野生冬虫夏草的替代品^[1]。但在蛹虫草的生产过程中, 常出现菌丝不转色、徒长、子实体产量减少或根本不产生子实体等退化现象, 试图寻找蛹虫草菌种退化机理, 为生产提供参考和理论依据, 具有重要意义。关于蛹虫草退化机理前人已做过研究^[2-4], 但从酯酶同工酶角度未见分析报道。该试验通过对不同代次的蛹虫草菌丝生长速度测定和酯酶同工酶差异进行比较, 旨在寻找蛹虫草菌种退化机理, 为生产提供参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为蛹虫草 CM001 F₁ 代菌株, 由中国农业大学食用菌研究室提供。从 F₁ 代母种培养基中取一小块菌种接种于 PDA 综合培养基试管斜面中央, 在 24℃ 恒温箱中培养 2 周, 生长表现为菌丝纯白、浓密、健壮, 长满试管斜面即为 F₂ 代菌株。F₂ 代菌株长满试管后, 取一小块菌种接种于 PDA 培养基的试管中, 菌丝长满试管后, 为 F₃ 代菌株, 依次类推, 得到 F₄~F₉ 代菌株, 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理

将 F₁~F₉ 代菌种分别接种于盛有液

体培养基的三角瓶中, 24℃ 恒温静置培养, 待菌丝长满液体培养基表面, 取适量菌丝体, 滤纸吸干水分, 称重, 加石英砂冰浴研磨, 1 g 湿菌丝加 pH 7.5 的磷酸缓冲液 1 mL, 于 12 000 r/min、4℃ 离心 5 min, 取上清液备用。

1.2.2 电泳 采用垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 按胡能书等^[5]的方法制备分离胶和浓缩胶。凝胶厚 2 mm, 分离胶浓度 7%, 浓缩胶浓度 2.5%。用 pH 8.3 Tris-甘氨酸作电极缓冲液, 0.25% 的溴酚兰作前沿指示剂, 点样量 20 μL。电泳条件为稳流电泳, 浓缩胶电流为 2 mA/孔, 待指示剂进入分离胶后升至 3 mA/孔, 当指示剂距胶板底部 1 cm 时停止电泳, 电泳时间为 3.5 h。采用 α-萘酯乙酸、β-萘酯乙酸和固兰盐染色。各酶带的相对位置用相对迁移率(Rf)标定并表示。

2 结果与分析

2.1 继代培养对菌丝生长速度的影响

接种后, 每天测定 F₁~F₉ 代菌株菌丝的菌落直径, 连续测定 10 d, 由表 1 可知, 不同代次之间菌丝生长速度无太大差异, 说明继代培养对虫草菌丝生长速度无显著差异。

表 1 继代培养蛹虫草菌株菌丝生长速度

不同代次	菌丝生长速度/cm·d ⁻¹			平均长速 /cm·d ⁻¹
	I	II	III	
F ₁	0.50	0.44	0.45	0.463
F ₂	0.47	0.49	0.49	0.483
F ₃	0.47	0.51	0.46	0.480
F ₄	0.45	0.45	0.48	0.460
F ₅	0.46	0.49	0.51	0.486
F ₆	0.44	0.46	0.49	0.463
F ₇	0.47	0.49	0.49	0.483
F ₈	0.44	0.48	0.45	0.456
F ₉	0.45	0.46	0.51	0.473

第一作者简介:郑素月(1969-), 女, 河北石家庄人, 博士, 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:2012-03-07

2.2 不同代次菌株酯酶同工酶表型分析

供试的9个不同代次的蛹虫草菌株酯酶同工酶酶谱中共检测到3条相对迁移率不同的酶带,迁移率分别为0.63、0.65、0.67(图1中箭头所示),各酶带的相对迁移率见图1。由图1可知,蛹虫草不同代次之间酯酶同工酶酶谱出现了变异, F_1 代具有2条酯谱条带,迁移率分别为0.65和0.67; F_2 代菌株已出现了变异,迁移率为0.67的带消失,出现了迁移率为0.63的新带; F_3 、 F_4 、 F_5 代菌株又恢复出现 F_1 代次的2个条带; F_6 ~ F_9 代菌株又产生变异与 F_2 代菌株条带相同。

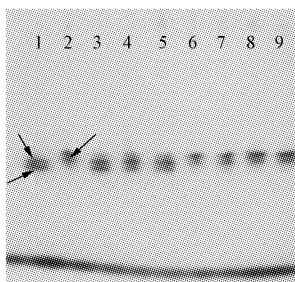


图1 不同代次菌株的酯酶同工酶酶谱
注:1~9泳道依次代表 F_1 ~ F_9 酯酶图谱。

3 结论与讨论

该试验结果表明,不同代次蛹虫草菌株菌丝生长速度无显著差异;不同代次蛹虫草菌株酯酶同工酶酶谱发生了较大差异, F_1 ~ F_6 代菌株 F_2 代发生了变异, F_3 ~ F_5 代菌株又恢复了正常,而 F_6 ~ F_9 代菌株酶谱变异类型与 F_2 代菌株相同。由此结果可看出,蛹虫草菌株继代培养中确实出现了很高的变异,但该试验只是从酯酶同工酶这个角度出发进行测定,其它诸如生化特性、DNA指纹等方面是否也出现变异,该变异是否是蛹虫草的菌株退化的表现尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 曾宏彬,宋斌,李泰辉. 蛹虫草研究进展及其产业化前景[J]. 食用菌学报,2011,18(2):70-74.
- [2] 李美娜,吴谢军,李春燕,等. 人工栽培蛹虫草退化现象的分子分析[J]. 菌物系统,2003,22(2):277-282.
- [3] 王洪军,吕真麟,张博平,等. 北虫草变异性研究[J]. 中国食用菌,2009,28(5):30-31.
- [4] 汪虹,魏静,林楠,等. 交配型基因作为分子标记鉴定蛹虫草退化菌株的核相初步研究[J]. 食用菌学报,2010,17(4):1-4.
- [5] 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.

The Influences of Subculture of *Cordyceps militaris* to Mycelial Growth Rate and Esterase Isozyme

ZHENG Su-yue¹, HAO Jun-ling², WANG Jian-wei²

(1. College of Agriculture, Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056038; 2. Handan Station of Agricultural Environment and Products Quality Supervision and Management, Handan, Hebei 056002)

Abstract: Mycelial growth rate and esterase isozyme of *Cordyceps militaris* were tested by vertical slab polyacrylamide gel electrophoresis and mycelial growth rate determination, the aim was to search for the degradation mechanism of *Cordyceps militaris*. The results showed that different esterase isozymes were observed among the different subculture strains and no difference in mycelial growth rates. EST isoenzyme showed that 3 EST bands of migration rates 0.63, 0.65 and 0.67 were found in all tested strains. F_1 , F_3 , F_4 and F_5 strains showed 2 EST bands, the second and the third band, and the EST bands of F_2 , F_6 , F_7 , F_8 , F_9 varied, the band of migration rate 0.67 disappeared and a new band of 0.63 appeared.

Key words: *Cordyceps militaris*; subculture; mycelial growth rate; esterase isozyme