

冀南平菇菌种资源鉴定研究

刘贵巧¹, 暴增海², 薛晓畅³

(1. 河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056003; 2. 淮海工学院 食品工程学院, 江苏 连云港 222005; 3. 邢台一中, 河北 邢台 054300)

摘要:从冀南菌种市场随机采集 7 个平菇菌株, 对其进行了拮抗性检测及酯酶同工酶检测。结果表明: 5 个菌株在酶带数量、位置、颜色上存在差异, 其拮抗性检测结果均产生拮抗线, 具有拮抗性, 表明它们为独立的不同的菌株; 有 2 个菌株拮抗性检测结果表现为拮抗, 酯酶同工酶检测结果酶带主带位置、数量、颜色相同, 辅带位置数量略有差异, 表明它们为亲缘关系较近的 2 个菌株, 证明 2 种检测方法对平菇菌株鉴定均有效。被检测的 2 家公司在平菇菌株命名上未有同物异名或一物多名现象。

关键词:平菇; 菌种; 拮抗性; 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(2012)24-0162-03

平菇味道鲜美, 营养丰富, 富含蛋白质、维生素、矿物质, 其菌类多糖还具有防癌、抗癌的作用, 另外平菇也是目前食用菌中抗逆性最强, 适应性最广, 种植面积最大, 产量最高的食用菌品种。因此, 一直以来栽培平菇是冀南菇农致富的一条路子。近年来, 在与菇农的接触中发现, 平菇菌种质量是影响平菇产量及菇农经济效益的主要问题, 表现在菌种含有虫害、杂菌, 菌种退化, 菌种同物异名或一物多名等问题, 导致了平菇栽培过程中产量降低, 甚至绝产, 给平菇生产造成很大的危害, 严重影响了菇农平菇生产的经济效益, 因此, 对冀南平菇菌种市场进行调查, 鉴定菌种质量是目前平菇栽培中迫切需要解决的问题, 基于此, 现对平菇菌种生产较大的 2 家公司, 采用随机取样的方式, 随机采集 7 支菌株, 对其进行了拮抗性检测和酯酶同工酶分析, 以确定该批菌株中是否存在同物异名或一物多名现象, 以探求菌种市场平菇物种间的差异度, 从而了解市场管理的规范程度, 为菌种的规范管理及杂交育种提供依据。

拮抗是生物竞争的一种方式, 它表现为当 2 种生物共处时, 生物体为了争夺生存空间或食物, 会产生某些抑制或杀害另一种生物的物质, 在微生物的培养过程中, 从外观培养特征看, 某些生物会形成明显的肉眼可见的抑菌圈或拮抗线, 而同品种间无拮抗现象, 因此, 利用生物间的拮抗性, 可粗略判断品种间的差异度。在课题组预试验中已发现平菇品种间拮抗现象明显, 因此, 该试验利用平菇的拮抗性来判断品种间差异具有可

行性。

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, 其广泛存在于生物体中, 反映了编码蛋白质的 DNA 序列信息。目前, 酯酶同工酶广泛应用于生物体种类的鉴定, 代谢能力、代谢机理的研究。也经常用于食用菌品种的鉴别。

拮抗方法鉴别菌种, 费用低, 操作简单, 同工酶方法费用高, 操作繁琐, 但 2 种鉴别方法的差异度, 目前文献中未见报道。为了探究 2 种方法的精确程度, 该试验采用了拮抗性检测和酯酶同工酶检测方法对搜集的 7 个平菇菌株进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 7 个菌株 ‘P8’、‘HP1’、‘XN1’、‘2026’、‘ZF’、‘9400’、‘抗王’分别采集于冀南市场的 2 家规模较大的菌种生产公司。主要仪器设备: 电泳仪, 垂直板电泳槽, 移液器, 离心机等。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株拮抗性测定 PDA 固体培养基制备: 按照常规方法制作 PDA 固体斜面培养基。菌种活化: 将搜集来的平菇试管菌种, 在超净工作台上, 用经酒精灯灼烧冷却后的小铲子取菌种菌丝段到新制备的试管培养基斜面中央, 然后将新转接的试管用报纸包扎放于 25℃ 恒温培养, 7~10 d 菌丝长满试管斜面。拮抗性试验: 将培养皿用报纸包扎, 置干燥培养箱于 165℃ 保持 2 h, 冷却后取出, 将三角瓶内的培养基加热融化, 倒入培养皿内, 培养基量要铺满平板底面, 冷却后, 液体状态的培养基凝固为固体, 此时取活化的菌种, 分别在培养皿内培养基表面(图 1)的位置放置活化后的各种菌种菌丝块

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。

收稿日期:2012-09-17

1块,使培养皿内有5~6块不同的菌种,并使每1个菌株都能与另外的6个菌株有相遇机会,每种组合方式设3次重复,然后将放置好的培养皿分别放到25℃恒温箱无光培养,待菌丝萌发并充分生长后,观察并记录不同品种间的拮抗性。

1.2.2 菌株酯酶同工酶测定 PDA液体培养基制备:取去皮马铃薯200 g,切成1 cm³小块,放入锅内,加入1 000 mL水煮沸,保持20 min,然后用2~3层纱布过滤,取滤液加入葡萄糖20 g,搅拌溶液到糖溶解,再加水,使溶液定容到1 000 mL,将混合液分装到100 mL三角瓶中,每个三角瓶分装量为50 mL,三角瓶塞上合适的棉塞,外面用牛皮纸包扎,然后将它们放入高压灭菌锅在121℃温度下保持40 min后,关闭电源,待锅内压力指针回到0位置,取出物品,冷却到常温后备用。平菇菌种的液体培养:将活化后的7个菌株分别在超净工作台上,酒精灯火焰周围,用酒精灯火焰灼烧,用冷却后的小铲子取菌种1块,放入三角瓶内液体培养基的表面,三角瓶按照原样包扎,放到25℃恒温箱培养,待菌丝充分生长,形成厚厚的菌膜后,备用。样品酶液提取:取出菌膜,用滤纸吸干菌膜表面水分,用天平称量1.0 g,放入研钵,用1 mL移液器加入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,样品在12 000 r/min离心5 min,上清液备用。垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳:垂直板电泳板组装:将2块玻璃板分别放入带有凹槽的胶条内,使胶条与玻璃板紧密结合,并且使玻璃板中带有突起的玻璃板与平面玻璃板在胶条内形成狭小的空间。然后将带有胶条的玻璃板插入垂直板电泳槽内,转动电泳槽上的旋钮将带有胶条的玻璃板固定在垂直板电泳槽上。称取2.5 g琼脂,放入容器,加入100 mL水,加热直到琼脂粉溶化为液体,用长头滴管吸取琼脂粉溶液,滴加到电泳槽内电泳板与胶条连接面,稍放置后,琼脂粉液体凝固,玻璃板与电泳槽紧密结合。电泳槽内灌入胶体:先向电泳槽内2层电泳板之间灌入分离胶液体6 mL,待其凝固后用滤纸吸取分离胶表面水,再在分离胶上面灌入浓缩胶液体4 mL,将点样梳插入浓缩胶液体中,不久浓缩胶液体凝固,轻轻取出点样梳,梳子齿取出时,将胶体带出,梳体部分胶体留在浓缩胶上,这样梳子



图1 液体培养好的平菇各菌株

齿部位,在浓缩胶上形成梳子齿状(长方形)点样孔。点样:将离心后的样品用移液器取上清液分别加入点样孔,注意取不同样品时换新枪头,每个孔内加入样品量为30 μL,顺序依次为‘P8’、‘HP1’、‘XN1’、‘2026’、‘ZF’、‘9400’、‘抗王’。点样后,在每孔内的样品上面滴加磷酸缓冲液,直到孔加满,然后孔口表面的液面表面加入溴酚蓝做指示剂,使之呈一条线覆盖所有样品。电泳:向玻璃板两面的电泳槽内分别加入Tris-甘氨酸电极缓冲液,要求电极液的要稍高于溴酚蓝液面,然后将电泳槽与电泳仪连接,接通电源泳仪,电泳开始后,溴酚蓝会形成一条线,逐渐由样品部位向下移动,经过浓缩胶部分,分离胶部分,要求溴酚蓝带在浓缩胶部分时,电泳仪电流设定为24 mA,溴酚蓝带在分离胶部分时电泳仪电流设定为36 mA。大约2 h,溴酚蓝带到达电泳槽距离底面约1 cm处,此时关闭电泳,取下电泳线,倒掉电泳槽内的电极液,调节电泳槽上的旋钮,将带胶条的玻璃板从电泳槽内取出。剥胶:去掉2个玻璃板边缘的胶条。去胶条时,注意保护2块玻璃板之间形成的特别薄的无色柔软、易破的胶片。然后将2块玻璃板放入清水中,取出后,用长针头的注射器向胶片与玻璃板间注水,直到玻璃板与胶片容易剥离,然后将玻璃板放入清水中,轻轻去掉玻璃板,获得清晰无色完整胶片。胶片染色:将胶片浸入酯酶染色液(乙酸-1-萘酯、乙酸-2-萘酯)内放置约20~30 min,这时胶片上会出现清晰的酶带,将胶片用水冲洗干净后,拍照,测量并计算每条带的迁移率。迁移率=点样孔到酶带之间的距离/点样孔到溴酚蓝指示剂带带之间的距离。

2 结果与分析

2.1 菌株拮抗性检测结果

供试菌株拮抗性检测结果见表1。由表1及图2可以看出,‘P8’、‘HP1’、‘XN1’、‘2026’、‘ZF’、‘9400’、‘抗王’这7个菌株之间除‘9400’与‘XN1’没有拮抗线出现外,其它品种之间均有明显的拮抗线出现,说明‘P8’、‘HP1’、‘2026’、‘ZF’、‘抗王’均为独立的菌株,‘9400’与‘XN1’可能为同1个菌株,也可能为亲缘关系极其紧密的不同菌株。

表1 7个平菇菌株拮抗性检测结果

	‘P8’	‘HP1’	‘XN1’	‘2026’	‘ZF’	‘9400’	‘抗王’
‘P8’	—	+	+	+	+	+	+
‘HP1’	+	—	+	+	+	+	+
‘XN1’	+	+	—	+	+	+	+
‘2026’	+	+	+	—	+	+	+
‘ZF’	+	+	+	+	—	+	+
‘9400’	+	+	—	+	+	—	+
‘抗王’	+	+	+	+	+	+	—

注:“+”表示有拮抗性,“—”表示没有拮抗性。

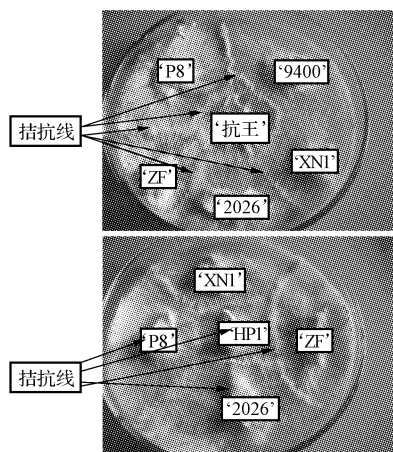


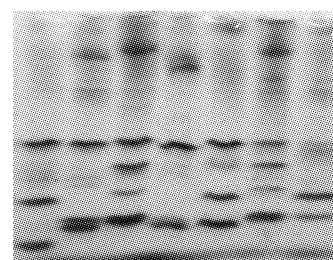
图2 平菇拮抗检测结果

2.2 菌株酯酶同工酶检测结果

由表2及图3可以看出,平菇不同菌株经电泳染色后,在胶片上形成明显的位置、数量及颜色不同的酶带,‘P8’有5条带,‘HP1’有10条带,‘XN1’有9条带,‘2026’有6条带,‘ZF’有4条带,‘9400’有7条带,‘抗王’有6条带。其中7个菌株都有迁移率为0.67这条带,且每个品种酶带的颜色均相同,这条带为平菇特征性条带。‘XN1’和‘9400’主带(即特征明显的带)均有5条,其迁移率分别为0.42、0.67、0.74、0.81、0.90;且颜色相同,特征不明显的辅带在位置及数量上略有差别。其它菌株或者在主带位置上,或者在酶带数量上或者在酶

表2 不同平菇品种酯酶同工酶酶带迁移率比较

平菇品种	迁移率(Rf)									
‘P8’						0.67	0.77	0.79	0.82	0.95
‘HP1’	0.44	0.46	0.48	0.51	0.52	0.67	0.77		0.79	0.90
‘XN1’	0.42		0.46	0.48	0.51	0.56	0.67	0.74	0.81	0.90
‘2026’	0.44	0.46					0.67	0.74	0.76	0.91
‘ZF’							0.67	0.74	0.82	0.91
‘9400’	0.44		0.48	0.51			0.67	0.74	0.81	0.90
‘抗王’		0.48	0.51				0.67	0.69	0.82	0.90



‘P8’ ‘HP1’ ‘XN1’ ‘2026’ ‘ZF’ ‘9400’ ‘抗王’

图3 7个平菇菌株酯酶同工酶电泳图

带颜色上有差别。说明‘XN1’和‘9400’亲缘关系极其紧密,但并非为同一菌株,而其它菌株均为亲缘关系相对较远的菌株。这与平菇拮抗试验结果相吻合。

3 结论与讨论

该试验结果表明,对于平菇的菌株鉴定而言,拮抗性检测及酯酶同工酶检测均有效,只是拮抗性检测相对有些粗略,酯酶同工酶检测更为精确,但酯酶同工酶检测操作相对繁琐,需要一定的仪器设备,且费用较高,因此在偏远、设备条件较差的农村地区,拮抗性检测是平菇品种鉴定的一种行之有效的办法。同时检测结果显示,从冀南菌种市场抽查的7个菌株,没有出现同物异名或一物多名现象,说明在菌种命名上抽检的2个公司管理较好。

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] 辜运富,张小平,陈强. 双孢蘑菇菌株酯酶同工酶及可溶性蛋白的电泳分析[J]. 四川农业大学学报,2003,21(3):217-220.
- [3] 叶明,叶生梅,戚中田,等. 香菇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,2005,25(1):54-56.
- [4] 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):614-645.

Preliminary Study on Oyster Mushroom Strain Identification in the Southern of Hebei

LIU Gui-qiao¹, BAO Zeng-hai², QUE Xiao-chang³

(1. College of Agriculture, Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056003; 2. School of Food Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005; 3. The First Middle School in Xingtai, Xingtai, Hebei 054300)

Abstract: Collecting 7 oyster mushroom strains randomly in the market of southern of Hebei, the antagonistic and esterase isozyme of them were detected. The results showed that the difference between five strains were the enzyme in the number, location and color; the antagonism testing had the same results; but there were two strains. The antagonistic test results were antagonistic, esterase isozyme detection results showed the two strains had the same enzyme of number, location and color in main belt location, the slightly difference between the two strains was the enzyme in the number, it showed that the two strains were closer in relationship. It proved that the two detection methods for oyster mushroom strains identification were effective, it also proved that no synonym or a material number of phenomena on the naming of oyster mushroom strains in the two companies.

Key words: oyster mushroom; strain; antagonistic; esterase isozyme