

十五个香菇菌株遗传特异性研究

宋莹, 刘娜, 肖千明, 李红

(辽宁省农业科学院 蔬菜研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:采用拮抗试验和酯酶同工酶电泳技术对 15 个香菇菌株进行了菌种遗传特异性研究。结果表明:15 个香菇菌株的谱带都在 8~11 条之间,酶谱稳定,可重复性高,酯酶同工酶技术可应用于香菇种群的划分研究;聚类分析结果显示,在相似水平为 0.41 时,15 个供试菌株聚合为 6 类:第 1 类包括‘荷香 1 号’、‘浙江丽水 808’和新宾县‘东升 808’,其中引自浙江丽水的‘808’和新宾‘东升 808’菌株相似系数为 100%,说明其遗传背景相同,为同名同种;第 2 类包括丹东‘早丰 8 号’;第 3 类包括‘向阳 2 号’和‘辽抚 4 号’;第 4 类包括辽宁省农业科学院提供的‘937’、引自新宾东升的‘937’、‘抚香 3 号’、‘锦香’和‘永香 1 号’,其中辽宁省农业科学院提供的‘937’和引自新宾东升的‘937’菌株相似系数为 100%,说明其遗传背景相同,为同名同种;第 5 类包括‘平泉 18’、新宾二道‘早丰 8 号’和新宾‘永陵 808-2’;第 6 类包括‘天成 1 号’,聚类分析结果与拮抗试验结果基本一致。

关键词:香菇;拮抗试验;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(2014)18-0163-04

香菇(*Lentinula edodes*)属伞菌目侧耳科香菇属食用菌。其味道鲜美、营养丰富,含有人体所必需的 7 种

第一作者简介:宋莹(1982-),女,硕士,现主要从事食用菌育种及栽培技术等研究工作。E-mail:sy.512@163.com.

收稿日期:2014-05-22

栽培模式中,综合生物转化率和产品商品性,处理 D 双排袋泥垛式单向出菇为最佳模式。

杂木屑和玉米芯部分代替棉籽壳栽培猴头菇证明是可行的,最佳的比例尚需要进一步试验;栽培模式 A 产量高、畸形菇比较多、菌盖发黄,估计可能与栽培季节地温低和靠近地面通风不畅有关,如何解决这一问题 是努力方向。处理 B 是菇型最大的,菌盖略有黄斑是缺点,估计与靠近地面通风不畅、二氧化碳浓度高有关,如

氨基酸和 30 多种酶类^[1];同时也是我国出口量最大的菇类^[2]。香菇品种的好坏直接影响香菇的产量和质量。因此,选育优良的香菇品种至关重要。目前在香菇选育中,杂交育种是一项应用比较广泛的育种方法,由于目前香菇菌株同名异物和同物异名现象严重,因此,对香菇菌株进行有效的分类和亲缘关系鉴定是香菇育种成

果解决这个问题,此模式是生产优质菇的首选方式。处理 C 和不覆土层垛式出菇差别不大,产量较低。处理 D 产量高、菇型好,可能与空间温度比地面高,空间比地面通风好有关,还与能从顶端沟槽内补加营养液有关,在试验过程中,发现菌袋下方出菇多且菇型好,这可能与猴头菇“向地性”有关。下一步能否把菌膜保留,在菌袋上打孔,调节菌袋出菇口局部环境,实现定点出菇,需进一步研究。

Key Technologies of Efficient Cultivation of *Hericiu m erinaceus*

WU Qing-shan

(Binzhou Vocational College, Binzhou, Shandong 256603)

Abstract: Taking ‘988’ *Hericiu m erinaceus* strains as test material, the effect of different media on growth rate, effect of different loading capacity on yield, and effect of cultivation mode on quality were studied. The results showed that the best formula suitable for the growth of *Hericiu m erinaceus* was recipe A (cottonseed skin 50%, 20% sawdust, corn cob 15%, wheat bran 10%, gypsum powder 2%, superphosphate 2%, sucrose 1%), not only the low cost, but also a reasonable collocation; when bagging bag was the amount of 400 g, conversion rate of *Hericiu m erinaceus* was the maximum; double bags of mud pile-way mode of cultivation of *Hericiu m erinaceus* mushroom fruiting type was well, a big thorn dense, high moral character was good.

Keywords: *Hericiu m erinaceus*; efficient cultivation; key technology

功与否的首要因素^[4]。

该试验旨在运用拮抗试验和酯酶同工酶技术,对 15 个香菇菌丝体间的体细胞非亲和性及酯酶同工酶的酶谱进行遗传特异性研究,初步鉴定 15 个香菇菌株的亲缘关系,以期香菇杂交育种工作中的亲本选择提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种及来源详见表 1。将收集到的 15 个香菇菌株,进行拮抗试验和酯酶同工酶分析。

PDA 综合培养基:土豆 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,磷酸二氢钾 3 g,硫酸镁 1.5 g,蛋白胨 3 g,水 1 000 mL,pH 值自然。

1.2 试验方法

1.2.1 香菇菌种活化 将供试菌种在无菌条件下分别接于 PDA 斜面培养基上,置于(24±1)℃的恒温培养箱内,培养 7 d。

表 1 供试香菇菌株

Table 1 Strains of *Lentinula edodes* tested in the study

编号 No.	菌株名称 Strain name	来源/采样地点 Origin/Collect place
XX1	‘荷香 1 号’	引自荷兰
XX2	‘向阳 2 号’	辽宁丹东宽甸
XX3	‘早丰 8 号’	辽宁丹东宽甸
XX4	‘平泉 18’	引自河北平泉
XX5	‘937’	辽宁省农业科学院食用菌研究室
XX6	‘808’	引自浙江丽水
XX7	‘早丰 8 号’	辽宁新宾二道村
XX8	‘永香 1 号’	辽宁新宾永陵镇
XX9	‘抚香 3 号’	辽宁新宾永陵镇
XX10	‘808-2’	辽宁新宾永陵镇
XX11	‘辽抚 4 号’(0912)	辽宁新宾东升
XX12	‘天成 1 号’	辽宁新宾东升
XX13	‘937-1’	辽宁新宾东升
XX14	‘808’(中)	辽宁新宾东升
XX15	‘锦香’	引自辽宁锦州

表 2 15 个菇菌株拮抗试验结果

Table 2 The result of antagonism test of 15 *Lentinula edodes* strains

	XX1	XX2	XX3	XX4	XX5	XX6	XX7	XX8	XX9	XX10	XX11	XX12	XX13	XX14	XX15
XX1		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
XX2			++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
XX3				++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
XX4					++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
XX5						++	++	++	++	++	++	++	—	++	++
XX6							++	++	++	++	++	++	++	—	+
XX7								++	++	++	++	++	++	++	+
XX8									++	++	++	++	++	++	++
XX9										+	++	++	++	++	++
XX10											++	++	++	++	++
XX11												++	++	++	++
XX12													++	++	++
XX13														++	++
XX14															++
XX15															++

注:“++”表示拮抗明显,“+”表示拮抗不明显。“—”没有拮抗线。

1.2.2 拮抗试验 将供试菌株分别用 Φ 0.6 cm 的打孔器取定量的菌丝块,每 3.5 株接种到 9 cm 的培养基平板上对峙培养,种块间距 1.5~2.0 cm,于(24±1)℃培养 20 d,每个菌株重复 3 次,观察结果并拍照。

1.2.3 菌丝收集 将活化好的菌种在无菌条件下接种到 25 mm×200 mm 的试管斜面培养基上,10 支/品种,(24±1)℃避光培养 25 d。

1.2.4 同工酶分析 采用垂直平板聚丙烯酰胺电泳法,收集供试菌株菌丝 0.5 g/份,液氮研磨,将样品收集于 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL 样品提取液。将研磨后的样品在 4℃、10 000 r/min 离心 20 min,取其上清液。将上清液、蔗糖溶液 1:1 的体积比混合作为电泳样品。点样量为 35 μL,溴酚兰作电泳指示剂。在 4℃下电泳,初期电压为每板 100 V,当溴酚兰指示剂进入分离胶后电压升为每板 200 V,待指示剂迁移至距末端 1 cm 左右处停止电泳,染色,保存备用。

1.3 数据分析

观察样品酶带的位置,计算每条酶带的相对迁移率(R_f), R_f 按下列公式计算: $R_m = dn/d$,式中: R_m 为条带 n 的相对迁移率; dn 为条带 n 的迁移距离(cm); d 为溴酚兰的迁移距离(cm)。同时将凝胶照相存图。根据菌株每条酶带的出现与否,计算各菌株间的遗传相似系数^[5]。

2 结果与分析

2.1 拮抗试验

拮抗试验可观察到菌株间种、群亲缘关系,对于亲缘关系远、完全独立的异缘或基因型不同的菌株来说,它们间存在着不亲和反应(拮抗反应)。而对亲缘关系近或基因型相同的菌株来说,它们之间表现为一定的亲和性。15 个香菇菌株的拮抗试验中(表 2),没有产生拮抗线的组合为 XX6 和 XX14、XX5 和 XX13,说明每 2 个菌株之间亲缘关系近,或为同一种源;拮抗表现不明显

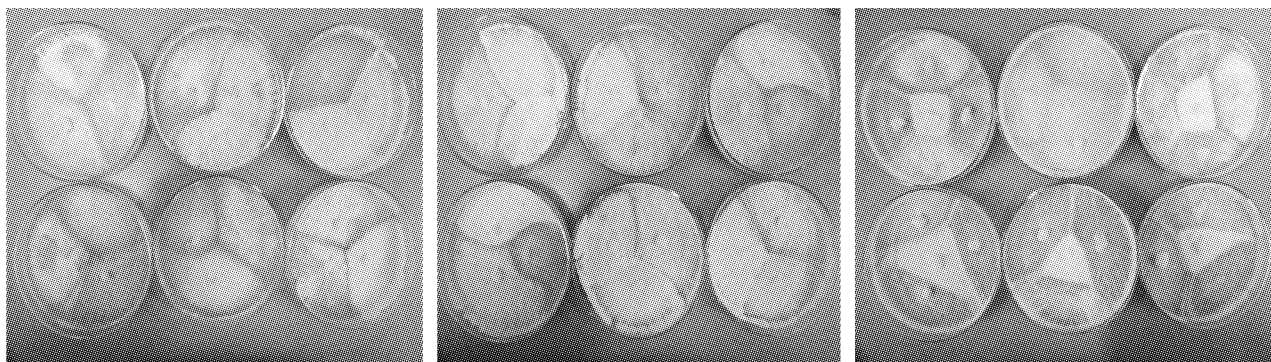


图1 部分拮抗试验

Fig. 1 Partial figures of antagonism test

的组合为 XX6 和 XX15、XX7 和 XX15、XX9 和 XX10,说明亲缘关系相对近些;其它组合的菌株拮抗现象均比较明显,说明亲缘关系较远,为独立的菌株。

2.2 酯酶同工酶带

由图 2 可知,15 个香菇菌株的酯酶同工酶图谱表现不同,15 个香菇品种酯酶同工酶酶谱带数在 8~11 条之

间,所有的酶带均在其中 R_f 0.278~0.797 之间,其中 R_f (相对迁移率)0.432、0.454、0.516、0.554 为 15 个菌株所共有,可以认为是香菇的基础酶谱带,这表明 15 个香菇菌株之间有同源性,在主要代谢过程中具有相似的生理性状;XX6 和 XX14、XX5 和 XX13 这 2 组酶带条数基本相同,但酶带深浅、宽窄不同,这可能与酶的活性和浓度有关。

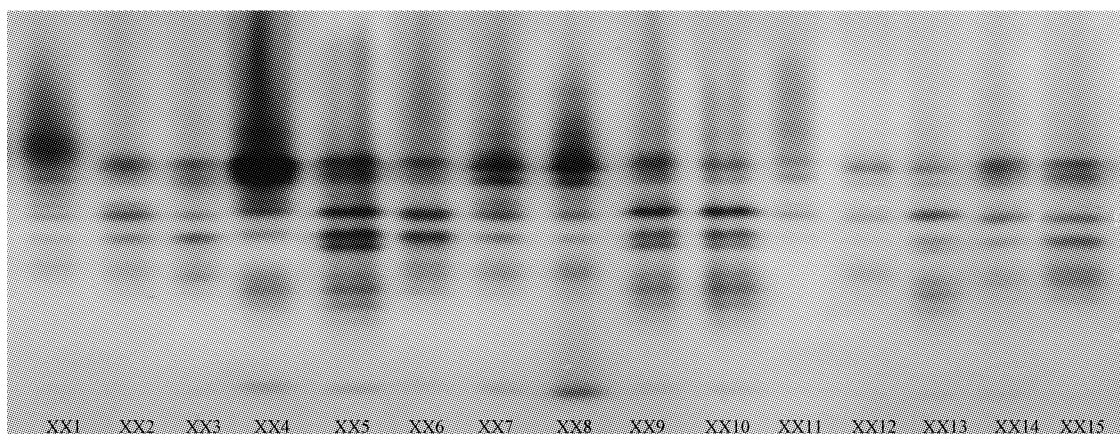


图2 供试 15 个菌株的酯酶同工酶图谱

Fig. 2 Esterase isozyme zymogram of the 15 strains tested

2.3 聚类分析结果

从图 3 可以看出,在相似水平为 0.41 时可将供试菌株聚合为 6 类:第 1 类包括 XX1、XX6、XX14 共 3 个菌株,其中 XX6 和 XX14 相似系数为 100%,说明每组的菌株遗传背景相似或为同一种;第 2 类为 XX3 菌株;第 3 类为 XX2、XX11 共 2 个菌株;第 4 类包括 XX5、XX13、XX9、XX15 和 XX8 共 5 株菌株,其中组合 XX5 和 XX13 相似系数为 100%,说明此组的菌株遗传背景相似或为同一种;第 5 类为 XX4、XX7、XX10 共 3 个菌株;第 6 类为 XX12。

3 结论与讨论

从供试菌株的拮抗试验及聚类分析树状图可以看出,部分菌株之间未出现拮抗反应,同工酶图谱分析显示相似系数高达 100%,拮抗酯酶同工酶图谱聚类分析

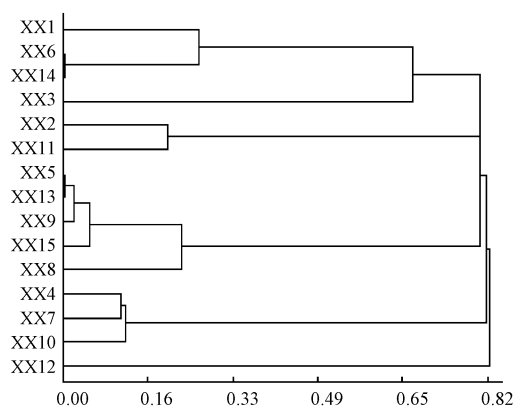


图3 15 个菌株的酯酶同工酶聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram based on esterase isozyme cluster analysis of the 15 strains tested

结果相吻合,可以初步确认这些菌株之间亲缘关系很近,属同种同名,但是来自不同地区的菌株,如引自浙江丽水的‘808’和新宾东升的‘808’菌株、辽宁省农业科学院的‘937’和新宾东升的‘937’菌株;但也有同名异种的现象出现,如在丹东宽甸的‘早丰8号’和新宾二道村的‘早丰8号’在拮抗试验中有拮抗线产生,同工酶图谱表现不一致,相似系数均较小,说明丹东宽甸的‘早丰8号’和新宾二道村的‘早丰8号’,菌株亲缘关系较远,有很大的遗传差异,属同名异种菌株;新宾永陵的‘808-2’菌株均与引自浙江丽水的‘808’和新宾东升‘808’(中)菌株均有拮抗线产生,说明新宾永陵的‘808-2’菌株均与引自浙江丽水的‘808’、新宾东升的‘808’(中)2菌株亲缘关系较远,有很大的遗传差异,属同名异种菌株。该试验3次重复,酶谱较稳定,可作为香菇种群的划分依据之一。

研究结果还发现,酶带的宽窄深浅与菌丝长势无明显直接关系,菌株‘平泉18’在菌丝收集时从菌丝外观上与其它菌株菌丝比较,菌丝长势最弱,菌丝较淡,但在重复3次的同工酶图谱上比较,3次重复的‘平泉18’的每条酶带比其它菌株均宽而深,这可能与品种特性有关;辽宁省农科院的‘937’与新宾东升的‘937’菌株、浙江丽水的‘808’与新宾东升的‘808’(中)的酶带条数相同,但宽窄深浅明显不同,这可能与不同代数、不同保藏菌种的培养基配方的培养菌丝所含有的酶活性和酶浓度有关。

通过设定不同电压进行电泳时发现,当初始电压为150 V,待溴酚兰指示线进入到分离胶时将电压调整为300 V时进行电泳,较浓缩胶初始电压为100 V,指示线进入分离胶后电压为200 V进行电泳时的酶带数量有所减少,同种菌株酶带数减少2~4条不等,具体原因还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈宗泽,杨军. 食用菌栽培实用技术[M]. 北京:解放军出版社,2000:156-158.
- [2] 韩省华. 食用菌培育与利用[M]. 北京:中国林业出版社,2006:99-100.
- [3] 陶永恩. 专业合作社助力辽宁香菇生产[J]. 新农业,2010(11):57-58.
- [4] 张瑾,华秀英,留海英,等. 13个香菇品种间酯酶同工酶的研究[J]. 沈阳师范学院学报,2000(10):35-39.
- [5] 谢雪迎,任鹏飞,朱常香,等. 24个香菇菌株的鉴定与分类研究[J]. 山东农业科学,2009(12):36-39.
- [6] 刘娜,李红,刘存柱,等. 香菇不同菌株的酯酶同工酶多态性分析[J]. 蔬菜,2009(10):34-35.
- [7] 刘宇,赵爽,耿小丽,等. 11个毛木耳主栽菌株的鉴别研究[J]. 中国农学通报,2012,28(10):142-145.
- [8] 秦俊哲,艳芳,孙伟. 18个灵芝菌种的酯酶同工酶分析[J]. 陕西科技大学学报,2006(6):65-69.
- [9] 韩增华,高娃,张丕奇,等. 东北黑木耳栽培菌株的酯酶同工酶分析[J]. 黑龙江科学,2001,2(6):4-6,9.
- [10] 何彦,曾晓丽,汪思迪,等. 黑木耳菌株酯酶同工酶酶谱多样性研究[J]. 生物技术,2009,19(6):8-10.
- [11] 张丹,健伟,郑有良,等. 木耳种质资源的酯酶同工酶分析[J]. 生物技术通报,2006(增刊):483-489.

Study on Genetic Specificity of 15 *Lentinula edodes* Strains

SONG Ying, LIU Na, XIAO Qian-ming, LI Hong

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

Abstract: Genetic specificity of 15 *Lentinula edodes* strains were studied using antagonism experiment and the technology of esterase isozyme electrophoresis in this paper. The results showed that the quantity of bands of 15 *Lentinula edodes* strains were in the 8~11 range, enzyme spectrum stability, high repeatability, which showed that esterase isozyme technique could be applied to the taxonomy study of *Lentinula edodes* species; cluster analysis results showed that in the similar level of 0.41, 15 strains aggregated into six types; category 1 includes ‘Hexiang 1’, ‘808’ from Lishui city of Zhejiang province and ‘808’ from Dongsheng of Xinbin country among which the strains similarity coefficient of ‘808’ from different place was 100%, testifying the same genetic background and with the same name; category 2 includes ‘Zaofeng 8’ from Dandong city; category 3 includes ‘Xiangyang 2’ and ‘Liaofu 4’; category 4 includes ‘937’ from Liaoning academy of agricultural sciences, ‘937’ from Dongsheng of Xinbin country, ‘Fuxiang 3’, ‘Jinxiang’ and ‘Yongxiang 1’, among which the strains similarity coefficient of ‘937’ from different place was 100%, testifying the same genetic background and with the same name. category 5 includes ‘Pingquan 18’, ‘Zhaofeng 8’ from Erdao of Xinbin country and ‘808-2’ from Yongling of Xinbin country; category 6 includes ‘Tiancheng 1’. Cluster analysis results and the results of antagonism test were basically the same.

Keywords: *Lentinula edodes*; antagonism test; esterase isozyme; cluster analysis