

两个猪苓菌株生长速度及酯酶同工酶比较研究*

许广波 李艳茹 李太元 梁运江 傅伟杰

(延边大学农学院 延吉 133400)

摘要: 对不同地理分布的猪苓纯培养菌株进行了种性和酯酶同工酶的比较研究, 结果表明, 鸡爪苓(Z) 纯培养菌株和猪屎苓(ZJ) 纯培养菌株的种性有很大不同, 两个纯培养菌株的酯酶同工酶酶带类型差异较大, 亲缘关系较远。

关键词: 猪苓纯培养菌株, 菌种特性, 酯酶同工酶分析

中图分类号: S646.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0057-03

Study of the Growth Rate and Comparative Analysis of Esterase Isoenzyme from Two Isolates of *Polyporus umbellatus**

XU Guang-Bo LI Yan-Ru LI Tai-Yuan LIANG Yun-Jiang FU Wei-Jie

(Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133400)

Abstract: Comparative analysis of characteristic of species and esterase-isoenzyme of isolates of *Polyporus umbellatus* from different regions were processed. The results indicated that isolates of Jizhaoling (Z) and Zhushiling (ZJ) have significant differences in characteristic, and enzymatic band types of the two species also have significant differences. The homology at genetics between the two isolates is 0%, and consanguinity between the two isolates is the farthest.

Key words: Isolates of *Polyporus umbellatus*, Characteristic of isolates, Analysis of esterase-isoenzyme

猪苓是一种药用真菌, 其菌核具有利水渗湿之药效, 在我国已有 2000 多年的应用历史。猪苓的学名为 *Polyporus umbellatus* (pers.) Fr., 异名为 *Grifola umbellata* Gray。猪苓在真菌分类学上属于担子菌门 (Basidiomycota), 层菌纲 (Hymenomycetes), 非褶菌目 (Aphyllphorales), 多孔菌科 (Polyporaceae), 多孔菌属 (*polyporus*)。自上世纪 80 年代开始, 真菌学者对猪苓生物学特性、菌核结构、菌核与蜜环菌 (*Armillaria mellea*) 的共生关系以及半人工栽培等方面都进行了深入的研究^[1]。猪苓从菌核形态上分为两种 (见图 1), 一种形如瘤状, 分枝少, 表面较光滑, 俗称猪屎苓; 另一种分枝多, 凹陷深, 形似鸡爪, 俗称鸡爪苓。在我国华北、西北等省区生长的猪苓多是猪屎苓, 在东北长白山区生长的猪苓主要是鸡爪苓^[2]。目前所报道的研究资料只是提到猪苓在分布区域和菌核形态上有差异, 还未见到猪苓种间亲缘关系的报道。研究发现, 用猪屎苓和鸡爪苓的菌核进行组织分离都能得到纯培养菌种, 但种性表现出明显不同^[3]。

同工酶是生物机体中功能相同而结构不同的酶。同工酶的性质可从一个侧面反映出生物间遗传信息和系统演化上的关系, 在相同生物种内同工酶很相似。用凝胶电泳分离技术可以得到不同的同工酶, 其结果具有客观性和重现性, 借助于数学方法, 分析其所反映出的信息, 可作为传统分类的一个辅助方法^[4]。自上个世纪 50 年代以来,

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30460084)

通讯作者 Tel: 0433-3264661, E-mail: ljxgbn9@mail.jl.cn

收稿日期: 2005-08-01, 修回日期: 2005-10-20

国内外将同工酶分离分析技术广泛地应用于物种鉴定、遗传变异及真菌分类等方面的研究,取得了很多成果。在食药真菌研究中,同工酶分析也是一种常用手段^[5~7]。笔者采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳技术,对得到的鸡爪苓菌株(Z)和猪屎苓菌株(ZJ)进行了种间亲缘关系比较分析,以便进一步研究它们的起源。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

鸡爪苓菌株(Z)由产自长白山区的鸡爪苓菌核分离得到;猪屎苓菌株(ZJ)由产自陕西的猪屎苓菌核分离得到。

1.2 菌丝生长速度测定

在平皿培养基上,分别接种菌龄一致、大小为 1 cm^2 Z菌株和ZJ菌株的菌种块,25℃恒温培养,每隔5d测量Z菌株和ZJ菌株的菌落半径,做5次重复,35d后根据菌落半径大小计算菌丝平均生长速度(cm/d)。

1.3 酯酶同工酶分析

1.3.1 样品制备: 25℃下用液体培养法培养猪苓Z和ZJ,25d后取出菌丝体,用蒸馏水冲洗3次,滤干。分别称取1g,各加入Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.3)2mL,冰浴中用研钵研磨成浆,4℃下经4,000r/min、20min离心后取上清液,置冰箱内保存。

1.3.2 制胶和电泳: 用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定Z和ZJ菌株的酯酶同工酶,分离胶浓度为7.2%,浓缩胶浓度为4.0%,电极缓冲液为Tris-甘氨酸系统(pH8.3),点样量30μL,稳流50A,电泳时间为4h。

1.3.3 染色: 用醋酸-α-萘酯和坚牢蓝染色法染色。电泳结束后,取下胶板,37℃下染色25min,显出清晰酯酶同工酶酶带后取出,蒸馏水漂洗数次,用7%醋酸固定并照相。

2 结果与分析

2.1 Z菌株和ZJ菌株的菌核形态

菌核形态见图1。

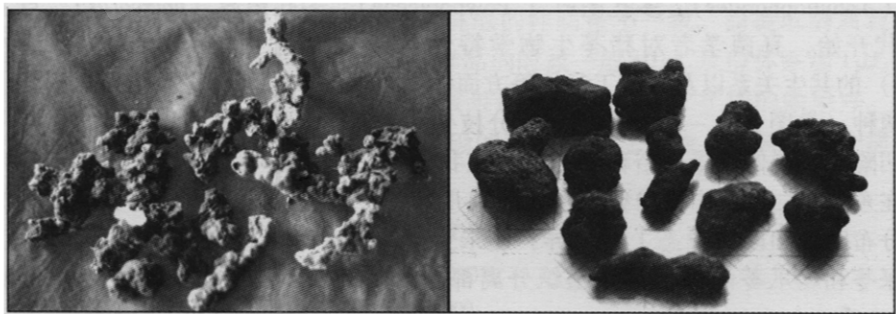


图1 猪苓菌核的形态

左图:鸡爪苓,右图:猪屎苓

2.2 Z菌株和ZJ菌株的菌丝生长速度比较

Z和ZJ菌株的菌丝生长速度观察结果见图2。由图2可以看出Z菌株菌丝生长速度快于ZJ菌株近1倍。Z菌株菌丝洁白,气生菌丝较为发达,菌落能够展开并能长满培养基表面,20d后在菌落上出现菌核状组织体。ZJ菌株气生菌丝较少,菌丝生长10d后出现老化,呈现褐色,菌落不能长满培养基表面,不形成菌核状组织体。

2.3 Z 菌株和 ZJ 菌株的酯酶同工酶比较

Z 和 ZJ 菌株的酯酶同工酶图谱见图 3，酯酶同工酶图谱相对迁移率 (R_f 值) 列于表 1。从图 3 上可见 Z 菌株和 ZJ 菌株的谱带各为 4 条，但 2 个菌株间各有自己的特征谱带。Z 菌株在 R_f 值 0.3174 处有一条色深而宽的特征酶带，是 EST 同工酶强带，ZJ 菌株则在 R_f 值 0.2016 处出现一条色深而宽的特征酶带。Z 菌株的 4 条酶带彼此间以接近等距分开，而 ZJ 菌株在 R_f 值 0.6 处有 3 条彼此靠近的酶带。Z 菌株和 ZJ 菌株没有 R_f 值相同的共有酶带，只在 R_f 值较为接近处 (0.6190 和 0.6210) 各有颜色不同的谱带，ZJ 菌株的谱带颜色要深些。由此，Z 菌株和 ZJ 菌株之间的遗传差异较大。

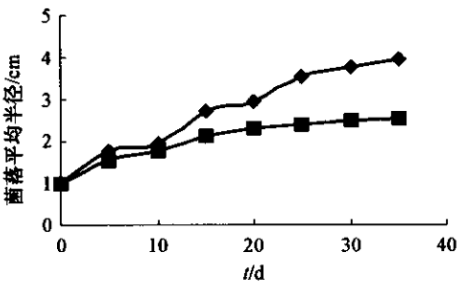


图 2 Z、ZJ 两个菌株的菌丝生长状况
—◆— Z 菌株，—■— ZJ 菌株

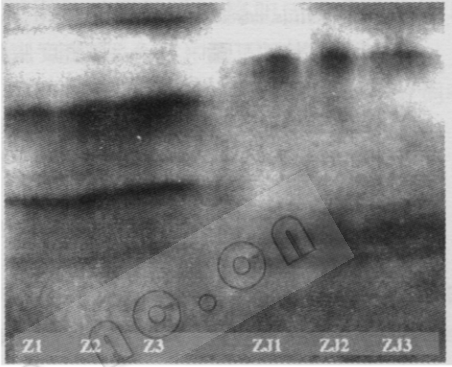


图 3 Z 和 ZJ 的酯酶同工酶分析图谱

表 1 Z 菌株和 ZJ 菌株酯酶同工酶的相对迁移率 (R_f)

菌株	谱带号			
	1	2	3	4
Z 菌株	0.1036	0.3174	0.5079	0.6210
ZJ 菌株	0.2016	0.5618	0.6190	0.6470

3 结论

- (1) 鸡爪苓纯培养菌株 (Z) 和猪屎苓纯培养菌株 (ZJ) 菌落及菌丝的生物性状差异很大，Z 菌株菌丝生长速度快，生物量大，有菌核状组织形成。ZJ 菌株的生长速度慢，菌丝易老化，没有菌核状组织形成。
- (2) 鸡爪苓 (Z) 菌株和猪屎苓 (ZJ) 菌株间的酯酶同工酶酶带类型差异较大，没有 R_f 值相同的共有酶带，说明 2 个菌株之间有很大的遗传差异，亲缘关系较远。

参 考 文 献

[1] 许广波, 傅伟杰, 赵旭奎. 菌物研究, 2003, 1 (1): 58 ~ 61.
[2] 许广波, 傅伟杰, 石铁源, 等. 北华大学学报 (自然科学版), 2002, 3 (1): 73 ~ 75.
[3] 许广波, 李太元, 李艳茹, 等. 吉林农业大学学报, 2004, 26 (3): 287 ~ 290.
[4] 胡书能, 万贤国. 同功酶技术及其应用. 长沙: 湖南科技出版社, 1985.
[5] 潘 玲, 李 纯. 微生物学通报, 1997, 24 (6): 379 ~ 380.
[6] 傅四清, 魏荣城. 中国食用菌, 1998, 19 (1): 8 ~ 9.
[7] 徐丽华, 段若玲, 张云峰, 等. 微生物学通报, 1998, 25 (6): 314 ~ 318.