

14 个灵芝菌株的酯酶同工酶分析*

秦俊哲 谷坤睿 陈 合

(陕西科技大学生命科学与工程学院 咸阳 712081)

摘要: 对 14 个灵芝菌株进行拮抗试验和酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳聚类分析, 实验共检出迁移率不同的谱带 18 条, 在 50% 相似水平上聚合为 5 类, 第 1 类包括仙芝、大仙 823、南韩、园芝 6 号、甜芝、韩芝; 第 2 类包括赤芝 10 号、赤芝 12 号、赤芝、日本红芝; 第 3 类包括紫芝和黑芝; 第 4 类为血芝; 第 5 类为白芝。聚类分析结果与形态观察及拮抗试验结果基本一致。实验还说明酯酶同工酶可作为灵芝良种选育的一种有效标记方法, 在菌种鉴定、保藏和管理等方面具有重要作用。

关键词: 灵芝, 拮抗试验, 酯酶同工酶, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 聚类分析

中图分类号: S646.9; Q556+.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0020-05

Esterase Isozyme Analysis of 14 Strains of *Ganoderma**

QIN Jun-Zhe GU Shen-Rui CHEN He

(College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xianyang 712081)

Abstract: Antagonism, esterase isozyme polyacrylamide gel electrophoretic (EST-PAGE) and cluster analysis was used in the study of 14 strains of *Ganoderma*. The results showed that there were 18 bands of EST with different Rf. Cluster analysis at 50% similarity level showed that all strains could be clustered into five groups, the first included Xian zhi, Da xian 823, Nan han, Yuan zhi 6, Tian zhi, Han zhi; the second included Chi zhi 10, Chi zhi 12, Chi zhi, Ri ben hong zhi; the third included Zi zhi, Hei zhi; the fourth included Xue zhi; the fifth included Bai zhi. And this result was similar to the result of antagonism and morphological characters. Because of its stability, the technique of EST can be used for identification of *Ganoderma*.

Key words: *Ganoderma*, Antagonism, Esterase isozyme, Polyacrylamide gel electrophoretic, Cluster analysis

灵芝 (*Ganoderma*) 是我国传统的药食两用真菌, 数千年来一直被认为是补气安魂, 延年益寿的良药仙草。现代研究证明, 灵芝中所含的灵芝多糖, 三萜类化合物等药效成分, 具有防癌变、抗衰老、增强免疫力等多种功效^[1]。利用灵芝菌制成的药物, 在临床上疗效显著, 开发前景极为广阔。

我国对灵芝的认识历史悠久, 《本草经集注》中依子实体的色泽将其分为青芝、赤芝、白芝、黄芝、黑芝和紫芝六大类^[2]。根据 Ainsworth 等人 (1973) 提出的分类系统, 灵芝属真菌门、担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、灵芝菌科、灵芝属^[1]。全世界已知灵芝属约有 300 余种, 其中我国已知有 110 种以上^[2]。随着人工栽培灵芝数量的迅速发展, 新的灵芝菌种也不断涌现。但由于我国食药用品种登记制度尚未健全, 菌种比较混乱, 同名异物或同物异名的情况非常普遍^[3], 灵芝菌也存在类似现象。不但给菌种生产管理带来难度, 同时给从事灵芝栽培及相关企业造成一定的经济损失,

* 陕西省教委自然科学基金资助 (No. 02JK080)

收稿日期: 2004-09-15, 修回日期: 2004-11-03

成为我国灵芝开发和产业发展中的严重障碍。同工酶电泳分析在食药真菌的分类鉴定和育种中的应用日益广泛,国内外都有类似的研究报道^[4~6],但是关于灵芝菌同工酶电泳分析报道很少。本文对目前市场上 14 个灵芝的主要栽培品种进行了生长特性和酯酶同工酶分析,旨在为灵芝菌的良种选育、种性鉴定及菌种管理等工作提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌种:1(赤芝 10 号)、2(赤芝 12 号)、3(仙芝)、4(大仙 823)、5(南韩)、6(黑芝)、7(紫芝)、8(白芝)、9(园芝 6 号)、10(血芝)、11(日本红芝)、12(甜芝)、13(韩芝)、14(赤芝)。以上菌种均由本校菌种室提供。

琼脂培养基:马铃薯 200g,蔗糖 20g,酵母膏 4g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, V_{B_1} 10~15mg,琼脂 20g,用水定容至 1,000mL, pH 自然。

棉籽壳培养基:棉籽壳 88%, 碳酸钙 2%, 麦麸 10%。料:水 = 1:1.5, 含水量 60%~65%。

1.2 主要仪器设备

BS 210S 分析天平, 303-3 电热培养箱, 超净工作台, LS-C50L 型立式压力蒸汽灭菌器, TGL-16M 高速台式冷冻离心机, DYY-11B 型三恒电泳仪, Vertical Electrophoresis System, 数码相机等。

1.3 实验方法

1.3.1 生长特性研究:将 14 个供试菌株分别接种于琼脂平板培养基和棉籽壳培养基中, 28℃ 培养, 每 24h 观察并测量菌丝长度。琼脂培养基取培养 5d 的菌丝进行比较, 棉籽壳培养基取培养 14d 的菌丝进行比较, 并进行子实体培养观察。

1.3.2 拮抗试验:将 14 个供试菌株接种于琼脂平板培养基上 28℃ 培养 7~10d, 观察是否有拮抗线出现。

1.3.3 酯酶同工酶电泳:(1) 菌丝培养:将 14 个供试菌株分别接于琼脂平板培养基中 28℃ 培养, 待菌丝刚刚长满, 每个菌株刮取一皿菌丝备用。(2) 电泳:取上述获得的菌丝, 分别加入 1mL TBE 缓冲液 (0.5mol/L, pH6.5) 和 0.5g 石英砂, 冰浴研磨成匀浆, 然后进行冷冻离心 (8,000r/min, 30 min, 4℃), 上清液中 1:1 加入 40% 蔗糖溶液和 1 滴溴酚兰指示剂, 即得样品液^[7]。实验采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)。浓缩胶浓度 3%, pH6.7, 分离胶浓度 8%, pH8.8, 点样量 20μL, 80V 电泳 1h, 150V 电泳 4h。酯酶染色采用 α, β 萘乙酯, 固蓝 RR 盐系统^[8]。(3) 聚类分析^[7,8]:计算电泳所得全部酶带的相对迁移率, 并采用类平均聚类法分析供试菌株之间的亲缘关系。

2 结果与讨论

2.1 供试菌株生长特征观察

培养观察结果 (表 1): 14 个菌株在琼脂培养基和棉籽壳培养基中均生长良好, 其中 8 号菌株生长最快。菌丝色泽和外观可分为白色绒状、乳白毡状、黑色绒状 3 类。子实体特征可分为红黄色、贝壳状、短柄类, 漆红色 (暗红)、近圆形、长柄类, 黑色

(紫黑、灰黑)、肾形、长柄类, 褐白色、圆形、短柄类, 深红色、圆形、短柄类等。

表 1 供试菌株的生长性状观察

编号	菌丝长速 (cm/d)	菌丝特征	子实体特征
1	1.14	白色, 绒状	贝壳状, 红黄, 柄短
2	1.14	白色, 绒状	贝壳状, 红黄, 柄短
3	1.24	乳白, 毡状	圆形, 漆红, 柄长
4	0.92	白色, 绒状	圆形, 亮漆红, 柄细长
5	0.84	乳白, 短绒状	肾形, 暗红, 柄侧生
6	0.86	乳白, 毡状	肾形, 黑色乌亮, 柄长
7	0.74	乳白, 毡状	肾形, 紫黑, 柄细长
8	1.38	白色, 短绒	圆形, 褐白色, 柄特短
9	0.64	乳白, 毡状	圆形, 紫红, 柄细长
10	1.00	黑色, 绒状	肾形, 灰黑, 柄短侧生
11	1.20	白色, 绒状	圆形, 深红, 柄短
12	1.34	乳白, 毡状	圆形, 紫红, 柄长
13	1.20	乳白, 毡状	肾形, 暗红, 柄长
14	0.86	白色, 绒状	贝壳状, 深红, 柄短

2.2 供试菌株间的拮抗试验

拮抗实验结果见表 2。

表 2 拮抗试验结果

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	+	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	-
2		++	++	++	++	++	+	++	++	-	++	++	+
3			+	+	++	++	++	+	++	++	+	-	++
4				+	++	++	++	-	++	++	+	-	++
5					++	++	++	-	++	++	+	-	++
6						-	++	++	++	++	++	++	++
7							++	++	++	++	++	++	++
8								++	++	++	++	++	++
9									++	++	+	+	++
10										++	++	++	++
11											++	++	-
12												+	++
13													++

由表 2 可见, 有拮抗现象的共有 91 组, 其中 68 组拮抗现象非常明显, 13 组拮抗现象不明显 (图 1), 它们是 (1, 2)、(2, 9)、(2, 14)、(3, 4)、(3, 5)、(3, 9)、(3, 12)、(4, 5)、(4, 12)、(5, 12)、(9, 12)、(9, 13)、(12, 13)。有 10 组无

拮抗现象, 分别是 (1, 11)、(1, 14)、(2, 11)、(3, 13)、(4, 13)、(4, 9)、(5, 9)、(5, 13)、(6, 7)、(11, 14)。

2.3 供试菌株的酯酶同工酶电泳图谱

图 2 为 14 个灵芝菌株的酯酶同工酶电泳图谱。14 个菌株共检测出 104 条酯酶同工酶谱带, 其中迁移率不同的有 18 条, 在 R_f 0.016 ~ 0.807 之间。多数菌株间酶带数目和迁移率不同, 酶带数分别为 4 ~ 10 条, 多为 6 ~ 9 条。14 个供试菌株分为五个酶谱类型, 大部分菌株种间和种内酶带存在一定差异。1、2、11、14 号酶带基本相同, 3、4、5、12、9、13 号的酶带基本相同, 表明菌株间遗传差异较小, 其中 3、4、5 号完全相同, 它们很可能为性状相近的不同品种或者为同物异名。8、10 号菌株谱带与其它菌株间的酶谱差异显著, 说明它们是与灵芝属其它种间性状差异较大的两个物种。酶谱分析结果与拮抗试验和子实体形态观察基本一致。

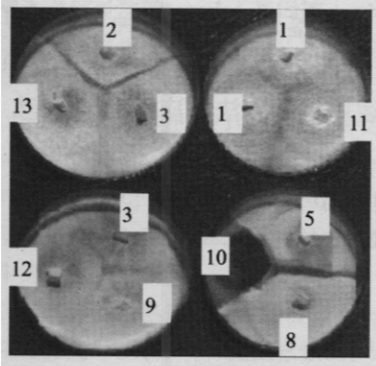


图 1 拮抗试验

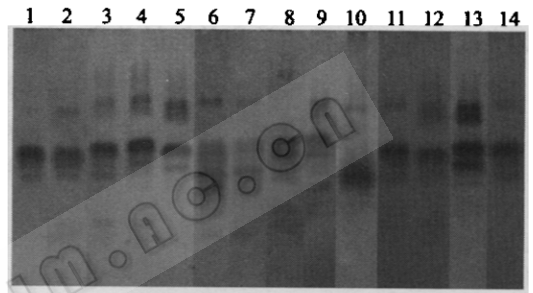


图 2 供试菌株的 EST-PAGE 图谱

运用聚类法计算 14 个灵芝菌株酶谱之间的联合系数, 并绘出遗传相似程度系统树 (图 3)。结果显示, 在相似水平为 50% 时可将供试菌株聚合为 5 类: 第 1 类包括以韩芝为代表的 6 个菌株; 第 2 类包括以赤芝为代表的 4 个菌株; 第 3 类包括紫芝和黑芝; 第 4 类为血芝; 第 5 类为白芝。聚类分析结果与形态特征及拮抗试验结果基本一致。

试验结果表明, 谱带差异显著的菌株, 其形态差别和拮抗现象明显, 例如白芝和血芝, 说明它们与其它菌株间有较远的亲缘关系。酶谱差异不大的菌株, 其形态差别和拮抗现象不明显, 例如赤芝、赤芝 10 号、赤芝 12 号、日本红芝等, 其产生差异的原因可能是赤芝作为灵芝的主栽品种, 在种植过程中某些性状发生变异的结果。酶谱基本相同的菌株, 例如仙芝、大仙 823、南韩、园芝 6 号、甜芝、韩芝等, 可能为同一物种在不同地区因性状的变化命名不同而已。实验结果还显示, 灵芝的酯酶同工酶多样性丰富, 具有一定的稳定性和重复性, 作为鉴定灵芝菌种的一种生化手段, 结果比较可靠。

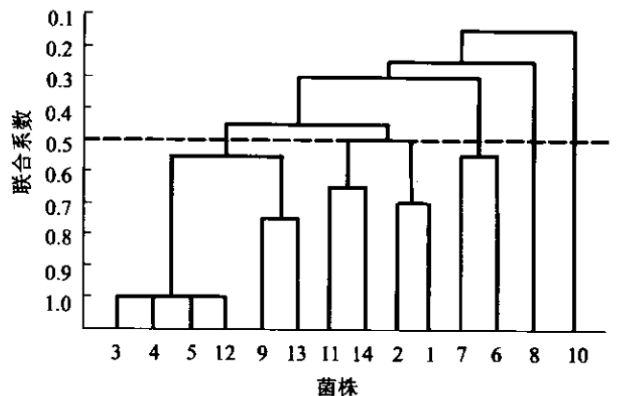


图 3 14 个灵芝菌株的遗传相似程度系统树

3 结论

(1) 14 个灵芝菌株共 91 个拮

抗试验组合,除仙芝、大仙 823、南韩、园芝 6 号、甜芝、韩芝以及赤芝 10 号、赤芝 12 号、赤芝、日本红芝之间无拮抗现象或拮抗现象不明显外,其余都具有明显的拮抗线。

(2) 14 个供试菌株的聚丙烯酰胺凝胶电泳共检出 104 条酯酶同工酶谱带,在相似水平为 50% 时可聚合为 5 类:第 1 类包括仙芝、大仙 823、南韩、园芝 6 号、甜芝、韩芝;第 2 类包括赤芝 10 号、赤芝 12 号、赤芝、日本红芝;第 3 类包括紫芝和黑芝;第四类为血芝;第五类为白芝。聚类分析结果与形态观察及拮抗试验结果基本一致。

(3) 研究表明,运用凝胶电泳技术进行酯酶同工酶分析,不同菌种之间酶谱多样性丰富,具有一定的稳定性和重复性,是从分子水平上鉴别种性的一种可靠方法。但实验中出现的拮抗现象的显著与否和酯酶同工酶谱带的差异,由于缺乏对照标准,难以判定是种间差异还是品种间的差异,因此这也是运用这种方法时应注意的问题。

参 考 文 献

- [1] 林树钱. 中国药用菌生产与产品开发. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [2] 严泽湘, 严清波, 刘建先. 灵芝与茯苓. 贵阳: 贵州科技出版社, 2002.
- [3] 张金霞. 中国食用菌, 1996, 15 (2): 11 ~ 12.
- [4] 郑泰月, 张金霞, 黄晨阳. 食用菌学报, 2003, 10 (4): 1 ~ 6.
- [5] 林兴生, 李开本, 陈体强, 等. 江西农业大学学报, 2001, 23 (1): 80 ~ 84.
- [6] 邢旺兴. 微生物学通报, 2000, 27 (6): 437 ~ 440.
- [7] 何忠效, 张树政. 电泳 (第二版). 北京: 科学出版社, 1999. 258 ~ 298.
- [8] 孔祥君, 王泽生. 中国蘑菇生产. 北京: 中国农业出版社, 2000. 53 ~ 60.