

## 利用同工酶酶谱法鉴别侧耳属的种和菌株

汤卫真 郑国扬 毕志树

(广东省微生物研究所, 广州)

**摘要** 本文初步报道酯酶同工酶酶谱对侧耳属各菌株的鉴定与按子实体的形态结构鉴别的结果基本一致; 并与菌株间的拮抗反应存在一定的关系。探讨了侧耳属的种或菌株的鉴别方法。

**关键词** 同工酶; 酶谱法; 侧耳属; 酯酶

1927年Bavendamm首次应用酶法于真菌分类上。他的方法是将酚加进培养基中使真菌的多酚氧化酶显色而得以鉴定。随后有不少学者以酶法进行分类研究。近十多年来,利用电泳方法分离同工酶和可溶性蛋白质鉴别半知菌、子囊菌及担子菌的某些菌株报道较多<sup>[9, 10, 11]</sup>。酶法在真菌上的分类价值已为很多研究者所肯定<sup>[9, 11]</sup>。这种方法可弥补形态学分类上的不足之处。然而,由于酶法分类涉及遗传基因及生物化学问题,存在种属特异性,因此,对各类真菌的种和菌株的酶谱都须分别进行探讨。

本文应用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定侧耳属的18个菌株菌丝体提取液的酯酶、酸性磷酸酶及过氧化物酶同工酶酶谱,以探索酶法在侧耳属菌株鉴别上的可能性。并将试验结果与形态鉴定和拮抗试验进行比较,提出该属的初步鉴别方法。

### 一、材料和方 法

(一) 供试菌株由本所野生真菌驯化组提供(见表1),各菌株以废棉为主要原料分别制成菌砖。在20—22℃、大气湿度85—95%、培养料含水量为70—75%的条件下,经15—20天培养长出子实体,待菌盖充分展开后进行宏观和微观观察,并参照邓叔群(1963)<sup>[1]</sup>、应建浙等(1982)<sup>[2]</sup>、Corner(1981)<sup>[4]</sup>、Miller(1969)<sup>[7]</sup>、Pegler(1977)<sup>[8]</sup>以及Singer(1975)<sup>[10]</sup>等进行鉴定。

(二) 菌丝的培养和电泳样品的制备:将保存在P.D.A.试管斜面的菌丝分别接入盛有20毫升培养液的150毫升三角瓶中。培养液配方:①马铃薯200克,葡萄糖20克,磷酸二氢钾3克,硫酸镁1.5克,维生素B<sub>1</sub>10毫克,水1000毫升。②硝酸钠10克,葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素及水的用量同①配方。③硫酸铵10克,葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素及水的用量同①配方。④酵母浸膏5克,葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、维生素及水的用量同①配方。菌丝体于24—25℃恒温静置培养6天。菌龄试验分4、6、8天三个处理。长好的菌丝分别收集在三角瓶内,用蒸馏水冲洗二次。捞起菌丝体离心除去水分。称重,按1:3(克/毫升)的比例加Tris-柠檬酸缓冲液,在零度以下预冷后磨成匀浆,立刻过滤,滤液以12000r.p.m./分的速度冷冻离心,取上清液保存于冰箱作为电泳样品。

本文承蒙陆大京教授审阅,龚静波、李崇同志照相,李泰辉、郑婉玲同志参加部分工作,一并致谢。

表1 供试侧耳属18个菌株

编号	学名	中文名	来源
P <sub>2</sub>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	糙皮侧耳	福建三明真菌所
P <sub>3</sub>	<i>Pl. platypodus</i>	扁柄侧耳	广州腐木上分离
P <sub>4</sub>	<i>Pl. ostreatus</i>	糙皮侧耳	湖北华中农学院
P <sub>6</sub>	<i>Pl. ostreatus</i>	糙皮侧耳	云南植物所
P <sub>10</sub>	<i>Pl. sajor-caju</i>	漏斗状侧耳	香港中文大学
P <sub>11</sub>	<i>Pl. cystidiosus</i>	鲍鱼菇	北京微生物所
P <sub>12</sub>	<i>Pl. floridanus</i>	蚝菇	北京微生物所
P <sub>13</sub>	<i>Pl. porrigens</i>	具形侧耳	福建三明真菌所
P <sub>16</sub>	<i>Pl. eugrammus</i>	真线侧耳	福建三明真菌所
P <sub>4076</sub>	<i>Pl. sajor-caju</i>	漏斗状侧耳	本所遗传育种组
P <sub>18</sub>	<i>Pl. pulmonarius</i>	肺形侧耳	福建三明真菌所
P <sub>19</sub>	<i>Pl. pulmonarius</i>	肺形侧耳	福建三明真菌所
P <sub>20</sub>	<i>Pl. eugrammus var. brevisporus</i>	短孢真线侧耳	福建三明真菌所
P <sub>22</sub>	<i>Pl. rhodophyllus</i>	粉红褶侧耳	福建三明真菌所
P <sub>23</sub>	<i>Pl. pulmonarius</i>	肺形侧耳	福建三明真菌所
P <sub>26</sub>	<i>Pl. citrinopileatus</i>	榆黄蘑	吉林生物所
P <sub>27</sub>	<i>Pl. citrinopileatus</i>	榆黄蘑	吉林生物所
P <sub>30</sub>	<i>Pl. citrinopileatus</i>	榆黄蘑	香港中文大学

(三) 酯酶、酸性磷酸酶及过氧化物酶同工酶的电泳测定: 按垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行<sup>[8]</sup>。以TEMED-过硫酸铵为催化系统。分离胶浓度为10%, 浓缩胶浓度为4%。酯酶电泳需稳定电压是42V/厘米, 电泳时间近二小时。酸性磷酸酶及过氧化物酶需稳定15V/厘米的电压, 电泳时间3—5小时。各种酶谱的显色方法是: 酯酶以醋酸- $\alpha$ -萘酯为底物, 快蓝为染料。酸性磷酸酶以 $\alpha$ -萘酚磷酸钠和固蓝盐B为染料。过氧化物酶以联苯胺-冰醋酸混合液为染料。酶带泳电率按莽克强<sup>[3]</sup>方法计算。

(四) 菌丝间的拮抗试验: 在9厘米P. D. A. 平板上进行。每个平板接上三个不同编号菌株的琼脂块, 置24—25℃培养14—15天检查菌株间是否形成拮抗线。

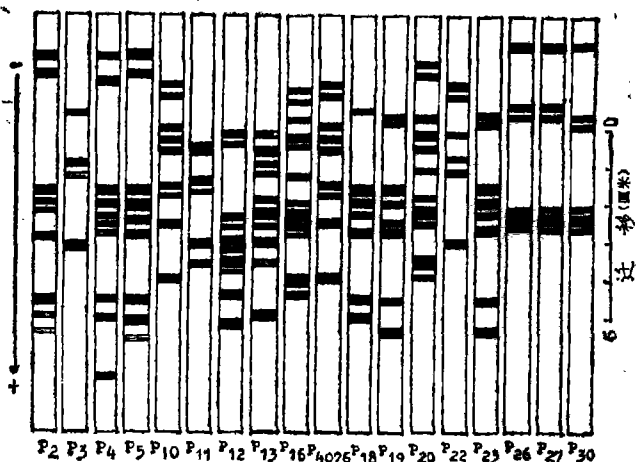


图1 18个侧耳菌株的酯酶同工酶酶谱

P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> (*Pl. ostreatus*), P<sub>5</sub> (*Pl. platypodus*), P<sub>10</sub>, P<sub>4076</sub> (*Pl. sajor-caju*), P<sub>11</sub> (*Pl. cystidiosus*), P<sub>12</sub> (*Pl. floridanus*), P<sub>13</sub> (*Pl. porrigens*), P<sub>16</sub> (*Pl. eugrammus*), P<sub>20</sub> (*Pl. eugrammus var. brevisporus*), P<sub>18</sub>, P<sub>19</sub>, P<sub>23</sub> (*Pl. pulmonarius*), P<sub>22</sub> (*Pl. rhodophyllus*), P<sub>26</sub>, P<sub>27</sub>, P<sub>30</sub> (*Pl. citrinopileatus*).

Fig. 1 Electrophoretic patterns of esterase isozyme of 18 strains of *Pleurotus*.

## 二、试验结果与分析

(一) 侧耳属的18个菌株菌丝体提取液的酯酶谱带、部分菌株的子实体形态如图1、图版I。图中表明各菌株的酯酶谱带与其子实体的形态存在一定的关系。酯酶同工酶谱带差异较大(酯酶带数、酶活性及迁移率等差异大)的菌株其子实体的形态不同,如P<sub>5</sub>, 糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、P<sub>10</sub>, 漏斗状侧耳(*Pl. sajor-caju*)、P<sub>26</sub>, 榆黄蘑(*Pl. citrinopileatus*)为不同的种。酯酶同工酶谱带差异较小的菌株其子实体的形态相似,如P<sub>2</sub>, P<sub>8</sub>(*Pl. ostreatus*)与P<sub>18</sub>, P<sub>23</sub>, 肺形侧耳(*Pl. pulmonarius*); P<sub>16</sub>, 真线侧耳(*Pl. eugrammus*)与P<sub>20</sub>, 短孢真线侧耳(*Pl. eugrammus* var. *brevisporus*)它们各是有亲缘关系的菌株。酯酶谱带基本上不存在差异的菌株,其子实体的形态结构相同。如P<sub>10</sub>(*Pl. sajor-caju*)与P<sub>4,076</sub>漏斗状侧耳(*Pl. sajor-caju*), P<sub>19</sub>肺形侧耳(*Pl. pulmonarius*)与P<sub>23</sub>(*Pl. pulmonarius*), P<sub>26</sub>(*Pl. citrinopileatus*)与P<sub>27</sub>榆黄蘑(*Pl. citrinopileatus*)各为相同的种。酯酶谱带与拮抗试验结果也存在一定的关系。菌株间不存在拮抗线的其酯酶谱基本相同。如P<sub>10</sub>与P<sub>4,076</sub>, P<sub>16</sub>与P<sub>23</sub>, P<sub>26</sub>与P<sub>27</sub>。存在拮抗线的菌株,它们的酯酶谱均有不同程度的差异。以上结果说明侧耳属的种或菌株用酯酶同工酶谱鉴别与形态结构鉴别和拮抗试验结果相一致。酯酶谱既有种的特异性,也能反映种间的亲缘关系。

在一定条件下,各菌株的主酶带(指显色较深的带)泳电率(Rf)是基本稳定的(见表2)。

表2 三个侧耳菌株的酯酶同工酶主酶带泳电率(Rf)

侧耳菌株	主酶带泳电率(Rf) <sup>*</sup>					
	1	2	3	4	5	6
P <sub>8</sub> ( <i>Pl. ostreatus</i> ) (糙皮侧耳)	0.403±0.020	0.427±0.023	0.453±0.026	0.474±0.004	0.652±0.009	0.691±0.020
P <sub>10</sub> ( <i>Pl. sajor-caju</i> ) (漏斗状侧耳)	0.277±0.017	0.304±0.010	0.329±0.015	0.384±0.018	0.456±0.014	0.594±0.006
P <sub>12</sub> ( <i>P. floridanus</i> ) (蚝菇)	0.288±0.013	0.448±0.009	0.494±0.010	0.540±0.017	0.637±0.022	0.710±0.008

\*δx是6次电泳的Rf值标准差

泳电率标准差在0.004至0.026之间。这表明各菌株酶带的相对位置是一定的。所以每次电泳对同一菌株来说,其酶纹都能重复出现。

(二) 酸性磷酸酶与过氧化物酶同工酶谱: 图2是几个菌株的酸性磷酸酶和过氧化物酶同工酶谱。它们与酯酶同工酶谱有如下关系: 酯酶同工酶谱差异大的菌株其酸性磷酸酶及过氧化物酶谱差异也大。如P<sub>11</sub>(*Pl. cystidiosus*)与P<sub>12</sub>(*Pl. floridanus*)、P<sub>16</sub>(*Pl. eugrammus*), 见图2: 1。酯酶同工酶谱相近或相同的菌株其酸性磷酸酶与过氧化物酶同工酶谱也相近或相同。如P<sub>10</sub>与P<sub>4,076</sub>, P<sub>26</sub>与P<sub>27</sub>, 见图2: 2, 图2: 3。这表明三种同工酶谱鉴定的结果是一致的。

(三) 不同培养基的菌丝体提取液的酯酶同工酶谱见图3: 图3表明同一菌株采用不

图2 几个菌株的酯酶、酸性磷酸酶及过氧化物酶的同工酶酶谱。

Fig.2 Electrophoretic pattern of esterase phosphatase and peroxidase isozyme of several strains of Pleurotus.

图2 : 1 a.酯酶; b.酸性磷酸酶

P<sub>11</sub>(Pl. cystidiosus), P<sub>12</sub>(Pl. floridanus), P<sub>13</sub>(Pl. porrigens), P<sub>16</sub>(Pl. eugrammus).

a. esterase; b. phosphatase.

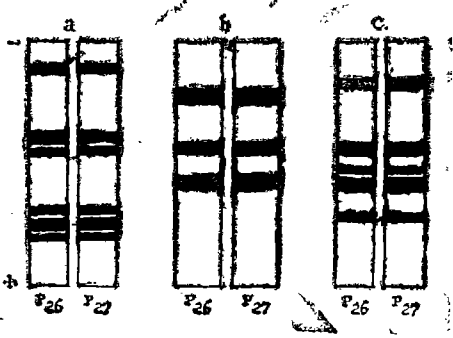
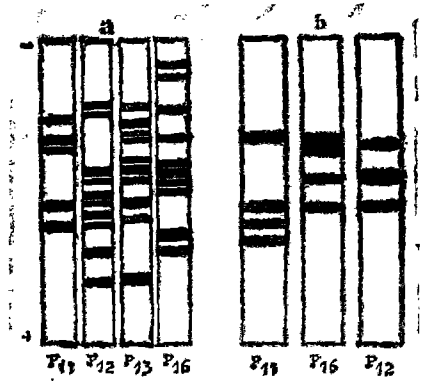


图2 : 2 a.酯酶; b.酸性磷酸酶; c.过氧化物酶。

P<sub>26</sub>, P<sub>27</sub>(Pl. citrinopileatus). a. esterase; b. phosphatase; c. peroxidase.

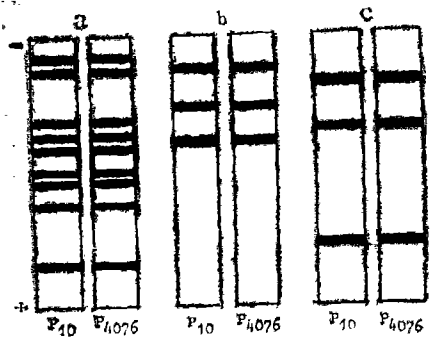


图2 : 3 a.酯酶; b.酸性磷酸酶; c.过氧化物酶。

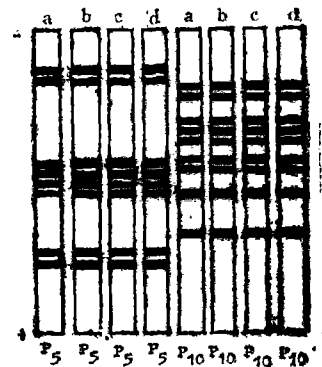
a. esterase; b. phosphatase; c. peroxidase P<sub>10</sub>, P<sub>4076</sub>(Pl. sajor-caju)

图3 不同培养基的菌丝酯酶同工酶谱

Fig. 3 Electrophoretic pattern of esterase isozyme of mycelial extracts on several media.

a.马铃薯培养基; b.硝酸钠培养基; c.硫酸铵培养基; d.酵母浸膏培养基。

a. Potato medium; b. NaNO<sub>3</sub> medium; c. (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> medium; d. Yeast extracts medium.

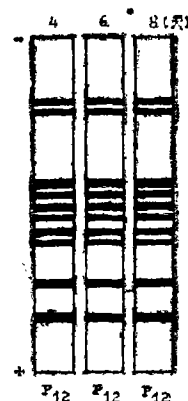


同培养基培养, 其菌丝体提取液的酯酶同工酶酶谱在本质上是相同的, 只是酶带强弱有别。马铃薯、硫酸铵及酵母浸膏为氮源培养的菌丝体, 其酯酶同工酶酶带活性较强, 而硝酸钠为氮源培养的菌丝其酯酶酶带活性较弱。

(四) 不同培养时间的菌丝体酯酶同工酶酶谱见图4: 从图4可看到同一菌株不同培养时间其菌丝的酯酶同工酶酶纹没有差异。

图4 不同培养时间培养的菌丝酯酶同工酶谱。

Fig.4 Electrophoretic pattern of esterase isozyme of mycelial extracts from various stages of culture



### 三、讨 论

Blaich<sup>[9]</sup> 认为酶带太简单或太复杂都不宜作为鉴别的酶。本文测定的三种酶都不存在这种情况, 适作鉴别的酶。其中以酯酶尤为适合, 因为酯酶的测定最易掌握, 且酶带最清晰、稳定。本试验测定的结果指出, 用酯酶、酸性磷酸酶及过氧化物酶等同工酶谱对侧耳属的种或菌株进行鉴定与拮抗试验或按子实体形态结构鉴定的结果基本一致。以同工酶作为鉴别种或菌株的依据只用培养菌丝就可达到目的。采用拮抗反应方法虽然也能在菌丝阶段得到鉴别, 但这个方法不能反映菌株间的亲缘关系。如  $P_2$  与  $P_5$ 、 $P_{18}$ 、 $P_{16}$  与  $P_{20}$  等菌株是彼此有亲缘关系的菌株, 但它们之间都分别存在拮抗线。在育种工作中, 如需选择亲缘较远的亲本作为杂交材料时, 利用同工酶电泳方法进行选择是较可靠的, 酶带差异越明显的菌株, 其亲缘关系也越远。对于杂交育种后代的鉴定, 测定同工酶是一种快速方便的鉴定方法。例如漏斗状侧耳  $P_{4076}$  (Pl. sajor-caju) 是以  $P_{10}$  (Pl. sajor-caju) 为其中一亲本的杂交后代, 通过上述几种同工酶的鉴定和拮抗试验以及子实体的形态结构鉴定, 它与  $P_{10}$  无论在形态上或生理上均未见任何差异。

$P_{26}$  (Pl. citrinopileatus) 与  $P_{27}$  (Pl. citrinopileatus) 是来自同一地方的两个不同编号的菌株, 经本试验鉴定, 两者其实是同一个种。 $P_2$  (Pl. ostreatus) 与  $P_5$  (Pl. ostreatus) 分别是来自福建和云南的二个糙皮侧耳。它们的子实体形态结构基本相同, 酯酶同工酶谱相似, 但拮抗试验存在拮抗线。可以认为它们是同一个种的变异菌。Eger (1979)<sup>[5]</sup> 认为用宏观和微观特征对糙皮侧耳 (Pl. ostreatus) 进行鉴别是不可靠的。在这一点上, 本文有相同的见解。

### 参 考 文 献

- [1] 邓叔群, 1963: 中国的真菌。580—583, 科学出版社。
- [2] 应建清等, 1982: 食用蘑菇。79—82, 图71—75, 科学出版社。
- [3] 莽克强等, 1975: 聚丙烯酰胺凝胶电泳。科学出版社。
- [4] Corner, E. J.; H. 1981: The Agaric Genera Lentinus, Panus, and Pleurotus. J. Cramer Germany 169pp.
- [5] Eger, G., Li, S. F. and Leal-Lara, H. 1979: Contribution to the discussion on the

- species concept in the *Pleurotus ostreatus* complex. *Mycologia* 71: 577—588.
- [6] Hall, R. 1967: Protein and catalase isoenzyme from *Fusarium solani* and their taxonomic significance. *Aust. J. Biol. Sci.* 20(2): 419—428.
- [7] Miller, O. K. 1969: A new species of *Pleurotus* with a coriemioid imperfect stage. *Mycologia* 61: 887—893.
- [8] Pegler, D. N. 1977: *Pleurotus* (Agaricales) in India, Nepal and Pakistan. *Kew Bull* 31: 501—510.
- [9] Rolf Blaich, 1976: Enzymes as an aid in taxonomy of higher Basidiomycetes. "The Species Concept in Hymenomycetes." Edited by H. Clemencon J. Gramer Germany. 215—228.
- [10] Singea, R. 1975: The Agaricales in modern taxonomy, J. Cramer. 912pp.
- [11] Toyomasu T. and Zennyozzi A. 1981: On the application of isozyme electrophoresis to identification of strain in *Lentinus edodes*. *Mushroom Science*, XI (part 2): 675—684.

## ON THE APPLICATION OF ISOZYME ZYMOGRAM TECHNIQUE TO IDENTIFY THE SPECIES OR STRAINS OF THE GENUS PLEUROTUS

Tang Wei-Zen Zheng Gou-yang and Bi zhi-shu  
(Institute of Microbiology of Guandong Province, Guangzhou)

**Abstract** This paper reports the preliminary results on the application of esterase zymograms technique to identify the species or strain of *Pleurotus*. It has been found that the results showed little difference from that of using morphology of their fruit-bodies for identification and that esterase zymogram are related to the antagonism among the strains. The identification of species or strain of *Pleurotus* was also evaluated.

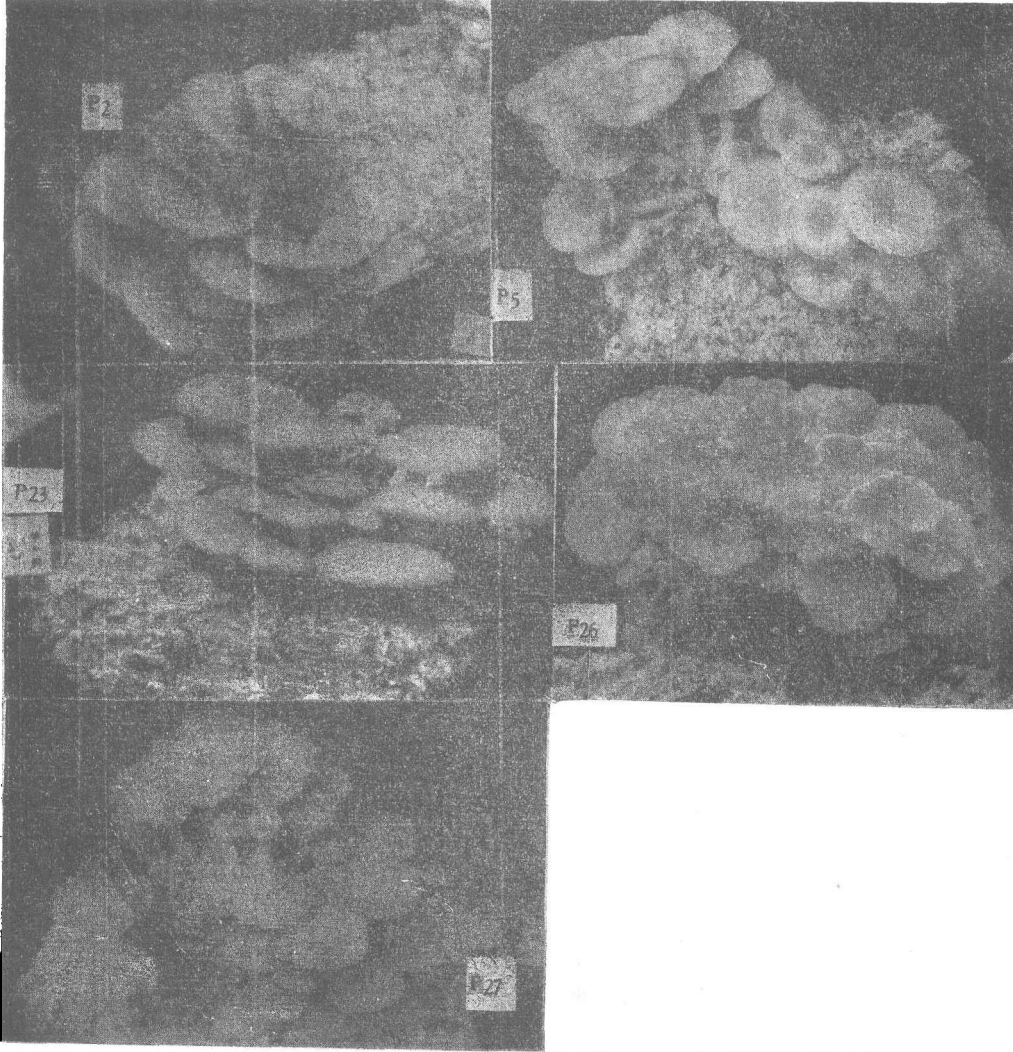
**Key words** Isoenzymes; Zymograms; *Pleurotus* (Fr.) Kumm; Esterase

汤卫真等：利用同工酶谱法鉴别侧耳属的种和菌株

图版 I

Tang Wei-zen et al.: On the application of isozyme zymogram technique to identify the species or strains of the genus *Pleurotus*

Plate I



几个菌株的子实体形态

Morphogenesis of fruit bodies of several strains of *Pleurotus*.

P<sub>2</sub> 糙皮侧耳 (*Pl. ostreatus*); P<sub>5</sub> 糙皮侧耳 (*Pl. ostreatus*);

P<sub>23</sub> 肺形侧耳 (*Pl. pulmonarius*); P<sub>26</sub> 榆黄蘑 (*Pl. citrinopileatus*);

P<sub>27</sub> 榆黄蘑 (*Pl. citrinopileatus*).