

对采自黑龙江五个大型真菌菌株最佳培养条件的筛选

李 丹, 戴月婷, 李 玉

(吉林农业大学 食药菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘 要:以采自黑龙江省的5种大型真菌多脂鳞伞、豹皮新香菇、马鞍菌、晶粒鬼伞、绒白乳菇为试材,对子实体进行分离获得菌株,采用观察、测量、SPSS Statistics 17.0 统计分析等方法,研究比较了4种不同水平的碳源、氮源、pH 值对5个菌株菌丝生长速度及长势的影响。结果表明:每一种真菌都有其最适的碳氮源和 pH 值,分别筛选出了适宜5个菌株生长的最佳培养基。

关键词:大型真菌;菌株;培养条件

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)22-0154-04

自然界中的菌物资源极其丰富,Hawksworth 估计全世界的菌物种类约有 150 万^[1]。但近年来由于人们对植被资源进行大规模的掠夺,导致地球上物质转化和能量流动的中心载体受到破坏,微生物资源发育的基础和环境也遭到破坏,给生物资源的发育和生物多样性带来巨大的灾害,同时也给大型真菌多样性和种质资源保护带来巨大创伤。我国虽然是食用菌种植大国,但不是食用菌的强国,其中拥有自主知识产权的品种少是重要的原因,可用的育种材料少是选育自有品种的主要障碍,野生资源是育种的宝库。基于以上因素,有必要对大型真菌资源进行收集评价。评价最重要的是应以优良菌株的表征为根据,如菌丝在不同培养基上的生长速度、形态特征、个体间的均一性和菇味等^[2-3],确定菌株的培养条件。目前关于优化培养条件的研究多集中在常见食用菌的生产菌种上,冯志勇等^[4]研究了不同碳源、氮源、温度、pH 值对秀珍菇菌丝生长的影响;蔡令仪等^[5]研究了不同温度、pH 值和含水量对姬菇菌丝生长的影响,而对直接从野外采集的大型真菌的质量评价相关报道较少。鉴于此,现对黑龙江省密山市峰密山采集到的5种真菌探索供试菌株培养条件并优化培养基,以期对相关菌株质量评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试真菌子实体多脂鳞伞(*P. adiposa*)、豹皮新香菇

(*N. lepideus*)、马鞍菌(*H. elastica*)、晶粒鬼伞(*C. mica-ceus*)、绒白乳菇(*L. vellereus*)于2012年7—10月采自黑龙江省密山市峰密山,菌株分离于新鲜子实体。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL;PD 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL;不同碳氮源培养基配方及 pH 值见表 1~3。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种分离提纯 真菌子实体采摘后,适当风干去除多余水分和黏性。然后用 75%酒精棉球擦洗双手及子实体,在酒精灯火焰附近,将被分离菌体掰开,用火焰灭菌过的解剖刀在菇盖与菇柄交界处刻一“田”字,然后靠近火焰,从“田”字中心处挑取一小块肉组织块(4~9 mm²)迅速移入 PDA 斜面培养基中央,塞上硅胶塞,贴标签,培养。菌种培养初期先判断菌丝是否受杂菌污染。利用某些大型真菌在较低的温度下,菌丝生长速度比细菌菌苔蔓延速度快的特点,用接种针切割菌丝的前端,转接到新的试管斜面培养基中培养,连续 2~3 次就能获得纯菌种。经常观察试管中菌丝生长情况,排除霉菌污染。将菌种块接入琼脂培养皿平板培养基中央,观察菌落形态。如菌落逐渐向四周呈辐射状散开,外缘整齐,则可判断为纯菌种^[2]。

1.2.2 碳氮源及 pH 试验 将试管内保存的供试菌种转接到 PDA 培养基平板上进行活化,大约 7 d 后,将活化的菌丝体沿菌落的边缘用 5 mm 打孔器接种于培养皿平板中央,每个处理 3 次重复,25℃恒温培养。每天定时观察菌落的生长状况,自菌种块萌发起 1 周内,采用十字划线法,以平板中菌落半径日增长量计算菌丝生长速度并观察记录菌丝颜色,气生菌丝多少,贴生菌丝分布状况等,分析菌丝生长速度的差异性及不同碳氮源、pH 值对这 5 种真菌菌丝生长的影响,以判断菌种生长能力

第一作者简介:李丹(1983-),女,硕士,实验员,研究方向为菌物学。E-mail:65608364@qq.com.

责任作者:李玉(1944-),男,硕士,教授,研究方向为菌物学。E-mail:yuli966@126.com.

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2014CB138305);现代农业产业技术体系建设专项基金资助项目(CARS24);吉林省重大资助项目(10ZDGG003)。

收稿日期:2014-07-13

表 1

不同碳源的培养基配方

Table 1

Formula of medium with different carbon sources

组别 Group	葡萄糖 Glucose/g	蔗糖 Sucrose/g	玉米粉 Corn flour/g	淀粉 Starch/g	酵母膏 Yeast extract/g	蛋白胨 Peptone/g	琼脂 Agar/g	硫酸镁 MgSO ₄ /g	磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄ /g	水 H ₂ O/mL	备注 Remarks
A	20	—	—	—	2	2	20	1.5	3	1 000	
B	—	20	—	—	2	2	20	1.5	3	1 000	用 1 mol/L 的 HCl 和
C	—	—	20	—	2	2	20	1.5	3	1 000	NaOH 调节 pH 6
D	—	—	—	20	2	2	20	1.5	3	1 000	

表 2

不同氮源的培养基配方

Table 2

Formula of medium with different nitrogen sources

组别 Group	硝酸铵 NH ₄ NO ₃ /g	谷氨酸 Glutamic acid/g	蛋白胨 Peptone/g	尿素 Urea/g	葡萄糖 Glucose/g	琼脂 Agar/g	硫酸镁 MgSO ₄ /g	磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄ /g	水 H ₂ O/mL	备注 Remarks
E	2	—	—	—	20	20	1.5	3	1 000	
F	—	2	—	—	20	20	1.5	3	1 000	用 1 mol/L 的 HCl 和
G	—	—	2	—	20	20	1.5	3	1 000	NaOH 调节 pH 6
H	—	—	—	2	20	20	1.5	3	1 000	

表 3

不同 pH 值的培养基配方

Table 3

Formula of medium with different pH value

组别 Group	土豆 Potato/g	葡萄糖 Glucose/g	琼脂 Agar/g	硫酸镁 MgSO ₄ /g	磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄ /g	水 H ₂ O/mL	pH 值 pH value	备注 Remarks
I	200	20	20	1.5	3	1 000	5	
J	200	20	20	1.5	3	1 000	6	用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节 pH
K	200	20	20	1.5	3	1 000	7	
L	200	20	20	1.5	3	1 000	8	

的优劣及在不同营养、环境条件下适应能力的高低。

1.3 数据分析

试验数据利用 SPSS 17 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌丝生长的影响

由表 4 可知,在碳源试验中,玉米粉为多脂鳞伞、晶粒鬼伞的最适碳源;蔗糖为豹皮新香菇的最适碳源;葡萄糖为马鞍菌、绒白乳菇的最适碳源。多脂鳞伞以玉米粉为碳源时,菌丝洁白,生长速度较快,菌丝较浓密,爬壁力强;以葡萄糖为碳源时,菌丝洁白,浓密,出现爬壁现象,但生长速度缓慢。豹皮新香菇以蔗糖为碳源时,生长速度最快,菌丝洁白,浓密;以淀粉为碳源时,菌丝生长速度最为缓慢,且长势一般。马鞍菌以葡萄糖为碳源时,生长速度最快,菌丝洁白、浓密;以淀粉为碳源时,菌丝生长速度最为缓慢。晶粒鬼伞以玉米粉为碳源时,生长速度最快,菌丝洁白、浓密;以淀粉为碳源时,菌丝生长速度最为缓慢。绒白乳菇以葡萄糖为碳源时,生长速度最快,菌丝洁白、长势好。

2.2 不同氮源对菌丝生长的影响

由表 5 可知,在氮源试验中,硝酸铵为多脂鳞伞、豹皮新香菇、晶粒鬼伞的最适氮源;蛋白胨为马鞍菌、绒白乳菇的最适碳源;尿素对 5 种真菌菌丝生长的促进作用均不明显,甚至表现出抑制作用(如晶粒鬼伞在尿素中未生长)。多脂鳞伞以硝酸铵为氮源时,菌丝生长速度最快,且菌丝浓密;以尿素为氮源时,菌丝生长速度缓慢且长势弱。豹皮新香菇以硝酸铵为氮源时,菌丝生长速度最快,且菌丝较为浓密;以尿素为氮源时,菌丝生长速

表 4 不同碳源对 5 个菌株菌丝生长速度及生长势的影响

Table 4 Mycelium growth rate and vigor of five strains on media with different carbon sources

菌株 Strain	碳源 Carbon source	菌丝生长速度 Mycelium growth rate/(mm·d ⁻¹)	差异显著性 Significant difference		菌丝生长势 Mycelium growth vigor
			0.05	0.01	
多脂鳞伞 <i>P. adiposa</i>	葡萄糖	6.40±0.00	a	A	+++
	蔗糖	7.18±0.03	b	B	++
	玉米粉	7.21±0.03	c	C	++
	淀粉	6.87±0.00	d	D	++
豹皮新香菇 <i>N. lepideus</i>	葡萄糖	3.50±0.00	a	A	++
	蔗糖	4.05±0.09	b	B	+++
	玉米粉	3.63±0.06	c	C	+++
	淀粉	2.75±0.05	d	D	++
马鞍菌 <i>H. elastica</i>	葡萄糖	2.03±0.12	a	A	+++
	蔗糖	2.00±0.00	b	B	+++
	玉米粉	1.50±0.00	c	C	+++
	淀粉	1.45±0.05	d	D	+++
晶粒鬼伞 <i>C. micaceus</i>	葡萄糖	1.72±0.03	a	A	++
	蔗糖	1.87±0.06	b	B	+++
	玉米粉	2.17±0.06	c	C	++
	淀粉	1.70±0.00	d	D	++
绒白乳菇 <i>L. vellereus</i>	葡萄糖	5.93±0.06	a	A	+++
	蔗糖	5.90±0.00	b	B	++
	玉米粉	5.63±0.55	c	C	++
	淀粉	5.37±0.03	d	D	+++

注:数据为 3 次重复的平均值和标准误;+++表示菌丝生长势强,++表示菌丝生长势一般,+表示菌丝生长势弱。下同。

Note: The data are the average value and standard error of 3 repetitions; +++ shows that the mycelia grow vigorously, ++ shows that the mycelia grow ordinarily, + shows that the mycelia grow weakly, the same below.

度缓慢且长势弱。马鞍菌蛋白胨为氮源时,菌丝生长速度最快,且菌丝浓密;以硝酸铵为氮源时,菌丝生长速度缓慢且长势弱。晶粒鬼伞硝酸铵为氮源时,菌丝生长速

表 5 不同氮源对 5 个菌株菌丝生长速度及生长势的影响

Table 5 Mycelium growth rate and vigor of five strains on media with different nitrogen sources

菌株 Strain	氮源 Nitrogen sources	菌丝生长速度 Mycelium growth rate/(mm·d ⁻¹)	差异显著性 Significant difference		菌丝生长势 Mycelium growth vigor
			0.05	0.01	
多脂鳞伞 <i>P. adiposa</i>	硝酸铵	6.87±0.06	a	A	++
	谷氨酸	6.23±0.06	b	B	++
	蛋白胨	6.78±0.06	c	C	++
	尿素	5.70±0.00	d	D	+
豹皮新香菇 <i>N. lepideus</i>	硝酸铵	5.53±0.06	a	A	++
	谷氨酸	0.82±0.03	b	B	++
	蛋白胨	4.10±0.00	c	C	+++
	尿素	3.53±0.06	d	D	+
马鞍菌 <i>H. elastica</i>	硝酸铵	0.42±0.03	a	A	+
	谷氨酸	1.30±0.20	b	B	+++
	蛋白胨	1.62±0.03	c	C	+++
	尿素	1.55±0.09	d	D	+++
晶粒鬼伞 <i>C. micaceus</i>	硝酸铵	2.53±0.12	a	A	++
	谷氨酸	1.77±0.06	b	B	++
	蛋白胨	2.17±0.06	c	C	++
	尿素	0.00±0.00	d	D	—
绒白乳菇 <i>L. vellereus</i>	硝酸铵	1.27±0.41	a	A	+++
	谷氨酸	2.10±0.00	b	B	+
	蛋白胨	2.98±0.03	c	C	+++
	尿素	2.97±0.42	d	D	++

注：—表示菌丝停止生长。
Note: — shows that the mycelium do not revive, similarly hereinafter.

度最快,且菌丝长势较好;以尿素为氮源时,菌块未生长。绒白乳菇以蛋白胨为氮源时,菌丝生长速度最快,且菌丝浓密;以尿素为氮源时,菌丝生长速度与在蛋白胨中的接近,且菌丝分泌褐色色素。

2.3 不同 pH 值对菌丝生长的影响

由表 6 可知,在 pH 试验中,多脂鳞伞在 pH 7 时,菌丝生长速度最快且菌丝浓密;pH 5 时,菌丝较为浓密,菌种块周围出现少量褐色色素。豹皮新香菇在 pH 6 时,菌丝生长速度较快且菌丝长势好;pH 5 时,菌丝生长速度最快但菌丝稀疏。马鞍菌在 pH 8 时,菌丝生长速度最快且菌丝长势好,菌丝洁白,极其浓密,气生菌丝发达呈棉絮状。随着 pH 的降低,菌丝生长速度逐渐减慢。pH 5 时,菌丝生长速度缓慢。晶粒鬼伞在 pH 5 时,菌丝生长速度最快且菌丝长势较好。绒白乳菇在 pH 8 时,菌丝生长速度最快且菌丝长势较好。

2.4 5 个菌株菌丝在适宜培养基上的生长情况

多脂鳞伞的最适培养基为玉米粉 20 g,硝酸铵 2 g,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 3 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 7(图 1A);豹皮新香菇的最适培养基为蔗糖 20 g,硝酸铵 2 g,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 3 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 6(图 1B);马鞍菌的最适培养基为葡萄糖 20 g,蛋白胨 2 g,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 3 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 8(图 1C);晶粒鬼伞的最适培养基

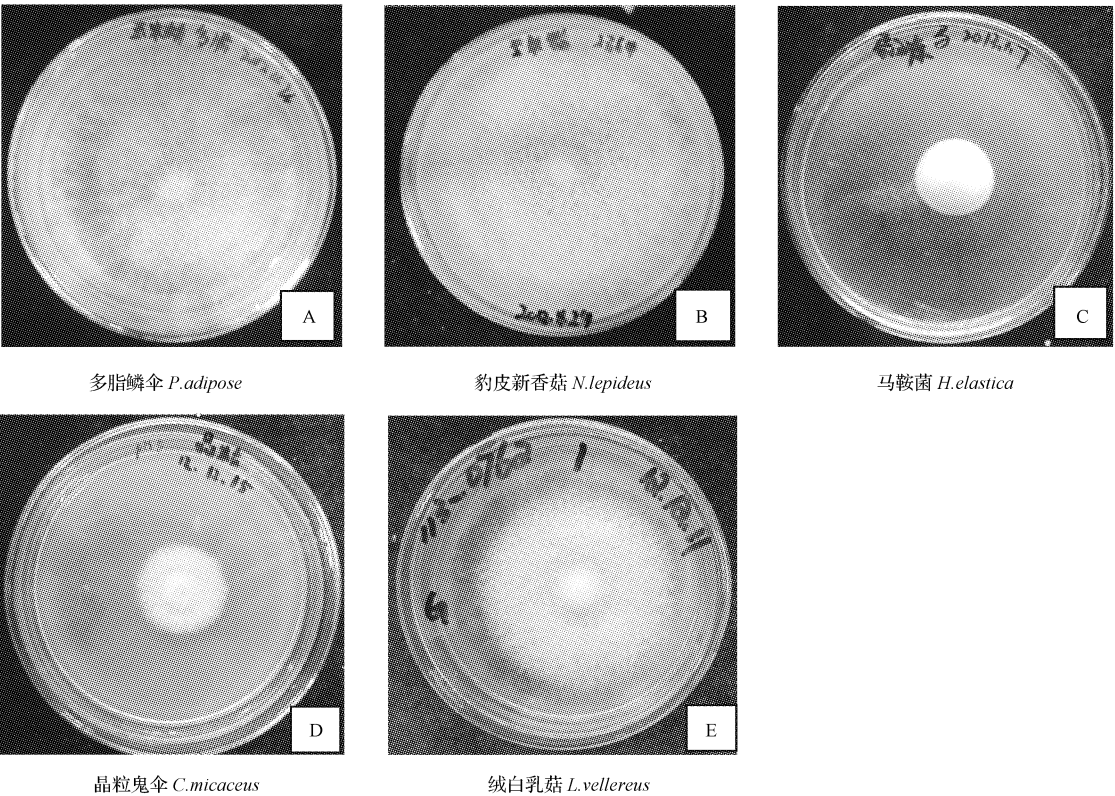


图 1 5 个菌株菌丝在适宜培养基上的生长情况

Fig. 1 The conditions of five strains grew on optimum media

表 6 不同 pH 值对 5 个菌株菌丝生长速度及生长势的影响

Table 6 Mycelium growth rate and vigor of five strains on media with different pH value

菌株 Strain	pH 值 pH value	菌丝生长速度	差异显著性		菌丝生长势
		Mycelium growth rate/(mm·d ⁻¹)	0.05	0.01	Mycelium growth vigor
多脂鳞伞 <i>P. adiposa</i>	5	6.50±0.06	a	A	++
	6	7.00±0.05	b	B	+++
	7	7.08±0.03	c	C	+++
	8	7.07±0.10	d	D	++
豹皮新香菇 <i>N. lepideus</i>	5	6.00±0.00	a	A	+
	6	4.33±0.06	b	B	+++
	7	2.58±0.13	c	C	+++
	8	1.68±0.03	d	D	++
马鞍菌 <i>H. elastica</i>	5	1.22±0.03	a	A	+++
	6	1.40±0.00	b	B	+++
	7	1.60±0.00	c	C	+++
	8	2.08±0.08	d	D	+++
晶粒鬼伞 <i>C. micaceus</i>	5	2.10±0.00	a	A	++
	6	1.63±0.06	b	B	+++
	7	1.93±0.03	c	C	+++
	8	1.60±0.00	d	D	++
绒白乳菇 <i>L. vellereus</i>	5	5.07±0.15	a	A	++
	6	2.93±0.06	b	B	+++
	7	3.67±0.08	c	C	+++
	8	5.98±0.03	d	D	++

为玉米粉 20 g,硝酸铵 2 g,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 3 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 5(图 1D);绒白乳菇的最适培养基为葡萄糖 20 g,蛋白胨 2 g,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 3 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 8,(图 1E)。

3 讨论与结论

菌种是菌物科学研究与生产的重要物质基础^[6],同

一种真菌对不同碳源、氮源或 pH 值等方面的适应特性均有所不同;不同真菌在同一种培养基的上生长表现也不相同;每一种真菌都有其最适的碳氮源和 pH 值。菌丝生长速度快慢与菌丝浓密程度无直接关系。

玉米粉、硝酸铵、pH 7 分别是多脂鳞伞菌丝生长的最佳碳氮源和 pH 值。蔗糖、硝酸铵、pH 6 分别是豹皮新香菇菌丝生长的最佳碳氮源和 pH 值;淀粉、尿素、pH 5 不适宜豹皮新香菇菌丝生长。葡萄糖、蛋白胨、pH 8 分别是马鞍菌菌丝生长的最佳碳氮源和 pH 值;淀粉、硝酸铵、pH 5 不适宜马鞍菌菌丝生长。在 12 种培养基上,晶粒鬼伞菌落边缘均整齐,均匀。玉米粉、硝酸铵、pH 5 分别是晶粒鬼伞菌丝生长的最佳碳氮源和 pH 值。在 12 种培养基上,绒白乳菇菌落边缘均整齐,均匀。因此,葡萄糖、蛋白胨、pH 8 分别是绒白乳菇菌丝生长的最佳碳氮源和 pH 值。

参考文献

[1] 阿历索保罗 C J,明斯 C W,布莱克韦尔 M. 菌物学概论[M]. 姚一建,李玉,译. 4 版. 北京:中国农业出版社,2002:2.
[2] 黄毅. 食用菌栽培[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2008:84-85, 89-90.
[3] 张金霞. 食用菌的品种菌种质量及其保持Ⅲ. 食用菌品种菌种(体)质量的保持[J]. 中国食用菌,1996,15(5):18-19.
[4] 冯志勇,王志强,郭力刚,等. 秀珍菇生物学特性研究[J]. 食用菌学报,2003,10(3):11-16.
[5] 蔡令仪,郭立刚,崔星明,等. 姬菇生物学特性的初步研究[J]. 食用菌学报,2002,9(4):47-49.
[6] Sanchez C. Modern aspects of mushroom culture technology [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2004,64:756-762.

Selection of Optimum Culture Conditions for Five Macrofungi Strains Collected from Heilongjiang

LI Dan,DAI Yue-ting,LI Yu

(Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi,Jilin Agricultural University,Changchun,Jilin 130118)

Abstract: Taking the collected five strains from Heilongjiang province, which were *Pholiota adiposa*, *Neolentinus lepideus*, *Helvella elastica*, *Coprinus micaceus*, *Lactarius vellereus* as the test materials, using the method of isolation fruitbody and obtained strains, through the method of observation, measurement and SPSS Statistics 17. 0, the effect of four different level of carbon sources, nitrogen sources and pH value on the mycelial growth rate and growth vigor were compared and studied. The results showed that each of the fungi had the most suitable carbon and nitrogen source and pH, culture media that suitable for five strains were selected seperately.

Keywords: macrofungi; strains; culture conditions