

四种无机盐对荷叶离褶伞菌丝生长的优化试验

张焱珍^{1,2}, 周会明^{1,2}, 魏生龙², 李巧红²

(1. 临沧师范高等专科学校 农学系, 云南 临沧 677000; 2. 河西学院 食用菌研究所, 甘肃 张掖 734000)

摘 要:以荷叶离褶伞菌株为试材, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 在 PDA 基础培养基上测定了 4 种无机盐及其正交组合对其菌丝生长的影响, 以期为其优质栽培提供理论依据。结果表明: 荷叶离褶伞菌丝萌发与生长的最适组合为 ZnSO_4 2.0 g/L、 MgSO_4 4.0 g/L、 KH_2PO_4 4.0 g/L、 FeSO_4 1.5 g/L; 高浓度的 ZnSO_4 、 MgSO_4 、 KH_2PO_4 以及 FeSO_4 对菌丝生长有抑制作用, 其中 MgSO_4 浓度 ≥ 10.0 g/L 时, 菌丝停止生长; 4 种无机盐协同作用对荷叶离褶伞菌丝生长影响的大小依次为 $\text{FeSO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{ZnSO}_4$; 各组合之间的菌丝生长速度差异极显著, 不同组合间有明显的交互作用, 最佳组合为 2.0 g/L ZnSO_4 + 6.0 g/L MgSO_4 + 6.0 g/L KH_2PO_4 + 1.0 g/L FeSO_4 。

关键词:无机盐; 荷叶离褶伞; 菌丝生长速度; 正交实验

中图分类号:S 646.19 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0135-04

荷叶离褶伞 (*Lyophyllum decastes*) 属离褶伞属 (*Lyophyllum*) 野生珍稀食、药两用菌, 其口感脆滑、形色悦目, 具有极高的营养价值^[1-2]、药用价值^[3-4]、经济价值和生态价值, 自古以来人们常把离褶伞菌称作“香在松口蘑, 美在玉蕈”, 国外学者研究报道了荷叶离褶伞的保健及药效, 充分阐明该菌是一种理想的保健、安全、绿色食品^[12-13]。筛选其菌丝生长的最优培养基对其人工栽培意义重大。研究人员已对该菌进行了生物学特性^[5]、营养条件^[6-9]、分类及研究进展^[10-11]等进行了初步的研究, 但荷叶离褶伞生物学转化率很低, 仅为 46%; 栽培周期很长, 一般在 150~180 d; 子实体长势差等问题严重影响了其推广。

影响食用菌生长发育的因素很多, 无机盐是重要因素之一^[14-15], 无机盐中 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等元素^[16-18] 尤为重要。该试验采用正交实验设计方法, 探索了 4 种无机盐对荷叶离褶伞菌丝生长的最优培养基, 并分析各无机盐对该菌菌丝生长的影响程度及之间的交互作用, 以期为其优质栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试荷叶离褶伞菌株由河西学院食用菌研究所提

第一作者简介:张焱珍(1986-), 女, 硕士, 助教, 研究方向为食用菌资源驯化与遗传。E-mail: 421154119@qq.com.

责任作者:魏生龙(1962-), 男, 教授, 研究方向为食用真菌。E-mail: glad-happy@163.com.

基金项目:甘肃省科技厅科技支撑资助项目(1104NKCG091)。

收稿日期:2013-11-13

供, 菌株编号为 1022。

供试基础培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 5 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验 按基础培养基配方, 配制 600 mL 培养基, 分装到 6 个 250 mL 三角瓶中, 每瓶 100 mL, 分别配置 ZnSO_4 浓度为 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L 的培养基。用同样的方法配制 MgSO_4 和 KH_2PO_4 浓度为 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 g/L 的培养基, FeSO_4 浓度为 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L 的培养基。封口, 121℃ 灭菌 30 min, 灭菌后趁热倒入直径为 90 mm 平板, 每瓶各倒 3 皿, 在无菌操作下, 将直径为 5 mm 事先活化并用打孔器处理过的菌饼接入平板中央, 置于 20℃ 培养箱中培养。测量菌丝生长量, 记录菌种萌发时间, 其中菌丝生长势以“+++”表示浓密健壮, “++”表示较浓密, “+”表示生长, “-”表示不生长。

1.2.2 正交实验 以无机盐 ZnSO_4 、 MgSO_4 、 KH_2PO_4 、 FeSO_4 为处理因素, 共设 3 个水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验(表 1)。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experimental

水平 Level	因素 Factor			
	A ZnSO_4 /g · L ⁻¹	B MgSO_4 /g · L ⁻¹	C KH_2PO_4 /g · L ⁻¹	D FeSO_4 /g · L ⁻¹
1	1.0	2.0	2.0	1.0
2	2.0	4.0	4.0	1.5
3	3.0	6.0	6.0	2.0

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同浓度 ZnSO_4 对荷叶离褶伞菌丝生长的影响

由表 2 可知,0.0~4.0 g/L 的 ZnSO_4 有利于荷叶离褶伞菌丝萌发,促进其营养菌丝生长;当浓度为 2.0 g/L

时,菌落圆形且完整,浓密,乳白色,萌发时间为 1 d,菌丝生长最快为 3.3 mm/d,与其它处理相比差异明显,培养皿长满时间为 13 d;浓度 ≥ 4.0 g/L 时,菌丝生长逐渐缓慢且受到抑制,萌发时间为 2 d,培养皿长满时间最长为 19 d。

表 2 不同浓度 ZnSO_4 对菌株 1022 生长发育的影响

Table 2 Effects of different concentration of ZnSO_4 on growth of strain No. 1022

浓度 Concentration/g · L ⁻¹	生长速度 Growth rate/mm · d ⁻¹	萌发时间 Germination time/d	菌落形态 Colony morphology	生长势 Growth vigour	颜色 Colour	长满时间 Overgrow time/d
0.0	2.7 cdC	2		+++		16
1.0	2.9 bcBC	2		+++		17
2.0	3.3 aA	1	圆形,较完整	++	乳白	13
3.0	3.1 abAB	1		+++		14
4.0	2.8 cdBC	1		+++		15
5.0	2.7 dC	2		+		19

注:同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平有显著差异;不同大写字母表示在 0.01 水平有极显著差异。下同。

Note: Different small letters behind the data in the same column mean significant difference at 0.05 level; different capital letters mean extremely significant difference at 0.01 level.

The same below.

2.1.2 不同浓度 MgSO_4 对荷叶离褶伞菌丝生长的影响

由表 3 可知,0.0~6.0 g/L 的 MgSO_4 有利于荷叶离褶伞菌丝萌发,促进其营养菌丝生长;当浓度为 4.0 g/L 时,菌落圆形且完整,浓密,乳白色,萌发时间为 1 d,菌丝生长

最快为 3.33 mm/d,与其它处理相比均差异极显著,培养皿长满时间为 13 d; MgSO_4 浓度 ≥ 6.0 g/L 时,菌丝生长逐渐缓慢且开始受到抑制,萌发时间达 2 d,培养皿长满时间最长为 23 d,浓度 ≥ 10.0 g/L 时,菌丝停止生长。

表 3 不同浓度 MgSO_4 对菌株 1022 生长发育的影响

Table 3 Effects of different concentration of MgSO_4 on growth of strain No. 1022

浓度 Concentration/g · L ⁻¹	生长速度 Growth rate/mm · d ⁻¹	萌发时间 Germination time/d	菌落形态 Colony morphology	生长势 Growth vigour	颜色 Colour	长满时间 Overgrow time/d
0.0	2.70 cC	2		+++		16
2.0	2.87 bB	1		++		14
4.0	3.33 aA	1	圆形,较完整	++	乳白	13
6.0	2.80 cC	2		+++		17
8.0	1.80 dD	2		+		23
10.0	—	4		—	浅黄	—

2.1.3 不同浓度 KH_2PO_4 对荷叶离褶伞菌丝生长的影响 由表 4 可知,0.0~8.0 g/L KH_2PO_4 有利于荷叶离褶伞菌丝萌发,促进其营养菌丝生长;当浓度为 4.0 g/L 时,菌落圆形且完整,浓密,乳白色,萌发时间为 1 d,菌丝

生长最快为 4.3 mm/d,与其它处理相比均差异极显著,培养皿长满时间为 12 d; KH_2PO_4 浓度为 8.0 g/L 时,菌丝生长逐渐缓慢,萌发时间达 2 d;浓度为 10.0 g/L 时,培养皿长满时间为 18 d,抑制菌丝生长。

表 4 不同浓度 KH_2PO_4 对菌株 1022 生长发育的影响

Table 4 Effects of different concentration of KH_2PO_4 on growth of strain No. 1022

浓度 Concentration/g · L ⁻¹	生长速度 Growth rate/mm · d ⁻¹	萌发时间 Germination time/d	菌落形态 Colony morphology	生长势 Growth vigour	颜色 Colour	长满时间 Overgrow time/d
0.0	2.7 dC	2		+++		16
2.0	3.6 bB	1		++		14
4.0	4.3 aA	1	圆形,较完整	++	乳白	12
6.0	3.0 cC	1		+++		15
8.0	2.9 cdC	2		+++		15
10.0	2.7 dC	2		+		18

2.1.4 不同浓度 FeSO_4 对荷叶离褶伞菌丝生长的影响

由表 5 可知,0.0~2.0 g/L 的 FeSO_4 有利于荷叶离褶伞菌丝萌发,促进其营养菌丝生长;当浓度为 1.5 g/L 时,菌落圆形且完整,浓密,乳白色,萌发时间为 1 d,菌丝

生长最快分别为 3.5 mm/d,与其它处理相比达到极显著水平,培养皿长满时间为 12 d;浓度为 2.5 g/L 时,菌丝生长逐渐缓慢且受到抑制,萌发时间达 2 d,培养皿长满时间为 15 d。

表 5 不同浓度 FeSO₄ 对菌株 1022 生长发育的影响

Table 5 Effects of different concentration of FeSO₄ on growth of strain No. 1022

浓度 Concentration	生长速度 Growth rate	萌发时间 Germination	菌落形态 Colony	生长势 Growth	颜色 Colour	长满时间 Overgrow
/g · L ⁻¹	/mm · d ⁻¹	time/d	morphology	vigour		time/d
0.0	2.7 cBC	2		+++		16
0.5	2.8 bcB	2		+++		15
1.0	3.1 bB	1		++		14
1.5	3.5 aA	1	圆形,较完整	++	乳白	12
2.0	2.9 bcB	1		+++		13
2.5	2.1 dC	2		+		15

2.2 正交实验结果

从表 6 可以看出,不同的无机盐及其正交组合对荷叶离褶伞菌丝生长的影响不同。各列极差大小顺序为 R₄>R₂>R₃>R₁,即试验因素的主次顺序为:D>B>C>A。各因素的最优水平为 2.0 g/L ZnSO₄、6.0 g/L MgSO₄、6.0 g/L KH₂PO₄、1.0 g/L FeSO₄。从表 7 可以看出,正交组合的 P=0.000<0.01,各组合之间的菌丝生长速度差异达到了极显著差异水平,说明不同组合有明显的交互作用,即最佳的组合为:2.0 g/L ZnSO₄、6.0 g/L MgSO₄、6.0 g/L KH₂PO₄、1.0 g/L FeSO₄。

表 6 正交实验结果

Table 6 The results of orthogonal test

试验号	因素 Factors				菌丝生长速度 Mycelial growth rate/mm · d ⁻¹
	A	B	C	D	
	ZnSO ₄ /g · L ⁻¹	MgSO ₄ /g · L ⁻¹	KH ₂ PO ₄ /g · L ⁻¹	FeSO ₄ /g · L ⁻¹	
1	1(1.0)	1(2.0)	1(2.0)	1(1.0)	0.3453
2	1	2(4.0)	2(4.0)	2(1.5)	0
3	1	3(6.0)	3(6.0)	3(2.0)	0.2893
4	2(2.0)	1	2	3	0.2370
5	2	2	3	1	0.3700
6	2	3	1	2	0.1780
7	3(3.0)	1	3	2	0.1670
8	3	2	1	3	0
9	3	3	2	1	0.3333
K ₁	0.6346	0.7493	0.5233	1.0486	
K ₂	0.7850	0.3700	0.5703	0.3450	
K ₃	0.5003	0.8006	0.8263	0.5263	
k ₁	0.2115	0.2498	0.1744	0.3495	
k ₂	0.2617	0.1233	0.1901	0.1150	
k ₃	0.1668	0.2669	0.2754	0.1754	
极差 Range R	0.0949	0.1436	0.1010	0.2345	
主次顺序					
Primary and secondary order			D>B>C>A		
优水平					
Excellent level	A ₂	B ₃	C ₃	D ₁	
优组合					
Excellent combination			A ₂ B ₃ C ₃ D ₁		

表 7 方差分析

Table 7 ANOVA

方差来源 Source	Ⅲ型的平方和 Type III sum of squares	自由度 Df	均方和 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
检验模型 Corrected model	0.471 ^a	10	0.047	42 417 036.800	0.000
截距 Intercept	1.229	1	1.229	1.106	0.000
重复 Repeat	2.222	2	1.111	1.000	0.390
正交组合 Quadratic combination	0.471	8	0.059	53 021 295.750	0.000
误差 Error	1.778	16	1.111		
总和 Total	1.700	27			
校正总和 Corrected total	0.471	26			

注:因变量为生长速度。

Note:Dependent variable was growth rate.

3 讨论

该试验结果表明,0~4.0 g/L ZnSO₄、0~6.0 g/L MgSO₄、0~8.0 g/L KH₂PO₄、0~2.0 g/L FeSO₄ 均有利于荷叶离褶伞菌丝萌发,促进其营养菌丝生长;当上述无机盐浓度分别≥4.0、6.0、10.0、2.5 g/L 时,菌丝生长逐渐缓慢且受到抑制。魏生龙等^[6]的试验结果表明,0.2、0.5、0.8 mg/mL ZnSO₄ 和 0.5 mg/mL FeSO₄ 促进菌丝生长;0.8、0.2 mg/mL FeSO₄ 对菌丝生长的影响不显著,10.0 g/L MgSO₄ 或 KH₂PO₄ 抑制菌丝生长。因此,该试验除 ZnSO₄、FeSO₄ 对该菌菌丝生长抑制的变异范围缩小外基本符合前人报道结果,且更加系统的阐述了 4 种无机盐对该菌菌丝生长特性影响范围,再次证实了高浓度无机盐不利于甚至抑制高等真菌菌丝的生长^[19-21]。

该试验首次采用正交分析的试验方法,研究 4 种无机盐对该菌菌丝生长的影响,结果表明无机盐对该菌菌丝生长影响的大小依次为 FeSO₄>MgSO₄>KH₂PO₄>ZnSO₄,最佳的组合为 2.0 g/L ZnSO₄+6.0 g/L MgSO₄+6.0 g/L KH₂PO₄+1.0 g/L FeSO₄,但单因素试验发现 2.0 g/L ZnSO₄、4.0 g/L MgSO₄ 或 KH₂PO₄、1.5 g/L FeSO₄ 为荷叶离褶伞菌丝萌发与生长的最适浓度。因此,正交实验与单因素试验结果不同,其中 MgSO₄、KH₂PO₄ 因与其它无机盐混合而对菌丝生长的促进作用减弱,且各组合之间的菌丝生长速度差异达到了极显著差异水平,这说明不同无机盐组合有明显的交互作用,类似的结果也同样在其它真菌中发生^[21]。在荷叶离褶伞栽培和生产中,说明该菌对无机盐的利用,尤其是对无机盐浓度大小的敏感性有所不同,应适当添加某些无机盐以达到高产、优质栽培的目的,但要注意控制添加浓度,还要考虑实施添加的具体方法与时机。对该菌进行制种和栽培时,对其培养基质的配制应加以区别。

该试验只用 4 种无机盐为因素, 仅用 1 株荷叶离褶伞菌株作为试验对象, 未涉及不同来源的相同品种, 同时多种无机盐之间对该菌菌丝生长的交互影响如何尚需进一步研究。适当添加无机盐, 可为其的高产、优质提供良好的基础和保障。

(致谢: 感谢中国著名大型真菌分类学家卯晓岚先生鉴定了标本, 深表谢意!)

参考文献

- [1] 席亚丽, 王治江, 王晓琴, 等. 荷叶离褶伞子实体、菌丝体和发酵液营养成分比较分析[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 155-157.
- [2] Pokhrel C P, Ohga S. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*[J]. Food Chemistry, 2007, 105(2): 641-646.
- [3] Miura T, Kubo M, Itoh Y, et al. Antidiabetic activity of *Lyophyllum decastes* in genetically type 2 diabetic mice[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(9): 1234-1237.
- [4] Ukawa Y, Furuichi Y, Kokean Y, et al. Effect of *Hatakesimeji* (*Lyophyllum decastes* Sing.) Mushroom on serum lipid levels in rats[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2002, 48(1): 73-76.
- [5] 王守现, 刘宇, 许峰, 等. 荷叶离褶伞菌株的 ITS 鉴定及生物学特性研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(28): 148-152.
- [6] 魏生龙, 于海萍, 连海丽, 等. 矿质营养与其他生长物质对荷叶离褶伞菌丝生长的影响[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 201-208.
- [7] 张春梅, 宋海, 魏生龙. 荷叶离褶伞菌丝体多糖的提取及还原力的研究[J]. 中国食用菌, 2012, 31(6): 44-48.
- [8] 张汉斌, 张芬琴, 王小明, 等. 荷叶离褶伞子实体营养成分分析与评价[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 696-700.
- [9] 张凤琴, 李彩霞, 李鹏, 等. 荷叶离褶伞可溶性多糖提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010(5): 224-225.
- [10] 汪小庆, 周德群, 张小雷, 等. 离褶伞属分类学研究概况[J]. 中国食用菌, 2013, 32(1): 1-3.
- [11] 李晓, 李玉. 中国离褶伞属真菌研究进展[J]. 食用菌学报, 2009, 16(3): 75-79.
- [12] Nakamura T, Itokawa Y, Tajima M, et al. Radioprotective effect of *Lyophyllum decastes* and the effect on immunological functions in irradiated mice[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2007, 27(1): 70-75.
- [13] Ukawa Y, Izumi Y, Ohbuchi T, et al. Oral administration of the extract from *Hatakesimeji* (*Lyophyllum decastes* Sing.) mushroom inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2007, 53(3): 293-296.
- [14] Rodriguez Estrada A E, Royse D J. Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(10): 1898-1906.
- [15] 吴郑武. 白灵菇栽培配方、 Cu^{2+} 及 Mn^{2+} 对其生长发育影响研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [16] Igamberdiev A U, Kleczkowski L A. Implications of adenylate kinase-governed equilibrium of adenylates on contents of free magnesium in plant cells and compartments[J]. Biochemical Journal, 2001, 360(1): 225-231.
- [17] Igamberdiev A U, Kleczkowski L A. Membrane potential, adenylate levels and Mg^{2+} are interconnected via adenylate kinase equilibrium in plant cells[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2003, 1607(2): 111-119.
- [18] 杨琴, 杜双田, 张桂香. 大肥蘑菇营养生理研究[J]. 食用菌学报, 2012, 19(3): 63-68.
- [19] 谢天娇. 杏鲍菇液体培养微量元素对其菌丝生物量的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(21): 10757-10758.
- [20] 吴秀珍, 王秋玲, 杜双田, 等. 无机盐、维生素及生长调节剂对斑玉蕈菌丝生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(3): 158-162.
- [21] 李盛旻, 王永宏, 王广耀. 不同矿质元素对褐口蘑菌丝体生长的影响[J]. 北方园艺, 2012(14): 166-167.

Optimization Test of Four Inorganic Salts on the Mycelia Growth of *Lyophyllum decastes*

ZHANG Yan-zhen^{1,2}, ZHOU Hui-ming^{1,2}, WEI Sheng-long², LI Qiao-hong²

(1. Department of Agronomy, Lincang Teachers' College, Lincang, Yunnan 677000; 2. Mushroom Research Institute, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000)

Abstract: Taking *Lyophyllum decastes* as material, effects of four inorganic salts and their orthogonal combination on the mycelial growth of *Lyophyllum decastes* were investigated by $L_9(3^4)$ orthogonal design on the PDA culture medium in this study, it could provide the theoretical basis of its high quality cultivation. The results showed that the best concentration on optical mycelia germination and growth of *Lyophyllum decastes* was ZnSO_4 2.0 g/L, MgSO_4 4.0 g/L, KH_2PO_4 4.0 g/L, FeSO_4 1.5 g/L. ZnSO_4 , MgSO_4 , KH_2PO_4 and FeSO_4 at high concentration could inhibit the mycelia growth, and mycelium could stop growth at a concentration of $\text{MgSO}_4 \geq 10$ g/L. The cooperative effects of four inorganic salts on the mycelial growth showed the impact order was $\text{FeSO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{ZnSO}_4$. Mycelial growth rate revealed that each combination had a highly significant difference and significant interaction. The best combination for the mycelia growth of *Lyophyllum decastes* was 2.0 g/L ZnSO_4 + 6.0 g/L MgSO_4 + 6.0 g/L KH_2PO_4 + 1.0 g/L FeSO_4 .

Key words: inorganic salts; *Lyophyllum decastes*; mycelial growth rate; orthogonal experiment