

药用真菌桑黄(*I. sanghuang*)母种培养基的筛选龚光禄¹, 桂 阳¹, 雷 震², 朱国胜¹

(1. 贵州省农作物品种资源研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州惠丰蚕业发展有限公司, 贵州 施秉 556200)

摘 要:以桑黄(*Inonotus sanghuang*)菌种为试材,采用 PDA 培养基为对照,设计 5 种不同的母种培养基,研究了不同培养基对桑黄菌丝生长的影响。结果表明:配方为木屑 100 g,马铃薯 100 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 10 g,水 1 000 mL,pH 自然,为桑黄母种最适的培养基。

关键词:桑黄;母种培养基;生长特性;筛选

中图分类号:Q 949.32 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)24-0139-03

桑黄主要分布于中美洲、非洲和东亚如中国、日本和韩国等地,在日本被称为 Meshimakobu 或 Mesima,在韩国被称为 Sang Hwang,在中国又称桑臣、桑耳或胡孙眼,中国传统中医中也有“松根”的别称^[1]。中文“桑黄”通常指的是针层孔菌属(*Phellinus* Quel.)里的火木层孔

菌(*Phellinus igniarius*)、裂蹄木层孔菌(*Phellinus linteus*)、鲍氏层孔菌(*Phellinus baumii* Pilat)3 个种^[2]。在整个东亚地区,桑黄被广泛用于疾病的预防和治疗,传统中医中,桑黄多用于治疗血崩、血淋、脐腹涩痛、脱肛泻血、带下、闭经等妇科疾病^[3]。现代科学研究表明桑黄具有很强的药用价值,很多成熟产品已经投放市场用于增强免疫力和防治癌症^[1]。

桑黄(*Inonotus sanghuang* Sheng H. Wu, T. hatt & Y. C. Dai)为 2012 年吴声华命名的世界新种,寄生于桑树上,其子实体菌盖多数叠生在一起,马蹄形或不规则形,幼时柠檬黄至金黄色,老时土黄色或黄棕色^[4]。2013 年课题组在贵州桑蚕区的老桑树上采集到了类似的菌株,经过鉴定为桑黄(*I. sanghuang*),为贵州的新记录种,并开展了一些列的研究。现着重对桑黄(*I. sanghuang*)

第一作者简介:龚光禄(1985-),男,硕士,研究方向为食药真菌。E-mail:gongguanglu0923@163.com.

责任作者:朱国胜(1971-)男,博士,研究员,研究方向为药用植物伴生菌及食药真菌。E-mail:zgshah@163.com.

基金项目:贵州省农业科技攻关资助项目(黔科合 NY 字[2012]3021 号);创新能力建设与专项计划资助项目(黔科合服企[2014]4006 号);贵阳市与省农科院农业科技合作资助项目(院地农科合字[2014]3 号)。

收稿日期:2016-08-04

[3] 刘淑琴,宫文超,李春燕. TTC 法细胞酶活力测试技术在北虫草选育中应用[J]. 食用菌,2005(2):12-13.

[4] 林清泉,丘雪红,郑壮丽,等. 蛹虫草退化菌株的特征研究[J]. 菌物学报,2010,29(5):670-677.

[5] 郭俊霞,李青苗,曾军秀,等. 不同来源北虫草菌种的比较研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(22):9229-9230.

[6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.

[7] 何国维,李伟光,王瑞雪,等. 利用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)测定细胞活力的方法与应用[J]. 军事医学,2014,38(5):388-391.

[8] 王立枫,许修宏,刘华晶,等. 黑龙江地区野生黑木耳菌种的指纹分析[J]. 东北农业大学学报,2011,4(2):109-114.

A Fast Test Means of *Auricularia auricular-judae* Hypha Activity in Laboratory

LI Hong, ZHANG Min, XIAO Qianming

(Microbial Engineering Center, Liaoning Academy of Agricultural Science, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: In order to improve *Auricularia auricular-judae* breeding efficiency and cost savings, TTC-dehydrogenase measurement was used to detect *Auricularia auricular-judae* mycelium vitality, and were verified by liquid submerged culture and cultivation test. The results showed that the TTC experiment conclusion with the liquid submerged culture and cultivation test conclusions were consistent, strain M10 cell vitality was the strongest, M14 strain cell vitality was the weakest, TTC-dehydrogenase measurement was proved to reliability. It provided a method of fast detection *Auricularia auricular-judae* mycelium activity in laboratory.

Keywords: TTC; dehydrogenase activity; *Auricularia auricular-judae*; hyphae activity

的母种培养基进行优化研究,为该菌株的驯化栽培、生理生化研究奠定基础。由于该菌株发现并正名较晚,关于其它桑黄菌株的相关研究较多^[5-7],而专门针对该菌株研究尚鲜见报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:桑黄(*Inonotus sanghuang*)采集于贵州施秉县蚕桑主产区古老的桑树上,经过 ITS 分析为 *Inonotus sanghuang* Sheng H. Wu, T. hatt & Y. C. Dai 菌株,现保藏于贵州省农作物品种资源研究所真菌研究室,编号为 GZAAS. PM03,该试验供试菌株由该研究室提供。

原材料:杂木屑购买于附件香菇生产场,桑树木屑为收集桑树枝丫或废弃的桑木,用切片粉碎机粉碎后直接使用,颗粒大小与购买的杂木屑一致。

PDA(CK):马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 10 g,水 1 000 mL;培养基 1:杂木屑 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 10 g,水 1 000 mL;培养基 2:桑树木屑 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 10 g,水 1 000 mL;培养基 3:杂木屑 100 g,桑树木屑 100 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 10 g,水 1 000 mL;培养基 4:桑树木屑 100 g,马铃薯 100 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 10 g,水 1 000 mL;培养基 5:杂木屑 100 g,马铃薯 100 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 10 g,水 1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基制作方法 按照上述的配方,先将木屑、土豆用沸水煮 30 min 后,6 层纱布过滤 2 次,添加其它配料混匀并用蒸馏水定容。121 °C,0.1 MPa 条件下,灭

菌 30 min,冷却到 60 °C 左右时,分别分装到预先灭菌直径为 90 mm 的平板中,每平板倒入量为 15 mL,平放冷凝备用。

1.2.2 接种与培养 先将供试桑黄菌种接到对照(CK)培养基平板上进行活化,待菌落直径达到 3~5 cm 时,再在平板上用打孔器打下直径为 5 mm 的菌饼,分别接种至不同的母种培养基平板上,以 CK 为对照。25~26 °C 恒温培养,每 6 h 观察 1 次菌丝的萌发情况,7 d 后观察菌丝的生长特性,并用十字交叉法测定菌落直径,计算菌丝生长速度。菌丝生长速度($\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$)=(菌落直径-菌饼直径)/培养时间/2,重复 3 次。

1.3 数据分析

利用 SPSS 19 统计分析软件,进行单因素试验差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养基中桑黄菌丝的生长特性

由表 1 和图 1 中桑黄菌丝在不同培养基中的菌丝密度、边缘整齐度、菌丝生长势及菌落颜色可知,在 3、4、5 号培养基上,菌丝生长稠密、边缘整齐、菌丝粗壮、菌落淡黄色;在 1 号培养基上,菌丝生长较稀、边缘较整齐、菌丝较细弱、菌落淡黄色;在 2 号培养基上,菌丝生长稠密、边缘整齐、菌丝较粗壮、菌落中间淡黄边缘白色;在 CK 培养基上,菌丝生长较稠、边缘整齐、菌丝粗壮、菌落淡黄色。综上,从菌丝生长特性方面来看,桑黄菌丝在 3、4、5 号培养中生长最好。

表 1 桑黄菌丝不同培养基中的生长特性

Table 1 The growth characteristics of *I. sanghuang* mycelia in different culture medium

培养基编号 Medium No.	菌丝密度 Mycelium density	边缘整齐度 Edge uniformity	菌丝生长势 Mycelium growth potential	颜色特征 Color feature
CK	较稠 Denser	整齐 Uniformity	粗壮 Haircheded	淡黄 Faint yellow
1	较稀 Relatively sparse	较整齐 More uniformity	较细弱 Gracility	淡黄 faint yellow
2	稠密 Dense	整齐 Uniformity	较粗壮 More haircheded	中间淡黄边缘白色 Center is light yellow and white edge
3	稠密 Dense	整齐 Uniformity	粗壮 Haircheded	淡黄 Faint yellow
4	稠密 Dense	整齐 Uniformity	粗壮 Haircheded	淡黄 Faint yellow
5	稠密 Dense	整齐 Uniformity	粗壮 Haircheded	淡黄 Faint yellow

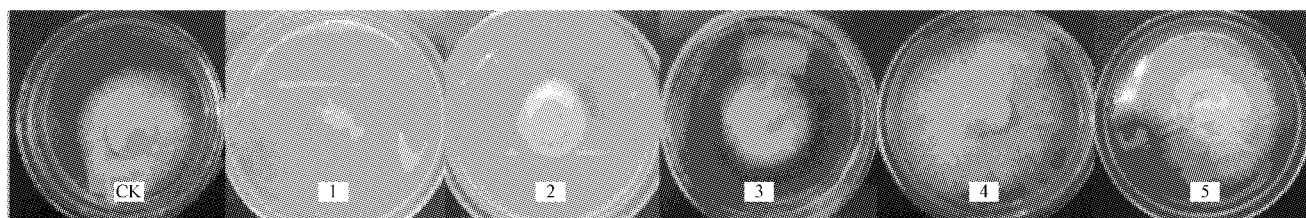


图 1 不同培养基中桑黄菌丝的生长特性(培养皿 90 mm,培养 7 d)

Fig. 1 Growth characteristics of *I. sanghuang* mycelia in different culture medium(90 mm culture dish,cultured for seven days)

2.2 不同培养基中桑黄菌丝的萌发情况及生长速度

由表 2 桑黄菌丝在不同母种培养基中的萌发时间

与生长速度可知,菌丝在 4、5 号培养基中的萌发速度较快,为 12 h,与 CK 一致;在 1、2、3 号培养基中的萌发较

慢,为 24 h。且菌丝平均生长速度大小依次为 $4>5>CK>3>2>1$ 。差异显著性检验结果表明,菌丝在 4 号培养基中的平均生长速度为 $5.70\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$,其次是与 5 号培养基,生长速度为 $4.93\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$,均显著高于 CK。因此,从菌丝萌发与生长速度方面来看,桑黄菌丝在 4、5 号培养基上的生长速度最快均可作为桑黄生长的最适培养基。

表 2 桑黄菌丝在不同培养基中的萌发时间及生长速度

Table 2 Germination and growth rate of *I. sanghuang* mycelia in different culture medium

培养基编号 Medium No.	萌发时间 Germination time/h	菌丝生长速度 Mycelium growth rate/(mm·d ⁻¹)				差异性 Difference analysis	
		1	2	3	均值 Mean	0.05	0.01
CK	12	3.5	3.1	3.6	$3.40\pm0.152\ 8$	b	C
1	24	1.8	1.2	1.5	$1.50\pm0.173\ 2$	c	D
2	24	2.1	1.5	1.4	$1.67\pm0.218\ 6$	c	D
3	24	2.8	3.1	2.8	$2.90\pm0.100\ 0$	b	C
4	12	5.7	6.2	5.2	$5.70\pm0.288\ 7$	a	A
5	12	5.1	4.8	4.9	$4.93\pm0.088\ 2$	b	B

3 结论与讨论

适合于菌丝生长的母种培养基不但要求菌丝生长特性优、速度快,还要求均一性高^[8]。由表 2 可知,4 号培养基的标准误差小,说明变异小均一性高^[9]。结合菌丝生长特性、菌丝生长速度、菌丝生长均一性综合分析可知,桑黄菌丝在含有木屑与马铃薯煮汁的培养基中萌发快,菌丝稠密、边缘整齐、粗壮、菌落淡黄色,且生长速度快、均一性高,4、5 号培养基均可作为桑黄母种培养的最佳选择。

对桑黄(*I. sanghuang*)菌株的驯化栽培与生理生化等相关研究,首先要进行母种培养基筛选试验,以保证母种的质量。而且在培养基筛选试验中,菌丝的生长特性也是鉴定环境是否合适的一个重要指标^[9]。因此,该

研究从菌丝生长特性、萌发情况、生长速度和均一性探讨了桑黄菌丝在不同母种培养基中的生产情况。结果表明,马铃薯煮汁能促进桑黄菌丝的生长,桑树木屑和杂木屑在培养基中起到后劲营养的作用,添加木屑可保持桑黄菌丝较强的活力,马铃薯和桑树木屑混合为桑黄菌丝生长最适培养基。且无论桑树木屑或杂木屑菌丝长势均显著优于对照组,培养基中起关键作用的为马铃薯,对木屑种类的需求不显著,因此桑黄菌丝生长最适培养基为木屑 100 g,马铃薯 100 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 10 g,水 1 000 mL,pH 自然。

该试验只以马铃薯、杂木屑、桑树木屑等为原料,设计了不同的培养基,进行桑黄母种培养基的初筛,得到的结果也只是在试验范围内的最优结果。对于究竟添加何种物质对菌丝生长的促进作用更大,添加的最适量为多少,以及以此制作的母种在栽培时,是否会表现出极强的产量优势,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王华林,温万芬. 桑黄的药用价值研究进展[J]. 时珍国医国药,2015,26(11):2747-2750.
- [2] 宋新华,吕英华,王建芳,等. 药用真菌桑黄的研究进展[J]. 蚕业科学,2009,35(1):204.
- [3] 宋力,孙培龙,徐双阳,等. 珍稀药用真菌桑黄的国内外研究进展[J]. 微生物学通报,2006,33(2):119.
- [4] 吴声华. 珍贵药用菌“桑黄”物种正名[J]. 食药菌,2012,20(3):177-179.
- [5] 张革红,刘文艳. 正交设计优化桑黄培养基的研究[J]. 新乡学院学报(自然科学版),2013,30(4):263-269.
- [6] XU Q. Optimizing of liquid medium formula about medicinal fungus *Phellinus igniarius*[J]. Journal of Microbiologie,2015,35(4):29-34.
- [7] 孙坚,张世义,薛峰,等. 桑黄原种栽培母培养基筛选研究[J]. 中国农业信息,2015(9):80-82.
- [8] 胥成浩,陈文强,邓百万. 裂褶菌母种培养基筛选研究[J]. 中国食用菌,2004,23(6):18-20.
- [9] 胡梅. 猪肚菇母种培养基的筛选[J]. 北方园艺,2012(18):176-178.

Selection of Mother Culture Media of Medicinal Fungus *Inonotus sanghuang*

GONG Guanglu¹, GUI Yang¹, LEI Zhen², ZHU Guosheng¹

(1. Guizhou Institute of Crop Germplasm Resources, Guiyang, Guizhou 550006; 2. Guizhou Huifeng Sericulture Development Co. Ltd., Shibing, Guizhou 556200)

Abstract: In this study, five different kinds of culture medium were designed to study the influence on the growth of *Inonotus sanghuang*. The results compared with PDA medium showed that the optimum culture medium formula were wood chips 100 g, potato 100 g, glucose 20 g, AGAR powder 10 g, 1,000 mL water, pH natural.

Keywords: *Inonotus sanghuang*; mother culture media; growth characteristics; selection