

小羊肚菌菌丝培养条件的研究

陶 热, 谭玉琴, 陈 晔, 樊有赋, 许明敏, 胡 浩

(九江学院 生命科学学院, 江西 九江 332000)

摘 要:对产自江西九江小羊肚菌人工栽培时不同培养基、不同碳源、不同氮源、不同碳氮比及不同酸碱度等生长条件进行了初步研究。结果表明:小羊肚菌最适宜的培养基为豆饼 200 g (煮汁), 玉米粉 5 g, 蔗糖 20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, NaNO_3 0.01 g, 酵母膏 0.5 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL; 小羊肚菌菌丝能利用多种碳、氮源, 其中以果糖为最佳碳源, 以 NH_4NO_3 和牛肉膏作为最佳氮源, 小羊肚菌菌丝生长的最适碳氮比为 20:1, 小羊肚菌菌丝培养的适宜 pH 为 6。

关键词:小羊肚菌; 菌丝; 营养; 培养条件

中图分类号:S 646.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)17-0183-05

小羊肚菌(*Morehella deliciosa* Fr.)属于盘菌目羊肚菌科羊肚菌属真菌, 又称为美味羊肚菌。味道鲜美, 具有益肠胃、助消化、化痰理气、补肾壮阳、提高人体免疫力等功效^[1-2]。目前, 国内外对羊肚菌(*M. esculent*)、黑脉羊肚菌、尖顶羊肚菌、粗柄羊肚菌的栽培条件已进行了广泛的研究^[3-12], 但对小羊肚菌栽培条件的研究较少。现对小羊肚菌菌丝生长条件进行研究, 以期为开发利用这一珍稀食用菌资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:2010年5月于九江市南湖公园采得野生小羊肚菌子实体, 通过组织分离获得纯化菌株。

1.2 试验方法

1.2.1 不同培养基筛选试验 培养基 1:马铃薯 200~250 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL。培养基 2:黄豆芽 500 (煮汁), 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 1 g, 水 1 000 mL。培养基 3:栋木屑 500 g (煮汁), 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL。培养基 4:蛋白胨 1 g, 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 1 g, VB 11 g, 酵母膏 1 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL。培养基 5:马铃薯 200~250 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蛋白胨 0.5 g, 牛肉膏 0.5 g, 水 1 000 mL。培养基 6:豆饼 200 g (煮汁), 玉米粉 5 g, 蔗糖 20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, NaNO_3 0.01 g, 酵母膏 0.5 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL。培养基 7:马铃薯 200~250 g, 玉米粉 5 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL。常规方法灭菌, 接入活化菌丝,

置于 25℃ 培养箱中培养, 每天观察 1 次, 记录每天菌丝的生长量, 共观察记录 5 d。10 次重复, 取平均值。

1.2.2 碳源试验 基础培养基:马铃薯 200~250 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 1 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL。以基础培养基 20 g 的葡萄糖的含碳量为准, 分别用相等含碳量的果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、红糖、可溶性淀粉代替基础培养基中的葡萄糖。其余操作步骤同不同培养基试验。

1.2.3 氮源试验 以基础培养基 1 g 的蛋白胨的含氮量为准。分别用相等含氮量的 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、 NaNO_3 、大豆粉、酵母膏、牛肉膏代替基础培养基中的蛋白胨。其余操作步骤同不同培养基试验。

1.2.4 C/N 比试验 在基础培养基中添加不同重量的蛋白胨(蛋白胨含碳量忽略不计)配成碳氮比为 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1 的培养基。其余操作步骤同不同培养基试验。

1.2.5 pH 值试验 在基础培养基中, 用 1 mol/L 盐酸和 1 mol/L 氢氧化钠调节培养基 pH 值至 4、5、6、7、8、9。其余操作步骤同不同培养基试验。

1.3 数据处理

对试验数据用 Spss13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 小羊肚菌形态特征

由图 1、2 可知, 小羊肚菌形态特征:子囊果较小, 高 4~10 cm。菌盖圆锥形, 高 1.7~3.3 cm, 直径 0.8~1.5 cm, 凹坑往往长圆形, 浅褐色, 棱纹常纵向排列, 有横脉相互交织, 色交凹坑, 边缘与菌盖连接一起。菌柄长 2.5~6.5 cm, 粗 0.5~1.8 cm, 近白色至浅黄色, 基部往往膨大且有凹槽。子囊近圆柱形, (300~350) $\mu\text{m} \times (16\sim25) \mu\text{m}$ 。子囊孢子单行排列, 椭圆形, (18~20) $\mu\text{m} \times (10\sim11) \mu\text{m}$ 。侧丝有分隔或分枝, 顶

第一作者简介:陶热(1966-), 男, 副教授, 现主要从事生物资源开发利用的研究工作。E-mail:jjtao66@126.com。

基金项目:江西省教育厅科技资助项目(GJJ08438)。

收稿日期:2011-05-24

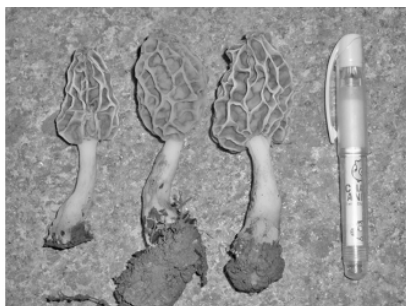


图1 小羊肚菌子实体

Fig.1 Sporocarp of *Morehella deliciosa* Fr.

图2 小羊肚菌母种菌丝

Fig.2 Mother culture mycelium of *Morehella deliciosa* Fr.

端膨大,粗(11~15) μm 。主要生长在稀疏林地上,主要分布在甘肃、山西、福建等地区^[2]。

2.2 不同培养基对小羊肚菌菌丝生长的影响

由图3、4可知,小羊肚菌菌丝在各培养基配方上都有菌丝密度、颜色和长势的变化,与对照相比,培养基配方5、6菌丝浓密,菌丝颜色深黄褐色,长势强,边缘整齐;培养基配方2、7菌丝较密,菌丝颜色黄褐色,长势较好,边缘较整齐;培养基配方3、4菌丝较稀疏,菌丝颜色浅黄褐色,长势较差,边缘不整齐。由于羊肚菌在7种培养基生长速度各不相同,由此可见,配方6:豆饼200 g(煮汁),玉米粉5 g,蔗糖20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, NaNO_3 0.01 g,酵母膏0.5 g,琼脂20 g,水1 000 mL,为小羊肚菌最适宜的培养基。吴韶菊^[6]对粗柄羊肚菌固体培养基的筛选研究,结果表明:配方为玉米粉20 g,蛋白胨1 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g,琼脂20 g,水1 000 mL的玉米粉培养基是适合羊肚菌商业化批量生产的培养基。黄冕^[7]等对尖顶羊肚菌母种培养基的筛选研究,结果表明:胡萝卜200 g,黄豆粉20 g,蔗糖20 g, MgSO_4 1 g, KH_2PO_4 1 g,维生素B 0.1 g,琼脂20 g。加水1 000 mL的胡萝卜黄豆粉培养基上培养,可缩短制种周期,获得质量较高的母种,由此可知,不同羊肚菌在不同培养基上菌丝生长皆有差异。

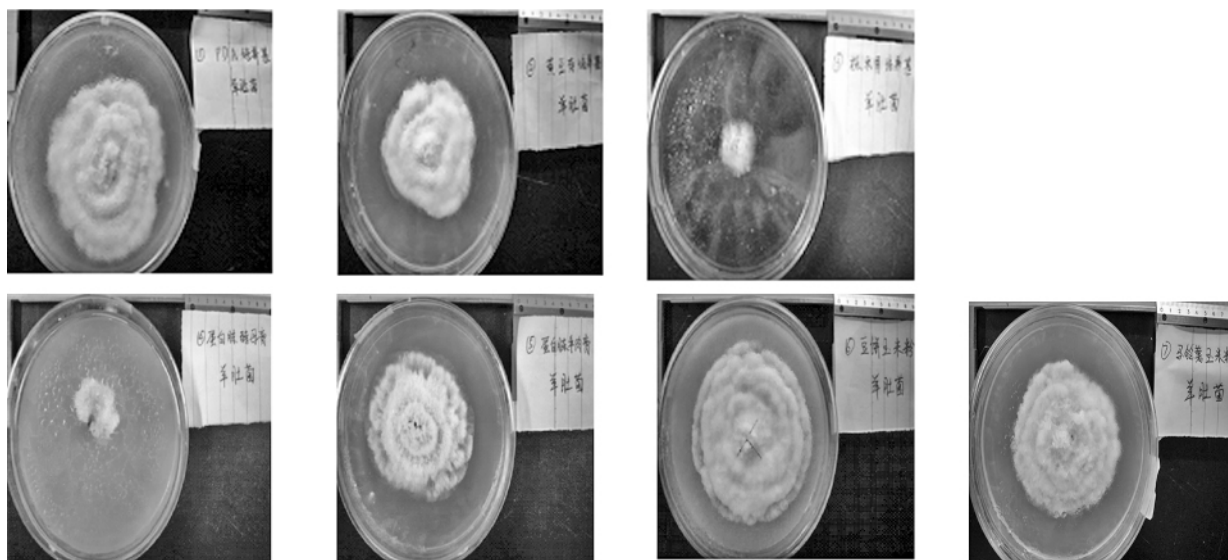


图3 不同培养基对小羊肚菌菌丝生长的影响

Fig.3 Effect of different media on growth of mycelium

2.3 不同碳源对小羊肚菌菌丝的生长影响

碳素是真菌最重要的营养,它不仅是碳水化合物和蛋白质的基本组成元素,同时,又是重要的能量来源。研究表明小羊肚菌菌丝对不同碳源的选择性比较敏感,从表1、图5可知,小羊肚菌菌丝对单糖的利用以果糖为最好,菌丝长势好、色白、菌丝致密,而对葡萄糖利用一般。对二糖中的红糖也都能很好的利用,对蔗糖和乳糖较差,对麦芽糖利用萌发快,但长势一般,且

菌丝生长稀疏,这可能是红糖的化学成分较复杂等原因,对可溶性淀粉、玉米粉利用一般,对甘露醇的利用最差。由此可知,小羊肚菌菌丝对单糖利用比二糖要好,对碳素利用是果糖>红糖>麦芽糖>蔗糖>乳糖>可溶性淀粉>葡萄糖>玉米粉>甘露醇。因此,小羊肚菌菌丝生长的最佳碳源为果糖。杨芳等^[13]利用红糖、白糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、葡萄糖8种不同的碳源对4种不同来源的羊肚菌进行培养

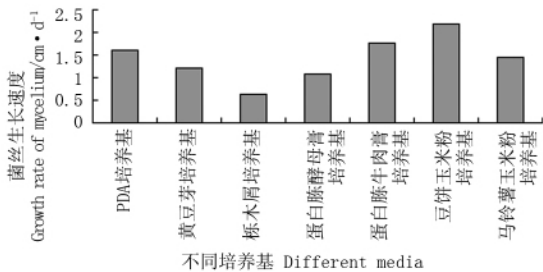


图 4 小羊肚菌菌丝在不同培养基上的生长趋势

Fig. 4 The growth tendency of *Morehella deliciosa* Fr. on different media

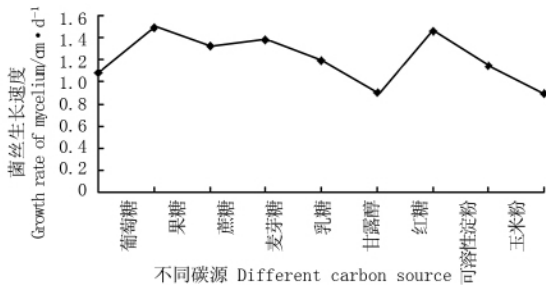


图 5 不同碳源对菌丝生长影响

Fig. 5 Effects of carbon source on growth of mycelium

研究,结果表明,适合北京羊肚菌生长的最佳碳源是蔗糖,适合武汉羊肚菌生长的最佳碳源是可溶性淀粉,适合山东羊肚菌生长的最佳碳源是白糖,适合淮阴羊肚菌生长的最佳碳源是可溶性淀粉;王泽清等^[4]对产自云南丽江的粗腿羊肚菌人工栽培条件研究,粗腿羊肚菌菌丝能利用多种碳源,其中以可溶性淀粉和麦芽糖作为最佳碳源;熊春菊等^[9]尖顶羊肚菌菌丝培养研究,碳源以葡萄糖最佳。说明不同产地羊肚菌生长对碳素利用是不同,可能与各地生长环境有关。

表 1 不同碳源对菌丝生长影响

Table 1 Effects of carbon source on growth of mycelium			
碳源 Carbon source	菌落生长速度 Mycelial growth rate/mm · d ⁻¹	菌丝生长势 Mycelial growth vigor	菌丝致密度 Hyphae density
葡萄糖	4.83	+	稀疏松散
果糖	5.80	++++	致密
蔗糖	4.4	+++	较致密
麦芽糖	4.9	+++	较致密
乳糖	3.98	++	稀疏
甘露醇	3.81	+	稀疏松散
红糖	5.73	++++	致密
可溶淀粉	4.27	++	稀疏
玉米粉	3.42	+	稀疏松散

注:++++表示菌丝生长势强、生长茂盛、厚实浓密;+++表示菌丝生长势较强、较密;++表示菌丝生长势较弱、稀疏;+表示菌丝势弱、薄而稀疏,下同。
Note: '++++' express growth potential of mycelium is strong, exuberance, thick and dense; '+++' express growth potential of mycelium is relatively strong, thick; '++' express growth potential of mycelium is relatively weak, thin; '+' express growth potential of mycelium is weak, thin and sparse, the same below.

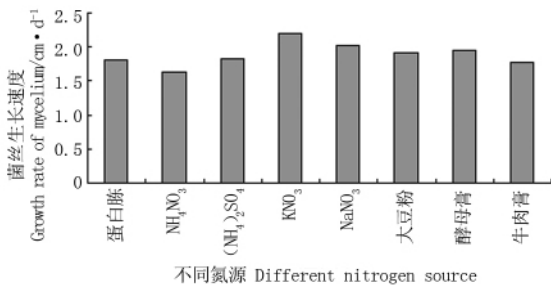


图 6 不同氮源对菌丝生长影响

Fig. 6 The different nitrogen source on growth of mycelium

2.4 不同氮源对小羊肚菌菌丝的生长影响

氮素是真菌合成蛋白质、核酸的必要原料,对菌丝的生长发育至关重要。选择 7 种原料作氮源比较,结果表明,小羊肚菌菌丝在供试的 7 种不同氮源培养基中生长差异较大(图 6)。小羊肚菌菌丝在有机氮源培养基比无机氮源培养基长势较好,菌丝致密,绒毛状,边缘整齐,气生菌丝不强,爬壁能力强,其中在牛肉膏培养基中菌丝长较好,其次为蛋白胨,酵母膏较差。在 4 种无机氮源培养基中,NH₄NO₃菌丝生长最好,其次为(NH₄)₂SO₄,NaNO₃,KNO₃,菌丝长势较差。因此,小羊肚菌菌丝生长的最佳氮源为 NH₄NO₃和牛肉膏。杨芳等^[13]利用 8 种不同的氮源对 4 种不同来源的羊肚菌进行培养的研究,结果表明,适合北京羊肚菌生长的最佳氮源是豆粕粉,适合武汉羊肚菌生长的最佳氮源是蛋白胨,适合山东羊肚菌生长的最佳氮源是鱼粉,适合淮阴羊肚菌生长的最佳氮源是豆粕粉;王泽清等^[4]对产自云南丽江的粗腿羊肚菌人工栽培条件研究,粗腿羊肚菌菌丝能利用多种氮源,其中以硝酸钾或硝酸铵作为最佳氮源。说明不同产地羊肚菌生长对氮素利用也不同。

表 2 不同氮源对小羊肚菌菌丝生长影响

Table 2 Effects of nitrogen source on growth of mycelium			
氮源 Nitrogen source	菌落生长速度 Mycelial growth rate/mm · d ⁻¹	菌丝生长势 Mycelial growth vigor	菌丝致密度 Hyphae density
蛋白胨	3.81	++	稀疏
酵母膏	2.92	+	稀疏松散
牛肉膏	4.83	+++	致密
硝酸铵	5.23	++++	很致密
硫酸铵	4.1	+++	致密
硝酸钾	2.47	++	稀疏松散
硝酸钠	3.12	+	稀疏

2.5 不同 C/N 比对小羊肚菌菌丝的生长影响

培养基中各营养物质之间的浓度配比也直接影响真菌菌丝的生长繁殖,其中碳氮比(C/N)的影响较大,碳氮比(C/N)还影响着真菌的活力、寿命。由表 3 可看出,当碳氮比为 10:1 时,菌丝长势较好,边缘整齐整

齐,菌丝较致密;碳氮比为 20:1 时,菌丝生长势强,生长茂盛,边缘整齐,菌丝厚实浓密,生长速度快;碳氮比为 30:1,菌丝长势较差,边缘较整齐,菌丝较致密,但生长速度较快;碳氮比为 (40:1)~(60:1),菌丝长势较差,边缘不整齐,但菌丝较致密,生长速度较快;碳氮比为

(70:1)~(80:1),菌丝长势较差,边缘不整齐,菌丝稀疏,生长速度慢。因此,综合来看,小羊肚菌菌丝生长的最适碳氮比为 20:1。熊春菊等尖顶羊肚菌菌丝培养研究,碳氮比以 (30~40):1 最佳。

表 3 不同 C/N 比对小羊肚菌菌丝的生长影响

Table 3 Effects of different carbon and nitrogen in on growth of mycelium

C/N	菌丝形态色泽	菌丝长势	菌丝密度	菌丝生长速度
Hyphae form	Hyphae grew	Hyphae density	Mycelial growth rate	Growth rate of mycelium/mm · d ⁻¹
10:1	圆形绒毛状白色	+++	较密	2.97
20:1	圆形绒毛状白色	++++	厚实浓密	4.12
30:1	圆形绒毛状白色	++++	较密	3.32
40:1	圆形绒毛状白色	++++	较密	2.98
50:1	圆形绒毛状白色	++++	较密	2.67
60:1	圆形绒毛状白色	++	薄	2.08
70:1	圆形绒毛状白色	+	稀薄	1.19
80:1	圆形绒毛状白色	+	稀薄	1.15

2.6 不同 pH 值对小羊肚菌菌丝的生长影响

小羊肚菌菌丝生长对 pH 值的适应范围较广,试验中 pH 值 4~9 内菌丝均可生长,但生长速度有明显差异。当 pH 值为 6 时菌丝生长最快,日生长量达到 3 mm。当 pH 值大于 7 时,菌丝生长速率随 pH 值增大而减小(图 7)。说明小羊肚菌菌丝适宜在中性偏酸环境下生长。张松等^[8]对尖顶羊肚菌液体培养基与条件的研究,结果表明,尖顶羊肚菌生长最适 pH 值为 6;陈易飞等^[14]对苏州产羊肚菌菌丝体在 PDA 培养基上的生长速度、粗壮程度、基内菌丝的分枝角,菌核的产生同 pH 之间的关系,指出其生长所需的 pH 为 3.5~10,最适 pH 为 7.7,说明羊肚菌菌丝适宜在中性偏碱环境下生长。

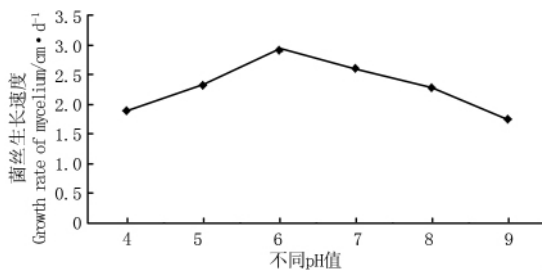


图 7 pH 值对小羊肚菌菌丝生长的影响

Fig. 7 Effects of pH value on growth of mycelium

3 结论

试验表明,小羊肚菌最适宜的培养基为豆饼 200 g (煮汁),玉米粉 5 g,蔗糖 20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, NaNO_3 0.01 g,酵母膏 0.5 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL。小羊肚菌菌丝对单糖利用比二糖要好,小羊肚菌菌丝生长的最佳碳源为果糖,最佳氮源为 NH_4NO_3 和牛肉膏;小羊肚菌菌丝碳氮比 (20:1)~

(40:1) 的培养基中菌丝生长量无显著差异,但在 20:1 中菌丝生长速度最快,菌落完整,菌丝洁白浓密,健壮整齐,因此,认为小羊肚菌菌丝生长的最适碳氮比为 20:1;小羊肚菌菌丝适宜在中性偏酸环境下生长,菌丝培养的适宜 pH 值为 6。有关小羊肚菌的人工栽培技术有待进一步研究。

参考文献

- [1] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学技术出版社, 1979: 238.
- [2] 兰进, 曹文琴. 中国羊肚菌属真菌资源[J]. 资源科学, 1999, 21(2): 56-61.
- [3] 陈芝兰, 张培平. 黑脉羊肚菌菌丝的栽培条件[J]. 食用菌, 2004, 26(6): 6-7.
- [4] 王泽清, 徐中志. 粗腿羊肚菌菌丝栽培条件研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(1): 149-152.
- [5] 王广耀, 蒋晓成, 程枯. 羊肚菌菌种分离及母种培养基的筛选[J]. 北方园艺, 2009(9): 211-212.
- [6] 吴韶菊. 羊肚菌固体培养基的筛选[J]. 北方园艺, 2009(3): 216-218.
- [7] 黄冕, 张松. 尖顶羊肚菌母种培养基的筛选[J]. 食用菌, 2007, 29(6): 32-32.
- [8] 张松, 夏艳红. 羊肚菌菌丝栽培条件研究[J]. 食用菌学报, 2002, 9(1): 18-21.
- [9] 熊春菊, 赵琪, 徐中志. 尖顶羊肚菌菌丝培养研究[J]. 现代农业科技, 2009(8): 13-14.
- [10] 陆娜, 王伟科, 闫静. 野生羊肚菌培养研究初报[J]. 杭州农业与科技, 2008(5): 35-37.
- [11] 张松. 羊肚菌液体菌种培养配方的研究[J]. 食用菌, 1996, 18(3): 15.
- [12] 杨芳, 王新风, 朱骏. 肋脉羊肚菌液体培养条件的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 280-283.
- [13] 杨芳, 王新风, 李刚, 等. 不同碳、氮源对羊肚菌生长与胞内多糖的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 396-400.
- [14] 陈易飞, 郭益红. 温度、pH 对羊肚菌菌丝体生长的影响[J]. 苏南科技开发, 2007(8): 28-29.

(该文作者还有潘丽辉, 单位同第一作者)。

黄伞种质资源遗传多样性的 RAPD 分析

瞿惠君, 刘连强, 周永斌, 张志军, 魏雪生

(天津市林业果树研究所, 天津 300384)

摘要:利用 RAPD 分子标记技术对 9 个黄伞菌株进行遗传多样性分析。结果表明:RAPD 技术是准确评估黄伞遗传多样性的有效方法。50 条 RAPD 引物中筛选出 8 条多态性引物,共检测出 226 条带,其中多态性条带 143 条,多态率为 63%。菌株之间遗传相似系数(GS)变幅范围为 0.6181~0.9306,平均 GS 值为 0.746,表明黄伞遗传变异较丰富。聚类分析结果表明,在相似系数 0.763 处可将 9 个黄伞菌株划分为 4 类。

关键词:黄伞;种质资源;遗传多样性;随机扩增多态性 DNA(RAPD)

中图分类号:S 759.8 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2011)17-0187-03

黄伞(*Pholiota adiposa* (Fr.) Quél.) 属球盖菇科鳞伞属,又名多脂鳞伞或肥鳞伞^[1],其子实体菌肉肥厚、营养丰富,菌盖表面有一层粘液,是一种核酸物质,具有恢复人体精力和脑力的特殊作用,从中提取的多糖具有强烈抗癌活性,是一种药膳同功的珍稀食用菌^[2-3]。野生黄伞在我国分布广泛,尤以北方地区常见,每年春季 5~6 月和秋季 8~10 月生长于杨、柳及桦等倒木或枯枝上^[4]。目前国内对黄伞的研究主要停留在野生驯化、生物学特性及人工栽培技术等方面,对黄伞种质资源分类和鉴定研究未见报道。

RAPD 是分子标记中比较方便、快捷的标记方法,仅用 10 bp 左右的引物就可以对整个基因组进行标记,而且多态性较高,呈显性遗传。现以 9 个黄伞菌株为材

料,采用 RAPD 技术对其遗传多样性及亲缘关系进行分析,为黄伞种质鉴定、资源保护和育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:Pa-1、2、3 为天津野生黄伞组织分离获得,Pa-4、5、6 购于福建三明市真菌研究所,Pa-7 购于江苏江都天达公司,Pa-8 购于湖北华中农业大学,Pa-9 购于北京吉蕈公司。菌株编号顺序为 1~9。供试培养基及试剂:PDA 固体培养基,PDM 液体培养基, λ -Hind III、digest DNA Marker 购自鼎国生物公司;Taq 酶、10xbuffer、MgCl₂、dNTPs 为 TaKaRa 公司产品,随机引物为上海生工公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝液体培养及收集 将活化后的供试菌株分别接种于含有 100 mL 无菌 PDM 液体培养基的 250 mL 三角瓶内,25℃ 恒温、150 r/min 摇床培养 10 d,用 2 层纱布过滤,蒸馏水冲洗干净后收集菌丝体,

第一作者简介:瞿惠君(1971-),女,天津人,硕士,助理研究员,现主要从事食用菌育种及栽培研究工作。

基金项目:天津市农业科学院院长基金资助项目(06008)。

收稿日期:2011-06-08

Study on Culture Conditions for Mycelium of *Morehella deliciosa*

TAO Re, TAN Yu-qin, CHEN Ye, FAN You-fu, XU Ming-min, HU Hao, PAN Li-hui

(College of Life Science, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000)

Abstract: Effects of culture medium, carbon sources, nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and pH on mycelium growth of cultivated *Morehella deliciosa* produced from Jiujiang in Jiangxi were studied. The results showed that the optimum culture medium was bean cake 200 g (boiled), corn flour 5 g, sucrose 20 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, NaNO₃ 0.01 g, yeast extract 0.5 g, agar 20 g and water 1 000 mL. Various carbon sources and nitrogen sources could be used by *Morehella deliciosa*. Among them, the best carbon sources was fructose, and the best nitrogen sources was NH₄NO₃ and beef paste. The optimum carbon to nitrogen ratio was 20:1. The mycelia of *Morehella deliciosa* were fitting to grow in neutral to low acid conditions, and the optimum pH was 6.

Key words: *Morehella deliciosa*; mycelium; nutrition; culture conditions