

DOI:10.11937/bfyy.201521039

一株野生灰树花菌丝体液体培养基正交方法筛选

刘 西 周

(天津师范大学 蕈菌研究所,天津市动植物抗性重点实验室,天津 300387)

摘 要:以 1 株野生灰树花菌株为试材,采用正交实验设计法,研究了不同液体培养基对其菌丝体生物量的影响。结果表明:其最适配方为蔗糖 25 g/L、玉米粉 25 g/L(浸提液)、麦麸 20 g/L(浸提液)、酵母粉 2 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g/L、 KH_2PO_4 5 g/L、维生素 B_1 0.030 g/L、pH 自然,24℃ 培养静置培养 10 d,其菌丝生物量为 10.41 g/L。

关键词:灰树花;液体培养基;正交设计;生物量

中图分类号:S 646.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0152-03

灰树花(*Grifola frondosa*)属担子菌纲多孔菌目多孔菌科,又名贝叶多孔菌,多生长在海拔 800~1 400 m 的阔叶林下或栗树周围,喜温暖和潮湿环境。子实体呈莲花形,有柄,分枝,高 9~18 cm,宽 2~8 cm,幼嫩时呈灰白色,成熟后为灰白色或灰褐色,菌盖扇形,肉质,边缘薄而稍内卷,表面有细毛,老后光滑呈放射状条纹,菌孔面白色至淡黄色,管口多角形。孢子无色透明,表面光滑,卵圆形,具有较高的食药价值^[1-2]。研究发现其具有抗肿瘤、抗 HIV 病毒作用、免疫调节作用、治疗肝炎

作用、抗辐射,调节血脂,降血压,降血糖,改善脂肪代谢等功能^[3-5]。该试验以天津蓟县地区野生灰树花为试验材料,进行液体培养基筛选研究,以探索其适宜的生长条件,为天津地区野生灰树花种质资源研究、开发、利用提供有益支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株分离于天津蓟县,菌种保藏于天津师范大学蕈菌研究所。

PDA 综合培养基(M/V)^[6]:马铃薯 200 g/L(浸提液),棉籽皮 200 g/L(浸提液),琼脂 18 g/L,葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L,维生素

作者简介:刘西周(1984-),男,硕士,助理实验师,研究方向为蕈菌设施化培植与植物组织培养。E-mail:fusant@126.com.

收稿日期:2015-07-27

参考文献

- [1] 陈土瑜. 食用菌生产大全[M]. 北京:中国农业出版社,1988.
[2] 冯伟林,蔡为明,金群力,等. 秀珍菇菌株主要农艺性状比较及 ISSR

分子标记鉴定[J]. 食用菌学报,2014,21(2):14-18.

- [3] 黄志龙,肖淑霞,上官舟建. 杏鲍菇优良菌株筛选及配套标准化栽培技术[J]. 食用菌,2008(2):25-27.

Study on Identification of Produce *Pleurotus eryngii* Quel by ISSR Molecular Marker

LU Na,ZHOU Zufa,WANG Weike,SONG Jiling,YUAN Weidong,YAN Jing

(Bacteria Station, Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310024)

Abstract: With 15 *Pleurotus eryngii* Quel varieties as test materials, using ISSR molecular marker identification method, 32 ISSR primers were screened from 52 ISSR primers and the DNA was amplified by PCR, the DNA sequence polymorphism was analyzed; at the same time, the varieties of mycelial growth and yield were compared. The results showed that mycelial growth rate and yield did not exhibit the characteristics of each group, the effect of mycelial growth rate and yield were more susceptible to environmental conditions and dominant or recessive gene; reference strains of genetic similarity coefficient of variation ranged 0.64—0.98. Using the UPGMA analysis showed that, in 0.87 at 15 *Pleurotus eryngii* Quel varieties were divided into five types.

Keywords: *Pleurotus eryngii* Quel; ISSR; mycelial growth rate; yield

B₁ 0.004 g/L, pH 自然。

碳源初选培养基: 蛋白胨 4 g/L、KH₂PO₄ 3 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g/L、维生素 B₁ 微量, 分别以葡萄糖 20 g/L、蔗糖 20 g/L、麦芽糖 15 g/L、玉米渣 20 g/L(浸提液)、马铃薯 200 g/L(浸提液)为供试碳源, pH 自然, 分装于 100 mL 锥形瓶中, 每瓶 50 mL, 3 次重复, 加 6 层纱布通气塞后, 0.12 MPa 灭菌 20 min, 备用。

氮源初选培养基: 葡萄糖 20 g/L、KH₂PO₄ 3 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g/L, 分别以蛋白胨 2 g/L、酵母粉 2 g/L、牛肉膏 4 g/L、麦麸 40 g/L(浸提液)、(NH₄)₂SO₄ 5.85 g/L、NH₄NO₃ 0.85 g/L 为供试氮源, pH 自然, 分装于 100 mL 锥形瓶中, 每瓶 50 mL, 3 次重复, 加纱布通气塞后, 0.12 MPa 灭菌 20 min, 备用^[7]。

1.2 试验方法

1.2.1 碳氮源培养基的筛选 将菌种提前 4 d 活化。无菌条件下, 挑取菌落边缘菌丝体, 接于碳氮源平板培养基上, 28℃ 培养 4~5 d 备用。从菌落边缘挑取直径 0.8 cm 大小均匀的菌种圆块, 接种于对应的液体培养基, 每瓶 3 块, 28℃ 静置 48 h, 每 24 h 摇瓶 5 min。将滤纸编号、称重, 恒温培养 10 d 后将培养产物进行滤纸抽滤, 于 80℃ 烘干至恒重, 再次称重, 2 次质量差值为菌丝体生物量(干重)。

1.2.2 碳氮源培养基正交实验 根据碳、氮源初选培养基筛选试验结果, 以复合碳源(蔗糖+玉米粉)、复合氮源(酵母粉+麦麸)、无机盐(MgSO₄ · 7H₂O+KH₂PO₄)、维生素 B₁ 组成 9 个试验配方, 正交因素与水平见表 1, 正交因素水平组合见表 2。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Orthogonal experimental factor and level

水平 Level	因素 Factor/(g · L ⁻¹)			
	蔗糖+玉米粉 Sucrose and corn flour	酵母粉+麦麸 Wheat bran and yeast powder	MgSO ₄ · 7H ₂ O+ KH ₂ PO ₄	维生素 B ₁ Vitamin B ₁
1	15+15	1+10	0.5+1	0.010
2	20+20	2+20	1.5+3	0.020
3	25+25	3+30	2.5+5	0.030

2 结果与分析

2.1 灰树花菌丝体对碳源的利用

碳源是液体培养基的重要组成部分, 主要的作用是

表 4 不同氮源对菌丝体生物量影响

Table 4 The effect of different nitrogen source on the mycelia biomass

重复 Repeat	生物量 Mycelial biomass					
	蛋白胨 Peptone	酵母粉 Yeast powder	牛肉膏 Beef extract	麦麸浸提液 Wheat bran extract	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ NO ₃
1	1.222	2.856	1.144	4.922	1.32	1.594
2	1.226	1.916	0.836	4.174	1.36	1.234
3	1.398	2.230	1.106	4.030	0.698	1.234
均值 Mean	1.282±0.10C	2.334±0.48B	1.029±0.17C	4.375±0.48A	1.354±0.21C	1.917±0.01C

注: A, B, C 表示在 0.01 水平上差异极显著。

Note: A, B, C letters show significant difference at 0.01 level.

表 2 正交实验因素水平组合

Table 2 Combination of orthogonal experimental factors and levels

水平 Level	因素 Factor/(g · L ⁻¹)			
	蔗糖+玉米粉 Sucrose and corn flour	酵母粉+麦麸 Wheat bran and yeast powder	MgSO ₄ · 7H ₂ O+ KH ₂ PO ₄	维生素 B ₁ Vitamin B ₁
1	15+15	1+10	0.5+1	0.010
2	15+15	2+20	1.5+3	0.020
3	15+15	3+30	2.5+5	0.030
4	20+20	1+10	1.5+3	0.030
5	20+20	2+20	2.5+5	0.010
6	20+20	3+30	1.5+3	0.020
7	25+25	1+10	2.5+5	0.020
8	25+25	2+20	1.5+3	0.030
9	25+25	3+30	1.5+3	0.010

提供菌丝体生长所需的能量, 构成菌体细胞骨架和代谢产物^[8]。然而不同菌丝体对碳源要求和利用不尽相同, 通过碳源初选单因素试验找到了更适合灰树花菌丝体生长的碳源。从表 3 可以看出, 玉米粉浸提液作为供试碳源时生物量最高, 生物量从高到低依次为玉米粉浸提液>麦芽糖>蔗糖>葡萄糖>马铃薯浸提液, 方差分析结果显示不同碳源之间对灰树花菌丝体生物量干重的影响差异显著。

表 3 不同碳源对菌丝体生物量影响

Table 3 The effect of different carbon source on the mycelia biomass

重复 Repeat	生物量 Mycelial biomass				
	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	麦芽糖 Maltose	玉米粉浸提液 Corn powder extract	马铃薯浸提液 Potato extract
1	1.024	1.036	1.742	2.060	0.770
2	1.262	1.322	1.228	2.128	0.860
3	1.156	1.796	1.218	1.930	0.810
均值 Mean	1.147±0.12ab	1.385±0.38b	1.396±0.30b	2.039±0.10a	0.813±0.05c

注: 不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level.

2.2 灰树花菌丝体对氮源的利用

氮源主要作用是构成菌体细胞物质和含氮代谢物。然而不同菌株菌丝体对氮源的要求和利用也不尽相同^[8], 通过氮源单因素的初选找到了更适合灰树花菌丝体生长的氮源。从表 4 可以看出, 以牛肉膏为供试氮源

时菌丝体生物量最高,生物量从高到低依次为:麦麸浸提液>酵母粉>NH₄NO₃>蛋白胨>(NH₄)₂SO₄>牛肉膏,方差分析结果显示不同氮源对灰树花菌丝体生物量干重的影响差异极显著^[9]。

2.3 复合碳源、复合氮源正交实验结果与分析

虽然无机盐和和维生素对菌丝体生长量的影响程度不如碳、氮源起决定性因素,但其在菌丝体生长方面起着促进或延缓的作用。无机盐构成细胞的主要成分,参与细胞渗透压的调节。维生素是辅酶的重要组成成分,或者发挥辅酶的作用^[8],结合单碳源、单氮源单因素初筛试验对正交实验进行了优化,以复合碳源、复合氮源、无机盐、维生素作为4个因素,分别设置3个梯度水平,按照正交实验设计组合条件对灰树花进行液体培养,由表5正交实验结果与极差分析可知,4个因素对菌丝体

表5 正交实验结果分析

Table 5 Results analysis of L₉(3⁴)orthogonal design

水平 Level	因素 Factors/(g·L ⁻¹)				结果 Result
	蔗糖+玉米粉 Sucrose and corn flour	酵母粉+麦麸 Yeast powder and wheat bran	MgSO ₄ ·7H ₂ O+ KH ₂ PO ₄	维生素 B ₁ Vitamin B ₁	
1	15+15	1+10	0.5+1	0.010	3.914
2	15+15	2+20	1.5+3	0.020	4.914
3	15+15	3+30	2.5+5	0.030	5.092
4	20+20	1+10	1.5+3	0.030	5.470
5	20+20	2+20	2.5+5	0.010	5.746
6	20+20	3+30	1.5+3	0.020	5.644
7	25+25	1+10	2.5+5	0.020	5.856
8	25+25	2+20	1.5+3	0.030	6.166
9	25+25	3+30	1.5+3	0.010	5.968
K ₁	4.64	5.08	5.24	5.20	
K ₂	5.62	5.60	5.46	5.48	
K ₃	6.00	5.56	5.56	5.58	
R	1.36	0.52	0.32	0.38	

生长影响程度由高到低依次是复合碳源、复合氮源、维生素、无机盐,极差越大,表明该因素变化对试验结果影响越大^[10-12]。4个因素在3个水平下各自平均值表明,蔗糖+玉米粉、MgSO₄·7H₂O+KH₂PO₄、维生素 B₁ 在第3水平下,酵母粉+麦麸在第2水平下,灰树花菌丝体生物量理论上最高。

3 结论

试验结果表明,灰树花菌丝体液体培养基最适配方为蔗糖 25 g/L,玉米粉 25 g/L,麦麸 20 g/L,酵母粉 2 g/L, MgSO₄·7H₂O 2.5 g/L, KH₂PO₄ 5 g/L, 维生素 B₁ 0.030 g/L,24℃静置培养 10 d,生物量为10.41 g/L。

参考文献

- [1] 彭红. 灰树花的栽培和开发现状[J]. 食用菌,1998,20(4):2-4.
- [2] 王增池. 灰树花的生态条件与药用价值[J]. 中国食用菌,1998,17(6):39-40.
- [3] 李小定,荣建华,吴某成. 灰树花活性多糖的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(4):364-367.
- [4] 孙震,陈石良,古文英,等. 灰树花多糖体内抗肿瘤作用的实验研究[J]. 药物生物技术,2001,8(5):279-283.
- [5] 林章余,何锦星,林文忠. 灰树花研究综述[J]. 福建农业科技,1994,12(6):29-30.
- [6] 郭成金. 霉菌生物学[M]. 天津:天津科学技术出版社,2005:68,159.
- [7] 刘西周,郭成金. 采用 L₉(3⁴)正交设计方法筛选木耳菌丝体液体培养基[J]. 中国食用菌,2009(1):36-38.
- [8] 邢来军,李明春. 普通真菌学[M]. 北京:高等教育出版社,1999:50-82.
- [9] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 北京:高等教育出版社,2003:263-265.
- [10] 王振和,万学东,武中伟,等. 正交设计优化裂褶菌发酵全液多糖提取工艺[J]. 中国野生植物资源,2007,26(4):50-56.
- [11] 王战勇,张建东,李莹,等. 北虫草液体培养基的研究[J]. 辽宁石油化工大学学报,2004,24(1):19-25.
- [12] 陈文强,邓百万,陈永刚,等. 用 L₉(3⁴) 正交试验筛选裂褶菌液体培养基[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(4):38-41.

Selection of Liquid Medium for a Wild *Griifola frondosa* Mycelium by Orthogonal Design

LIU Xizhou

(Mushroom Institute, Tianjin Normal University, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin 300387)

Abstract: Taking a wild *Griifola frondosa* strain as material, the effect of different liquid medium on mycelial biomass was studied by using orthogonal design method in this paper. The results showed that the optimum liquid medium composition were sucrose 25 g/L, wheat bran 20 g/L, MgSO₄·7H₂O 2.5 g/L, corn flour 4 g/L, yeast powder 2 g/L, KH₂PO₄ 5 g/L and vitamin B₁ 0.030 g/L, natural pH, through culturing for 10 d at 24℃, the biomass of *Griifola frondosa* reached 10.41 g/L.

Keywords: *Griifola frondosa*; liquid medium; orthogonal design; mycelium biomass