

# 一株野生有柄树舌的鉴定、 菌丝培养特性及驯化栽培

张国广, 卢文朋, 林溜章, 邹金美

(闽南师范大学 生物科学与技术学院, 福建 漳州 363000)

**摘要:**以一株野生大型真菌为研究对象,通过 ITS(internal transcribed spacer)测序和同源序列比对鉴定该野生真菌,同时使用固体平板培养和人工栽培试验来探讨该野生真菌的培养特性等。结果表明:所分离野生真菌为有柄树舌(*Ganoderma gibbosum*),菌丝生长所需要的最佳碳源为葡萄糖或果糖,氮源为酵母浸膏,最适碳氮比为(10:1)~(20:1),pH 5.5,培养温度 28℃。木屑、玉米芯和棉籽壳为主料的 3 种栽培基质中都观察到有柄树舌子实体的发生。

**关键词:**有柄树舌;培养特性;人工驯化栽培

**中图分类号:**S 646.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)22-0153-05

有柄树舌(*Ganoderma gibbosum* (Nees) Pat.)属于担子菌门(Basidiomycota),层菌纲(Hymenomycetes),非褶菌目(Aphyllorphales),灵芝科(Ganodermataceae),灵芝属(*Ganoderma*),树舌亚属(*Ganoderma* Subgen. *Elfvigia*)的一种药用真菌,又称有柄灵芝、老母菌等<sup>[1-3]</sup>。灵芝科内有药用价值的真菌种类较多,据统计至 2005 年我国报道的灵芝科物种共计 4 属 103 种<sup>[4]</sup>,其中,有药用价值的有 27 种<sup>[5]</sup>,树舌亚属中树舌(*G. applanatum*)和有柄树舌被认为是有较高药用价值的 2 种真菌<sup>[3,5-6]</sup>,以往对树舌的药理学及其它相关研究报道很多<sup>[5,7-8]</sup>,但关于有柄树舌的相关报道较少,有柄树舌在海南民间用于治疗胃病,其它功效被认为与树舌相同<sup>[3]</sup>。但陈体强等<sup>[9]</sup>在对二者的氨基酸含量分析时发现树舌氨基酸总含量高于有柄树舌,有柄树舌必需氨基酸总比例要高于树舌,可见二者在一些化学成分上有所不同,所以有必要加强对有柄灵芝的相关研究,以推动该药用真菌的合理利用和野生资源的保存。该研究利用 ITS(internal transcribed spacer)序列测序鉴定了一株野外分离的有柄树舌,并探讨了其菌丝的培养特性并进

行了人工初步栽培试验,为进一步开展有柄树舌的相关研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2010 年 9 月,在闽南师范大学校园内一棵桑树立木上发现一株大型真菌,初步判断为灵芝属树舌亚属真菌,不确定是何具体种,组织分离获得该野生菌的母种(图 1)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 树舌类野生真菌 ITS 序列测序与比对 采用 CTAB 法<sup>[10]</sup>从分离到的野生真菌的菌丝中提取该真菌的 DNA。扩增野生真菌 ITS 序列的一对引物为 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'和 ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',由上海英骏生物工程公司合成。用提取的野生真菌 DNA 作模板,以特异性引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增。将得到的特异性片段纯化回收,连接 pMD18T 克隆载体后送上海英骏生物公司测序,测得的序列截去载体和引物上下游多余序列后,登录 NCBI 网站用 Blast 工具进行同源序列比对。从 GenBank 下载搜索到的部分同源序列和若干条树舌的 ITS 序列,以紫芝(*Ganoderma japonicum*)和桦褶孔菌(*Lenzites betulinus*)ITS 序列做外群,采用 MEGA 6.0 软件包进行系统发育分析和系统发育树的构建,采用 kimura2-parameter 模式计算遗传距离,采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,Bootstrap 参数设定为 1 000。

1.2.2 菌种活化 将分离得到的斜面试管取出,接至马

**第一作者简介:**张国广(1973-),男,博士,副教授,现主要从事菌物及其天然产物等研究工作。E-mail:zhanggg709@126.com.

**责任作者:**邹金美(1972-),女,硕士,副教授,现主要从事园艺植物等研究工作。E-mail:jimmy709@126.com.

**基金项目:**校优秀中青年骨干教师资助项目(2013013046)。

**收稿日期:**2015-08-19



图1 野生大型真菌形态(a)及组织分离的菌丝(b)

Fig. 1 Morphology of wild macrofungi(a) and mycelia by tissue isolation(b)

铃薯综合培养基制成的平板中部,在 28℃ 恒温培养箱中避光培养,直至菌丝将要长满平板时使用。接种时用灭菌打孔器(直径 6 mm)在相同直径的圆圈上打孔,保证同一个处理中接种的菌块菌龄一致<sup>[11]</sup>。

1.2.3 碳源、氮源和碳氮比对菌丝生长的影响 参照张国广等<sup>[11]</sup>方法进行,以葡萄糖蛋白胨琼脂培养基(葡萄糖 20 g,蛋白胨 5 g,磷酸二氢钾 3 g,硫酸镁 1.5 g,维生素 B<sub>1</sub> 10 mg,琼脂 20 g)中 20 g 葡萄糖的含碳量为标准,分别用和 20 g 葡萄糖相等含碳量的果糖、蔗糖、麦芽糖、甘油、可溶性淀粉和玉米粉代替葡萄糖进行碳源因子比较试验,以未添加碳源的培养基为对照。以葡萄糖蛋白胨琼脂培养基中 5 g 蛋白胨的含氮量为标准,分别用和 5 g 蛋白胨相等含氮量的硝酸钾、硫酸铵、尿素、牛肉膏、酵母浸膏和麸皮代替培养基中的蛋白胨,以未添加氮源的培养基为对照。在葡萄糖蛋白胨培养基中,改变蛋白胨添加量配成碳氮比为 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 的培养基,观察不同碳氮比对菌丝生长的影响。

1.2.4 温度和 pH 值对菌丝生长的影响 以优化的碳氮源培养基为基础,分别设置 18、23、28、33、38℃ 5 个培养温度,观察温度对菌丝生长的影响。以优化的碳氮源配制基础培养基,调节 pH 值分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,观察 pH 值对野生真菌菌丝生长的影响。

1.2.5 野生真菌驯化栽培 以棉籽壳、玉米芯和木屑为人工栽培菌包中的碳源主料配制 3 种栽培基质(配方 1 为棉籽壳 80%、麸皮 19%、轻质碳酸钙 1%,含水量控制在 60%~65%,初始 pH 6.5;配方 2 将配方 1 中棉籽壳替换为玉米芯 80%,其余均相同;配方 3 将配方 1 中棉籽壳替换为木屑 80%,其余均相同),将配制好的栽培基质装入聚丙烯塑料袋,126℃,高压灭菌 2 h,冷却至室温后接入野生真菌菌种,28℃ 条件下培养,菌包长满后,打开菌包,取部分菌包在菌丝上覆盖 1 层(3~

5 cm)灭菌沙土,提高空气湿度至 90%,观察野生真菌子实体发生情况。

### 1.3 项目测定

以上每个菌丝生长比较的处理均重复 3 次,接种后每天观察记录至其中一个处理中菌丝长满培养皿后停止观察,测量菌丝生长长度。计算菌丝生长率(菌丝生长速率(mm/d)=菌丝生长长度/培养天数)。

### 1.4 数据分析

数据用平均值±方差的方式表述。对各处理菌丝平均生长率进行方差分析,用新复极差法进行多重比较和显著性分析( $P<0.01$  为差异极显著, $P<0.05$  为差异显著)。

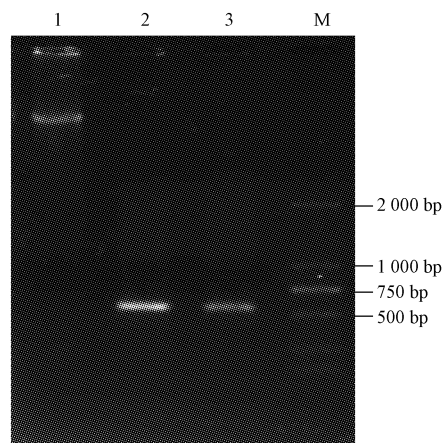
## 2 结果与分析

### 2.1 野生真菌 ITS 序列的进化分析

以野生真菌的 DNA 为模板,PCR 扩增得到一条约 650 bp 左右的特异性条带(图 2)。图 3 表明,该研究分离菌株的 ITS 序列与 7 个不同分离地的有柄树舌的菌株聚在一起,3 株树舌的聚在一起,而紫芝(*Ganoderma japonicum*)和桦褶孔菌(*Lenzites betulinus*)都单独一支,紫芝亲缘关系与树舌和有柄树舌的亲缘关系相对与桦褶孔菌与二者的近。根据系统发育树并结合其形态学特征,确认该野生真菌为有柄树舌(*Ganoderma gibbosum*)。

### 2.2 碳、氮源对菌丝生长的影响

2.2.1 碳源对菌丝生长的影响 有柄树舌灵芝菌丝体在 7 种碳源和对照培养基中均能生长(表 1),但生长速度和生长状态有较大差异,其中在葡萄糖和果糖中生长速度都较快,二者间不具有显著性差异,在其它氮源物质中菌丝生长速度与 2 种单糖做碳源的培养基中菌丝生长速度有显著性差异,且生长状态也有变化,综合生长状态和生长速度,葡萄糖或果糖均可以作为树舌灵芝菌丝培养的碳源使用。

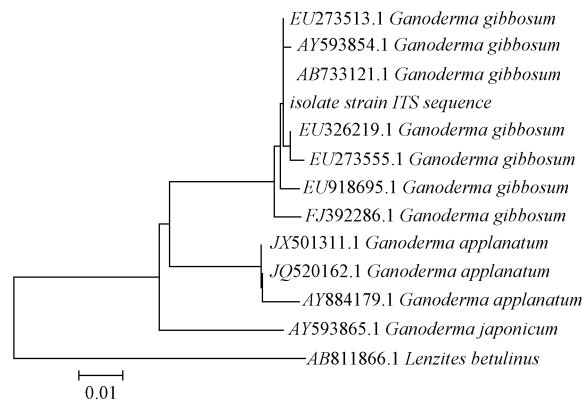


注:1,野生真菌菌丝基因组 DNA;2~3,PCR 扩增的 ITS 基因片段;M,DNA marker。

Note:1 represent genomic DNA of wild fungi;2-3 represent ITS gene fragment of PCR amplification;M represent DNA marker.

图 2 野生真菌基因组 DNA 及其 ITS PCR 扩增片段

Fig. 2 Genomic DNA and ITS PCR amplification products of wild fungi



注:图中标尺表示的序列间 0.01 碱基差异。

Note:Bar signifies 0.01 sequence divergence substitution per nucleotide position.

图 3 基于 rDNA ITS 碱基序列构建的 NJ 系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree based on rDNA ITS region sequence

2.2.2 氮源对菌丝生长的影响 有柄树舌灵芝菌丝在不同氮源培养基中生长速度不同(表 2),能够很好的在麸皮、酵母浸膏、牛肉膏和蛋白胨等有机氮源培养基中生长,以麸皮和酵母浸膏培养基中生长较快,但菌丝在麸皮培养基中生长比较稀疏,总体比较酵母浸膏培养基最优;在无氮源和无机氮源培养基中生长较差,在尿素培养基中观察不到有菌丝生长,分析认为尿素在高温灭菌过程中可能产生了抑制菌丝生长的物质所致。

2.2.3 碳氮比对菌丝生长的影响 由表 3 可知,在(10:1)~(50:1)范围内随着碳氮比的增加,菌丝生长速度变慢,生长状态变差,在菌丝培养阶段(10:1)~

表 1 不同碳源对菌丝生长的影响

Table 1 Effect of different C-source treatments on the mycelial growth

碳源 Carbon source	菌丝生长率 Mycelial growth rate /(mm · d <sup>-1</sup> )	菌丝色泽、密度、长势 Mycelial color,density, growing vigor
葡萄糖 Glucose	4.463±0.083 a A	白、致密、长势很好
果糖 Fructose	4.350±0.080 a A	白、粗壮致密、长势很好
麦芽糖 Maltose	3.017±0.067 b B	洁白、较密、长势一般
可溶性淀粉 Starch	2.223±0.076 c C	白、较密、长势一般
玉米粉 Corn powder	1.947±0.211 d CD	白、较密、长势一般
蔗糖 Sucrose	1.857±0.020 d DE	白、较浓密、长势一般
甘油 Glycerol	1.763±0.031 de DE	白、较浓密、长势一般
对照 Control	1.540±0.010 e E	白、稀疏、长势弱

注:菌丝生长率后不同大、小写字母表示在 0.01 和 0.05 水平上显著。下同。

Note:Different uppercase and lowercase letters in the rear growth rate represent significant differences at  $P<0.01$  and  $P<0.05$ , respectively. The same below.

表 2 不同氮源对菌丝生长速度的影响

Table 2 Effect of different N-source treatments on the mycelial growth

氮源 Nitrogen source	菌丝生长率 Mycelial growth rate /(mm · d <sup>-1</sup> )	菌丝色泽、密度、长势 Mycelial color,density, growing vigor
麸皮 Wheat bran	4.573±0.081 a A	灰白、后端菌丝稀疏,长势较好
酵母浸膏 Yeast extract	4.553±0.160 a A	浓白、菌丝粗壮致密、长势很好
牛肉膏 Beef extract	3.430±0.066 b B	浓白、菌丝粗壮致密、长势很好
蛋白胨 Peptone	3.107±0.201 b B	白、致密、长势好
对照 Control	2.087±0.029 c C	非常稀疏,依稀能看到生长的菌丝
硝酸钾 KNO <sub>3</sub>	1.953±0.072 cd CD	灰白、极稀疏、长势极弱
硫酸铵 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.777±0.100 d D	白、稀疏、长势弱
尿素 Urea	0.0±0.0 e E	肉眼未观察到有菌丝生长

表 3 不同碳氮比对菌丝生长速度的影响

Table 3 Effect of different C/N treatments on the mycelial growth

碳氮比 C/N ratio	菌丝生长率 Mycelial growth rate /(mm · d <sup>-1</sup> )	菌丝色泽、密度、长势 Mycelial color,density, growing vigor
10:1	4.667±0.107 a A	浓白、粗壮致密、长势很好
20:1	4.517±0.330 a AB	浓白、粗壮致密、长势很好
30:1	4.160±0.209 b BC	白色、致密、长势较好
40:1	3.813±0.038 c CD	白色、致密、长势较好
50:1	3.653±0.084 c D	灰白色、稀疏、长势一般

(20:1)的碳氮比是菌丝快速生长的物质保证,如果碳氮比营养供给中氮元素不足,难以满足快速生长的菌丝合成蛋白质、核酸等含氮生物大分子,从而会限制菌丝的生长。

2.3 温度对菌丝生长的影响

在设定的 5 个测试温度中,菌丝最适宜的生长温度为 28℃,随着温度的升高或降低,其菌丝的生长逐渐受到抑制,在 38℃时,菌丝接种块周围观察不到有菌丝生长,菌丝的生长完全受到抑制(表 4)。

2.4 pH 值对菌丝生长的影响

有柄树舌灵芝适应的 pH 值范围较广泛,pH 5.5~8.0 的培养基中菌丝均可以快速生长,在 pH 5.5 和



表 4 不同温度对菌丝生长的影响

Table 4 Effect of different temperature treatments on mycelial growth

温度 Temperature /℃	菌丝生长率 Mycelial growth rate /(mm·d <sup>-1</sup> )	菌丝色泽、密度、长势 Mycelial color, density, growing vigor
28	4.557±0.101 a A	洁白、粗壮致密、长势很好
33	2.890±0.149 b B	白色、非常致密、长势好
23	2.777±0.269 b B	白色、致密、长势较好
18	0.403±0.021 c C	在接种菌种块周围可以观察到菌丝发生
38	0.0±0.0 d D	菌丝不能萌发生长

表 5 不同 pH 值对菌丝生长的影响

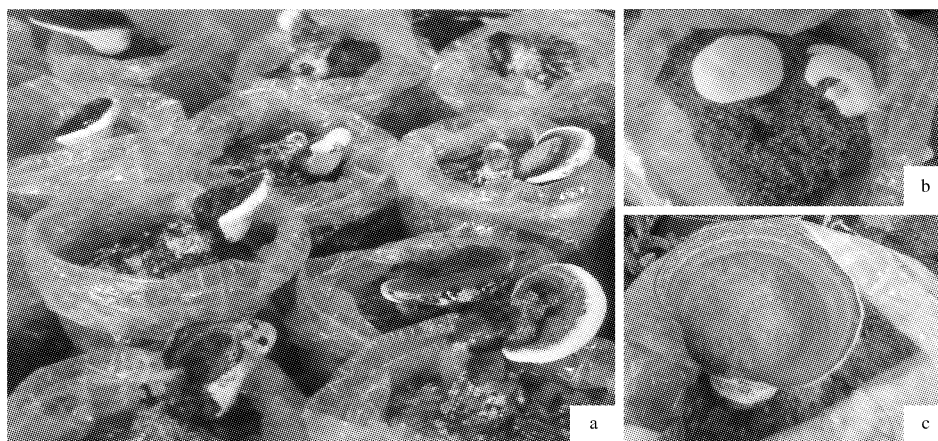
Table 5 Effect of different pH value treatments on mycelial growth

pH 值 pH value	菌丝生长率 Mycelial growth rate/(mm·d <sup>-1</sup> )	菌丝色泽、密度、长势 Mycelial color, density, growing vigor
5.5	4.663±0.015 a A	白色、致密、长势很好
6.0	4.593±0.100 ab A	白色、致密、长势很好
6.5	4.490±0.062 b AB	白色、致密、长势较好
7.0	4.447±0.150 b B	白色、致密、长势较好
7.5	4.200±0.291 c C	洁白色、致密、长势较好
8.0	4.190±0.187 c C	洁白色、致密、长势较好

pH 6.0 的培养基中菌丝的生长速度没有显著性差异,随着 pH 值升高,生长速度变慢,但菌丝生长状态均较好,菌丝比较适宜的 pH 值为 5.5~6.5(表 5)。

## 2.5 有柄树舌人工试栽培结果

有柄树舌在 3 种栽培培养基中均能很好生长,长满菌包的时间均不超过 30 d,其中在棉籽壳培养基中生长速度会稍微快一些,满包时间在 22 d 左右,玉米芯培养基次之,木屑培养基满包时间最长,可能与棉籽壳和玉米芯培养基比较疏松、透气性好有关系。菌包长满放置 7 d 左右打开菌包,提高空气湿度至 90% 左右进入出菇阶段。3 种培养基上不论菌丝表面覆土或不覆土的菌包均有子实体的发生,但覆土的菌包子实体出现的时间要快于不覆土的,覆土菌包一般 10 d 左右就能看到子实体的发生(图 4),在部分子实体上能明显观察到短菌柄构成部分。人工栽培的子实体与野生子实体菌盖颜色和厚度上有一定变化(图 1、4),推测是子实体日龄、光照或者栽培基质的变化导致的改变。



注:a.部分栽培菌包长出的子实体;b.覆土菌包子实体初发生;c.未覆土菌包子实体。

Note:a,fruit bodies grown on artificial logs;b,primordia formation of wild fungi from artificial logs with casing overlay;c,fruit body development from artificial logs without casing overlay.

图 4 有柄树舌栽培菌包子实体发生

Fig. 4 Fruit body development of *Ganoderma gibbosum* artificial cultivation mycelium-packing

## 3 结论与讨论

大型真菌的鉴定方法主要有 2 种,一是基于子实体形态或其生理生化特征的经典鉴定方法,二是近年来出现的分子鉴定方法。经典方法依据子实体形态可以非常直观的做出鉴定,在大型真菌的分类和鉴定上有着不可替代的地位。但由于野生真菌子实体形态会受到地域分布、子实体发生时间和环境条件等因素影响而出现不稳定性;再有一些近缘物种子实体形态非常相似,仅仅依靠外形很难分辨。为了更准确的对野生大型真菌进行分类鉴定,近年来一些分类研究工作往往在经典形态学基础上,再辅以分子系统学鉴定的方法<sup>[12]</sup>。基于生

物可以遗传的核酸分子开发了多种分子标记用于分子系统进化分析和物种的鉴定,如 RAPD(random amplified polymorphic DNA)、SSR(simple sequence repeats)、SCAR(sequence characterized amplified regions)、AFLP(amplified restriction fragment polymorphism)、ITS 测序分析等,其中 rDNA 的 ITS 序列在菌物系统发育和菌种辅助鉴定中被广泛使用<sup>[13-15]</sup>。该研究探讨的有柄树舌与树舌的外部形态非常相像,国内曾经将有柄树舌作为树舌的一个变种<sup>[2,16]</sup>,二者仅靠子实体形态较难辨别,课题组推测同为树舌亚属传统药用真菌为何有柄树舌的相关药理及其它研究报道比树舌少,是否存在部分文献将二者均视为树舌的可能?因此对 2 种树舌类真菌开展药理等

研究时对材料的来源进行审慎的鉴别是有必要的。该研究基于野生菌株的 ITS 序列及其系统发育树分析将野生真菌鉴定为有柄树舌,而且分离菌种栽培出的子实体也观察到了短菌柄的存在,佐证了该研究的分子鉴定结果,这为课题组后续研究提供了基础数据。同时系统发育树也表明有柄树舌和树舌间亲缘关系比较近,但基于 ITS 的序列可以将二者区分开来。

有柄树舌菌丝培养特性研究结果表明菌丝最适宜碳源为葡萄糖或果糖,最适氮源为酵母浸膏,最适碳氮比为(10:1)~(20:1),最适宜温度为 28℃ 左右、pH 5.5,结果与文献报道基本一致<sup>[17-18]</sup>。根据结果优化出的母种培养基配方是马铃薯 200 g,葡萄糖或果糖 20 g,酵母浸膏 5 g,硫酸镁 1.5 g,磷酸二氢钾 3 g,维生素 B<sub>1</sub> 10 mg,琼脂 20 g,水 1 L,在优化的母种培养基上,有柄树舌菌丝接种后 6 d 左右可以长满试管。栽培结果表明有柄树舌能够人工栽培,但需要进一步探讨合理的栽培方案以提高产量和保证药用效果。

#### 参考文献

- [1] 戴玉成. 中国多孔菌名录[J]. 菌物学报, 2009, 28(3): 315-327.
- [2] 赵继鼎,徐连旺,张小青. 中国灵芝科的分类研究Ⅱ[J]. 真菌学报, 1983, 2(3): 159-167.
- [3] 钟金霞,郭建荣,肖敏,等. 海南岛药用灵芝资源的调查研究[J]. 中国药学报, 1998, 33(11): 652-655.
- [4] 吴兴亮,戴玉成. 中国灵芝图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 1-229.
- [5] 吴兴亮,宋斌,赵友兴,等. 中国药用灵芝及名称使用商榷[J]. 贵州科学, 2013, 31(1): 1-17.
- [6] 钟金霞,何青,何顺志,等. 中国主要药用灵芝的鉴别[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(2): 75-76.
- [7] KIM Y S, EO S K, OH K W, et al. Antimicrobial activity of water soluble components of *Elfvigia applanata* alone and in combination with quinolones[J]. Mycobiology, 2001, 29(1): 11-14.
- [8] 周忠波,马红霞,图力古尔. 树舌(*Ganoderma lipsiense*)化学成分及药理学研究进展[J]. 菌物研究, 2005, 3(1): 35-42.
- [9] 陈体强,徐洁,吴锦忠. 福建省常见灵芝的氨基酸分析比较[J]. 海峡药学, 2004, 16(5): 1-4.
- [10] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANJATID T. Molecular cloning [M]. A laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 张国广,邹金美,郑琳,等. 一株野生大型真菌的 ITS 分析及生物学特征研究[J]. 云南民族大学学报, 2010, 19(6): 395-399.
- [12] 邓春英. 中国小皮伞属广义球盖组分类学研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [13] GOTTLIEB A M, FERRER E, WRIGHT J E. rDNA analyses as an aid to the taxonomy of species of *Ganoderma*[J]. Mycology Research, 2000, 104(9): 1033-1045.
- [14] 苏春丽,唐传红,张劲松,等. 基于 rDNA ITS 序列探讨中国栽培灵芝菌株的亲缘关系[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 11-16.
- [15] 兰玉菲,王庆武,安秀榕,等. 野生硫磺菌分离株 ITS 序列分析[J]. 食用菌学报, 2012, 19(2): 31-34.
- [16] 匿名. 真菌、地衣汉语学命名法规[J]. 真菌学报, 1987, 6(1): 61-64.
- [17] 陈向东,曾念开,兰进. 药用真菌有柄树舌菌丝培养特性的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 1939-1942.
- [18] 梁志群,陈子武. 有柄灵芝菌丝生物学特性研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(18): 164-167.

## Isolation Identification, Mycelial Cultivation Characteristics and Artificial Cultivation of a Wild *Ganoderma gibbosum* Strain

ZHANG Guoguang, LU Wenpeng, LIN Liuzhang, ZOU Jinmei

(School of Biological Science and Technology, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000)

**Abstract:** A wild macrofungi was taken as research object. The wild macrofungi was identified by internal transcribed spacer(ITS) sequence and homologous sequence alignments, simultaneously mycelial cultivation characteristics and artificial cultivation were investigated by solid plate culture method and artificial logs. The results showed that the isolating wild strain was *Ganoderma gibbosum* by phylogenetic analysis based on ITS region sequence. Optimum carbon was the glucose or fructose, and the optimum nitrogen source was extracts of yeast, and the optimum carbon nitrogen ratio was about from 10:1 to 20:1. The optimum growth temperature and optimum pH value were around 28℃ and 5.5 respectively. The fruit body development was observed from three kinds of cultivating substrate whose main materials were sawdust, corncob and cottonseed hull separately.

**Keywords:** *Ganoderma gibbosum*; cultivation characteristics; artificial domesticated cultivation