

# 一株乌天麻共生萌发菌培养条件的优化

程立君<sup>1</sup>, 李世辉<sup>1</sup>, 胡志芳<sup>2</sup>, 段相程<sup>1</sup>, 赵艳娟<sup>1</sup>

(1. 昭通学院 化学与生命科学学院, 云南省高校昭通高原特色农产品工程研究中心, 云南 昭通 657000;

2. 昭通苹果产业研究所, 云南 昭通 657000)

**摘要:**以天麻共生萌发菌 MY-001 为试材, 采用单因素试验和正交实验分析法, 以菌丝生长速率和菌丝体生物量为主要指标, 对萌发菌 MY-001 培养环境条件及培养基营养条件进行优化。结果表明: MY-001 最适宜的环境条件为温度 25℃, 培养基质含水量 200% 下进行暗培养; MY-001 最易利用的氮源和碳源分别是酵母膏、葡萄糖, 复合维生素 B 也能促进菌丝生长, 最佳的营养条件为酵母膏 3 g·L<sup>-1</sup>、葡萄糖 20 g·L<sup>-1</sup>、复合维生素 B 0.005 g·L<sup>-1</sup>, 通过多元回归分析建立回归方程( $Y=0.362+0.084A-0.014B-0.007C$ ), 方差分析显示方程为极显著。

**关键词:**天麻; 萌发菌; 环境条件; 营养条件

**中图分类号:**S 567.9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)19-0175-03

天麻(*Gastrodia elata* Blume)为名贵的传统中药, 云南省昭通市是我国公认的天麻道地药材产地, 特别是昭通市彝良县小草坝所产的天麻, 以优良的品质而驰名中外<sup>[1]</sup>。天麻属兰科多年生草本植物, 无根无绿色叶片, 不能进行光合作用, 其种子发芽必须依靠萌发菌侵染后才能正常发芽<sup>[2]</sup>。课题组前期对昭通小草坝分离的萌发菌进行过筛选和萌发对比试验, 并将筛选出的菌株在昭通实施了推广<sup>[3]</sup>。大量研究表明天麻种子萌发菌属

于小菇属(*Mycena*)的一类真菌<sup>[2,4-5]</sup>, 该属的多数种类试验有抗癌作用, 对小白鼠肉瘤 180 和艾氏癌有抑制效果<sup>[6]</sup>。由于菌种来源不同, 生物学特性也存在差异, 为加快萌发菌的扩繁, 降低生产成本, 同时为深入开发利用萌发菌奠定基础, 有必要对萌发菌的生长环境条件和营养条件进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试萌发菌菌株为 MY-001 由昭通乌天麻原球茎上分离获得, 于昭通学院保存。供试碳源分别为葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉。供试氮源分别为硝酸钾、硝酸铵、蛋白胨、酵母膏和尿素。供试维生素分别为维

**第一作者简介:**程立君(1986-), 男, 湖南岳阳人, 硕士, 助教, 研究方向为食用菌与中草药资源开发。E-mail: chenglijun224@163.com。

**收稿日期:**2016-04-18

## Effect of Plant Growth Regulators and Sucrose Concentrations on the Proliferation, Growth and Effective Compounds Content of *Orostachys cartilaginosa* Callus

ZHANG Wanbo, PIAO Xuanchun, YANG Fan, JIANG Yinji, LIAN Meilan, JIN Yinghua  
(Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

**Abstract:** *Orostachys cartilaginosa* callus was used as experiment material, the effect of MS strength and concentrations of plant growth regulators, 6-BA and NAA on callus biomass and effective compound accumulation was explored by orthogonal experiment method. The suitable sucrose concentration was also selected. The results showed that, MS medium supplemented with 3.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA was favorable for callus growth and effective compound accumulation, the maximum fresh and dry weight of calluses were found when the medium was supplied 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 711.2 mg·L<sup>-1</sup> of polysaccharides, 165.1 mg·L<sup>-1</sup> of phenolics and 154.5 mg·L<sup>-1</sup> of flavonoids were obtained in *Orostachys cartilaginosa* callus.

**Keywords:** *Orostachys cartilaginosa* callus; MS medium concentration; plant growth regulators; sucrose concentrations; biomass; effective compounds

生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 C 和复合维生素 B。PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL。木屑-麦麸培养基:按木屑:麦麸=1:1 进行配置,含水量根据试验设计设置。

## 1.2 试验方法

1.2.1 温度对菌丝生长的影响 配置 PDA 平面培养基,接种直径为 0.5 cm 的菌种块,分别在 5、10、15、20、25、30、35 ℃ 7 个温度下进行暗培养,7 d 后记录菌丝的生长速率,每处理设置 5 个重复。

1.2.2 含水量对菌丝生长的影响 取长 20 cm 的试管装入定量的木屑-麦麸培养基,培养基的含水量分别设置在 100%、200%、300%、400% 4 个处理,在最适温度条件下进行培养,21 d 后记录菌丝的生长速率,每处理设置 5 个重复。

1.2.3 光照对萌发菌生长的影响 参照 1.2.1 的方法在最适温度条件下,将接种有萌发菌的 PDA 平面培养基,分别在光照、半光照半黑暗、黑暗 3 个条件下进行培养,7 d 后记录菌丝的生长速率,每处理设置 5 个重复。

1.2.4 营养条件的筛选 参照彭述敏等<sup>[7]</sup>的方法进行,每处理设计 5 次重复。

1.2.5 正交实验 以单因素营养条件筛选所得结果设计三因素三水平的正交实验(表 1),在单因素环境条件筛选中获得的最佳条件下培养,优化萌发菌培养基的营养条件。

表 1 因素及水平

Table 1 Factor and level

水平 Level	因素 Factor/(g·L <sup>-1</sup> )		
	A 酵母膏 Yeast extract	B 葡萄糖 Glucose	C 复合维生素 B Composite vitamin B
1	1	15	0.005
2	2	20	0.010
3	3	25	0.015

## 1.3 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度、含水量和光照对萌发菌 MY-001 菌丝生长速率的影响

由表 2 可知,温度、含水量和光照对萌发菌 MY-001 菌丝生长都具有明显的影响,菌丝生长的最适温度为 25 ℃,最适培养基质的含水量为 200%,在黑暗条件下生长较好。

### 2.2 氮源、碳源和维生素等营养条件对萌发菌 MY-001 菌丝生物量的影响

从表 3 可以看出,氮源、碳源和维生素种类不同对菌丝生物量存在明显差异。在 5 种不同氮源中,以酵母膏表现最优,菌丝生物量干样质量达到 0.50 g,其次是蛋白胨(0.40 g)。在不同的碳源条件下,碳源为葡萄糖时

表 2 不同温度、含水量和光照对 MY-001 菌丝生长的影响

Table 2 Effect of different temperature,moisture and light on

MY-001 mycelial growth

温度 Temperature /℃	日均生长速率 Average growth rate/(cm·d <sup>-1</sup> )	含水量 Moisture /%	日均生长速率 Average growth rate/(cm·d <sup>-1</sup> )	光照 Light	日均生长速率 Average growth rate/(cm·d <sup>-1</sup> )
5	—Aa	100	0.15±0.01Aab	光照	0.39±0.03Aa
10	0.05±0.01Bb	200	0.28±0.01Cc	光照/黑暗	0.48±0.02Bab
15	0.13±0.01Cb	300	0.19±0.02Bb	黑暗	0.57±0.02Cb
20	0.31±0.03Dc	400	0.13±0.01Aa		
25	0.51±0.04Ed				
30	0.42±0.02Dcd				
35	—Aa				

注:“—”为接种后菌丝不生长;菌丝的日均生长速率由平均值±标准误差(SE)表示;不同大写字母表示差异显著( $P<0.05$ );不同小写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同。

表 3 不同氮源、碳源和维生素对 MY-001 菌丝生物量的影响

Table 3 Effect of different nitrogen source,carbon source and vitamins on MY-001 mycelial biomass

氮源 Nitrogen source	菌丝干样质量 Mycelial biomass /g	碳源 Carbon source	菌丝干样质量 Mycelial biomass /g	维生素 Vitamins	菌丝干样质量 Mycelial biomass /g
硝酸钾	0.18±0.02Aa	葡萄糖	0.57±0.03Ed	维生素 B <sub>1</sub>	0.58±0.01BCabc
硝酸铵	0.16±0.01Aa	乳糖	0.28±0.02Bb	维生素 B <sub>2</sub>	0.62±0.03Cbc
蛋白胨	0.40±0.02Bb	蔗糖	0.42±0.03Cc	维生素 B <sub>6</sub>	0.59±0.02BCabc
酵母膏	0.50±0.02Cc	淀粉	0.47±0.02CDcd	复合维生素 B	0.69±0.03Dc
尿素	0.15±0.01Aa	麦芽糖	0.51±0.02DEcd	维生素 C	0.52±0.03ABab
CK	0.18±0.01Aa	CK	0.19±0.01Aa	CK	0.50±0.02Aa

菌丝生物量干样质量最大,达 0.57 g,是对照组(0.19 g)的 3 倍,其次是麦芽糖培养基,仅比葡萄糖培养基下菌丝生物量低 0.06 g,为对照组的 2.68 倍。在不同的维生素的培养基中,各种维生素都能促进菌丝的生长,复合维生素 B 促进菌丝生长最明显,菌丝生物量干样质量达 0.69 g,其次是维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub> 和维生素 B<sub>1</sub>,且差异不显著。

### 2.3 正交实验结果

由表 4 可知,3 种营养因素对萌发菌 MY-001 菌丝生物量影响由大到小依次为 A>B>C,即氮源酵母膏的影响最大。经直观分析法对结果分析,在试验范围内,萌发菌 MY-001 菌丝生长的最佳培养基因素水平组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>,即培养基按酵母膏为 3 g·L<sup>-1</sup>、葡萄糖 20 g·L<sup>-1</sup>、复合维生素 B 0.005 g·L<sup>-1</sup> 进行配制。正交实验结果经多元回归分析得回归方程: $Y=0.362+0.084A-0.014B-0.007C$ (多元相关系数  $R=0.961$ );Y 为生物量,A 为酵母膏,B 为葡萄糖,C 为复合维生素 B,方差分析显示回归方程为极显著( $P=0.003<0.01$ ),t 检验结果表明,对回归方程贡献最大的是酵母膏( $P=0.001<0.01$ ),其次是葡萄糖和复合维生素 B,即对萌发菌 MY-001 菌丝生物量影响依次为酵母膏>葡萄糖>复合维生素 B,该结果与

表 4 正交实验结果

Table 4 Orthogonal experiment results

试验号 No.	因素 Factor/(g · L <sup>-1</sup> )			菌丝体干样质量 Mycelial biomass /g
	A 酵母膏 Yeast extracts	B 葡萄糖 Glucose	C 复合维生素 B Composite vitamin B	
1	3	3	1	0.578 1
2	1	2	3	0.431 1
3	3	1	3	0.551 8
4	1	3	2	0.357 4
5	2	3	3	0.460 5
6	3	2	2	0.571 2
7	2	2	1	0.499 4
8	2	1	2	0.517 3
9	1	1	1	0.410 5
K <sub>1</sub>	1.198 9	1.479 5	1.487 9	
K <sub>2</sub>	1.477 1	1.501 6	1.445 9	
K <sub>3</sub>	1.701 1	1.396 0	1.443 3	
R	0.502 2	0.105 6	0.044 6	

注:K<sub>n</sub>表示以n水平试验结果之和;R表示极差。

直观分析法的结果一致。

### 3 讨论

萌发菌为天麻共生菌,与天麻的生长发育密切相关,不同来源性状的萌发菌菌株对天麻的产量影响非常显著。自徐锦堂等<sup>[8]</sup>首次报道天麻种子发芽需要萌发菌之后,陆续有研究者开展相关研究,如萌发菌的生长环境条件和种类的分类鉴定等,到目前已经鉴定到种的天麻种子萌发菌有紫萁小菇(*Mycena osmundicola*)<sup>[8]</sup>、兰小菇(*Mycena orchidicola*)<sup>[9]</sup>、开唇兰小菇(*Mycena anoetochila*)<sup>[10]</sup>、石斛小菇(*Mycena dendrobii*)<sup>[5]</sup>等,但很少见到关于萌发菌营养条件优化的报道,随着天麻产业的发展 and 萌发菌开发利用,筛选合适的发酵营养条件具有重要意义。该研究对一株性状优良的昭通当

地萌发菌 MY-001 生长的环境条件和营养条件进行了优化,结果表明,MY-001 最适宜的环境条件为温度 25 ℃,培养基质含水量 200% 下进行暗培养,与郭顺星等<sup>[5]</sup>和宁丽等<sup>[11]</sup>的研究结果相同;MY-001 最易利用的氮源和碳源分别是酵母膏、葡萄糖,复合维生素 B 也能促进菌丝生长,经正交实验筛选结果显示,最佳营养条件为酵母膏 3 g · L<sup>-1</sup>、葡萄糖 20 g · L<sup>-1</sup>、复合维生素 B 0.005 g · L<sup>-1</sup>,同时建立了回归模型  $Y = 0.362 + 0.084A - 0.014B - 0.007C$ ,回归方程为极显著。

### 参考文献

- [1] 李德勋,张观敏,马跃新. 昭通天麻的原植物调查与鉴定[J]. 现代中药研究与实践,2005,19(1):29-31.
- [2] 徐锦堂. 中国天麻栽培学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993.
- [3] 程立君,陈玉惠,徐畅,等. 昭通天麻种子萌发菌的筛选[J]. 安徽农业科学,2009,37(28):13600-13602.
- [4] 徐锦堂,郭顺星,范黎,等. 天麻种子与小菇属真菌共生萌发的研究[J]. 菌物系统,2001,20(1):137-141.
- [5] 郭顺星,王秋颖. 促进天麻种子萌发的石斛小菇优良菌株特性及作用[J]. 菌物系统,2001,20(3):408-412.
- [6] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科技出版社,2000.
- [7] 彭述敏,陈玉惠,程立君,等. 2 株优良天麻共生蜜环菌生长条件筛选[J]. 中国食用菌,2010,29(4):22-25.
- [8] 徐锦堂,郭顺星. 供给天麻养种子萌发营养的真菌紫萁小菇[J]. 真菌学报,1989,8(3):221-226.
- [9] 范黎,郭顺星,曹文岑,等. 墨兰共生真菌一新种的分离、培养、鉴定及其生物活性[J]. 真菌学报,1996,15(4):251-255.
- [10] 范黎,郭顺星,肖培根. 天麻种子萌发过程与开唇兰小菇的相互作用[J]. 菌物系统,2001,20(4):539-546.
- [11] 宁丽,郭立忠,李翠翠,等. 天麻萌发菌株的生物学特性研究[J]. 氨基酸和生物资源,2007,29(2):5-7.

## Optimization of Cultivation Condition in *Gastrodia elata* Seed-germinating Strain

CHENG Lijun<sup>1</sup>, LI Shihui<sup>1</sup>, HU Zhifang<sup>2</sup>, DUAN Xiangcheng<sup>1</sup>, ZHAO Yanjuan<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Life Sciences, Zhaotong University/Zhaotong Characteristic Agricultural Products Research Center, Zhaotong, Yunnan 657000; 2. Zhaotong Apple Industry Research Institute, Zhaotong, Yunnan 657000)

**Abstract:** *Gastrodia elata* seed-germinating strain MY-001 was used as test material, the cultivation conditions of MY-001 was studied according to the index of mycelial growth rate and mycelial biomass by single factor experiment and orthogonal experiment. The results showed that the optimum growth environmental conditions were 25 ℃, 200% water content, under dark cultivation; glucose and yeast extracts were the optional carbon source and nitrogen sources. The optimum growth nutrient conditions were determined yeast extracts 3 g · L<sup>-1</sup>, glucose 20 g · L<sup>-1</sup>, composite vitamin B 0.005 g · L<sup>-1</sup>. Through multiple regression analysis to establish regression equation ( $Y = 0.362 + 0.084A - 0.014B - 0.007C$ ), variance analysis showed significant equation was very significant.

**Keywords:** *Gastrodia elata*; germinating strain; environmental condition; nutrient condition