

三株大型真菌最佳培养条件的筛选

郭富宽, 王术荣, 孟俊龙, 刘靖宇, 常明昌

(山西农业大学 食品科学与工程学院, 山西 太谷 030801)

摘要:以采自庞泉沟国家自然保护区的3种大型真菌(野蘑菇、罗曼尼蘑菇、梨形马勃)为试材,对子实体进行组织分离获得菌株,采用观察、测量、统计、分析等方法,研究比较了5种不同的碳源和氮源对3种菌株的菌丝生长速度的影响。结果表明:野蘑菇和罗曼尼蘑菇菌丝生长的最适碳源均为玉米粉,梨形马勃菌丝生长的最适碳源为葡萄糖;罗曼尼蘑菇和梨形马勃菌丝生长的最适氮源为硫酸铵,野蘑菇菌丝生长的最适氮源为硝酸铵。该研究为食用菌资源的开发利用奠定了基础。

关键词:大型真菌;菌丝;培养条件

中图分类号:S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)13-0161-04

我国疆土辽阔,自然资源种类繁多,其中更是包含了相当丰富的菌物资源^[1]。对这些宝贵资源的识别、研究、保护和开发利用,使之充分发挥其应有的价值,这对于发展菌物资源产业、振兴农业经济、增加国民收入、活跃城镇及乡村市场、扩大对外农业经济贸易、保护生物的多样性都有着非常重要的意义^[2-3]。

我国虽然是食用菌种植大国,但却不是食用菌生产强国^[4],主要原因是拥有自主产权的品种较少,而选育自主品种的主要障碍又在于可选用的自主材料少。基于以上因素,对野生大型真菌的收集和评价就显得尤为重要。首先应该是对菌株的表观特征和生物学特性进行研究,其次是栽培条件的筛选,例如,每种菌丝在不同的培养基上的生长速度、形态特征、个体间均一性等都会出现

差异,因此,最佳培养条件的研究就显得尤为重要。现对采自山西省吕梁市交城县庞泉沟的3种大型真菌进行观察研究,旨在找出其最适生长碳氮源,为后期研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试野蘑菇(*Agaricus arvensis*)、罗曼尼蘑菇(*Agaricus romagnesii*)及梨形马勃(*Lycoperdon pyriforme*)3种菌株均于2015年7—9月采自山西省吕梁市交城县庞泉沟,菌株均分离于新鲜子实体。

PDA培养基(Potato Dextrose Agar):水1 000 mL、马铃薯250 g、蛋白胨1.5 g、葡萄糖25 g、琼脂25 g、磷酸二氢钾3.75 g、硫酸镁1.8 g^[5]。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种分离提纯

将采摘的真菌子实体适当风干,去除多余水分和粘性后,用75%酒精擦拭灭菌,采用“田”字取样法挑取4~9 mm²菌肉组织,接入PDA斜面培养基,放入恒温培养箱培养^[6]。连续重复2~3

第一作者简介:郭富宽(1993-),男,硕士研究生,研究方向为食品科学。E-mail:18235446743@163.com.

责任作者:常明昌(1964-),男,本科,教授,现主要从事食用菌等研究工作。E-mail:sxmushroom@126.com.

基金项目:山西农业大学科研启动基金资助项目(2014YJ18);山西省煤基重点科技攻关资助项目(FT20140301);2015年度山西省高校协同创新中心资助项目。

收稿日期:2017-03-28

次试验就可以获得纯菌种,期间应排除杂菌的污染,时刻关注菌丝的生长情况^[7]。当菌种长满斜面培养基时转接入平板培养基中,观察其菌落形态,若菌落逐渐向四周呈辐射状散开,外缘整齐,则可判断为纯菌种^[8]。

1.2.2 不同碳源对3种菌丝生长速率的影响

按表1配制5种不同碳源培养基,分别标记为A1、A2、A3、A4、A5。将培养好的菌丝体沿菌落的边缘用5 mm打孔器接种于不同碳源培养基中央,每个菌种重复5次,25℃恒温培养箱中进

行菌丝培养。每天定时观察菌落生长情况,并于菌块开始萌发之时起,采用十字划线法,以平板中菌落半径的生长速度为计量单位,观察记录菌丝的日生长量,分析菌丝生长速度的差异性,研究5种不同碳源对菌丝生长的影响^[9]。

1.2.3 不同氮源对3种菌丝生长速率的影响

按表2配制5种氮源培养基,分别标记为B1、B2、B3、B4、B5。接种等操作方法同1.2.2,研究5种不同氮源对菌丝生长的影响^[10]。

表1 5种不同碳源的培养基配方

Table 1 Formula of medium with 5 different carbon sources

组别 Group	葡萄糖 Glucose/g	蔗糖 Sucrose/g	玉米粉 Corn flour/g	淀粉 Starch/g	麦芽糖 Maltose/g	蛋白胨 Peptone/g	琼脂 Agar/g	硫酸镁 MgSO ₄ /g	磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄ /g	水 H ₂ O/mL
A1	25	—	—	—	—	1.5	25	1.8	3.75	1 000
A2	—	25	—	—	—	1.5	25	1.8	3.75	1 000
A3	—	—	25	—	—	1.5	25	1.8	3.75	1 000
A4	—	—	—	25	—	1.5	25	1.8	3.75	1 000
A5	—	—	—	—	25	1.5	25	1.8	3.75	1 000

表2 5种不同氮源的培养基配方

Table 2 Formula of medium with 5 different nitrogen sources

组别 Group	牛肉膏 Beef extract/g	硝酸铵 NH ₄ NO ₃ /g	硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄ /g	酵母膏 Yeast extract/g	蛋白胨 Peptone/g	葡萄糖 Glucose/g	琼脂 Agar/g	硫酸镁 MgSO ₄ /g	磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄ /g	水 H ₂ O/mL
B1	1.5	—	—	—	—	25	25	1.8	3.75	1 000
B2	—	1.5	—	—	—	25	25	1.8	3.75	1 000
B3	—	—	1.5	—	—	25	25	1.8	3.75	1 000
B4	—	—	—	1.5	—	25	25	1.8	3.75	1 000
B5	—	—	—	—	1.5	25	25	1.8	3.75	1 000

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 5种不同碳源对3种菌丝生长速度的影响

由表3可知,野蘑菇和罗曼尼蘑菇菌丝生长的最适碳源均为玉米粉,野蘑菇在以蔗糖为碳源的培养基中生长缓慢,罗曼尼蘑菇在以可溶性淀粉为碳源的培养基中生长缓慢;梨形马勃菌丝生长最适碳源为葡萄糖,在以麦芽糖为碳源的培养基中生长缓慢。野蘑菇在以玉米粉为碳源的培养基中生长时,菌丝洁白,生长速度相对较快,菌丝比较浓密,爬壁能力较强;在以蔗糖为碳源的培养

基中生长时,菌丝洁白浓密,具有较强的爬壁能力,但是生长速度相对缓慢。罗曼尼蘑菇接在玉米粉为碳源的培养基中,生长速度最快,菌丝浓密,洁白;在可溶性淀粉的培养基中,菌丝生长相对缓慢,且长势相对较弱。梨形马勃在以葡萄糖为碳源的培养基中生长速度最快,菌丝浓密、洁白,在麦芽糖的培养基中,菌丝生长缓慢,长势相对较差。

2.2 5种不同氮源对3种菌丝生长速度的影响

由表4可知,野蘑菇的最适氮源为硝酸铵;罗曼尼蘑菇的最佳氮源为硫酸铵;梨形马勃的最适氮源为硫酸铵。通过对菌丝生长情况的观察,得出在添加最适氮源的培养基中,菌丝生长旺盛,生长速度最快且长势最强,菌丝洁白浓密整齐。

表 3 不同碳源对菌丝体生长的影响

Table 3 Effect of different carbon source on the growth of mycelium

菌株 Strain	碳源 Carbon source	菌丝生长速度 Mycelial growth rate/(mm · d ⁻¹)	差异显著性 Significant difference		菌丝生长势 Mycelial growth vigor
			0. 05	0. 01	
野蘑菇 <i>Agaricus arvensis</i>	玉米粉	0. 750	a	A	+++
	麦芽糖	0. 655	ab	A	++
	可溶性淀粉	0. 383	b	A	+
	葡萄糖	0. 354	b	B	+
	蔗糖	0. 223	c	C	+
罗曼尼蘑菇 <i>Agaricus romagnesii</i>	玉米粉	1. 426	a	A	+++
	蔗糖	1. 400	a	A	+++
	葡萄糖	0. 828	ab	B	++
	麦芽糖	0. 771	b	B	++
	可溶性淀粉	0. 770	b	B	++
梨形马勃 <i>Lycoperdon pyriforme</i>	葡萄糖	1. 073	a	A	+++
	蔗糖	0. 878	ab	A	++
	玉米粉	0. 732	b	A	++
	可溶性淀粉	0. 556	c	B	+
	麦芽糖	0. 497	c	B	+

注:+++表示菌丝长势强,++表示菌丝长势一般,+表示菌丝长势很弱。表 4 同。

Note:+++ indicates that mycelial growth is strong,++ indicates that mycelial growth is general,+ indicates that mycelial growth is weak, Table 4 is the same as Table 3.

表 4 不同氮源对菌丝体生长的影响

Table 4 Effect of different nitrogen source on the growth of mycelium

菌株 Strain	氮源 Nitrogen source	菌丝生长速度 Mycelial growth rate/(mm · d ⁻¹)	差异显著性 Significant difference		菌丝生长势 Mycelial growth vigor
			0. 05	0. 01	
野蘑菇 <i>Agaricus arvensis</i>	硝酸铵	0. 809	a	A	+++
	硫酸铵	0. 674	ab	A	++
	蛋白胨	0. 655	ab	A	++
	酵母膏	0. 423	b	B	+
	牛肉膏	0. 386	b	B	+
罗曼尼蘑菇 <i>Agaricus romagnesii</i>	硫酸铵	1. 308	a	A	+++
	酵母膏	1. 259	a	A	+++
	蛋白胨	0. 916	ab	A	++
	硝酸铵	0. 891	ab	A	++
	牛肉膏	0. 632	b	B	+
梨形马勃 <i>Lycoperdon pyriforme</i>	硫酸铵	1. 342	a	A	++++
	硝酸铵	1. 221	ab	A	+++
	牛肉膏	1. 150	b	A	+++
	蛋白胨	1. 092	b	B	+++
	酵母膏	0. 981	c	C	++

2.3 3 种菌株菌丝在适宜培养基上生长的情况

野蘑菇菌丝生长的最适培养基为玉米粉 25 g,硝酸铵 1.5 g,硫酸镁 1.8 g,琼脂 25 g,磷酸二氢钾 3.75 g,水 1 000 mL;罗曼尼蘑菇菌丝生长的最适培养基为玉米粉 25 g,硫酸铵 1.5 g,硫酸镁 1.8 g,琼脂 25 g,磷酸二氢钾

3.75 g,水 1 000 mL;梨形马勃菌丝生长的最适培养基为葡萄糖 25 g,硫酸铵 1.5 g,硫酸镁 1.8 g,琼脂 25 g,磷酸二氢钾 3.75 g,水 1 000 mL。所有菌丝在最适培养基上时,生长速度最快,长势最好,且菌丝浓密、洁白。

3 结论与讨论

野蘑菇菌丝生长的最佳碳源、氮源分别为玉米粉、硝酸铵;罗曼尼蘑菇菌丝生长的最适碳源、氮源分别为玉米粉、硫酸铵;梨形马勃菌丝生长的最佳碳源、氮源分别为葡萄糖、硫酸铵。菌种是菌物科学研究与生产的重要物质基础^[11]。不同真菌对于碳氮源具有不同的需求,每个物种都会表现出差异性,野外采集菌种的培养条件筛选对于保育工作具有基础性的作用,对于弥补野生大型真菌的收集评价、驯化栽培和深层次利用研究严重不足有深切的影响,同时为野生菌种的驯化和开发奠定了基础。

参考文献

[1] 王瑞华. 山东省菌物资源调查(I)及部分虫生真菌的分子生物学研究[D]. 济南:山东中医药大学,2013.

[2] 吕彩莲. 野蘑菇菌丝体培养条件的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.

[3] 黄浩,肖正端,邓春英,等. 广东石门台自然保护区大型真菌多样性研究(I)[J]. 广东林业科技,2010(5):40-44.

[4] 阿历索保罗 C J,布莱克韦尔 M. 菌物学概论[M]. 4版. 姚一建,李玉,译. 北京:中国农业出版社,2002.

[5] 杨勇,张凤英,陈岑. PDA培养基改良配方的研究[J]. 酿酒科技,2012(4):29-31.

[6] 徐冰洁. 不同碳源条件下功能菌共代谢降解典型 PPCPs 的效能与机理[D]. 上海:东华大学,2014.

[7] 韩春华. 杏鲍菇碳氮营养生理的研究[D]. 保定:河北农业大学,2003.

[8] 黄奕. 食用菌栽培[M]. 3版. 北京:高等教育出版社,2008.

[9] 赵亚东. 不同培养料对秀珍菇生长发育、产量及胞外酶的影响[D]. 南京:南京农业大学,2011.

[10] 胡章喜,安民,段舜山,等. 不同氮源对布朗葡萄藻生长、总脂和总烃含量的影响[J]. 生态学报,2009(6):3288-3294.

[11] 张金霞,陈强,黄晨阳,等. 食用菌产业发展历史、现状与趋势[J]. 菌物学报,2015(4):524-540.

Screening of Optimal Culture Conditions of Three Strains of Macrofungi

GUO Fukuan, WANG Shurong, MENG Junlong, LIU Jingyu, CHANG Mingchang

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Abstract: Three species of macrofungi (*Agaricus arvensis*, *Agaricus romagnesii*, *Lycoperdon pyriforme*) from Pangquangou National Nature Reserve were used as the test materials, the strains from subsidiary entities was gotten by isolating tissue. The influence of five different carbon source and nitrogen source on the three strains of mycelium growth rate were researched by adopting such methods as observation, survey, statistics, analysis and so on. The results showed that the optimal carbon source of *Agaricus arvensis* and *Agaricus romagnesii* mycelium's growth was corn flour, the optimal carbon source of *Lycoperdon pyriforme* mycelium's growth was glucose; the optimal nitrogen source of *Agaricus romagnesii* and *Lycoperdon pyriforme* mycelium's growth was ammonium sulfate; the optimum nitrogen source of *Agaricus arvensis* mycelium's growth was ammonium nitrate. The research laid the foundation for edible fungus resources' development and utilization.

Keywords: macrofungi; mycelium; culture conditions