

DOI:10.11937/bfyy.201705031

# 猪苓袋料培养条件筛选

高巧妮<sup>1</sup>, 谢淑雨<sup>1</sup>, 张跃进<sup>1</sup>, 孙建华<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 陕西汉王略阳中药科技有限公司, 陕西 略阳 724300)

**摘要:**以猪苓为试材, 采用 PDA 培养基及袋料培养真菌的传统方法, 对猪苓在不同培养条件下菌丝的生长及菌核形成情况进行了分析, 采用划线法测量猪苓菌丝生长速度, 用观察计数法对猪苓菌核形成数量、大小、位置进行统计分析。结果表明:猪苓菌种袋料培养的最佳条件为 25 ℃、24 h 黑暗培养、料水比 1:1.4(kg·L<sup>-1</sup>);最适合猪苓菌种袋料培养的培养基配方为木屑 50%、棉籽壳 30%、麸皮 18%、石膏 1%、生石灰 0.4%、蔗糖 0.5%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%;明确了不同培养条件对猪苓菌丝生长发育及菌核形成的影响, 为进一步开展猪苓种苓工厂化生产提供参考依据。

**关键词:**猪苓;袋料培养;人工栽培;菌核

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)05-0130-04

猪苓(*Polyporus umbellata* (Pers.) Fries.) 属多孔菌科(Polyporaceae)药用真菌, 主要由菌核和子实体构成<sup>[1]</sup>。以其菌核入药, 具有利尿、渗湿、消肿的功效, 临床上用于小便不利、水肿、泄泻、淋浊、带下等的治疗<sup>[2]</sup>。历代以四川、山东所产为道地, 现今主产于四川、陕西、云南、河南等省<sup>[3]</sup>。

长期以来, 猪苓主要来自采挖野生菌核, 由于人为过度采集, 野生资源被大量滥采乱挖, 猪苓生长环境受到严重破坏, 野生资源濒危绝迹, 我国已将其列为三级保护野生药材<sup>[4]</sup>。为此, 近年来课题组对秦岭野生猪苓资源的分布、土壤与植被生态环境特征进行了调研, 同时开展了猪苓生物学特性、人工半野生栽培技术研究<sup>[5-11]</sup>, 在人工半野生栽培中, 猪苓种苓成为影响该产业发展的瓶颈<sup>[12-13]</sup>, 该试验研究了不同培养条件对猪苓菌丝生长发育及菌核形成的影响, 为人工种苓的工厂化生产提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株来源 供试猪苓菌株由西北农林科技

第一作者简介:高巧妮(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药材规范化生产。E-mail:576993578@qq.com.

责任作者:张跃进(1960-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为中药材 GAP 规范化栽培技术。E-mail:qxzhang@126.com.

**基金项目:**陕西省科技统筹资助项目(2016KTCL02-10);濒危药材猪苓规范化种植与饮片标准化生产基地建设资助项目(国家工信部项目)。

**收稿日期:**2016-12-05

大学生命学院提供, 来源于陕西省略阳县陕西汉王略阳中药科技有限公司猪苓种植基地。

1.1.2 培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g·L<sup>-1</sup> (去皮煮汁)、葡萄糖 20 g·L<sup>-1</sup>、琼脂 10 g·L<sup>-1</sup>、蒸馏水 1 000 mL。液体培养基:玉米粉 3%、葡萄糖 2%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%、MgSO<sub>4</sub> 0.05%、酵母膏 0.5%、蛋白胨 0.1%。袋料培养基:袋料培养基配方见表 1。

**表 1 袋料培养基配方**

Table 1 The medium formula of *Polyporus* substitute culture

培养基编号 Medium number	培养基配方 Culture medium formula
S <sub>1</sub>	木屑 50%, 棉籽壳 30%, 麸皮 18%, 石膏 1%, 生石灰 0.4%, 蔗糖 0.5%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%
S <sub>2</sub>	木屑 59%, 棉籽壳 39%, 石膏 1%, 生石灰 0.4%, 蔗糖 0.5%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%
S <sub>3</sub>	木屑 65%, 麸皮 33%, 石膏 1%, 生石灰 0.4%, 蔗糖 0.5%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%
S <sub>4</sub>	棉籽壳 55%, 麸皮 43%, 石膏 1%, 生石灰 0.4%, 蔗糖 0.5%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 制备 PDA 培养基 1 000 mL 分装于洁净干燥的 20 mL 试管中, 121 ℃、0.12 MPa 灭菌 25 min。灭菌后摆放斜面并将保存备用的猪苓菌株接种到固体斜面培养基上, 放入培养箱中 25 ℃黑暗条件下活化 7 d, 转接于 PDA 平板培养基 25 ℃培养。

1.2.2 液体培养 待菌丝长满平板培养基后, 用直径 0.5 cm 的打孔器在菌落边缘打孔, 接种至装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 每瓶接种 6

块,恒温摇床,150 r·min<sup>-1</sup>、25℃黑暗培养7~10 d。

1.2.3 袋料培养 按表1袋料培养基配方要求配制,分装于12 cm×24 cm×0.04 cm的聚丙烯塑料袋中,每袋装料250 g,使用封口圈封口,121℃、0.12 MPa灭菌4 h。待冷却后在无菌操作台上,将培养7~10 d的液体菌种以1瓶·袋<sup>-1</sup>的量倒入袋料培养基中,用封口圈封口,放入25℃培养箱中,每种处理接种5袋。

### 1.3 项目测定

待菌丝长满培养基上表面,沿菌丝生长前沿划线,作为测定菌丝生长速度的起点。每7 d记录一次菌丝的生长状况,计算菌丝生长速率(菌丝生长速率=菌丝生长长度/菌袋长度),直至菌丝长满菌袋。根据测量数据,绘制生长曲线图,比较不同培养条件下袋料培养的猪苓菌丝生长发育,同时观察菌核形成情况。袋料培养优化设计为9组,试验条件见表2。

表2 袋料培养的不同培养条件处理

编号 Number	条件 Condition
1	25℃、24 h黑暗、料水比1:1.4(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>1</sub> 培养基
2	20℃、24 h黑暗、料水比1:1.4(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>1</sub> 培养基
3	30℃、24 h黑暗、料水比1:1.4(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>1</sub> 培养基
4	25℃、12 h黑暗 12 h光照、料水比1:1.4(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>1</sub> 培养基
5	25℃、24 h黑暗、料水比1:1.2(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>1</sub> 培养基
6	25℃、24 h黑暗、料水比1:1.6(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>1</sub> 培养基
7	25℃、24 h黑暗、料水比1:1.4(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>2</sub> 培养基
8	25℃、24 h黑暗、料水比1:1.4(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>3</sub> 培养基
9	25℃、24 h黑暗、料水比1:1.4(kg·L <sup>-1</sup> )、S <sub>4</sub> 培养基

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养条件对猪苓袋料培养中菌丝生长的影响

2.1.1 不同温度处理对猪苓袋料培养中菌丝生长的影响 由图1可以看出,不同温度条件下猪苓菌丝的生长存在一定差异。培养温度为25℃时猪苓菌丝生长速度最快,其次为20℃,30℃最慢。25℃时菌丝长满菌袋需要41 d,20℃时需要55 d,而30℃培养条件下的猪苓菌丝在试验期间未长满菌袋。温度是生物生长发育的主要环境因子,不同生物由于自身生物学特性不同对温度的要求也不同,温度过高或过低对其生长均构成一定影响。试验表明,25℃对猪苓菌丝生长较为有利,而30℃则不利于猪苓菌丝生长,这可能是猪苓菌丝在30℃温度下菌丝体内过氧化物酶类的活性增高,使得活性氧大大减少,导致菌丝内氧化应激水平过低,不利于菌丝细胞增殖分化。20℃时菌丝体中的其它酶类(如蛋白酶)比25℃时活性低,影响到猪苓菌丝的生长。

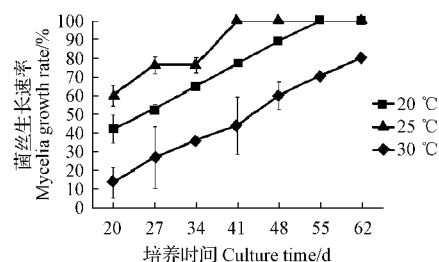


图1 不同温度对袋料培养中猪苓菌丝生长的影响

Fig. 1 Mycelia growth rate in different temperatures of *Polyporus*

2.1.2 不同光照时间对猪苓袋料培养中菌丝生长的影响 由图2可以看出,不同光照条件下猪苓菌丝生长存在较大差异,24 h黑暗远大于12 h黑暗,41 d左右即可长满菌袋;而12 h黑暗、12 h光照条件下猪苓菌丝生长速度缓慢,在试验期内未能长满菌袋。猪苓作为一种异养型生物自然条件下生长在地下,只有进行有性繁殖时子实体才露出地面且极短时间。这种生物学特性决定了猪苓可能对光照没有需求,该试验证明了猪苓菌丝的生长不仅不需要光照,而且光照对猪苓菌丝生长有一定的抑制作用。

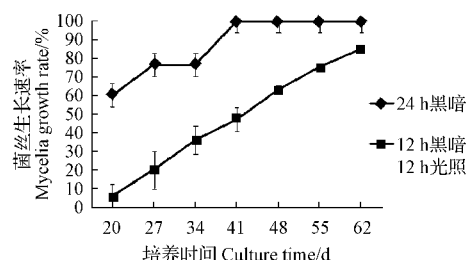


图2 不同光照时间对袋料培养中猪苓菌丝生长的影响

Fig. 2 Mycelia growth rate in different light of *Polyporus*

2.1.3 不同水分处理对猪苓袋料培养中菌丝生长的影响 由图3可知,不同水分条件对猪苓菌丝生长有一定影响。当培养基中料水比为1:1.4(kg·L<sup>-1</sup>)和1:1.6(kg·L<sup>-1</sup>)时,菌丝生长较快,41 d左右就可长满菌袋。料水比为1:1.2(kg·L<sup>-1</sup>)时,菌丝长满菌袋则需要55 d左右。水分是生物生长过程中不可缺少的重要因子,但各种生物需求不同。在猪苓袋料培养中,料水比为1:1.6(kg·L<sup>-1</sup>)时由于水分充足,表面的菌丝生长速度较快,长势良好,但袋料中间水分堆积,间隙小,空气少,不利于菌丝向内生长,且在后期易导致菌丝腐烂。料水比为1:1.2(kg·L<sup>-1</sup>)时,菌丝生长环境水分相对较匮乏,不能满足猪苓菌丝正常生长对水分的需求而受到一定影响因此,猪苓菌种袋料培养中料水比为1:1.4(kg·L<sup>-1</sup>)较为

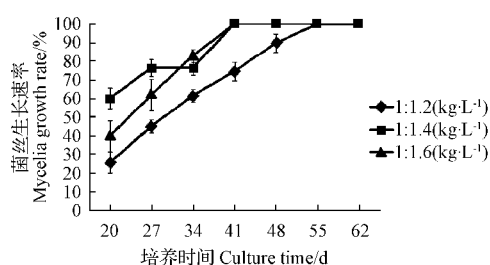


图3 不同水分处理对袋料培养中猪苓菌丝生长的影响

Fig. 3 Mycelia growth rate in different moisture contents of *Polyporus*

合适。

2.1.4 不同培养基对猪苓袋料培养中菌丝生长的影响 由图4可以看出,不同培养基组成对猪苓菌种袋料培养菌丝的生长情况存在一定影响。其中S<sub>1</sub>培养基上猪苓菌丝生长速度最快,延伸能力强,41 d左右长满菌袋。S<sub>2</sub>和S<sub>4</sub>培养基中菌丝生长速度差异不大,但与S<sub>1</sub>培养基存在较大差异,生长速度较慢,在55 d时长满菌袋。其中S<sub>2</sub>培养基因木屑和棉籽壳体积较大,培养基整体间隙较大,菌丝的延伸有一定困难,S<sub>4</sub>培养基中氮源充足,但碳源较为匮乏,因此生长速度较慢。S<sub>3</sub>培养基中因没有添加棉籽壳,较为紧密,整体间隙小,对菌丝前期生长构成较大影响,但后期生长较快,在55 d时长满菌袋。因此,S<sub>1</sub>培养基可作为猪苓袋料培养较适培养基。

2.2 不同培养条件对猪苓菌丝形态及菌核形成的影响

由表3可以看出,不同培养条件下猪苓菌种袋料培养的菌丝形态及菌核形成有较大差异。首先是温度的影响:温度为25℃时菌丝和菌核生长情况最

表3 不同培养条件下猪苓菌种袋料培养菌丝形态与菌核生长情况

Table 3 Mycelia morphology and sclerotium growth situation of *Polyporus* mycelia in different cultivating conditions

编号 Number	菌丝形态 Mycelia morphology	菌核数量 Sclerotium number	菌核形成时间 Sclerotium forming time/d	菌核生长情况 Growth of sclerotium
1	菌丝浓密,呈黄白色	++++	41	菌核形成早,个头大且质密,呈黄白色,沿袋壁和顶部均有生长
2	菌丝较浓密,呈白色	++	55	菌核形成晚,个头小,呈白色,只在袋料顶部生长
3	菌丝较密,呈黄白色	++	62	菌核形成晚,个头小,呈白色,只在袋料顶部生长
4	菌丝生长稀疏,呈嫩白色,肉眼能看见菌丝纹路,菌丝未完全覆盖培养基,故整体呈灰白色	—	—	无菌核产生
5	菌丝生长较密,呈白色	++	62	菌核形成晚,个头小,呈白色,菌核只在袋料顶部生长
6	菌丝生长密实,呈黄白色	+	48	菌核形成较晚,个头小,呈白色,菌核只在袋料顶部生长
7	菌丝稀疏,呈白色,菌丝未完全覆盖培养基,故整体呈灰白色	+	55	菌核形成晚,个头小,呈白色,沿上表面袋壁生长
8	菌丝较密集,呈黄白色	+++	41	菌核形成早,个头大,呈黄白色,沿袋壁和顶部都有生长
9	菌丝质密,呈乳白色	+++	48	菌核形成较早,个头小,呈黄白色,只在袋料顶部生长

注:“—”表示不产生菌核;“++++”表示菌核数量≥50个;“+++”表示菌核数量在30~40个;“++”表示菌核数量在10~30个;“+”表示菌核数量<10个。

Note: “—” stands for there's no sclerotium; “++++” stand for the number of sclerotia is over 50; “+++” stand for the number of sclerotia is between 30 and 40; “++” stand for the number of sclerotia is between 10 and 30; “+” stands for the number of sclerotia is less than 10.

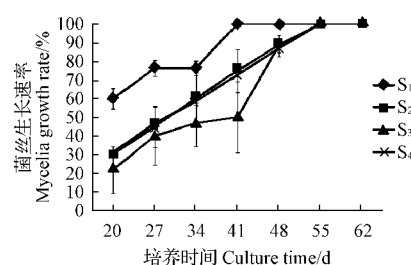


图4 不同培养基对猪苓菌丝生长的影响

Fig. 4 Mycelia growth rate in different medium formula of *Polyporus*

好,菌丝生长密集,颜色较浓;菌核形成时间早,数量最多,菌核大且质密,沿袋壁和顶部均有生长,温度过高或过低都会对菌丝生长和菌核形成造成不利的影响。其次是光照的影响:在黑暗条件下,猪苓菌种袋料培养的菌丝及菌核生长状况较好;光照会抑制猪苓菌丝的生长发育,具体表现在菌丝生长稀疏,色浅,无菌核产生等。第三是水分的影响:培养基料水比为1:1.4(kg·L<sup>-1</sup>)时菌丝及菌核生长情况较好;料水比为1:1.2(kg·L<sup>-1</sup>)时菌丝生长较密,呈白色,菌核形成时间晚、数量少、个头小,且菌核只在培养基顶部生长;料水比为1:1.6(kg·L<sup>-1</sup>)时猪苓菌丝生长密实,呈黄白色,菌核形成较晚,数量稀少,呈白色,个头小,菌核只在培养基顶部生长。培养基组成也是影响猪苓菌丝生长即菌核形成的重要因素之一,培养基配方的主要成分为木屑、棉籽壳和麸皮(即S<sub>1</sub>培养基)时猪苓袋料培养猪苓菌丝和菌核生长情况最好;培养基配方的主要成分为木屑和棉籽壳(即S<sub>2</sub>培养基)时猪苓菌丝稀疏,菌核形成晚,数量稀少,个头小,沿上表面的袋壁生长;培养基配方

的主要成分为木屑和麸皮(即  $S_3$  培养基)时菌丝生长情况较好,形成菌核个头大,但数量较少,沿袋壁和顶部都有生长;培养基配方的主要成分为棉籽壳和麸皮(即  $S_4$  培养基)时菌丝生长较好,但形成菌核数量少,个头小,只在培养基顶部生长。综合上述分析,第1组表现最好,即  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、24 h 黑暗、料水比为  $1:1.4(\text{kg}\cdot\text{L}^{-1})$ 、 $S_1$  培养基培养条件下,有利于猪苓袋料培养中菌丝的生长及菌核形成。

### 3 结论与讨论

本研究以陕西省略阳县产地的猪苓菌种为供试菌株,分别研究了不同温度、光照、水分条件及不同培养基对猪苓袋料培养菌丝生长及菌核形成的影响。结果表明在培养温度为  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,料水比  $1:1.4(\text{kg}\cdot\text{L}^{-1})$ ,24 h 黑暗培养条件下猪苓菌丝生长速度最快,菌丝洁白、紧密,形成的菌核数量多且个头大。

不同培养基组成( $S_1$ 、 $S_2$ 、 $S_3$ 、 $S_4$ )对猪苓菌丝生长及菌核形成有较大影响。其中  $S_1$  培养基培养的猪苓菌种在菌丝生长和菌核形成方面总体表现最好。即猪苓种苓人工培养的最适培养基配方为:木屑 50%、棉籽壳 30%、麸皮 18%、石膏 1%、生石灰 0.4%、蔗糖 0.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%。

该研究结果表明,在一定的培养条件下,猪苓菌丝能够形成菌核,为进一步开展猪苓种苓工厂化生产提供了技术支撑。然而,该菌核能否进一步应用大田栽培还在深入进行中。同时菌核只形成在袋料表面与菌丝是好气性生长有关,但具体这方面研究还不太清楚,也有待进一步研究。猪苓菌丝形成菌

核的过程是一个复杂多因素综合作用的结果,各种环境理化因子及生物调控因子共同参与,关于这些因素具体调控机制的研究还在进行中。

### 参考文献

- [1] 刘国库,杨太新,吴和平,等.猪苓培养条件的确立及其与蜜环菌共同培养的研究[J].时珍国医国药,2016(4):950-953.
- [2] 国家药典委员会.中国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:318.
- [3] 夏琴,周进,李敏,等.猪苓种植生产的研究进展[J].中药与临床,2015(2):119-123.
- [4] 胡平,方清茂,夏燕莉,等.猪苓栽培技术研究[J].安徽农业科学,2013(21):8855-8856.
- [5] 吴媛婷,陈德育,梁宗锁,等.猪苓人工栽培技术研究进展[J].北方园艺,2012(18):201-205.
- [6] 樊莎.猪苓种质资源的评价及菌核形成初探[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.
- [7] ZHANG Y J, FAN S, LIANG Z S, et al. Mycelial growth and polysaccharide content of *Polyporus umbellatus* [J]. Journal of Medical Plants Research, 2010, 4(18):1847-1852.
- [8] 李萍,梁宗锁,陈德育,等.猪苓菌丝菌核的显微结构及其多糖含量研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(6):226-230.
- [9] 周元,梁宗锁.猪苓发酵菌丝胞内多糖提取工艺研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(6):227-235,242.
- [10] 李雯瑞,梁宗锁,陈德育.猪苓生物学特性的研究进展[J].西北林学院学报,2012(6):60-65.
- [11] 陈媛媛,张跃进,郭宏波.猪苓 EST-SSR 标记的开发及遗传多样性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [12] 杨新庆.猪苓的发展前景、目前出现的问题及对策[C]//2015 第二届全国猪苓会议资料汇编,2015.
- [13] 郭顺星.猪苓栽培和产品开发中关键问题探讨[C]//2015 第二届全国猪苓会议资料汇编,2015.

## Screening for Bagging Culture Conditions of *Polyporus*

GAO Qiaoni<sup>1</sup>, XIE Shuyu<sup>1</sup>, ZHANG Yuejin<sup>1</sup>, SUN Jianhua<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Shaanxi Hanwang TCM Technology Co. Ltd., Lueyang, Shaanxi 724300)

**Abstract:** Taking *Polyporus umbellatus* as test material, the mycelia growth and sclerotia formation of *Polyporus umbellatus* in different culture conditions by the traditional method of culturing fungi with PDA medium and bag material were studied. The mycelia growth rate of *Polyporus umbellatus* was measured by the scribe method, and the number, size and position of sclerotia formation were analyzed by counting method. The results showed that the best condition for *Polyporus* substitute cultivation was:  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 hours of darkness, the ratio of material to water of  $1:1.4(\text{kg}\cdot\text{L}^{-1})$ . The most suitable formula for bagging *Polyporus* cultivation was: sawdust 50%, the cotton seed hull 30%, bran 18%, gypsum 1%, quick lime 0.4%, sucrose 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%. The effects of different culture conditions on mycelia growth and sclerotia formation of *Polyporus umbellatus* were clarified, which could provide reference for the further production of *Polyporus umbellatus*.

**Keywords:** *Polyporus umbellatus*; bagging cultivation; artificial cultivation; sclerotium