

网络出版时间:2019-04-01 15:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.10.010
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190401.1518.020.html

土壤微生物发酵液对猪苓菌丝生长的影响

廉冬^a,徐梦馨^{1a},马珍璐^{1a},张小燕^{1b},张跃进^{1c},孙建华²

(1 西北农林科技大学 a 化学与药学院,b 农学院,c 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】【目的】研究土壤微生物发酵液对猪苓菌丝生长发育及胞外多糖质量浓度的影响,为其大规模人工栽培提供技术支持。【方法】从猪苓生活的土壤中分离微生物(细菌、放线菌、真菌),通过平板试验,筛选对猪苓菌丝或菌核生长有促进作用的菌株;用筛选出的微生物发酵液培养猪苓,以不添加发酵液的培养基为对照,比较不同发酵液处理对猪苓菌丝生物量及胞外多糖质量浓度的影响。【结果】平板培养中,细菌 L2、L3、L5、L9 处理菌丝均有分泌物出现;随着培养时间延长,菌丝颜色逐渐变黄变褐,除 L2 外,其余细菌菌株处理猪苓均有菌核生成;放线菌 A14 处理猪苓菌丝生长速度较快,但与对照差异不显著;真菌 P3 处理猪苓菌丝生长速度与对照相比显著提高。在液体培养基中,真菌 P4 发酵液可显著提高猪苓菌丝生物量,菌丝体干质量达 7.67 g/L,放线菌 A3 发酵液处理猪苓菌丝胞外多糖质量浓度最高,达 0.133 g/L。【结论】从土壤中筛选出了能够促进猪苓菌丝生长发育、提高猪苓胞外多糖质量浓度的菌株。

【关键词】 猪苓;土壤微生物发酵液;菌丝生长;胞外多糖

【中图分类号】 S567.3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)10-0080-07

Effect of fermentation broth of soil microbes on mycelial growth of *Polyporus umbellatus*

LIAN Dong^{1a}, XU Mengxin^{1a}, MA Zhenlu^{1a}, ZHANG Xiaoyan^{1b},
ZHANG Yuejin^{1c}, SUN Jianhua²

(1 a College of Chemistry & Pharmacy, b College of Agronomy, c College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Shaanxi Hanwang TCM Technology Co. Ltd, Lüeyang, Shaanxi 724300, China)

Abstract:【Objective】This study investigated the effects of fermentation broth of soil microorganisms on growth and development of hyphae and extracellular polysaccharide content of *Polyporus umbellatus* to provide support for its large-scale artificial cultivation.【Method】Soil microorganisms (bacteria, actinomycetes and fungi) were isolated from the soil with *Polyporus umbellatus*. The strains with the ability of promoting growth of hyphae or sclerotia were screened. Then the liquid fermentation of screened microorganisms were used and effects on mycelial biomass and extracellular polysaccharide content were analyzed.【Result】In solid culture, the bacterial treatment groups L2, L3, L5 and L9 had secretions. The color gradually turned yellow and brown. All bacterial fermentation broths promoted the formation of sclerotia except L2. The growth rate of actinomycetes mycelium in treatment A14 was faster, but was not significantly different from the control group. The fungi P3 treatment of the hyphae was faster, with significant difference from the control group. The yield of hyphae was significantly increased by P4 fermentation broth, with the rate of 7.67 g/L. A3 fermentation broth had the highest mycelia extracellular polysaccharide content of

【收稿日期】 2018-09-21

【基金项目】 陕西省统筹计划项目(2016KTCL02-10)

【作者简介】 廉冬(1994-),女,山西运城人,硕士,主要从事中药材规范化生产研究。E-mail:931447709@qq.com

【通信作者】 张跃进(1959-),男,陕西西安人,教授,硕士生导师,主要从事中药材规范化生产研究。E-mail:qxzhang@126.com

0.133 g/L。【Conclusion】 Strains were screened from soil to promote growth of hyphae and increase extracellular polysaccharide content of *Polyporus umbellatus*.

Key words: *Polyporus umbellatus*; fermentation broth of soil microbes; mycelium growth; extracellular polysaccharide

猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. 是我国传统的名贵中药,在分类学上属于真菌 Fungi、担子菌门 Basidiomycota、多孔菌目 Polyporales、多孔菌科 Polyporaceae、多孔菌属 *Polyporus*,其菌核入药始载于《神农本草经》,性平,味甘、淡,归脾、肾、膀胱经,具有利水渗湿、抗肿瘤、抗氧化等功效^[1]。现代研究发现,猪苓含有丰富的化学成分,如多糖类、甾体类、蛋白质类、氨基酸类、维生素类及微量无机元素类等^[2],其中多糖是猪苓药材的重要活性成分之一^[3],具有抗肿瘤、调节免疫力、保肝、抗辐射、抗诱变、抗菌等药理作用^[4]。近年来,人们对猪苓的需求越来越大,导致野生猪苓资源逐年减少,而人工栽培猪苓又存在产量低、周期长、优良种苓短缺、田间管理方式不当等诸多亟待解决的问题^[5-6],其中影响最大的问题是缺乏种性均一的种苓。前人从猪苓生活的土壤中分离出 1 种伴生菌,该伴生菌对猪苓菌核形成具有积极的促进作用,但作用机理不明,限制了其在猪苓栽培过程中的应用^[7-8]。高巧妮^[9]将猪苓菌丝与土壤微生物共培养后,发现有 4 种放线菌(A2、A6、A7、A9)在代料培养中能够促进猪苓菌丝生长及菌核形成。本研究对猪苓生活的土壤微生物进行分离纯化,研究土壤微生物发酵液对固体和液体培养猪苓菌丝生长及胞外多糖质量浓度的影响,筛选对猪苓生长具有促进作用的土壤微生物,为猪苓菌核形成及其大规模人工栽培提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 猪苓及土样 供试猪苓菌株由西北农林科技大学生命科学院提供,来源于陕西汉王略阳中药科技有限公司猪苓种植基地。土样采自陕西省略阳县猪苓种植基地猪苓穴中。

1.1.2 分离培养基 土壤细菌采用 LB 培养基,放线菌培养用淀粉硝酸盐培养基,真菌培养选用 PDA 培养基。

LB 培养基:酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂 1.5 g/L,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2。

淀粉硝酸盐培养基:可溶性淀粉 20 g/L,硝酸

钾 1 g/L,磷酸氢二钾 0.1 g/L,氯化钠 0.1 g/L,硫酸镁 0.1 g/L,硫酸亚铁 0.01 g/L,琼脂 20 g/L,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L,蒸馏水 1 000 mL, pH 自然。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤微生物的分离 采用稀释涂布平板法^[10-11]分离土壤微生物。

(1) 细菌。采用 LB 培养基,土壤原液稀释梯度为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 每梯度 5 个重复。28 °C 培养 2~3 d。

(2) 放线菌。灭菌结束待淀粉硝酸盐培养基温度降至 50 °C 左右,倒平板之前在每 1 000 mL 培养基中加入单独灭菌的体积分数 1% 的重铬酸钾 10 mL,稀释梯度为 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 每梯度 5 个重复。28 °C 培养 7~8 d。

(3) 真菌。灭菌结束待 PDA 培养基温度降至 50 °C 左右时,每 1 000 mL 中加入体积分数 1% 的链霉素 3 mL,以抑制细菌和放线菌生长,稀释梯度为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 每梯度 5 个重复。23 °C 培养 3~4 d。

上述试验待生长出菌落后,挑选形态差异较大的菌落划线纯化,纯化细菌编号为 L1~L9、放线菌编号为 A1~A17、真菌编号为 P1~P5。纯化菌种于 4 °C 冰箱冷藏备用。

1.2.2 土壤微生物发酵液的制备 将保存的细菌、真菌、放线菌菌种分别转接入 LB 培养基、淀粉硝酸盐培养基、PDA 斜面培养基上进行活化,再于平板培养基上培养,待菌落长出后,接种环蘸取细菌菌落于 LB 液体培养基中,180 r/min、37 °C 条件下培养 3~5 d;用接种针、接种环挑取放线菌菌落于淀粉硝酸盐液体培养基中,180 r/min、28 °C 条件下培养 7~14 d;用无菌打孔器(孔径为 0.5 cm)在真菌菌落边缘打孔,以 5 块/瓶的接种量接入 PDA 液体培养基中,150 r/min、25 °C 条件下培养 5~7 d。液体培养结束后,抽滤收集土壤微生物的液体发酵液,于 4 °C 冰箱冷藏备用。

1.2.3 土壤微生物发酵液对猪苓菌丝平板培养的影响 取 9 cm 培养皿,每皿加培养基 20 mL。将各新鲜的土壤微生物发酵液加入配制好的 PDA 培养

基中,每皿加 3 mL,pH 调至 5.5~6.0 后灭菌,每处理重复 5 次,以不添加任何微生物成分的纯 PDA 培养基为对照(CK)。在活化后的猪苓菌落边缘用直径 0.5 cm 的打孔器取样,将菌丝块置于平板培养基中央于 25 °C 黑暗下培养。接种后每 4 d 采用十字交叉法精确测定 1 次菌落直径,观察菌落形态并记录,计算猪苓菌丝生长速度(mm/d)。

菌丝生长速度 = 菌落半径(mm)/菌丝生长时间(d)。

1.2.4 土壤微生物发酵液对猪苓菌丝生物量及胞外多糖质量浓度的影响 在 250 mL 锥形瓶中添加 85 mL PDA 培养基与 15 mL 筛选出的微生物发酵液,CK 组每瓶装 100 mL PDA 培养基,调节 pH 5.5~6.0,于 1×10^5 Pa 下灭菌 20 min,待培养基冷却后,每瓶装 7 块猪苓菌丝,在 24 °C 黑暗环境下 150 r/min 培养 11 d 后,抽滤收集猪苓菌丝球及发酵液^[12],菌丝球用蒸馏水冲洗数次,置于 60 °C 烘箱

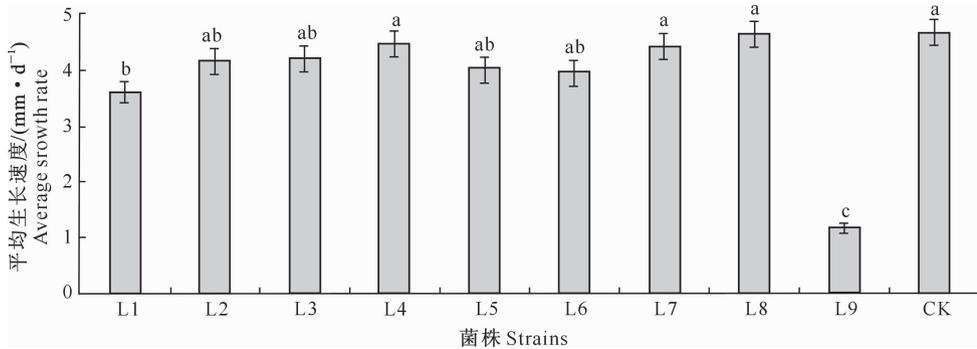
中烘干至恒质量,精确称质量。收集液体发酵液,采用蒽酮-硫酸法^[13-14]测定猪苓胞外多糖质量浓度。

1.2.5 数据处理 采用 Microsoft Excel 2010 软件处理数据及绘图,运用 SPSS 21 统计软件进行 k -均值聚类分析、方差分析和差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物发酵液对猪苓菌丝生长的影响

2.1.1 细菌发酵液 由图 1 可见,在 PDA 固体培养基上,9 种细菌发酵液对猪苓菌丝生长均有一定程度的抑制作用。在外部形态上,菌株 L1、L5、L7、L9 处理组菌丝较浓密,细菌 L2、L3、L5、L9 处理均有透明小液滴出现,随着培养时间延长,颜色逐渐变黄变褐。除菌株 L2 无菌核外,其他菌株在培养的 7~20 d 均出现直径 2~4 mm 的细小菌核,且随着培养时间延长,菌核色素沉积,渐渐由白色转为黑褐色(图 2),对照组无菌核及分泌物出现。

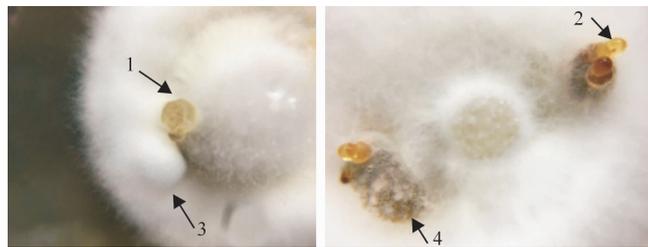


图柱上标不同小写字母表示各处理在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,下同

Different lowercase letters indicate significant difference in the $P < 0.05$ level among treatments, the same below

图 1 细菌发酵液对猪苓菌丝生长的影响

Fig. 1 Effects of bacterial broth on mycelial growth of *Polyporus umbellatus*



1. 培养初期猪苓形成的分泌物; 2. 培养后期分泌物颜色逐渐变深; 3. 培养初期形成的白色菌核; 4. 培养后期菌核颜色变深
1. Exudate formed in the initial stage of culture; 2. Color of the exudate gradually darken in the late culture;
3. White sclerotia formed in the initial stage of culture; 4. Color of sclerotia darken in the late culture period

图 2 细菌发酵液处理猪苓菌核及渗出液的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of sclerotia and exudate of *Polyporus umbellatus* during plate culture after bacterial broth treatments

采用 k -均值聚类分析将 9 个菌株按照平均生长速度分为 3 组,第 1 组含菌株 L4、L7、L8,第 2 组含菌株 L1、L2、L3、L5、L6,第 3 组含菌株 L9;猪苓菌

丝生长速度总体呈现第 1 组 > 第 2 组 > 第 3 组的趋势,且第 3 组与第 1、2 组菌株的菌丝生长速度存在显著差异($P < 0.05$);对照组菌丝生长速度最快,为

4.67 mm/d; 菌株 L9 发酵液处理猪苓菌丝生长速度最慢。由表 1 可知, $F = 16.685, P = 0.000, P < 0.05$, 说明添加 9 种细菌发酵液后, 猪苓菌丝生长速度存在显著差异。

表 1 不同细菌发酵液处理猪苓菌丝生长速度的方差分析

Table 1 Variance of growth velocity of mycelium of *Polyporus umbellatus* under different bacterial broth treatments

变异来源 Source of variation	方差 SS	自由度 df	均方差 MS	F	P
菌株组间 Interblock-group	27.963	9	3.107	16.685	0.000
菌株组内 Intra-group	3.724	20	0.186		
总变异 Total variation	31.687	29			

2.1.2 放线菌发酵液 由图 3 可见, 固体培养过程中, 17 种土壤放线菌发酵液对猪苓菌丝生长的促进作用均不显著。在外部形态上, 17 个菌株处理与对照组差异不大, 均没有出现菌核及分泌物。采用 k -均值聚类分析将 17 个菌株按照平均生长速度分为 3 组: 第 1 组含菌株 A3、A14, 第 2 组含菌株 A1、A4、A5、A6、A7、A8、A9、A10、A11、A12、A13、A16、A17, 第 3 组含菌株 A2、A15; 猪苓菌丝生长速度总

体呈现第 1 组 > 第 2 组 > 第 3 组的趋势。菌株 A3、A14 发酵液培养猪苓菌丝生长速度较快, 但与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 其中 A14 处理猪苓菌丝生长速度最快, 为 4.86 mm/d; 菌株 A2、A6、A10、A15 发酵液处理菌丝生长速度较慢。由表 2 猪苓菌丝生长速度方差分析结果可知, $F = 1.243, P = 0.265, P > 0.05$, 说明不同放线菌发酵液对猪苓菌丝生长无显著影响。

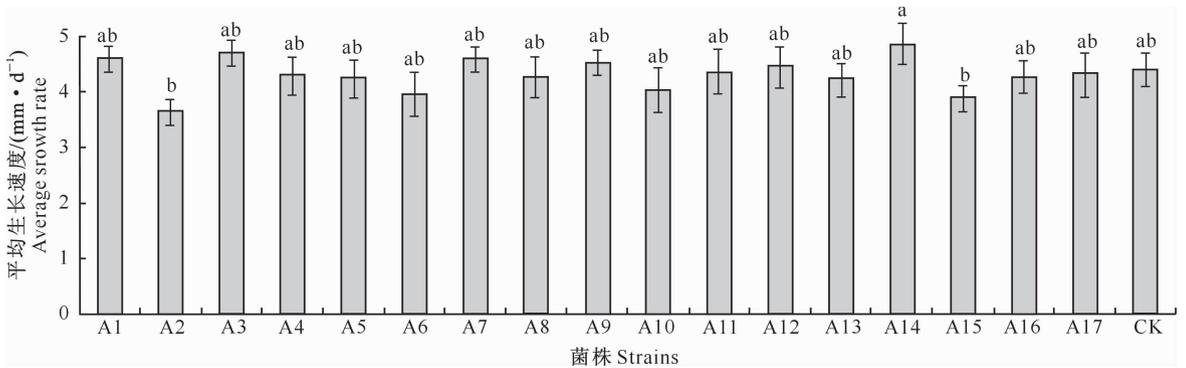


图 3 放线菌发酵液对猪苓菌丝生长的影响

Fig. 3 Effects of actinomycetes broth on mycelial growth of *Polyporus umbellatus*

表 2 不同放线菌发酵液处理猪苓菌丝生长速度的方差分析

Table 2 Variance of growth velocity of mycelium of *Polyporus umbellatus* under different actinomycetes broth treatments

变异来源 Source of variation	方差 SS	自由度 df	均方差 MS	F	P
菌株组间 Interblock-group	6.353	17	0.374	1.243	0.265
菌株组内 Intra-group	16.237	54	0.030		
总变异 Total variation	22.590	71			

2.1.3 真菌发酵液 在加入了 5 种土壤真菌发酵液的固体培养基上, 猪苓菌丝平均生长速度见图 4。由图 4 可知, 不同真菌发酵液对猪苓菌丝生长速度的影响表现为 $P3 > P4 > P1 > P5 > CK > P2$ 。在外部形态上, 菌株 P1、P2 处理猪苓菌丝较稀疏, 其余处理与对照组差异不大。

采用 k -均值聚类分析将 5 个菌株处理按平均生长速度分为 2 组, 第 1 组含菌株 P3, 第 2 组含菌株 P1、P2、P4、P5, 猪苓菌丝生长速度总体呈现第 1 组 > 第 2 组的趋势。

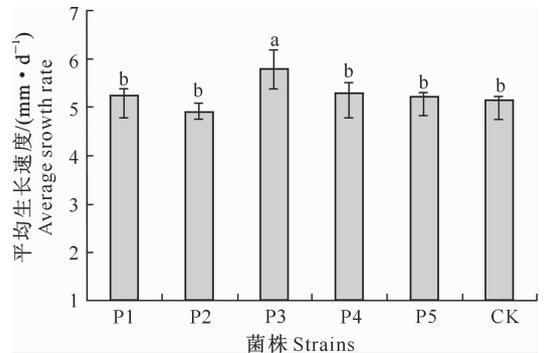


图 4 真菌发酵液对猪苓菌丝生长的影响

Fig. 4 Effects of fungus broth on mycelial growth of *Polyporus umbellatus*

菌株 P4、P1、P2、P5 间及其与对照组间菌丝生长速度均无显著差异($P>0.05$), 菌株 P3 处理猪苓菌丝生长速度显著高于其他菌株处理($P<0.05$), 14 d 时菌丝长满平板, 菌丝平均生长速度为 5.80 mm/d。菌株 P1、P4、P5 对猪苓菌丝生长的促进作用

表 3 不同真菌发酵液处理猪苓菌丝生长速度的方差分析

Table 3 Variance of growth velocity of mycelium of *Polyporus umbellatus* under different fungus broth treatments

变异来源 Source of variation	方差 SS	自由度 df	均方差 MS	F	P
菌株组间 Interblock-group	1.906	5	0.381	4.192	0.020
菌株组内 Intra-group	1.091	12	0.091		
总变异 Total variation	2.998	17			

2.2 土壤微生物发酵液对猪苓菌丝生物量及多糖质量浓度的影响

根据平板试验结果, 筛选出可用于后续试验的细菌 9 株, 为 L1~L9, 其中细菌 L2 处理有分泌物产生, 其余细菌处理均有猪苓菌核生成; 放线菌 2 株, 分别为 A3、A14, 处理后猪苓菌丝平均生长速度较快; 真菌 2 株, 分别为 P3、P4, 处理后猪苓菌丝平均生长速度较快。

2.2.1 菌丝生物量 从图 5 可以看出, 不同微生物发酵液处理猪苓菌丝体干质量差异较大, 其中 L2、

用较弱, 菌株 P2 有一定的抑制作用。猪苓菌丝生长速度方差分析结果(表 3)显示, $F=4.192$, $P=0.020$, $P<0.05$, 说明不同真菌发酵液对猪苓菌丝生长的影响存在显著差异。

L6、L7、P4 菌株处理菌丝体干质量较对照组显著增加($P<0.05$), 且以 P4 处理猪苓菌丝体干质量最大, 菌丝体干质量达 7.67 g/L, 说明 P4 菌株发酵液能显著提高猪苓菌丝的生产能力; 其次为菌株 L6、L2、L7。菌株 L1、L5、L8、L9 均在一定程度上抑制猪苓菌丝生长, 与对照组差异显著($P<0.05$)。13 个菌株处理猪苓菌丝体干质量由高到低依次为 $P4>L6>L2>L7>P3>L3>A3>L4>A14>L5>L1>L8>L9$ 。

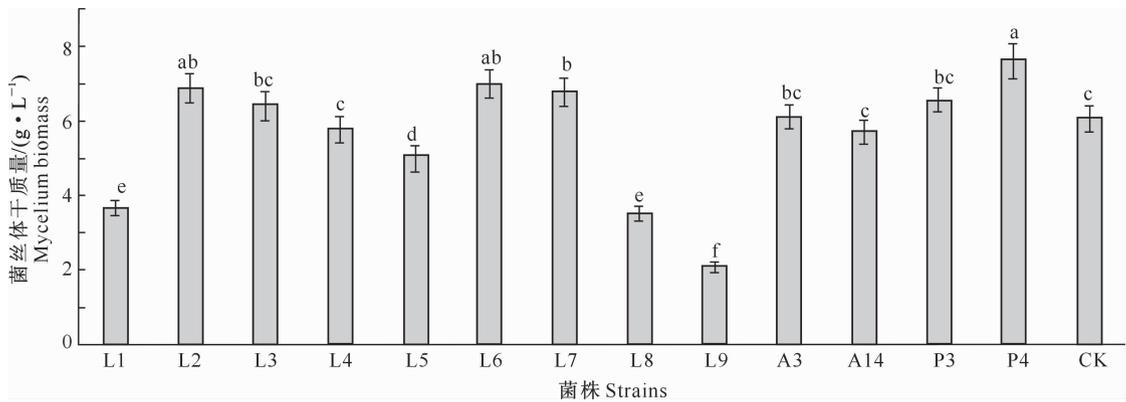


图 5 不同土壤微生物发酵液对猪苓菌丝生物量的影响

Fig. 5 Effects of different fermentation broths of soil microbes on biomass of *Polyporus umbellatus*

2.2.2 胞外多糖质量浓度 由图 6 可以看出, 不同微生物发酵液对猪苓菌丝胞外多糖质量浓度的影响各异。以放线菌 A3 处理猪苓胞外多糖质量浓度最高, 为 0.133 g/L, 其次为细菌 L1、L7、L8, 其余微生物处理组均较对照组低。其中菌株 L6 处理胞外多糖质量浓度最低, 为 0.068 g/L。13 种微生物处理胞外多糖质量浓度由高到低依次为 $A3>L1>L7>L8>L2>L9>A14>P3>L4>L5>P4>L3>L6$ 。

3 结论与讨论

本试验研究了猪苓生长环境中的土壤微生物发

酵液对其菌丝生长的影响。结果显示, 细菌发酵液均降低了猪苓菌丝的生长速度, 放线菌 A3、A14 和真菌 P3、P4 对猪苓菌丝生长有较明显的促进作用。从生长形态来看, 细菌 L1、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9 处理在培养 7~20 d, 均有菌核出现, 由此推测细菌发酵液中可能存在着能促进菌核形成的代谢产物或营养物质, 为猪苓菌丝生长及菌核形成提供了物质保障。关于细菌对猪苓菌核的影响目前尚未见相关报道。Colotelo 等^[15] 和 Georgiou 等^[16] 研究认为, 在真菌菌核形成阶段, 菌核表面会出现大量透明的小液滴, 随着培养时间延长, 小液滴会逐渐增大并

融合。菌核渗出液的出现及其与猪苓菌核形成是否有直接关系还需进一步研究。在液体培养中,综合猪苓菌丝生物量及胞外多糖质量浓度来看,细菌 L2、L7 和放线菌 A3 处理猪苓菌丝生物量及胞外多

糖质量浓度均较高,说明液体培养条件下,这 3 种微生物发酵液可明显促进猪苓菌株菌丝生物量增加与胞外多糖的积累,该结果可为开展猪苓工厂化生产提供了参考。

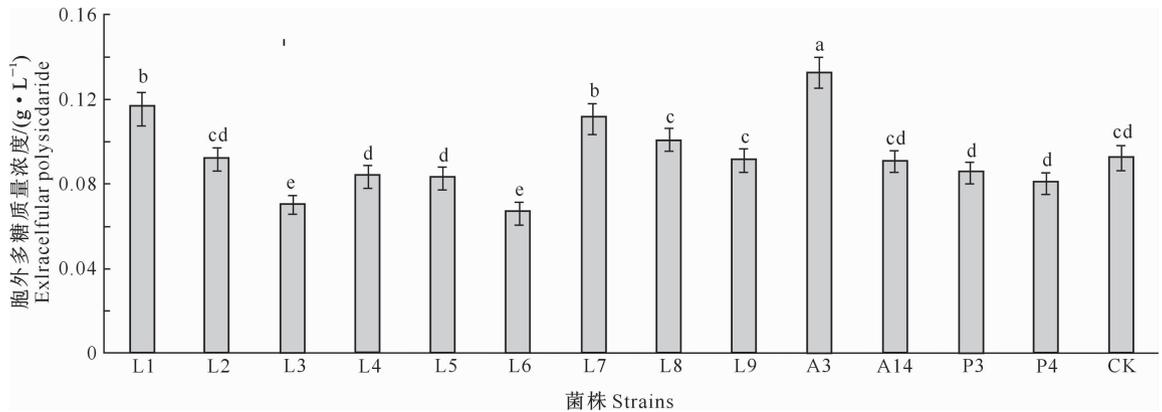


图 6 不同土壤微生物发酵液对猪苓菌株胞外多糖质量浓度的影响

Fig. 6 Effects of different fermentation broths of soil microbes on extracellular polysaccharide content of mycelial of *Polyporus umbellatus*

地球上的土壤微生物种类与数量十分庞大,通常 1 g 土壤中有几亿到几百亿个微生物,其种类和数量可随外界环境及土层深度的不同而变化^[17]。本研究分离土壤微生物采用的是传统的稀释涂布平板法,但此方法只是对土壤生境的简单人工模拟;而在实际操作中,由于土壤化学条件、环境结构及气候等因素不能满足大多数土壤微生物生长所需的实际生境,常会导致土壤中的绝大多数微生物无法培养^[18-19]。因此,其他未被分离纯化出的微生物也极有可能对猪苓菌核的形成具有一定促进作用。此外,土壤中对猪苓菌核形成起作用的可能不是单独某一菌株,而是由多种不同菌种组成的复杂的微生物群落结构^[20]。微生物发酵液的浓度对猪苓菌丝生长可能也有影响,故本试验只是对猪苓生长环境的土壤微生物进行了初步筛选,对于土壤微生物与猪苓菌核形成机制的联系还需深入探讨。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 299.
National Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 299.
- [2] 王天媛, 张飞飞, 任跃英, 等. 猪苓化学成分及药理作用研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(4): 109-112.
Wang T Y, Zhang F F, Ren Y Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Polyporus umbellatus* [J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese

Medicine, 2017, 51(4): 109-112.

- [3] 刘洪超, 杨小龙, 王淑英. 猪苓药理作用研究进展 [J]. 河南科技大学学报(医学版), 2011, 29(2): 159.
Liu H C, Yang X L, Wang S Y. Progress research on pharmacological activities of *Polyporus* [J]. Journal of Henan University of Science & Technology (Medical Science), 2011, 29(2): 159.
- [4] 陈晓梅, 田丽霞, 郭顺星. 猪苓化学成分及药理活性研究进展 [J]. 菌物学报, 2017, 36(1): 35-47.
Chen X M, Tian L X, Guo S X. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of sclerotia of *Polyporus umbellatus* (*Polyporaceae*, *Basidiomycota*) [J]. Mycosystema, 2017, 36(1): 35-47.
- [5] 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, 6(2): 119-123.
Xia Q, Zhou J, Li M, et al. Study advances on plant production of *Polyporus umbellatus* (Pers) Fr [J]. Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica, 2015, 6(2): 119-123.
- [6] 田飞, 曹晓燕, 王喆之, 等. 影响猪苓产量因素的调查研究 [J]. 陕西农业科学, 2010, 56(2): 106-109.
Tian F, Cao X Y, Wang Z Z, et al. Investigation and study on the factors affecting the yield of *Polyporus umbellatus* [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2010, 56(2): 106-109.
- [7] Guo S X, Wang Q Y, Zuang W Y, et al. Discovery and application of the companion fungus related to sclerotial formation from hyphae of *Grifola umbellata* [J]. Acta Botanica Sinica, 2002(10): 1151-1154.
- [8] 邢晓科, 郭顺星. 猪苓、伴生菌及蜜环菌共培养的形态学研究 [J]. 菌物系统, 2003(4): 653-660.
Xing X K, Guo S X. Morphological studies on dual and triple culture of *Grifola umbellata*, an unnamed companion fungus

- and *Armillariella mellea* [J]. *Mycosystema*, 2003(4): 653-660.
- [9] 高巧妮. 土壤微生物对猪苓菌核形成的影响 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- Gao Q N. Effects of soil microbial of *Polyporus umbellatus* sclerotium formation [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2017.
- [10] 樊莎. 猪苓种质资源的评价及菌核形成初探 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- Fan S. Evaluation on the germplasm resources of *Polyporus umbellatus* and preliminary study on the formation of the sclerotium [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2010.
- [11] 吴秋芳, 付亮, 路志芳. 土壤微生物分离纯化和分子鉴定实验研究 [J]. *安阳工学院学报*, 2016, 15(4): 27-29.
- Wu Q F, Fu L, Lu Z F. Purification and molecular identification experiments of microbe in soil [J]. *Journal of Anyang Institute of Technology*, 2016, 15(4): 27-29.
- [12] 豆宏瑶, 高慧娟, 黄金梅, 等. 猪苓菌丝体发酵条件的优化 [J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(15): 113-116.
- Dou H Y, Gao H J, Huang J M, et al. Optimization of fermentation condition for mycelium of *Polyporus umbellatus* [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 36(15): 113-116.
- [13] 刘鸿雁, 刘丽娜, 贾忠. 灵芝多糖提取工艺及含量测定 [J]. *甘肃医药*, 2017, 36(12): 1000-1002.
- Liu H Y, Liu L N, Jia Z. Extracting technology and quantitative determination of the ganoderma polysaccharides [J]. *Gansu Medical Journal*, 2017, 36(12): 1000-1002.
- [14] 王文洁, 唐炜, 俞玲娜, 等. 蒽酮-硫酸法与苯酚-硫酸法测定凉粉草多糖的比较 [J]. *食品科技*, 2017, 42(9): 274-279.
- Wang W J, Tang W, Yu L N, et al. Comparison of anthrone-sulfuric and phenol-sulfuric acid methods for determination of polysaccharide in *Mesona Blume* [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(9): 274-279.
- [15] Colotelo N, Sumner J L, Voegelin W S. Chemical studies on the exudate and developing sclerotia of *Sclerotinia sclerotium* (Lib.) De Bary [J]. *Can J Microbiol*, 1971, 17: 1189.
- [16] Georgiou C D, Papapostolou L, Geroge Z, et al. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress [J]. *Integrative & Comparative Biology*, 2006, 46(6): 691.
- [17] 马梦星. 陕西几种常见灌丛土壤微生物多样性分析 [D]. 西安: 西北大学, 2016.
- Ma M X. Analysis of microbial diversity of several common shrub soils in Shaanxi Province [D]. Xi'an: Northwestern University, 2016.
- [18] Pace N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere [J]. *Science*, 1997, 276(5313): 734-740.
- [19] 陈慧清, 李晓晨, 于学峰, 等. 土壤生态系统微生物多样性技术研究进展 [J]. *地球与环境*, 2018, 46(2): 204-209.
- Chen H Q, Li X C, Yu X F, et al. A review on technique progresses of microbial diversity in soil ecosystem [J]. *Earth and Environment*, 2018, 46(2): 204-209.
- [20] 林先贵, 胡君利. 土壤微生物多样性的科学内涵及其生态服务功能 [J]. *土壤学报*, 2008(5): 892-900.
- Lin X G, Hu J L. Scientific connotation and ecological service function of soil microbial diversity [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008(5): 892-900.