

网络出版时间:2014-01-02 16:02

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.062

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.062.html>

野生高产猪苓菌株分离培养条件研究

李雯瑞¹, 陈德育¹, 梁宗锁¹, 刘瑞芳², 孙建华²

(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责任公司, 陕西 略阳 724300)

【摘要】 **【目的】**研究野生猪苓菌株的最佳分离、培养方法, 为猪苓的深入研究和人工栽培提供参考。**【方法】**对采自陕西眉县太白山野生猪苓进行菌核组织分离和子实体孢子分离, 比较 2 种方法所得菌株菌丝的生长情况。以子实体孢子分离所得菌株为材料, 分析不同培养基、碳源、氮源、生长因子、矿质元素和栽培代料对其菌丝生长的影响。**【结果】**采用子实体孢子分离法所得猪苓菌株菌丝生长情况较菌核组织分离法好; PDA 培养基、GPY 培养基和麦芽汁培养基适用于野生猪苓菌的分离。分别以糊精、果糖为碳源, 蚕蛹粉、酪素为氮源时, 它们对猪苓菌丝生长的促进作用都非常显著; 以 1.2 mL/L 玉米浆作为生长因子时, 菌丝生长速率最高。适宜质量浓度的矿质元素对猪苓菌丝生长都有促进作用, 其中以 0.018 g/L MnSO_4 的效果最好; 用腐殖土、木棒和树叶为主要填充基质的代料更利于猪苓菌丝的生长。**【结论】**获得了野生猪苓菌株菌丝生长的最佳分离和培养条件。

【关键词】 猪苓; 分离培养; 菌丝生长; 萌发; 代料栽培

【中图分类号】 S646.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)02-0179-08

Isolation and culture conditions for high-yield strains of wild *Polyporus umbellatus*

LI Wen-rui¹, CHEN De-yu¹, LIANG Zong-suo¹,

LIU Rui-fang², SUN Jian-hua²

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Hanwang Lüeyang Chinese Medicine Science and Technology Co., Ltd., Lüeyang, Shaanxi 724300, China)

Abstract: **【Objective】** Optimal isolation and cultivation conditions for wild *Polyporus umbellatus* were studied to improve artificial cultivation of *P. umbellatus*. **【Method】** Wild *P. umbellatus* was obtained from Taibai mountain in Shaanxi province, China. Mycelial growth of strains obtained from sclerotium tissue isolation and fruiting body spore isolation was compared. Strains from fruiting body spore isolation were used to study the effects of culture medium, carbon source, nitrogen source, growth factor, mineral element and cultivation material on mycelial growth. **【Result】** The growth of strains isolated from fruiting body spore was better than that from sclerotium tissue, and PDA, GPY and wort mediums were suitable for the isolation of wild *P. umbellatus*. Carbon sources like dextrin and fructose, and nitrogen sources like silkworm chrysalis powder and casein, significantly promoted mycelial growth. The highest mycelial growth rate was found using 1.2 mL/L corn pulp as the growth factor. Mineral elements with appropriate mass concentrations also significantly upgraded mycelial growth, and 0.018 g/L of MnSO_4 was the best. Cultivation material using humus soil stick and leaves as the main filling materials was the best. **【Conclusion】** The optimal

【收稿日期】 2013-03-05

【基金项目】 陕西省“13115”重大科技专项(2010ZDKG-109); 国家工信部药材基地建设项目

【作者简介】 李雯瑞(1988—), 女, 宁夏银川人, 在读硕士, 主要从事药用真菌研究。E-mail: wrli227@163.com

【通信作者】 梁宗锁(1965—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事中草药规范化栽培理论与技术研究。E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

conditions for isolation and cultivation of wild *P. umbellatus* were obtained.

Key words: *Polyporus umbellatus*; isolated culture; mycelial growth; germination; substitute cultivation

猪苓 [*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries.] 属于真菌门 (Eumycota)、层菌纲 (Hymenomycetes)、非褶菌目 (Aphyllorphorales)、多孔菌科 (Polyporaceae)、多孔菌属 (*Polyporus*)^[1], 是传统的药用真菌, 由地上部分的子实体和地下的菌核构成, 菌核多年生, 为药用部分。猪苓味甘、淡, 性平, 有利水渗湿之效^[2]。

近年来, 由于人类大量采挖导致野生猪苓资源匮乏, 目前有关猪苓的人工栽培技术还不完善, 用野生菌核做种进行林地栽培, 产量低、周期长; 用传统的组织培养法分离的野生菌株在实验室内生长缓慢、易污染, 且需经过长期驯化培养。本研究分析不同的分离方法、培养基组分及添加物、栽培基质等对猪苓菌丝生长的影响, 以获取野生猪苓菌株的最佳分离培养条件, 为猪苓的大规模人工栽培提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试野生猪苓 (1) 子实体。供试野生猪苓子实体 (300 g 左右) 采自陕西省宝鸡市眉县境内太白山半阴坡的野生树林, 刚成熟、无病虫、无破损。采集地海拔 1 500~1 700 m, 年均气温 12.9 °C, 年均降水量 609.5 mm, 主要分布有栓皮栎、锐齿栎、侧柏、华山松、鹅耳枥和槭树等树种, 土壤类型主要为山地棕壤^[3]。

(2) 菌核。供试菌核取自于上述野生猪苓子实体下部 5~15 cm 土层。

1.1.2 培养基 PDA 培养基: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 值 6.0。

PDA 加富培养基: 马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, 维生素 B_1 0.01 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 值 6.0。

蛋白胨培养基: 麦芽糖 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 值 6.0。

麦麸培养基^[4]: 麦麸 30 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 值 6.0。

SM 培养基^[5]: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, KH_2PO_4 0.9 g/L, KCl 0.2 g/L, NH_4NO_3 1.0 g/L, 葡萄糖 15 g/L, Fe^{2+} 0.002 g/L, Mn^{2+} 0.002 g/L, Zn^{2+} 0.002 g/L, 维生素 B_1 0.000 1 g/L, 琼脂

20 g/L, pH 值 6.8。

孟加拉红培养基: 蛋白胨 5 g/L, 葡萄糖 10 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 孟加拉红 0.03 g/L, 氯霉素 0.1 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 值 7.2。

麦芽汁培养基: 每升麦芽汁 (固形物 45 g/L) 中加入琼脂 15 g, pH 值 6.0。

GPC 培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 6 g/L, 玉米浆 10 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 值 6.0。

GPY 培养基^[6]: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 6 g/L, 酵母膏 10 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 值 6.0。

完全培养基: 蛋白胨 4 g/L, 葡萄糖 20 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 维生素 B_1 5×10^{-5} g/L, 琼脂 20 g/L, pH 值 6.0。

1.2 试验方法

1.2.1 分离方法对猪苓菌丝萌发的影响 (1) 菌核组织分离法。先将猪苓菌核表面清洗干净, 用质量分数 0.2% 的金霉素溶液漂洗, 再用体积分数 75% 的酒精棉擦净消毒。在无菌环境下, 用刀片在菌核表皮环切一圈并掰开, 用无菌刀片和镊子在菌核内部挑取一块直径 0.5 cm 左右的菌肉, 迅速将其放入制备好的 PDA 加富斜面培养基上, 设置 5 个重复, 命名为菌株 1, 置于 23 °C 下黑暗培养^[7], 待菌丝萌发后, 挑选萌发快、长势旺的菌落, 转接于新的 PDA 加富斜面培养基上继续培养。

(2) 子实体孢子分离法。将猪苓子实体表面用质量分数 0.1% 升汞溶液消毒, 无菌水冲洗, 再用无菌滤纸将表面擦干, 用无菌刀切除多余菌柄, 菌柄朝下, 置于无菌的培养皿中收集孢子印^[8]。用无菌接种环从孢子印上沾取少量孢子, 在 PDA 加富斜面培养基上自下而上划线接种, 设置 5 个重复, 命名为菌株 2, 置于 23 °C 下黑暗培养, 待孢子萌发后, 挑选萌发快、长势旺的菌落, 转接于新的 PDA 加富斜面培养基上继续培养。

比较 2 种分离方法对猪苓菌丝萌发情况 (萌发时间、萌发率和萌发程度) 的影响。菌丝萌发程度和长势的判定标准分为 5 级, 分别为: +. 菌丝特别稀疏, 颜色淡黄, 生长缓慢; ++. 菌丝较稀疏, 颜色浅白, 生长较慢; ++++. 菌丝不稀疏, 颜色发白, 生长较快; +++++. 菌丝较浓密, 颜色雪白, 生长很快;

+++++. 菌丝非常浓密,颜色雪白,生长旺盛。

1.2.2 分离培养基对猪苓菌丝萌发的影响 分别用 GPY 培养基、GPC 培养基、麦芽汁培养基、麦麸培养基、PDA 培养基、PDA 加富培养基、蛋白胨培养基、孟加拉红培养基、SM 培养基作为野生猪苓的分离培养基,每处理 5 个重复。将猪苓菌株 2 接种于各培养基中,置于 23 ℃ 下黑暗培养,分析分离培养基对猪苓菌丝萌发的影响。

1.2.3 碳源对猪苓菌丝生长的影响 在无碳源的完全培养基中,分别加入糊精、果糖、山梨醇、甘露醇、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、甘油、葡萄糖(对照,CK)、半乳糖、木糖、乳糖和乙醇等作为碳源培养猪苓菌株 2,每处理 5 个重复,置于 23 ℃ 下黑暗培养,分析碳源对猪苓菌株 2 菌丝体长势和生长速率的影响。菌丝体生长速率的计算方法为:自接种 4 d 起,采用十字交叉法,每隔 2 d 测量 1 次菌落半径,直到菌丝长满平板,用菌落平均半径除以满板时间,即得生长速率。

1.2.4 氮源对猪苓菌丝生长的影响 在无氮源的完全培养基中,分别加入蚕蛹粉、酪素(水解酪蛋白)、蛋白胨(对照,CK)、脱脂牛奶、豆饼粉、酵母膏、牛肉膏、NaNO₃、尿素和(NH₄)₂SO₄ 等作为氮源培养猪苓菌株 2,每处理 5 个重复,置于 23 ℃ 下黑暗培养,分析氮源对猪苓菌株 2 菌丝体长势和生长速率的影响。

1.2.5 生长因子对猪苓菌丝生长的影响 在无生长因子的完全培养基中,分别加入 5 种生长因子培养猪苓菌株 2,每种生长因子质量浓度均设置 5 个梯度:维生素 B₁ (0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 μg/L)、维生素 B₆ (0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 μg/L)、维生素 AD (0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 μL/L)、赤霉素 (0.02,0.06,0.10,0.14,0.18 mg/L)、玉米浆(制作玉米淀粉的副产物,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL/L),以未添加任何生长因子的完全培养基为空白对照(CK),每处理 5 个重复,置于 23 ℃ 下黑暗培养,分析不同生长因子对猪苓菌株 2 菌丝体长势和生长速率的影响。

1.2.6 矿质元素对猪苓菌丝生长的影响 在无矿

质元素的完全培养基中,分别加入 5 种矿质元素培养猪苓菌株 2,每种矿质元素质量浓度均设置 5 个梯度: K₂SO₄ (3.0,2.5,2.0,1.5,1.0 g/L)、NaH₂PO₄ (0.15,0.12,0.09,0.06,0.03 g/L)、Mn-SO₄ (0.030,0.024,0.018,0.012,0.006 g/L)、Zn-SO₄ (0.033,0.030,0.027,0.024,0.021 g/L)、Cu-SO₄ (0.024,0.021,0.018,0.015,0.012 g/L),以未添加任何矿质元素的完全培养基为空白对照(CK),每处理 5 个重复,置于 23 ℃ 下黑暗培养,分析不同矿质元素对猪苓菌株 2 菌丝体长势和生长速率的影响。

1.2.7 栽培代料对猪苓菌丝生长和菌核形成的影响 (1)代料 1。代料总质量 400 g,其中含木屑 50%、棉籽壳 30%、麸皮 18%、石膏 1%、石灰 0.4%、蔗糖0.5%和 KH₂PO₄ 0.1% (以上均为质量分数),加适量蒸馏水拌匀,调 pH 值至 6.5,水分质量分数约 60%,混匀装袋,高温灭菌后接猪苓菌株 2 的液体菌种。

(2)代料 2。代料总质量 400 g,其中含腐殖土 50%、五角枫树叶 20%和椴木棒 30% (以上均为质量分数),加适量蒸馏水湿润腐殖土,调 pH 值至 6.5,水分质量分数约 60%。将腐殖土与树叶混匀后铺在袋子周围,中间插入高锰酸钾消毒的椴木棒,扎口高温灭菌后在木棒两端接猪苓菌株 2 的液体菌种。

用规格为 17 cm×33 cm,厚度为 0.045 cm 的聚丙烯塑料袋装料,每处理 5 个重复。菌株 2 的液体菌种接种量为 20 mL/袋,于 23 ℃ 黑暗下培养猪苓菌核,分析代料配方对猪苓菌丝萌发时间、满袋时间、菌丝体生长速率、长势和菌核形成时间的影响。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对试验数据进行分析,试验数据均以“平均值±标准差($\bar{X} \pm S$)”表示。

2 结果与分析

2.1 分离方法对猪苓菌丝萌发的影响

分离方法对猪苓菌丝萌发的影响见表 1。

表 1 分离方法对猪苓菌丝萌发的影响

Table 1 Influence of isolation method on mycelium germination of *Polyporus umbellatus*

分离方法 Isolation method	萌发时间/d Germination time	萌发率/% Germination rate	萌发程度 Germinating level
菌核组织分离法 Sclerotium tissue isolation	6	80	++
子实体孢子分离法 Fruiting body spore isolation	4	95	++++

从表 1 可以看出,采用子实体孢子分离法得到的菌株 2,其菌丝萌发时间、萌发率及萌发程度均优于菌核组织分离法,萌发时间短且萌发率高。用菌核组织分离法得到的菌株 1,菌丝萌发较慢且长势差,萌发率仅为 80%,且萌发的菌丝颜色灰黄无力;而用子实体孢子分离法分离时,从新鲜子实体收集有活力的孢子,将其接种于 PDA 加富培养基上,于 23 ℃ 黑暗培养,菌丝 4 d 萌发,污染率低,萌发率高达 95%,菌丝洁白且长势旺盛,在培养基表面呈现很多浓密的菌落。因此,子实体孢子分离法是分离野生猪苓菌株较优良的方法,后续试验均采用以子实体孢子分离法得到的菌株 2 进行。

表 2 分离培养基对猪苓菌丝萌发的影响

Table 2 Influence of isolation medium on mycelium germination of *Polyporus umbellatus*

分离培养基 Isolation medium	萌发时间/d Germination time	萌发率/% Germination rate	萌发程度 Germinating level
GPY 培养基 GPY medium	4	80	+++++
GPC 培养基 GPC medium	5	90	++++
麦芽汁培养基 Malt extract medium	5	95	++++
麦麸培养基 WBA medium	5	85	+++
PDA 培养基 PDA medium	4	100	+++++
PDA 加富培养基 PDA enriched medium	6	70	++
蛋白胨培养基 Peptone agar medium	7	40	++
孟加拉红培养基 Rose Bengal agar medium	7	40	+
SM 培养基 SM medium	8	10	+

2.3 碳源对猪苓菌丝生长的影响

本研究分析了 13 种碳源对猪苓菌株 2 菌丝生长的影响,结果见表 3。由表 3 可以看出,用含不同碳源培养基培养的猪苓菌丝生长速率差异总体达到显著水平($P<0.05$),其中糊精和果糖对菌丝生长有十分明显的促进作用,二者的菌丝生长速率与其

2.2 分离培养基对猪苓菌丝萌发的影响

由表 2 可见,在不同的分离培养基上,猪苓菌株 2 菌丝的萌发时间和程度差异较大,其在 GPY 培养基和 PDA 培养基中的萌发时间最短,4 d 后便长出新菌丝;菌丝萌发程度以 GPY 培养基最高,略大于 GPC 培养基、麦芽汁培养基和 PDA 培养基;PDA 培养基和麦芽汁培养基中猪苓菌丝的萌发率均较高,分别为 100%和 95%;而在富含矿质元素的 SM 培养基和可抑制细菌生长的孟加拉红培养基中,菌丝萌发时间、萌发率和萌发程度均较低。由此可见,麦芽汁培养基和 PDA 培养基及 GPY 培养基都是适合野生猪苓生长的最佳分离培养基。

他碳源差异极显著($P<0.01$),且糊精对菌丝生长速率的促进效果最显著,果糖对菌丝长势的促进效果最好。与常用碳源葡萄糖相比,木糖、乳糖和乙醇均极显著降低了猪苓菌丝的生长速率。可知糊精和果糖是猪苓菌株 2 菌丝生长的最佳碳源。

表 3 碳源对猪苓菌丝生长的影响

Table 3 Influence of carbon source on mycelial growth of *Polyporus umbellatus*

碳源 Carbon sources	长势 Growing trend	生长速率/(mm·d ⁻¹) Average growth rate	碳源 Carbon sources	长势 Growing trend	生长速率/(mm·d ⁻¹) Average growth rate
糊精 Dextrin	++++	0.480 7±0.008 0 aA	甘油 Glycerol	+	0.306 8±0.011 5 gF
果糖 Fructose	+++++	0.418 6±0.001 9 bB	葡萄糖(CK) Glucose	+++	0.289 4±0.001 8 hG
山梨醇 Sorbitol	+++	0.349 4±0.002 3 cC	半乳糖 Galactose	+	0.288 0±0.002 3 hG
甘露醇 Mannitol	+++	0.340 3±0.000 9 dD	木糖 Xylose	++	0.277 3±0.002 9 iH
麦芽糖 Maltose	++	0.325 3±0.003 1 eE	乳糖 Lactose	+	0.238 6±0.001 7 jI
蔗糖 Sucrose	++	0.321 0±0.006 0 efE	乙醇 Ethanol	0	0.001 3±0.000 9 kJ
可溶性淀粉 Soluble starch	+	0.318 4±0.002 3 fE			

注:“0”表示菌丝没有生长。同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$),标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note:“0” means no growth. Different uppercase letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$),while different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same below.

2.4 氮源对猪苓菌丝生长的影响

本研究分析了 10 种氮源对猪苓菌株 2 菌丝生长的影响,结果见表 4。由表 4 可以看出,除蛋白胨

与脱脂牛奶、尿素与(NH₄)₂SO₄ 处理菌丝生长速率无显著差异外,添加不同氮源后,猪苓菌丝生长速率差异显著($P<0.05$),其中蚕蛹粉和酪素对菌丝生

长有十分明显的促进作用,两者与其他氮源差异极显著($P<0.01$),且蚕蛹粉对菌丝生长速率的促进效果最明显,酪素对菌丝长势的促进效果较好。与常用氮源蛋白胨相比,有机氮源(脱脂牛奶、豆饼粉、

酵母膏、牛肉膏)和无机氮源(NaNO_3 、尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)均降低了菌丝的生长速率,尤以无机氮源抑制作用最为明显。可知蚕蛹粉和酪素是猪苓菌株 2 菌丝生长的最佳氮源。

表 4 氮源对猪苓菌丝生长的影响

Table 4 Influence of nitrogen source on mycelial growth of *Polyporus umbellatus*

氮源 Nitrogen sources	长势 Growing trend	生长速率/(mm·d ⁻¹) Average growth rate	氮源 Nitrogen sources	长势 Growing trend	生长速率/(mm·d ⁻¹) Average growth rate
蚕蛹粉 Silkworm chrysalis powder	+++	0.636 4±0.000 8 aA	酵母膏 Yeast extract	+++	0.334 2±0.003 3 eD
酪素 Casein	++++	0.566 4±0.002 0 bB	牛肉膏 Beef extract	++++	0.318 4±0.002 8 fE
蛋白胨(CK) Peptone	++++	0.424 3±0.002 3 cC	NaNO ₃	+	0.312 2±0.004 6 gF
脱脂牛奶 Skim milk	++	0.421 0±0.002 8 cC	尿素 Urea	0	0.001 6±0.001 0 hG
豆饼粉 Soybean powder	++	0.339 1±0.002 0 dD	(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0.001 4±0.000 8 hG

2.5 生长因子对猪苓菌丝生长的影响

本研究选取 5 种生长因子适宜菌丝生长的用量范围,分析了其对猪苓菌株 2 菌丝生长的影响,结果

见表 5。从表 5 可以看出,除维生素 B₁ 0.4 与 0.6 μg/L 处理外,其他生长因子不同梯度用量处理间的菌丝生长速率均存在极显著差异($P<0.01$)。

表 5 生长因子对猪苓菌丝生长的影响

Table 5 Influence of growth factor on mycelial growth of *Polyporus umbellatus*

生长因子 Growth factor	用量 Dosage	长势 Growing trend	生长速率/(mm·d ⁻¹) Average growth rate
维生素 B ₁ Vitamin B ₁	0.4 μg/L	+++	0.577 0±0.011 9 aA
	0.6 μg/L	++++	0.570 6±0.005 1 aA
	0.8 μg/L	++	0.553 3±0.005 8 bB
	1.0 μg/L	+	0.446 2±0.001 1 dD
	1.2 μg/L	+	0.434 2±0.001 5 dE
维生素 B ₆ Vitamin B ₆	0.4 μg/L	+	0.342 2±0.002 1 fF
	0.6 μg/L	++++	0.596 1±0.001 1 aA
	0.8 μg/L	+++	0.457 6±0.002 8 cC
	1.0 μg/L	++	0.453 7±0.000 6 dD
	1.2 μg/L	++	0.434 5±0.001 5 eE
维生素 AD Vitamin AD	0.5 μL/L	++++	0.592 3±0.001 2 aA
	1.0 μL/L	+++	0.527 1±0.001 0 bB
	1.5 μL/L	++	0.492 2±0.000 4 dC
	2.0 μL/L	+	0.392 3±0.008 7 eD
	2.5 μL/L	+	0.399 3±0.002 9 fE
赤霉素 Gibberellin	0.02 mg/L	+++	0.495 8±0.001 4 bB
	0.06 mg/L	++	0.469 1±0.001 7 cC
	0.10 mg/L	++	0.477 6±0.010 5 dD
	0.14 mg/L	+	0.369 7±0.002 4 eE
	0.18 mg/L	+	0.365 3±0.000 7 fF
玉米浆 Corn pulp	0.4 mL/L	+++++	0.757 6±0.001 7 dD
	0.6 mL/L	+++++	0.763 8±0.003 9 cC
	0.8 mL/L	++++	0.777 1±0.001 0 bB
	1.0 mL/L	+++	0.704 4±0.002 9 eE
	1.2 mL/L	+++++	0.811 3±0.001 1 aA
CK	0	+++	0.530 8±0.000 9 fF

由表 5 还可见,较低质量浓度的维生素 B₁ 对猪苓菌丝生长有明显的促进作用,随着维生素 B₁ 质量浓度的增加,菌丝生长速率呈下降趋势,当维生素 B₁ 质量浓度超过 0.8 μg/L 时,菌丝生长速率低于 CK。当维生素 B₆ 质量浓度为 0.6 μg/L 时,菌丝生长速率达到最大值,此时菌丝长势也最旺。低含量

的维生素 AD 可以促进菌丝生长,当维生素 AD 含量为 0.5 μL/L 时菌丝生长速率达到最大值,菌丝长势最佳;随着维生素 AD 含量的继续增加,菌丝生长速率极显著减低。赤霉素对菌丝生长有抑制作用,且随着赤霉素质量浓度的增加,其抑制作用也递增。玉米浆对菌丝生长的促进效果最明显,且随着

玉米浆含量的递增,菌丝生长速率明显增大,菌丝长势也旺。可知玉米浆是猪苓菌株 2 菌丝生长的最佳生长因子。

2.6 矿质元素对猪苓菌丝生长的影响

本研究选取 5 种各矿质元素适宜菌丝生长的质量浓度范围,分析了其对猪苓菌株 2 菌丝生长的影响,结果见表 6。从表 6 可以看出,各矿质元素不同质量浓度处理之间的菌丝生长速率大都存在显著或极显著差异。 K_2SO_4 各质量浓度处理下,菌丝生长速率均高于 CK,当 K_2SO_4 质量浓度为 1.0 g/L 时菌丝生长速率达到最大值,长势最佳。随着 NaH_2PO_4 质量浓度的增高,菌丝生长速率呈先升后降的趋势,当 NaH_2PO_4 质量浓度为 0.06 g/L 时菌

丝生长速率达到最大值,且长势最好,当 NaH_2PO_4 质量浓度过高时其反而抑制了菌丝生长。随着 $MnSO_4$ 质量浓度的增高,菌丝生长速率也呈现先升后降的趋势,当 $MnSO_4$ 质量浓度为 0.018 g/L 时菌丝生长速率最大,长势最好。与 CK 相比,各质量浓度的 $ZnSO_4$ 均能促进菌丝生长,并随着 $ZnSO_4$ 质量浓度增加,菌丝生长速率先升高后下降。当 $CuSO_4$ 质量浓度较低时,菌丝生长较好,随着 $CuSO_4$ 质量浓度的增高,菌丝生长速率逐渐降低,当 $CuSO_4$ 质量浓度达到 0.024 g/L 时,菌丝生长速率同 CK 相近。以上结果表明,矿质元素均能促进猪苓菌株 2 菌丝生长,其中以 0.018 g/L $MnSO_4$ 的效果最佳。

表 6 矿质元素对猪苓菌丝生长的影响

Table 6 Influence of mineral element on mycelial growth of *Polyporus umbellatus*

矿质元素 Mineral elements	质量浓度/(g · L ⁻¹) Mass concentration	长势 Growing trend	生长速率/(mm · d ⁻¹) Average growth rate
K_2SO_4	3.0	++	0.431 3±0.003 6 bB
	2.5	+++	0.434 5±0.002 7 bB
	2.0	++	0.406 3±0.001 5 dC
	1.5	++	0.415 8±0.003 5 cC
	1.0	++++	0.513 8±0.007 4 aA
NaH_2PO_4	0.15	++	0.312 5±0.002 8 eD
	0.12	+++	0.410 4±0.001 0 cC
	0.09	+++	0.431 3±0.001 6 bB
	0.06	++++	0.534 5±0.004 4 aA
	0.03	++	0.398 9±0.010 0 dC
$MnSO_4$	0.030	+++	0.448 3±0.001 7 cC
	0.024	++	0.410 3±0.004 7 dD
	0.018	++++	0.540 1±0.016 1 aA
	0.012	+++	0.529 8±0.002 0 aA
	0.006	+++	0.491 1±0.002 1 bB
$ZnSO_4$	0.033	++	0.423 5±0.002 1 dD
	0.030	++	0.440 0±0.002 0 bB
	0.027	+++	0.480 3±0.001 6 aA
	0.024	++	0.412 3±0.010 9 eE
	0.021	+++	0.435 1±0.002 4 cC
$CuSO_4$	0.024	++	0.322 3±0.002 7 eD
	0.021	++	0.369 1±0.001 5 dC
	0.018	+++	0.392 3±0.011 5 cB
	0.015	+++	0.428 7±0.001 3 aA
	0.012	++++	0.418 7±0.000 7 bA
CK	0	++	0.316 9±0.001 6 eD

2.7 栽培代料对猪苓菌丝生长和菌核形成的影响

本研究中的代料 1 为传统的以木屑、棉籽壳和麸皮等为主要填充基质,代料 2 是模仿野生条件的

以腐殖土、五角枫树叶和椴木棒为填充基质。栽培代料对猪苓菌丝生长和菌核形成的影响见表 7。

表 7 栽培代料对猪苓菌丝生长和菌核形成的影响

Table 7 Influence of substitute cultivation on mycelial growth and sclerotium formation of *Polyporus umbellatus*

方式 Pattern	萌发时间/d Germination time	满袋时间/d Bag full time	生长速率/(mm · d ⁻¹) Growth rate	长势 Growing trend	菌核形成时间/d Sclerotium forming time
代料 1 Substitute cultivation 1	5	61	2.459±0.061 5	++	79
代料 2 Substitute cultivation 2	4	48	3.125±0.042 3	++++	62

从表 7 可以看出,猪苓菌株 2 在代料 1 中的萌发时间长,菌丝满袋时间比代料 2 多 13 d,生长速率、长势都比代料 2 差,菌核形成时间比代料 2 晚 17 d。因此,代料 2 更适合猪苓的人工栽培。

3 讨 论

3.1 分离方法对猪苓菌丝萌发的影响

因猪苓子实体不常见,故常用的菌株分离方法为从菌核组织分离。但本研究结果显示,采用菌核组织分离法得到的猪苓菌株 1 的菌丝萌发较慢且长势较差,萌发菌丝颜色灰黄;此外,在 PDA 加富培养基上接种的组织块周围会有黑褐色分泌物渗透到培养基中,其颜色越深菌丝萌发越慢,对这些分泌物的化学成分尚不清楚,其可能是由猪苓组织分泌的一种抑制自身菌丝生长的物质,但具体成分有待进一步研究。

本研究中,用子实体孢子分离法得到的猪苓菌株 2 长势较好,而试验所子实体是在太白山发现的一丛较大的野生猪苓子实体,其地下部分的菌核产量也很高,属于高产优良菌株。孢子在条件适宜的 PDA 加富培养基上很快萌发;且菌株 2 菌丝洁白长势旺,在培养基表面出现很多浓密的菌落。

3.2 分离培养基对猪苓菌丝萌发的影响

本试验结果表明,GPY 培养基、PDA 培养基和麦芽汁培养基作为分离培养基时,猪苓菌株 2 菌丝萌发情况较好,而 SM 培养基和孟加拉红培养基不适宜作为猪苓菌株 2 的分离培养基。Cheng 等^[9]研究表明,培养基和碳源对猪苓菌核的形成有很大影响,麦芽汁培养基有助于猪苓菌核的形成。初步分析其原因可能是由于 GPY 培养基、PDA 培养基和麦芽汁培养基内有机营养物质含量较高,有利于菌丝的萌发,且菌丝长势好,不易受污染;而 SM 培养基内由于有机营养物质含量低,无机元素不能满足猪苓菌丝的生长,菌丝长势和萌发率也降低。邢晓科等^[4]的研究结果表明,猪苓菌在 SM 培养基上表现出明显的生长劣势。

PDA 加富培养基是在 PDA 培养基的基础上又添加了无机盐和维生素 B₁,从理论上而言,其营养物质更加全面,应该会促进猪苓菌丝的萌发,但在该培养基上猪苓菌株 2 菌丝萌发情况却不如 PDA 培养基。究其原因可能是因为维生素 B₁ 不耐高温,需在灭菌后加入,否则会增加培养基污染的概率,所以对结果产生了一定的影响。

3.3 碳源对猪苓菌丝生长的影响

本研究发现,猪苓菌株 2 在培养过程中,以果糖

为碳源时,菌丝形态最为特殊,菌丝纯白浓密蓬松,与其他碳源处理菌丝形态有着明显的差异,这与程显好等^[6]的研究结果一致;另外,Liu 等^[10]研究表明,果糖是影响猪苓菌核形成的重要因素。以无机碳源(如乙醇等)作为惟一碳源时,猪苓菌株 2 的菌丝萌发缓慢或几乎没有萌发,长势也较差,菌丝稀疏、颜色发黄,生命力不旺盛。相比之下,有机碳源对猪苓菌株 2 的菌丝生长的促进作用比较明显,菌丝萌发快,长势旺盛,浓密雪白。

在碳源的利用上,与单糖、双糖碳源相比,糖醇碳源如山梨醇、甘露醇等可使猪苓菌丝生长疏松、较厚且颜色纯白,这可能与碳源的化学结构、氧化还原电位有关^[6]。另外,菌丝对营养物质的摄取主要通过细胞的吸收作用,且只能吸收能透过细胞膜的单糖、醇、有机酸等小分子物质,因此菌丝对这些糖类的利用率较高,而像多糖类的复杂有机物则需要被菌体自身产生的胞外酶分解后才可被吸收利用^[11]。

3.4 氮源对猪苓菌丝生长的影响

本研究结果表明,与无机氮源相比,有机氮源对猪苓菌株 2 菌丝生长的促进效果较好,其中动物性氮源(蚕蛹粉、酪素等)的效果优于植物性氮源(豆饼粉)和微生物性氮源(酵母膏)。无机氮源中,NaNO₃ 有利于菌丝的生长,而以(NH₄)₂SO₄ 和尿素作为氮源时菌丝几乎不生长,这与程显好^[12]的研究结果相一致。另外,蚕蛹粉等含无机氮源、氨基酸、蛋白质等营养物质以及多种生长因子,属于复合氮源,可为菌丝生长提供足够的营养和能量来源,调节各种酶的活性,加快营养物质的摄取,从而促进其生长。而硝酸盐类氮源在真菌体内须首先形成 NH₄⁺ 才能再合成各种氨基酸^[11]。

3.5 生长因子对猪苓菌丝生长的影响

本研究所用的 5 种生长因子中,玉米浆对猪苓菌株 2 菌丝生长的促进效果最好,3 种维生素可以在低质量浓度下促进菌丝生长,而高质量浓度下则反之。维生素是组成各种酶活性基的重要部分。维生素 B₁ 在细胞内的碳循环中起重要作用,维生素 B₆ 与氨基酸代谢有关。Jonathan 等^[13]研究发现,维生素 B₁ 和维生素 B₆ 可以促进草菇菌丝的生长。赤霉素对菌丝的生长则有抑制作用,且随着质量浓度的增加,抑制作用增强。由于玉米浆具廉价、高效等优良特点,故可以作为猪苓生产实践中理想的生长因子。

3.6 矿质元素对猪苓菌丝生长的影响

综合本研究中供试的 5 种常用矿质元素,0.018

g/L MnSO_4 对猪苓菌株 2 菌丝生长的促进效果最好,低质量浓度的 K_2SO_4 和 CuSO_4 也可以促进菌丝生长,而随着 ZnSO_4 和 CuSO_4 质量浓度的增高,菌丝生长速率呈先升后降的趋势。整体而言,各矿质元素在其适宜质量浓度下都有促进菌丝生长的作用。Yue 等^[14]研究表明,适宜质量浓度的金属离子可以促进细胞的生长和新陈代谢,而金属离子质量浓度过高则会对细胞生长产生毒害作用。邱鹏程等^[15]的研究也表明, NaH_2PO_4 、 K_2SO_4 、 CuSO_4 、 ZnSO_4 4 种矿质元素对猪苓菌丝的生长起促进作用,这与本研究的结果一致。

3.7 栽培代料对猪苓菌丝生长和菌核形成的影响

本研究中,与传统代料 1 相比,代料 2 中腐殖土和木棒所含的营养物质较为丰富,适宜猪苓菌株 2 菌丝的生长和菌核的形成;此外,代料 2 中的椴木棒周围填充了腐殖土和树叶,其结构较代料 1 更为疏松,可以为菌丝的生长提供足够的空间和氧气。代料 1 结构较为紧实,由于在一端接种,菌丝生长到后期时代料底部空间小、氧气少,导致菌丝生长明显变慢。

4 结 论

本研究结果表明,不同分离方法获得的猪苓菌株差异较大,培养基的营养元素以及栽培方式等对猪苓菌丝的生长有很大影响。子实体孢子分离方法较传统的菌核组织分离法具有很大的优势,使猪苓菌株可以较快地适应人工培养环境。在 9 种培养基中,以 GPY 培养基、PDA 培养基和麦芽汁培养基作为分离培养基时,猪苓菌菌丝萌发时间短(4~5 d),长势也较好。碳源和氮源也是影响猪苓菌丝生长的重要因素,其中碳源糊精、果糖和氮源蚕蛹粉、酪素对猪苓菌丝生长的促进作用显著。生长因子对猪苓菌丝生长的影响也很显著,其中以玉米浆的促进效果最好。适宜质量浓度的矿质元素对猪苓菌丝的生长都有促进作用,其中以 0.018 g/L MnSO_4 的促进效果最好。不同栽培代料对猪苓菌丝生长和菌核形成的影响尤为重要,用腐殖土、木棒和树叶为主要填充基质的新型代料有利于菌丝的生长。但在实验室内人工培养的猪苓菌丝与野生猪苓菌丝还有差异。因此,将人工培养的猪苓纯菌种在野外林地进行大规模栽培时,一些关键技术仍需要继续研究。

[参考文献]

[1] 徐锦堂. 中国药用真菌学 [M]. 北京: 中国医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1997: 518-534.

Xu J T. Chinese medicinal fungi [M]. Beijing: China Medical University, Peking Union Medical University Joint Publishing House, 1997: 518-534 (in Chinese)

[2] 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, 27(6): 60-65.
Li W R, Liang Z S, Chen D Y. Research advance on biological characteristics of *Polyporus umbellatus* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(6): 60-65. (in Chinese)

[3] 徐明岗, 张建新, 赵一庆. 太白山北坡森林土壤性质的研究 [J]. 陕西林业科技, 1993(2): 1-5, 8.
Xu M G, Zhang J X, Zhao Y Q. A study on the properties of forest soil on the north slope of Taibai Mountain [J]. Shaanxi Forest Science and Technology, 1993(2): 1-5, 8. (in Chinese)

[4] 邢晓科, 郭顺星. 猪苓与其伴生菌在几种不同培养基上的生长特性 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(6): 417-420.
Xing X K, Guo S X. Study on growth characteristics of *Gri fola umbellata* and its companion fungus on different media [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005, 40(6): 417-420. (in Chinese)

[5] Okon Y, Chet I, Henis Y. Effects of lactose ethanol and cycloheximide and on sclerotium formation in *Sclerotium rolfsii* [J]. J Gen Microbiol, 1973(74): 251.

[6] 程显好, 郭顺星. 猪苓菌丝固体培养特性研究 [J]. 中药材, 2009, 32(1): 11-14.
Cheng X H, Guo S X. Research on the *Gri fola umbellata* mycelium solid culture characteristic [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(1): 11-14. (in Chinese)

[7] 李彩萍, 葛存梅. 猪苓纯菌种的分离及培养条件的研究 [J]. 食用菌, 2011(6): 15-16, 24.
Li C P, Ge C M. Research on the separation and culture conditions of the *Gri fola* pure strains [J]. Edible Fungi, 2011(6): 15-16, 24. (in Chinese)

[8] 陈少珍, 韦仕岩, 吴圣进, 等. 野生松乳菇菌丝的分离试验 [J]. 食用菌, 2004(1): 12-13.
Chen S Z, Wei S Y, Wu S J, et al. Separation experiments of wild *Lactarius delicious* mycelium [J]. Edible Fungi, 2004(1): 12-13. (in Chinese)

[9] Cheng X H, Guo S X, Wang C L. Factors influencing formation of sclerotia in *Gri fola umbellate* (Pers.) Pilat under artificial conditions [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(11): 1312-1317.

[10] Liu Y Y, Guo S X. Nutritional factors determining sclerotial formation of *Polyporus umbellatus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2009(49): 283-288.

[11] 向世华. 食用真菌的营养生理 [J]. 中国食用菌, 1990, 9(5): 13-14.
Xiang S H. Edible fungi nutrition physiology [J]. Edible Fungi of China, 1990, 9(5): 13-14. (in Chinese)