

黑脉羊肚菌固体培养基的制备 及其培养条件优化^①

张保顺¹, 叶孟婷¹, 刘清¹, 王建康¹, 罗楠轩¹,
杨昌庆¹, 朱昱蓉¹, 李逐波¹, 刘元喜²

1. 西南大学药学院·中医药学院, 重庆 400715; 2. 重庆市黔江区农业农村委员会, 重庆 黔江 409000

摘要:以黑脉羊肚菌为对象, 研究了不同固体培养基对菌种生长的影响. 通过以菌丝生长速度、密度和菌核为考察指标, 研究在不同碳源、氮源、无机盐及 pH 条件下羊肚菌菌丝体的生长状况, 从而优化培养基的制备工艺. 结果表明: 黑脉羊肚菌生长的最适条件为 2% 的葡萄糖碳源, 2 g/L 的蛋白胨氮源, MgSO₄ 无机盐, pH 值为 6.0. 该实验为今后羊肚菌的栽培奠定了坚实的基础.

关键词:羊肚菌; 菌丝体; 培养条件; 筛选

中图分类号: S646.7

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2020)06-0052-11

羊肚菌(*Morchella* spp.)又名羊肚菜、羊肚子、蜂窝蘑、美味羊肚菌、阳雀菌, 是羊肚菌科羊肚菌属所有种类的总称, 隶属菌物界(Fungi)、子囊菌门(Ascomycota)、盘菌纲(Discomycetes)、盘菌亚纲(Pezizomycetidae)、盘菌目(Pezizales)、羊肚菌科(Morchellaceae)、羊肚菌属(*Morchella*)^[1]. 羊肚菌是一类药食两用的野生大型真菌, 李时珍的《本草纲目》中有其“味甘, 寒, 无毒, 益肠胃, 化痰理气”^[2]的记载. 传统中医认为, 羊肚菌能益肠胃, 化痰理气, 治疗消化不良. 近代药理研究发现, 羊肚菌还具有保护肝脏^[3]、肾脏^[4]、抗衰老^[5]、抗肿瘤^[6]、降血脂^[7]和免疫调节作用^[8], 因此, 羊肚菌是一种不可多得的滋补食材.

如今国内外对于羊肚菌的研究较为广泛, 从羊肚菌的菌种分离、纯化、栽培、深加工到产品开发等都有报道. 目前报道的羊肚菌菌株分离方法主要有孢子分离、组织分离及基质分离, 由孢子分离得到的菌种纯度可靠^[9], 并且孢子分离萌发率较组织分离的萌发率更高^[10], 而采用组织分离和基质分离的方法分离成功率低, 污染率高^[11]. 孢子分离法明显优于其他方法, 但分离过程仍然存在部分污染问题. 羊肚菌菌丝体形态多样, 从同一试管中转接的菌落形态也存在差异性, 菌种存在不稳定性^[12]. 羊肚菌菌丝体的生长和菌核的形成是子实体产生的关键, 形成菌核是羊肚菌的一个重要特征^[13-14]. 菌核是菌丝体反复进行分枝和菌丝接合交织在一起的组织, 共同形成的致密且坚硬的特殊结构^[15], 是羊肚菌子实体形成的必经阶段^[16], 不同羊肚菌种所形成的菌核, 在大小、形状、颜色、数量上存在很大的遗传差异性^[17]; 同一种菌株在不同培养条件下, 菌核差异性也较大. 因此菌核是菌种筛选、培养和栽培过程中研究的关键参考指标. 国内 20 世纪 70 年代初引入羊肚菌人工栽培技术, 开始探讨羊肚菌的人工化栽培^[18]. 目前羊肚菌栽培方式多样, 主要有大田^[19]、林下^[20]和箱栽技术^[21]. 但是, 3 种栽培模式都是以 3 大技术作为支撑: 即以品种技术为基础, 外源营养袋技术为核心, 栽培管理技术为桥梁. 在实际栽培生产中, 存在大田出菇不稳定和室内栽培

① 收稿日期: 2019-06-08

基金项目: 重庆市科学技术局社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2017shms-zdyfX0061, cstc2017shms-xdny80016).

作者简介: 张保顺(1979-), 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药化学和天然产物化学的研究.

不出菇的状况^[22]。从市场发展角度来看, 目前我国对于羊肚菌的栽培技术并不完全成熟^[23]。羊肚菌对生长环境的温度、湿度、光照、氧气、pH 均有比较苛刻的要求^[24], 加之栽培用地、田间管理、病虫害防治很大程度上影响着羊肚菌的产量和品质, 故而成熟的羊肚菌栽培技术仍在探索中。筛选合适的羊肚菌培养条件, 对提高羊肚菌分离纯化效果、羊肚菌出菇稳定性以及羊肚菌栽培具有重要意义。本文通过研究不同的碳源、氮源、无机盐以及 pH 对羊肚菌菌丝体生长状况的影响, 筛选出更适合羊肚菌的培养条件, 最大限度地提高羊肚菌菌丝体生长及菌核形成的能力, 为羊肚菌人工栽培的最适生长条件提供数据参考, 有助于羊肚菌的规模化人工栽培。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株为黑脉羊肚菌(重庆市璞琢农业开发有限责任公司)。

1.2 培养基

培养基 I: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 硫酸镁 0.5 g, 琼脂 25 g, 蒸馏水 1 000 mL。
培养基 II: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 2 g, 琼脂 25 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.3 试验仪器

正置荧光显微镜: NIKON 公司; HWS 智能恒温恒湿保温箱: 宁波东南仪器有限公司; JA2003 电子天平: 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 自动蒸汽消毒锅: 上海善志仪器设备有限公司; 超净工作台: 广州市深华生物技术有限公司。

1.4 试验设计

1.4.1 碳源试验

将培养基 I 作为碳源试验的基础培养基, 分别用 20 g 的乳糖、半乳糖、山梨醇、果糖、海藻糖、甘露醇、糊精、木聚糖、棉子糖共 9 种碳源, 替换培养基 I 中的 20 g 葡萄糖, 同时, 把不加碳源的培养基作为对照 (CK), 制作成 11 种培养基 (含 CK), 即为 11 个处理的碳源试验, 每个处理设置 3 次重复。

1.4.2 氮源试验

将培养基 I 作为氮源试验的基础培养基, 分别用 0.02, 0.2, 2 g 的酵母浸膏、亚硝酸钠、氯化铵、硫酸铵、尿素和过硫酸铵 (0.02, 0.002 g) 共 6 种氮源, 替换培养基 I 配方中的 2 g 蛋白胨, 同时, 以不加氮源作为对照 (CK), 分别制作成 21 种平板培养基, 即为 21 个处理 (含 CK) 的氮源试验, 每个处理设置 3 次重复。

1.4.3 无机盐试验

培养基 II 作为无机盐试验的基础培养基, 分别加入 300, 500, 700 mg 的磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钠和碳酸钾于培养基 II 中, 加入 10, 30, 50 mg 的氯化钴、硫酸锌、硫酸铜、硫酸镁于培养基 II 中, 以不加任何无机盐的培养基 II 作为对照 (CK), 分别制作成 25 种平板培养基, 即为 25 个处理 (含 CK) 的无机盐试验, 每个处理设置 3 次重复。

1.4.4 pH 试验

将培养基 I 作为 pH 试验的基础培养基, 用 1% NaOH 和 1% HCl 调节培养基 pH 值为 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 分别制成 6 种平板培养基, 即为 6 个处理的 pH 试验, 每个处理设置 3 次重复。

1.4.5 验证试验

通过把单因素筛选出来的最好条件与基础培养基 I 进行对比, 观察菌丝生长速度、菌丝密度以及菌核的形成, 筛选出黑脉羊肚菌生长的最佳组合。

1.5 试验方法

采用直径为 100 mm 的培养皿, 每个培养基用量 25 mL, 无菌操作, 于皿中央处接种一块直径大约为 5 mm 的菌饼, 在湿度为 (45±1)%, 温度为 (22±1)℃ 的培养箱中避光培养。以菌丝刚好延伸至平皿边缘时记录其生长时间, 以接种菌饼中心到菌丝生长最远距离为半径, 测定菌丝生长速度, 观察菌丝的密度和菌核生长情况。

1.6 数据分析

实验数据用 SPSS 20，GraphPad Prism 5 等进行分析处理.

2 结果与分析

2.1 羊肚菌生长形态观察

2.1.1 在碳源培养基上培养不同时间的羊肚菌生长形态观察

不同时间的羊肚菌菌落形态见图 1.

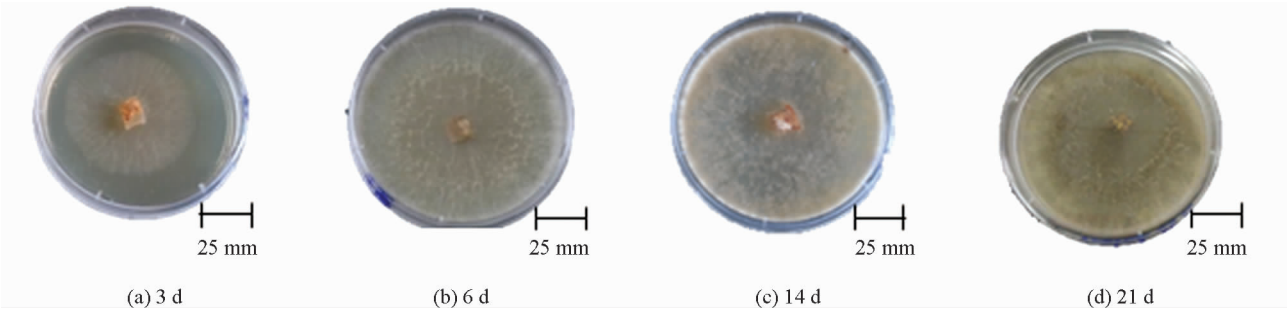
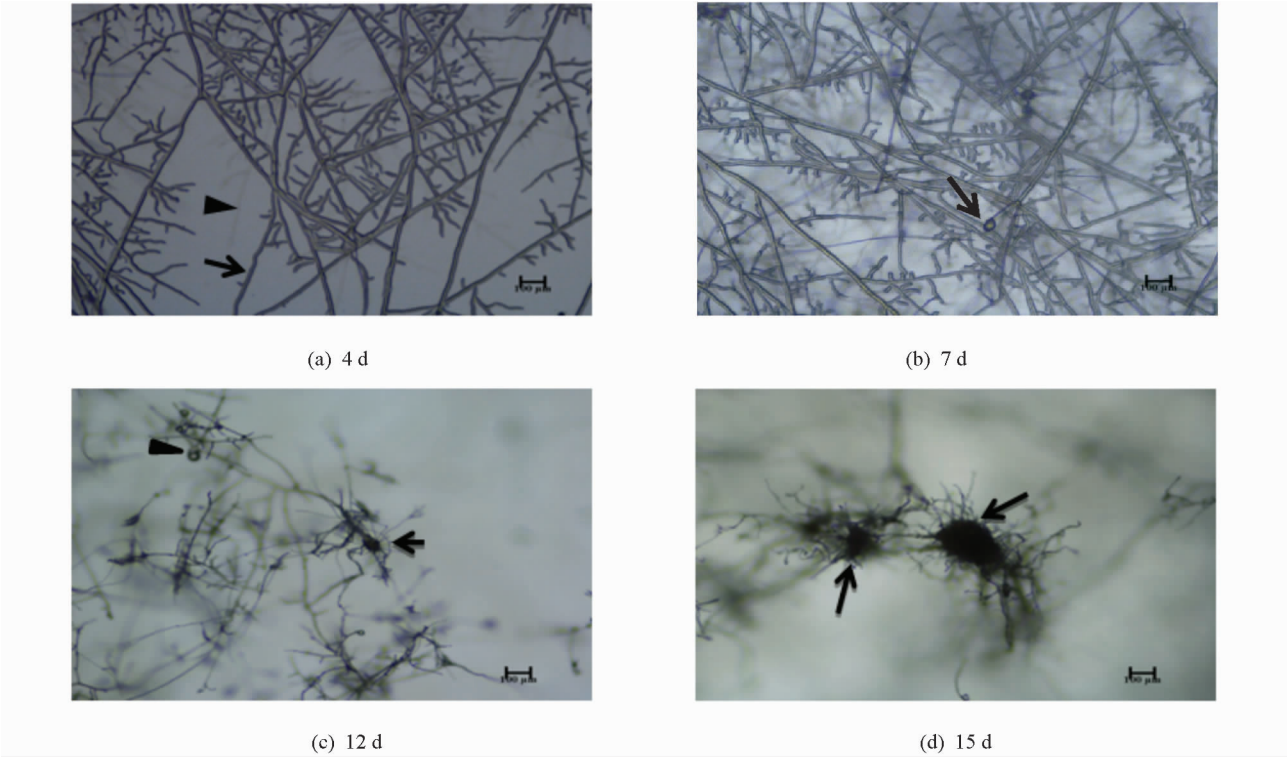


图 1 不同时间的羊肚菌菌落形态

2.1.2 在正置荧光显微镜下培养不同时间观察羊肚菌的生长状况

羊肚菌显微观察见图 2.



a 为培养 4 d 的菌丝体形态，黑色箭头指向气生菌丝，黑色三角形指向营养菌丝；b 为培养 7 d 的羊肚菌菌丝形态，黑色箭头指向气生菌丝产生的小水珠；c 为培养 12 d 的羊肚菌气生菌丝，开始部分扭结成菌核，黑色箭头指向菌核，黑色三角形指向气生菌丝产生的小水珠；d 为培养 15 d 的羊肚菌菌丝，扭结程度加深，菌核形成加快，黑色箭头指向菌核.

图 2 羊肚菌显微视图

2.2 碳源对羊肚菌菌丝生长状况的影响

碳源是微生物生长的一类营养物，主要作用是微生物生长代谢提供细胞的碳架，提供细胞生命活动所需的能量，为微生物或细胞的正常生长、分裂提供物质基础. 本试验选择了 10 种质量浓度为 2% 的不同

碳源, 结果表明: 在不同的碳源培养条件下菌丝都能生长, 但是生长状况存在统计学意义, 并且浓密程度亦存在明显的统计学意义. 其中, 在以 2% 的葡萄糖、海藻糖、乳糖、甘露醇、半乳糖和糊精为碳源的培养基上, 菌丝日均生长速度更快; 在以 2% 的木聚糖为碳源的培养基上, 菌丝日均生长速度最慢; 同时, 在以 2% 的葡萄糖为碳源的培养基上, 菌丝生长密度最高, 海藻糖、半乳糖棉子糖和糊精密度次之; 葡萄糖、甘露醇菌核形成情况较好, 见表 1, 图 3.

表 1 不同种类的碳源对羊肚菌菌丝生长的影响

碳 源	菌落生长速度/ (mm · d ⁻¹)	差异显著性		菌核形成	菌丝致密度
		0. 05	0. 01		
CK	12. 23	c	DE	—	薄
葡萄糖	17. 72	a	A	+++	致密
木聚糖	9. 95	d	F	—	稀疏
山梨醇	13. 08	c	CDE	—	稀疏
棉子糖	14. 68	b	BCD	+	致密
乳糖	16. 20	ab	AB	+	稀疏
半乳糖	15. 02	b	ABC	—	致密
甘露醇	16. 20	ab	AB	+++	稀疏松散
海藻糖	17. 63	a	A	+	致密
果糖	11. 30	cd	E	—	稀疏
糊精	15. 61	ab	ABC	+	致密

注: —表示菌核未形成, +表示菌核形成一般, +++表示菌核形成良好; 具有相同字母的组别差异无统计学意义.

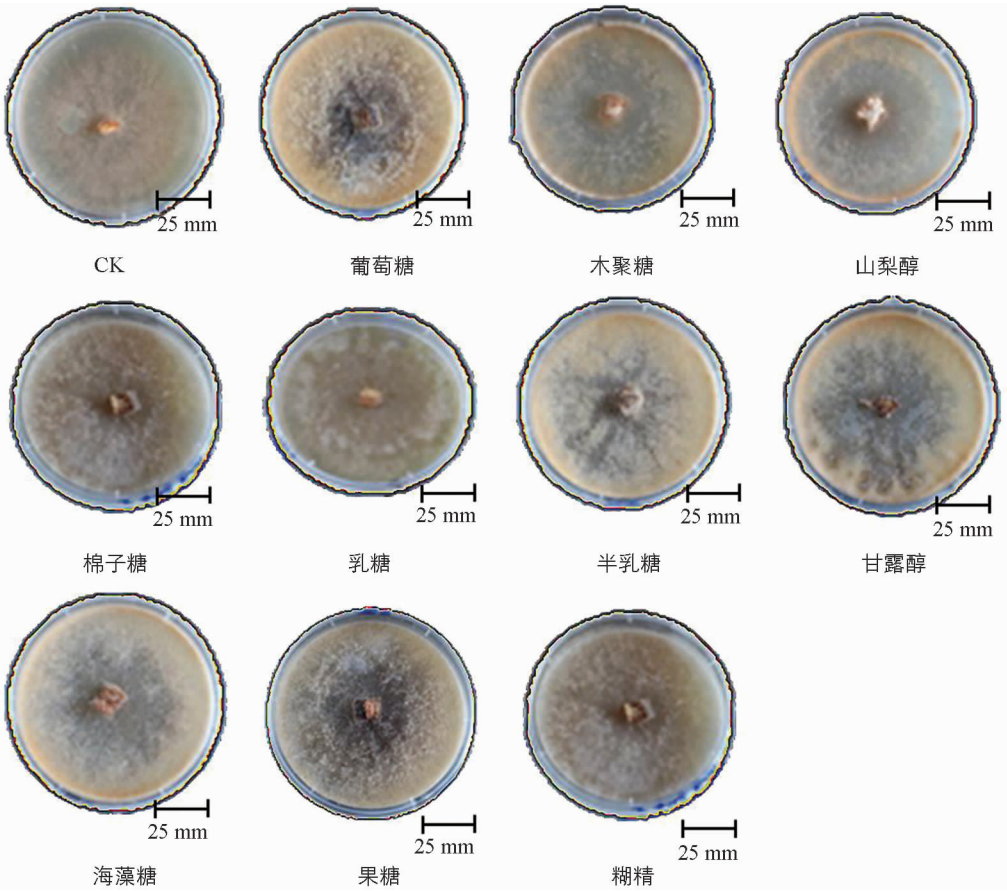


图 3 在不同种类的碳源培养基上羊肚菌的生长状况

综合试验结果表明：不同碳源对羊肚菌菌丝生长速度和菌丝致密度有不同程度的影响，在以 2% 的葡萄糖为碳源的培养基上，羊肚菌菌丝生长状况最好。所以 2% 的葡萄糖是黑脉羊肚菌生长的最适碳源。

2.3 氮源对羊肚菌菌丝生长状况的影响

氮源是能提供给微生物细胞组成成分或代谢产物中的氮素来源的营养物质，是合成蛋白质、核酸的重要原料，在细胞代谢中起着至关重要的作用。本试验选择不同的氮源，每种氮源设计了 3 个不同的浓度，试验结果表明：菌丝都能够生长，生长速度有统计学意义，并且浓密程度亦存在明显的统计学意义。其中在以 0.2 g/L 尿素，0.2 g/L 硫酸铵，0.2 g/L 亚硝酸钠，2 g/L 亚硝酸钠，0.2 g/L 过硫酸铵，2 g/L 蛋白胨为氮源的培养基上，菌丝日均生长速度更快；在以 2 g/L 尿素为氮源的培养基上，菌丝日均生长速度最慢；同时在以 2 g/L 酵母浸膏，0.2 g/L 过硫酸铵，2 g/L 蛋白胨为氮源的培养基上，菌丝生长更为浓密，见表 2，图 4。

综合试验结果表明：不同氮源对羊肚菌菌丝生长速度有不同程度的影响，在以 2 g/L 蛋白胨为氮源的培养基上，羊肚菌生长状况最好，故黑脉羊肚菌的最适氮源为 2 g/L 蛋白胨。

表 2 不同种类的氮源对羊肚菌菌丝生长的影响

氮 源	菌落生长速度/ (mm · d ⁻¹)	差异显著性		菌核形成	菌丝致密度
		0.05	0.01		
CK	6.72	f	G	—	薄
0.02 g/L 尿素	10.80	d	CD	+	稀疏
0.2 g/L 尿素	13.79	a	A	+	稀疏
2 g/L 尿素	3.65	g	H	—	稀疏
0.02 g/L 硫酸铵	10.59	d	D	—	稀疏
0.2 g/L 硫酸铵	13.45	ab	AB	++	致密
2 g/L 硫酸铵	10.80	d	CD	+	致密
0.02 g/L 酵母膏	6.95	f	FG	—	稀疏松散
0.2 g/L 酵母浸膏	10.54	d	D	+	致密
2 g/L 酵母浸膏	12.53	bc	AB	+	厚实浓密
0.02 g/L 亚硝酸	6.89	f	FG	—	稀疏
0.2 g/L 亚硝酸钠	13.86	a	A	++	稀疏
2 g/L 亚硝酸钠	12.87	abc	AB	—	薄
0.02 g/L 氯化铵	8.11	e	EFG	—	稀疏
0.2 g/L 氯化铵	12.18	c	BC	+	致密
2 g/L 氯化铵	11.15	d	CD	+	稀疏
0.02 g/L 过硫酸	8.52	e	E	—	稀疏
0.2 g/L 过硫酸铵	13.45	ab	AB	—	浓密
0.02 g/L 蛋白胨	6.89	f	FG	—	稀疏松散
0.2 g/L 蛋白胨	8.25	e	EF	+	稀疏松散
2 g/L 蛋白胨	13.56	ab	AB	++	厚实浓密

注：—表示菌核未形成，+表示菌核形成一般，++表示菌核形成良好；具有相同字母的组别差异无统计学意义。

2.4 无机盐对羊肚菌菌丝生长状况的影响

2.4.1 单因素试验

无机盐在菌丝生长过程中起到不可或缺的作用。试验选择了 8 种不同的无机盐，每种无机盐分别设置 3 个浓度梯度。结果表明：不同的无机盐及浓度对菌丝生长状况有不同的影响，其中，在以 MgSO₄ 为无机盐的培养基上，菌丝日均生长速度最快；但差异并无统计学意义；以 MnSO₄ 为无机盐的培养基上，菌丝日均生长速度次之。以 CuSO₄，ZnSO₄，CoCl₂，K₂CO₃，NaCl，KH₂PO₄ 为无机盐的培养基上，菌丝生长有显著性抑制作用，见表 3，图 5—7。

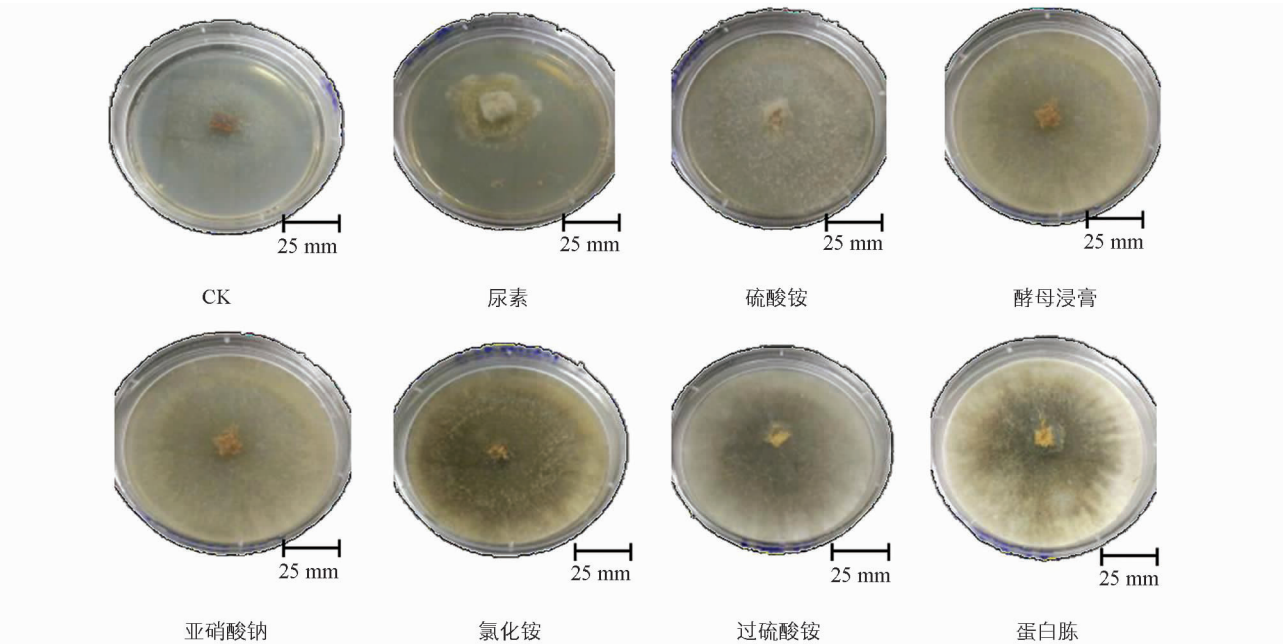


图 4 在不同种类的 2 g/L 的氮源(0.2 g/L 过硫酸铵)培养基上羊肚菌的生长状况

表 3 不同种类的无机盐对羊肚菌菌丝生长的影响

无机盐	菌落生长速度/ (mm · d ⁻¹)	差异显著性		菌核形成	菌丝致密度
		0.05	0.01		
CK	13.24	ab	A	—	很致密
0.001% CuSO ₄	9.86	c	B	—	稀疏
0.003% CuSO ₄	13.60	ab	A	—	稀薄
0.005% CuSO ₄	12.95	b	A	—	稀薄
0.001% ZnSO ₄	10.34	c	B	+	致密
0.003% ZnSO ₄	9.73	c	B	+	致密
0.005% ZnSO ₄	7.10	d	C	—	薄
0.001% MnSO ₄	13.42	ab	A	+	致密
0.003% MnSO ₄	14.37	ab	A	+	很致密
0.005% MnSO ₄	13.78	ab	A	++	很致密
0.001% CoCl ₂	5.49	e	D	—	稀疏
0.003% CoCl ₂	4.21	f	D	—	稀疏松散
0.005% CoCl ₂	4.10	f	D	—	稀疏松散
0.03% K ₂ CO ₃	10.51	c	B	+	致密浓厚
0.05% K ₂ CO ₃	5.57	e	D	+	很致密
0.07% K ₂ CO ₃	10.42	c	B	+	很致密
0.03% MgSO ₄	14.73	a	A	++	很致密
0.05% MgSO ₄	14.73	a	A	++	致密
0.07% MgSO ₄	14.55	a	A	++	致密浓厚
0.03% NaCl	10.03	c	B	++	很致密
0.05% NaCl	10.90	c	B	+	很致密
0.07% NaCl	9.82	c	B	+	致密浓厚
0.03% KH ₂ PO ₄	10.68	c	B	+	致密
0.05% KH ₂ PO ₄	9.99	c	B	+	致密
0.07% KH ₂ PO ₄	9.99	c	B	+	致密

注：—表示菌核未形成，+表示菌核形成一般，++表示菌核形成良好；具有相同字母的组别差异无统计学意义。

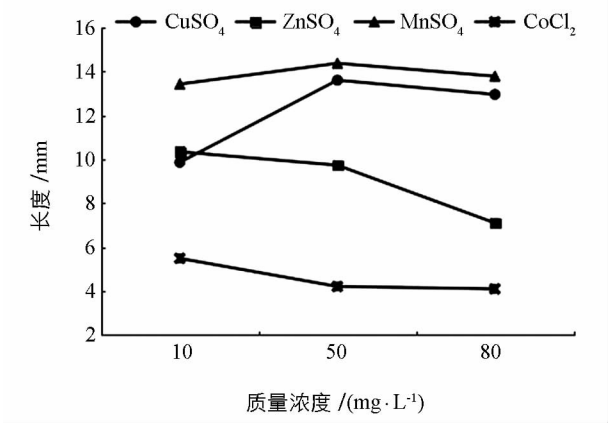


图 5 含微量矿物质元素无机盐对羊肚菌菌丝生长的影响

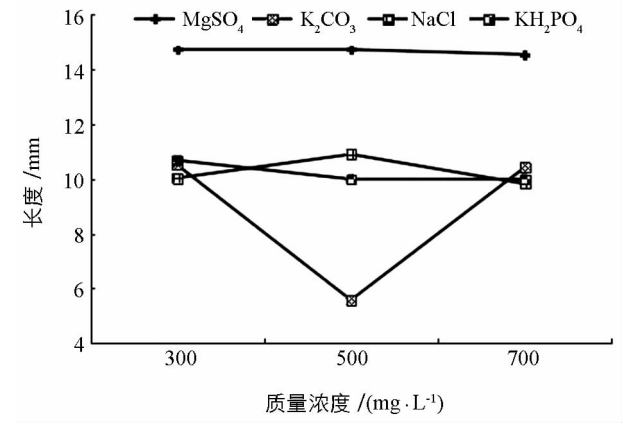


图 6 含常量矿物质元素无机盐对羊肚菌菌丝生长的影响

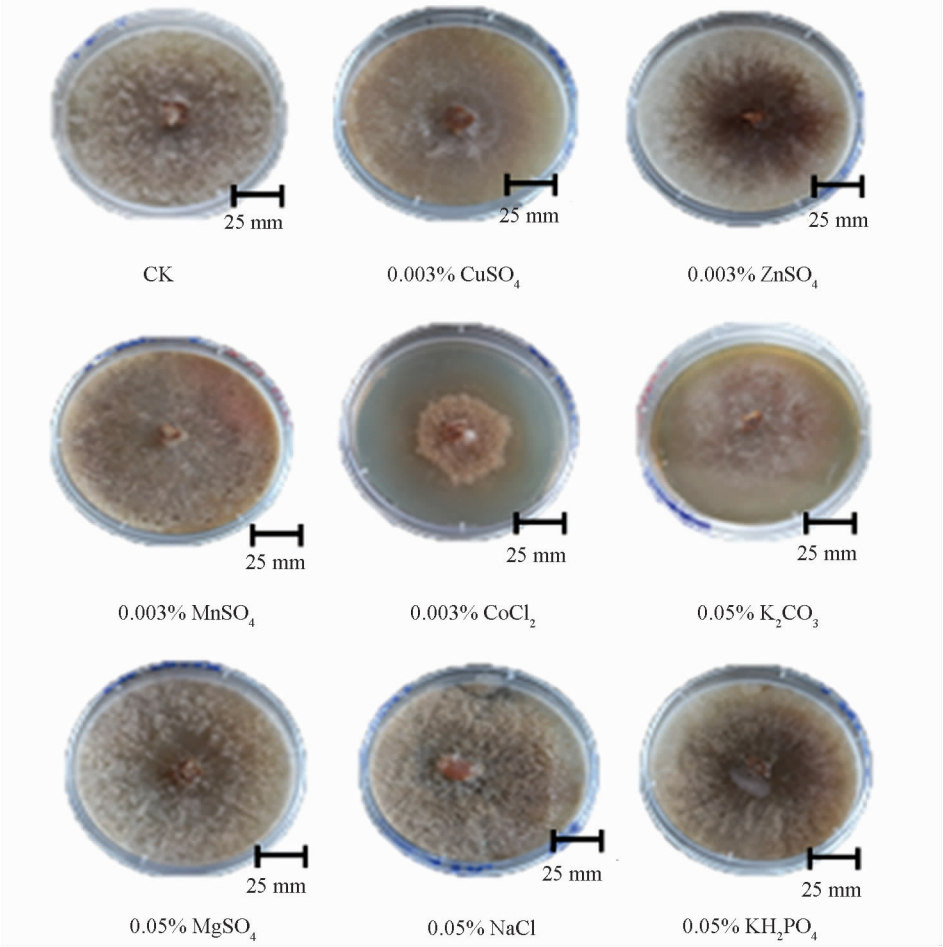


图 7 在不同种类的无机盐培养基上羊肚菌的生长状况

综合试验结果表明：单一的无机盐对菌丝生长没有显著的促进作用，但存在明显的抑制作用。需进一步试验，来筛选出最适菌丝生长的无机盐组合。

2.4.2 无机盐组合试验

把 2.4.1 中几种生长状况较好的无机盐进行组合试验，见表 4。

表 4 不同组合的无机盐

组 别		不同组合无机盐	
1	0.005% MnSO ₄	0.05% KH ₂ PO ₄	0.03% MgSO ₄
2	0.005% MnSO ₄	0.05% KH ₂ PO ₄	0.05% MgSO ₄
3	0.005% MnSO ₄	0.05% KH ₂ PO ₄	0.07% MgSO ₄
4	0.005% MnSO ₄	0.03% MgSO ₄	
5	0.005% MnSO ₄	0.05% MgSO ₄	
6	0.005% MnSO ₄	0.07% MgSO ₄	

结果表明：在几种组合的无机盐培养基上，菌丝日均生长速度均无统计学意义，也无显著协同作用。但通过菌丝致密度观察，发现组别 3 菌丝密度最大，相比之下，组别 3 更适宜羊肚菌的生长，见表 5，图 8。

表 5 不同比例无机盐对羊肚菌菌丝生长的影响

无机盐组合	菌落生长速度/(mm · d ⁻¹)	菌核形成	菌丝致密度
CK	13.34	—	很致密
组别 1	14.77	—	致密
组别 2	16.09	—	致密
组别 3	17.28	+	致密浓厚
组别 4	15.47	—	稀疏
组别 5	14.33	+	致密
组别 6	14.33	—	稀疏

注：—表示菌核未形成；+表示菌核形成一般；++表示菌核形成良好。

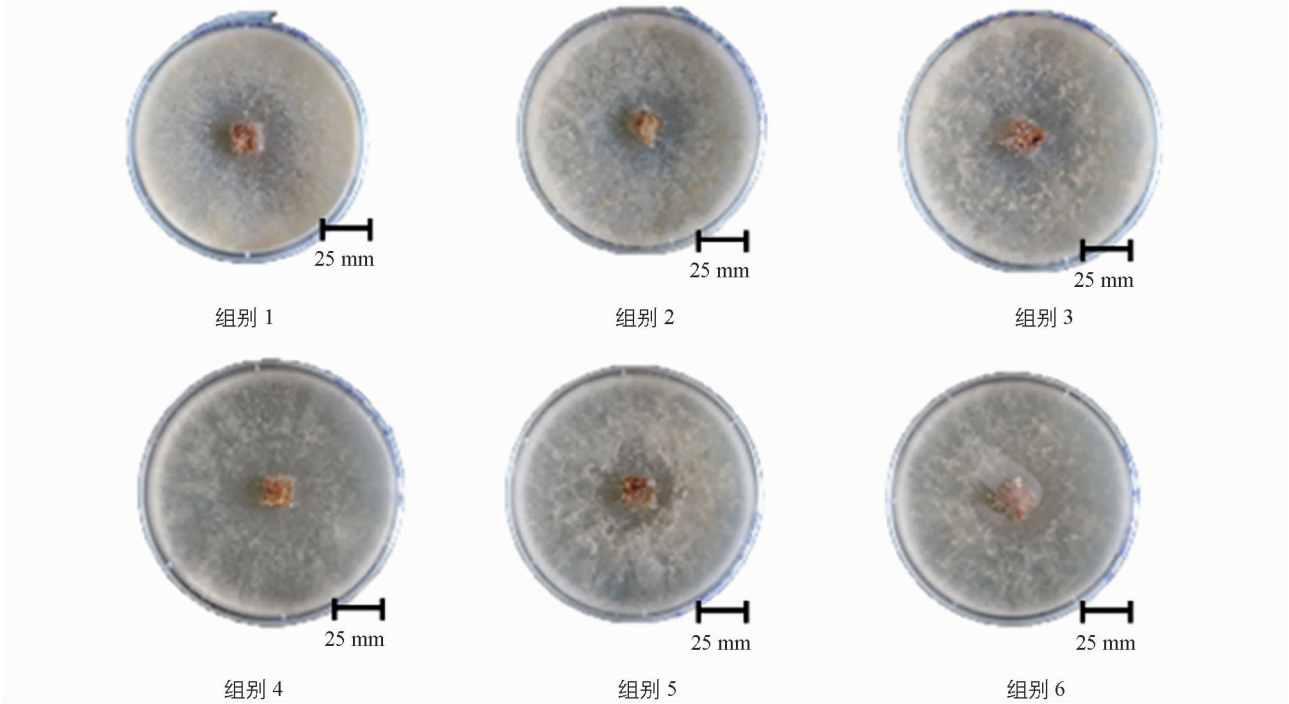


图 8 不同组合无机盐对羊肚菌菌丝生长的影响

2.5 pH 对黑脉羊肚菌菌丝生长状况的影响

pH 是指溶液中氢离子的总数和总质量的比。反应环境中的 H⁺ 浓度，pH 值小于 7，呈酸性；pH 值大于 7，呈碱性。pH 对微生物生长的影响主要是影响微生物体内酶的活性。在本次试验中，不同 pH 值之

间菌丝日均生长速度差异无统计学意义,当 pH 值在 8.0 时菌丝生长密度较低,其余 pH 条件下菌丝生长状况均较好.综合比较,当 pH 值在 6.0 时黑脉羊肚菌生长最好,为最适 pH,见表 6.

表 6 不同 pH 对羊肚菌菌丝生长的影响

pH 值	菌落生长速度/(mm · d ⁻¹)	菌丝致密度
5.5	17.76	致密浓厚
6.0	19.85	致密浓厚
6.5	17.49	稀疏
7.0	17.30	致密
7.5	16.94	致密
8.0	16.94	稀疏

2.6 验证试验

通过单因素筛选出的最佳条件与基础培养基 I 对比,发现菌丝生长速度差异并无统计学意义,且菌核形成也无明显区别;但通过观察菌丝致密度,发现组别 2 最致密.综上所述,选择组别 2 为黑脉羊肚菌生长的最佳组合,见表 7,表 8.

表 7 不同最适条件的组合

组别		不同条件的最适组合			
1	2%葡萄糖	2 g/L 蛋白胨	0.005% MnSO ₄	0.05% KH ₂ PO ₄	0.07% MgSO ₄
2	2%海藻糖	2 g/L 蛋白胨	0.005% MnSO ₄	0.05% KH ₂ PO ₄	0.07% MgSO ₄
3	2%糊精	2 g/L 蛋白胨	0.005% MnSO ₄	0.05% KH ₂ PO ₄	0.07% MgSO ₄

表 8 验证试验中不同组合培养基中羊肚菌生长情况

验证试验	菌落生长速度/(mm · d ⁻¹)	菌核形成	菌丝致密度
基础培养基 I	16.72	+	致密
组别 1	18.32	+	致密
组别 2	17.97	+	致密浓厚
组别 3	18.49	+	致密

注:—表示菌核未形成, + 表示菌核形成.

3 讨 论

3.1 羊肚菌生长形态观察

试验中观察到黑脉羊肚菌生长的一系列变化.首先是羊肚菌菌种在培养基上形成菌丝,包括气生菌丝和基内菌丝.基内菌丝是生长在培养基内或基料内的营养菌丝,可以产生各种胞外酶类、水溶性和脂溶性色素等,使培养基着色.气生菌丝是由基内菌丝生长出培养基外伸向空间的菌丝,呈直生或分支状.随着培养时间的增加,气生菌丝上有明显的水珠产生,菌丝形态和产生的位置开始发生变化,主菌丝开始分支,分支菌丝和主菌丝之间相互融合交织形成菌丝网格,培养基颜色发生变化,同时菌丝扭结形成菌核,菌核逐渐生长成熟,并且菌核在羊肚菌生长史上起着重要的作用^[16].

3.2 最适碳源

在碳源试验中发现,不同碳源对黑脉羊肚菌菌丝体及菌核的生长有不同的效果.其中,以在 2%葡萄糖培养基上生长最好,是黑脉羊肚菌的最适碳源,与赵春燕等^[25]、彭路等^[26]研究的最适碳源为葡萄糖结论一致,与董雪^[27]研究的最适碳源是可溶性淀粉和麦芽糖有所不同.由于本试验并没有用可溶性淀粉和麦芽糖来做碳源试验,故不能直接比较与葡萄糖的效果,后续可继续进行研究.

3.3 最适氮源

在氮源试验中发现,氮源会对黑脉羊肚菌菌丝体及菌核的生长产生影响,本次试验表明,黑脉羊肚菌的最适氮源为 2 g/L 的蛋白胨,与彭路等^[26]、陈芳草等^[28]、谢放等^[29]研究的最适为 0.4% 的蛋白胨浓度略有不同,与刑增涛等^[30]研究的 0.4% 胰蛋白胨也有差异,这可能由于菌种及培养方式不同引起,后续可开展浓度筛选和比较试验。

3.4 最适无机盐

在无机盐试验中发现,不同无机盐对黑脉羊肚菌菌丝体及菌核的生长有不同的效果,且作用效果相差较大. 以 MnSO_4 和 MgSO_4 为无机盐的培养基上羊肚菌生长较好, MgSO_4 促进作用更强,与李洁等^[31]研究的 MgSO_4 能够促进羊肚菌孢子萌发和菌丝生长的结果一致,与刘生梅^[32]研究的 Zn,Cu 等微量元素对羊肚菌生长有促进作用结果不一致,且本试验表明,Zn,Cu 等微量元素对黑脉羊肚菌生长有抑制作用,可能是由于羊肚菌的种类不同而导致的结果不同。

3.5 最适 pH

羊肚菌和其他真菌类似,具有一个较宽的 pH 范围,根据陈易飞等^[33]的研究,羊肚菌在 pH 值为 3.5~10 的范围内均能生长,pH 值为 5.5~8.7 时生长状态良好. 本试验发现,pH 值为 5.5~8.0 菌丝生长良好,最适 pH 值为 6.0,菌丝日均生长速度差异无统计学意义,与陈芳草等^[28]研究的最适 pH 值在 5~8,陶热等^[34]的最适 pH 值为 6 相一致. 与陈易飞等^[33]研究苏州产羊肚菌菌丝体最适 pH 值为 7.7 结果不一致,这可能是由于羊肚菌的种类不同所至。

3.6 验证试验

通过将单因素筛选出的最佳碳源、氮源和无机盐进行组合试验,发现在 2% 海藻糖,2 g/L 蛋白胨,0.005% MnSO_4 ,0.05% KH_2PO_4 和 0.07% MgSO_4 组合的培养基上,黑脉羊肚菌生长状况最佳,与基础培养基相比,促进了羊肚菌菌丝体的生长,提高了菌丝密度和加快了菌核的形成,有利于子实体的产生。

参考文献:

- [1] 雷 艳,曾 阳,唐 勋,等. 羊肚菌化学成分及药理作用研究进展 [J]. 青海师范大学学报(自然科学版),2013,29(2): 59-62, 65.
- [2] 赵 琪,黄韵婷,徐中志,等. 羊肚菌栽培研究现状 [J]. 云南农业大学学报,2009,24(6): 904-907.
- [3] 孙玉军,陈 彦,周正义,等. 羊肚菌胞内多糖对小鼠急性肝损伤的影响 [J]. 中国食用菌,2008,27(2): 41-42, 45.
- [4] NITHA B, JANARDHANAN K K. Aqueous-ethanolic Extract of Morel Mushroom Mycelium *Morchella* Esculenta, Protects Cisplatin and Gentamicin Induced Nephrotoxicity in Mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(9): 3193-3199.
- [5] 马 利,李 霞,张 松. 尖顶羊肚菌胞外多糖提取物对皮肤成纤维细胞增殖和衰老的影响 [J]. 菌物学报,2014,33(2): 385-393.
- [6] 崔华丽. 羊肚菌多糖的结构特点和抗肿瘤机制的研究 [D]. 合肥: 安徽大学,2011.
- [7] 殷伟伟,张 松,吴金凤. 尖顶羊肚菌活性提取物降血脂作用的研究 [J]. 菌物学报,2009,28(6): 873-877.
- [8] 孙晓明,张卫明,吴素玲,等. 羊肚菌免疫调节作用研究 [J]. 中国野生植物资源,2001,20(2): 12-13, 20.
- [9] 康晓彤. 羊肚菌菌种的分离与纯化和形态鉴定 [J]. 中国食用菌,2018,37(6): 85-87.
- [10] 黎智文,代俊杰,李 晓. 羊肚菌子实体组织分离与孢子分离获得菌种的比较试验 [J]. 食药用菌,2018,26(2): 94-95.
- [11] 朱锦福,雷 艳,李鹏业. 粗柄羊肚菌生境及组织分离优化条件的研究 [J]. 安徽农业科学,2012,40(24): 11966-11967.
- [12] 彭卫红,唐 杰,何晓兰,等. 四川羊肚菌人工栽培的现状分析 [J]. 食药用菌,2016,24(3): 145-150.
- [13] 李素玲,尚春树,刘 虹,等. 羊肚菌的子实体培育研究初报 [J]. 食用菌,1999,21(4): 8-10.
- [14] STAME P, 黄伟光. 羊肚菌栽培 [J]. 中国食用菌,1994,13(5): 14-16.
- [15] 陈立佼,柴红梅,黄兴奇,等. 羊肚菌属真菌菌丝及菌核多态性研究进展 [J]. 中国食用菌,2011,30(2): 3-7.

[16] VOLK T J, LEONARD T J. Cytology of the Life-cycle of *Morchella* [J]. Mycological Research, 1990, 94(3): 399-406.

[17] 刘士旺, 梁宗琦, 刘爱英. 羊肚菌生活史中重要的组成部分——菌核 [J]. 贵州农业科学, 1997, 25(2): 55-59.

[18] 朱斗锡. 羊肚菌的菌种制作 [J]. 中国食用菌, 1993, 12(5): 35-36.

[19] 平慧芳. 羊肚菌大田栽培技术要点 [J]. 食用菌, 2019, 41(1): 56-58.

[20] 关 明. 林下羊肚菌人工栽培技术 [J]. 中国林副特产, 2012(4): 42-43.

[21] 程 雁, 郭 恒, 何蔚荭, 等. 加拿大箱栽羊肚菌技术简介 [J]. 食用菌, 2018, 40(5): 58-59.

[22] 朱斗锡. 羊肚菌人工栽培研究进展 [J]. 中国食用菌, 2008, 27(4): 3-5.

[23] 袁永成. 羊肚菌商业化发展现状分析及未来发展的思考 [J]. 农业与技术, 2016, 36(12): 158.

[24] 伍晓丽, 谭 均, 崔广林, 等. 深绿木霉对青蒿的促生作用 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(7): 36-42.

[25] 赵春燕, 孙军德, 李 敏, 等. 培养条件对羊肚菌菌丝生长的影响 [J]. 中国食用菌, 2005, 24(1): 15-17.

[26] 彭 璐, 常继东. 羊肚菌菌丝体培养特性的研究 [J]. 食用菌, 2006, 28(5): 10-12.

[27] 董 雪. 黑脉羊肚菌(*Morchella angusticeps*)生物学特性研究 [D]. 北京: 首都师范大学, 2004.

[28] 陈芳草, 刘兴蓉, 谭方河, 等. 尖顶羊肚菌生物培养学特性研究 [J]. 西南农业学报, 2004, 17(4): 508-514.

[29] 谢 放, 吴萍民, 赵春巧. 7 株羊肚菌菌丝的生物学特性研究 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(10): 140-147.

[30] 邢增涛, 孙芳芳, 刘景圣. 尖顶羊肚菌液体培养条件的研究 [J]. 食用菌学报, 2004, 11(4): 38-43.

[31] 李 洁, 张云霞, 邱德江. 不同因素对羊肚菌孢子萌发和菌丝生长的影响 [J]. 河北林业科技, 2004(2): 1-2.

[32] 刘生梅. 微量元素对羊肚菌菌丝体生物学效应的影响 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(5): 1331-1332.

[33] 陈易飞, 郭益红. 温度、pH 对羊肚菌菌丝体生长的影响 [J]. 苏南科技开发, 2007(8): 28-29.

[34] 陶 热, 谭玉琴, 陈 晔, 等. 小羊肚菌菌丝培养条件的研究 [J]. 北方园艺, 2011(17): 183-187.

Preparation and Optimization of
Solid Media of *Morchella angusticeps*

ZHANG Bao-shun¹, YE Meng-ting¹, LIU Qing¹,
WANG Jian-kang¹, LUO Nan-xuan¹, YANG Chang-qing¹,
ZHU Yu-rong¹, LI Zhu-bo¹, LIU Yuan-xi²

1. School of Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Qianjiang Agricultural and Rural Committee, Qianjiang Chongqing 409000, China

Abstract: *Morchella angusticeps* is a wild edible fungus. In order to lay a basis for its cultivation, an experiment was made to study the effects of different solid culture media on the growth of the fungus strain. With mycelial growth rate and density and sclerotia formation as the major indicators, the growth of its mycelia in culture media of different carbon and nitrogen sources, inorganic salts and pH was investigated so as to optimize the preparation process of culture media. The resulted revealed that the optimum formula of the culture media for the growth of *M. angusticeps* was 2% glucose as the carbon source, 2 g/L peptone as the nitrogen source, MgSO₄ as the inorganic salt and a pH of 6.0.

Key words: *Morchella*; mycelium; culture condition; screening