

不同营养基质与条件对灰树花生长的影响

张松, 沈如冰, 乐以成

(华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631)

摘要: 探讨了不同营养基质与条件对灰树花 [*Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray] 生长的影响。试验结果表明: 菌丝生长的最适 pH 为 5~6; 最适氮源为蛋白胨、牛肉膏和谷氨酰胺, 葡萄糖和蛋白胨最适浓度分别为 100 和 1 g/L; 菌丝在黑暗环境下生长良好; 使用马铃薯蛋白胨培养基进行振荡培养, 菌丝球生长较好; 母种采用马铃薯麦麸培养基, 栽培种选用棉子壳麦麸石灰培养料, 可缩短制种周期, 获得质量较高的菌种; 菌丝含有较多的钙、铁和锌等元素。

关键词: 灰树花; 菌丝体; 营养基质; 生长条件; 矿质元素

中图分类号: S646 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)01-0021-05

Effects of media and conditions on growth of *Grifola frondosa* ZHANG Song, SHEN Ru-bing, YUE Yi-cheng (College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(1): 21-25

Abstract: The growth media and conditions of *Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray were reported. The experiment results indicated that the optimal pH was 5-6. Peptone, beef extract and glutamine were suitable nitrogen sources. 100 g/L glucose or 1g/L peptone was optimum concentration. Mycelia grew well in darkness. The mycelial pellet grew well in potato-peptone medium. The optimum medium for mother culture was potato-bran medium and the best substrate of culture spawn was the mixed material of cotton seed shell-bran-lime. The contents of mineral elements such as Ca, Fe and Zn were rich in mycelia of *G. frondosa*.

Key words: *Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray; mycelium; medium; growth condition; mineral element

灰树花 [*Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray] 是一种珍贵食用菌, 具有丰富的营养, 独特的风味, 药效较高, 深受人们的喜爱。味道鲜美, 香味浓郁, 其菌体含有 β -葡聚糖等有效成分, 具有抗肿瘤和抗艾滋病病毒的作用。临床实验表明, 灰树花不仅能增强人体的免疫力, 预防疾病, 而且对水肿、肝硬化腹水及糖尿病等多种疾病具有一定的疗效^[1,2], 在医药、保健品和食品等领域具有广阔的开发前景。关于灰树花的营养成分、形态特征和生态等方面的研究已有报道^[2-4], 但对其营养基质与生长条件的研究较少, 灰树花对营养基质和生长环境的要求比较严格, 为了全面地了解灰树花对营养和生长条件的要求, 作者于 2000-2002 年就不同营养基质和生长条件对灰树花生长的影响进行了研究, 以期为灰树花工业发酵和工厂化生产提供科学依据, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 灰树花 [*Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray] 5.64 菌株于 2000 年从广东省微生物研究所引入。

1.1.2 母种培养基配方 马铃薯培养基(A₁): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, KH₂PO₄ 1 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 6.5。

马铃薯麦麸培养基(A₂): 马铃薯 200 g, 麦麸 40 g, 蛋白胨 3 g, 葡萄糖 20 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, KH₂PO₄ 1 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 6.5。

收稿日期: 2002-08-23

作者简介: 张松(1964-), 男, 贵州思南人, 硕士, 副教授, 主要从事珍稀食用菌资源、生态及生理的研究。

马铃薯硫酸铵培养基(A₃):马铃薯 200 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, 蛋白胨 1 g, 葡萄糖 20 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, KH₂PO₄ 1 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 6.5。

黄豆芽黄豆粉培养基(A₄):黄豆芽 300 g, 黄豆粉 30 g, 葡萄糖 20 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, KH₂PO₄ 1 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 6.5。

1.1.3 振荡培养液体培养基配方 黄豆粉玉米粉培养基(G₁):黄豆粉 30%, 玉米粉 1%, 葡萄糖 2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, pH 6.5。

马铃薯黄豆粉培养基(G₂):马铃薯 20%, 黄豆粉 1%, 葡萄糖 2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, pH 6.5。

黄豆芽浆黄豆粉培养基(G₃):黄豆芽浆 20%, 黄豆粉 1%, 葡萄糖 2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, pH 6.5。

麦麸玉米粉培养基(G₄):麦麸 4%, 玉米粉 1%, 葡萄糖 2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, pH 6.5。

胡萝卜蛋白胨培养基(G₅):胡萝卜 20%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.5%, 葡萄糖 2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, pH 6.5。

马铃薯蛋白胨培养基(G₆):马铃薯 20%, 蛋白胨 1%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%, 葡萄糖 2%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, pH 6.5。

1.1.4 基础培养基配方 葡萄糖 100 g, 蛋白胨 5 g, KH₂PO₄ 2.5 g, MgSO₄·7H₂O 1.25 g, Na₂HPO₄ 0.25 g, CaCl₂ 0.25 g, V_{B1} 0.25 g, 营养液 12.5 mL, 水 1 000 mL, pH 6.5。

其中营养液配方为:KCl 1 g, NaCl 1 g, FeSO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, ZnSO₄ 0.1 g, AlK(SO₄)₂ 0.01 g, CuSO₄ 0.01 g, NaMoO₄·2H₂O 0.01 g, H₃BO₃ 0.01 g, 水 1 000 mL。

1.1.5 玉米菌种培养基配方 玉米粒 90%, 麦麸 5%, 黄豆粉 2%, 葡萄糖 1%, 过磷酸钙 1%, 石膏 1%。

1.1.6 混合培养料配方 棉子壳木屑麦麸培养料(B₁):棉子壳 35%, 木屑 40%, 麦麸 17%, 玉米粉 2%, 黄豆粉 2%, 过磷酸钙 1%, 石膏 1%, 葡萄糖 1%, MgSO₄·7H₂O 1%。

棉子壳麦麸培养料(B₂):棉子壳 79%, 麦麸

17%, 过磷酸钙 1%, 石膏 1%, 葡萄糖 1%, MgSO₄·7H₂O 1%。

木屑麦麸培养料(B₃):木屑 76%, 麦麸 20%, 过磷酸钙 1%, 石膏 1%, 葡萄糖 1%, MgSO₄·7H₂O 1%。

棉子壳麦麸尿素培养料(B₄):棉子壳 76%, 麦麸 17%, 尿素 1%, 黄豆粉 1%, 玉米粉 1%, 过磷酸钙 1%, 石膏 1%, 葡萄糖 1%, MgSO₄·7H₂O 1%。

木屑棉子壳培养料(B₅):木屑 50%, 棉子壳 36%, 玉米面 10%, 过磷酸钙 1%, 石膏 1%, 葡萄糖 1%, MgSO₄·7H₂O 1%。

棉子壳麦麸石灰培养料(B₆):棉子壳 78%, 麦麸 17%, 石灰 1%, 多菌灵 0.1%, 过磷酸钙 1%, 石膏 1%, 葡萄糖 1%, MgSO₄·7H₂O 1%。

1.2 试验方法

1.2.1 营养与生长条件的试验 配制 4 种母种培养基, 制成平板, 进行不同母种培养基试验; 将常用的 1 种培养基——马铃薯硫酸铵培养基用 HCl 或 NaOH 分别调节至 pH 4、5、6、7、8、9 和 10, 制成平板, 进行不同 pH 试验; 按基础培养基配方, 采用 9 种不同的氮源, 以不加任何氮源为对照进行不同氮源试验; 按基础培养基配方, 分别采用 5 种浓度的蛋白胨进行不同氮源浓度试验; 按基础培养基配方, 分别采用 5 种浓度的葡萄糖进行不同碳源浓度试验。将菌株培养在基础培养基中进行光暗对比试验, 光照度为 400 lx。以上试验培养液使用量为 50 或 30 mL。

配制 6 种振荡培养的培养基, 培养液用量 150 mL, 置于回旋振荡器(转速 180 r/min)培养。

上述各处理组均按以下步骤进行试验: 先将菌株转接于马铃薯硫酸铵培养基的培养皿内, 制成平板菌种, 用同一打孔器(直径 3 mm)在平板菌种的同一半径上打孔, 将等量的菌栓接入培养基, 在 28℃ 培养箱内静置培养或振荡培养, 每隔 3 d 测定菌丝的生长情况, 计算菌丝生长速度, 培养 13 d 后滤出菌丝体, 在 75℃ 烘干至恒重, 测定菌丝干重。

1.2.2 不同混合培养料的试验 配制 6 种混合培养料, 装瓶, 灭菌(棉子壳麦麸石灰生料培养料除外), 用玉米原种接种, 在 28℃ 培养箱内培养, 每隔 3 d 测定菌丝的生长程度, 计算平均生长速度; 并以菌丝生长的浓密程度进行分级, 记录菌丝生长势。

1.2.3 矿质元素含量的测定 将灰树花 5.64 菌株培养在基础培养基中, 13 d 后将菌丝过滤烘干, 用

HNO₃消化,采用 WFX-1F₂原子吸收分光光度计测定钙、铁和锌含量,测定波长分别为 4 227、2 483 和 2 139 Å,狭缝分别为 0.2、0.4 和 0.4 mm,灯电流为 2 mA,空气流量为 6.5 L/min,乙炔流量为 1.1 L/min。上述试验均采用完全随机设计,重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 不同母种培养基对菌丝生长的影响

将灰树花 5.64 菌株接种在 4 种母种培养基中培养,结果见表 1。

从表 1 可知,菌丝在 4 种培养基上均能生长,在马铃薯麦麸培养基上生长最好,其菌丝生长速度为 2.519 mm/d,菌丝干重达 8.10 g/L。因为马铃薯麦麸培养基含有丰富的碳源、氮源和矿质元素等营养物质,碳氮比合适,可为菌丝生长提供充足的营养与能量,有利于菌体物质的合成与积累,促进了菌丝的生长^[3]。

表 1 不同母种培养基对灰树花菌丝生长的影响¹⁾
Table 1 Effects of different mother culture media on the mycelial growth of *Grifolia frondosa* (Fr.) S. F. Gray¹⁾

| 培养基 ²⁾ Media ²⁾ | 菌丝生长速度 Mycelial growth rate(mm/d) | 菌丝干重 Dry weight of the mycelia(g/L) |
|--|--------------------------------------|--|
| A ₁ | 1.869 | 2.95 |
| A ₂ | 2.519 | 8.10 |
| A ₃ | 2.175 | 2.05 |
| A ₄ | 2.363 | 2.90 |

¹⁾ 数据为 3 次重复的平均值 Data are the average of three replications; ²⁾ A₁:马铃薯培养基 Potato medium; A₂:马铃薯麦麸培养基 Potato-bran medium; A₃:马铃薯硫酸铵培养基 Potatom-ammonium sulfuric acid medium; A₄:黄豆芽黄豆粉培养基 Soybean bud-soybean powder medium.

2.2 不同 pH 值对菌丝生长的影响

将灰树花 5.64 菌株接种于不同 pH 值的培养基上,结果见表 2。

表 2 不同 pH 值对灰树花菌丝生长速度的影响¹⁾
Table 2 Effects of different pH values on the mycelial growth rate of *Grifolia frondosa* (Fr.) S. F. Gray¹⁾

| pH | 菌丝生长速度 Mycelial growth rate (mm/d) | pH | 菌丝生长速度 Mycelial growth rate (mm/d) |
|----|---------------------------------------|----|---------------------------------------|
| 4 | 1.89 | 8 | 2.08 |
| 5 | 2.69 | 9 | 1.18 |
| 6 | 2.66 | 10 | 0.81 |
| 7 | 2.23 | | |

¹⁾ 数据为 3 次重复的平均值 Data are the average of three replications.

从表 2 可知,菌丝可在 pH 4~10 范围内生长,在 pH4 时菌丝生长较差;当 pH 升至 5 时,菌丝生长最快,菌丝平均生长速度可达 2.69 mm/d;但 pH 大于 5 后,菌丝生长又变慢,这时,随着 pH 的进一步升高,菌丝生长速度逐渐降低。因此,灰树花菌丝生长的适宜 pH 为 5~7,最适 pH 为 5~6。不适宜的 pH 对菌丝生长具有抑制作用。

2.3 不同氮源对菌丝生长的影响

将灰树花 5.64 菌株培养在不同氮源的培养基中,其结果见表 3。

从表 3 可见,9 种氮源均能被菌丝利用。最好的氮源为蛋白胨、牛肉膏和谷氨酰胺,它们的菌丝干重间无显著差异,在以蛋白胨为氮源的培养基上菌丝的干重可达 4.276 7 g/L。NH₄H₂PO₄、天冬酰胺和 (NH₄)₂SO₄ 等为较差的氮源,尿素是最差的氮源,这可能因为尿素在高温下分解,释放氨及氰尿酸,致使培养基 pH 发生了变化,并有氨味,不利于菌丝的生长。这与前人对食用菌氮源的研究结果相似^[2,5,6]。

表 3 不同氮源对灰树花菌丝干重的影响¹⁾
Table 3 Effects of different nitrogen sources on the dry weight of the mycelia of *Grifolia frondosa* (Fr.) S. F. Gray¹⁾

| 氮源 Nitrogen sources | 菌丝干重 ²⁾ Dry weight of the mycelia(g/L) ²⁾ |
|---|--|
| 蛋白胨 Peptone | 4.276 7 aA |
| 牛肉膏 Beef extract | 3.950 0 abAB |
| 谷氨酰胺 Glutamine | 3.776 7 abABC |
| NH ₄ Cl | 3.166 7 bcBCD |
| NH ₄ NO ₃ | 2.646 7 bedBCD |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 2.053 3 cdBCD |
| 天冬酰胺 Asparagine | 2.010 0 cdCD |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.733 3 cdeCD |
| 尿素 Urea | 0.436 7 eE |
| 对照 Control | 1.466 7 deDE |

¹⁾ 数据为 3 次重复的平均值 Data are the average of three replications; ²⁾ 小写和大写英文字母分别表示 P=0.05 和 P=0.01 水平上的差异显著性 Small and capital letters indicate the significant differences at P=0.05 and P=0.01 levels respectively.

2.4 不同浓度的葡萄糖对菌丝生长的影响

将灰树花 5.64 菌株接种到含不同浓度葡萄糖的培养基中培养,结果见表 4。

从表 4 可见,菌丝在葡萄糖浓度为 1~150 g/L 范围内的培养基中均可生长,但生长有差异。在一定浓度范围内,菌丝生长量随葡萄糖浓度的增大而增加。当葡萄糖浓度为 1 g/L 时,碳源不足,菌丝生长差,其菌丝干重低。随着碳源浓度的增大,菌丝生

长量也增加,当葡萄糖浓度为 100 g/L 时,菌丝生长量最大,其菌丝干重达 8.332 g/L。当葡萄糖浓度超过 100 g/L 时,随着葡萄糖浓度的增大,菌丝生长量反而减小。这是因为碳源过量,碳氮比失调而导致菌丝生长量下降。因此,在灰树花培养中,可调配葡萄糖浓度为 100 g/L,则碳源丰富,能量充足,碳氮比也适合,可促进菌丝的生长。

表 4 不同浓度葡萄糖对灰树花菌丝干重的影响¹⁾
Table 4 Effects of different concentrations of glucose on the dry weight of the mycelia *Grifolia frondosa* (Fr.) S. F. Gray¹⁾

| 葡萄糖浓度 Concentration of glucose (g/L) | 菌丝干重 Dry weight of the mycelia (g/L) |
|---|---|
| 1 | 1.342 |
| 10 | 2.752 |
| 50 | 5.744 |
| 100 | 8.332 |
| 150 | 5.452 |

¹⁾ 数据为 3 次重复的平均值 Data are the average of three replications.

2.5 不同浓度的蛋白胨对菌丝生长的影响

将灰树花 5.64 菌株接种到含不同浓度蛋白胨的培养基中培养,结果见表 5。

表 5 不同浓度蛋白胨对灰树花菌丝干重的影响¹⁾
Table 5 Effects of different concentrations of peptone on the dry weight of the mycelia of *Grifolia frondosa* (Fr.) S. F. Gray¹⁾

| 蛋白胨浓度 Concentration of peptone (g/L) | 菌丝干重 Dry weight of the mycelia(g/L) |
|---|--|
| 0.1 | 5.654 |
| 1.0 | 7.558 |
| 5.0 | 6.956 |
| 50.0 | 2.988 |
| 100.0 | 2.486 |

¹⁾ 数据为 3 次重复的平均值 Data are the average of three replications.

从表 5 可见,菌丝在蛋白胨浓度为 0.1 ~ 100 g/L 范围内均可生长。在蛋白胨浓度小于 1 g/L 的范围内,菌丝生长量随蛋白胨浓度的增大而增加;当蛋白胨浓度为 0.1 g/L 时,氮源不足,菌丝生长受阻。当其浓度为 1 g/L 时,菌丝生长量最大,其菌丝干重达 7.558 g/L;但蛋白胨浓度超过 1 g/L,菌丝生长量随蛋白胨浓度的增大反而下降。过量或过低的氮不仅妨碍了对氮源本身的吸收,还影响了对其他营养物质的利用,氮源浓度可影响菌丝利用营养物质的效率^[2]。因此,灰树花菌丝在蛋白胨浓度为 1 ~ 5 g/L 范围内生长较好,其最适蛋白胨浓度为 1 g/L。

2.6 光照对菌丝生长的影响

将灰树花 5.64 菌株接入基础培养基后,置于光

照和黑暗环境下培养,结果发现,光照下平均菌丝干重为 5.564 g/L,而黑暗下为 6.664 g/L。由此可见,经光照后,菌丝生长量较黑暗对照有所降低,这表明光照对菌丝生长具有一定的抑制作用,这与前人对其他食用菌菌丝对光照的反应研究结果较为相似^[2]。因此,在灰树花的菌丝生长阶段(如菌种培养或生长初期)宜处于黑暗环境,尽量避免光照,可将培养对象进行包扎或遮盖,以防止光照对菌丝生长产生不良的影响。

2.7 不同的液体培养基对菌丝球生长的影响

灰树花 5.64 菌株在 6 种液体培养基中进行振荡培养,结果见表 6。

表 6 不同的液体培养基对灰树花菌丝球生长的影响¹⁾
Table 6 Effects of different liquid media on the mycelial pellet growth of *Grifolia frondosa* (Fr.) S. F. Gray¹⁾

| 培养基 ²⁾ Media ²⁾ | 菌丝球数 No. of mycelial pellet (no./mL) | 菌丝球直径 Mycelial pellet diameter(mm) | 菌丝干重 Dry weight of the mycelia(g/L) |
|--|---|---------------------------------------|--|
| G ₁ | 75 | 0.83 ~ 1.73 | 12.541 3 |
| G ₂ | 19 | 1.09 ~ 1.65 | 6.575 3 |
| G ₃ | 35 | 1.50 ~ 4.00 | 7.766 0 |
| G ₄ | 27 | 1.67 ~ 3.00 | 8.427 3 |
| G ₅ | 16 | 3.25 ~ 10.05 | 7.183 3 |
| G ₆ | 58 | 2.09 ~ 4.25 | 13.041 3 |

¹⁾ 数据为 3 次重复的平均值 Data are the average of three replications; ²⁾ G₁: 黄豆粉玉米粉培养基 Soybean powder-maize powder medium; G₂: 马铃薯黄豆粉培养基 Potato-soybean powder medium.; G₃: 黄豆芽浆黄豆粉培养基 Soybean bud milk-soybean powder medium; G₄: 麦麸玉米粉培养基 Bran-maize powder medium; G₅: 胡萝卜蛋白胨培养基 Carrot-peptone medium; G₆: 马铃薯蛋白胨培养基: Potato-peptone medium.

从表 6 可见,灰树花在 6 种液体培养基中均可形成菌丝球,在马铃薯蛋白胨培养基和黄豆粉玉米粉培养基中形成的菌丝球较多,个体较大,大小较均匀,菌丝生长量也大,菌丝干重分别达到 13.041 3 和 12.541 3 g/L。由于马铃薯蛋白胨培养基和黄豆粉玉米粉培养基都含有较多的营养物质,易被菌体吸收利用,在马铃薯、黄豆粉和玉米粉等物质的浸出汁中可能还含有一些对菌丝生长有刺激作用的物质^[7],因此,促进了菌丝球的生长。

2.8 不同混合培养料对菌丝生长的影响

将灰树花 5.64 菌株培养于 6 种不同的混合培养料中,结果见表 7。

从表 7 可见,菌丝在 6 种培养料上均可生长,说明菌丝对培养料的适应力较强,可采用多种材料培养灰树花。菌丝在棉子壳麦麸石灰培养料上生长最

