

理化因素及栽培基质对雷丸菌丝生长的影响

赵银瓶, 胡开治, 李娜, 韩量, 韦中强, 肖波*

重庆市药物种植研究所, 重庆 南川 408435

摘要: 目的 明确雷丸菌丝生长的影响因素, 为人工栽培提供依据。方法 在不同温度、碳源、氮源、pH、培养基质等培养条件下测定雷丸菌丝日生长量。结果 25 ℃、pH 6.0~7.0 条件下菌丝生长快; 1%~3%的碳源, 菌丝生长速率差异不显著; 蛋白胨、酵母粉等氮源对菌丝生长有抑制作用, 玉米粉无抑制; 竹叶为雷丸栽培种较适宜的栽培主料, 玉米粉的促生长作用明显。结论 温度、氮源和基质对雷丸菌丝生长的影响较明显。

关键词: 雷丸; 温度; 氮源; 竹叶; 生长速率

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)03-0424-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.022

Effects of physicochemical factors and cultivation substrates on mycelial growth in *Omphalia lapidescens*

ZHAO Yin-ping, HU Kai-zhi, LI Na, HAN Liang, WEI Zhong-qiang, XIAO Bo

Chongqing Institute of Pharmaceutical Plant, Nanchuan 408435, China

Abstract: **Objective** To confirm the influential factors on mycelial growth of *Omphalia lapidescens* and to provide a basis for the artificial cultivation. **Methods** The mycelial growth rates of *O. lapidescens* under different culture conditions were measured. **Results** With the temperature of 25 ℃ and pH 6.0—7.0, the mycelium of *O. lapidescens* was in its rapid growth. And there was no significant difference in mycelial growth rate with the concentration of carbon sources between 1% and 3%. Nitrogen sources such as peptone and yeast powder inhibited the mycelial growth, while the corn flour was not inhibited. The more suitable ingredient for the cultivation of *O. lapidescens* was bamboo leaves, meanwhile the growth-promoting effect of corn flour was obvious. **Conclusion** The effects of temperature, nitrogen source, and matrix on mycelial growth of *O. lapidescens* are significant.

Key words: *Omphalia lapidescens* Schroet.; temperature; nitrogen source; bamboo leaves; growth rate

雷丸是白蘑科真菌雷丸 *Omphalia lapidescens* Schroet. 的干燥菌核, 为我国常用传统中药之一^[1], 多腐生或寄生于竹根和老竹蔸下。目前, 雷丸是国内外研制开发新优高效驱虫药、植物病毒抑制剂和抗癌药的热点药材^[2-5], 市场需求量剧增。雷丸药源以野生为主, 其资源量逐年锐减, 国内外市场供需矛盾突出, 价格一路攀升。

为扩大药源, 人们陆续开展了对雷丸人工培养的研究^[6-7]。然而, 有关雷丸栽培的报道较少, 研究也仅对雷丸的生长习性有了一定的认识, 但对雷丸自身生物学特性的了解还不够系统。作为药用真菌,

相比外界条件的影响, 优良的栽培菌种是人工种植雷丸的关键。因此, 本实验着重研究不同理化因素及不同栽培基质对雷丸菌丝生长的影响, 以期培养优良的雷丸栽培种奠定基础。

1 材料

所用材料为本实验室野外采集并在无菌条件下分离、纯化的菌种, 经本单位刘正宇研究员鉴定为雷丸 *Omphalia lapidescens* Schroet.。

2 方法

2.1 不同理化因素对雷丸菌丝生长的影响

2.1.1 雷丸试管斜面培养 选取同一型号试管, 每

收稿日期: 2014-06-15

基金项目: 重庆市卫生局中医药科技项目 (ZY20132048)

作者简介: 赵银瓶 (1984—), 女, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事药用菌研究。Tel: 18883256765 E-mail: zhaoyinping2005@163.com

*通信作者 肖波 Tel: (023)71480463 E-mail: xiaoxiao429@hotmail.com

管装量约 6 mL, 制成 PDA 固体斜面培养基, 将培养 10 d 的雷丸母种用自制接种针划取大小约 0.5 cm×0.5 cm 的薄片, 放在斜面中部, 25 ℃、暗培养。每处理设置 3 个重复, 以菌丝日生长量 (mm) 进行数据统计分析。

2.1.2 温度对雷丸菌丝生长的影响 分别采用 20、22.5、25、27.5、30 ℃ 进行培养, 考察雷丸菌丝生长情况。

2.1.3 培养基初始 pH 对雷丸菌丝生长的影响 调节培养基 pH 值分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 测量菌丝生长量。

2.1.4 碳源对雷丸菌丝生长的影响 分别采用单糖-葡萄糖、双糖-蔗糖、多糖-可溶性淀粉单独作碳源, 质量分数分别设置为 1%、2% 和 3%, 考察雷丸菌丝生长状况。

2.1.5 氮源对雷丸菌丝生长的影响 分别添加蛋白胨、酵母粉、玉米粉作氮源, 质量分数设置为 0.15%、0.20%、0.30%, 考察雷丸菌丝生长情况, 以不添加氮源为对照 (CK)。

2.2 栽培基质对雷丸菌丝生长的影响

2.2.1 雷丸原种制作和培养 煮大米至透心, 沥水冷却, 添加 0.3% 玉米粉, 拌匀, 装入 500 mL 罐头瓶中, 于 103.5 kPa, 121.0 ℃ 条件下高压灭菌 1 h, 冷却, 接入制备好的优质雷丸母种, 25 ℃ 培养箱中培养, 待菌丝长满瓶后用于雷丸栽培菌种的制作。

2.2.2 雷丸栽培种制作和培养 将栽培种原料按比例混合均匀, 加水至紧握拳头有水珠欲滴下, 然后装塑料瓶、灭菌 (103.5 kPa, 121.0 ℃, 灭菌 1.5 h)、接种, 25 ℃ 培养箱中培养, 观察雷丸菌丝生长情况, 记录满瓶时间, 换算雷丸菌丝每天生长面积 (cm²)。

2.2.3 玉米粉对雷丸栽培种菌丝生长的影响 以 75% 棉籽壳 (木屑)、0.5% 石膏、0.5% 过磷酸钙为基质, 调整麦麸 (24%、18%、0) 和玉米粉 (0、6%、24%) 的用量, 每组处理 9 个重复。观察随着玉米粉量的增加, 雷丸菌丝生长情况。

2.2.4 主料对雷丸栽培种菌丝生长的影响 分别以棉籽壳、竹叶和木屑为主料, 各含 75%, 加入 18% 麦麸、6% 玉米粉、0.5% 石膏、0.5% 过磷酸钙, 每处理重复 9 次。观察菌丝生长势, 测定污染率、菌丝满袋时间, 初选出雷丸栽培种配方中的主料。

2.2.5 竹叶基质配比实验 配比设计见表 1。

2.3 统计分析

以上均为单因素试验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验

表 1 竹叶基质配比

Table 1 Medium ratio of bamboo matrix

配比类型	体积分数/%				
	竹叶	麦麸	玉米粉	石膏	过磷酸钙
A	51	36	12	0.5	0.5
B	75	18	6	0.5	0.5
C	99	0	0	0.5	0.5

数据经 Origin8.5 并结合 SPSS16.0 软件的 One-way ANOVA 进行方差分析, Duncan 法进行多重比较, 分析多组样本间的差异显著性 ($P < 0.05$), 然后作图。

3 结果与分析

3.1 不同理化因素对雷丸菌丝生长的影响

在温度实验中, 20、22.5 ℃ 培养条件下雷丸菌丝生长较慢, 25~30 ℃ 培养下雷丸菌丝生长较快且无显著差异, 但在 27.5、30 ℃ 培养时, 菌丝干燥、黄化现象严重。因此, 25 ℃ 是雷丸菌丝生长的最适温度, 平均值为 (7.44 ± 0.42) mm/d (图 1-A)。

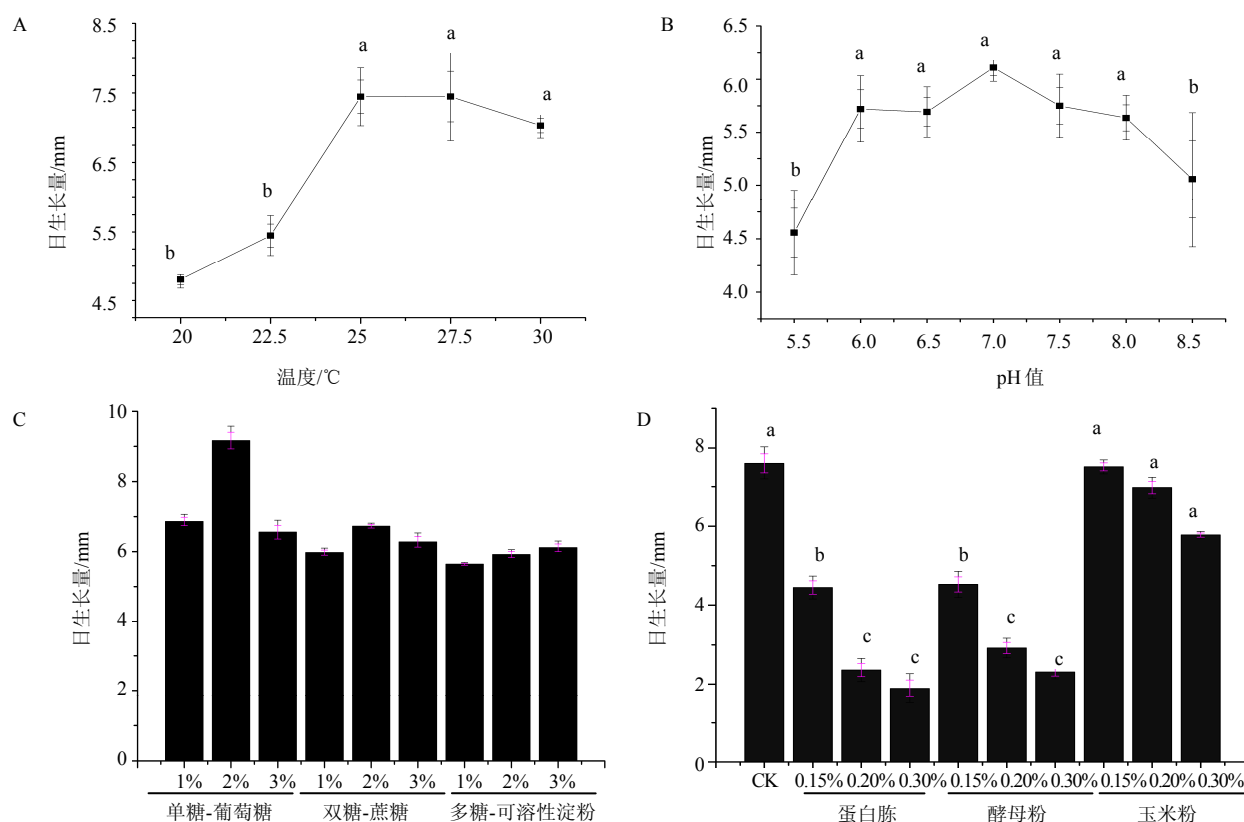
pH 实验中, 观察结果结合图 1-B 可知, 在 pH 6.0~8.0 雷丸菌丝生长无显著差异, 但 pH 7.5、8.0 条件下样品污染情况严重。因此, 雷丸较适的 pH 环境为中性偏酸。

碳源实验表明 (图 1-C), 单糖-葡萄糖、双糖-蔗糖和多糖-可溶性淀粉在 1%~3%, 雷丸菌丝生长差异不显著。但相比之下, 质量分数为 2% 的葡萄糖培养条件下, 雷丸菌丝生长最快, 可达 (9.17 ± 0.41) mm/d。

氮源实验结果发现 (图 1-D), 蛋白胨、酵母粉对雷丸菌丝生长具有抑制作用, 且质量分数越高, 抑制作用越明显。但适量的玉米粉 (0.15%) 几乎无抑制作用。这可能是由于蛋白胨和酵母粉明显增加了培养基中的氮量, 造成碳氮比 (C/N) 偏低, 不利于雷丸菌丝的生长; 而玉米粉本身既是氮源又是碳源, 适量的玉米粉不会明显造成 C/N 降低。本实验推测, 雷丸菌丝生长所需的 C/N 可能较高。

3.2 栽培基质对雷丸菌丝生长的影响

3.2.1 玉米粉对雷丸栽培种菌丝生长的影响 分别以棉籽壳和木屑为主料, 通过添加不同量的玉米粉调整培养基配方, 结果发现, 在 2 种主料基质中, 随着玉米粉量的增加, 雷丸菌丝日生长量均表现出增大趋势。玉米粉对雷丸栽培种菌丝具有明显的促生长作用 (图 2)。



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$, 下同
Different letters mean significant difference, $P < 0.05$, same as below

图1 理化因素对雷丸菌丝生长的影响

Fig. 1 Effects of physicochemical factors on mycelial growth rate of *O. lapidescens*

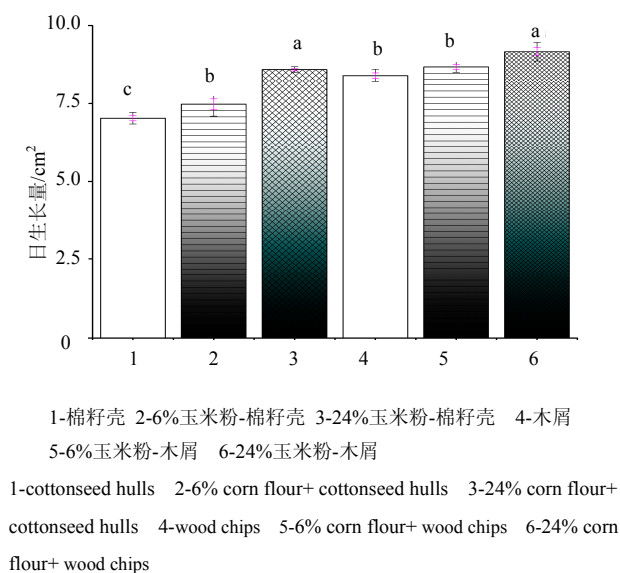


图2 玉米粉对雷丸菌丝生长的影响

Fig. 2 Effects of corn flour on mycelial growth of *O. lapidescens*

3.2.2 主料对雷丸栽培种菌丝生长的影响 从图3可以得出,雷丸栽培种菌丝在以竹叶(C/N=36:1)和木屑(C/N=300:1)为主料的基质中生长较好,生长速率分别为 (8.80 ± 0.09) 、 (8.68 ± 0.17) cm²/d,污染率为0。棉籽壳培养基(C/N=25:1),

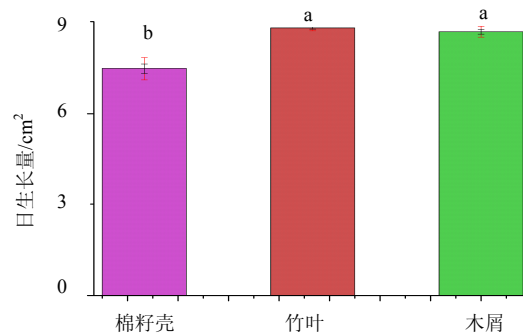


图3 栽培培养基对雷丸菌丝生长的影响

Fig. 3 Effects of cultivation media on mycelial growth of *O. lapidescens*

栽培种污染现象严重,且菌丝生长较慢,日生长量为 $(7.48 \pm 0.38) \text{ cm}^2$ 。结果表明,雷丸菌丝在竹叶和木屑等较高 C/N 条件下生长良好。与木屑相比,以竹叶为主料的菌丝洁白粗壮,香味浓郁;且更符合雷丸野生环境及“变废为宝”的理念。

3.2.3 竹叶基质配比对雷丸栽培种菌丝生长的影响
图4表明,A配比(51%竹叶、36%麦麸、12%玉米粉)和B配比(75%竹叶、18%麦麸、6%玉米粉)的配比组合对雷丸菌丝生长的影响明显高于C配比(99%竹叶),从培养基节约的原则出发,本实验选择B配比为雷丸栽培种较适的培养配方。

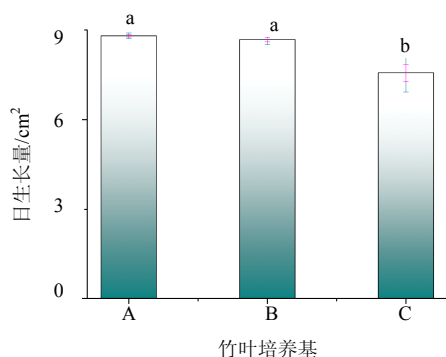


图4 竹叶基质配比对雷丸菌丝生长的影响

Fig. 4 Effects of substrate composition on mycelial growth of *O. lapidescens*

4 讨论

本研究通过观察不同培养条件下雷丸菌丝的生长情况及其测定其菌丝生长速度,得出的主要结论,雷丸的最适生长温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、最适pH为6.0~7.0;1%~3%碳源,菌丝生长速率差异不显著,但相比之下,2%葡萄糖作为碳源,雷丸菌丝生长情况较好。氮源实验表明,高浓度的氮(蛋白胨和酵母粉)会抑制雷丸菌丝的生长,玉米粉的抑制作用不明显。经分析得出:适量的有机氮对雷丸菌丝生长具有促进作用,高浓度氮可能是由于影响了培养基中的

C/N,从而对雷丸菌丝生长产生较大的影响,推测雷丸菌丝生长可能需要较高的C/N。

栽培种实验结果得出,玉米粉对雷丸菌丝的促生长作用明显;主料实验表明,在竹叶和木屑等高C/N基质中,雷丸菌丝生长较好,棉籽壳菌丝生长速度较慢,且污染严重。本实验得出,雷丸栽培种菌丝生长所需C/N较高,但最适C/N范围还需进一步研究。

以天然废料-竹叶为主料进行了雷丸栽培种培养基配比实验,得出雷丸栽培种较优配方为:75%竹叶、18%麦麸、6%玉米粉、0.5%石膏、0.5%过磷酸钙,此时C/N约为36:1。

与曾发表雷丸的研究报道相比^[7-8],本实验系统地探讨了雷丸的生物学特性和栽培种培养条件,加深了对雷丸自身生长习性的认识,得出了雷丸菌丝生长所需C/N较高这一结论,初步筛选出雷丸栽培种较优的培养基配方。本研究为雷丸的理论研究以及人工栽培实践奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 许明峰,沈莲清,王奎武. 雷丸化学成分的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 251-254.
- [3] Zhou L H, Zhang Y Q, Wang R J, et al. Optimization of mycelial biomass and protease production by *Laccoccephalum mylittae* in submerged fermentation [J]. *Afr J Biot*, 2009, 8(8): 1591-1601.
- [4] Zhou L H, Xu Q Q, Zhang Y Q, et al. Purification, characterization and *in vitro* anthelmintic activity of a neutral metalloprotease from *Laccoccephalum mylittae* [J]. *Chin J Chem Engin*, 2010, 18(1): 122-128.
- [5] 每乐,刘纯,赵兵,等. 雷丸药学研究概况 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(10): 4312-4313.
- [6] 黄友如. 雷丸人工栽培 [J]. 中国食用菌, 1987(1): 21.
- [7] 王淑芳,王瑞芳,朱慧新,等. 雷丸菌人工培养形成菌核试验 [J]. 中药材, 2005, 28(8): 647-648.