

刘西周,郭成金. 正交试验筛选平田头菇菌丝液体培养基[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):261-262.

正交试验筛选平田头菇菌丝液体培养基

刘西周, 郭成金

(天津师范大学蕈菌研究所/天津市动植物抗性重点实验室,天津 300387)

摘要:采用正交试验对平田头菇菌丝液体培养基进行筛选。结果表明,平田头菇菌丝液体培养基最佳配方是 25 g/L 葡萄糖、250 g/L 马铃薯(浸提液)、40 g/L 麦麸(浸提液)、4 g/L 蛋白胨、5 g/L KH_2PO_4 、2.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、16 mg/L 维生素 B_1 , pH 值自然, 28 ℃ 静置培养 10 d, 其菌丝体生物量(干质量)可达 13.52 g/L。

关键词:平田头菇;液体培养基;菌丝体;生物量;正交分析

中图分类号: S646.104⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0261-02

平田头菇 [*Agrocybe pediades* (Fr.) Fayod] 属粪伞科 (Bolbitiaceae) 田蘑属 (*Agrocybe*), 因具有独特的风味、丰富的营养及特殊的抗肿瘤等药用价值, 受到越来越多的关注^[1-2]。平田头菇主要分布在芦苇湿地等区域, 但近些年由于湿地面积不断萎缩, 环境受到严重破坏, 野生菌种资源数量急剧下降。目前对平田头菇的研究鲜见报道, 未见其液体培养基筛选相关研究。本研究通过对平田头菇菌丝液体培养基筛选, 旨在为其人工驯化等进一步研究开发提供支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

平田头菇子实体采自天津市七里海湿地, 菌种保藏于天津师范大学蕈菌研究所。

1.2 培养基

1.2.1 PDA 综合培养基^[3] 200 g/L 马铃薯, 200 g/L 棉籽皮, 18 g/L 琼脂, 20 g/L 葡萄糖, 3 g/L KH_2PO_4 , 1.5 g/L MgSO_4 , 4 mg/L 维生素 B_1 , pH 值自然。

1.2.2 碳源初选培养基及其配制方法 碳源初选培养基: 分别以 15 g/L 葡萄糖、15 g/L 蔗糖、15 g/L 甘露醇、15 g/L 麦芽糖、200 g/L 马铃薯(浸提液)、20 g/L 玉米渣(浸提液)为供试碳源, 加入 3 g/L 蛋白胨、3 g/L KH_2PO_4 、1.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、微量维生素 B_1 , pH 值自然, 配制碳源初选培养基, 分装于 100 mL 锥形瓶中, 每瓶 50 mL, 每个处理 3 次重复, 加纱布通气塞后, 0.12 MPa 灭菌 20 min, 备用。

1.2.3 氮源初选培养基及其配制方法 氮源初选培养基: 分别以 3 g/L 蛋白胨、3 g/L 酵母粉、30 g/L 麦麸(浸提液)、3 g/L 硝酸铵、3 g/L 硝酸钾、3 g/L 氯化铵为供试氮源, 加入 20 g/L 葡萄糖、3 g/L KH_2PO_4 、1.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 值自然, 分装于 100 mL 锥形瓶, 每瓶 50 mL, 每个处理 3 次重复, 加纱布通气塞后, 0.12 MPa 灭菌 20 min, 备用^[4]。

1.3 试验方法

1.3.1 菌丝体培养及其称重 提前 4 d 将菌种活化。无菌条件下挑取强壮菌丝体前端, 接于平板培养基上, 28 ℃ 培养 4~5 d 备用。

从菌落边缘挑取直径 0.8 cm 均匀大小的菌种圆块, 接种于对应的液体培养基, 每瓶 3 块, 28 ℃ 静置 2 d, 摇瓶 5 min/d。

将滤纸编号、称重, 恒温培养 10 d 后将培养产物抽滤, 于 80 ℃ 烘干至恒重并称重, 2 次质量差值为菌丝体生物量(干质量)。

1.3.2 碳源、氮源培养基正交试验 根据碳源、氮源初选培养基筛选试验结果, 从中各选出 2 个最适合的碳源和氮源, 按 $L_9(3^4)$ 设计 4 因素 3 水平正交试验进行复选, 与 3 g/L KH_2PO_4 、1.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、4 mg/L 维生素 B_1 组成 9 个试验配方, 正交因素与水平设计见表 1。

表 1 碳源、氮源正交试验因素与水平

水平	浓度(g/L)			
	A:葡萄糖	B:马铃薯	C:麦麸	D:蛋白胨
1	15	200	30	2
2	20	250	40	3
3	25	300	50	4

1.3.3 无机盐及维生素水平试验 根据碳源、氮源正交试验结果, 以最适菌丝体生长的氮源、碳源组合作为基础培养基, 加入不同浓度梯度的 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、维生素 B_1 (表 2)。

表 2 无机盐、维生素 B_1 浓度筛选试验设计

处理	浓度		
	KH_2PO_4 (g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	维生素 B_1 (mg/L)
1	2	1	4
2	3	1.5	8
3	4	2	12
4	5	2.5	16

2 结果与分析

2.1 平田头菇菌丝体对氮素营养的利用

氮源是蕈菌菌丝细胞合成酶类、蛋白质和核酸的必需主要原料, 为细胞生长和正常代谢活动所必需^[5]。试验表明, 平田头菇菌丝体可利用的氮源比较广泛, 其中对有机氮的利

收稿日期:2013-10-17

作者简介:刘西周(1984—),男,甘肃陇南人,硕士,助理实验师,研究方向为蕈菌设施化栽培与植物组织培养。

通信作者:郭成金,教授,研究方向为蕈菌与植物细胞营养生理。
E-mail:chengjin6866@163.com。

用效果明显高于无机氮源。以麦麸为氮源培养基的平田头菇菌丝体生物量最高,平田头菇菌丝体生物量从高到低依次是:麦麸处理>蛋白胨处理>硝酸铵处理>氯化铵处理>硝酸钾处理>酵母粉处理。方差分析表明,麦麸处理下的平田头菇菌丝体生物量与其他氮源处理差异极显著^[6]。

表 3 不同氮源对平田头菇菌丝体生物量的影响

氮源	田头菇菌丝体生物量(g/L)			
	重复 1	重复 2	重复 3	$\bar{x} \pm s$
蛋白胨	7.30	7.19	7.08	7.19 ± 0.11B
酵母粉	7.05	7.12	6.91	7.03 ± 0.11B
麦麸	7.74	7.28	8.01	7.68 ± 0.37A
硝酸铵	7.26	7.07	7.08	7.13 ± 0.11B
硝酸钾	7.03	7.05	7.16	7.08 ± 0.69B
氯化铵	7.06	7.11	7.21	7.12 ± 0.08B

注:同列数据后不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。下同。

2.2 平田头菇菌丝体对碳源营养的利用

碳源是液体培养基的基础成分,是蕈菌大分子物质的主要结构骨架,既是菌丝合成的重要细胞结构,又是菌丝各种代谢产物和细胞内贮藏的主要物质原料^[5]。由表 4 可见,平田头菇菌丝体能利用各种碳源,其中以马铃薯和葡萄糖最好,平田头菇菌丝体生物量从高到低依次是:马铃薯处理>葡萄糖处理>玉米渣处理>麦芽糖处理>蔗糖处理>甘露醇处理。马铃薯处理下的平田头菇菌丝体生物量极显著高于其他碳源处理^[6]。

表 4 不同碳源对平田头菇菌丝体生物量的影响

氮源	田头菇菌丝体生物量(g/L)			
	重复 1	重复 2	重复 3	$\bar{x} \pm s$
葡萄糖	8.20	8.71	8.53	8.48 ± 0.26B
蔗糖	7.20	7.27	7.48	7.32 ± 0.15C
甘露醇	6.97	7.17	7.23	7.12 ± 0.15C
麦芽糖	7.66	7.54	7.39	7.53 ± 0.14C
马铃薯	10.29	9.12	8.85	9.42 ± 0.77A
玉米渣	8.40	8.51	8.46	8.46 ± 0.53B

2.3 碳源、氮源正交试验结果

由表 5 可知,影响平田头菇菌丝体生长的 4 个因素重要程度由高到低依次是:马铃薯>葡萄糖>麦麸>蛋白胨^[7-9]。平田头菇菌丝体液体培养基最佳碳源、氮源组合方式为 25 g/L 葡萄糖、250 g/L 马铃薯、40 g/L 麦麸、4 g/L 蛋白胨,该条件下平田头菇菌丝体生物量最大、长势最好。

2.4 无机盐及维生素 B₁ 浓度的筛选结果

虽然无机盐和维生素对平田头菇菌丝体生长量的影响程度不如碳源、氮源重要,但其对菌丝体生长起着促进或延缓作用,无机盐构成细胞的主要成分,参与细胞渗透压的调节。维生素是辅酶的重要组成成分,或发挥辅酶的作用^[5]。由表 6 可见,处理 4 下平田头菇菌丝体生长量极显著高于其他处理,即最优组合为 5 g/L KH₂PO₄、2.5 g/L MgSO₄ · 7H₂O、16 mg/L 维生素 B₁。

表 5 碳源、氮源正交试验结果

序号	A:葡萄糖	B:马铃薯	C:麦麸	D:蛋白胨	生物量(g/L)
1	1	1	1	1	9.53
2	1	2	2	2	10.36
3	1	3	3	3	9.08
4	2	1	2	3	9.45
5	2	2	3	1	9.23
6	2	3	1	2	8.30
7	3	1	3	2	9.73
8	3	2	1	3	10.45
9	3	3	2	1	9.70
k ₁	9.657	9.570	9.427	9.487	
k ₂	8.993	10.013	9.837	9.463	
k ₃	9.960	9.027	9.347	9.660	
R	0.967	0.986	0.490	0.197	

表 6 不同处理下平田头菇菌丝体生物量

氮源处理	平田头菇菌丝体生物量(g/L)			
	重复 1	重复 2	重复 3	$\bar{x} \pm s$
1	8.44	7.97	7.84	8.08 ± 0.32B
2	7.74	8.19	7.12	7.68 ± 0.54B
3	8.3	6.96	7.85	7.70 ± 0.68B
4	13.72	13.36	13.47	13.52 ± 0.18A

3 结论

研究表明,平田头菇培养基最佳配方是 25 g/L 葡萄糖、250 g/L 马铃薯(浸提液)、40 g/L 麦麸(浸提液)、4 g/L 蛋白胨、5 g/L KH₂PO₄、2.5 g/L MgSO₄ · 7H₂O、16 mg/L 维生素 B₁,pH 值自然,28 ℃ 静置培养 10 d,其菌丝体生物量(干重)可达 13.52 g/L。本研究为平田头菇人工驯化等进一步研究奠定了基础。

参考文献:

[1]戴玉成,杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订[J]. 菌物学报,2008,27(6):801-824.

[2]周会明,柴红梅,赵永昌. 田头菇属真菌研究进展[J]. 中国食用菌,2009,28(6):3-8.

[3]郭成金. 蕈菌生物学[M]. 天津:天津科学技术出版社,2005:159.

[4]刘西周,郭成金. 采用 L₉(3⁴) 正交设计方法筛选血耳菌丝体液体培养基[J]. 中国食用菌,2009,28(1):36-38.

[5]邢来君,李明春. 普通真菌学[M]. 北京:高等教育出版社,1999:50-58.

[6]李春喜. 生物统计学[M]. 北京:科学出版社,1997:263-265.

[7]王振河,万学东,武忠伟,等. 正交设计优化裂褶菌发酵全液多糖提取工艺[J]. 中国野生植物资源,2007,26(4):50-51,56.

[8]王战勇,张建东,李莹,等. 北虫草液体培养基的研究[J]. 辽宁石油化工大学学报,2004,24(1):19-21,25.

[9]陈文强,邓百万,陈永刚,等. 用 L₉(3⁴) 正交试验筛选裂褶菌液体培养基[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(4):38-41.