

张 丽,郭成金. 松茸菌丝体液体培养方式及其最适培养基的筛选[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):245-247.

# 松茸菌丝体液体培养方式及其最适培养基的筛选

张 丽, 郭成金

(天津师范大学生命科学学院/天津市动植物抗性重点实验室,天津 300387)

**摘要:**首次通过对松茸菌丝体的液体培养方式的比较,选择以间歇性手摇的方式进行筛选,以松茸菌丝体生物量(干质量)为主要指标,首先采用单因素试验分别筛选出 2 种最适碳氮源,再结合  $L_9(3^4)$  正交设计方法,最终得到最适液体培养基配方:蔗糖 30.00 g/L,麦芽糖 20.00 g/L,酵母粉 2.50 g/L,麦麸 25.00 g/L(浸提液), $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.50 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.50 g/L,维生素  $\text{B}_1$  8 mg/L,pH 值自然条件。25 ℃静置培养 12 h,再每隔 12 h 水平往复手摇约 5 min,培养 72 h,其生物量可达 10.92 g/L。与前人试验结果相比,该方式周期更短,生物量更高。

**关键词:**松茸;间歇性手摇;菌丝体;生物量;液体培养基;正交设计;周期。

**中图分类号:**S646.1+50.4+3

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2014)08-0245-03

松茸[*Tricholoma matsutake* (S. Ito & S. Imai) Singer]别称松口蘑,属担子菌门伞菌亚门伞菌纲伞菌亚纲伞菌目口蘑科口蘑属<sup>[1]</sup>,是一种珍稀濒危的食药两用真菌,国家级二级保护植物,有极高的营养价值和经济价值<sup>[2]</sup>。松茸是共生菌,世界范围内研究松茸人工栽培已有几十年的历史,然而至今仍无突破性的成果。目前,随着松茸生理生态研究的深入,松茸菌丝的纯培养及子实体的仿生态栽培已取得了一定的进展,但仅能做到接种式的半人工栽培,真正的人工栽培还没有实现<sup>[3-4]</sup>。目前,很多国内外学者采用高新技术从分子生物学角度研究松茸外生菌根的形成机理、分子特性和它们的遗传特征序列<sup>[5-8]</sup>,以此作为分子标记,既可研究松茸的起源和亲缘关系,又可为建立松茸基因库打下基础,以备将来用以挽救其可能灭绝的命运<sup>[3]</sup>。自日本学者洪田捻(1947)、广江勇(1957)和小川真(1987)等先后报道了分离培养松茸菌丝体的方法、培养基、菌落形态和菌丝类型<sup>[9]</sup>并为松茸菌种分离提供了成功的经验以来,人们采用不同的方法从不同的角度对松茸菌丝体纯培养<sup>[10-11]</sup>、液体发酵<sup>[12-13]</sup>等进行了许多研究,通过对松茸菌丝体的获得、扩繁及其鉴定证实了在合理控制试验条件下可以进行松茸菌丝体液体扩繁,且扩繁后的菌丝体与原种依然保持种质的一致性<sup>[14]</sup>。笔者运用不同于前人的试验设计,通过碳氮源单因素试验,并结合  $L_9(3^4)$  正交设计对松茸菌丝体最适液体培养基进行了系统的筛选,为松茸液体发酵及今后的育种等提供了理论依据及技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌种

松茸,由北京北纳创联生物技术研究提供,编号为 ACC51071。

收稿日期:2013-12-04

基金项目:国家星火计划(编号:2012GA610002)。

作者简介:张 丽(1989—),女,安徽舒城人,硕士研究生,主要从事蕈菌生物学研究。E-mail:li529924@163.com。

通信作者:郭成金,教授,主要从事植物细胞营养及蕈菌生物学研究。

E-mail:chengjin@vip.sina.com。

### 1.2 培养基

1.2.1 综合培养基 棉籽皮 200.00 g/L(浸提液)、马铃薯 200.00 g/L(浸提液)、葡萄糖 20.00 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.50 g/L、维生素  $\text{B}_1$  0.004 g/L、琼脂 18.00 g/L,pH 值自然条件。

1.2.2 碳源初选培养基 酵母粉 3.00 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.50 g/L,维生素  $\text{B}_1$  0.004 g/L,pH 值自然条件。分别以葡萄糖 20.00 g/L、麦芽糖 20.00 g/L、蔗糖 20.00 g/L、马铃薯 200.00 g/L(浸提液)、玉米 20.00 g/L(浸提液)为供试碳源。

1.2.3 氮源初选培养基 葡萄糖 20.00 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.00 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.50 g/L,维生素  $\text{B}_1$  4 mg/L,pH 值自然。分别以酵母粉 3.00 g/L、蛋白胨 3.00 g/L、牛肉膏 3.00 g/L、硝酸铵 3.00 g/L、麦麸 20.00 g/L(浸提液)为供试氮源。

### 1.3 试剂与仪器设备

SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台(江苏苏州净化设备有限公司);YXQG02 手提式压力蒸汽消毒器(山东新华医疗器械厂);WDP 型微生物多用培养箱(广东省医疗器械厂);BS224S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统股份有限公司);AP-01D 真空泵(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);DHG-9240 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

### 1.4 试验方法

1.4.1 菌种活化与提纯复壮 将保存的松茸菌种提前 3 d 活化,在无菌条件下接种于斜面综合培养基上,25 ℃培养 5 d,再挑取健壮的菌丝前端,接种于平板综合培养基上,于 25 ℃培养 6 d,备用。

1.4.2 菌丝体液体培养 用打孔器在生长健壮的菌丝体前端,挑取大小相同约 0.5 cm<sup>2</sup> 的菌块,接种于液体培养基中,每瓶 5 块。25 ℃静置培养 12 h,再每隔 12 h 水平往复手摇约 5 min,培养 72 h,每个水平 3 次重复。

1.4.3 菌丝体干质量测量 滤纸编号,分别用电子天平称重,将培养 84 h 的松茸菌丝体抽滤后,于 60 ℃烘箱中烘干至恒重,用电子天平再次称重。

1.4.4 碳氮源培养基正交试验 依据碳源、氮源单因素试验

的结果,各选择 2 个较好的碳氮源,按  $L_9(3^4)$  设计 4 因素 3 水平正交试验(表 1)进行复选,与  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.50 g/L/维生素  $\text{B}_1$  0.004 g/L 组成 9 个试验配方,筛选出最佳碳氮源组合。

表 1 碳氮源培养基正交试验因素和水平

水平	A:蔗糖含量(g/L)	B:麦芽糖含量(g/L)	C:酵母粉含量(g/L)	D:麦麸含量(g/L)
1	10.00	10.00	2.50	15.00
2	20.00	20.00	3.00	20.00
3	30.00	30.00	3.50	25.00

1.4.5 无机盐及维生素  $\text{B}_1$  水平试验 根据碳氮源正交试验的结果选出最佳碳氮源组合作为基础培养基,向其中添加不同浓度的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和维生素  $\text{B}_1$ ,结果见表 2。

表 2 无机盐及维生素  $\text{B}_1$  因素与水平试验

水平	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 含量(g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 含量(g/L)	维生素 $\text{B}_1$ 含量(mg/L)
1	1.50	0.50	4
2	2.00	1.00	6
3	2.50	1.50	8
4	3.00	2.00	10

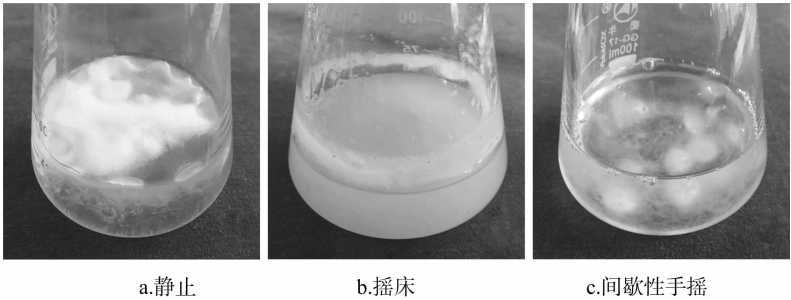


图1 不同方式的培养结果

表 3 不同碳源对菌丝体生物量的影响

水平	不同碳源的菌丝体生物量(g/L)				
	麦芽糖	葡萄糖	蔗糖	马铃薯	玉米粒
1	3.91	3.34	3.90	2.20	2.58
2	2.97	2.95	3.84	1.99	2.28
3	2.85	3.01	4.16	2.52	2.22
平均值	3.24A	3.10AB	3.96A	2.24B	2.36B

注:平均值行后标有不同大写字母表示处理间差异极显著( $P<0.01$ )。

表 4 不同碳源配方下菌丝体生物量的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值
组间	5.980	4	1.495	14.478
组内	1.033	10	0.103	
总变异	7.012	14		

检验法多重比较结果表明,蔗糖、麦芽糖与葡萄糖在 0.01 水平差异不显著,但与马铃薯、玉米粒差异显著,所以选择蔗糖和麦芽糖进行下一步碳氮源的正交试验。

2.3 氮源对松茸菌丝体生物量的影响

曾东方等对松茸纯培养氮源进行了优选试验,结果表明,无机氮源以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  最好,其次为  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$  最差,呈现出松茸喜铵态氮氮源而不喜硝态氮氮源的规律性<sup>[17]</sup>,所以供试

2 结果与分析

2.1 不同液体培养方式对松茸菌丝体生长状况的影响

试验初期笔者首次进行了 3 种液体培养方式的筛选,分别为静置培养(图 1-a)、120 r/min 摇床培养(图 1-b)和间歇性手摇培养(图 1-c),各 72 h。由于松茸菌丝生长迅速,静置培养 12 h 后菌丝体即可连成片,浮于液体表面,抽滤后菌丝体生物量误差较大,且不利于获取菌丝体片段。摇床培养的液体浑浊,菌丝细小黏稠,不宜抽滤和分离。间歇性手摇是接种后静置培养 12 h,再每隔 12 h 水平往复手摇约 5 min,培养一段时间后的菌丝体分布均匀,清晰可见,较容易抽滤,且动静相间法所培养的菌丝体更有利于原生质体的制备和诱变育种<sup>[15]</sup>,所以最终采取间歇性手摇方式进行后期试验。

2.2 不同碳源对松茸菌丝体生物量的影响

碳源是构成细胞基本骨架的营养物质,同时也为基本生命过程提供能源,试验结果(表 3)表明,在 5 种供试碳源中,以蔗糖为碳源的菌丝体生物量最高,麦芽糖次之,再次为葡萄糖、玉米粒,马铃薯最低。统计学方差分析结果(表 4)表明, $F$  值为  $14.478 > F_{0.01}(4,10) = 5.994^{[16]}$ ,表明不同碳源培养基对松茸菌丝体生物量的影响在 0.01 水平上差异显著。Duncan's

氮源设为 4 种有机氮源和 1 种无机氮源硝酸铵。试验结果(表 5)表明,在供试的 4 种有机氮源中,麦麸获得的菌丝体生物量最高,其次是酵母粉,再次是牛肉膏、蛋白胨,无机氮源硝酸铵获得的菌丝体生物量最少,可能是因为小分子有机氮比无机氮更有利于松口蘑菌丝的生长<sup>[18]</sup>。统计学方差分析结果(表 6)表明, $F$  值为  $11.519 > F_{0.01}(4,10) = 5.994^{[16]}$ ,表明不同氮源培养基对松茸菌丝体生物量的影响在 0.01 水平上差异显著。Duncan's 检验法多重比较结果表明,麦麸与酵母粉在 0.01 水平差异不显著,但与蛋白胨和牛肉膏差异显著,所以选择麦麸和酵母粉进行下一步碳氮源的正交试验。

表 5 不同氮源菌丝体生物量的影响

水平	不同氮源的菌丝体生物量(g/L)				
	酵母粉	蛋白胨	牛肉膏	硝酸铵	麦麸
1	4.09	3.08	2.85	1.26	4.80
2	4.02	2.44	3.13	2.15	4.65
3	3.63	2.66	2.65	3.18	4.29
平均值	3.91AB	2.73BC	2.88BC	2.20C	4.58A

注同表 3。

2.4 碳源、氮源正交试验结果

由表 7 可知,蔗糖的极差最大,其次是麦芽糖、麦麸、酵母粉。极差越大,在该因素的水平变动时,菌丝体生物量变化越

表 6 不同氮源配方下菌丝体生物量的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值
组间	11.201	4	2.800	11.519
组内	2.431	10	0.243	
总变异	13.632	14		

大,也就是该因素对生物量变化影响越大,可见碳源蔗糖是影响菌丝生物量的主要因素。比较水平之间  $k$  值大小,得到最佳水平组合为  $A_3B_3C_3D_3$ ,即蔗糖 30.00 g/L、麦芽糖 30.00 g/L、酵母粉 3.50 g/L、麦麸 25.00 g/L(浸提液)。但经过 3 次重复试验验证,其菌丝体平均生物量为 8.21 g/L,低于 8 号处理组。可能是因为随碳源、氮源浓度加大造成高渗环境,处于逆境的菌丝体正常代谢受阻<sup>[19]</sup>,经过分析比较可知,最终选取 8 号进行下一步的无机盐及维生素  $B_1$  水平试验。

表 7 碳源、氮源筛选的  $L_9(3^4)$  正交直观分析结果

编号	A:蔗糖 含量(g/L)	B:麦芽糖 含量(g/L)	C:酵母粉 含量(g/L)	D:麦麸 含量(g/L)	菌丝体生物 量(g/L)
1	10	10	2.50	15	4.79
2	10	20	3.00	20	5.81
3	10	30	3.50	25	7.33
4	20	10	3.00	25	6.27
5	20	20	3.50	15	7.26
6	20	30	2.50	20	7.50
7	30	10	3.50	20	7.19
8	30	20	2.50	25	8.73
9	30	30	3.00	15	8.67
$k_1$	5.977	6.083	7.007	6.907	
$k_2$	7.010	7.267	6.917	6.833	
$k_3$	8.197	7.833	7.260	7.443	
$R$	2.222	1.750	0.343	0.610	

2.5 无机盐及维生素  $B_1$  水平试验结果分析

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $KH_2PO_4$  对菌丝生长促进作用极显著,说明这些矿物质是松茸菌丝生长所必需的,维生素  $B_1$  对松茸菌丝生长促进作用显著<sup>[20]</sup>,为了进一步完善松茸液体培养基成分,试验对无机盐  $KH_2PO_4$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  和维生素  $B_1$  进行了水平试验筛选。由统计学分析结果(表 8)可以看出,处理组之间有极显著差异,菌丝体生物量首先随着剂量的增加而增加,但再继续增加剂量又会导致菌丝体生物量下降,低剂量组(水平 1)与高剂量组(水平 4)作用相当,水平 3 的菌丝体生物量最高,表明无机盐的添加需适量,不可过高也不可过低。所以,确定最佳液体培养基配方的无机盐与维生素水平为  $KH_2PO_4$  2.50 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.50g/L、维生素  $B_1$  8 mg/L。

表 8 无机盐及维生素  $B_1$  用量对菌丝体生物量的影响

重复	菌丝体生物量 (g/L)			
	水平 1	水平 2	水平 3	水平 4
1	8.07	9.20	10.59	8.20
2	7.58	9.25	11.62	8.81
3	7.92	9.26	10.55	7.59
平均值	7.86C	9.24B	10.92A	8.20BC

注同表 3。

3 结论

试验结果表明,松茸菌丝体生长的最适液体培养基为蔗糖 30.00 g/L、麦芽糖 20.00 g/L、酵母粉 2.50 g/L、麦麸

25.00 g/L(浸提液)、 $KH_2PO_4$  2.50 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.50 g/L、维生素  $B_1$  8 mg/L,pH 值自然条件。25℃静置培养 12 h,再每隔 12 h 水平往复手摇约 5 min,培养 72 h,其生物量可达 10.92 g/L,与前人试验结果相比,本研究周期更短,生物量更高。采用间歇性手摇的方式培养,得到的菌丝体分散均匀,生物量高,便于日后的原生质体制备和诱变育种。

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]弓明钦,王凤珍. 从国际松茸市场动向看国产松茸的应对措施[J]. 国土与自然资源研究,2004,02(2):88-89.

[3]周选围. 松茸资源研究概况[J]. 食用菌学报,2002,9(1):50-56.

[4]邵丽丽,王艳臣,罗春玲. 松口蘑研究现状及发展趋势[J]. 中国林副特产,2009,101(4):109-110.

[5]Vaario L M,Heinonsalo J,Spetz P,et al. The ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* is a facultative saprotroph *in vitro*[J]. Mycorrhiza,2012,22(6):409-418.

[6]Kataoka R,Siddiqui Z A,Kikuchi J,et al. Detecting nonculturable bacteria in the active mycorrhizal zone of the pine mushroom *Tricholoma matsutake*[J]. Journal of Microbiology,2012,50(2):199-206.

[7]Vaario L M,Fritze H,Spetz P,et al. *Tricholoma matsutake* dominates diverse microbial communities in different forest soils[J]. Appl Environ Microbiol,2011,77(24):8523-8531.

[8]Ding X,Hou Y L. Identification of genetic characterization and volatile compounds of *Tricholoma matsutake* from different geographical origins[J]. Biochemical Systematics and Ecology,2012,44(44):233-239.

[9]刘振钦,高勇秀,王子权. 松茸菌丝体分离培养研究初报[J]. 吉林农业大学学报,1989,11(2):13-16,120.

[10]Hirato H,Kitamoto Y. Effect of physico-chemical characteristics of the culture substrate and nutritional conditions on mycelial growth in *Tricholoma matsutake*[J]. Mushroom Sci Biotechnol,1995(2):17-22.

[11]曹张军,张兴群,吕小鹰,等. 一个适合松茸菌丝生长的加富培养基[J]. 食用菌学报,2007,14(3):41-43.

[12]李长田,刁盈盈,毛欣欣,等. 松茸液态发酵菌丝生长量因子的研究[J]. 菌物学报,2012,31(2):229-234.

[13]王淑珍,白晨,高雁,等. 松茸液态发酵培养基的筛选与科学依据[J]. 食用菌,2000,22(6):4-5.

[14]张微思,罗孝坤,张丽英,等. 松茸菌丝体的纯培养及其鉴定[J]. 中国食用菌,2010,29(3):34-36.

[15]曲鸿雁,郭成金. 冬虫夏草与蛹虫草融合子菌丝体液体培养基筛选[J]. 中国酿造,2013,32(3):106-109.

[16]杜荣骞. 生物统计学[M]. 北京:高等教育出版社,2003:263-265.

[17]曾东方,陈玢,高孟文. 不同氮源对松茸菌丝生长的影响[J]. 食用菌,2010,32(4):10-11.

[18]赵秀芳. 不同碳氮源对松口蘑菌丝生长的影响[J]. 安徽农业科学,2005,33(3):429-429,431.

[19]刘西周,郭成金. 采用  $L_9(3^4)$  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.

[20]杨民和,杨新美,陈立国. 松茸的营养生理及培养基的筛选[J]. 菌物系统,2000,19(2):272-277.