

叶建强,宋冰,李玉,等.灰树花生理成熟期到出菇期生理生化初探[J].江苏农业科学,2018,46(19):133-136.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.19.035

灰树花生理成熟期到出菇期生理生化初探

叶建强,宋冰,李玉,付永平,李丹,李长田,王菲,徐安然,孟灵思

(吉林农业大学/食药菌教育部工程研究中心,吉林长春 130118)

摘要:为较全面地了解灰树花生理后熟期及其以后的生理生化变化,进行温度差、pH 值、菌料单位面积压力、含水量、失质量、羧甲基纤维素酶活性、滤纸纤维素酶活性、淀粉酶活性、半纤维素酶活性、胞外水溶性糖含量、胞外水溶性蛋白含量的研究。结果表明,不同指标变化趋势不完全相同,同一指标不同时期变化也不完全相同。菌料单位面积压力在生理成熟期不断升高到一定水平,在出菇期的原基形成时明显升高,达到最大值后不断降低;羧甲基纤维素酶活性在生理成熟期降低到稳定值,在出菇期明显升高,原基形成后不断降低;胞外可溶性蛋白含量在生理成熟期不断升高到一定水平,在出菇期菌丝恢复时降低,后又升高到稳定水平。pH 值和漆酶相关酶与原基形成有一定正相关,这对灰树花原基形成研究具有积极意义,同时为灰树花栽培过程中的生理成熟期及出菇管理提供理论依据。

关键词:灰树花;生理成熟期;出菇期;生理生化;酶活性;原基形成

中图分类号: S646.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)19-0133-04

灰树花[*Grifola frondosa* (Dicks.) Gray]商品名别称栗子蘑(中国河北省迁西县)、舞茸(日本)^[1],具有很高的食药价值^[2-5],素有“食用菌王子”之美称^[6]。目前,灰树花在日本的销量已仅次于香菇和金针菇,稳居第 3 位^[7],在我国也是主要栽培珍稀食药菌之一^[8],在河北省迁西县、山东省泰安市及浙江省庆元县等地已形成区域特色产业^[9]。

食用菌栽培过程分为培养过程及出菇过程。培养过程分为定植期、发热期和生理成熟期^[10]。生理成熟期能显著影响食用菌的产量和效益。近些年,关于食用菌生理成熟期的研究不断增多。以往的研究表明,不同食用菌拥有不同的较适应的生理成熟期培养天数,如香菇(20~40 d)、白灵菇(30~60 d)、茶薪菇(20~25 d)、蟹味菇(30~35 d)、灰树花(20~30 d)、杏鲍菇(7 d)、金针菇(2~5 d)、真姬菇(25~40 d)等^[11],但未有针对关于该阶段的深入研究。灰树花属于中高

温型菌^[12],出菇温度和发菌温度基本一致,可以减少其他因素的影响。虽然已有关于灰树花栽培过程中胞外酶等方面的报道^[13-14],但都没有进入该阶段的深入研究。本试验以主要栽培料硬杂木木屑、麦麸、轻质碳酸钙等为栽培培养基^[15],研究灰树花生理成熟期到出菇阶段的培养基质量、含水量等生理生化变化,以期为灰树花栽培提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 灰树花菌种 菌株号为 H34,由吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心提供,来源于山东省泰安市。栽培料主料(硬杂木木屑)和辅料(麦麸、轻质碳酸钙),均购自吉林省长春市农博园菌菜基地。

1.1.2 培养基 配方:75%硬杂木木屑(主料),23%麦麸(辅料),2%轻质碳酸钙(辅料),培养料含水量在 62.5%左右,pH 值自然。

1.2 试验方法

1.2.1 栽培试验 各料运用烘干箱在 105℃烘干 30 min,测定含水量。按配方配比及含水量称取各材料,加水拌至含水量为 62.5%左右,采用 33.00 cm×17.50 cm×0.05 cm 聚丙烯袋装湿料 800.0 g(干料 300.0 g),袋口套直径为 2.5 cm 的套环,插入直径为 2.5 cm、深 12 cm 的柱型塑料插棒,在 121℃灭菌 85 min,冷却至室温,接种菌棒(拔出塑料插棒),每袋接种 10 mL 液体菌种,盖上透气盖,在 23~26℃培养大

收稿日期:2017-05-16

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503137);国家重点基础研究发展规划项目(编号:2014CB138305);吉林省秸秆综合利用技术创新平台(编号:吉高平合字 2014B-1);吉林农业大学启动资金(编号:2015007)。

作者简介:叶建强(1990—),男,江西鹰潭人,硕士研究生,主要从事食用菌栽培研究。E-mail:1508409301@qq.com。

通信作者:李玉,男,教授,博士生导师,主要从事菌物科学与食用菌工程技术和产业化研究。E-mail:yuli966@126.com。

[13]王英男,陶爽,华晓雨,等.盐碱胁迫下 AM 真菌对羊草生长及生理代谢的影响[J].生态学报,2018,38(6):1-8.

[14]Phillips J M, Hayman D S, Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection [J]. Transactions of the British Mycological Society, 1970, 55(1): 158-160.

[15]Tsang A, Maunm A. Mycorrhizal fungi increase salt tolerance of *Atrophostyles helvola* in coastal foredunes [J]. Plant Ecology, 1999,

144(11): 159-166.

[16]陆爽,郭欢,王绍明,等.盐胁迫下 AM 真菌对紫花苜蓿生长及生理特征的影响[J].水土保持学报,2011,25(2):227-231.

[17]樊瑞苹,周琴,周波,等.盐胁迫对高羊茅生长及抗氧化系统的影响[J].草业学报,2012,21(1):112-117.

[18]魏秀君,殷云龙,芦治国,等. NaCl 胁迫对 5 种绿化植物幼苗生长和生理指标的影响及耐盐性综合评价[J].植物资源与环境学报,2011,20(2):35-42.

部分显现原基,转入出菇室。出菇室管理如下:去掉透气盖及原基,搔菌出菇;温度维持在 19~21℃,湿度为 93%~97%,二氧化碳浓度为 400~700 μL/L,光照为 200 lx/12 h,直到采收。

1.2.2 粗酶液的制备过程 在生理成熟阶段到出菇阶段,每 5 d 取样 1 次,3 次重复。取样过程:菌袋开口,在栽培料下 2~3 cm 处均匀取样品,每份 20.0 g 左右,每天 09:00 随机测量及取样,样品用液氮冷冻后,保存在 -80℃ 冰箱中备用^[16]。粗酶液提取:称 1.0 g 样品,其中 1 份加入 2.0 mL 蒸馏水,在 28℃ 温度下浸提 4 h,过滤残渣,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,上清液即是粗酶液,保藏在 4℃,每个样品 2 次重复,分别备用。

1.2.3 生理测定方法 pH 值采用手持式 Testo 206 酸度计测定^[17];菌袋失质量等于上一次取样阶段质量减去当前取样阶段菌袋的质量^[18];培养基干质量测定方法参照王玉万等的方法^[19];含水量测定采用 105℃ 烘干法^[20];温度差采用水银温度计测定菌料温度,等于菌料中心温度减去环境温度;菌料单位面积压力采用 GY-4 果实硬度计测量。

1.2.4 生化测定方法 羧甲基纤维素酶和滤纸纤维素酶活性测定参照 Mandels 等的方法^[21],淀粉酶活性测定参照李合生的方法^[22],羧甲基纤维素酶、滤纸纤维素酶、淀粉酶酶活力

单位定义为 1 U=1 μmol 葡萄糖/(60 min·g) 干培养物;半纤维素酶活性测定参照 Shamala 等的方法^[23],酶活力单位定义为 1 U=1 μmol 木糖/(60 min·g) 干培养物;漆酶、多酚氧化酶、愈创木酚氧化酶活性测定参照宋爱荣等的方法^[24-25],酶活力单位定义为 1 U=ΔD/(30 min·g) 干培养物。胞外可溶性蛋白含量测定采用 lowry 法^[26],应用酪蛋白作标准曲线;胞外可溶性糖含量测定采用二硝基水杨酸法^[27],使用葡萄糖糖作标准曲线。

2 结果与分析

2.1 灰树花栽培特性

由表 1 可知,在灰树花栽培过程中,菌袋在 26 d 左右满袋,40 d 左右部分菌袋套环口处显现原基,40 d 去掉套环及原基(生理后熟期显现),搔菌出菇,54 d 开始采收,到 62 d 采收结束,根据曾宪森等的报道^[12],该种属于中高温型菌种(17~26℃)。

本试验从生理成熟期到出菇期,共取 8 个时间点,分别是 0、5、10、15、20、25、30、35 d,其中,0、5、10、15 d 属于生理成熟期,20、25、30、35 d 属于出菇期。菌袋移入出菇室时,为了控制整齐度及方便研究灰树花出菇各阶段,去掉套环及原基(生理后熟期显现),搔菌出菇,各时期的状态见表 2。

表 1 灰树花生育理过程特性

接种日期	生理成熟期		出菇期	
	满袋日期	部分菌袋现原基	进入出菇室	采收
2016 年 7 月 10 日	2016 年 8 月 1—10 日	2016 年 8 月 16—20 日	2016 年 8 月 20 日	2016 年 9 月 2—9 日

表 2 各取样时间灰树花的状态

时期	取样时间(d)	状态
生理成熟期	0	菌丝满袋
	5	菌袋表面浓白
	10	少数菌袋口出现原基
	15	多数菌袋口出现原基
出菇期	20	菌丝恢复
	25	原基形成
	30	原基分化
	35	采收

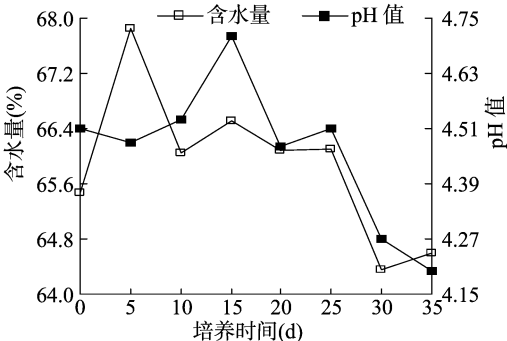


图1 菌料的 pH 值和含水量在生理后熟期和出菇期过程中的变化

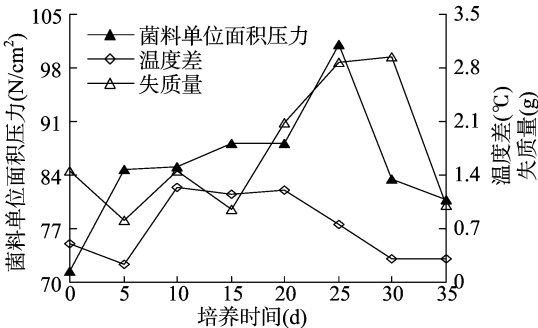


图2 菌料的单位面积压力、温度差和失质量在生理后熟期和出菇期过程中的变化

2.2 灰树花生理特性变化

对灰树花生理成熟期(0~15 d)和出菇期(15~35 d)的生理变化进行分析,由图 1 可知,菌料中含水量在 0~5 d 基本保持上升状态,但 5~10 d 明显下降,可能由于原基形成,呼吸加快导致水分散失,进入出菇期,15~30 d 含水量不断下降,且 25~30 d 下降明显,可能与原基分化(此阶段原基吐出大量白色水珠)有关,30~35 d 含水量有略微升高。菌料的 pH 值在 0~5 d 缓慢降低,在 5~15 d 不断升高,其中 10~15 d 升高明显,15 d 达最高值,进入出菇期,菌料的 pH 值基本保持下降,但 20~25 d 有小幅升高,表明原基形成过程中培养菌料的 pH 值会升高。

菌料中有纵横交错的菌丝,形成一个庞大的整体,能承受一定压力,与菌丝量有一定相关性。由图 2 可知,菌料单位面积承受的压力在 0~15 d 不断升高,其中在 0~5 d 明显升高,

其后变化不大,进入出菇期,15~25 d 不断升高,20~25 d 升高明显,25 d 达最高值,25~35 d 不断下降,其中 25~30 d 下降明显。这与 Montoya 等报道菌丝量在该过程不断升高到一

定值^[14,28]基本一致,但菌丝的韧性还与菌丝的内含物及年龄有关,本研究表明在 25~35 d 单位面积压力下降,可能是菌丝体把内含物输送到子实体中相关。菌料失质量在 0~5 d 不断降低,5~10 d 明显升高,可能与原基形成前代谢加强有关,10~15 d 不断下降,进入出菇期,15~30 d 不断升高,在 30 d 达到最大值,可能与割口出菇方式有关,30~35 d 明显减少,可能与灰树花叶片生长可以接受到环境中高湿度水汽有关。菌袋的内外温度差变化反应了菌料的代谢情况。温度差在 0~5 d 缓慢下降,5~10 d 明显升高,可能与菌袋袋口出现原基有关,10~15 d 温度差维持在较高水平,进入出菇期,15~20 d 仍然维持在高水平,20~30 d 明显降低,30~35 d 基本维持不变。

2.3 灰树花胞外酶变化

从生理成熟期(0~15 d)到出菇期(15~35 d),随着培养时间的增加,灰树花各个酶类活性有着不同的变化。

由图 3 可知,纤维素降解酶类主要包括羧甲基纤维素酶和滤纸纤维素酶。其中,羧甲基纤维素酶活性在 0~15 d 基本呈下降趋势,但 5~10 d 有细微上升,可能跟菌袋袋口出现原基有关,进入出菇期,20~25 d 有较高值。这表明原基形成时,羧甲基纤维素酶活性升高,也与 Montoya 等报道灰树花羧甲基纤维素酶^[14]基本一致。此外,滤纸纤维素酶活性进入出菇期开始不断上升,25 d 有较高值,之后明显下降。这表明滤纸纤维素酶活性在生理成熟期较弱,在出菇期大量分泌,且在原基分化时有最大值,这与倪新江等报道滤纸纤维素酶活性比纤维素酶及半纤维素酶活性微弱^[13]相一致,且在出菇期变化与本试验一致。半纤维素酶活性在 0~5 d 略微下降,5~15 d 明显上升,进入出菇期,基本维持在较高水平,但 20~25 d 明显下降,这可能与原基分化有关。淀粉酶活性在 0~15 d 基本不断升高,但 5~10 d 有细微下降,可能与菌袋袋口出现原基有关,进入出菇期,15~20 d 快速上升,20 d 时达最大值,可能与菌丝恢复相关,但 20~30 d 明显下降,30~35 d 又上升。淀粉酶活性在生理成熟期与倪新江等的报道^[13-14]不一致,可能是与本试验选的高温菌种有关,但在出菇期基本一致,表明灰树花出菇时,淀粉酶活性不断降低。

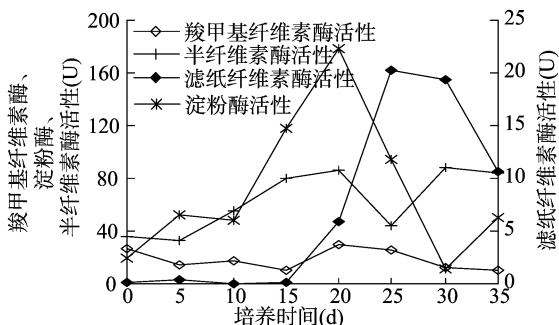


图3 菌料中的纤维素酶类、半纤维素酶和淀粉酶在生理后熟期和出菇期过程中的变化

木质素降解酶类主要是漆酶,与漆酶相关酶包括漆酶、愈创木酚氧化酶和多酚氧化酶^[29-30]。由图 4 可知,3 种酶的活性在 0~35 d 基本是不断降低的,在 10、25、35 d 均有高峰值。这表明木质素降解酶类酶活性在生理成熟期和出菇期低,无太大相关性,与倪新江等研究报道漆酶类变化^[13-14]基本一致。但木质素降解酶类酶活性在原基形成时,酶活性会有一

定提高,表明原基形成与木质素降解酶类有一定正相关性,这与姜性坚等报道在白色茶树菇栽培过程中原基形成及分化时漆酶显著升高^[31]相一致。

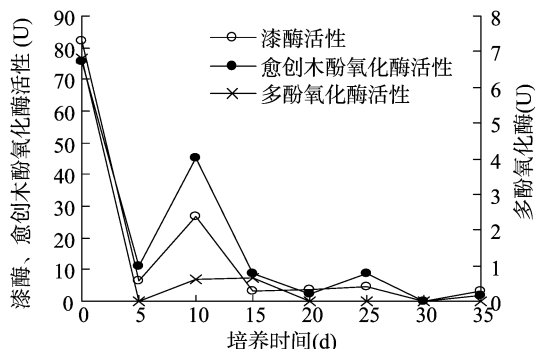


图4 菌料中漆酶相关酶在生理后熟期和出菇期过程中的变化

2.4 灰树花胞外可溶性蛋白含量和胞外可溶性糖含量变化

由图 5 可知,胞外水溶性蛋白含量在 0~5 d 不断升高,5~35 d 变化轻微,其中 15~20 d 有明显下降,这可能是由于菌丝恢复生长需要蛋白,导致胞外蛋白进入细胞内,构建细胞生长。胞外可溶性糖含量变化,在 0~15 d 基本是不断下降的,但在 5~10 d 有细微上升,可能跟原基形成有关,进入出菇期,在 20 d 有较大值,20~35 d 不断下降,可能与菌丝恢复期菌丝量变多有关。这与 Montoya 等研究报道菌料还原糖变化趋势^[14,28]基本一致,但本试验中出菇期开始时胞外可溶性糖含量突然升高,可能与本试验搔菌出菇时菌丝恢复生长相关。

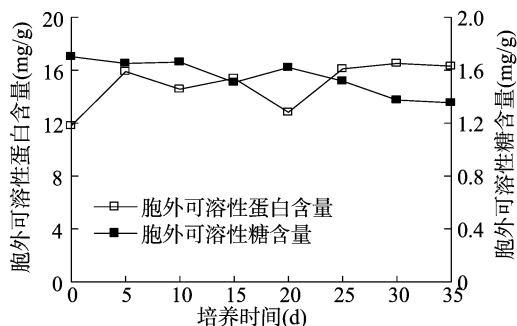


图5 菌料中胞外可溶性蛋白和胞外可溶性糖在生理后熟期和出菇期过程中的变化

3 结论与讨论

本试验研究了中高温型灰树花在栽培过程中从生理成熟期到出菇期的生理生化变化,pH 值、漆酶相关酶活性不断下降,但都在出现原基时明显升高,这与在白色茶树菇原基形成时,漆酶活性升高^[31]相似;含水量在生理成熟期基本呈不断升高的趋势,在出菇期不断下降,原基分化时下降,这与在黑木耳^[32]和真姬菇^[18]栽培中生理成熟期菌料含水量不断升高相似;菌料单位面积压力在生理成熟期不断升高到一定水平,在出菇期的原基形成时明显升高,达到最大值,后不断降低;菌料失质量在生理成熟期较低,在出菇期明显升高,到原基形成及分化后明显降低;温度差在生理成熟期先降低,后升高到一定值(原基显现),维持到出菇期菌丝恢复,之后明显降低;滤纸纤维素酶活性在生理成熟期酶活性较低,在出菇期明显升高,在原基分化时达到最大值;羧甲基纤维素酶活性在生理

成熟期降低到稳定值,在出菇期明显升高,原基形成后不断降低,这与倪新江等报道灰树花中^[13]类似;淀粉酶活性在生理成熟期不断升高,在出菇期维持在较高水平,但在原基形成时降低;半纤维素酶活性在生理成熟期不断升高,到出菇期菌丝恢复时达到最大值,后不断下降,采收时又升高;胞外可溶性糖含量在生理成熟期维持较高水平,在出菇期不断降低,与Montoya等研究报道菌料还原糖在生理成熟期维持较高,出菇期下降的变化^[14,28]相同;胞外可溶性蛋白含量在生理成熟期不断升高到一定水平,在出菇期菌丝恢复时降低,后又升高到稳定水平。

因此,本试验结果表明不同指标变化趋势不完全相同,同一指标不同时期变化也不完全相同。菌料的单位面积压力、羧甲基纤维素酶活性、胞外可溶性蛋白含量在生理成熟期间(原基形成前)能达到一定水平,是否可以应用于生理成熟期判断还须进一步研究;pH值和漆酶相关酶与原基形成有一定正相关,这对灰树花原基形成研究具有积极意义,同时为灰树花栽培过程中的生理成熟期及出菇管理提供理论依据。

参考文献:

- [1] Gray S F. A natural arrangement of British plants [M]. London: Baldwin, Cradock and Joy, 1821: 643.
- [2] 胡昭庚, 曾长华, 肖建京. 名贵食用菌栽培 [M]. 上海: 上海科学普及出版社, 2000: 147.
- [3] 赵国强, 王凤春, 于田. 灰树花无公害栽培实用新技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [4] Mayell M. Maitake extracts and their therapeutic potential [J]. Alternative Medicine Review, 2001, 6(1): 48–60.
- [5] Boh B, Berovic M. *Grifola frondosa* (Dicks.; Fr.) S. F. Gray (maitake mushroom): medicinal properties, active compounds, and biotechnological cultivation [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2007, 9(2): 89–108.
- [6] 吴智艳, 闫训友. 灰树花生理活性物质的研究进展 [J]. 北方园艺, 2006(6): 1–2.
- [7] 陈强, 黄晨阳. 日本食用菌产业现状 [J]. 中国食用菌, 2013, 32(5): 28.
- [8] 杨国良, 张淑霞. 灰树花栽培新技术 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2005.
- [9] 宋一鸣. 灰树花工厂化栽培技术研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016.
- [10] 黄毅. 食用菌工厂化栽培实践 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2014: 99.
- [11] 黄毅. 食用菌栽培 (全一册) [M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 80–150.
- [12] 曾宪森, 李开本, 何锦星, 等. 灰树花品系的初步研究 [J]. 福建农业学报, 1998, 13(3): 51–55.
- [13] 倪新江, 丁立孝, 冯志勇, 等. 灰树花生长发育过程中的几种胞外酶活性变化 [J]. 微生物学杂志, 2001, 21(3): 24–25.

- [14] Montoya S, Orrego C E, Levin L. Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake) [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(4): 1533–1541.
- [15] Mayuzumi Y, Mizuno T. Cultivation methods of maitake (*Grifola frondosa*) [J]. Food Reviews International, 1997, 13(3): 357–364.
- [16] 丛珊. 黑木耳复合基质的适宜品种筛选及营养生理的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [17] 郑典元, 邵世光. 培养基含水量对平菇抗杂菌能力胞外pH值及生物转化率的影响 [J]. 连云港师范高等专科学校学报, 2001(2): 77–79.
- [18] 高君辉, 冯志勇, 陈辉. 真姬菇培养时间与栽培料失重、含水量和产量的关系 [J]. 食用菌学报, 2008, 15(3): 23–26.
- [19] 王玉万, 潘贞德, 李秀玉, 等. 玉蕈降解木质纤维素的生理生化基础 [J]. 真菌学报, 1993, 12(3): 219–225.
- [20] 韩增华, 张介驰, 张丕奇, 等. 黑木耳菌丝后熟过程的初步研究 [J]. 食药用菌, 2012, 20(1): 28–29.
- [21] Mandels M, Hontz L, Nystrom J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(1): 3–25.
- [22] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184–261.
- [23] Shamala T R, Sreekantiah K R. Production of cellulases and D-xylanase by some selected fungal isolates [J]. Enzyme & Microbial Technology, 1986, 8(3): 178–182.
- [24] 宋爱荣, 郭立忠, 刘作亭, 等. 七个白色金针菇菌株发酵液中4种胞外酶活性的测定与分析 [J]. 中国食用菌, 1999, 18(4): 31–34.
- [25] 曾荣鉴. 碳源和氮源对平菇菌丝胞外酶的诱导作用 [J]. 食用菌, 1992(1): 17–18.
- [26] Kuka M, Cakste I. Bioactive compounds in Latvian wild edible mushroom *Boletus edulis* [C]//Conference Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology, 2011: 116–120.
- [27] Miller G L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426–428.
- [28] Barreto S M, Alzate C E O, Levin L. Modeling *Grifola frondosa* fungal growth during solid-state fermentation [J]. Engineering in Life Sciences, 2011, 11(3): 316–321.
- [29] 钱静亚, 张正沛, 季蓉蓉, 等. 3株真菌固态发酵产木质素降解酶的研究 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 277–280.
- [30] 李红, 杨镇, 吕立涛, 等. 黑木耳栽培过程中抗霉能力及胞外酶活性变化 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 109–112.
- [31] 姜性坚, 王春晖, 彭运祥, 等. 白色茶树菇生长发育中漆酶与纤维素酶活力的测定 [J]. 北方园艺, 2013(11): 149–151.
- [32] 韩增华, 张丕奇, 张介驰, 等. 黑木耳菌丝生理后熟与栽培特性的关系 [J]. 食用菌学报, 2012, 19(2): 43–49.