

赤灵芝菌种培养基的比较与筛选

代彦满,陈书明,张 棋

(三门峡职业技术学院,河南 三门峡 472000)

摘 要:为了筛选出适应性强的赤灵芝母种和原种新型培养基,选取以小麦为主料的培养基,通过对赤灵芝菌丝在不同培养基的生长状况、生长速度进行分析比较,确定人工栽培赤灵芝母种和原种的最佳培养基。赤灵芝母种培养基中加入小麦煮汁菌丝长势最强且明显,以麦粒为主料的原种培养基中菌丝生长最快。综合比较,以小麦为主料的培养基接种赤灵芝母种和原种更适合菌丝生长。同时在豫西气候条件下栽培,表现出较强的适应性,但其抗低温性能作用机理还需进一步试验研究。

关键词:赤灵芝;菌种;培养基;筛选

中图分类号:S763.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2019)04-0162-04

Comparison and Selection of the Culture Media for Red Ganoderma Strains

DAI Yan-man, CHEN Shu-ming, ZHANG Qi

(Sanmenxia Polytechnic College, Sanmenxia 472000, Henan, China)

Abstract: In this study, an attempt was made to screen adaptable media for the mother spawn and stock spawn of *Ganoderma lucidum*. The wheat-based media were prepared in this work. The optimum media for culturing mother spawn and stock spawn of *G. lucidum* were screened by evaluating the growth status and the growth rate of mycelium in different media. Adding boiled wheat juice to the mother culture medium, the growth of mycelium was the strongest and obvious. And the stock spawn grew fast in the wheat grain based medium. Comprehensively considering, the wheat-based media were more suitable for culturing mother spawn and stock spawn of *G. lucidum* mycelium. They showed stronger adaptability under the climate conditions in Western Henan, the mechanism of resistance to low temperature needs further research.

Key words: *Ganoderma lucidum*; strain; culture medium; screening

赤灵芝(*Ganoderma lucidum*)又名丹芝,赤灵芝民间称灵芝草。是一种名贵的中药材,性温,气味苦平无毒,主治胸中结、益心气。常服用有滋补强身、扶正固体、延年益寿等功效^[1]。赤灵芝是近几年来发展较快的药用真菌,野生赤灵芝生于山中向阳的深谷处,寄生在壳斗科和松科松属植物等根际或枯树桩上。独特的生长条件限制了赤灵芝资源十分有限,近年来在许多地区都有人工栽培赤灵芝,但由于受生长条件的影响,在栽培过程中遇到不少问题,造成经济效益不高。为此,依据 10 a 多的生产实践,根据赤灵芝菌种在几种培养基上生长状况,进

行比较筛选,为赤灵芝的人工栽培提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试灵芝菌株引自广东省农科院,经鉴定为赤灵芝,在秦岭伏牛山一带广泛分布^[2],豫西俗称韩芝,在河南南阳、洛阳栾川、三门峡卢氏等有较长栽培历史,原因是这些地区广泛分布有栓皮栎(*Quercus variabilis* Bl),是栽培赤灵芝的最佳原料之一。

1.2 试验灵芝菌株菌种培养基配方

1.2.1 灵芝菌株母种培养基配方 A、PDA 培养

基:马铃薯 200.0 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂粉 20.0 g,稍冷却后再补足蒸馏水至 1 000 mL^[3]。B、PDA 综合培养基:磷酸二氧钾 3.0 g,硫酸镁 1.0 g,蛋白胨 2.0 g,其他原料与 A 相同,稍冷却后再补足蒸馏水至 1 000 mL。C、PDA 麦汁培养基:优质干小麦 200.0 g,先煮 60 min 取汁,维生素 B₁ 20 mg,硫酸镁 1.0 g,其它原料与 A 相同,稍冷却后再补足蒸馏水至 1 000 mL。D、玉米粉培养基:玉米粉 100.0 g,麦皮 40.0 g,葡萄糖 20.0 g,其他同上^[4],稍冷却后再补足蒸馏水至 1 000 mL。

1.2.2 原种培养基配方 ①栓皮栎木屑 77%、麦麸 20%、糖 1%、石膏粉 1%、磷肥 1%;②棉子壳 77%、麦麸 20%、石膏粉 1%、石灰 1%、磷肥 1%;③小麦 87%、栓皮栎木屑 10%、石膏粉 1%、碳酸钙 1%、磷肥 1%;④栓皮栎木屑 58%、棉籽壳 32%、麸皮 8%、石膏粉 1%、石灰 0.5%、过磷酸钙 0.5%。

1.2.3 栽培料袋(菌包)配方 栓皮栎木屑 75%、麦麸 23%、糖 1%、石膏粉 1%。

1.3 试验方法

1.3.1 母种培养基配方试验 按配方准确称重, pH 自然,取 10 mL/支试管,规格 20 mm×20 mm。每个配方各装 20 支,经高温灭菌,冷却到 60℃时,趁热摆成斜面,待试管壁内冷凝水稍干后接入供试灵芝菌株,接完种后置于 25℃恒温箱培养,观察菌丝体在母种培养基中的生长情况^[5]。根据母种菌丝体在不同培养基中长势比较结果,筛选出最佳母种培养基菌丝体作为原种。

表 1 赤灵芝菌丝体在母种培养基中的生长情况

Table 1 Growth of <i>Ganoderma lucidum</i> mycelia in four mother stocks						
培养基	菌丝萌发力	满管天数/d	菌丝密度	菌丝特征	爬壁力	是否长菌皮
A	弱	20	+	稀疏、浅白发黄、生长不均匀	良好	无
B	较强	15	++	稀疏、洁白、整齐	好	无
C	最强	10	+++	浓密、洁白、粗壮	强	无
D	强	18	++	密,轻微发黄,出现菌皮	较强	有

注:“+”表示菌丝密度稀疏,“++”表示菌丝密度较稀,“+++”菌丝密度浓密。

2.2 原种与栽培种配方试验结果

本试验是上述母种菌丝体在不同培养基中长势比较的基础上做出的延续研究。根据母种菌丝体长势生长情况,选择配方 C 培养基培养的菌种。接原种与栽培种前,把 C 配方所取得试管母种接到原种上,接 70 瓶进行对比培养,(原种与栽培种是相同做法与培养,这里只做原种比较测定)^[10]。具体菌丝生长情况见表 2。

从表 2 可知,赤灵芝菌丝在原种培养基中,配方③的菌丝最早长满瓶,而且极少有气生菌丝,爬壁力强,比棉子壳为主料的配方②提早 20 d 长满瓶,配方①的菌丝长速慢活力差可能缺乏养分,菌丝色泽

1.3.2 原种与栽培种配方培养基制备 按 4 种原种培养基配方及栽培料袋(菌包)配方的配方分别称重后,①木屑配方的直接拌料装瓶,②棉子壳的要先提前 1 d 用石灰预湿处理堆制^[6],③麦粒的要先把麦粒煮熟至无白心后捞起,再拌入木屑辅料,④木屑加棉子壳需堆制发酵 15 d。以上培养基装入 500 mL 罐头瓶,每个配方做 70 瓶,经高压灭菌冷却后接入优选的母种^[7],接种后放入 25℃恒温箱进行恒温培养,并定时记录检查菌丝萌发情况,观测赤灵芝菌丝在各类配方瓶内生长速率和生长状况。

1.3.3 栽培袋试验 栽培袋料采用豫西常规栽培的培养料配制(栓皮栎木屑 75%,麸皮 23%,糖 1%,石膏 1%,含水量 65%)^[8]。栽培袋料配制好后,消毒装入聚丙烯栽培袋(33.00 cm×17.00 cm×0.05 cm),接上以上 4 个原种配方获得的纯菌丝的菌种,接完种后分组摆放培养,分别做好记录。

2 结果与分析

2.1 母种菌丝体在不同培养基中长势比较

赤灵芝在 A、B、C、D 4 个母种培养基上的菌丝生长情况(表 1),总体看配方 A 菌丝生长浅白且发黄、稀、弱,缺乏养分。配方 B、C 菌丝生长健壮、洁白整齐、浓密爬壁力强,而且配方 C 加入了小麦煮汁和维生素 B₁ 对赤灵芝菌丝生长有较强的促进作用。而配方 D 加入了玉米粉和麦皮在母种培养基上易形成菌皮^[9](表 1)。

浅白不浓密,配方②萌发快,前期比配方③强,但 10 d 之后出现较多稀生菌丝,最后在上层结有菌皮和菌斑,可能是棉子壳热能高造成发热,所以导致前期长速快后期慢,直致长满瓶共 40 d 时间,配方④是棉子壳和木屑的混合料,菌丝体质量比配方①虽长得好,可能拌有棉子壳不透气,也出现了气生菌丝和少量菌皮,30 d 后长满瓶。综合比较 4 个配方的菌丝长得最好是配方③,其次是配方①、配方④、配方②。

2.3 栽培袋试验结果

把原种再作连续的培养研究,把以上 4 个配方所取得的原种菌种都接在栽培袋(菌包上),按常规方法制备冷却后,分别接入上述 4 类配方的原种,每

袋菌种分别接 30 包菌筒,不同配方的菌种接完种后,分组在栽培基地内暗光下培养,观察各个配方所做的菌种在菌包上的生长情况,记录其长势以及长满袋的时间(表 3)。

表 2 赤灵芝菌丝在原种瓶内生长速率和生长状况

Table 2 Rate of mycelium growth and growth situations of stock spawn of <i>G. lucidum</i> growing							
培养基 配方	平均生长速率 (mm · d ⁻¹)	满瓶天数 /d	菌丝色泽	菌丝密度	长势	爬壁力	气生菌丝
①	4.69	52	浅白	较弱+	一般	一般	少
②	8.07	40	洁白、浓密	很好+++	较好	较弱	多
③	8.54	20	粗壮洁白整齐	较好++	很好	很好	极少
④	7.91	30	洁白、整齐	一般++	较弱	较好	少

表 3 不同配方原种菌种在栽培袋上生长状况

Table 3 Growth status of the stock spawns with different culturing media in cultivation bags				
培养基 配方	接种后菌丝 萌发时间/h	是否 长有菌皮	菌丝 颜色	菌丝长满袋 天数/d
①	48	无	很淡	36
②	36	有	淡白	32
③	24	无	淡白	23
④	42	很少	淡白	21

从表 3 可知,栽培赤灵芝首先要选择好优质的菌种,从表 2 各配方制得菌种看,长满菌丝的时候看起来都正常,无杂菌,但接入栽培袋后有明显差异,配方①木屑为主料的原种基接到栽培袋(菌包)后要 48 h 才开始萌发,恢复长白,较难定植,配方②以棉子壳为主料所获得的菌种可能由于出现菌皮造成菌丝营养不全面,接入后 36 h 才开始萌发,配方③以小麦为主料所做的菌种营养充足,无菌皮,接入栽培后萌发最快,只要 24 h 就开始萌发而且菌丝洁白、浓密、较快在栽培袋内定植,配方④所做的菌种比配方①稍快,但和配方③相比需要接种 42 h 后菌丝才开始萌发且有少量菌皮。综合比较得出选择配方③所做的菌种最好,吃料最快配方最早长满袋。

3 结论与讨论

任何一个优良菌株只有在适宜培养基条件下的生长,其生理代谢才能正常进行,优良性状才能得以表现,环境条件中最基本的是种质的培养基^[11]。因此,栽培规模大的农户生产前必须进行测试筛选或订购优质菌种,观察从母种开始直到接入菌包各个过程的培养基是否适应其生长^[12]。本试验结果表明,赤灵芝菌丝体在母种培养基中加入小麦煮汁菌丝最强明显,原种与栽培种也以小麦为主料的菌丝生长最快,最后把它接到栽培袋后也是最快萌发定植,表现出较强的生长优势^[13]。

综上所述试验可得出,赤灵芝菌种是以小麦粒为主料拌入栓皮栎木屑的培养基在栽培袋内最适应灵芝菌丝生长,接入栽培袋也是最早萌发,菌包也是

最早长满袋^[14]。

生产实践表明,2017 年豫西地区春节前后出现较长时间的寒冷低温,隔年农历 12 月初所做的菌包(包括一些平菇、香菇、木耳等),由于接种后温度难回升大部分菌筒出现了死种现象^[15],使用小麦粒做原料的菌种在菌袋内当时出现休眠现象,但 80%以上无出现杂菌和死亡,春节正月过后菌丝还继续正常生长,效果良好,而用其他培养基地做的菌种,80%以上的栽培袋出现死亡,特别是木屑种所产生的菌包^[16],基本上全军覆灭,成活很少。用小麦粒作为原料的菌种是否与抵抗低温有直接关系,作用机理是什么,还需进一步试验研究。

参考文献:

[1] 田呈明,王吉忍,杨俊秀,等. 太白山自然保护区大型真菌生态分布及资源评价[J]. 西北林学院学报,2000,15(3):62-67.
TIAN C M,WANG J R,YANG J X,*et al.* The distributional features of macrofungi in the Taibaishan Mts. [J]. Journal of Northwest Forestry University,2000,15(3):62-67. (in Chinese)
[2] 甄学渊,张文辉,周建云,等. 秦巴山区利用栎类资源生产食用菌中药材的经济效益分析[J]. 西北林学院学报,2014,29(4):286-292.
ZHEN X Y,ZHANG W H,ZHOU J Y,*et al.* Economic benefits analysis of the uning oak resources to produce edible fungi and medicinal material in Qinba Mountains [J]. Journal of Northwest Forestry University,2014,29(4):286-292. (in Chinese)
[3] 江洁,李彦宇,江森. 以豆渣为基料灵芝菌丝体液体发酵饮料的研制 [J]. 食品科学,2011,32(10):308-311.
GANG J,LI Y Y,JIANG S. With the development of the bean dregs fermentation for ganoderma lucidum mycelium liquid beverage [J]. Food Science,2011,32(10):308-311. (in Chinese)
[4] 甄学渊,张文辉,郭敏,等. 陕南秦巴山区栎类资源消长分析 [J]. 西北林学院学报,2014,29(6):39-45.
ZHEN X Y,ZHANG W H,GUO M,*et al.* Growth and decline analysis about oak resources in Qinba Mountains[J]. Journal of Northwest Forestry University,2014,29(6):39-45. (in Chinese)
[5] 李景侠,张文辉. 汉中地区食用菌的生产现状[J]. 西北林学院

学报,1990,5(1):82-87.

[6] 付作霖,曹秀文,朱学泰,等.白龙江中上游林区大型真菌物种多样性与区系特征[J].西北林学院学报,2017,32(5):183-188.

FU Z L,CAO X W,ZHU X T,*et al.* Species diversity and flora of macrofungi in the forests of the middle-upper reaches of Bailong River[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017,32(5):183-188. (in Chinese)

[7] 柴新义,盛硕,于士军,等.牯牛降自然保护区大型真菌资源组成及分布[J].西北林学院学报,2018,33(1):193-201.

CHAI X Y,SHENG S,YU S J,*et al.* Composition and ecological distribution of wild macrofungus resources in Guniujiang Natural Reserve[J]. Journal of Northwest Forestry University,2018,33(1):193-201. (in Chinese)

[8] 汪金萍,吴保锋.液体培养条件下温度对灵芝菌丝作用效果研究[J].北方园艺,2010(16):203-204.

WANG J P,WU B F. Effect of temperature on ganoderma lucidum mycelia in liquid culture [J]. Northern Horticulture,2010(16):203-204. (in Chinese)

[9] 王庆武,兰玉菲.不同营养成分对泰山赤灵芝液体菌种菌丝生物量的影响[J].食用菌,2017(5):33-34,37.

[10] 马红梅,陈永敢,袁学军.灵芝的椰子果皮代料栽培试验[J].江苏农业科学,2013(2):204-205.

MA H M,CHEN Y G,YUAN X J. Cultivation experiment of coconut peel substitute for ganoderma lucidum [J]. Jiangsu Agricultural Science,2013(2):204-205. (in Chinese)

[11] 吴兴亮,戴玉成,林龙河.中国灵芝科资源及其地理分布 I [J]. 贵州科学,2004,22(2):204-205.

WU X L,DAI Y C,LIN L H. China ganoderma lucidum I family resources and their geographical distribution [J]. Guizhou Science,2004,22(2):204-205. (in Chinese)

[12] 罗莹,张志军,刘连强,等.不同灵芝菌株液体菌种培养及栽培应用比较[J].食用菌,2014(6):19-20.

[13] 袁学军,李艳丽,陈永敢,等.野生灵芝菌种培养基筛选的研究[J].中国食用菌,2012(4):24-26.

[14] 柳焕章,卢月霞,郑素月.四种食药两用真菌菌种扩繁培养基筛选[J].北方园艺,2014(17):145-147.

LIU H Z,LU Y X,ZHENG S Y. Screening of four edible and medicinal fungi species for propagation medium [J]. Northern Horticulture,2014(17):145-147. (in Chinese)

[15] 蒋冬花.培养基配方与栽培方式对灵芝产量和质量的影响[J].海南大学学报:自然科学版,2001,19(1):76-79.

[16] 初洋,倪新江.灵芝培养基的筛选[J].安徽农业科学,2008(5):1924-1925.

(上接第 75 页)

[22] 何平,常顺利,张毓涛,等.新疆森林游憩区空气负离子浓度时空分布特征及其影响因素 [J]. 资源科学,2015,37(3):629-635.

HE P,CHANG S L,ZHANG Y T,*et al.* Spatiotemporal distribution and influence factors of negative air ion in forest recreation areas across Xinjiang [J]. Resources Science,2015,37(3):629-635. (in Chinese)

[23] 陈梓茹,杨小可,傅伟聪,等.龙岩国家森林公园冬季负离子浓度变化特征 [J]. 江西农业大学学报,2016,38(6):1119-1126.

CHEN Z R,YANG X K,FU W C,*et al.* The variation characteristics of anion concentrations in Longyan National Forest Park in winter [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2016,38(6):1119-1126. (in Chinese)

[24] 韦朝领,王敬涛,蒋跃林,等.合肥市不同生态功能区空气负离子浓度分布特征及其与气象因子的关系 [J]. 应用生态学报,2006,17(11):2158-2162.

WEI C L,WANG J T,JIANG Y L,*et al.* Air negative charge ion concentration and its relationships with meteorological factors in different ecological functional zones of Hefei City [J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2006,17(11):2158-2162. (in Chinese)

[25] 齐冰,杜荣光,邵碧嘉.杭州市空气负离子变化特征分析 [J]. 气象与减灾研究,2011,34(4):68-71.

QI B,DU R G,SHAO B J. Characteristics of anion variation in Hangzhou [J]. Meteorology and Disaster Reduction Research,2011,34(4):68-71. (in Chinese)

[26] 关蓓蓓,郑思俊,崔心红,等.崇明岛不同生态用地空气负离子分布规律研究[J].西北林学院学报,2016,31(1):280-285.

GUAN B B,ZHENG S J,CUI X H,*et al.* Variation of negative air ions in different ecological lands in Chongming island [J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(1):280-285.

[27] 张毓涛,李吉政.新疆主要城市不同生态功能区夏季空气负离子特征 [J]. 干旱区地理,2012,12(6):865-874.

ZHANG Y T,LI J M. Characteristics of air anion concentration in different ecological functional zones in summer in main cities of Xinjiang [J]. Arid Land Geography,2012,12(6):865-874. (in Chinese)

[28] 吴楚材,郑群明,钟林生.森林游憩区空气负离子水平的研究 [J]. 林业科学,2001,37(5):75-81.

WU C C,ZHENG Q M,ZHONG L S. A study of the aero-anion concentration in forest recreation aera [J]. Scientia Silvae Sinicae,2001,37(5):75-81. (in Chinese)

[29] 汤秋嫒,邢海莹,张冬有.北极村樟子松与落叶松林区空气负离子浓度及其与气象因子的关系[J].中国农学通报,2017,33(13):107-111.

TANG Q Y,XING H Y,ZHANG D Y. Aero-anion concentration and its relationship with meteorological factors:scotch Pine and Larch in Arctic village [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2017,33(13):107-111. (in Chinese)