长根菇菌种鉴定及生长条件优化

张 磊[1,2] 徐丽丽[1] 何翠萍[1] 郭立忠[1]

(1青岛农业大学山东省应用真菌省级重点实验室,山东青岛 266109;2上海荷仙菇生物科技股份有限公司,上海 201418)

摘 要:为解决长根菇菌株命名混乱问题以及初步筛选最佳生长条件,该研究以6株长根菇菌株为试验材料,利用拮抗试验和分子鉴定技术,探究参试菌株的亲缘关系;用单因素变量试验探究在不同碳、氮源,pH条件下菌株最佳生长条件。结果显示,参试长根菇菌株总体亲缘关系较近,其中编号OuA与OuC亲缘关系更近,OuD与OuE亲缘关系更近,OuA,OuC与OuB和OuD,OuE与OuF亲缘关系和其他菌株相比,亲缘关系较近,OuC与OuD亲缘关系最远,OuC与OuF亲缘关系较远,OuD与OuF亲缘关系相对较远;最佳碳源是麦芽糖,最佳氮源是牛肉膏,不能利用尿素作为氮源,最适生长pH为7。该研究可以长根菇规范化命名提供科学依据,为长根菇商品化,规模化生产提供理论依据。

关键词:长根菇;拮抗反应;分子鉴定;碳、氮源;生长条件

中图分类号 S646 **文献标识码** A **文章编号** 1007-7731(2018)05-0014-07

DOI:10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2018.05.007

Identification of *Oudemansiella radicata* and its Growth Conditions Optimization

Zhang Lei[1,2] et al.

(1Shandong Province Key Laboratory of Agricultural Applied Mycology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2Shanghai Sun Avenue Biotechnology Co., Ltd, Shanghai 201418, China)

Abstract: In order to solve the naming chaos problem of *Oudemansiella radicata* and to obtain the optimum conditions for the initial screening, the genetic relationship of the tested strains was studied by antagonistic test andmolecular identification technique. Six isolates of *Oudemansiella radicata* were used as the experimental materials. The optimum growth conditions were studied under different carbon, nitrogen and pH conditons. The results showed that all test strains had close relationships: OuA, OuC, OuE had closer relationships than others, OuA, OuC, OuB, OuD, OuE, OuF had closer genetic relationship with OuF, OuC was closely related to OuF, OuF and OuE had relatively distant with each other. Maltose was the best carbon source. Beef extract was the best nitrogen source and urea cannot be used by the strains. The optimum growth pH was 7. The results provided a scientific basis for the standardization name and commercialization of *Oudemansiella radicata*, and a theoretical basis for large scale production.

Key words: *Oudemansiella radicata*; Antagonism; Molecular identification; Carbon; Nitrogen source; Growth conditions

长根菇*Oudemanciella radicata*(Relhan:Fr)sing[1]学名为长根小奥德蘑[2],属担子菌亚门、伞菌纲、伞菌目、膨瑚菌科、小奥德蘑属[3],为珍稀野生食药用真菌,其在国际上享有“食用菌皇后”的美誉[4]。长根菇在中国、日本等都有生产[5]。在中国,它主要分布于福建、广西、江苏、河北等地,是一种土生型木腐真菌。其营养成分包含蛋白质,氨基酸[6],脂肪,碳水化合物,维生素,微量元素等,肉嫩味鲜[7],营养价值高,深受消费者喜爱,人们经常食用,可增强人体免疫力,降低高血压,长根菇中含有多种对人体有益的成分,如长根菇多糖、长根菇素等,其中多糖成分对治疗肿瘤有显著作用,长根菇素(小奥德蘑酮Oudenone)对血压有降低作用[8-9]。目前,在市场上,供销售的长根菇量较少,长根菇人工栽培困难、产量较低。在目前,国内外对长根菇的研究主要集中在菌丝培养[10-13]、培养特性、驯化栽培、深层发酵[14-16]等方面,但对长根菇菌丝体的亲缘关系分析的报道比较少见。为此,本试验以6个长根菇菌株为基础,通过相关试验,比较它们的菌株拮抗反应;菌丝生长速度和生长势等指标,以期规范长根菇的命名,为新品种选育和长根菇商品化,规模化生产提供理论基础。

基金项目:山东省现代农业产业技术体系遗传育种岗位专家,项目编号:SDAIT-11-011-02;青岛市科技惠民专项农业科技项目,项目编号:16-6-2-32-NSH。

作者简介:张磊(1986—),男,山东威海人,研究方向:珍稀菌菇栽培与功能产品开发。 **收稿日期:**2017-01-20

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　菌株　供试菌株如表1所示。

表1　供试菌种

菌种名称	产地来源	编号
A	广东	OuA
B	广东	OuB
C	广东	OuC
山东远洋	山东远洋	OuD
北京	北京	OuE
自保种	本实验室保藏	OuF

1.1.2　试剂和培养基　试剂和培养基如表2所示。

表2　主要参试试剂和培养基

试剂	试剂培养基名称	
NaOH(AR)	HCl(AR)	$MgSO_4$(AR)
$CaCO_3$(AR)	E.Z.N.A.TM Fungal DNAmini Kit	马铃薯葡萄糖琼脂
琼脂粉	尿素(AR)	葡萄糖(AR)
麦芽糖(BR)	酵母浸膏(BR)	马铃薯
果糖(AR)	$(NH4)_2SO_4$(AR)	蛋白胨(BR)
蔗糖(AR)	KNO_3(AR)	甘油(AR)
可溶性淀粉	牛肉膏(BR)	

1.1.3　试验仪器　主要参试仪器如表3所示。

表3　主要试验仪器

仪器名称	仪器型号	仪器公司
高速微量离心机	D2012	大龙兴创实验仪器有限公司
高压蒸汽灭菌锅	MLS-3750	三洋电机株式会社
PCR仪	T100 thermal cycle	BIO-Rad
恒温生化培养箱	A0507288	广东省医疗器械厂

1.1.4　试验器皿　500mL锥形瓶，250mL锥形瓶，1000mL量筒，500mL量筒，90cm平板，试管，接种针，打孔器。

1.2　菌株鉴定

1.2.1　长根菇分子鉴定　(1)菌株DNA的提取：详细方法见E.Z.N.A.TM Fungal DNAmini Kit柱式试剂盒说明书。(2)样品rDNA ITS区的PCR扩增：采用由上海生工生物工程技术服务有限公司合成真菌核糖体基因间隔区通用引物ITS1(5′ TCCGTAGGTGAACCTGCGG3′)和ITS4(5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC3′)进行扩增。构建PCR扩增体系如表4。

表4　PCR扩增体系

试剂	加入量(μL)
2×Taq PCR MasterMix	15
ITS1	1
ITS4	1
模板DNA	1
ddH2O	12
Total	30

按表4构建扩增体系后进行PCR扩增，PCR扩增程序为：94℃预变性5min；94℃变性1min，55℃退火1min，72℃延伸90s，共35个循环；72℃延伸10min，4℃保存。PCR扩增完成后，产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测，电压为100V，产物和Marker上样量均为5μL，电泳结果进行成像分析。

(3)ITS扩增产物的序列测定：将1.2.1的(2)中得到的样品ITS扩增产物直接送至有关公司测序，测序引物为PCR引物。(4)ITS扩增产物序列对比及分析：将测序得到的序列，通过Blast比对，并用MEGA7.0软件进行系统发育分析，采用NJ法(邻近遗传距离法)构建系统发育树，制作方法参考文献[17]。

1.2.2　配置PDA培养基　准确称取新鲜洗净并去皮的马铃薯，切成1cm³大小，以20%添加量放入蒸馏水中，煮沸30min，用8层纱布过滤，取汁液；称取并添加2%葡萄糖和2%琼脂至汁液中，待琼脂完全熔化后，加入葡萄糖混匀，定容至并分装入500mL的锥形瓶中，装瓶量为250mL。标记并封口，115℃湿热灭菌20min，备用。

1.2.3　菌株活化　在灭好菌的超净工作台中，用1.2.2中灭好菌的培养基，倒平板，采用无菌操作接种技术接种于培养皿正中间，标记并封口，在25℃的恒温培养箱中避光培养。待菌丝长满培养皿之后，置于室温备用。

1.2.4　长根菇拮抗试验　在灭好菌的超净工作台中，用1.2.2中灭好菌的培养基，倒平板至培养基完全铺满整个培养皿，且厚度不宜过高，以方便后期试验观察。将制备好的培养基平板底部划分为3块区域，并对3个不同编号的菌株随机组合，用无菌操作接种技术，将相对应编号的菌株接种于相应区域中央，使其相距2~3cm，做好标记并封口，然后将平板置于25℃恒温培养箱中避光培养5~7d。待平板长满菌丝之后，观察菌株间拮抗情况。

1.3　生长条件优化

1.3.1　长根菇菌丝生长速度试验　在灭好菌的超净工作台中，用1.2.2中灭好菌的培养基，倒平板，采用无菌操作打孔接种技术，将活化好的菌种接种于培养皿正中间，每组设置5个平行，做好标记并封口。将接种好的平板置于25℃的恒温培养箱中避光培养。每2d按时观察平板菌丝生长情况，生长势，菌丝浓密程度和菌丝颜色，在平板背面记录菌丝生长圈，计算菌落增长半径与菌丝生长速度，进行比较分析。

1.3.2　不同碳、氮源培养基优化试验　基础培养基：蛋白胨0.5%、葡萄糖1%、琼脂2%。用1%碳源和0.5%氮源将表5中的碳、氮源依次替换基础培养基中的碳、氮源，依次用0.5mol/LNaOH调节pH至7，标记并封口，115℃湿热灭菌20min，备用。

表5　不同碳源和氮源

因素	类别
碳源	葡萄糖，麦芽糖，果糖，蔗糖，可溶性淀粉，甘油
氮源	蛋白胨，尿素，酵母浸膏，$(NH_4)2SO_4$，KNO_4，牛肉膏

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

按1.3.1中方法接种培养，每个菌株3个重复。按1.3.1方法进行观察记录，进行比较分析。

1.3.3 不同pH培养基优化试验 分别配制pH为6，7，8和9的PDA培养基，标记并封口，115℃湿热灭菌20min。按1.3.1中方法接种培养，每个菌株3个重复。按1.3.1方法进行观察记录，进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 分子鉴定结果 将长根菇子实体提取DNA，进行rDNA ITS序列PCR扩增后，跑电泳后得到的胶图，详见图1。如图1所示。供试验的6个菌株的条带大小在1000～750bp，这与我们预计的结果800bp相一致。说明在这次跑胶的过程中，我们得到了比较理想的条带。

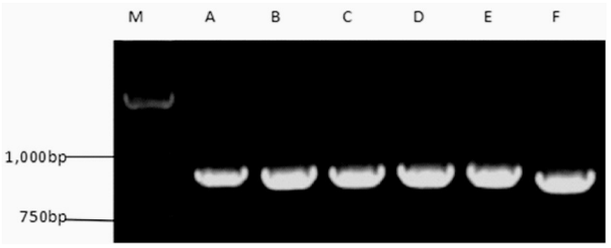

图1 长根菇rDNA ITS序列PCR产物电泳

注：泳道M为10,000bp Marker；泳道A是OuA的条带，泳道B是OuB的条带，泳道C是OuC的条带，泳道D是OuD的条带，泳道E是OuE的条带，泳道F是OuF的条带。

将PCR扩增后得到的样品直接送至有关公司测序，测序引物为PCR引物。将测序得到的序列，通过相关软件进行同源性比对。样品序列通过MEGA7.0软件进行系统发育分析，得到图2。如图2所示，长根菇菌株的差异不大。但相对而言，OuA与OuC的亲缘关系更相近，OuA，OuC与OuB的亲缘性和其他菌株相比，亲缘关系相近；OuD与OuE的亲缘关系更相近，OuD，OuE与OuF的亲缘关系和其他菌株相比，亲缘关系相近。OuC与OuD的亲缘关系最远，OuC与OuF的亲缘关系较远，OuD与OuF的亲缘关系相对较远。

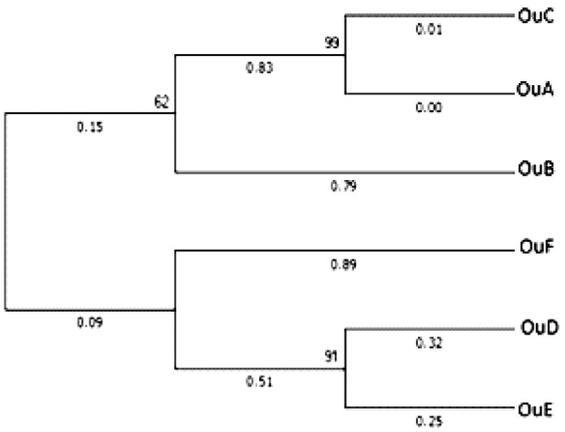

图2 6个长根菇子实体系统发育树

2.2 菌株拮抗性比较 试验将PDA平板平均划分3个区域，6个试验菌株3个随机组合无菌操作打孔接种于平板中，在25℃下培养7d后观察菌株之间的拮抗反应。试验结果显示，6个菌株两两之间的拮抗反应基本上都呈现出隆起状，较少出现凹陷。菌株编号OuA与OuB，OuB与OuC有拮抗反应，菌丝生长较为稀疏形成拮抗线。OuA与OuC，OuB与OuD，OuB与OuE，OuC与OuD，OuC与OuE，OuC与OuF，OuD与OuE，OuD与OuF和OuE与OuF有拮抗反应，菌丝生长形成隆起的拮抗线。OuA与OuD，OuA与OuE，OuA与OuF拮抗反应不明显，菌丝生长较为稀疏，形成不明显的凹陷拮抗线。OuB与OuF拮抗反应不明显，菌丝生长形成不明显的隆起拮抗线。如表6和图3所示。

表6 6个长根菇菌株菌丝体两两拮抗反应结果的判定

菌株	OuB	OuC	OuD	OuE	OuF
OuA	+	+	N	N	N
OuB		+	+	+	N
OuC			+	+	+
OuD				+	+
OuE					+

注："+"表示有拮抗反应，"-"表示无拮抗反应，"N"表示拮抗反应不明显。

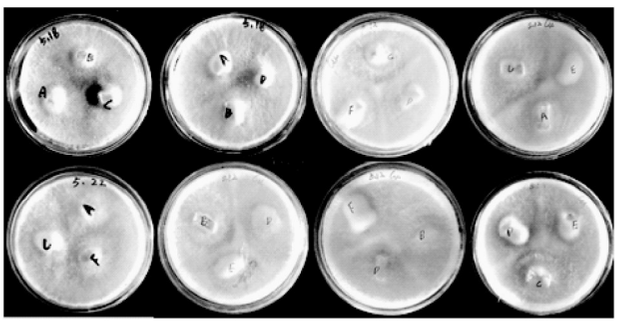

图3 6个长根菇菌株菌丝体三三拮抗反应

2.3 不同菌株菌丝生长速度比较 此试验采用无菌操作打孔接种技术，将6个供试菌株接种于PDA平板中央。每个菌株3个重复，在25℃下培养5d后开始观察，此后每2d定时观测一次，记录数据，并进行分析，分析结果如表7所示。从表7可以看出，在供试验的6个菌株中，6个菌株之间生长势相差不大，OuF菌株菌丝生长速度最快，而OuA菌株菌丝生长速度最慢。这几个菌株菌丝生长速度的顺序为OuF > OuB > OuC > OuD > OuE > OuA。

表7 不同菌株菌丝生长速度情况

菌株	菌丝长势			生长势	差异显著性	
	菌丝生长速度(mm/d)	菌丝浓密度	菌丝洁白度		0.05	0.01
OuA	5.85	浓密	洁白	+ + +	c	C
OuB	6.40	密	洁白	+ +	a	A
OuC	6.35	浓密	洁白	+ + +	ab	AB
OuD	6.05	浓密	洁白	+ +	c	C

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌株	菌丝长势			生长势	差异显著性	
	菌丝生长速度（mm/d）	菌丝浓密度	菌丝洁白度		0.05	0.01
OuE	5.90	密	洁白	+ +	c	C
OuF	6.45	浓密	洁白	+ + +	a	A

注：用“－”表示菌丝不生长，用“+→+ + +”表示菌丝生长由弱至强。

2.4　碳、氮源对其生长状况的影响

2.4.1　碳源对其生长状况的影响　根据1.2.1和1.2.4的试验结果，我们选择出3个亲缘性差异比较大的菌株来进行不同碳源培养基优化试验，3个亲缘性差异比较大的菌株分别为：OuC，OuE，OuF。试验采用无菌操作打孔接种技术，将3个供试菌株接种于1.3.2制作的相应的培养基所倒平板的中央。每个菌株在每种培养基上做3个重复，在25℃下培养5d后开始观察，此后每2d定时观测一次，记录数据，并进行分析，分析结果如表8所示。

表8　3个菌株不同碳源菌丝生长情况

菌株	不同碳源	菌丝长势			生长势	差异显著性	
		菌丝生长速度（mm/d）	菌丝浓密度	菌丝洁白度		0.05	0.01
C	葡萄糖	4.83	浓密	洁白	+ + +	c	C
	麦芽糖	8.00	密	白	+ + +	a	A
	果糖	6.33	浓密	洁白	+ + +	b	B
	蔗糖	4.00	稀疏	淡白	+	d	D
	可溶性淀粉	5.00	密	白	+ +	c	C
	甘油	5.17	密	白	+ +	c	C
E	葡萄糖	5.67	浓密	洁白	+ + +	b	B
	麦芽糖	5.17	密	白	+ + +	b	B
	果糖	7.00	浓密	洁白	+ + +	a	A
	蔗糖	5.08	稀疏	淡白	+	bc	B
	可溶性淀粉	4.25	密	白	+ +	c	C
	甘油	7.25	密	白	+ +	a	A
F	葡萄糖	7.50	浓密	洁白	+ + +	a	A
	麦芽糖	7.17	密	白	+ + +	a	A
	果糖	6.50	浓密	洁白	+ + +	ab	B
	蔗糖	2.17	稀疏	淡白	+	e	E
	可溶性淀粉	5.08	密	白	+ +	cd	C
	甘油	6.00	密	白	+ +	bc	C

注：用“－”表示菌丝不生长，用“+→+ + +”表示菌丝生长由弱至强。

根据表8的试验结果可以看出，OuC菌株对供试验的6种碳源都能加以利用。其菌丝生长势以葡萄糖、麦芽糖、果糖为最佳，可溶性淀粉和甘油较好，蔗糖为最差。其菌丝生长速度的顺序为麦芽糖＞果糖＞甘油＞可溶性淀粉＞葡萄糖＞蔗糖。其中麦芽糖的菌丝生长速度最快，蔗糖的菌丝生长速度最慢，其中麦芽糖、果糖之间以及葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、甘油之间在影响菌丝生长速度上无显著差异。而麦芽糖、果糖与葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、甘油相比较，则有显著或极显著差异。

OuE菌株对供试验的6种碳源都能加以利用。其菌丝生长势以葡萄糖、麦芽糖、果糖为最佳，可溶性淀粉和甘油较好，蔗糖为最差。其菌丝生长速度的顺序为甘油＞果糖＞葡萄糖＞麦芽糖＞蔗糖＞可溶性淀粉。其中甘油的菌丝生长速度最快，可溶性淀粉的菌丝生长速度最慢，其中甘油、果糖之间以及葡萄糖、麦芽糖、蔗糖之间在影响菌丝生长速度上无显著差异。而甘油、果糖与葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和可溶性淀粉相比较，则有显著或极显著差异。

OuF菌株对供试验的6种碳源都能加以利用。其菌丝生长势以葡萄糖、麦芽糖、果糖为最佳，可溶性淀粉和甘油较好，蔗糖为最差。其菌丝生长速度的顺序为葡萄糖＞麦芽糖＞果糖＞甘油＞可溶性淀粉＞蔗糖。其中葡萄糖的菌丝生长速度最快，蔗糖的菌丝生长速度最慢，其中麦芽糖、葡萄糖和果糖之间以及可溶性淀粉、甘油之间在影响菌丝生长速度上无显著差异。而麦芽糖、葡萄糖和果糖与溶性淀粉、甘油与蔗糖相比较，则有显著或极显著差异。

2.4.2　氮源对其生长状况的影响　根据1.2.1和1.2.4的试验结果，我们选择出3个亲缘性差异比较大的菌株来进行不同氮源培养基优化试验，3个亲缘性差异比较大的菌株分别为：OuC，OuE，OuF。试验采用无菌操作打孔接种技术，将3个供试菌株接种于1.5.6制作的相应的培养基所倒

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

平板的中央。每个菌株在每种培养基上做3个重复，在25℃下培养5d后开始观察，此后每2d定时观测一次，记录数据，并进行分析，分析结果如表9所示。

表9 3个菌株不同氮源菌丝生长情况

菌株	不同氮源	菌丝长势			生长势	差异显著性	
		菌丝生长速度（mm/d）	菌丝浓密度	菌丝洁白度		0.05	0.01
C	蛋白胨	4.8	浓密	洁白	+++	c	C
	尿素	0	无菌丝体	透明	−	d	D
	酵母浸膏	7.2	浓密	洁白	+++	b	B
	$(NH_4)_2SO_4$	4.2	稀疏	淡白	+	c	C
	KNO_3	8.7	稀疏	淡白	+	a	A
	牛肉膏	6.5	浓密	洁白	+++	b	B
E	蛋白胨	5.7	浓密	洁白	+++	b	C
	尿素	0	无菌丝体	透明	−	d	D
	酵母浸膏	4.0	浓密	洁白	+++	c	C
	$(NH_4)_2SO_4$	5.8	稀疏	淡白	+	b	B
	KNO_3	7.5	稀疏	淡白	+	a	A
	牛肉膏	6.2	浓密	洁白	+++	b	B
F	蛋白胨	7.5	浓密	洁白	+++	b	B
	尿素	0	无菌丝体	透明	−	d	D
	酵母浸膏	7.2	浓密	洁白	+++	b	B
	$(NH_4)_2SO_4$	4.3	稀疏	淡白	+	c	C
	KNO_3	9.7	稀疏	淡白	+	a	A
	牛肉膏	6.5	浓密	洁白	+++	b	B

注：用“−”表示菌丝不生长，用“+→+++”表示菌丝生长由弱至强。

根据表9的试验结果可以看出，供试的3个菌株对供试验的6种氮源的利用具有选择性。它们能利用蛋白胨、酵母浸膏、$(NH_4)_2SO_4$、KNO_3、牛肉膏，不能利用尿素。OuC菌株其菌丝生长势以蛋白胨、酵母浸膏、牛肉膏为最佳，$(NH_4)_2SO_4$、KNO_3较差。其菌丝生长速度顺序为KNO_3＞酵母浸膏＞牛肉膏＞蛋白胨＞$(NH_4)_2SO_4$。KNO_3、牛肉膏、酵母浸膏之间与蛋白胨、$(NH_4)_2SO_4$之间在对菌丝生长速度影响上无显著差异，而KNO_3、牛肉膏、酵母浸膏与蛋白胨、$(NH_4)_2SO_4$之间则有显著或极显著差异。其中以利用酵母浸膏的效果最好，生长势最佳。

OuE菌株菌丝生长势以蛋白胨、酵母浸膏、牛肉膏为最佳，$(NH_4)_2SO_4$和KNO_3较差。其菌丝生长速度顺序为KNO_3＞牛肉膏＞$(NH_4)_2SO_4$＞蛋白胨＞酵母浸膏。蛋白胨、KNO_3、牛肉膏之间与蛋白胨、$(NH_4)_2SO_4$之间在对菌丝生长速度影响上无显著差异，而KNO_3、牛肉膏与蛋白胨、$(NH_4)_2SO_4$和酵母浸膏之间则有显著或极显著差异。其中以利用牛肉膏的效果最好，生长势最佳。

OuF菌株菌丝生长势以蛋白胨、酵母浸膏、牛肉膏为最佳，$(NH_4)_2SO_4$和KNO_3较差。其菌丝生长速度顺序为KNO_3＞蛋白胨＞酵母浸膏＞牛肉膏＞$(NH_4)_2SO_4$。蛋白胨、KNO_3、酵母浸膏之间在对菌丝生长速度影响上无显著差异，其中以利用酵母浸膏的效果最好，生长势最佳。

2.5 pH对其生长状况的影响 根据1.2.1和1.2.4的试验结果，我们选择出3个亲缘性差异比较大的菌株来进行不同碳源培养基优化试验，3个亲缘性差异比较大的菌株分别为：OuC，OuE，OuF。试验采用无菌操作打孔接种技术，将3个供试菌株接种于1.5.7制作的相应的培养基所倒平板的中央。每个菌株在每种培养基上做3个重复，在25℃下培养5d后开始观察，此后每2d定时观测一次，记录数据，并进行分析，分析结果如表10所示。

表10 3个菌株不同pH菌丝生长情况

菌种	pH	菌丝长势			生长势	差异显著性	
		菌丝生长速度（mm/d）	菌丝浓密度	菌丝洁白度		0.05	0.01
C	6	6.23	浓密	洁白	++	ab	A
	7	6.52	浓密	洁白	++	a	A
	8	6.75	浓密	洁白	++	a	A
	9	5.33	浓密	洁白	++	b	B
E	6	6.17	浓密	洁白	++	a	A

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌种	pH	菌丝长势			生长势	差异显著性	
		菌丝生长速度(mm/d)	菌丝浓密度	菌丝洁白度		0.05	0.01
F	7	6.00	浓密	洁白	++	ab	A
	8	4.83	浓密	洁白	++	c	C
	9	5.67	浓密	洁白	++	b	B
	6	7.00	浓密	洁白	+++	a	A
	7	6.83	浓密	洁白	+++	a	A
	8	6.00	浓密	洁白	+++	b	B
	9	7.00	浓密	洁白	+++	a	A

注:用“－”表示菌丝不生长,用“+→+++”表示菌丝生长由弱至强。

从表10的试验结果可以看出,在pH6~9,pH不同,对长根菇菌丝生长的影响不大。供试的3个菌株对供试验的4种pH不同的PDA培养基都能加以利用,且生长势较好。OuC菌株其菌丝生长速度的顺序为pH8＞pH7＞pH6＞pH9。其中以PDA培养基pH=8时菌丝生长速度为最佳,且不同pH之间差异不显著。

OuE菌株其菌丝生长速度的顺序为pH6＞pH7＞pH9＞pH8。其中以PDA培养基pH=6时菌丝生长速度为最佳。pH6、pH7、pH9之间菌丝生长速度差异不显著,pH6、pH7、pH9与pH8相比较,则有显著或极显著差异。

OuF菌株其菌丝生长速度的顺序为pH6=pH9＞pH7＞pH8。其中以PDA培养基pH=6,pH=9时菌丝生长速度为最佳,且不同pH之间差异不显著。

3　讨论

在这个试验中,通过分子鉴定试验,可以看出供试的6个长根菇菌株在DNA遗传上,相似度较大。通过拮抗试验,可以看出6个长根菇菌株有两两拮抗反应,但拮抗反应(拮抗线)不明显。由此,可以看出分子鉴定试验与拮抗试验相互映证,所做的试验结果是正确的。

在测定菌丝生长速度试验中,6个供试菌株菌丝生长速度差异不太明显,相对而言,菌株OuF菌丝生长速度最快,而OuA菌丝生长速度最慢。这几个菌株菌丝生长速度的顺序为OuF＞OuB＞OuC＞OuD＞OuE＞OuA,在生产实践中,生产者应优先考虑选择OuF应用于生产。此试验因为样品数量少,得出的结论不具有代表性,接下来,应继续扩大样品数量,进行试验。

在不同碳、氮源培养基优化试验中,不同菌株在不同碳源培养基生长情况稍有不同。OuC菌株利用的最佳碳源是麦芽糖,OuE菌株利用的最佳碳源是果糖,OuF菌株利用的最佳碳源是麦芽糖。这与谭伟等[18]的试验结果是相一致的。而不同菌株对不同氮源的利用情况有不同。它们不能利用尿素,对其他的氮源的利用情况稍有不同,OuC与OuE利用的最佳氮源是牛肉膏,OuF利用的最佳氮源是酵母浸膏。

在不同pH培养基优化试验中,供试的4个pH对试验菌株的影响不大。相对而言,OuC在PDA培养基pH=8,pH=6时菌丝生长速度为最佳,OuE在PDA培养基pH=7时菌丝生长速度为最佳,OuF在PDA培养基pH=9时菌丝生长速度为最佳。在以后的试验中,应该扩大试验培养基pH的范围,继续进行试验。

参考文献

[1]卯晓岚.中国食用菌百科[M].北京:农业出版社,1993:124.

[2]李建宗,胡新文,彭寅斌.南大型真菌志[M].长沙:湖南师范大学出版,1993:288-289.

[3]Yang Z L,Zhang L F,Mueller G M,et al.A new systematic arrangement of the genus Oudemansiellas.str.(Physalacriaceae,Agaricales)[J].Mycosystema,2009,28(1):1-13.

[4]Zhu H,ShengK,Yan E F,et a1.Extraction,purification and antibacterial activities of a polysaccharide from spent mushroom substrate[J].International Journal of Biological Macromolecules,2011,50(3):840-843.

[5]杨新美.中国食用菌栽培学[M].北京:农业出版社,1988,1(33):235.

[6]高斌.长根小奥德蘑驯化栽培研究[J].中国食用菌,2000,19(2):5-6.

[7]李浩.长根菇生活史研究[D].长沙:湖南师范大学,2012:4-5.

[8]Tsantfizos Y S,Yang X S,McCloryA.Studies on *the biosynthesis* of the Fungal metabolite oudenone.Synthesis and enzymatic cyclization of analpHa-diketone open-chainprecursor into oudenone in cuhures of *Oudemansiella radicata*[J].Journal of Organic Chemistry,1999,64(8):6609-6614.

[9]Tsantrizos Y S.ZhouF,FamiliP,et a1.Biosynthesis of the hypotensive metabolite oudenone by *Oudemansiella radicata*.1.intact incorporation of a tetraketide chain elongation intermediate[J].Journal of Organic Chemistry,1995,60(21):6922-6929.

[10]邹立扣,潘欣,岳爱玲,等.长根菇菌丝培养、鉴定及氨基酸成分分析[J].食品科学,2011,32(03):144-147.

[11]胡梅.长根菇静置培养液体菌种培养基的优化[J].安徽农业科学,2008,36(05):1926-1928.

[12]Wu C Y,Lin Y P,Wang J C,et a1.Effect of cultivation conditions on the production of mycelial biomass and exopolysaccharide by submerged culture of a rooting shank medicinal mushroom,*Oudemansiella radicata*(Relhan) Singer(Agaricomycetideae)[J].International Journal of Medicinal Mushrooms,2010,12(1):99-110.

[13]Kim Sang-beom,KimSeong-hwan,Lee Kyung-rim,et a1.The optimal culture conditions for the mycelial growth of Oudemansiella radicata[J].Mycobiology,2005,33(4):230-

(下转27页)

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3.1　木贼科Equisetaceae　塞罕坝木贼科只有木贼属（*Equisetum*）一个属，木贼属包括草问荆、木贼和问荆3个种。

3.1.1　草问荆　草问荆*Equisetum pratense Ehrhart*地上茎一年生、二型。根状茎黑褐色，匍匐地下。孢子茎春季由根状茎发出，淡褐色，质稍嫩，不分枝，有明显的棱脊。有一个孢子囊穗生长于茎顶端，有柄，成长椭圆形，钝头。伴随着成熟的孢子囊，茎的先端开始枯萎，出现分枝，慢慢变成绿色，为营养茎。主茎分布棱脊8~14条，脊背上具密的硅质小刺状突起，略有粗糙感；叶鞘圆筒状，鞘齿长三角形，长尖，较鞘筒为短，分离，薄膜质，淡棕色或白色，中央具一棕色狭纵条；分枝轮生，每节10枚以上，主茎下部有的有少量分枝，有的没有分枝，有分枝的与主茎基本成直角伸展，长度基本相等，叶鞘齿近似，分枝近似三棱形。有时主茎顶端（4~8节）不延长，也不分枝，长7~13mm。生长在林内、灌木草丛或山沟中。

3.1.2　木贼　木贼*Equisetum hyemale* L.地上茎常绿，多年生，一型。根状茎为黑褐色，比较粗。地上茎直立，高50～110cm，粗5～10mm，坚硬，单一或仅从基部有1～2分枝，内中心孔大型，节间有纵棱脊20～30条，较宽，每棱脊上有硅质的疣状突起2行，极粗糙，沟内有气孔线1行；叶鞘圆筒形，长7～10mm，紧贴于茎，灰绿色，顶端及基部各有一棕黑色环圈；叶鞘齿线状钻形，质厚，背面有两条棱脊，形成浅沟，先端长锐尖，棕褐色，早落而成钝头。孢子囊穗长圆形，长7～12mm，具小尖头，无柄。生山坡湿地、疏林下或河岸沙地。全草能入药，能收敛止血、利尿，发汗，并治眼疾。

3.1.3　问荆　问荆*Equisetum arvense* L.地上茎一年生，二型。根状茎横生，有黑褐色小球茎。孢子茎春季（4～5月）由根状茎发出，常为紫褐色，无叶绿素，肉质，不分枝，高10～30cm，粗2～5mm，节间有12～14条不明显的棱脊；叶鞘大而长（长10～20mm），鞘齿棕褐色，常2～3齿连接成阔三角形。孢子囊穗顶生，长椭圆形，长2～35cm，钝头，有柄；孢子叶六角形，盾状着生，螺旋排列，边缘着生长形孢子囊。孢子成熟散落后此茎即枯萎，另由根状茎上生出绿色分枝的营养茎，高20～60cm，有棱脊6～15条，脊背上有横的波状隆起，沟中有气孔带。叶鞘筒漏斗状，鞘齿三角状披针形或由2～3齿连接成阔三角形，长度与鞘筒近相等，棕褐色，质厚，具膜质白色狭边；分枝轮生，每节7～13枚，细长，与主茎成锐角开展，中实，具3～4棱，叶鞘齿阔披针形，先端具膜质白色小尖头。生沟旁及山坡石缝中。全草入药，有清热利尿、止血、消肿等功效。对牲畜有毒。

3.2　凤尾蕨科 Pteridaceae　塞罕坝凤尾蕨科只有蕨属*Pteridium*的一种蕨*Pteridium aquilinum*。蕨*Pteridium aquilinum*（L.）*Kuhn var. latiusculum*（Desv.）*Underw.ex Helle*本地俗称蕨菜，植株大约1 m高。根状茎为黑色，长而横走，茎部具有短毛，颜色为锈黄色。叶疏生，小羽轴及主脉下面也分布着短毛，其他地方无毛；叶片形状接近阔三角形或长圆三角形，叶片大约长30～60cm，叶片大约宽20～45cm，为3～4回羽状叶，最后一回小羽片或裂片为长圆形，圆钝头，叶片全缘或者叶片下部具浅裂；叶脉成羽状，侧脉2～3叉，下面隆起。孢子囊生于小脉顶端的联结脉上。分布于塞罕坝的草地及林下。所谓坝上的蕨菜就是指采摘的嫩叶；根状茎贮藏优质淀粉，食用的天然蕨粉也是有这种植物制，为滋养食品；全株可以入药，具有驱风湿，利尿解热。

3.3　蹄盖蕨科 Athyriaceae　塞罕坝蹄盖蕨科也只有蹄盖蕨属*Athyrium*中的东北蹄盖蕨。东北蹄盖蕨*Athyrium multidentatum*（Doll）Ching植株高60～75cm，多年生草本植物。根状茎细长，横走，或粗短，直立或斜升，外被大鳞片。叶簇生；稀近生或远生；有长柄，叶柄长25～35cm，基部黑褐色，膨大而向下尖削；叶草质，稀有厚纸质，无毛或仅沿叶轴和羽轴上有单细胞腺毛，长圆状卵形，长约35～40cm，宽约20～25cm，三回羽裂，羽片密接，基部对称，下部1～2对略缩短；小羽片近平展；裂片顶端有2～4个细锯齿，侧脉单一，伸入锯齿。孢子囊群生于裂片基部的上侧一脉；囊群盖条形，边缘啮蚀状。塞罕坝主要分布于林下。

参考文献

[1]候建华，刘春延，刘海莹，等.塞罕坝动物志[M].北京：科学出版社，2011.

[2]刘春延，赵亚民，刘海莹，等.塞罕坝森林植物图谱[M].北京：中国林业出版社，2010.

（责编：张宏民）

（上接19页）234.

[14]闵三弟，臧珍娣，宋士良，等.长根菇深层发酵和多糖测定[J].上海农业学报，1994，10(04)：36-40.

[15]邹祥，胡昌华.长根菇液体深层发酵条件的研究[J].食品科学，2005，26(02)：130-134.

[16]袁彤光.食用菌液体种深层发酵技术应用综述[J].食用菌，1995，17(03)：6-7.

[17] Bunyard B A.A systematic assessment of Morchella using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene[J].Mycologia，1994，86(6)：762.

[18]谭伟，郑林用.六种碳源和氮源对长根奥德蘑菌丝生长的影响[J].西南农业学报，2001，14(03)：109-111.

（责编：张宏民）

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net