

文章编号:1673-1689(2007)03-0090-05

鸡枞菌培养特性的初步研究

龙正海¹, 曾大兴²

(1. 浙江医药高等专科学校药理学系, 浙江宁波 315100; 2. 深圳职业技术学院, 广东深圳 518055)

摘要: 采用固体培养和液体培养方法研究了鸡枞菌的培养特性以及培养基、pH值、酵母膏对其菌丝生长的影响。结果表明: 鸡枞菌在普通固体培养基中生长缓慢, 菌落较小, 在培养后期, 菌株间存在3种明显的菌落类型即“菌丝型”、“孢子型”、“中间型”, 产孢量和形态也有较大差异。在液体培养条件下鸡枞菌的生长较快, 培养基、pH值、酵母膏浓度对液体菌丝生长存在很大影响。各供试菌株在液体摇床培养中的最佳培养条件基本一致: 即最适pH值为4.5; 酵母膏最佳质量浓度为0.2 g/dL; 理想培养基为PSDYB。

关键词: 鸡枞菌; 培养特性; 培养基; 酵母膏

中图分类号:

文献标识码: A

Preliminary Study on Cultural Characteristics of *Termitomyces* spp.

LONG Zheng-hai¹, ZENG Da-xing²

(1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China; 2. Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

Abstract: In this manuscript, the cultural characteristics of *Termitomyces* spp were compared in solid and submerged culture. Furthermore, the nourishment and environmental conditions for *Termitomyces* spp growth were determined. Compared with that of the submerged culture, a very slow growth rate was observed on solid medium. The optimum culture conditions for *Termitomyces* spp growth in flask were follows: pH 4.7; yeast extract 0.2%; medium PSDYB.

Key words: *Termitomyces*; cultural characteristics; medium; yeast extract

鸡枞菌属又称蚁巢伞属(*Termitomyces*), 是 Heim(1942)针对白蚁(Termite)共生的伞菌提出来的^[1], Heim(1977)在其专著《Termites et Champignons》中共描述了28个种^[2], 目前我国已报道近20多个种^[3]; 其中鸡枞菌(*T. albuminosus*)和粗柄鸡枞菌(*T. robustus*)在我国的分布最广、产量最大^[4]。

鸡枞菌子实体味道鲜美, 营养丰富, 其菌丝体蛋白质含量高达28.28%, 8种人体必需氨基酸占

总氨基酸量的37.60%^[5], 超过其它很多种类食用菌菌丝体或子实体, 水溶性多糖含量也与野生子实体接近^[6]。中医认为, 其性平味甘, 有益胃、清神、治痔等功效。近年来医学研究表明其中的多糖、麦角甾醇等活性成分尚具有抗肿瘤、降血脂、调节免疫功能等作用^[7]。因此, 鸡枞菌在食品、医药领域颇具开发价值。

但由于该菌只能生长在白蚁巢上, 与白蚁之间的共生关系相当复杂, 商业化人工栽培仍处于摸索

收稿日期: 2006-05-15.

作者简介: 龙正海(1963-), 男, 贵州锦屏人, 副教授, 微生物学硕士研究生. Email: longzh@mail.zphc.net

阶段^[6]。鉴此了解鸡纵菌菌丝的生长条件和培养特性具有十分重要的意义。本文用子实体分离菌株对其生长特性及培养条件进行初步研究,为进一步开发利用这种珍稀食用兼药用真菌资源提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

鸡纵菌(*T. albuminosus*) Tb-213、Tb-214 菌株及粗柄鸡纵菌(*T. robustus*) Tr-702 菌株均系作者从贵州省兴义市采集的野生子实体中分离。

1.2 培养基

1.2.1 固体培养基 采用 PDAY 培养基,即在 PDA 培养基中加质量浓度 0.2 g/dL 酵母膏配制而成,用柠檬酸调 pH 值至 4.5。

1.2.2 液体培养基 PDY 培养基成分(g/dL):20 马铃薯汁,2 葡萄糖,0.2 酵母膏;PDYB 培养基:PDY+ VB₁ 30mg/L + VB₆ 60mg/L;PSDY 培养基:15 马铃薯汁,25 豆汁,2 葡萄糖,0.1 酵母膏;PSDYB 培养基:PSDY+ VB₁ 30 mg/L + VB₆ 60 mg/L;Czapek 培养基:3 蔗糖,0.3 硝酸钠,0.05 氯化钾,0.1 磷酸氢二钾,0.001 亚硫酸铁,0.05 硫酸镁;上述培养基均用柠檬酸调 pH 值至 4.5。

1.3 培养方法

固体培养采用 9 cm 培养皿 25 °C 恒温培养,液体培养采用 250 mL 三角瓶装入 50 mL 培养液,用分生孢子液(1×10^6 /mL)接种,接种量为 1 mL/每瓶,置 25 °C 下 120 r/min 恒温摇床培养。

1.4 孢子萌发观察

用无菌水以斜面或摇瓶培养物制备孢子悬浮液(1×10^6 /mL),在装有培养基的试管或三角瓶中接入适量孢子悬浮液,25 °C 静置或摇床培养,分别于 24 h 和 48 h 取样观察孢子萌发情况,及时做好记录并计算孢子萌发率。

1.5 菌丝干重测定

各种培养液经 4 层纱布过滤,将得到的湿菌丝体烘干至恒重后,用电子天平称重,取各处理的平均值即可。

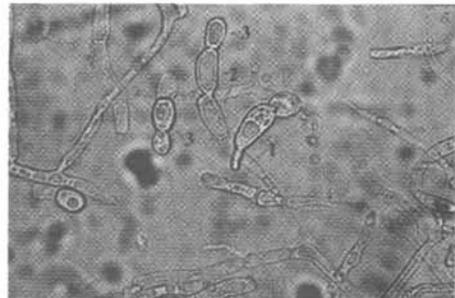
2 结果

2.1 鸡纵菌的培养特性

2.1.1 鸡纵菌的固体培养特征 实验观察了鸡纵菌若干菌株的固体培养特征,发现各菌株在 PDA

斜面和固体平板上生长极慢,在 PDAY 上生长有所加快,但仍然十分缓慢。在 PDAY 斜面培养基上,25 °C 培养,多数菌株 12~15 d 后可长满斜面,但有一部分菌株接种后仅局限在斜面的中央部位生长,菌苔不扩大,不能长满整个斜面。

固体斜面培养:菌苔初期纯白色,后颜色逐渐加深至黄色或灰褐色。不同菌株的菌苔在生长初期形态较一致,后期因产孢量不同,形态差异较大。根据这些差异,初步可分为 3 种类型:(1)菌丝型:菌苔后期仍然保持纯白色或微黄,形成大量气生菌丝,产孢量少,菌苔表面绒状,少数菌株属此种类型。(2)孢子型:菌苔气生菌丝少,菌丝后期聚集成颗粒状或粉状,菌苔部分隆起,产孢量大,大部分菌株属此种类型;(3)中间型:气生菌丝和产孢情况介于上述两种类型之间,挑取后期菌苔进行镜检,可见很多着生于分生孢子梗上的球形、椭圆形或卵形链状细胞,分生孢子一般位于链状细胞前端,呈卵圆形、球形等多种形态(见图 1(a));包括 Tb-213、Tb-214、Tr-702 在内的部分菌株则属于这种类型。



1. 分生孢子梗 2. 链状孢子 3. 分生孢子
(a) Tb-213 菌株分生孢子梗及分生孢子



1. 萌发孢子 2. 芽管 3. 未萌发孢子
(b) Tb-213 菌株的分生孢子萌发

图 1 Tb-213 菌株的分生孢子及孢子萌发

Fig. 1 The conidia and germination of Tb-213 strain

固体平板培养:由于鸡纵菌在人工培养基上普遍生长缓慢,因此在 PDAY 平板上,多数菌株的菌

落扩展也较慢,大多数局限生长,25℃培养10d,菌落可生长5mm~35mm(直径),多数菌株仅生长5mm~15mm;菌落特征与斜面培养相似,也存在3种类型。菌丝型的菌落生长相对较快,菌落较大,而孢子型的菌落生长缓慢,菌落较小,菌落后期的产孢情况及孢子形态与斜面培养的情况基本一致。

2.1.2 鸡枞菌的液体培养特征 上述固体培养所采用的各菌株,在摇床培养条件下,多数接种2~3d后,开始形成纯白色的微菌丝球,菌丝球中部紧密,边缘疏松,菌丝粗细均匀,较细,直径约1μm~1.5μm,边缘菌丝向外呈辐射状生长,未见分生孢子产生。4~5d后,长成4mm~8mm大小的菌丝球,菌丝球边缘菌丝变粗变短,直径约2μm~3μm,其顶端开始产生分生孢子,分生孢子形态与固体培养相似,菌丝球颜色加深为淡黄色或黄褐色。5~6d后,菌丝球一般不再增大,开始大量产孢,培养液变浑浊。观察还发现:在摇床培养条件下,鸡枞菌的产孢时间与产孢量受多种因素影响,一般而言,“孢子型”菌株比“菌丝型”菌株产孢早,产孢量大,中间型则位于二者之间。此外,当接种量较大和培养温度高于30℃以上时,产孢量明显增加。

而各菌株静置培养时,则均在培养液的表面形成一层菌丝膜,初期白色,逐渐加深至黄色或灰褐色,也形成相当数量的分生孢子。但此时“孢子型”、“菌丝型”、“中间型”菌株间培养特征的差异性不够明显。

综上所述,由于“菌丝型”菌株产孢量较小,用于液体深层培养时接种量不好控制,而“孢子型”菌株产孢量虽大,但不易形成菌丝球。因此,作者选择了产孢量适中,在液体培养时相对容易形成菌丝球的3个中间型菌株即Tb-213、Tb-214、Tr-702作为后续实验的主要研究材料。

2.2 鸡枞菌的孢子萌发特征

将Tb-214的孢子悬浮液分别接入无菌水、Czapek、PD和PDY中,24h、48h后观察,结果见表1所示。24h后观察,在无菌水和Czapek中未见孢子萌发,萌发率为0;在PD和PDY中孢子的萌发率分别为94%和96%。孢子萌发时不膨大,大多从孢子两端长出2根芽管(见图1(b)),偶见3~4根;多数孢子仅长出较短的芽管,少数芽管已长成较长的菌丝。48h后观察,孢子萌发率几乎没有变化,仅是芽管不断伸长,而在无菌水和Czapek中未萌发的孢子开始自融。实验中还观察到,静置和摇床培养对孢子萌发率无影响。Tb-214在无菌水和Czapek中不能萌发的原因,可能是其营养不能满足孢

子萌发的需要。

2.3 酵母膏浓度对鸡枞菌菌丝生长的影响

本实验以PDY培养基研究了不同酵母膏质量浓度对鸡枞菌菌丝生长的影响,结果见图2所示。实验结果表明:酵母膏质量浓度对3个菌株菌丝生长的影响是一致的,当酵母膏浓度为0.2g/dL时,各菌株的菌丝产量达到最高,此后,随着浓度的升高,菌丝产量逐步下降,当质量浓度升至0.6g/dL后,各菌株的菌丝产量下降至对照水平;预试验还证实酵母膏质量浓度超过0.7g/dL后,会明显地抑制菌丝生长。因此,鸡枞菌菌丝生长的最佳酵母膏质量浓度为0.2g/dL。

表1 鸡枞菌Tb-214菌株分生孢子在不同培养基中的萌发率 $n=5, \bar{x}$

Tab.1 The germination rate of conidium from Tb-214 strain with different medium

培养基	萌发率/%	
	24 h	48 h
Water	0.0	0.0
Czapek	0.0	0.0
PD	94.0	95.0
PDY	96.0	96.5

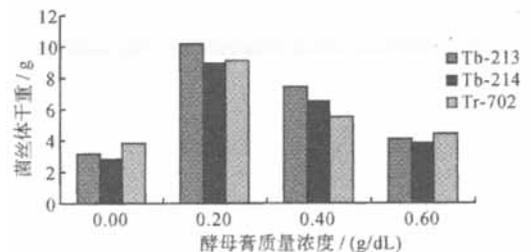


图2 酵母膏对鸡枞菌菌丝生长的影响

Fig.2 Effects of yeast extract on mycelium growth by *Termitomyces*

2.4 pH值对鸡枞菌菌丝生长的影响

以PDY为培养基,初步比较了pH值对3个供试菌株生长的影响,结果见图3。试验说明偏酸性环境适合供试菌株的菌丝生长,各菌株的最佳pH值均为4.5,但是当pH值小于3.5或大于5.5时,菌丝体生长受到抑制。

2.5 培养基组成对鸡枞菌菌丝生长的影响

比较了PD、PDY、PDYB、PSDY和PSDYB等培养基对鸡枞菌菌丝生长的影响,结果见表2。实

实验结果表明:不同种的两个菌株在 PD 中的生长量最小,在添加酵母膏或大豆汁后的 PDY 或 PSDY 培养基上其生长量可提高 2~3 倍;在进一步添加 2 种维生素的 PDYB 或 PSDYB 培养基上,菌丝的生长量仅有少量提高。说明酵母膏及大豆汁所含有的丰富的 B 族维生素已基本满足供试菌株对维生素的需要,两个供试菌株在 PSDYB 培养基中都生长最好,不存在明显的种间差异。

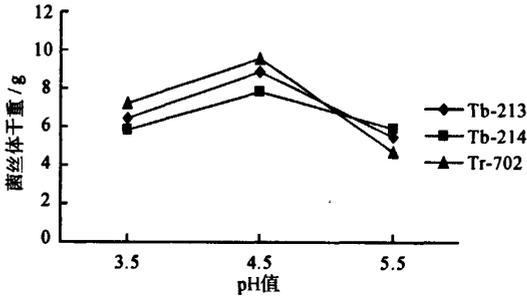


图 3 pH 值对鸡枞菌菌丝生长的影响

Fig. 3 Effects of pH on mycelium growth of *Termitomyces*

表 2 不同培养基对鸡枞菌菌丝生长的影响 $n=5, \bar{x}$

Tab. 2 The effects of different medium on mycelium growth of *Termitomyces*

培养基	菌丝体干重/g	
	Tb-213	Tr-702
PD	4.23	3.90
PDY	10.78	10.56
PDYB	11.20	9.32
PSDY	12.70	11.24
PSDYB	13.58	12.53

3 讨论

本实验发现,固体平板或斜面培养,鸡枞菌菌株间均存在菌丝型、孢子型、中间型三种明显的菌苔(落)类型,大部分菌株属于孢子型,少数是菌丝型,部分菌株为中间型。鸡枞菌种间和种内菌株间培养特征的显著差异性在大型高等真菌中并不多见,其规律性值得进一步研究。

鸡枞菌作为共生菌,需要许多生长因子,据报道玉米浆、酵母膏(粉)、黄豆粉、麦麸浸汁、多种维生素等均能促进鸡枞菌生长^[7-9],本实验也说明大豆汁、酵母膏、VB₁、VB₂对该菌生长具有很大的促进作用。由于大豆汁、酵母膏本身就含有丰富的 B 族维生素,在 PDY、PSDY 中加入 VB₁ (30 mg/L)、VB₆ (60 mg/L) 两种 B 族维生素,产量的提高并不明显,表明酵母膏中的维生素已能较好满足菌丝生长的需要。在 PDY 中加入豆汁后,菌丝产量进一步提高,但应注意调节培养基的碳氮比(C/N),加入豆汁后培养基氮源增加,因此,我们在配制时相应减少了马铃薯汁和酵母膏在培养基配方中的用量。

关于鸡枞菌菌丝生长适宜的 pH 值范围有关报道存在一定差异,赵呈裕等曾报道鸡枞菌菌丝体深层发酵的最适起始 pH 值为 6~7^[10],本文的实验结果与朱必凤等^[7]及陈宛如等^[8]的报道比较一致,我们认为鸡枞菌菌丝最适宜的 pH 值范围在 4.0~4.7 之间。

有关鸡枞菌属生活史^[11,12]及其分生孢子^[13,14]、小白球等无性阶段^[8]的研究报道较多,然而对于分生孢子萌发特征和萌发影响因子方面未见详细报道。本实验中鸡枞菌分生孢子在 Czapek 等普通的合成培养基中不能萌发,添加马铃薯浸汁、酵母膏等成分后萌发率都接近 95%,说明其分生孢子萌发也需要某些刺激因子或适宜的营养条件。

参考文献 (References):

[1] Heim R. Les champignons des termitières nouveaux aspects d'un problème de biologie et de systématique générales[J]. *Revue scientifique*, 1942, 80, 69-86.

[2] Heim R. *Termites et Champignons*[M]. Paris: Soci t nouvelle des editions ditions bou b e. 1977.

[3] Wei T Z, Yao Y J, Li T H. First record of *Termitomyces entolomoides* in China[J]. *Mycotaxon*, 2003, 88: 433-438.

[4] Tang B H, Wei T Z, Yao Y J. Revision of *Termitomyces* species originally described from China[J]. *Mycotaxon*, 2006, 95: 285-293.

[5] 胡忠策, 郑晓冬. 鸡枞菌液体深层发酵的研究[J]. *菌物系统*, 2002, 21(1): 98-101.

HU Zhong-ce, ZHENG Xiao-dong. Study on submerge fermentation of *Termitomyces albuminosus*[J]. *Mycosystema*, 2002,

- 21(1):98-101. (in Chinese)
- [6] 姚晓红,陈宛如,董调雅. 鸡枞菌的液体培养及菌体成分分析[J]. 浙江农业学报,2001,13(2):91-93.
YAO Xiao-hong, CHENG Wan-ru, DONG Diao-ya. Liquid culture and composition analysis of *Termitomyces albuminosus* [J]. *Acta agriculturæ Zhejiangensis*, 2001, 13(2): 91-93. (in Chinese)
- [7] 朱必凤,马海燕,赵发清,等. 鸡枞菌的液体培养及其多糖物质研究[J]. 真菌学报,1996,15(1):42-47.
ZHU Bi-fen, MA Hai-yan, ZHAO Fa-qin, et al. Study on liquid culture and polysacchride of *Termitomyces albuminosus* [J]. *Acta mycologica sinica*, 1996, 15(1): 42-47. (in Chinese)
- [8] 陈宛如,陈增鸿,董调雅. 比较研究白蚁巢上生长的担子菌—鸡枞菌及其分生孢子阶段小白球菌的生长与其基质的生态关系[J]. 真菌学报,1995,14(3):202-208.
CHEN Wan-ru, CHEN Cen-hong, DONG Diao-ya. The ecological relation between the growth of *Termitomyces albuminosus* and *Termitosphaeria duthiei* and substrates[J]. *Acta mycologica sinica*, 1995, 14(3): 202-208. (in Chinese)
- [9] Zhang M Z, Zhang X D, Chen X A, et al. Study on the submerged fermentation(SMF) of *Termitomyces eurrhizus*[J]. *Journal of Zhejiang university science*, 2002, 3(3): 362-366.
- [10] 赵呈裕,杨抚华,王化远,等. 鸡枞菌的液体发酵研究和化学成分分析[J]. 华西医科大学学报,1997,28(4):407-411.
ZHAO Ceng-yu, YANG Fu-hua, WANG Hua-yuan, et al. Studies on the liquid fermentation of *Termitomyces albuminosus* and its chemical composition analysis[J]. *Journal of west China university of medical sciences*, 1997, 28(4): 407-411. (in Chinese)
- [11] 陈楚璠,温志强. 鸡枞菌生活史研究[J]. 福建农学院学报,1991,20(2):192-195.
CHEN Chu-jun, WEN Zhe-qiang. A study on the life cycle of *Termitomyces albuminosus*[J]. *Journal of Fujian agricultural college*, 1991, 20(2): 192-195.
- [12] 陈楚璠. 鸡枞菌性模式的研究[J]. 中国食用菌,1995,14(5):22-23.
CHEN Chu-jun. A study on sexual moden of *Termitomyces albuminosus*[J]. *Edible fungi of China*, 1995, 14(5): 22-23. (in Chinese)
- [13] Botha W J, Eicker, A. Cultural studies on the genus *Termitomyces* in south Africa II. Macro-and micromorphology of comb sporodochia[J]. *Mycology research*, 1991, 95(4): 444-451.
- [14] 贺新生,梁福,贾继东,等. 粗柄鸡枞菌菌丝体培养和无性繁殖过程研究初报[J]. 微生物学杂志,1996,16(3):26-31.
HE Xing-sheng, LIANG Fu, JIA Ji-dong, et al. Study on the culture of mycelium and the process of asexual reproduction of *Termitomyces robustus*[J]. *Journal of microbiology*, 1996, 16(3): 26-31. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)