

## 耐低温灰树花工厂化生产菌株的筛选

冯芳侠<sup>1,2</sup>, 付庆伟<sup>2,3</sup>, 王凤春<sup>1</sup>, 付庆成<sup>3</sup> (1. 河北省迁西县板栗产业研究发展中心, 河北迁西 064300; 2. 河北省迁西县农牧局, 河北迁西 064300; 3. 河北省迁西县虹泉食用菌专业合作社, 河北迁西 064300)

**摘要** [目的] 筛选适合低温环境生产出菇的菌种。[方法] 通过比较 13 个野生灰树花菌株的菌丝生长速率、生长势、拮抗性, 并以栽培周期、子实体品质及前期生物学转化率等指标进行工厂化栽培考察。[结果] 菌株“ZDL-05”在  $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$  时 68 d 完成 2 次出菇, 且生物转化率为 82.3%, 同时在颜色、风味、叶片厚度、口感及朵形等方面表现优秀, 适合灰树花低温工厂化栽培。[结论] 灰树花菌株 ZDLM-05 可以作为秋冬季或较低温地区工厂化生产菌种。

**关键词** 灰树花; 耐低温; 菌株筛选; 工厂化

**中图分类号** S646 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)34-056-03

Screening on Resistance of *Grifola frondosa* Production Strains at Low Temperature

FENG Fang-xia<sup>1</sup>, FU Qing-wei<sup>2,3</sup>, WANG Feng-chun<sup>1</sup> et al (1. Qianxi Chestnut Industry Research Development Centre, Qianxi, Hebei 064300; 2. Qianxi County Agriculture and Animal Husbandry Bureau, Qianxi, Hebei 064300; 3. Qianxi County Hongquan Mushroom Professional Cooperatives, Qianxi, Hebei 064300)

**Abstract** [Objective] In order to select the suitable low temperature environment to produce mushroom strains. [Method] The comparison of mycelium growth rate, growth vigor, antagonism, cultivation period, fruitbody quality and early biological conversion rate of 13 wild strains of *Grifola frondosa* as indicators of industrial cultivation were carried out. [Result] The results showed that: the growth temperature shelf culture mode strain 'ZDLM-05' at  $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$  for 68 days, two times the cumulative matrix fruiting biological transformation rate was 82.3%, while at low temperature, flavor, taste and leaf thickness, shape was so excellent, and was suitable for low temperature *Grifola frondosa* factory cultivation. [Conclusion] *Grifola frondosa* "ZDLM-05" was used as factory production strains at low temperature area.

**Key words** *Grifola frondosa*; Low temperature resistance; Strain screening; Factory

灰树花 [*Grifola frondosa* (Dicks. Fr.) S. F. Gray] 是担子菌亚门层菌纲无隔担子菌亚纲非褶菌目多孔菌科灰树花属真菌, 为珍贵的药食两用菌。其人工栽培历史较短, 受前期生物转化率低、多糖含量低等因素制约, 灰树花栽培成本较高, 工厂化生产技术发展缓慢, 制约了整个行业的发展。筛选前期生物转化率高、适合低温环境出菇的工厂化栽培菌种, 既能满足秋、冬及初春较低温度环境下工厂化出菇, 又能降低生产成本, 可以极大地满足灰树花工厂化栽培的需求<sup>[1]</sup>。

## 1 材料与方

## 1.1 试验材料

**1.1.1 培养基配方。**基础培养基: 马铃薯 200.00 g, 栗木屑 50.00 g, 麦麸 50.00 g, 葡萄糖 20.00 g, 蛋白胨 2.00 g, 维生素 B<sub>1</sub> 0.01 g, CaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.00 g, MgSO<sub>4</sub> 1.50 g, 琼脂粉 20.00 g, 定容至 1 000 ml。

原种、栽培种培养基: 栗木屑 35%、棉籽皮 15%、麸皮 15%、玉米芯 20%、栗蓬 10%、海泡石粉 2%、蔗糖 1%、过磷酸钙 1%、石膏 1%, 含水量 65%, 常压 100 °C 灭菌 12 h。

**1.1.2 菌株及来源。**13 个灰树花菌株系从唐山市迁西县东荒峪、汉儿庄等地收集、分离纯化和筛选获得的野生菌株。采用组织分离法, 取子实体柄叶结合部位组织接种到基础培养基平板上, 在 25 °C 下恒温培养形成菌落, 采用菌丝尖端纯化法纯化菌种, 并用基础培养基斜面保存备用, 依次编号为 ZDLM-01 ~ ZDLM-13。以当地主栽品种“小黑汀”为对照, 由河北省燕山科学试验站提供。

**1.1.3 试剂。**木聚糖, Sigma 公司; 其他试剂如醋酸钠、酒石

酸钾钠、丙酮、3,5-二硝基水杨酸 (DNS)、MgSO<sub>4</sub>、NaOH 等均

为国产分析纯试剂。  
DNS 显色剂 (3,5-二硝基水杨酸显色剂): 称取 10 g 3,5-二硝基水杨酸溶于蒸馏水中, 加入 20 g 氢氧化钠、200 g 酒石酸钾钠和 500 ml 水, 加热溶解后再加入重蒸酚 2 g、无水亚硫酸钠 0.5 g, 待全部溶解后, 冷却, 蒸馏水定容至 1 000 ml, 贮于棕色瓶中, 放置 7 d 后使用, 用前过滤。

醋酸钠缓冲液 (0.1 mol/L, pH 4.6): 称取 NaAC 0.8 g, 加入蒸馏水 80 ml 溶解, 用醋酸调 pH 至 4.6, 最后用蒸馏水定容至 100 ml。

木聚糖溶液 (1%): 称取木聚糖 0.501 g, 用蒸馏水溶解并定容至 50 ml。

浓缩胶缓冲液 (0.5 mol/L, pH 6.8): 称取 6.06 g Tris, 加 80 ml dd H<sub>2</sub>O 溶解, 用盐酸调 pH 至 6.8, 最后定容至 100 ml。

**1.1.4 主要仪器。**UV8100 紫外可见分光光度计, 北京莱伯泰科仪器股份有限公司; 洁净工作台, 上海博迅实业有限公司; 梅特勒电子分析天平, 河南郑州南北仪器设备有限公司; LDZH-150KBS 型立式蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 最适发菌温度试验。**采用生长速率法进行测定。用基础培养基做成平板, 接种环挑菌种置于平板中央, 分别在 16、18、20、22、24、26、28、30 °C 下恒温培养 10 d 后, 测量菌落直径, 每个处理 3 个平行试验, 结果取平均值。

**1.2.2 出菇试验。**以栗木屑 35%、棉籽皮 15%、玉米芯 20%、麸皮 15%、栗蓬 10%、海泡石粉 2%、蔗糖 1%、过磷酸钙 1%、石膏 1% 为配方。将栗木屑、棉籽壳、栗蓬渣等主料称好, 混在一起搅拌均匀, 再将麸皮、过磷酸钙、蔗糖、石膏等辅料随水拌入料中, 料水比为 1:1.2 ~ 1:1.3, 含水量 65%, 常

**作者简介** 冯芳侠 (1982 - ), 女, 陕西宝鸡人, 农艺师, 硕士, 从事微生物发酵及食用菌研究。

**收稿日期** 2015-10-31

压 100℃ 灭菌 12 h。

以主栽品种“小黑汀”为对照,与 13 个野生优种各 200 棒作对比试验;按照“1.2.1”结果中各菌种最适生长温度 ( $\pm 2$  ℃) 为培养温度,采用层架式发菌,菌丝长满菌袋后,剥袋置于长  $\times$  宽  $\times$  深 = 2.0 m  $\times$  0.5 m  $\times$  0.3 m 生长畦内,覆土栽培,出菇两潮为止。分别记录 2 次出菇量、出菇温度、出菇时间、平均单重,以前期生物转化率、产量、颜色、气味、叶片厚度、产量等指标<sup>[2-3]</sup>,筛选低温环境下前期生物转化率、商品性状较好的野生优种。

**1.2.3 菌丝生长势测定。**以主栽品种“小黑汀”为对照,将 3 个野生优种在基础培养基活化后,沿菌落的边缘取直径 5 mm 的菌块,分别接种于 PDA 加富平板培养基上。每个菌种 3 个重复,于各自适宜的生长温度下恒温培养 3 d,每天定时观察菌落的生长状况,并精确测量菌落半径,计算菌丝生长速度。

菌丝生长速度 (mm/d) = 菌落半径 (mm) / 菌丝生长天数 (d)

**1.2.4 木聚糖酶活力测定。**沿菌落边缘挖取模拟出菇培养基上的菌丝各 1 g 于试管中,加 pH 4.6 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液 10 ml,25 ℃ 浸提过夜 (12 h),将浸提液用滤纸过滤,取

滤液 1 ml 加入试管中,然后加入 9 ml 蒸馏水稀释,充分混匀,得粗酶液待用。

将 pH 4.6 醋酸钠缓冲溶液、1% 木聚糖溶液及粗酶液于 40 ℃ 水浴预热 2 min,然后在试管中依次加入 pH 4.6 醋酸钠缓冲溶液 1 ml,1% 木聚糖溶液 0.5 ml,稀释后的粗酶液 0.5 ml。40 ℃ 水浴 30 min 后,加入 DNS 3 ml,100 ℃ 水浴 5 min 后水冷,在波长 510 nm 下测定 OD 值。酶活力以样品与底物反应 30 min 后吸光值的改变表示。

**1.2.5 拮抗性试验。**将活化后的供试菌株沿菌落边缘用打孔器切下直径 5 mm 的菌块,每 2 个不同菌株的菌块相距约 1 cm,接种于同一基础培养基平板上,于 20 ℃ 恒温培养箱内培养 7 d,观察不同菌株间是否有拮抗线的存在,拮抗线是否明显。

## 2 结果与分析

**2.1 最适发菌温度** 一般灰树花菌株菌丝体生长适宜温度为 22 ~ 30 ℃,在 22 ℃ 以下或 30 ℃ 以上生长缓慢。由表 1 可知,ZDLM-03 菌株菌落直径在 28 ℃ 时最大达到 4.9 cm。其中,ZDLM-05、ZDLM-06、ZDLM-12 在相对低温下 (18 ~ 24 ℃) 具有较大的生长量;ZDLM-05 在此温度范围下菌落直径能达到 4.4 mm,有较大的应用空间。

表 1 不同温度下各灰树花品种的菌落直径

品种	16 ℃	18 ℃	20 ℃	22 ℃	24 ℃	26 ℃	28 ℃	30 ℃
小黑汀	1.6	1.7	2.3	2.8	3.4	4.1	3.8	3.6
ZDLM-01	1.3	1.7	2.2	2.9	3.2	4.5	3.6	2.6
ZDLM-02	1.0	1.8	1.8	2.1	3.7	4.3	3.9	3.7
ZDLM-03	1.4	1.6	2.3	3.5	4.6	4.7	4.9	4.7
ZDLM-04	1.2	1.6	0.8	1.8	3.4	3.8	3.8	3.4
ZDLM-05	2.6	3.9	4.2	4.3	4.4	3.2	3.2	2.5
ZDLM-06	1.4	2.5	3.6	3.9	3.4	3.3	4.1	4.2
ZDLM-07	1.3	1.9	2.1	2.6	2.8	4.4	4.0	3.2
ZDLM-08	1.0	1.4	1.5	1.9	2.4	3.0	3.0	2.8
ZDLM-09	0.8	1.2	1.8	2.4	3.1	3.6	3.3	2.6
ZDLM-10	0.9	1.1	1.7	2.2	2.8	3.8	3.6	3.1
ZDLM-11	0.8	1.4	0.8	1.8	2.8	3.8	4.1	3.3
ZDLM-12	1.7	3.4	3.9	4.2	4.3	3.8	3.6	2.9
ZDLM-13	1.2	1.5	1.6	2.9	3.3	4.0	4.1	3.5

**2.2 出菇试验结果** 由表 2 可知,传统优种“小黑汀”比 ZDLM-05 号优种 2 次出菇时间长 15 d,且后者在较低温度 ( $18 \pm 2$ ) ℃ 下生物转化率达到 82.3%;ZDLM-12 优种也比“小黑汀”早 7 d 完成出菇,生物转化率同比高 6.3%。

结合灰树花子实体的特有香味、灰黑色、叶片厚实等传统评价指标,优种 ZDLM-05 具有耐低温 ( $18 \pm 2$ ) ℃、前期生物转化率高 (82.3%) 及较好的产品特性,符合工厂化生产菌株的特征。

表 2 不同灰树花品种の出菇情况

品种	出菇温度 ℃	头潮产量 kg	二潮产量 kg	平均单重 g	转化率 %	出菇时间 d	颜色	风味	叶片厚度 mm	菇型
小黑汀	25 $\pm$ 2	106.9	89.3	3126.5	65.4	83	灰黑	浓郁	3.71	***
ZDLM-01	25 $\pm$ 2	71.6	59.5	2139.5	43.7	87	灰白	浓郁	3.61	***
ZDLM-02	25 $\pm$ 2	96.6	77.1	2688.3	57.9	79	灰黑	浓郁	3.93	*
ZDLM-03	28 $\pm$ 2	113.7	85.2	3473.1	66.3	85	灰白	清淡	4.11	**
ZDLM-04	23 $\pm$ 2	89.6	81.7	2565.5	57.1	93	灰白	一般	4.21	***
ZDLM-05	18 $\pm$ 2	138.6	108.3	4823.1	82.3	68	灰黑	浓郁	4.23	***
ZDLM-06	20 $\pm$ 2	98.8	71.6	2987.4	56.8	78	灰白	浓郁	3.34	**
ZDLM-07	27 $\pm$ 2	121.2	71.4	2498.7	64.2	91	灰白	浓郁	5.12	**
ZDLM-08	27 $\pm$ 2	79.6	80.3	6451.1	53.3	73	灰黑	一般	4.24	**
ZDLM-09	25 $\pm$ 2	115.8	87.9	4623.5	67.9	82	灰黑	浓郁	4.44	***
ZDLM-10	25 $\pm$ 2	123.2	88.6	3844.8	70.6	76	灰黑	清淡	4.18	*
ZDLM-11	27 $\pm$ 2	102.8	81.6	2989.0	64.8	79	灰白	浓郁	3.78	***
ZDLM-12	20 $\pm$ 2	117.6	97.5	3716.1	71.7	76	灰白	一般	3.96	***
ZDLM-13	27 $\pm$ 2	116.6	91.9	3341.7	69.5	83	灰黑	浓郁	5.03	**

注:菇型按形态好坏及畸形菇数量从少到多依次分为\*、\*\*和\*\*\*。

**2.3 菌丝生长势** 由表3可知,4个灰树花菌株在PDA加富培养基上的生长速度虽存在一定差异,但不明显,生长速度排列为ZDLM-05 > ZDLM-12 > ZDLM-06 > 小黑汀;ZDLM-06灰树花优种生长势较旺,有粗壮优势菌丝发育。

表3 不同灰树花品种在PDA加富培养基上的菌丝生长势

品种	生长速度/mm/d	菌落特征
小黑汀	5.23 ± 0.45	白色,菌丝棉絮状,有较厚、较密的菌被
ZDLM-05	5.65 ± 0.83	白色,菌丝棉絮状,有较厚、较密的菌被
ZDLM-06	5.32 ± 0.61	白色,菌丝棉絮状,有粗壮优势菌丝,菌被较密
ZDLM-12	5.57 ± 0.55	白色,菌丝棉絮状,有较厚、较密的菌被

**2.4 木聚糖酶活力** “小黑汀”、ZDLM-05、ZDLM-06、ZDLM-12灰树花菌株的木聚糖酶活力分别为13.12 ± 0.11、25.25 ± 0.29、24.67 ± 0.14、19.52 ± 0.06 U,3个筛选的灰树花菌种均高于对照组;其中ZDLM-05菌株的活力最高,接近“小黑汀”的2倍;此结果与菌种的生物转化率相一致。

**2.5 拮抗性** 由表4可知,“小黑汀”和3个筛选的灰树花菌株间拮抗作用明显,表明考察的3个野生菌种相对独立,亲缘关系较远。

表4 不同灰树花菌种间的拮抗作用

品种	ZDLM-12	ZDLM-06	ZDLM-05
小黑汀	+	+	+
ZDLM-05	+	+	
ZDLM-06	+		

注:存在明显拮抗作用为“+”;不存在拮抗作用为“-”。

### 3 结论与讨论

我国工厂化灰树花生产分为液体发酵罐菌丝体发酵生产灰树花多糖和工厂化栽培生产子实体两类。第一类主要满足工业及医药生产需求,已经发展相对成熟;第二类主要满足日益增长的营养食材的需求,产品产量低、成本高,产业

(上接第30页)

(3)该研究是在膜下滴灌栽培条件下进行,并且采用了机收花生种植模式,该种植方式是新疆花生最具发展潜力的新型栽培模式。在该种植模式下,筛选出的花育33号(HY33)和花育50号(HY50)可作为今后新疆花生高产育种的骨干亲本重点使用,还应对这2个高产品种的配套栽培技术进行深入系统的研究,实现良种良法相配套,农机农艺相融合,以充分发挥良种的增产潜力。

#### 参考文献

- [1] 卢庆善,赵廷昌.作物遗传改良[M].北京:中国农业科学技术出版社,2011.
- [2] 王军,王溯,王军强,等.花生品种主要农艺性状的主成分分析[J].农业科技通讯,2015(4):103-106.
- [3] 王亮,王桥江,李艳,等.天山北坡经济带机收花生膜下滴灌高产栽培技术[J].农业科技通讯,2015(6):238-240.
- [4] 王亮,李艳,王桥江,等.滴灌条件下花生单粒播种密度对产量及其相关性状的影响[J].安徽农业科学,2015,43(30):380-382,385.
- [5] 万书波.中国花生栽培学[M].上海:上海科学技术出版社,2003.
- [6] 王新华,吴继华,陈雷,等.花生新品种商研9938播期和密度试验研究

发展缓慢,其中前期生物转化率低、生长周期长是最重要的制约因素。工厂化栽培食用菌通常只采收第一潮菇,以提高菇房利用率,降低生产成本。前期研究表明,灰树花第二潮出菇量为第一潮出菇量的50%~85%,出菇周期短的灰树花品种,收两潮菇可以降低成本40%~78%。

因此,以前期生物转化率为指标,筛选生产周期短、耐低温的灰树花菌种,不仅可以提高单位产量和菇房使用率,还可以降低冬季生产的操作成本和生产风险,实现工厂化生产的利润最大化。该试验通过最适生长温度和小试工厂化生产,只能提供灰树花优种的筛选依据,不能完全依靠其结果作为菌株筛选的最终标准。该试验阶段获得ZDLM-05、ZDLM-06和ZDLM-12共3个野生优种,均能在小于或等于22℃时正常出菇;其中ZDLM-05可以在(18±2)℃时68d完成2次出菇,且生物转化率达到82.3%;同时子实体性状和产品标准较高,是难得的工厂化生产菌种。该研究继续考察了3个野生优种的生长势、木聚糖酶活力和拮抗性,以定性或半定量的形式考察了菌种的亲缘关系和生物转化能力,其中ZDLM-05不是每项指标均最佳,但综合评比适宜工厂化栽培。

综上所述,灰树花菌株ZDLM-05可以作为秋冬季或较低温地区工厂化生产菌种,能在68d内完成2次出菇,且生物转化率达到82.3%,与传统主栽品种“小黑汀”相比,优势非常明显;同时菌株生物稳定性好,可进一步研究其栽培工艺、环境控制参数等条件,保证高产、稳产。

#### 参考文献

- [1] 潘辉,王瑞娟,李正鹏,等.工厂化栽培灰树花菌株的筛选研究[J].北方园艺,2011(1):188-191.
- [2] 沈高潮,姚庭永,姚松涛,等.灰树花“小黑汀”的特性及栽培要点[J].食用菌,2014,22(1):59-60.
- [3] 陈秀娟.灰树花工厂化周年栽培技术[J].中国园艺文摘,2012(6):141-142.
- [4] 初报[J].农业科技通讯,2013(7):90-93.
- [5] KIPKOIR E C, RAES D, MASSAWE B. Seasonal water production functions and yield response factors for maize and onion in Perkerra, Kenya [J]. Agricultural water management, 2002, 56:229-240.
- [6] 苏君伟,赵立仁.花生膜下滴灌节水栽培技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2012.
- [7] 程冬玲,林性粹,蔡焕杰.膜下滴灌技术对新疆绿洲农业持续发展的效应[J].干旱地区农业研究,2005,23(2):59-62.
- [8] 马英杰,何继武,洪明,等.新疆膜下滴灌技术发展过程及趋势分析[J].节水灌溉,2010(12):87-89.
- [9] 尹飞虎,周建伟,董云社,等.新疆生产建设兵团滴灌技术应用现状及存在问题[C]//植物需水与调控技术交流研讨会论文集.北京:中国科学技术出版社,2010:208-210.
- [10] 苏君伟,王慧新,吴占鹏,等.辽西半干旱区膜下滴灌条件下对花生田土壤微生物量碳、产量及WUE的影响[J].花生学报,2012,41(4):37-41.
- [11] 江建华,倪婉莉,于欢欢,等.花生单株生产力与主要农艺性状间的相关性研究[J].中国农学通报,2013,29(36):125-130.
- [12] 李玉发,窦忠玉,梁军,等.花生主要农艺性状的遗传变异及相关性和主成分分析[J].辽宁农业科学,2013(3):11-14.
- [13] 陈雷,范小玉,李可,等.花生品系主要农艺性状的相关性及聚类分析[J].花生学报,2015,44(1):34-38.