

# 鸡枞菌分离及生长条件研究

李艳丽<sup>1</sup>, 邓百万<sup>1,2</sup>, 黄曼曼<sup>1</sup>, 解修超<sup>1,2</sup>, 彭浩<sup>1,2</sup>

(1. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723000)

**摘要:**为解决鸡枞菌分离较难的问题,对采自秦岭地区的一株野生鸡枞菌,采用组织分离法对本菌株进行分离纯化,通过平皿观察法和 ITS 序列分析确定其菌属,以菌丝生长速率为指标、探索其最优生长碳源、氮源、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度、 $\text{MgSO}_4$  浓度、温度及酸碱度等培养条件。结果表明:经形态特征及 ITS 序列分析确定此菌株为鸡枞菌,该菌营养菌丝生长最适碳源是玉米粉;最适氮源是硝酸铵;鸡枞菌生长较快的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度在 0.10%~0.20% 时,最适浓度是 0.15%; $\text{MgSO}_4$  浓度在 0.025%~0.075% 时,最适浓度是 0.050%;生长温度范围在 25~27℃ 时,最适温度是 26℃;pH 范围 5.0~6.0,最适 pH 是 5.0。

**关键词:**鸡枞菌;分离;鉴定;生长条件

中图分类号:S646.1<sup>+</sup>9 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2017)10-0087-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.10.0087

鸡枞菌(*Termitomyces albuminosus* (Berk.) Heim)隶属于担子菌门(basidiomycetes)、伞菌亚纲(Agaricomycetidae)、伞菌目(Agaricales)、离褶伞科(Lyophyllaceae)、蚁巢伞属(*Termitomyces*)<sup>[1]</sup>,又名伞把菇、三大菇、鸡宗、鸡丝菇、白蚁菇、三坛菌、蚁纵等<sup>[2]</sup>,是一类十分珍稀的食药两用大型真菌。鸡枞菌主要分布于非洲南部、南亚及亚热带地区,我国现已知鸡枞菌属有 24 个种,主要分布于云南、四川、贵州等地,其中分布在云南 20 种,四川 9 种,贵州 8 种,广东 4 种,其它省区仅 1~2 种<sup>[3-4]</sup>。鸡枞菌不仅具有肉质肥厚、质细丝白、脆嫩爽口、清香鲜美、营养丰富等特性<sup>[5]</sup>,而且具有清神、增强人体免疫、治痔、预防肠癌、养血、润燥、健脾胃等功效<sup>[6-7]</sup>。已有研究表明,张玉金等已实现鸡枞菌的驯化栽培,但至今还没有人工栽培成功并批量生产的报道,可以看出鸡枞菌人工栽培尚且存在一定的难度<sup>[8]</sup>。诸多学者对鸡枞菌的研究主要致力于探索鸡枞菌与白蚁之间的关系、鸡枞菌的分类及识别、鸡枞菌的分离纯化、鸡枞菌的液体深层发酵以及鸡枞菌富含的

营养物质等<sup>[9]</sup>。其中胡尚勤<sup>[2]</sup>对重庆师范大学收藏的一株鸡枞菌生长条件进行了研究,曾先富<sup>[5]</sup>等对四川雷波、仁寿和井研地区的几株鸡枞菌生长条件进行了研究,但关于秦岭地区鸡枞菌生长培养条件鲜见报道。本研究通过组织分离法从秦岭地区一株野生鸡枞菌中分离得到菌丝,通过平皿观察法进行初步鉴定,结合 ITS 测序比对结果,分析野生鸡枞菌的菌属,同时对其生长条件进行研究,以期能够为秦岭地区鸡枞菌的人工栽培提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 采自于陕西秦岭地区,进行野外真菌调查过程中采集一株形态与鸡枞菌相似的子实体。

1.1.2 主要培养基及其配置 PDA 培养基:20%马铃薯,2%葡萄糖,0.5%蛋白胨,0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.3%  $\text{MgSO}_4$ ,0.007 5%  $\text{VB}_1$ ,1.8%琼脂,pH 自然,用于鸡枞菌菌种斜面培养。基础培养基:20%马铃薯,2%葡萄糖,0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.05%  $\text{MgSO}_4$ ,0.02% NaCl,0.02%  $\text{MnSO}_4$ ,0.015%维生素  $\text{B}_6$ ,0.21%蛋白胨,pH 自然<sup>[10]</sup>。

1.1.3 主要仪器与设备 LS-B50L 型高压蒸汽灭菌锅(上海医用核子仪器厂),LRH-800-GS 人工气候箱(韶关市明天环保仪器有限公司),Centrifuge 5424R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),Mycycler PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公

收稿日期:2017-08-29  
基金项目:2016 年科技厅科技创新工程资助项目(2016HB-GC-07)  
第一作者简介:李艳丽(1990-),女,陕西省韩城市人,在读硕士,从事微生物资源保育及开发利用研究。E-mail:1446727949@qq.com。  
通讯作者:邓百万(1963-),男,陕西省眉县人,博士,教授,从事微生物资源保育与开发利用研究。E-mail:2210309868@qq.com。

司),GelDoc 凝胶扫描成像系统(美国 Bio—Rad 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 鸡枞菌分离与鉴定 共分3个步骤。

(1)分离与纯化:去除基部杂质,用清水洗净表面,然后用75%乙醇溶液进行表面消毒,再用灭过菌的小刀将子实体从中剖开,在菌盖与菌柄相交处的剖面取一黄豆大小组织块,移接在试管PDA培养基斜面中央。将接入组织块的试管置于23℃以下室内避光培养,直至有白色的菌丝长出,挑取少许菌丝体在PDA培养基上进行纯化,待菌丝长满斜面后转入4℃冰箱保藏备用。

(2)菌株形态学鉴定:将纯化好的菌株接种于基础培养基中,23℃培养,设3组平行样,观察记录菌株菌落形态、菌丝色泽、菌丝密度等特征。用棉兰染色,进行显微镜观察。根据以上的形态特征和培养特征对分离纯化的菌株进行初步鉴定。

(3)ITS序列分析:采用CTAB法提取菌丝体基因组总DNA,用真菌通用引物ITS1、ITS4进行扩增。PCR反应体系(50 μL),2×Taq Master Mix 25 μL,上下引物(10 μM)各3 μL,模板DNA 5 μL,dd H<sub>2</sub>O 14 μL。PCR反应程序,95℃预变性4 min,94℃变性1 min,57℃退火45 s,72℃延伸1 min,共33个循环;72℃延伸10 min,4℃保藏。将PCR产物送往上海生工测序,并将测序结果提交NCBI进行比对,申请登录号。

### 1.2.2 生长特性研究 分4步试验完成。

(1)营养条件:挑取纯化好的鸡枞菌菌丝块接

种到分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米粉、乳糖、乙醇为碳源的基础培养基和分别以牛肉粉、蛋白胨、豆粉、酸水解酪蛋白、尿素、硝酸铵、酵母浸出膏为氮源的基础培养基上,每组设3个平行,在23℃、pH自然的条件下培养,每天定时观察记录菌丝的生长情况及生长速率。

(2)无机盐最适浓度:挑取纯化好的鸡枞菌菌丝块接种到浓度分别为0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>基础培养基和浓度分别为0.025%、0.050%、0.075%、0.100%、0.125%、0.150%的MgSO<sub>4</sub>基础培养基上,每组设3个平行,在23℃、pH自然的条件下培养,观察鸡枞菌长势。

(3)培养环境条件:挑取纯化好的鸡枞菌菌丝块接种到平板培养基上,分别在22、23、24、25、26、27、28℃、pH自然条件下和23℃、pH分别为4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5梯度培养基平板上培养,每组设3个平行。

(4)菌丝生长速率:鸡枞菌菌丝生长速率(mm·d<sup>-1</sup>)=纯生长量/天数<sup>[11-13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离与鉴定

2.1.1 菌株的分离 从一株野生菌株中分离得到菌丝,经多次纯化,最终获得纯种菌株。

2.1.2 菌株的鉴定 (1)形态学鉴定:将分离所得的野生鸡枞菌株纯化后,挑取菌落,23℃培养30 d天后观察菌落形态和显微镜下菌丝形态,结果见图1。

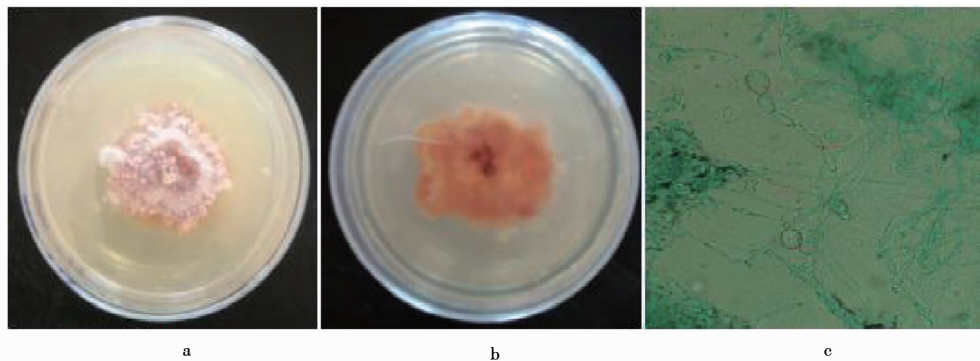


图1 菌株菌落形态及菌丝形态特征

Fig.1 Colony morphology and mycelial morphological characteristics of strain

由图1a可见菌落具有规则的圆形环状轮纹,表面干燥,呈微黄色,菌丝表面呈粉状或丝状,菌丝较致密,菌丝量较少且紧贴培养基;由图1b可

见菌落背面呈土黄色。从图1c可见在40×显微镜下观察扭结的菌丝,发现菌丝透明无色且分支较少,具有横隔膜,未见锁状联合,菌丝体的直径

为 2.35~8.53 μm,内含物丰富,菌丝前端形成球状胞和分生孢子,分生孢子由菌丝缢缩断裂形成。依据形态特征,结合文献<sup>[1,14-15]</sup>可初步确定为鸡枞菌。

(2)ITS 序列分析:菌株的基因组 DNA 经 ITS-PCR 扩增,利用 1%琼脂糖凝胶(TBE 缓冲液)电泳进行检测,由图 2 可知,PCR 产物获得单一条带,序列片段长度大小为 500~750 bp。将序列进行 Blast 比对,结果显示该菌株(登录号:MF995630)与鸡枞菌属(*Termitomyces* sp. YO198)相似度达 99%,建立系统发育树,如图 3 所示。结合该菌株形态学特征,可鉴定为鸡枞菌(*Termitomyces albuminosus*)。

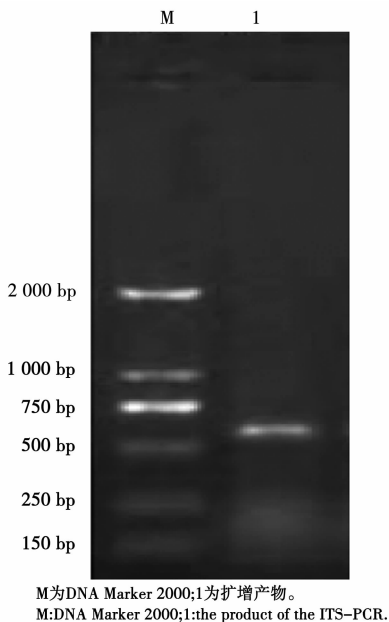


图 2 ITS-PCR 扩增产物电泳图  
Fig. 2 Electrophoresis of ITS-PCR amplification products

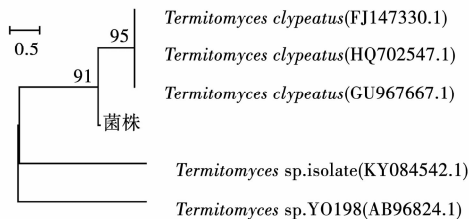


图 3 基于 ITS 序列构建的系统发育树  
Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS sequences

## 2.2 菌丝生长条件研究

2.2.1 鸡枞菌固体培养基碳源的筛选 由图 4 可知,鸡枞菌菌株可以利用不同种类的碳源,且不同类型的碳源对菌丝生长的影响较大。当以玉米

粉为碳源时,菌丝生长得到最大值 1.32 mm·d<sup>-1</sup>,其次是蔗糖和麦芽糖。由于玉米粉除了含有基础碳源外,还含有丰富的生长因子及其它的营养成分,因此以玉米粉为碳源时菌丝生长值最大,所以选用玉米粉作为鸡枞菌固体培养基碳源。

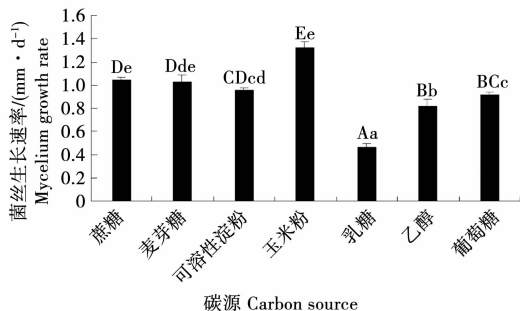


图 4 不同碳源对菌丝生长速率的影响  
Fig. 4 Effect of different carbon source on the mycelium growth rate

2.2.2 鸡枞菌固体培养基氮源的筛选 从图 5 可知,鸡枞菌菌株可以利用不同种类的氮源,且不同类型的氮源对菌丝生长的影响较大。菌丝生长速率较快的 3 种氮源分别为酸水解酪蛋白、硝酸铵和酵母浸出膏,当酸水解酪蛋白为氮源时,菌丝生长速率为 1.10 mm·d<sup>-1</sup>;当硝酸铵为氮源时,菌丝生长速率为 1.05 mm·d<sup>-1</sup>;当酵母浸出膏为氮源时,菌丝生长速率为 1.19 mm·d<sup>-1</sup>。由于酸水解酪蛋白和酵母浸出膏高昂的价格,综合考虑试验可行性以及经济条件,选取硝酸铵为氮源。

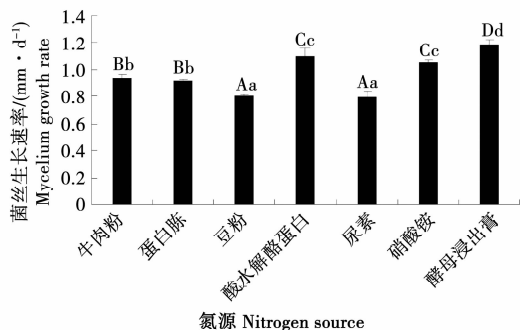


图 5 不同氮源对菌丝生长速率的影响  
Fig. 5 Effect of different nitrogen source on the mycelium growth rate

2.2.3 鸡枞菌固体培养基 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度的筛选 由图 6 可知,鸡枞菌菌株可以利用不同浓度 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,且不同浓度 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>对菌丝生长的影响较大。培养基添加 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度在 0.10%~0.20%鸡枞菌均能良好生长,但在 0.10%以下和 0.20%以上生长非常缓慢。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>浓度在

0.05%时,菌丝生长速率达到 $0.83\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度在0.25%,菌丝生长速率达到 $0.82\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ 。 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度在0.05%~0.15%时,菌丝的生长速度随着 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度的升高逐步加快, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度在0.15%时生长速度最快,菌丝的长势也较好;浓度升至0.20%时,菌丝生长速度降低。因此,鸡枞菌丝最适的生长浓度为0.10%~0.20%。

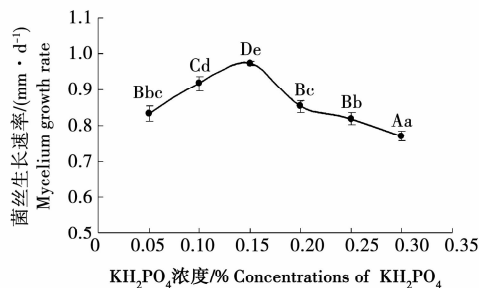


图6 不同浓度 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 对菌丝生长速率的影响

Fig. 6 Effect of different  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentrations on the mycelium growth rate

#### 2.2.4 鸡枞菌固体培养基 $\text{MgSO}_4$ 浓度的筛选

由图7可知,固体培养基 $\text{MgSO}_4$ 浓度在0.025%~0.075%时鸡枞菌均有良好生长,但在0.075%以上生长非常缓慢。 $\text{MgSO}_4$ 浓度在0.100%时,菌丝生长速率达到 $0.78\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4$ 浓度在0.125%时,菌丝生长速率达到 $0.76\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ 。 $\text{MgSO}_4$ 浓度在0.025%~0.050%时,菌丝的生长速度随着 $\text{MgSO}_4$ 浓度的升高逐步加快, $\text{MgSO}_4$ 浓度在0.050%时生长速度最快,菌丝的长势最好,菌丝粗壮、浓白、致密;浓度升至0.075%时,菌丝生长速度降低。因此,鸡枞菌丝最适的生长浓度为0.025%~0.075%。

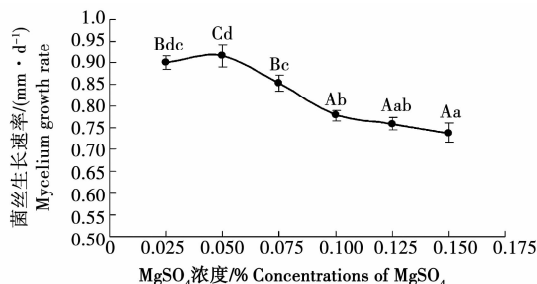


图7 不同浓度 $\text{MgSO}_4$ 对菌丝生长速率的影响

Fig. 7 Effect of different  $\text{MgSO}_4$  concentrations on the mycelium growth rate

2.2.5 鸡枞菌固体培养温度的筛选 由图8可知,不同温度对菌丝生长速率的影响不明显,菌丝

生长速率随着温度的增加而基本趋于稳定,当温度为 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,菌丝生长达到最大值 $1.11\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ,其次是 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。因此,鸡枞菌菌丝最适温度为 $25\sim 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

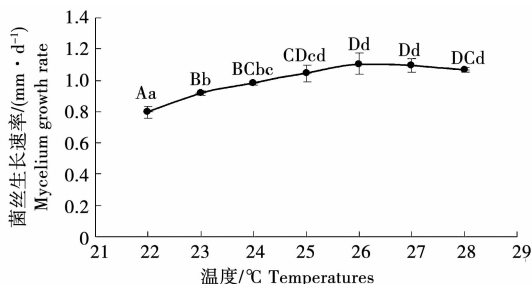


图8 不同温度对菌丝生长速率的影响

Fig. 8 Effect of different temperature on the mycelium growth rate

2.2.6 鸡枞菌固体培养pH的筛选 由图9可知,鸡枞菌菌丝在不同酸碱度培养基上均能生长,不同酸碱度的培养基对菌丝生长的影响比较显著,其影响程度为: $\text{pH}5.0 > \text{pH}5.5 > \text{pH}6.0 > \text{pH}4.5, \text{pH}6.5 > \text{pH}7.0 > \text{pH}7.5 > \text{pH}8.0$ ,其中在pH为5.0的培养基上,菌丝生长速率达到最大值( $1.13\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )、长势最好,其次是pH5.5和pH6.0的培养基;在pH为8.0的培养基上,菌丝生长速率最慢( $0.74\text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )。因此,鸡枞菌菌丝最适pH为5.0~6.0。

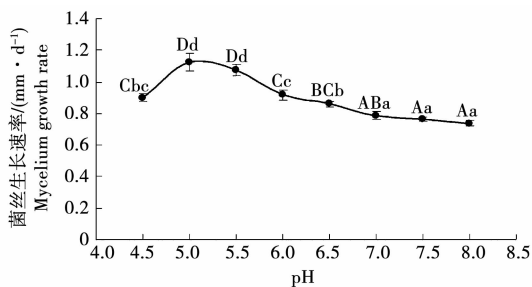


图9 不同pH对菌丝生长速率的影响

Fig. 9 Effect of different pH on the mycelium growth rate

### 3 结论

从采集菌株中分离出一株野生鸡枞菌,结合形态学和ITS rDNA分子生物学手段将其鉴定为鸡枞菌属。通过不同温度、酸碱度、碳源、氮源、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度以及 $\text{MgSO}_4$ 浓度对鸡枞菌进行培养,并对该菌株菌丝生长进行测量,发现鸡枞菌菌丝在各培养基上生长速度差异显著,说明温度、酸碱度和碳源、氮源、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度及 $\text{MgSO}_4$ 浓度对菌丝的生长均具有一定影响。鸡枞菌菌丝最适

合的碳源是玉米粉,其菌丝生长速率是  $1.32 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ;最适合的氮源是硝酸铵,其菌丝生长速率是  $1.05 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ;最适的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度是  $0.10\% \sim 0.20\%$ ,其菌丝生长速率是  $0.85 \sim 0.92 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ;最适的  $\text{MgSO}_4$  浓度是  $0.025\% \sim 0.075\%$ ,其菌丝生长速率是  $0.85 \sim 0.90 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。最适生长温度为  $25 \sim 27^\circ\text{C}$ ,菌丝生长速率为  $1.04 \sim 1.11 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。最适生长 pH 为  $5.0 \sim 6.0$ ,菌丝生长速率为  $0.92 \sim 1.13 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。此外,试验还表现出不同培养基在鸡枞菌菌丝的不同生长阶段,其影响速度也不一样,这说明菌丝生长的全部过程并不是匀速的,可能是变量生长曲线。鸡枞菌是一种研究不够广泛的珍稀食用菌,目前人工栽培还存在问题,试验主要对秦岭地区鸡枞菌的生物学特性进行了研究,为秦岭地区鸡枞菌的人工栽培提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 赵昱. 云南 6 种鸡枞菌子实体与菌丝体呈味物质及液体培养的研究[D]. 昆明:云南大学,2015.
- [2] 胡尚勤,刘天贵,李贤柏. 鸡枞菌的培养条件研究[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(1):67-70.
- [3] 才晓玲,于龙凤,何伟. 鸡枞菌种质资源研究进展[J]. 大理学院学报,2010,9(10):61-64.

- [4] 覃俊达. 鸡枞菌种质资源的研究[J]. 山西农经,2017(4):50-52.
- [5] 曾先富,陈阳婷,熊维全,等. 鸡枞菌菌丝体培养试验[J]. 食用菌,2012,34(6):9-18.
- [6] 施渺筱,何映霞,龙菊,等. 鸡枞菌的生物学特性及药效研究[J]. 心理医生,2010(6):92-93.
- [7] Splivallo R, Ottonello S, Mello A, et al. Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis[J]. New Phytologist, 2011, 189(3):688-699.
- [8] 张玉金,郭华春. 鸡枞的驯化栽培现状[J]. 微生物学报,2010,50(10):1288-1292.
- [9] 付前发,王晓东,王菊琼,等. 黑鸡枞菌的分离纯化及固液体培养特性研究[J]. 食用菌,2013,35(4):18-19.
- [10] 熊亚,李敏杰. 鸡枞菌菌丝体基础培养基的优化[J]. 食品与机械,2013(4):185-189.
- [11] 陆建明,张锡凤. 食用菌液体菌种制备的研究进展[J]. 中国食用菌,2003,22(6):15-17.
- [12] 罗海凌,林兴生,林辉,等. 不同 pH 的菌草培养基对 4 种真菌菌丝生长的影响[J]. 广西科学院学报,2007,23(3):166-167.
- [13] 魏晓梅,胡尚勤,韦伟,等. 鸡枞菌菌丝体在不同条件下蛋白质合成量的分析[J]. 食品科技,2007,32(8):74-77.
- [14] 聂晓东. 鸡枞菌丝体及其皂甙的深层发酵条件的优化[D]. 无锡:江南大学,2009.
- [15] 龙正海,曾大兴. 鸡枞菌培养特性的初步研究[J]. 食品与生物技术,2007,26(3):90-93.

## Isolation and Growth Conditions of *Termitomyces albuminosus*

LI Yan-li<sup>1</sup>, DENG Bai-wan<sup>1,2</sup>, HUANG Man-man<sup>1</sup>, XIE Xiu-chao<sup>1,2</sup>, PENG Hao<sup>1,2</sup>,

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong, Shaanxi 723001)

**Abstract:** To solve the difficult problem of separating *Termitomyces albuminosus*, the isolation, identification and growth characteristics of Qinling Mountains area from a wild *Termitomyces albuminosus* were studied, tissue isolation method was used to isolate and purify the strains, its genus was determined by plate observation and ITS sequence analysis, the optimum growth carbon source, nitrogen source,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentration,  $\text{MgSO}_4$  concentration, temperature and pH were investigated with the growth rate of mycelium as index. The results showed that according to the morphological characteristics and ITS sequence analysis to determine the strain of *Termitomyces albuminosus*, the optimum carbon source for the growth of mycelia was corn flour; the optimum nitrogen source was ammonium nitrate; the concentration of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was  $0.10\% \sim 0.20\%$ , the optimum concentration was  $0.15\%$ ; the concentration of  $\text{MgSO}_4$  was  $0.025\% \sim 0.075\%$ , the optimum concentration was  $0.050\%$ ; the growth temperature range was  $25 \sim 27^\circ\text{C}$ , the optimum temperature was  $26^\circ\text{C}$ ; the growth pH range was  $5.0 \sim 6.0$ , the optimum pH was  $5.0$ .

**Keywords:** *Termitomyces albuminosus*; isolation; identification; growth conditions