

2 株野生侧耳的驯化栽培及营养成分分析 *

赵书雪¹, 刘苗苗², 吉建成¹, 卢思雨¹, 徐丽丽^{1**}

(1. 青岛农业大学 山东省应用真菌重点实验室, 山东 青岛 266109; 2. 青岛市农产品质量安全中心, 山东 青岛 266109)

摘要: 对野外采集得到的野生菌株 5271、1710 的子实体进行组织分离, 经 ITS 鉴定 5271 菌株为侧耳属的肺形侧耳 (*Pleurotus pulmonarius*)、1710 菌株为侧耳属的紫孢侧耳 (*Pleurotus sapidu*)。菌株 5271、1710 菌丝最适生长温度分别为 26℃、30℃, 最适生长 pH 均为 7.0, 通过栽培试验发现该 2 株菌株都具有优良的栽培性状, 其菌丝在菌包中生长速度较快、形成原基时间短、出菇期间转潮快、出菇持续时间长。对 2 株菌株子实体中粗蛋白、粗多糖、微量元素、VC、VE 及氨基酸含量进行测定, 综合分析发现 1710 子实体营养价值更高。通过对野生侧耳属的驯化栽培及营养价值研究, 可为今后侧耳属野生资源开发利用、新种质资源的获取及遗传育种研究等提供理论依据。

关键词: 野生侧耳; 生物学特性; 分离鉴定; 驯化栽培; 营养成分

中图分类号: S646.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-8310 (2020) 11-0035-06

Domestication and Nutritional Composition Analysis of Two Wild *Pleurotus* spp. Strains

ZHAO Shu-xue¹, LIU Miao-miao², JI Jian-cheng¹, LU Si-yu¹, XU Li-li¹

(1. Qingdao Agricultural University, Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Fungi, Qingdao 266109, China;

2. Qingdao Agricultural Product Quality and Safety Center, Qingdao 266109, China)

Abstract: The fruiting bodies of wild strains 5271 and 1710 collected in the field were isolated. According to its identification, 5271 was *Pleurotus pulmonarius* of *Pleurotus* and 1710 was *P. sapidu* of *Pleurotus*. It was found that the optimal growth temperature of 5271 and 1710 mycelium was 26℃ and 30℃, respectively, and the optimal growth pH was 7.0. Through the cultivation experiment, it was found that the two strains had excellent cultivation characteristics, the growth speed of mycelium in the fungus bag was faster, the forming time of the original base was short, the tide turned fast during the emergence period, and the duration of the emergence was long. The content of crude protein, crude polysaccharide, trace elements, VC, VE and amino acids in the fruiting bodies of the two strains were determined. Through the study of domestication, cultivation and nutritional value of *Pleurotus*, we can provide theoretical basis for the development and utilization of wild resources, the acquisition of new germplasm resources and the study of genetic breeding.

Key words: wild *Pleurotus* spp.; biological characteristics; isolation and identification; domestication and cultivation; nutritional components

侧耳属 (*Pleurotus*) 食用菌隶属于担子菌门 (Basidiomycota) 伞菌纲 (Agaricomycete) 伞菌目 (Agaricales) 侧耳科 (Pleurotaceae)^[1]。据报道, 我国目前有 36 种侧耳属真菌, 均有较高的蛋白含量、丰富的氨基酸组成^[2], 具有较高的营养价值。侧耳因其栽培方法简便, 投资小, 见效快, 效益高等优点而被广泛栽培^[3]。

随着食用菌驯化栽培技术的不断发展, 人们对野生食用菌资源的开发和利用有了新的认识, 侧耳属多糖、蛋白具有增强免疫力, 抗癌等功效^[4]。通过对野生侧耳进行驯化栽培研究, 不断探索野生菌株生长的环境条件, 制定出适合野生菌株栽培的方案; 不断优化野生驯化菌株栽培条件, 改变其部分特性, 逐渐成为适合本地栽培的人工栽培品种; 并测定其

* 基金项目: 2018 年国家重点研发计划资助项目 (2018YFD0400200); 2019 年山东省现代农业产业技术体系食用菌创新团队项目 (SDAIT-11-011-02)。

作者简介: 赵书雪 (1991-), 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向为微生物学。E-mail: 1093516668@qq.com

** 通信作者: 徐丽丽 (1979-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事微生物学方面研究。E-mail: Ellyxu@163.com

收稿日期: 2020-10-23

子实体的营养成分,筛选出最适栽培方法,指导生产实践。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

侧耳属菌株 5271,由云南农科院苏开美老师于昆明境内采集并赠送;侧耳属菌株 1710,采自山东潍坊境内的野生菌株经组织分离纯化得到。

1.1.2 供试培养基配方及制备

棉籽壳 45%、木屑 30%、玉米粉 30%、麸皮 10%、石膏 3%,磷酸二氢钾 0.5%、尿素 0.5%,糖 1%^[5]。栽培种培养基制备料水比为 1:1~1:1.8,配制 30 kg 栽培料,每袋装约 750 g,121℃灭菌 2 h。

1.2 主要仪器

日立 8900 高速氨基酸分析仪:沈阳奇特尔科技有限公司;XSP-9CA 显微镜:上海光学仪器一厂;MR23i 离心机:法国捷安公司;DRP-9082 恒温培养箱:上海森信实验仪器有限公司;spectro art200 分光光度计:美国威泰克公司;EP214C 电子天平:奥豪斯国际贸易有限公司(上海等)。

1.3 菌种鉴定方法

1.3.1 菌丝性状观察

野生菌株采用组织分离法接种于 PDA 固体培养基上,将灭过菌的载玻片斜插到菌块 2 cm 处,置 26℃恒温培养箱中暗光连续培养^[6]。待菌丝长至载玻片上,取载玻片于显微镜下观察其菌丝结构及有无锁状联合。

1.3.2 菌丝体 DNA 提取及 ITS 验证

采用 Ezup 柱式真菌 DNA 抽提试剂盒提取 DNA,采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增^[7],得到的 PCR 产物送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

1.4 侧耳菌株 5271、1710 菌丝最适生长条件及栽培条件的优化

1.4.1 菌丝最适生长温度

取直径为 5 mm 的菌株菌饼接种于 PDA 固体培养基中央,分别于 18℃、22℃、26℃、30℃、34℃恒温培养箱避光倒置培养,每组设置 3 个重复,连续培养 5 d。采用十字交叉法每天定时测量菌落直径,计算不同温度培养条件下菌丝生长速率,菌丝生长

速率 (V , mm·d⁻¹) 计算公式为:

$$V = \Phi / d \quad (1)$$

式中: Φ 为菌落平均直径 (mm), d 为菌丝生长天数 d。

1.4.2 菌丝最适生长 pH

将 pH 设置为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,共 5 个梯度,每组设置 3 个重复,分别倒置于最适温度恒温培养箱避光培养,测定及接种方法同 1.4.1。

1.4.3 子实体最适栽培培养基筛选

按照 1.1.2 栽培培养基配方,分别培养菌株 5271、1710,观察其子实体栽培性状(主要是结实性),并进行子实体出菇试验,探索是否可以应用于实践,指导实际生产。

1.5 子实体营养成分分析

1.5.1 子实体含水量测定

将新鲜子实体称重后放入烘箱中,40℃~60℃烘干 4 h~5 h,再升温至 60℃~70℃,烘干直至恒重,记录数据。

1.5.2 子实体中氨基酸含量分析

利用日立 8900 高速氨基酸分析仪,参考 GB 5009.124-2016 食品安全国家标准食品中氨基酸的测定测定子实体中氨基酸的含量。

1.5.3 子实体中粗多糖含量测定

按照水提醇沉法^[8]提取子实体多糖;按苯酚-硫酸法^[9]测定多糖含量,按照 NYT 1676-2008 食用菌中粗多糖含量的测定标准绘制葡萄糖标准曲线,后根据标准曲线计算多糖含量。粗多糖提取液中的多糖提取率 (T ,%) 的计算公式为:

$$T = C \times D \times V \times 0.9 \div \omega \times 100\% \quad (2)$$

式中: C 为测定浓度 (ng·mL⁻¹); D 为稀释倍数; V 为提取液体积 (mL); ω 为称取子实体粉末质量 g;0.9 为还原糖换算成多糖的系数^[9]。

1.5.4 子实体中粗蛋白含量测定

子实体粗蛋白含量测定采用蛋白定量测试盒^[10]测定,计算子实体中粗蛋白含量。

1.5.5 子实体中其他常规营养成分含量测定

参考 GB 5009.90-2016 食品中铁的测定测定子实体铁含量;GB 5009.92-2016 食品中钙的测定测定子实体中钙的含量;GB 5009.86-2016 食品中抗坏血酸的测定测定子实体 VC 含量;GB 1886.233-2016 食品添加剂维生素 E 测定子实体 VE 含量。

2 结果与分析

2.1 野生菌株菌丝培养观察及 ITS 鉴定

2.1.1 菌丝生长形态

将野生菌株 5271、1710 菌饼转接至 PDA 培养基培养 5 d 后,菌丝生长情况如图 1、图 2 所示。

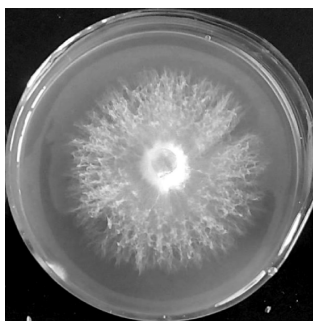


图 1 野生菌株 5271 菌丝生长形态

Fig.1 Growth morphology of wild strain 5271

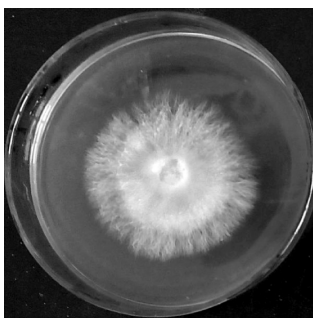


图 2 野生菌株 1710 菌丝生长形态

Fig.2 Growth morphology of wild strain 1710

由图 1、图 2 可知,野生菌株 5271 气生菌丝生长较发达,呈绒毛状,菌丝尖端较为粗壮,颜色较

白,边缘生长整齐。野生菌株 1710 菌落呈绒毛状,圆形,菌丝洁白,菌落正反颜色无差异,菌落边缘较整齐,浓密。

2.1.2 野生菌株 ITS 鉴定

2 株野生菌株 ITS 序列扩增电泳图见图 3。

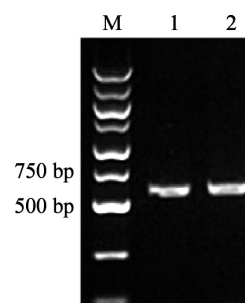


图 3 2 株野生菌株 ITS 序列扩增电泳图

Fig.3 ITS sequence amplification electrophoresis of two wild strains

注：M：marker，1：野生菌株 5271 的 ITS 序列，2：野生菌株 1710 的 ITS 序列。

Note: M: marker, 1: ITS sequence of wild strain 5271, 2: ITS sequence of wild strain 1710.

由图 3 可知,野生菌株 5271、1710 通过 ITS1 和 ITS4 引物扩增后的碱基数约为 700 bp。通过测序比对发现,菌株 5271 与肺形侧耳 *Pleurotus pulmonarius* 有 99% 的相似性,菌株 1710 与紫孢侧耳 *Pleurotus sapidus* 有 99% 的相似性。

2.2 培养条件筛选结果

2.2.1 温度对 2 株菌丝生长的影响

菌株在不同温度梯度培养 5 d,各菌株菌丝生长情况见图 4,菌丝生长速率见图 5。

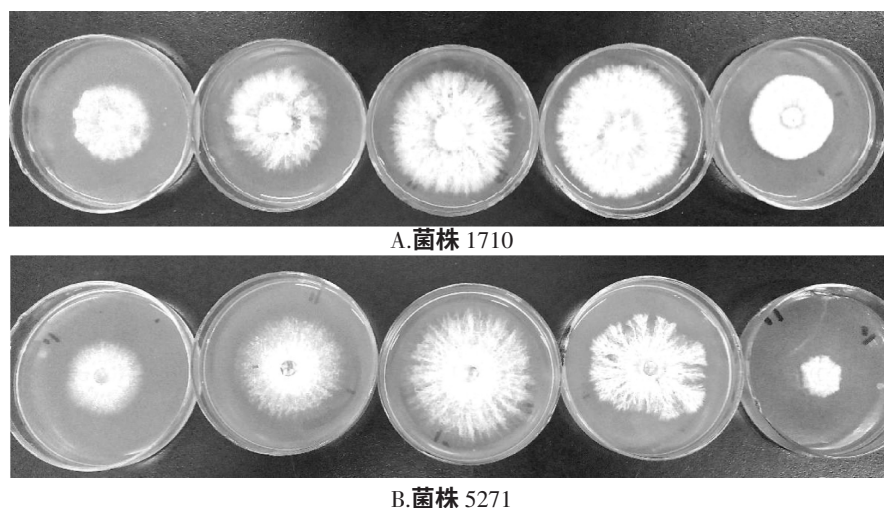


图 4 2 株菌株在不同温度下菌丝生长情况

Fig.4 Mycelial growth of two strains at different temperatures

注：A 代表菌株 1710 生长状况, B 代表菌株 5271 生长状况,培养基从左到右分别为 18℃、22℃、26℃、30℃、34℃菌丝生长情况。

Note: A represents the growth status of strain 1710, and B represents the growth status of strain 5271, medium from left to right represents mycelial growth at 18℃, 22℃, 26℃, 30℃ and 34℃, respectively.

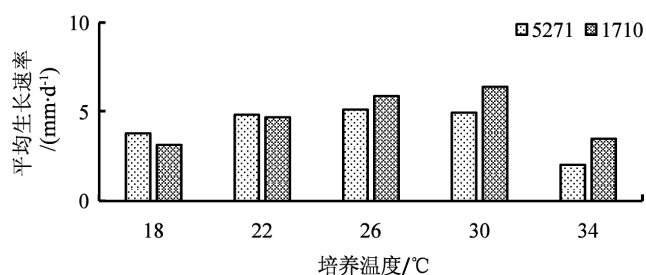


图 5 2 株菌株在不同温度下菌丝平均生长速率

Fig.5 Average growth rate of mycelial of two strains at different temperatures

由图 5 可知, 菌株 5271 在 26℃ 时, 菌丝生长速率最快, 菌丝稠密、洁白, 菌丝边缘生长整齐,

在其他温度时菌丝生长速率较慢。菌株 1710 在 30℃ 时, 菌丝生长速率最快, 菌丝洁白、稠密, 菌丝边缘生长整齐, 在 34℃ 时, 2 菌株菌丝仍可生长, 菌株 1710 菌丝生长速率比 5271 快, 耐受温度高。综上所述, 在试验温度梯度中, 最适 5271 菌丝生长温度为 26℃, 1710 菌丝生长最适温度为 30℃。

2.2.2 pH 对 2 株菌丝生长的影响

2 株菌株在不同培养基 pH 且置于最适生长温度下培养 5 d, 菌丝生长情况见图 6, 菌丝平均生长速率统计见图 7。

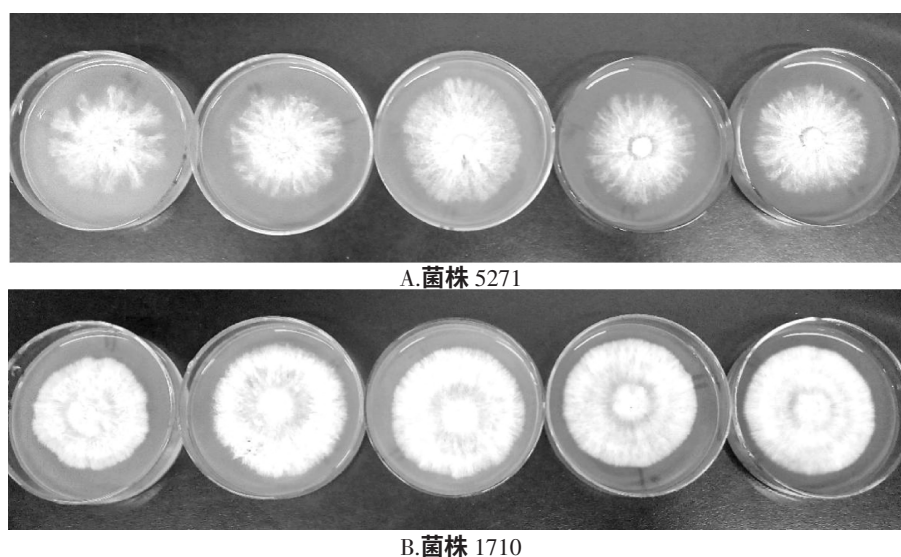


图 6 2 株菌株在不同 pH 下菌丝生长情况

Fig.6 Mycelial growth of two strains at different pH

注: A 代表菌株 5271 生长状况, B 代表菌株 1710 生长状况, 培养基从左至右 pH 分别为 5、6、7、8、9 菌丝生长情况。

Note: A represents the growth status of strain 5271, B represents the growth status of strain 1710, and medium from left to right represents the mycelial growth status under pH 5, 6, 7, 8 and 9, respectively.

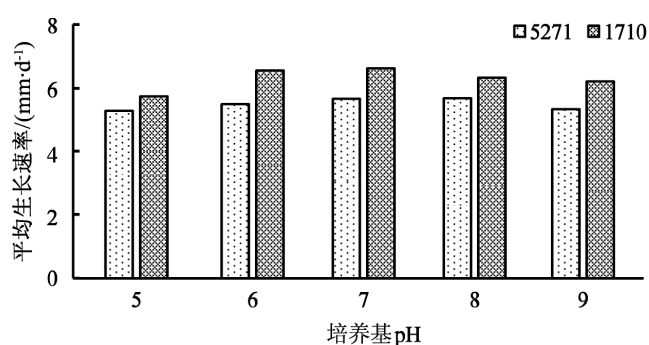


图 7 2 株菌株在不同 pH 下菌丝平均生长速率

Fig.7 Average growth rate of mycelial of two strains at different pH

由图 6、图 7 可知, 2 株菌株在 pH 为 7 条件下长势均较好, 在 pH5~9 均能生长; 菌株 5271 菌丝

边缘整齐、菌丝较白; 菌株 1710 菌丝洁白、边缘整齐、稠密。可见 pH 对菌丝生长速率影响较小, 菌株 1710 菌丝长势优于 5271 生长情况。综上, 2 株菌株生长的最适 pH 为 7。

2.3 2 株野生菌株出菇试验结果

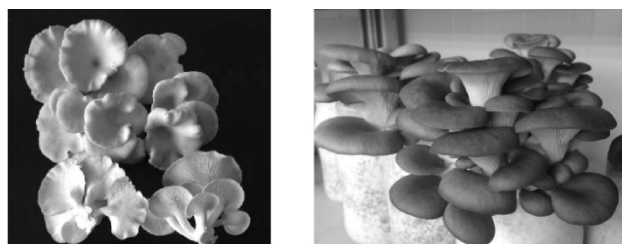
2.3.1 野生菌株栽培培养基筛选结果

对结实性的考察主要是考察原基形成所需时间。菌株 5271 原基形成时间 20 d, 1710 原基形成时间 17 d, 2 株菌株从原基形成到采收第一茬需要约 5 d。子实体出菇条件为温度 15℃~17℃、湿度 85%, 光照强度为 600 lx^[11], 2 株菌菌丝在菌包中生长速度较快、形成原基时间短、出菇期间转潮快、

出菇持续时间长, 此时菌株 5271、1710 生物学效率分别达 100.03%、105.97%。

2.3.2 菌株子实体特征

2 株野生菌株人工培养出菇结果见 8。



A.菌株 5271

B.菌株 1710

图 8 2 株野生菌株人工培养出菇结果图

Fig.8 The results of artificial culture of two wild strains

如图 8A 所示, 菌株 5271 菌盖形状呈扁半球形至平展, 倒卵形至肾形或近扇形, 大小 5 cm~13 cm, 颜色为白色、灰白色至灰黄色, 表面光滑, 菌肉白色, 靠近基部稍厚; 菌褶白色, 延生, 稍密, 不等长; 菌柄很短或没有, 白色有绒毛, 后期近光滑, 内部实心至松软。从图 8B 看出菌株 1710 子实体菌盖呈黑褐色, 与菌株 5271 颜色完全不同, 呈半球形, 靠近基部稍厚, 菌褶白色, 延生; 菌柄较长。

2.3.3 菌株孢子印及孢子形态观察

菌株 5271 野生菌株孢子印及孢子形状见图 9, 菌株 1710 野生菌株孢子印及孢子形状见图 10。

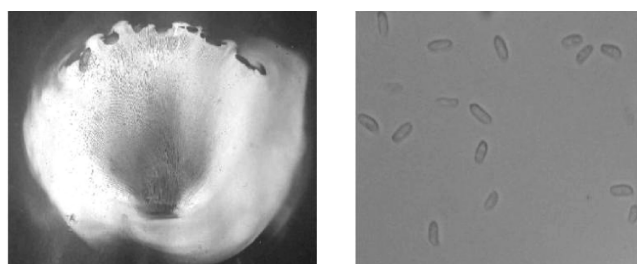


图 9 5271 野生菌株孢子印与孢子观察

Fig.9 Spore print and spore observation of 5271 wild strain

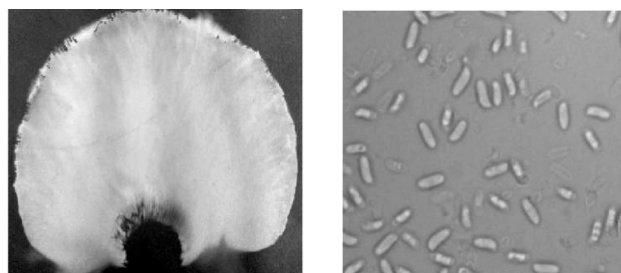


图 10 1710 野生菌株孢子印与孢子观察

Fig.10 Spore print and spore observation of 1710 wild strain

由图 9、图 10 所示, 菌株 5271 孢子印呈扁半球形, 白色; 孢子浅绿色, 呈近梭形。菌株 1710 孢子印呈近圆形, 颜色为白色; 孢子淡黄色, 呈近梭形。

2.4 子实体营养成分分析结果

2 株子实体中营养成分含量见表 1。

表 1 2 株子实体中营养成分含量

Tab.1 Content of nutrients in two fruiting bodies

常规营养成分	菌株 5271	菌株 1710
粗多糖/ ($\text{g} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$)	12.47	19.42
粗蛋白质/ ($\text{g} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$)	13.14	15.40
Fe/ ($\text{mg} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$)	40.60	173.78
Ca/ ($\text{mg} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$)	40.40	47.47
VC/ ($\text{mg} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$)	55.22	12.12
VE/ ($\text{mg} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$)	0.14	0.32

由表 1 可知, 2 株菌株营养成分含量存在差异, 其中, 菌株 5271、1710 子实体中粗多糖含量分别含有 $12.47 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$ 、 $19.42 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$, 均比文献^[12-13]报道高; 菌株 5271、1710 子实体中粗蛋白质含量分别为 $13.14 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$ 、 $15.40 \text{ g} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$ 。测定的微量元素 Fe、Ca 含量均较高, 菌株 1710 子实体中 Fe 含量高达 $173.78 \text{ mg} \cdot 100^{-1} \text{g}^{-1}$ 。菌株 1710 子实体中 VE 含量高于 5271 子实体中的含量, 两者相差 2.28 倍。而菌株 5271 子实体中 VC 含量是 1710 的 4.55 倍。根据综合分析, 1710 菌株有更高的营养价值。

2.5 菌株氨基酸含量分析结果

采用日立 L8900 型氨基酸自动分析仪测得了 2 株侧耳属菌株中 17 种氨基酸含量, 包括赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、组氨酸 8 种必需氨基酸 (EAA), 天门冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、酪氨酸、精氨酸、脯氨酸 9 种非必需氨基酸 (NEAA)^[14], 由于采用酸水解法使得色氨酸结构不稳定, 试验未测。与已报道的糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 子实体氨基酸含量为对比^[15], 2 株野生侧耳与糙皮侧耳中氨基酸含量见表 2。

由表 2 可知, 2 株菌株中 17 种氨基酸含量均不同, 其中, 2 株菌株中酪氨酸、苯丙氨酸含量相差较大, 约 1.3 倍左右。与糙皮侧耳子实体苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸等含量相差不大 (胱氨酸

表 2 2 株野生侧耳与糙皮侧耳中氨基酸含量比较

Tab.2 Comparison of amino acid contents between two wild *Pleurotus* spp. *pellucidum*

氨基酸种类	含量/(g·100 ⁻¹ g)		
	菌株 5271	菌株 1710	糙皮侧耳
天门冬氨酸	1.20	1.39	1.86
苏氨酸	0.84	0.80	0.78
丝氨酸	0.84	0.79	0.84
谷氨酸	2.23	2.21	2.40
甘氨酸	0.79	0.74	0.76
丙氨酸	1.11	1.00	0.93
胱氨酸	0.37	0.31	未检测
缬氨酸	0.86	0.76	0.42
蛋氨酸	0.70	0.55	1.30
异亮氨酸	0.73	0.67	0.60
亮氨酸	1.17	1.05	1.02
酪氨酸	0.90	0.68	0.55
苯丙氨酸	0.93	0.68	0.98
赖氨酸	1.13	0.99	0.98
组氨酸	0.59	0.52	0.39
精氨酸	1.09	0.90	1.01
脯氨酸	0.55	0.47	0.57
EAA	6.95	6.02	6.08
NEAA	9.08	8.49	9.31
氨基酸总和	16.03	14.51	15.39

未检测，缬氨酸、酪氨酸、组氨酸、蛋氨酸含量相差较大。菌株 5271 子实体中氨基酸总量、EAA、NEAA 氨基酸含量均高于 1710 子实体，与糙皮侧耳相差不大。

3 讨论

对野生菌种质资源的采集和鉴定是食用菌产业发展的一项基础性研究工作^[15]，通过驯化筛选可得到更多的工厂化栽培菌种。目前对野外采集真菌主要通过形态、ITS 等进行鉴定。通过对采集的野生菌种鉴定可知菌株 5271 为肺形侧耳，1710 菌株为侧耳属紫孢侧耳。研究了菌株 5271、1710 菌丝生长的最适条件；通过栽培条件筛选试验发现该 2 株菌株都具有优良的栽培性状。2 株菌种子实体中粗蛋白、粗多糖、微量元素、VC、VE 及氨基酸含量进行测定，综合分析，发现 1710 子实体营养价值

更高。试验对野生侧耳属真菌的驯化栽培研究可为今后侧耳属真菌野生资源开发利用，新种质资源的获取及遗传育种等提供理论依据。

参考文献：

- [1] 陈哲. 侧耳属 2 个野生菌株的鉴定及其栽培特性的研究[D]. 武汉：华中农业大学，2012.
- [2] 黄清铎，王庆福，张柳莲，等. 甘蔗渣栽培的不同颜色侧耳中的氨基酸组成与蛋白质营养评价[J]. 北方园艺，2011 (10)：127-133.
- [3] 张金霞，黄晨阳，陈强，等. 食用菌可栽培种类野生种质的评价[J]. 植物遗传资源学报，2010，11 (1)：127-131.
- [4] Sanmee R, Dell B, Lumyong P. Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand (Article)[J]. Food Chemistry, 2003, 82 (4)：527-532.
- [5] 晚安琪，简晓云，黄亮，等. 一株侧耳属野生菌的分离鉴定及初步驯化栽培[J]. 天津农学院学报，2020，27 (1)：28-30, 34.
- [6] 史秀娟，张平，刘振伟. 一株野生平菇的生物学特性测定[J]. 食用菌，2003 (5)：8-9.
- [7] 陈剑山，郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学，2007，35 (13)：3785-3786.
- [8] 刘奕辰. 水提醇沉提取银杏叶多糖工艺浸提温度的试验研究[J]. 山东畜牧兽医，2019，40 (1)：10-11.
- [9] 张松柏，陈磊，许文，等. 优化苯酚硫酸法测定金线莲中多糖含量[J]. 福建中医药，2019，50 (1)：58-60.
- [10] 聂昌宏，郑欣，阿依居来克·卡得尔，等. 考马斯亮蓝法检测不同乳中乳清蛋白含量[J]. 食品安全质量检测学报，2019，10 (1)：1138-1142.
- [11] 熊芳，朱坚，邓优锦，等. 红平菇 (*Pleurotus djamor*) 培育条件和栽培技术研究[J]. 江西农业大学学报，2011，33 (1)：1006-1011.
- [12] 王慧君，李国杰，赵瑞琳. 卵孢侧耳野生菌株人工栽培及营养成分分析[J]. 菌物学报，2018，37 (1)：606-616.
- [13] 施鹏飞，马丽艳，邓志峰，等. 林地遮阳网中 3 种侧耳属食用菌营养分析比较[J]. 食品研究与开发，2016，37 (13)：24-29.
- [14] 陈建超，葛志豪，徐丽丽，等. 野生宽鳞多孔菌蛋白质营养分析与评价[J]. 氨基酸和生物资源，2016，38 (1)：1-4.
- [15] 汪麟. 侧耳的氨基酸营养比较[J]. 食用菌，1986 (1)：32.
- [16] 胡晓强，李峰，赵建选，等. 1 株野生平菇菌株的采集及其驯化栽培[J]. 中国食用菌，2014，33 (1)：13-14, 16.