

肉质黑孢孔菌生物学特性、驯化栽培及急性毒性

顾丹丹², 史玲玉¹, 张金秀¹, 王美华¹, 邓晓晴¹, 王立安^{1*}

1 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050024

2 石家庄学院化工学院, 河北 石家庄 050035

摘要:以采自河北省燕山地区的一株野生食用菌肉质黑孢孔菌 *Amyloporus succulentus* 经组织分离得到的菌丝体为实验材料, 对其菌丝体营养特性和环境特性进行了研究, 对其适宜的原种、母种和栽培种培养基进行了筛选, 经驯化栽培成功出菇。通过单因素试验和正交试验筛选, 得出适合肉质黑孢孔菌菌丝生长的最优配方为: 可溶性淀粉 1.80%, 酵母浸粉 0.25%, 硫酸镁 0.15%, 磷酸二氢钾 0.30%, 琼脂 2.00%。适宜肉质黑孢孔菌菌丝生长的温度为 31–34 °C, pH 为 4.5–5.5, 光照条件为黑暗。适合肉质黑孢孔菌培养的母种培养基为玉米粉培养基, 原种培养基为小米培养基。栽培袋接种后 30–60 d 满袋, 5–10 d 后现原基, 6–11 d 原基分化成子实体。高产栽培料配方为玉米芯+棉籽壳培养基, 配方为: 玉米芯 39%, 棉籽壳 39%, 石膏 1%, 葡萄糖 1%; 其第一潮菇产量为 106.9 g/袋, 生物学效率为 66.81%。急性经口毒性试验表明: 在给予小鼠最大给药量为 4 612.4 mg/kg 情况下, 肉质黑孢孔菌无明显急性中毒的危险性。

关键词: 多孔菌; 肉质黑孢孔菌; 生物学特性; 配方筛选; 急性毒性

[引用本文]

顾丹丹, 史玲玉, 张金秀, 王美华, 邓晓晴, 王立安, 2023. 肉质黑孢孔菌生物学特性、驯化栽培及急性毒性. 菌物学报, 42(5): 1139-1150

Gu DD, Shi LY, Zhang JX, Wang MH, Deng XQ, Wang LA, 2023. Biological characteristics, cultivation and acute toxicity of *Amyloporus succulentus*. Mycosystema, 42(5): 1139-1150

资助项目: 河北省重点研发计划(21326315D, 20537301D)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Hebei Province (21326315D, 20537301D).

*Corresponding author. E-mail: wlian1965@126.com

ORCID: GU Dandan (0000-0002-1091-7336), WANG Li'an (0000-0003-0318-9956)

Received: 2022-07-25; Accepted: 2022-08-17

Biological characteristics, cultivation and acute toxicity of *Amylosporus succulentus*

GU Dandan², SHI Lingyu¹, ZHANG Jinxiu¹, WANG Meihua¹, DENG Xiaoqing¹,
WANG Li'an^{1*}

1 College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, Hebei, China

2 College of Chemical Engineering, Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China

Abstract: The nutritional and environmental characteristics of a wild *Amylosporus succulentus* strain, collected from Yanshan area of Hebei Province were studied. The suitable medium for its stock culture, mother spawn, and spawn were screened, and the mushroom was successfully domesticated. Through single factor test and orthogonal test screening, the optimized culture medium formula for the mycelial growth was obtained as follows: soluble starch 1.80%, yeast extract powder 0.25%, magnesium sulfate 0.15%, potassium dihydrogen phosphate 0.30%, agar 2.00%. The mycelia suitably grow at 31–34 °C and pH 4.5–5.5 under dark condition. The suitable stock culture and mother spawn media were corn flour medium and millet medium respectively. Mycelial sackful cultivation needs 30–60 days after inoculation. The primordia appeared 5–10 days later, and differentiated into fruit bodies after 6–11 days. The high-yielding substrate for commercialized cultivation was formulated as follows: corncob 39%, cottonseed shell 39%, gypsum 1%, glucose 1%. The yield of the first fruiting stage was 106.9 g/bag, and the biological efficiency was 66.81%. The acute oral toxicity test showed that there was no obvious risk of acute poisoning caused by *A. succulentus* when the maximum dosage was 4 612.4 mg/kg in mice.

Keywords: polypore; *Amylosporus succulentus*; biological characteristics; formula selection; acute toxicity

多孔菌(polypore)是具有孔状子实体的一类大型担子菌的统称, 因其许多种类可食用、药用或具有潜在的工业价值而备受关注(戴玉成等 2000, 2010, 2021; Cohen *et al.* 2002; 戴玉成和杨祝良 2008; 戴玉成和李玉 2011; 周丽伟和戴玉成 2013)。我国多孔菌资源丰富, 在全国各省区均有分布(Li *et al.* 2007; Wang *et al.* 2011; Yuan & Dai 2012), 2011 年报道其数量已达 704 种(戴玉成 2009; Dai 2012), 随着调查的深入, 近几年新品种相继被报道, 其数量仍在不断增加(Dai & Dai 2018; 杨雄和赵长林 2022), 而且, 近年来已经对一些多孔菌进行了人工驯化栽培研究(梁逸等 2021; 钟丽娟和赵新海 2021)。

黑孢孔菌属 *Amylosporus* 为多孔菌的一个小分支, 该属于 1973 年由 Ryvarden 建立, 记录了 5 种野生蕈菌, 其中一种就是肉质黑孢孔菌 *Amylosporus succulentus* Ryvarden, 后续基于详细的形态学和分子生物学分类研究, 将此属真菌数量扩充至 13 种(陈佳佳 2015; Chen *et al.* 2016; Huang *et al.* 2018)。国内早期采集的肉质黑孢孔菌标本, 最初被鉴定为 *Amylosporus campbellii* (Berk.) Ryvarden, 后续通过标本比较和分子系统学研究, 被定义为新种肉质黑孢孔菌。其子实体为一年生, 菌盖为圆形, 新鲜时子实体为肉质, 干品为木栓质, 干品质量轻, 菌盖 7–10 cm×15–20 cm, 厚 4–5 cm, 边缘较薄, 菌盖表面颜色为白色或淡粉色, 肉质, 边

缘为波浪形,干品子实体颜色为淡黄色,子实体质感柔软,菌褶为孔状,孔口形状为多角形,颜色为浅黄色,易破碎,肉质黑孢孔菌的孢子为椭圆形,无色,细胞壁稍厚,表面粗糙(Chen *et al.* 2013; 陈佳佳 2015)。Huang *et al.* (2018)、黄福常和刘斌(2019)报道了黑孢孔菌属的另一个种——纹盖黑孢孔菌 *Amylosporus sulcatus* F.C. Huang & B. Liu,并对其人工驯化栽培及子实体营养情况进行了研究,认为纹盖黑孢孔菌可作为新的食用菌品种进行开发利用。纹盖黑孢孔菌与肉质黑孢孔菌在分类学上为黑孢孔菌属的两个独立种。肉质黑孢孔菌发现较晚,至今对其生理生化研究及驯化栽培研究均鲜有报道。2017年8月,课题组在河北省燕山地区进行野生大型真菌资源调查时,采集到该菌的子实体并分离获得纯培养菌丝体,同时开展了生物学特性和驯化栽培研究,并对获得的子实体进行了食用安全性评价,研究结果为肉质黑孢孔菌的后续开发利用奠定基础,同时也有利于河北省野生食用菌资源的保护。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本研究所用菌株为肉质黑孢孔菌 *Amylosporus succulentus* 菌株(GenBank 收录号 OP185351),于2017年8月采集于河北省燕山地区的子实体经组织分离后获得,保存于河北师范大学应用真菌实验室。

1.2 营养特性研究

参考顾丹丹等(2022)的方法,采用固体平板培养法进行菌丝体营养特性研究,在基础培养基基础上,分别更换与葡萄糖等量的碳源、与蛋白胨等量的氮源、C/N、与硫酸镁等量的无机盐,进行单因素试验,根据试验结果,分别挑选出菌丝生长速度和长势较好的3个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交表,进行正交试验。

1.3 生长环境条件研究

采用正交实验筛选出的最优配方制作固体培养基,通过固体平板培养法进行生长环境条件筛选,以3℃为一个梯度,在19–43℃间设定不同的温度梯度;以0.5为一个梯度,在pH 4.5–8.5间设定不同初始pH;光照条件设置24 h黑暗、12 h光照+12 h黑暗和24 h光照。

固体平板培养方法:用直径6 mm的打孔器打孔,取菌丝接种至供试培养基上,除温度筛选试验按照设计温度培养外,碳源、氮源、C/N、无机盐、pH及光照条件筛选试验,均置于25℃培养箱内恒温培养。培养期间,每24 h采用十字划线法测量菌丝菌落直径,直到有平板长满时结束培养,计算菌丝生长速度(mm/d)。

1.4 培养基

1.4.1 母种培养基

共11种,编号A–K,A: PDA+木屑煮汁培养基,B: 大豆饼粉培养基,C: 马铃薯蔗糖培养基,D: CPDA培养基,E: 玉米粉培养基,F: 牛粪煮汁培养基,G: 麦粒煮汁培养基,H: 发酵料煮汁培养基,I: PDA+麸皮煮汁培养基,J: PDA培养基,A–J: 配方见顾丹丹等(2022)的报道,K: 正交配方见2.1。

1.4.2 原种培养基

共5种,分别为:高粱培养基、玉米粒培养基、荞麦培养基、麦粒培养基和小米培养基,配方参考顾丹丹等(2022)的报道。

1.4.3 栽培种培养基

设计6种栽培种培养基,分别为:木屑培养基;棉籽壳培养基(覃效敏 2006);玉米芯培养基:玉米芯 78%、麸皮 20%、石膏 1%、糖 1%、含水量 60%–65%、pH 自然;木屑+棉籽壳培养基:木屑 39%、棉籽壳 39%、麸皮 20%、石膏 1%、糖 1%、含水量 55%–60%、pH 自然;木屑+玉米芯培养基:木屑 39%、玉米芯 39%、麸皮 20%、石膏 1%、糖 1%、含水量 55%–60%、pH 自然;玉米芯+棉籽壳培养基:玉米芯 39%、棉籽壳 39%、麸皮 20%、石

膏 1%、糖 1%、含水量 55%–60%、pH 自然。

1.5 驯化栽培

将栽培种培养基按比例配制后自然发酵 2 h, 分装于聚丙烯菌袋中(菌袋规格 140 mm×280 mm×0.05 mm, 装量 400 g), 于高压蒸汽灭菌锅 121 °C 灭菌 2 h, 冷却后接种; 每个配方分别接种 30 袋, 置于温度 28 °C、湿度 60% 的发菌培养室, 在黑暗条件下进行发菌处理, 当菌丝长满菌袋顶部后, 打开栽培袋封口, 移入出菇棚进行出菇管理, 保持菇棚湿度为 85%–90%, 温度为 28–33 °C, 昼夜温差 5–10 °C, 并给与适当的散射光, 每天通风 2 次, 每次 30 min, 刺激原基形成, 原基形成后加大通风, 继续保持高温高湿的生长环境, 加速子实体成熟。

1.6 急性毒性试验

清洁型昆明小鼠, 雌性雄性数量各半, 周龄为 6–8 周, 体重为 18–22 g。将驯化栽培得到的子实体烘干后粉碎成粉末, 溶于水中, 配制最大浓度水溶液(恰好可以通过灌胃针)。将小鼠分为 2 组, 分别为实验组和对照组, 20 只/组, 雌雄各半, 分开饲养。实验前小鼠禁食 12 h, 自由饮水。使用限量法灌胃(适用于未显示毒性或毒性极小的受试物, 至少应为 10.0 g/kg 体重的剂量, 若剂量达不到, 则给予最大剂量), 小鼠最大灌胃体积为 20 mL/kg, 即每只小鼠灌胃 0.4 mL, 隔 6 h 后再灌胃一次, 肉质黑孢孔菌最大剂量给药为 4 612.4 mg/kg (实验组), 对照组给予同体积的超纯水。灌胃后小鼠继续禁食 4 h, 然后自由饮水, 喂基础饲料。观察小鼠的活动, 毛发光泽, 摄食饮水等情况, 记录小鼠有无死亡情况, 连续 14 d 的小鼠体重变化情况, 第 15 天处死后, 对小鼠进行解剖, 并观察其内脏颜色是否发生变化。

本文涉及的动物实验遵守了河北师范大学生物医学伦理委员会相关动物研究伦理规定, 并获得该委员会的批准(批准号为 2023LLSC037)。

1.7 制作组织病理学石蜡切片

参考吕明明等(2018)的实验方案, 将小鼠

解剖后取其肝脏与肾脏, 用生理盐水进行清洗后, 存放于组织固定液中, 经过乙醇脱水, 二甲苯做透明处理后, 进行石蜡包埋处理, 制成组织切片; 用苏木素伊红(HE)将切片染色后, 置于倒置显微镜下观察。

1.8 数据分析

采用正交设计助手 II 和 STATISTICA 17.0 计算平均值和标准差, 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌丝体生物学特性

肉质黑孢孔菌菌丝在测定的 10 种碳源和无碳培养基上均可以生长, 但是菌落形态、菌丝色泽、长势和整齐度等均有较大差异(表 1, 图 1)。培养基中添加可溶性淀粉、蔗糖和果糖的菌落形态较好且菌丝生长速度较快; 添加半乳糖后菌落形态较差, 菌丝生长速度缓慢, 低于无糖组。综合菌丝长势和生长速度, 可溶性淀粉为菌丝体生长适宜的碳源。

肉质黑孢孔菌菌丝在测定的 9 种氮源和无氮培养基上均可以生长, 但在有机氮源培养基上菌落形态优于无机氮源(表 1, 图 1)。培养基中添加酵母浸粉、牛肉膏、酵母膏的菌落形态较好且菌丝生长速度较快; 添加亮氨酸后菌丝的生长速度最慢, 低于无氮组。综合分析, 酵母浸粉为菌丝体生长适宜的氮源。

肉质黑孢孔菌菌丝在测定的 9 种 C/N 条件下均可以生长, 在 C/N 为 10:1、15:1、20:1 的培养基上菌丝洁白浓密、菌丝长势、边缘整齐度较好, C/N 为 15:1 时菌丝生长速度最快(表 1, 图 1)。综合分析, 菌丝体生长适宜的 C/N 条件为 15:1。

肉质黑孢孔菌对不同无机盐利用差异较大, 培养基中添加硝酸钠、硫酸铜菌丝不生长, 在其余 9 种无机盐培养基上均可以生长, 添加硫酸镁菌丝洁白浓密, 菌落形态较好, 生长速度较快(表 1, 图 1)。综上所述, 培养肉质黑孢孔菌菌丝时适宜添加的无机盐为硫酸镁。

表 1 肉质黑孢孔菌培养基配方单因素试验筛选结果

Table 1 Screening results of single factor test on the medium formula of *Amylosporus succulentus*

筛选条件	不同因素	菌丝长速	显著性差异	菌丝长势	
Screening factors	Different nutritional factors	Mycelial growth rate (mm/d)	Significance levels <i>P</i> <0.05	Mycelial growth vigor	
碳源	乳糖 Lactose	1.79±0.10	cd	+	
Carbon source	果糖 Fructose	1.86±0.13	cd	+++	
	葡萄糖 Glucose	1.81±0.11	cd	+++	
	木糖 Xylose	1.82±0.05	cd	+++	
	半乳糖 Galactose	1.29±0.05	e	+	
	山梨糖醇 Sorbitol	1.79±0.10	cd	++	
	蔗糖 Sucrose	2.31±0.08	b	++	
	甘露醇 Mannitol	1.64±0.15	d	++	
	麦芽糖 Maltose	1.64±0.05	d	++	
	可溶性淀粉 Starch	3.29±0.09	a	+++	
	空白 CK	1.95±0.08	c	++	
	氮源	(NH ₄) ₂ MoO ₄	1.21±0.05	e	+
	Nitrogen source	NH ₄ Cl	2.67±0.13	b	++
NH ₄ NO ₃		2.55±0.15	bc	++	
尿素 Urea		1.86±0.05	d	+	
亮氨酸 Leucine		1.02±0.08	e	+	
蛋白胨 Peptone		2.29±0.05	c	++	
(NH ₄) ₂ SO ₄		2.29±0.05	c	++	
牛肉膏 Beef extract		2.55±0.15	bc	++	
酵母浸粉 Yeast extract powder		3.50±0.27	a	+++	
空白 CK		1.81±0.08	d	++	
酵母膏 Yeast extract paste		2.33±0.08	c	++	
C/N		10:1	2.02±0.10	b	+
		15:1	2.29±0.07	a	+
	20:1	1.98±0.07	b	++	
	25:1	1.69±0.04	cd	++	
	30:1	1.83±0.09	bcd	++	
	35:1	1.73±0.03	cd	++	
	40:1	1.60±0.03	d	++	
	45:1	1.79±0.14	bcd	++	
	50:1	1.90±0.14	bc	++	
	无机盐	KCl	1.57±0.05	c	++
	Mineral salt	MgCl ₂	1.40±0.03	d	++
		MgSO ₄	2.21±0.10	a	+++
Na ₂ CO ₃		1.07±0.05	e	+	
Na ₂ SO ₄		1.64±0.05	bc	++	
K ₂ SO ₄		1.71±0.05	b	++	
空白 CK		1.55±0.08	c	++	
MnSO ₄		1.74±0.03	b	++	
CuSO ₄		—	—	—	
ZnSO ₄		1.55±0.08	c	++	
NaNO ₃		—	—	—	

+++表示菌丝长势较强; ++表示菌丝长势一般; +表示菌丝长势弱; —表示不生长. 下同

+++ Indicates vigorous growth; ++ indicates moderate growth; + indicates weak growth; — indicates no growth. The same below.

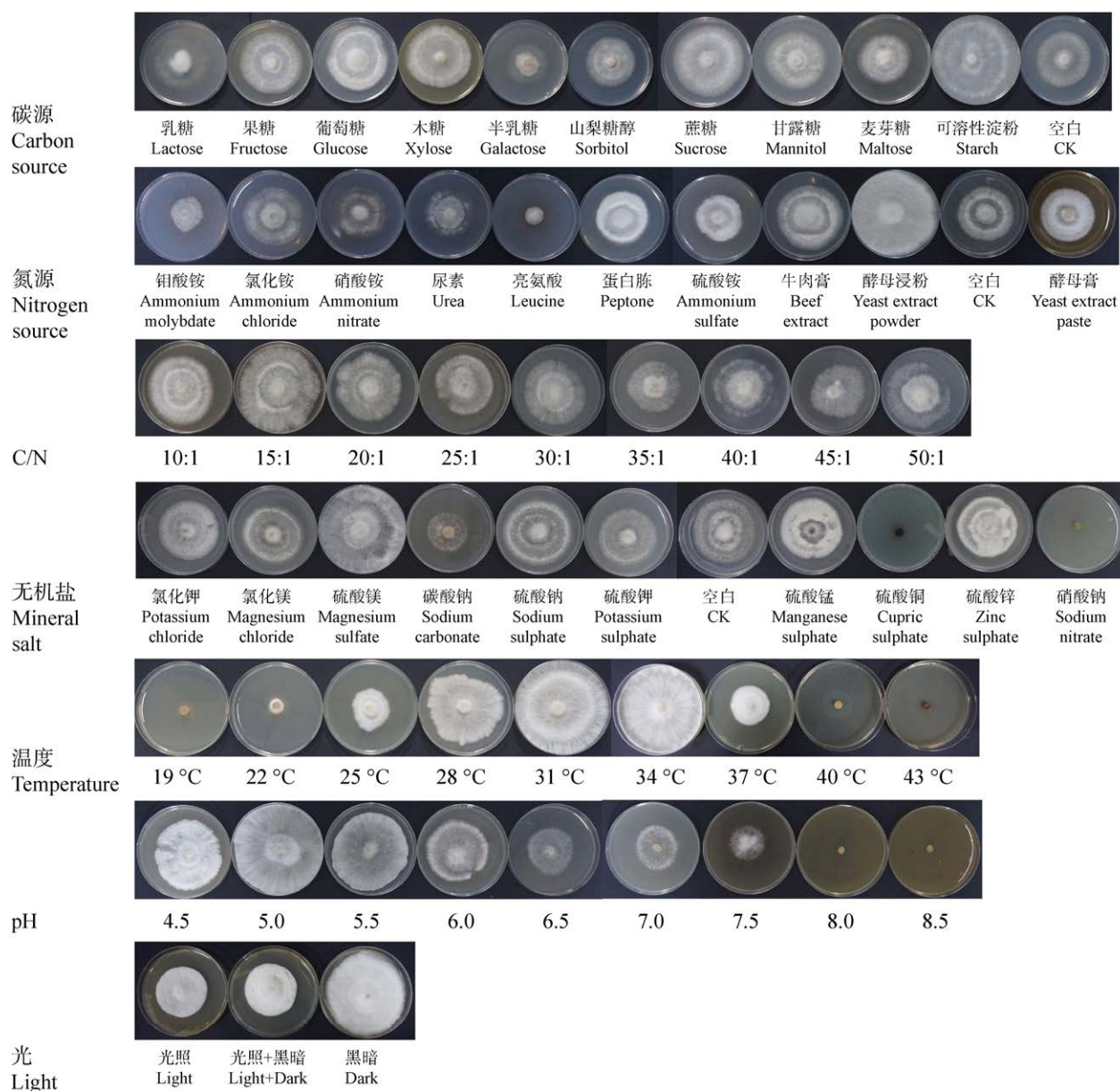


图 1 不同单因素条件对肉质黑孢孔菌菌丝生长情况的影响

Fig. 1 Effects of different single factor on mycelial growth of *Amylosporus succulentus*.

根据单因素试验结果, 分别挑选出菌丝生长速度和长势最佳的3个水平, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表2, 表3)。从极差R与r可以看出, 对菌丝生长速度影响最大的因素为氮源, 其次为碳源; 对菌丝干重影响最大的因素为碳源, 其次为C/N(表3)。综合分析, 适宜菌丝生长的培养基为: 可溶性淀粉1.8%, 酵母浸粉0.25%, 硫酸镁0.15%, 磷酸二氢钾0.30%, 琼脂2.00%。

2.2 菌丝体生长环境条件

菌丝体在22–40 °C均可生长, 适宜生长温度范围为31–34 °C, 最适生长温度为34 °C, 此温度下菌丝生长速度显著高于其他组, 在43 °C培养时菌丝不生长(图1, 图2A)。

菌丝体在初始pH 4.5–8.0均可生长, 在初始pH为5.0时, 菌丝生长速度最快、长势最好, 超过此pH, 菌丝生长速度和长势明显下降(图1,

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
Level	Factor			
	碳源	氮源	C/N	无机盐
	Carbon source	Nitrogen source		Mineral salt
1	可溶性淀粉 Starch	酵母浸粉 Yeast extract powder	15:1	MgSO ₄
2	蔗糖 Sucrose	牛肉膏 Beef extract	10:1	Na ₂ SO ₄
3	果糖 Fructose	酵母膏 Yeast extract paste	20:1	KCl

表 3 肉质黑孢孔菌菌丝生长的正交试验分析结果

Table 3 The results of orthogonal experiment for mycelial growth of *Amylosporus succulentus*

试验号	碳源	氮源	C/N	无机盐	菌丝长速	菌丝干重
Test No.	Carbon source	Nitrogen source		Mineral salt	Mycelial growth rate (mm/d)	Mycelial dry weight (g/d)
1	1	1	1	1	3.52±0.08a	68.36±1.99a
2	1	2	2	2	2.90±0.11b	50.08±4.42b
3	1	3	3	3	2.45±0.11c	36.20±2.70c
4	2	1	2	3	2.76±0.08b	9.09±0.30f
5	2	2	3	1	2.52±0.11c	12.54±0.78ef
6	2	3	1	2	2.20±0.13d	13.23±1.61ef
7	3	1	3	2	2.38±0.08c	13.18±0.69ef
8	3	2	1	3	2.45±0.11c	25.65±0.76d
9	3	3	2	1	2.48±0.08c	17.33±0.54e
K1	2.956	2.886	2.723	2.840		
K2	2.493	2.656	2.706	2.493		
K3	2.436	2.343	2.450	2.553		
R	0.520	0.543	0.273	0.347		
k1	51.546	30.210	35.764	32.743		
k2	11.620	29.423	25.500	25.496		
k3	18.720	22.253	22.253	23.646		
r	39.926	7.957	13.511	9.097		

数据为 6 次重复的平均值±标准差。Kn：n 水平上的菌丝平均生长速度；kn：n 水平上的菌丝平均干重。R 和 r 为极差。不同小写字母表示在 0.05 水平的显著性差异

The data were the means±SD (n=6). Kn: Average value of mycelial growth rate; kn: The average of mycelial dry weight at n level. R and r are ranges. Different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 probability level.

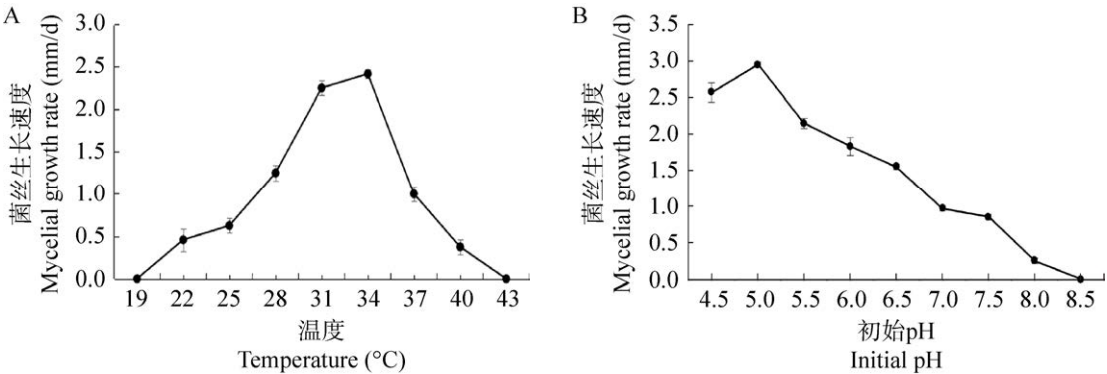


图 2 温度(A)和 pH (B)对肉质黑孢孔菌菌丝生长的影响

Fig. 2 Effects of different temperature (A) and initial pH (B) on the mycelial growth of *Amylosporus succulentus*.

图 2B), 综合分析, 适宜菌丝生长初始 pH 范围为 4.5–5.5, 最适初始 pH 为 5.0。

菌丝体在 3 种光照培养条件下均可生长, 但在黑暗培养条件下, 菌丝生长速度最快, 长势最佳, 即肉质黑孢孔菌菌丝体适宜在黑暗条件下培养(图 1)。

2.3 培养基

2.3.1 母种培养基

肉质黑孢孔菌菌丝体(菌种)在 11 种母种培养基上均可以生长, 在 D (CPDA 培养基)上菌丝生长速度较慢, 长势较差。在 E (玉米粉培养基)上菌丝生长速度最快, 菌落形态较好, 菌丝粗壮洁白(表 4)。综合分析, E (玉米粉培养基)为适宜肉质黑孢孔菌菌丝生长的母种培养基。

2.3.2 原种培养基

菌丝体不能在荞麦培养基上生长, 在其余 4 种培养基上均能够生长, 但生长速度差异明

显, 在小米培养基上的菌丝生长速度显著快于小麦、高粱和玉米粒培养基上培养的菌丝, 且菌丝长势最好(表 4)。综合分析, 适宜肉质黑孢孔菌培养的原种培养基为小米粒培养基。

2.4 驯化栽培

栽培袋接菌后在不同栽培料培养 30–60 d 满袋, 5–10 d 后现原基, 6–11 d 后分化为子实体, 原基个数在 1–3 个。不同的栽培料培养第一潮菇产量及生物学效率相差较大, 产量在 69.87–106.9 g/袋, 生物学效率在 43.66%–66.81%, 玉米芯+棉籽壳栽培料为最适宜肉质黑孢孔菌的栽培料, 其第一潮菇产量为 106.9 g/袋, 生物学效率可达到 66.81%。子实体成熟后, 菌盖形状多样, 多为扇形, 菌盖中心呈现淡粉色, 四周为白色, 横直径在 3.12–7.87 cm, 纵直径在 3.45–9.05 cm; 菌盖厚度在 1.23–2.08 cm; 此菌没有明显的菌柄, 菇质较硬, 没有明显蘑菇气味(表 5, 图 3)。

表 4 不同母种和原种培养基对肉质黑孢孔菌菌丝生长的影响

Table 4 Effects of different stock culture and mother spawn media on the mycelial growth of *Amyloporus succulentus*

培养基 Medium	培养基编号 Medium serial No.	菌丝长速 Mycelial growth rate (mm/d)	显著性差异 Significance levels <i>P</i> <0.05	菌丝长势 Mycelial growth vigor
母种培养基 Stock culture media	A	2.88±0.18	ef	++
	B	4.13±0.09	c	++
	C	4.00±0.09	c	++
	D	1.75±0.09	g	+
	E	5.58±0.18	a	+++
	F	4.13±0.09	c	++
	G	3.04±0.22	de	+
	H	3.38±0.09	d	+
	I	2.83±0.18	ef	+
	J	2.58±0.14	ef	+
	K	4.58±0.18	b	++
原种培养基 Mother spawn media	高粱 Sorghum	3.47±0.15	b	++
	玉米粒 Corn	2.83±0.11	c	++
	荞麦 Buckwheat	—	—	—
	小麦 Wheat	2.33±0.11	d	++
	小米 Millet	5.67±0.11	a	+++

表 5 不同栽培料对肉质黑孢孔菌出菇过程的影响

Table 5 Effects of different substrate on the fruiting development process of *Amylosporus succulentus*

栽培料 Substrate	原基发生时间 Primordium formation time (d)	子实体发生时间 Fruiting body formation time (d)	原基数 Primordium number	第一潮菇产量 First fruiting stage yield (g/bag)	第一潮菇生物学效率 Biological efficiency of first fruiting stage (%)
木屑培养基 Sawdust substrate	10	11	1	69.87	43.66
棉籽壳培养基 Cottonseed hull substrate	8	7	3	75.66	47.28
玉米芯培养基 Corncob substrate	6	7	1	96.90	60.56
木屑+棉籽壳培养基 Sawdust+cottonseed hull substrate	8	7	1	92.33	57.70
木屑+玉米芯培养基 Sawdust+corncob substrate	7	6	1	99.45	62.15
玉米芯+棉籽壳培养基 Corncob+cottonseed hull substrate	5	6	1	106.90	66.81

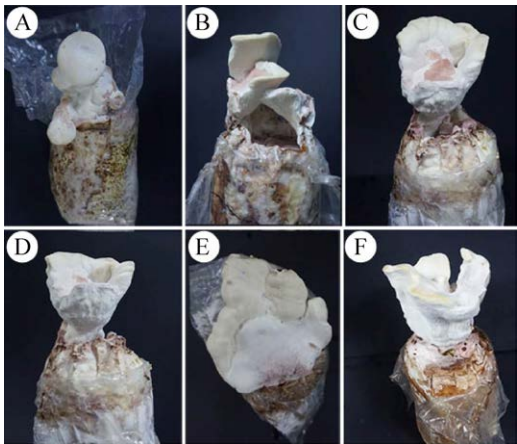


图 3 肉质黑孢孔菌驯化栽培 A–F: 6 种不同栽培料. A: 木屑. B: 棉籽壳. C: 玉米芯. D: 木屑+棉籽壳. E: 木屑+玉米芯. F: 玉米芯+棉籽壳

Fig. 3 The fruiting bodies of *Amylosporus succulentus* obtained by domestic cultivation. A–F: Six different substrate. A: Sawdust. B: Cottonseed hull. C: Corncob. D: Sawdust+cottonseed hull. E: Sawdust+corncob. F: Corncob+cottonseed hull.

2.5 肉质黑孢孔菌急性毒理试验

2.5.1 急性毒性试验

肉质黑孢孔菌提取物按最大给药量进行灌胃实验后，个别小鼠活动明显减少，1 h 后活动逐渐恢复正常状态，毛发色泽光亮；没有出现

抽搐、异常分泌物等现象；在观察期内，实验组和对照组均未出现死亡现象。实验表明，肉质黑孢孔菌的半数致死量 $LD_{50} \geq 4\,612.4\text{ mg/kg}$ (表 6)，根据急性经口毒性实验判断标准，可知肉质黑孢孔菌无严重急性中毒的危险性，属于可食用菌，但无法测得半数致死量，因此采用最大给药量法进行急性毒理试验。

2.5.2 最大给药量对小鼠体重的影响

对小鼠进行最大给药量灌胃实验，给药剂量为 $4\,612.4\text{ mg/kg}$ ，1 d 内给药 2 次，2 次间隔 4 h，恢复正常饮食后，连续观察 14 d，每隔 2 d 测量一次体重。在 14 d 的观察期中，实验组与对照组小鼠均可以正常饮食，体重正常增长，活动正常，毛发色泽光亮；未出现抽搐、分泌异物等现象。实验组小鼠体重整体高于对照组小鼠体重，尤其是实验组雄鼠，其体重上升速度最快(表 7)。

2.5.3 小鼠肝脏、肾脏组织病理学切片观察

观察结束后，对实验组与对照组小鼠均进行解剖学检查，肉眼对小鼠的各个脏器进行观察，未发现各脏器发生异常病变。然后对其肝脏组织、肾脏组织进行切片观察。实验组与

表 6 肉质黑孢孔菌子实体急性毒性试验结果

Table 6 Acute toxicity test of fruiting bodies of *Amylosporus succulentus*

组别	给药剂量	小鼠数目	死亡小鼠数	死亡率	存活率
Group	Dose (mg/kg)	Number of mice tested	Number of dead mice	Mortality rate (%)	Survival rate (%)
实验组	4 612.4	10	0	0	100
Experimental group					
对照组	0	10	0	0	100
Control					

表 7 最大给药量对小鼠体重的影响

Table 7 Effects of maximum dosage on the weight of tested mice

时间	实验组		对照组	
Time	Experimental group (g)		Control (g)	
(d)	雌鼠	雄鼠	雌鼠	雄鼠
	Female mice	Male mice	Female mice	Male mice
2	22.95±0.37	21.63±0.40	22.70±0.70	20.11±0.53
4	23.73±0.63	22.67±0.39	23.01±0.87	20.99±0.69
6	24.78±0.54	24.10±0.26	23.78±0.57	23.00±0.65
8	25.94±0.47	25.02±0.57	24.44±0.37	23.68±0.61
10	27.04±0.60	25.75±0.35	24.64±0.67	24.94±0.67
12	27.75±0.41	27.40±0.53	25.07±0.80	25.93±1.29
14	28.37±0.57	29.13±0.41	25.17±0.64	27.05±1.05

对照组的肝细胞核形态圆整且清晰可见，细胞核浆分明，细胞质饱满充盈，未出现明显细胞萎缩、凋亡等现象；肝小叶中央静脉边缘完整，形态完好，肝细胞整体呈现索状，排列紧密并向外扩展呈现放射状，未发生明显可见病变(图 4)。

实验组与对照组切片中肾单位结构完整清晰，组织间隙分明，细胞完整分明；细胞质饱满充盈，未出现明显细胞萎缩、凋亡等现象；肾小球结构完整，边缘清晰，无明显病变(图 5)，肉质黑孢孔菌无严重的急性中毒危险。

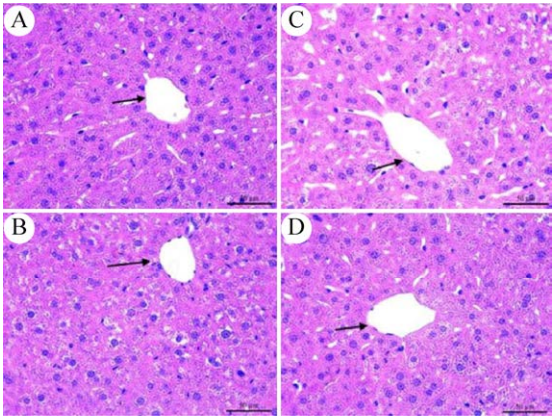


图 4 肉质黑孢孔菌对小鼠肝脏组织的影响(HE 染色，400×) A：实验组雌鼠. B：实验组雄鼠. C：对照组雌鼠. D：对照组雄鼠. 箭头指向为肝小叶中央静脉. 标尺=50 μm

Fig. 4 Effects of *Amylosporus succulentus* on liver tissue of mice (HE staining, 400×). A: Female rats in the experimental group. B: Male rats in the experimental group. C: Female rats in the control group. D: Male rats in the control group. The arrows pointed to the central vein of the hepatic lobule. Bars=50 μm.

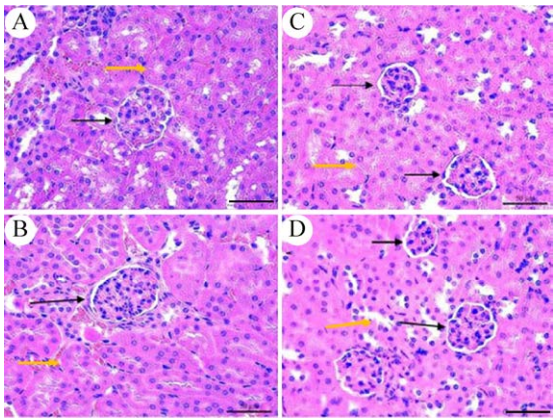


图 5 肉质黑孢孔菌对小鼠肾脏组织的影响(HE 染色，400×) A：实验组雌鼠. B：实验组雄鼠. C：对照组雌鼠. D：对照组雄鼠. 黑色箭头所指为肾小球；黄色箭头所指为肾小管. 标尺=50 μm

Fig. 5 Effects of *Amylosporus succulentus* on kidney tissue of mice (HE staining, 400×). A: Female rats in the experimental group. B: Male rats in the experimental group. C: Female rats in the control group. D: Male rats in the control group. The black arrows referred to glomeruli; The yellow arrows referred to tubules. Bars=50 μm.

3 讨论

肉质黑孢孔菌属于黑孢孔菌属,最初记载的只有 5 个种,后续随着新物种不断被发现,借助分子生物学技术不断明确物种间的系统发育关系,将此属物种数逐渐扩充至 13 个(陈佳佳 2015; Chen *et al.* 2016; Huang *et al.* 2018)。对此属物种的研究主要集中于形态学和分类学描述,鲜有驯化成功的报道。Chang & Chou (2003) 对此属中模式真菌 *Amylosporus campbellii* 的菌丝培养特征进行了研究,筛选出菌丝适宜的培养温度为 24–28 °C,但未实现驯化栽培。坦桑尼亚的 Juma *et al.* (2015) 对 *Amylosporus* sp. IJ-2014 菌株进行了驯化,生物学效率仅有 4.62%,且子实体发育不完全,未形成完整菌盖。2019 年,纹盖黑孢孔菌 *Amylosporus sulcatus* 被报道驯化栽培成功,收二潮菇后的生物转化率达 32.20%,实现了此属真菌真正意义的驯化栽培(黄福常和刘斌 2019)。而本研究通过对肉质黑孢孔菌的生物学特性和生长环境特性进行研究,筛选出适合其生长的母种、原种和栽培种培养基,并成功驯化栽培,一潮菇的生物学效率在 43.66%–66.81%,产量远超纹盖黑孢孔菌 *Amylosporus sulcatus*,栽培技术已经达到生产要求。此属真菌中纹盖黑孢孔菌菌丝适宜生长温度为 28–30 °C (黄福常和刘斌 2019), Juma *et al.* (2015) 虽然未对 *Amylosporus* sp. IJ-2014 菌丝最适生长温度进行筛选,但在驯化栽培时将发菌温度设置为(27.5±1.5) °C,可成功出菇,肉质黑孢孔菌适宜生长温度范围为 31–34 °C,可见此属真菌所需培养温度较高。在实验中发现,肉质黑孢孔菌在发菌时,菌种萌发较慢,致使发菌时间过长,如何提高菌种萌发速度,进而缩短发菌时间需要进一步研究。本研究未对出菇的温度、湿度及 CO₂ 浓度等条件进行筛选,并且未作扩大栽培实验,建议可进行更深一步的研究。

本研究通过对肉质黑孢孔菌的生物学特性

和环境特性的考察,经过出菇试验成功获得其子实体,首次实现人工栽培。食用安全性评价表明肉质黑孢孔菌属于可食用菌,研究结果为后续黑孢孔菌属真菌的开发研究和可持续利用奠定了基础。

[REFERENCES]

- Chang TT, Chou WN, 2003. Five polypores (Basidiomycota) new to Taiwan and their cultural characteristics. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44(3): 245-251
- Chen JJ, 2015. Taxonomy and phylogeny of *Wrightoporia* and related genera in China. PhD Dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. 1-214 (in Chinese)
- Chen JJ, Cui BK, Dai YC, 2016. Global diversity and molecular systematics of *Wrightoporia* s.l. (Russulales, Basidiomycota). *Persoonia*, 37(1): 21-36
- Chen JJ, Shen LL, Cui BK, 2013. *Amylosporus succulentus* sp. nov. (Russulales, Basidiomycota) evidenced by morphological characters and phylogenetic analysis. *Cryptogamie Mycologie*, 35(3): 271-282
- Cohen R, Persky L, Hadar Y, 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5): 582-594
- Dai SJ, Dai YC, 2018. Morphological characters and molecular data reveal a new species of *Physisporinus* (Basidiomycota) from southeast Asia. *Mycosystema*, 37(2): 145-150
- Dai YC, 2009. A checklist of polypores in China. *Mycosystema*, 28(3): 315-327 (in Chinese)
- Dai YC, 2012. Polypore diversity in China with an annotated checklist of Chinese polypores. *Mycoscience*, 53(1): 49-80
- Dai YC, Li Y, 2011. Notes on the nomenclature of six important medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 30(4): 515-518 (in Chinese)
- Dai YC, Qin GF, Xu MQ, 2000. The forest pathogens of root and butt rot in northeast China. *Forest Research*, 13: 15-22 (in Chinese)
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27(6): 801-824 (in Chinese)
- Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Wu G, Yuan HS, Zhou LW, He SH, Ge ZW, Wu F, Wei YL, Yuan Y, Si J, 2021. Diversity and systematics of the important macrofungi in Chinese forests. *Mycosystema*, 40: 770-805 (in Chinese)
- Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China.

- Mycosystema, 29(1): 1-21 (in Chinese)
- Gu DD, Shi LY, Liu HX, Zhang JX, Yao QG, Wang LA, 2022. Biological characteristics and cultivation of *Clitocybe fragrans*. Mycosystema, 41(4): 647-657 (in Chinese)
- Huang FC, Liu B, 2019. Domestication and nutrients analyses of a new mushroom—*Amyloporus sulcatus*. Genomics and Applied Biology, 38(12): 5483-5494 (in Chinese)
- Huang FC, Liu B, Wu H, Qin PS, Li JF, 2018. *Amyloporus sulcatus* sp. nov. (Russulales, Basidiomycota) from southern China. Mycobiology, 46(4): 311-316
- Juma I, Tibuhwa DD, Mshandete AM, Kivaisi AK, 2015. Domestication of seven Tanzanian indigenous saprophytic edible mushrooms. International Research Journal of Biological Sciences, 4(12): 1-8
- Li J, Xiong HX, Zhou XS, Dai YC, 2007. Polypores (Basidiomycetes) from Henan Province in central China. Sydowia, 59(1): 125-137
- Liang Y, Dai D, Rao G, Li D, Yu H, Zhang B, Li Y, 2021. Biological characteristics, domestic cultivation and antioxidant activities of *Fomitopsis ostreiformis*. Mycosystema, 40(8): 2074-2086 (in Chinese)
- Lü MM, Chu YJ, Hou CZ, Chen MM, Chen XH, 2018. Screening of the neurotoxic sites caused by *Strychnos vomica* and the neuroprotective sites of radix paeoniae alba. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 35(10): 865-871 (in Chinese)
- Qin XM, 2006. High yield cultivation techniques of *Lentinus edodes*. Edible Fungi of China, 25(5): 56, 60 (in Chinese)
- Wang B, Cui BK, Li HJ, Du P, Jia BS, 2011. Wood-rotting fungi in eastern China. V. Polypore diversity in Jiangxi Province. Annales Botanici Fennici, 48(3): 237-246
- Yang X, Zhao CL, 2022. Cultivation and biological characteristics of medical fungus *Vanderbylia cinnamomea*. Mycosystema, 41(1): 59-67 (in Chinese)
- Yuan HS, Dai YC, 2012. Wood-inhabiting fungi in southern China. VI. Polypores from Guangxi Autonomous Region. Annales Botanici Fennici, 49(5-6): 341-351
- Zhong LJ, Zhao XH, 2021. Liquid culture medium and cultivation conditions of *Polyporus arcularius*. Mycosystema, 40(12): 3118-3128 (in Chinese)
- Zhou LW, Dai YC, 2013. Chinese polypore diversities: species, mycota and ecological functions. Biodiversity Science, 21(4): 499-506 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 陈佳佳, 2015. 赖特孔菌属及近缘属的分类与系统发育研究. 北京林业大学博士论文, 北京. 1-214
- 戴玉成, 2009. 中国多孔菌名录. 菌物学报, 28(3): 315-327
- 戴玉成, 李玉, 2011. 中国六种重要药用真菌名称的说明. 菌物学报, 30(4): 515-518
- 戴玉成, 秦国夫, 徐梅卿, 2000. 中国东北地区的立木腐朽菌. 林业科学研究, 13: 15-22
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. 菌物学报, 27(6): 801-824
- 戴玉成, 杨祝良, 崔宝凯, 吴刚, 袁海生, 周丽伟, 何双辉, 葛再伟, 吴芳, 魏玉莲, 员瑗, 司静, 2021. 中国森林大型真菌重要类群多样性和系统学研究. 菌物学报, 40: 770-805
- 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. 菌物学报, 29(1): 1-21
- 顾丹丹, 史玲玉, 刘红霞, 张金秀, 姚清国, 王立安, 2022. 芳香杯伞生物学特性及驯化栽培. 菌物学报, 41(4): 647-657
- 黄福常, 刘斌, 2019. 纹盖黑孢孔菌——一种新食用菌的驯化及营养成分分析研究. 基因组学与应用生物学, 38(12): 5483-5494
- 梁逸, 戴丹, 饶固, 李丹, 于寒, 张波, 李玉, 2021. 牡蛎形拟层孔菌生物学特性、驯化栽培及抗氧化活性. 菌物学报, 40(8): 2074-2086
- 吕明明, 褚艳杰, 侯臣之, 陈明明, 陈晓辉, 2018. 马钱子致神经毒性部位及白芍神经保护作用部位的筛选. 沈阳药科大学学报, 35(10): 865-871
- 覃效敏, 2006. 香菇代料高产栽培技术. 中国食用菌, 25(5): 56, 60
- 杨雄, 赵长林, 2022. 药用真菌香樟范氏孔菌的驯化栽培及生物学发育特征. 菌物学报, 41(1): 59-67
- 钟丽娟, 赵新海, 2021. 漏斗多孔菌液体菌种培养基及其栽培条件. 菌物学报, 40(12): 3118-3128
- 周丽伟, 戴玉成, 2013. 中国多孔菌多样性初探: 物种、区系和生态功能. 生物多样性, 21(4): 499-506