

野生有柄灵芝生物学特性及驯化栽培

陈爽^{1,2}, 刘淑娟¹, 高悦^{1,2}, 宋子坤¹, 马海霞^{1*}

1 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南热带农业资源研究院海南省热带微生物重点实验室, 海口 571101

2 华中农业大学植物科学技术学院应用真菌研究所, 湖北 武汉 430070

摘要: 为了充分开发利用灵芝资源, 本研究对采自西藏墨脱县的一份野生灵芝子实体标本进行了分离纯化培养, 并通过形态学观察和分子生物学分析鉴定为有柄灵芝 *Ganoderma gibbosum*。将此菌株作为试验菌株, 从碳源、氮源、温度、pH 这 4 个因素进行生物学特性研究, 从中选择 3 个较优水平进行正交试验。结果表明, 有柄灵芝菌丝生长的最佳碳源为果糖, 氮源为酵母, 最适温度为 25 °C, 适宜 pH 为 7.0。驯化出芝栽培基质配方选用杂木屑 58%、玉米芯 20%、麦麸 20%、石灰 1%、石膏 1%, 40 d 左右菌丝满袋, 覆土一周后出现原基, 50 d 左右子实体成熟。初步成分分析表明, 有柄灵芝粗多糖、氨基酸含量分别为 1.5% 和 10.8%。本试验成功对野生有柄灵芝进行了人工驯化栽培, 为有柄灵芝作为新的药用菌进行开发利用提供了参考。

关键词: 灵芝; 药用真菌; 生物学特性; 驯化栽培; 功能成分

[引用本文]

陈爽, 刘淑娟, 高悦, 宋子坤, 马海霞, 2023. 野生有柄灵芝生物学特性及驯化栽培. 菌物学报, 42(11): 2218-2230

Chen S, Liu SJ, Gao Y, Song ZK, Ma HX, 2023. Biological characteristics and domestic cultivation of wild *Ganoderma gibbosum*. Mycosystema, 42(11): 2218-2230

资助项目: 中国热带农业科学院基本业务费(1630032022001); 海南省重点研发专项(ZDYF2020062)

This work was supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund for Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (1630032022001) and the Key Research and Development Project of Hainan Province (ZDYF2020062).

*Corresponding author. E-mail: mahaixia@itbb.org.cn

Received: 2023-03-06; Accepted: 2023-03-20

Biological characteristics and domestic cultivation of wild *Ganoderma gibbosum*

CHEN Shuang^{1,2}, LIU Shujuan¹, GAO Yue^{1,2}, SONG Zikun¹, MA Haixia^{1*}

1 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources, Haikou 571101, Hainan, China

2 Institute of Applied Mycology, College of Plant Science Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: A wild strain of *Ganoderma* from Medog, Xizang, was identified as *Ganoderma gibbosum*, based on morphological observation and molecular biological analysis. Its biological characteristics and domestic cultivation were studied. Single-factor tests were conducted for optimizing carbon and nitrogen sources, temperature and pH under solid cultivation conditions. Orthogonal experiment of three optimal levels selected from the four single-factor tests showed that the optimal carbon source and nitrogen source for mycelial growth of *G. gibbosum* were fructose and yeast, respectively. The optimum temperature was 25 °C, and the suitable pH was 7.0. The fruiting bodies of *G. gibbosum* could be formed on the substrate formulated by 58% angiosperm wood chips, 20% corncob, 20% bran, 1% lime, and 1% gypsum. The hyphae fully colonized the substrate after cultivation for 40 days. The primordium began to form in one week after casing, and the fruiting body matured in about 50 days. Preliminary analysis of functional components indicated that polysaccharide and amino acid contents of *G. gibbosum* were 1.5% and 10.8%, respectively. *G. gibbosum* might have a new potential medicinal value in future applications.

Keywords: *Ganoderma*; medicinal fungi; biological characteristics; domestic cultivation; functional component

有柄灵芝 *Ganoderma gibbosum* (Blume & T. Nees) Pat. (崔宝凯等 2023), 隶属于担子菌门 Basidiomycota、伞菌纲 Agaricomycetes、多孔菌目 Polyporales、多孔菌科 Polyporaceae, 国内主要分布在云南省(崔宝凯等 2023)。其子实体一年生, 有柄, 木栓质; 菌盖半圆形, 表面锈褐色, 无漆样光泽, 有同心环纹, 边缘稍钝, 菌管单层, 管口圆形, 表面白色膜; 有菌柄, 平侧生, 菌柄无漆样光泽, 同菌盖颜色, 粗细不等; 孢子卵圆形或顶端平截, 双壁层, 外壁无色透明, 平滑, 内壁浅褐色(戴玉成等 2022)。

研究表明, 灵芝含有多种活性成分(陈体强等 2004), 具有极高的药用价值。目前国内外研

究较多的灵芝的化学成分主要有三萜、多糖、蛋白质、多肽、氨基酸、甾醇、核苷、生物碱、脂肪酸、呋喃衍生物及无机元素等化合物(齐川等 2012)。其中三萜、多糖和氨基酸是受到人类关注的三大主要活性成分, 多糖和三萜是不同灵芝种质资源药用成分评价的主要指标(Wu *et al.* 2019; 王飞等 2022)。三萜类化合物可直接作用于肿瘤细胞进行毒杀, 具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、保肝、保肾、调节血脂血糖以及调节人类免疫系统的作用(罗云等 2021), 灵芝多糖具有提高免疫力、降低“三高”和抑瘤抗癌的作用(李平作和章克昌 2000), 还可提高机体耐缺氧能力, 增强肝脏、骨髓、血液合成 DNA、RNA 和蛋白质

的能力,从而延长人类的寿命(丰永红和于淑娟 2002)。另外,灵芝中含有多种活性强且易被人体吸收的氨基酸,与灵芝多糖协同作用后具有较强的抗肿瘤活性(王朝川 2018)。目前三萜类化合物和灵芝多糖已应用于肺癌、肝癌、宫颈癌、前列腺癌、乳腺癌及结肠癌等多种肿瘤的辅助治疗(王梦晨等 2022)。

随着人们生活水平的提高,对自身健康的重视程度越来越高,养生意识日益增强,包括对灵芝在内的多孔菌驯化栽培也日益增多(戴玉成 2023)。我国地跨 6 个气候带,分布着丰富的野生灵芝资源,不少人工栽培的灵芝品种已形成一定规模,但目前市面上有柄灵芝的研究还比较少。本研究对从西藏获得的野生有柄灵芝菌株进行了生物学特性研究,得出有柄灵芝菌丝的最适生长条件,同时开展了驯化栽培试验,并对出芝的子实体进行了成分测定,为充分保护利用该类真菌资源提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

有柄灵芝 *Ganoderma gibbosum* 菌株采自西藏墨脱,通过组织分离法分离纯化获得,现保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究所在菌种库。

1.1.2 培养基质

PDA 综合培养基:去皮马铃薯 200.0 g,琼脂粉 20.0 g,葡萄糖 20.0 g,蛋白胨 2.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, MgSO_4 1.5 g,蒸馏水定容至 1.0 L, pH 自然。碳源培养基:碳源 20.0 g,琼脂粉 20.0 g,蛋白胨 2.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, MgSO_4 1.5 g,蒸馏水定容至 1.0 L, pH 自然。氮源培养基:氮源 2.0 g,琼脂粉 20.0 g,葡萄糖 20.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, MgSO_4 1.5 g,蒸馏水定容至 1.0 L, pH 自然。原种培养基:小麦粒 98%,石膏粉 2%,用 200 mL 菌种瓶装料,121 °C、灭菌 2 h。栽培种

配方:杂木屑 58%、麦麸 20%、玉米芯 20%、石灰和石膏各 1%,含水量 65%,用 18 cm×36 cm 聚丙烯菌袋装料,121 °C、灭菌 2 h。

1.2 分子生物学鉴定

用 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)基因组提取试剂盒(北京艾德莱生物科技公司),依据说明书提取标本基因组 DNA,选取通用引物 ITS4 和 ITS5 对 ITS 片段进行 PCR 扩增,随后将 PCR 产物送至生物公司,得到测序结果在 NCBI 中进行 Blast 比对分析(王军芳等 2023)。

1.3 菌种活化

将低温保藏的有柄灵芝菌丝从斜面接种至 PDA 综合培养基平板上,25 °C 暗培养。当菌丝长满平板的 90% 时,使用内径为 6 mm 的打孔器在平板边缘同一半径位置打孔,得到大小一致的完整菌饼待用。

1.4 生物学特性研究

1.4.1 碳源单因子试验

设置葡萄糖、果糖、乳糖、甘露糖、淀粉、蔗糖和麦芽糖为不同碳源,以不添加碳源为空白对照。将大小一致的菌饼接种至平板中央,放置 25 °C 的培养箱中暗培养,每 24 h 观察并记录菌丝生长情况,包括菌丝的长势、颜色、形态,直至菌丝长满培养皿的 90%。

1.4.2 氮源单因子试验

设置蛋白胨、尿素、酵母、 NaNO_3 、 NH_4NO_3 、 KNO_3 和 NH_4Cl 为不同氮源处理,以不添加氮源为空白对照,试验操作方法同碳源单因子试验。

1.4.3 pH 单因子试验

设置 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 共 5 个梯度,使用 1.0 mol/L HCl 和 NaOH 调节 PDA 综合培养基的 pH,测量仪器为 pHSJ-3F 实验室 pH 计。试验操作方法同碳源单因子试验。

1.4.4 温度单因子试验

设置温度为 15、20、25、30、35 和 40 °C 共 6 个梯度,将大小一致的菌饼接种至由 PDA 综合培养基制成的平板中央,暗培养,观察并记录

菌丝生长情况。

1.4.5 正交试验

根据单因素试验结果,每个因素中选择最优的 3 个水平进行 4 因素 3 水平的正交试验,设计方案见表 1。试验操作方法同碳源单因子试验。

表 1 正交试验各因子水平

Table 1 The levels of factors of the orthogonal design

水平 Level	因子 Factor			
	碳源 Carbon source	氮源 Nitrogen source	pH	温度 Temperature (°C)
1	淀粉 Starch	酵母 Yeast	8.0	20
2	甘露糖 Mannose	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	9.0	25
3	果糖 Fructose	氯化铵 NH ₄ Cl	7.0	30

1.5 驯化栽培试验

将有柄灵芝菌丝接种至原种培养瓶中,放入 25 °C恒温培养箱中暗培养,待菌丝爬满即可接种到栽培菌袋中,放置室温遮光处培养,培养期间需及时记录菌丝生长情况以及是否污染,待菌丝体长满菌袋,采用覆土法进行出芝试验。

1.6 成分测定

将驯化栽培出菇的子实体进行成分测定,灵芝多糖、三萜化合物测定方法参照《中国药典(2020 年版一部,灵芝 196 页)》(国家药典委员会 2020)。16 种氨基酸(天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸)含量测定方法参照 GB5009.124—2016 (食品安全国家标准食品中氨基酸的测定 2016)。

1.7 数据处理

试验过程中观察菌丝生长情况、并作详细记录。在生物学特性研究中,每个处理均设置 8 组平行,用十字交叉法测量菌丝直径,采用

SPSS 27.01 统计软件进行数据分析, Graphpad Prism 8.0、Microsoft Excel 软件作图。

2 结果与分析

2.1 分子生物学鉴定

将测序得到的野生菌株 ITS 序列提交至 GenBank,得到序列号 OQ457018,在 NCBI 数据库中进行比对,比对结果显示与 *G. gibbosum* MK345432.1 相似度达到 99.53%,与 *G. gibbosum* MK280717.1 相似度达到 99.52%,与 *G. gibbosum* EU273513.1 相似度达到 99.52%,结合形态学的观察可以判定为有柄灵芝。

2.2 生物学特性

2.2.1 不同碳源对有柄灵芝菌丝生长的影响

野生有柄灵芝菌丝在不同碳源处理下均可生长,但有所差异(图 1A,图 2,表 2)。淀粉为碳源时,长势最好,菌丝最浓密,生长速度为(8.76±0.87) mm/d;甘露糖、果糖、蔗糖长势增速次之;葡萄糖、麦芽糖与乳糖为碳源时,长势不理想;麦芽糖与乳糖为碳源时,菌丝稀疏,生长速度甚至低于空白对照组[(5.68±0.44) mm/d]。综合菌丝的长势、生长速度及数据分析,淀粉明显优于其他处理,为最适有柄灵芝菌丝生长的碳源。

2.2.2 不同氮源对有柄灵芝菌丝生长的影响

野生有柄灵芝菌丝在不同氮源处理下均可生长,但有所差异(图 1B,图 2,表 2)。酵母为氮源时,菌丝浓密、长势旺盛,生长速度最快,达到(8.57±0.53) mm/d; NH₄NO₃ 次之;蛋白胨为氮源时,菌丝生长速度最慢,但菌丝较为粗壮;尿素与蛋白胨为氮源时,菌丝的生长速度甚至低于空白对照[(5.04±0.22) mm/d]。综合菌丝的长势、生长速度及数据分析,酵母为最适有柄灵芝菌丝的氮源。

2.2.3 pH 对有柄灵芝菌丝生长的影响

野生有柄灵芝菌丝在不同 pH 处理下均可生长,菌丝浓密,长势基本一致,生长速度

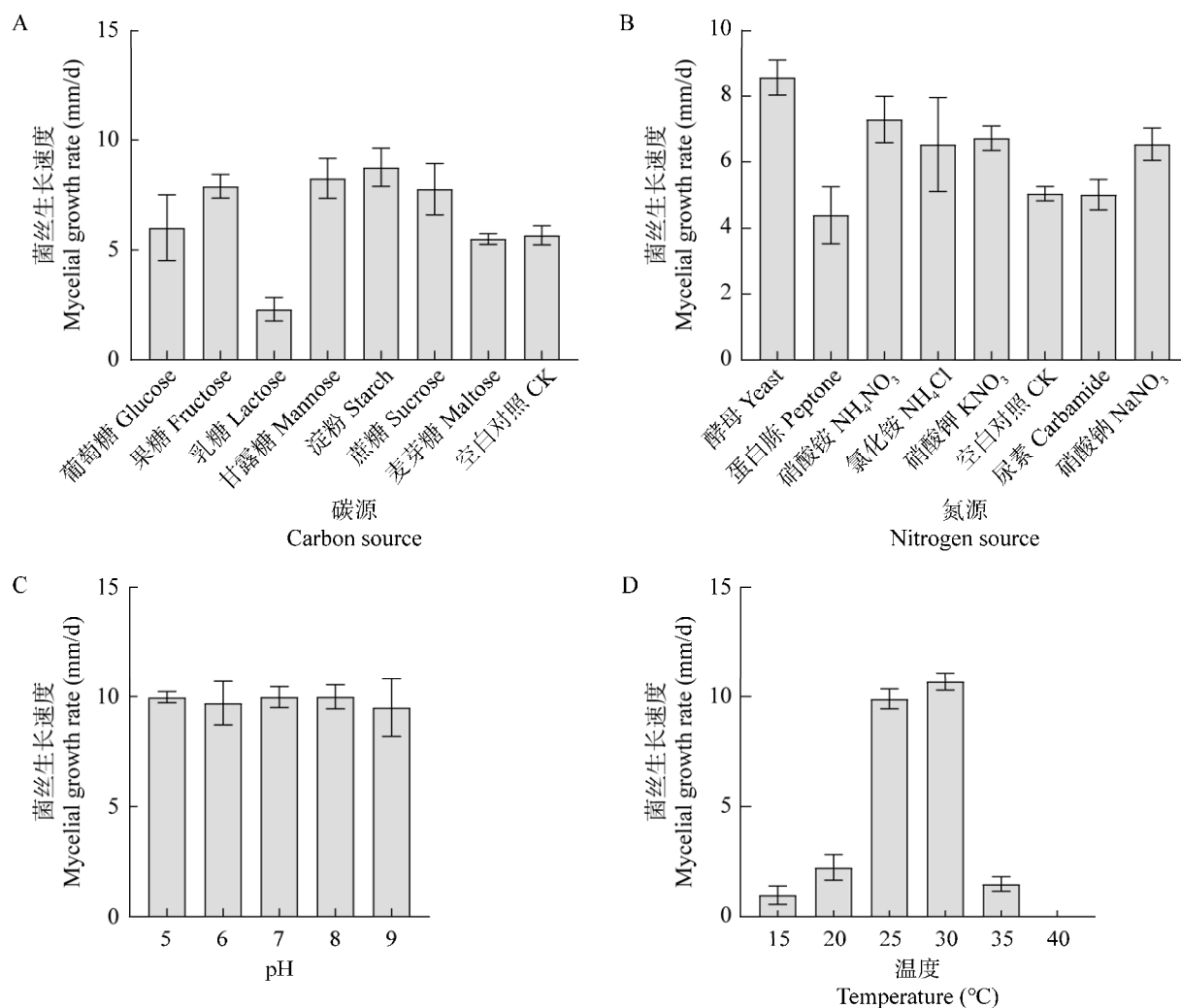


图1 不同单因子条件对有柄灵芝菌丝生长速度的影响 A: 碳源. B: 氮源. C: pH. D: 温度

Fig. 1 The effects of different single factor on the mycelial growth of *Ganoderma gibbosum*. A: Carbon source. B: Nitrogen source. C: pH. D: Temperature.

由大到小依次排序为 8.0 [(10.00±0.55) mm/d]、7.0 [(9.98±0.47) mm/d]、5.0 [(9.97±0.26) mm/d]、6.0 [(9.70±1.00) mm/d]和 9.0 [(9.50±1.31) mm/d]，经数据分析，发现生长速度无显著性差异(图 1C，图 2，表 2)。因此，酸碱环境对于有柄灵芝菌丝的生长影响不大。

2.2.4 温度对有柄灵芝菌丝生长的影响

野生有柄灵芝菌丝在不同温度处理下均可生长，随着温度的上升，其长速和长势呈现先增高后下降的趋势(图 1D，图 2，表 2)，生长速度由大到小依次排序为 30 $^{\circ}\text{C}$ >25 $^{\circ}\text{C}$ >20 $^{\circ}\text{C}$ >35 $^{\circ}\text{C}$ >15 $^{\circ}\text{C}$ ，在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时，有柄灵芝不生长；30 $^{\circ}\text{C}$ 时，

菌丝生长速度达到(10.70±0.39) mm/d，且菌丝浓密；其次为 25 $^{\circ}\text{C}$ ，菌丝较浓密，生长速度为(9.90±0.46) mm/d。综合菌丝的长势、生长速度及数据分析，选取 30 $^{\circ}\text{C}$ 为最适有柄灵芝菌丝生长的温度。

2.2.5 正交试验结果分析

考虑到不同因子间的相互影响，在单因子试验结果的基础上，选取最佳碳源、氮源、pH 和温度进行 4 因子 3 水平正交试验(表 3)。碳源、氮源、pH 和温度这 4 个因子的极差 R 分别为 3.99、3.91、1.47 和 5.82，所以这 4 个因子中，温度对有柄灵芝菌丝生长的影响最大，其次是碳

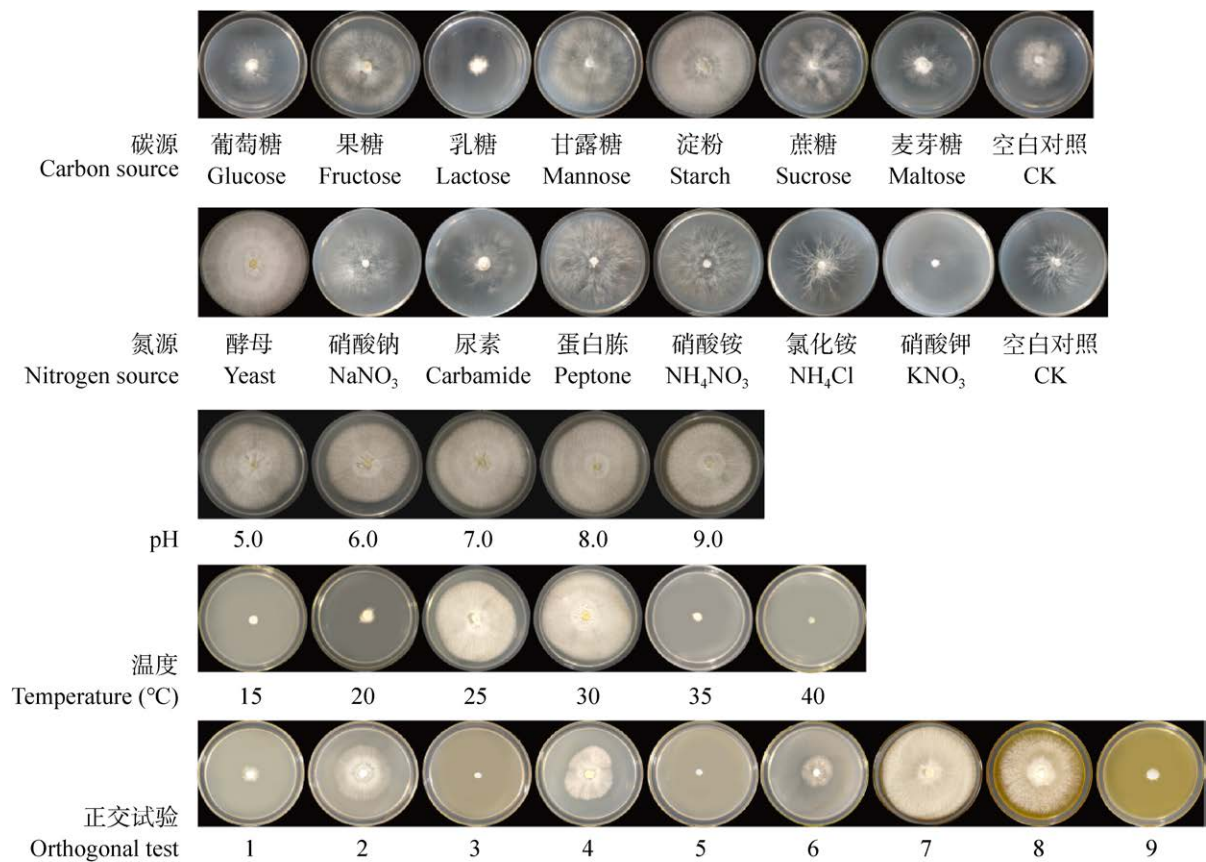


图 2 不同条件对有柄灵芝菌丝生长的影响
Fig. 2 The effects of different conditions on the mycelial growth of *Ganoderma gibbosum*.

源和氮源，影响最小的是 pH，这与单因子试验也相吻合。碳源均值由大到小依次为 k3、k1、k2，氮源均值由大到小依次为 k1、k2、k3，pH 均值由大到小依次为 k3、k1、k2，温度均值由大到小依次为 k2、k3、k1，可见，最佳组合为 A₃B₁C₃D₂，即果糖、酵母、pH 7.0、温度 25 °C，此时效果显著。

正交试验方差分析结果显示(表 4)，碳源、氮源、pH 和温度对有柄灵芝菌丝的生长影响极其显著($P<0.01$)，其中温度的影响最大，其次是碳源、氮源和 pH。方差分析的结果与上述分析的结果一致。

2.3 驯化栽培

接种后，放入 25 °C 黑暗培养，空气相对湿度 65%，约 40 d 菌丝长满袋。菌包长满菌袋后，去掉塑料袋放置盆中，覆土约 1 cm，土壤保持

湿润状态。温度在 26–30 °C，加大湿度，使空气相对湿度保持在 85%–90%，10 d 左右形成原基。从长出原基到子实体成熟一般需要 45–50 d (图 3)，当子实体菌盖颜色变褐，边缘不再生长即可采收。

2.4 成分测定

经检测，栽培出芝的有柄灵芝含有丰富的氨基酸、多糖以及三萜类化合物(表 5)。其中氨基酸总含量高达 10.8%，人体必需氨基酸有 7 种，分别为蛋氨酸(1.85%)、亮氨酸(0.82%)、苏氨酸(0.62%)、缬氨酸(0.57%)、赖氨酸(0.56%)、苯丙氨酸(0.54%)和异亮氨酸(0.53%)，总必需氨基酸含量 5.49%，非必需氨基酸含量 5.31%。根据世界卫生组织/联合国粮食及农业组织要求，在蛋白质营养评价中必需氨基酸/氨基酸比值应在 0.4 左右，必需氨基酸/非必需氨基酸比值应为 0.6

表 2 不同单因子条件对有柄灵芝菌丝生长的影响

Table 2 The effects of various single factors on the mycelial growth of *Ganoderma gibbosum*

培养条件 Condition	因子 Factor	菌丝生长速度 Mycelial growth rate (mm/d)	显著性 Significance		菌丝长势 Mycelial growth vigor
			0.05	0.01	
碳源 Carbon source	葡萄糖 Glucose	6.02±1.49	b	B	++
	果糖 Fructose	7.89±0.54	a	A	+++
	乳糖 Lactose	2.31±0.53	c	c	+
	甘露糖 Mannose	8.26±0.91	a	A	+++
	淀粉 Starch	8.76±0.87	a	A	++++
	蔗糖 Sucrose	7.76±1.17	a	A	+++
	麦芽糖 Maltose	5.52±0.25	b	B	++
	碳源空白对照 CK	5.68±0.44	b	B	++
氮源 Nitrogen source	酵母 Yeast	8.57±0.53	a	A	++++
	硝酸钠 NaNO ₃	6.54±0.49	b	B	++
	尿素 Carbamide	5.01±0.46	c	C	++
	蛋白胨 Peptone	4.39±0.86	c	D	+++
	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	7.29±0.70	b	B	+++
	氯化铵 NH ₄ Cl	6.53±1.42	b	B	++
	硝酸钾 KNO ₃	6.72±0.37	b	B	+
	氮源空白对照 CK	5.04±0.22	c	C	++
pH	5.0	9.97±0.26	a	A	++++
	6.0	9.70±1.00	a	A	++++
	7.0	9.98±0.47	a	A	++++
	8.0	10.00±0.55	a	A	++++
	9.0	9.50±1.31	a	A	++++
温度(°C) Temperature	15	0.98±0.42	d	D	+
	20	2.24±0.58	c	C	+
	25	9.90±0.46	b	B	+++
	30	10.70±0.39	a	A	++++
	35	1.48±0.33	d	CD	+
	40	0.00±0.00	e	E	—

—代表菌丝不生长；+代表菌丝极稀疏；++代表菌丝稀疏；+++代表菌丝浓密；++++代表菌丝极浓密；同列内不同小写字母和大写字母分别代表差异显著($P<0.05$)和差异极显著($P<0.01$)，下同

—, no growth; +, very weak growth; ++, weak growth; +++, vigorous growth; +++, very vigorous growth. Different lowercase and uppercase letters in the same column represent significant differences ($P<0.05$) and extremely significant differences ($P<0.01$), respectively. The same below.

以上(罗晓莉等 2021)。本试验栽培出芝的有柄灵芝 EAA/TAA 和 EAA/NAA 分别为 50.83%和 108.00%，高于 FAO/WHO 推荐的理想蛋白质模式。灵芝多糖含量为 1.51%，大于 0.90%，三萜(以齐墩果酸计)含量为 0.72%，大于 0.50%，符合中华人民共和国药典标准(国家药典委员会 2015)。

3 讨论

本研究在前人基础上，采用菌丝生长速度、菌丝长势等指标对已采自西藏墨脱的一株野生灵芝进行了生物学特性的综合分析评价，最终确定了菌丝生长的最佳碳源为果糖，氮源为酵母，适宜温度为 25 °C，适宜 pH 为 7.0。

表 3 正交试验结果

Table 3 The results of the orthogonal test

试验号 Test No.	因子 Factor				菌丝生长速度 Mycelial growth rate (mm/d)	显著性 Significance		菌丝长势 Mycelial growth vigor
	碳源 Carbon source	氮源 Nitrogen source	pH	温度 Temperature (°C)		0.05	0.01	
1	淀粉 Starch	酵母 Yeast	8	20	1.91±0.63	ef	DE	+
2	淀粉 Starch	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	7	25	8.19±1.25	b	B	++
3	淀粉 Starch	氯化铵 NH ₄ Cl	9	30	0.89±0.43	fg	E	+
4	甘露糖 Mannose	酵母 Yeast	7	30	5.96±1.50	c	C	++
5	甘露糖 Mannose	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	8	20	0.59±0.25	g	E	+
6	甘露糖 Mannose	氯化铵 NH ₄ Cl	9	25	3.51±0.61	d	D	++
7	果糖 Fructose	酵母 Yeast	9	25	10.83±0.51	a	A	++++
8	果糖 Fructose	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	8	30	8.61±2.03	b	B	++++
9	果糖 Fructose	氯化铵 NH ₄ Cl	7	20	2.57±0.21	de	D	+
K1	76.98	130.96	98.24	35.53				
K2	70.40	121.79	86.21	157.74				
K3	154.13	48.76	117.05	108.24				
k1	3.67	6.24	4.68	1.69				
k2	3.35	5.80	4.11	7.51				
k3	7.34	2.32	5.57	5.15				
R	3.99	3.91	1.47	5.82				

表 4 正交试验方差分析

Table 4 The analysis of variance for the orthogonal test

来源 Source	离差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
碳源 Carbon source	206.442 4	2	103.221 2	100.499 7	0.000 0	*
氮源 Nitrogen source	193.254 6	2	96.627 3	94.079 7	0.000 0	*
pH	23.003 8	2	11.501 9	11.198 6	0.000 1	*
温度 Temperature	359.865 0	2	179.932 5	175.188 5	0.000 0	*
误差 Error	55.462 3	54	1.027 1			
总计 Total	838.028 1	62				

*代表差异极显著(P<0.01)

*Represents an extremely significant difference (P<0.01).

将该结果与表 6 中其他 5 种灵芝(灵芝 *Ganoderma lucidum*、四川灵芝 *Ganoderma sichuanense*、韦伯灵芝 *Ganoderma weberianum*、白肉灵芝 *Ganoderma leucocontextum* 和鹿角灵芝 *Ganoderma cf. amboinense*) 10 个菌株的最适生长条件进行了对比(陈向东等 2010; 梁志群和陈子武 2011; 王庆武等 2015; 张国广等 2015;

陈旭等 2016; 莫伟鹏等 2017; 马博等 2019; 蒋帅等 2021; 刘冬梅等 2022; 钱坤等 2022)。结果发现: 对于碳源, 本研究单因素试验中最适为淀粉, 淀粉、甘露糖、果糖和蔗糖为碳源时, 有柄灵芝菌丝长速、长势都较好, 无显著性差异, 均能用于菌丝的培养, 说明有柄灵芝对碳源的利用范围较广泛, 可利用单糖、双糖和多糖, 进一

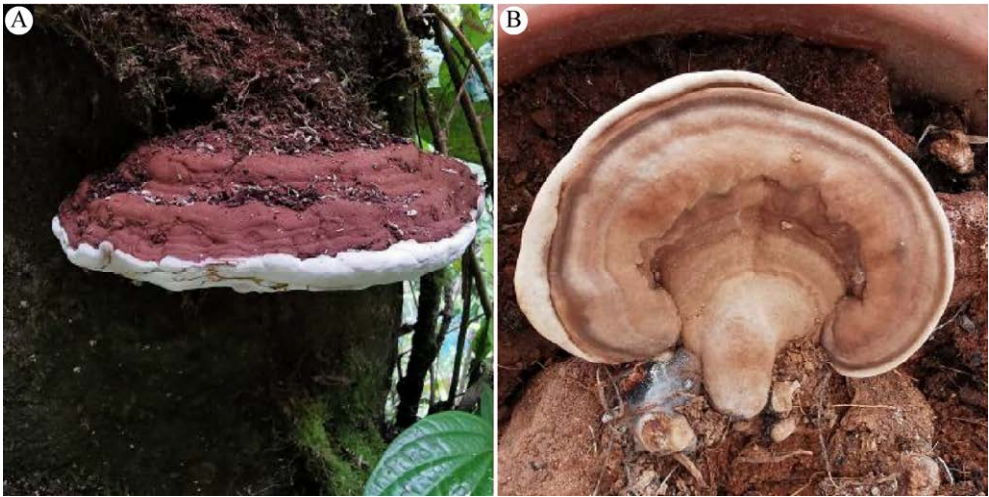


图 3 有柄灵芝野生子实体(A)和驯化子实体(B)
Fig. 3 Basidiomata of wild *Ganoderma gibbosum* (A) and cultivated basidiomata (B).

表 5 分析检测结果
Table 5 Analyzed test results

成分 Ingredient		含量 Functional component content (%)		
		有柄灵芝 <i>Ganoderma gibbosum</i>	赤芝 1 号 <i>Ganoderma lingzhi</i> No. 1	赤芝 5 号 <i>Ganoderma lingzhi</i> No. 5
必需氨基酸 Essential amino acid (EAA)	苯丙氨酸 Phe	0.54	0.51	0.37
	蛋氨酸 Met	1.85	3.57	3.92
	赖氨酸 Lys	0.56	0.43	0.31
	亮氨酸 Leu	0.82	0.73	0.66
	苏氨酸 Thr	0.62	0.51	0.41
	缬氨酸 Val	0.57	0.49	0.4
	异亮氨酸 Ile	0.53	0.43	0.35
	丙氨酸 Ala	0.66	0.54	0.42
非必需氨基酸 Non-essential amino acid (NEAA)	脯氨酸 Pro	0.46	0.34	0.27
	甘氨酸 Gly	0.58	0.44	0.35
	谷氨酸 Glu	1.06	0.88	0.85
	精氨酸 Arg	0.46	0.36	0.26
	酪氨酸 Tyr	0.27	0.29	0.15
	丝氨酸 Ser	0.57	0.47	0.38
	天冬氨酸 Asp	1.04	0.81	0.65
	组氨酸 His	0.21	0.18	0.11
必需氨基酸 EAA		5.49	6.67	6.42
非必需氨基酸 NEAA		5.31	4.31	3.44
16 种氨基酸总量 Total content of 16 amino acids		10.8	11	9.87
灵芝多糖 Polysaccharide		1.51	1.5	1.07
三萜(以齐墩果酸计) Triterpenoids (in terms of oleanolic acid)		0.72	2.35	1.34

表 6 野生有柄灵芝与其他灵芝属真菌菌丝生长最佳条件的对比
Table 6 A comparison of the optimal conditions for the mycelial growth of wild *Ganoderma gibbosum* and other *Ganoderma* species

种类	碳源	氮源	pH	温度	参考文献
Species	Carbon source	Nitrogen source		Temperature (°C)	References
灵芝	葡萄糖, 蔗糖	酵母	6.0	30	刘冬梅 等 2022
<i>Ganoderma lingzhi</i>	Glucose, sucrose	Yeast			Liu <i>et al.</i> 2022
泰山赤灵芝	葡萄糖, 蔗糖, 淀粉	酵母, 牛肉膏	6.0–7.0	25–30	王庆武 等 2015
<i>G. lucidum</i>	Sucrose, glucose, starch	Yeast, beef extract			Wang <i>et al.</i> 2015
四川灵芝	麦芽糖	牛肉膏	7.0	30	钱坤 等 2022
<i>G. sichuanense</i>	Maltose	Beef extract			Qian <i>et al.</i> 2022
韦伯灵芝	糊精	酵母	6.0	28–30	蒋帅 等 2021
<i>G. weberianum</i>	Dextrin	Yeast			Jiang <i>et al.</i> 2021
白肉灵芝	蔗糖, 淀粉	酵母, 牛肉膏	3.0	25	莫伟鹏 等 2017
<i>G. leucocontextum</i>	Sucrose, starch	Yeast, beef extract			Mo <i>et al.</i> 2017
鹿角灵芝	淀粉	蛋白胨	6.0	30	陈旭 等 2016
<i>G. amboinense</i>	Starch	Peptone			Chen <i>et al.</i> 2016
有柄灵芝	葡萄糖, 麦芽糖	蛋白胨	4.5–7.0	28–32	梁志群和陈子武 2011
<i>G. gibbosum</i>	Glucose, maltose	Peptone			Liang & Chen 2011
	葡萄糖, 果糖	酵母	5.5	28	张国广 等 2015
	Glucose, fructose	Yeast			Zhang <i>et al.</i> 2015
	蔗糖	酵母	5.5	25	陈向东 等 2010
	Sucrose	Yeast			Chen <i>et al.</i> 2010
	葡萄糖, 果糖	酵母	5.5	30	马博 等 2019
	Glucose, fructose	Yeast			Ma <i>et al.</i> 2019
	果糖	酵母	7.0	25	本研究
	Fructose	Yeast			The present study

步正交试验得出最适碳源为果糖, 对比其他 5 种灵芝, 灵芝最适碳源为葡萄糖或淀粉, 四川灵芝为麦芽糖, 韦伯灵芝为糊精、白肉灵芝为蔗糖和淀粉, 鹿角灵芝为淀粉, 灵芝属对单糖、双糖以及多糖的利用, 进一步说明灵芝属对碳源利用的广泛性。对于氮源, 本研究与灵芝、泰山赤灵芝、韦伯灵芝和白肉灵芝的最适氮源一致, 均为酵母, 其他灵芝属最适氮源也均为有机氮, 这说明有机氮能更好地维持菌丝的生长, 同时有机氮还可以作为氮源来利用, 促进了营养平衡及物质转化(张松 2000)。在 pH 对菌丝生长影响的单因子试验中, 本研究中的有柄灵芝菌丝在 pH 5.0–9.0 均可生长, 酸碱环境对有柄灵芝生长影响不大, 无显著性差异, 进一步综合多因子分析, 有柄灵芝最适 pH 为 7.0, 与四川灵芝和泰山赤灵芝最适 pH 一致, pH 在多因子分析时影响显著, 说

明各因子之间对有柄灵芝的生长发育有协同作用。在单因子温度试验中, 随着温度的升高, 菌丝的长速和长势呈现先上升后下降的趋势, 在 25–30 °C 时生长状态最佳, 灵芝属的最适温度都在 25–30 °C, 说明灵芝属适应较高温度, 适合在热带地区种植。

将本试验结果与前人研究的有柄灵芝进行对比(表 6)发现, 张国广等(2015)和马博等(2019)研究的最适碳源为葡萄糖或果糖, 与本试验的最适碳源果糖一致; 陈向东等(2010)、张国广等(2015)和马博等(2019)研究的最佳氮源为酵母, 与本试验结果一致; 陈向东等(2010)研究发现有柄灵芝的最适温度 25 °C, 与本试验结果一致; 本试验最适 pH 为 7.0, 中性, 与其他各研究中 pH 偏酸的结果不同(陈向东等 2010; 梁志群和陈子武 2011; 张国广等 2015; 马博等 2019)。

在正交试验中,根据极差 R 值大小,判断影响有柄灵芝菌丝生长的因素由大到小依次为温度、碳源、氮源和 pH。温度是影响有柄灵芝菌丝生长的主要因素, pH 对菌丝生长的影响最小,野生有柄灵芝生境不同产生的个体差异、基础培养基成分的不同以及一些人为因素都可能导致试验结果的不同。

经驯化出菇后,测定该灵芝含有 16 种氨基酸、灵芝多糖以及三萜活性成分,包含了药用真菌的主要活性指标,必需氨基酸/氨基酸总量、必需氨基酸/非必需氨基酸各项指标均高于 FAO/WHO (1973)推荐的理想蛋白质模式,灵芝多糖含量大于 0.90%,三萜(以齐墩果酸计)含量大于 0.50%。本研究中有柄灵芝的氨基酸总量和灵芝多糖含量与 2 种赤芝氨基酸和多糖含量相当或稍高,值得进一步研究开发。

灵芝具有广泛的生物活性,逐渐被应用到保健、护肤及饮料等行业中,走进大众的视野。现代药理学研究表明,其相关成分具有免疫调节、抗肿瘤、抗惊厥和降血脂等药理作用(杨锦生 2012),能够用于预防和治疗各种内科疾病(谢溢坤等 2021)。同时,有柄灵芝还能产生木质纤维素降解酶,该酶在生物燃料、造纸纺织、食品及洗涤剂等领域都得到了应用(李烜琦 2021)。鉴于有柄灵芝可人工驯化栽培,其子实体的必需氨基酸比例适宜,活性成分丰富,因此具有较大的开发潜力。

[REFERENCES]

Chen TQ, Xu J, Wu JZ, 2004. Analysis and comparison of amino acids in the fruitbody of wild and log-cultivated lingzhi in Fujian. *Strait Pharmaceutical Journal*, 16(5): 1-4 (in Chinese)

Chen X, Zeng Q, Zhu SL, Du MY, Liu PY, Yang RD, Wei SY, 2016. Mycelium biological characteristics of GL11 *Ganoderma amboinense* strain. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 29(9): 2212-2215 (in Chinese)

Chen XD, Zeng NK, Lan J, 2010. Cultural characteristics of

mycelia of *Ganoderma gibbosum*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 35(15): 1939-1942 (in Chinese)

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015. *Pharmacopoeia of People's Republic of China*. Chemical Industry Press, Beijing. 188-189 (in Chinese)

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. *Pharmacopoeia of People's Republic of China*. Chinese Medicine Science and Technology Press, Beijing. 196 (in Chinese)

Cui BK, Pan XH, Pan F, Sun YF, Xing JH, Dai YC, 2023. Species diversity and resources of *Ganoderma* in China. *Mycosystema*, 42(1): 170-178 (in Chinese)

Dai YC, 2023. Research progress on polypore domesticated cultivation in China. *Journal of Fungal Research*, 21(1/2/3): 151-156 (in Chinese)

Dai YC, Liu HG, Wu F, Si J, Yuan Y, He SH, Cui BK, Zhou M, Zhou M, 2022. Resources and diversity of wood-decaying fungi in Yunnan. Science Press, Beijing. 1-574 (in Chinese)

Feng YH, Yu SJ, 2002. A physiological active substance—*Ganoderma* polysaccharides. *Journal of Wuhan Polytechnic University*, 21(3): 19-21 (in Chinese)

Jiang S, Bi JH, Fan YG, Zeng NK, 2021. Cultural characteristics of mycelia of *Ganoderma weberianum*. *Guizhou Sciences*, 39(4): 33-37 (in Chinese)

Li PZ, Zhang KC, 2000. Isolation, purification and bioactivities of exopolysaccharides from fermented broth of *Ganoderma lucidum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 40(2): 217-220 (in Chinese)

Li XQ, 2021. Study on screening and application of lignocellulose degrading bacteria. Master Thesis, Jilin University, Changchun. 1-58 (in Chinese)

Liang ZQ, Chen ZW, 2011. Study on the biological characteristics of mycelium of *Ganoderma gibbosum*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(18): 164-167 (in Chinese)

Liu DM, Sun XY, Yan BY, Chen ZQ, Diao WT, Liang CY, 2022. Isolation, identification and biologic characteristics analysis of a wild strain of *Ganoderma lucidum*. *Edible Fungi of China*, 41(11): 18-23 (in Chinese)

Luo XL, Zhang SS, Yan M, Zhang WS, Sun DF, 2021. Protein and amino acid analysis and nutritional value evaluation of eight cultivation edible fungi in Yunnan province. *The Food Industry*, 42(8): 328-332 (in Chinese)

Luo Y, Chen L, Zhang XL, Lan J, Wei F, Sun XB, 2021.

- Research progress of pharmacological activities of triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. Chinese Pharmacological Bulletin, 37(9): 1185-1188 (in Chinese)
- Ma B, Wang K, Zhou S, Zhang TT, Feng BC, 2019. Identification, biological characteristics and lignocellulose-degrading enzyme activity assay of a wild *Ganoderma* sp. strain BSU01. Genomics and Applied Biology, 38(3): 1109-1116 (in Chinese)
- Mo WP, Liu YC, Hu HP, Huang LH, Liang XW, Xie YZ, Tamdrin T, 2017. Preliminary study on biological characteristics of *Ganoderma leucocontextum*. Edible Fungi of China, 36(6): 33-38 (in Chinese)
- National Health and Family Planning Commission, 2016. National food safety standard determination of amino acids in food. China Standard Press, Beijing. 1-8 (in Chinese)
- Qi C, Zhou H, Si JP, Liu JJ, Zhang XF, 2012. Analysis of the main active ingredients from different varieties of *Ganoderma lucidum*. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 18(17): 96-100 (in Chinese)
- Qian K, Wu DM, Wang H, Sun YF, Si J, Cui BK, 2022. Biological characteristics and antioxidant activities of wild *Ganoderma sichuanense*. Mycosystema, 41(4): 601-617 (in Chinese)
- Wang CC, 2018. Research status of components and functions of *Ganoderma lucidum*. China Fruit & Vegetable, 38(8): 45-47, 53 (in Chinese)
- Wang F, Yu Y, Wang N, Li YJ, Wang P, Huo YL, Gong GH, 2022. Research progress of *Ganoderma lucidum* resources. Special Economic Animals and Plants, 25(1): 57-60 (in Chinese)
- Wang JF, Song GY, Gao Y, Song ZK, Ma HX, 2023. Biological characteristics and domestic cultivation of wild *Pleurotus tuber-regium*. Mycosystema, 42(1): 395-407 (in Chinese)
- Wang MC, Zhang XL, Chen XD, Lan J, Wei F, Luo Y, Sun XB, 2022. Anti-tumor effect and mechanisms of triterpenoids and polysaccharides in *Ganoderma lucidum*. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 28(5): 234-241 (in Chinese)
- Wang QW, Lan YF, An XR, 2015. Study on biological characteristics of Taishan *Ganoderma lucidum*. Shandong Agricultural Sciences, 47(11): 64-67 (in Chinese)
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98(1): 1-76
- Xie YK, Zhang J, Yu Q, Yan CY, 2021. Advances in studies on polysaccharides from *Ganoderma* and their biological activities. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 52(17): 5414-5429 (in Chinese)
- Yang JS, 2012. Research progress of chemical compositions and pharmacological effects of *Ganoderma lucidum*. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 30(4): 906-907 (in Chinese)
- Zhang GG, Lu WP, Lin LZ, Zou JM, 2015. Isolation identification, mycelial cultivation characteristics and artificial cultivation of a wild *Ganoderma gibbosum* strain. Northern Horticulture, 39(22): 153-157 (in Chinese)
- Zhang S, 2000. Mushroom science. South China University of Technology Press, Guangzhou. 1-216 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 陈体强, 徐洁, 吴锦忠, 2004. 福建省常见灵芝的氨基酸分析比较. 海峡药学, 16(5): 1-4
- 陈旭, 曾茜, 朱森林, 杜慕云, 刘璞玉, 杨仁德, 魏善元, 2016. 灵芝南 GL11 菌丝的生物特性. 西南农业学报, 29(9): 2212-2215
- 陈向东, 曾念开, 兰进, 2010. 药用真菌有柄树舌菌丝培养特性的研究. 中国中药杂志, 35(15): 1939-1942
- 崔宝凯, 潘新华, 潘峰, 孙一翡, 邢佳慧, 戴玉成, 2023. 中国灵芝属真菌的多样性与资源. 菌物学报, 42(1): 170-178
- 戴玉成, 2023. 中国多孔菌驯化栽培研究进展. 菌物研究, 21(1/2/3): 151-156
- 戴玉成, 刘鸿高, 吴芳, 司静, 员媛, 何双辉, 崔宝凯, 周萌, 2022. 云南木材腐朽真菌资源和多样性. 北京: 科学出版社. 1-574
- 丰永红, 于淑娟, 2002. 一种生理活性物质——灵芝多糖. 武汉工业学院学报, 21(3): 19-21
- 国家卫生和计划生育委员会, 2016. 食品安全国家标准食品中氨基酸的测定. 北京: 中国标准出版社. 1-8
- 国家药典委员会, 2015. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社. 188-189
- 国家药典委员会, 2020. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社. 196
- 蒋帅, 毕家豪, 范宇光, 曾念开, 2021. 药用真菌韦伯灵

- 芝菌丝培养特性的研究. 贵州科学, 39(4): 33-37
- 李平作, 章克昌, 2000. 灵芝胞外多糖的分离纯化及生物学活性. 微生物学报, 40(2): 217-220
- 李烜琦, 2021. 木质纤维素降解菌的筛选及其应用研究. 吉林大学硕士论文, 长春. 1-58
- 梁志群, 陈子武, 2011. 有柄灵芝菌丝生物学特性研究. 中国农学通报, 27(18): 164-167
- 刘冬梅, 孙雪言, 严碧云, 陈泽群, 刁文彤, 梁呈元, 2022. 1株野生灵芝的分离鉴定及生物学特性分析. 中国食用菌, 41(11): 18-23
- 罗晓莉, 张沙沙, 严明, 张微思, 孙达锋, 2021. 云南8种栽培食用菌蛋白质和氨基酸分析及营养价值评价. 食品工业, 42(8): 328-332
- 罗云, 陈霖, 张雪涟, 兰进, 魏菲, 孙晓波, 2021. 灵芝三萜类成分药理活性研究进展. 中国药理学通报, 37(9): 1185-1188
- 马博, 王凯, 周树, 张婷婷, 冯邦朝, 2019. 野生灵芝BSU01的分离鉴定、生物学特性及其木质纤维素酶活分析. 基因组学与应用生物学, 38(3): 1109-1116
- 莫伟鹏, 刘远超, 胡惠萍, 黄龙花, 梁晓薇, 谢意珍, 旦真次仁, 2017. 白肉灵芝菌丝体生物学特性的初步研究. 中国食用菌, 36(6): 33-38
- 齐川, 周慧, 斯金平, 刘京晶, 张新风, 2012. 不同品种灵芝主要活性成分分析. 中国实验方剂学杂志, 18(17): 96-100
- 钱坤, 武冬梅, 王豪, 孙一翥, 司静, 崔宝凯, 2022. 野生四川灵芝的生物学特性和抗氧化活性. 菌物学报, 41(4): 601-617
- 王朝川, 2018. 灵芝成分及功能的研究现状. 中国果菜, 38(8): 45-47, 53
- 王飞, 于娅, 王娜, 李艳军, 王鹏, 霍云龙, 宫国辉, 2022. 灵芝种质资源评价研究进展. 特种经济动植物, 25(1): 57-60
- 王军芳, 宋国月, 高悦, 宋子坤, 马海霞, 2023. 野生菌核侧耳生物学特性及驯化栽培. 菌物学报, 42(1): 395-407
- 王梦晨, 张雪涟, 陈向东, 兰进, 魏菲, 罗云, 孙晓波, 2022. 灵芝三萜与灵芝多糖抗肿瘤作用及其机制研究进展. 中国实验方剂学杂志, 28(5): 234-241
- 王庆武, 兰玉菲, 安秀荣, 2015. 泰山赤灵芝菌株生物学特性研究. 山东农业科学, 47(11): 64-67
- 谢溢坤, 张静, 余茜, 严春艳, 2021. 灵芝多糖类成分及其生物活性研究进展. 中草药, 52(17): 5414-5429
- 杨锦生, 2012. 灵芝主要化学成分及其药理作用研究述评. 中华中医药学刊, 30(4): 906-907
- 张国广, 卢文朋, 林溜章, 邹金美, 2015. 一株野生有柄树舌的鉴定、菌丝培养特性及驯化栽培. 北方园艺, 39(22): 153-157
- 张松, 2000. 食用菌学. 广州: 华南理工大学出版社. 1-216