



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6309/86

(51) Int.Cl.5

A 01 G 1/04

(22) Indleveringsdag: 29 dec 1986

(24) Løbedag: 28 apr 1986

(41) Alm. tilgængelig: 29 dec 1986

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 28 nov 1994

(86) International ansøgning nr.: PCT/US86/00937

(86) International indleveringsdag: 28 apr 1986

(85) Videreførelsesdag: 29 dec 1986

(30) Prioritet: 29 apr 1985 US 728176

(73) Patenthaver: *NEOGEN CORPORATION; 620 Lesher Place; Lansing; Michigan 48912, US

(72) Opfinder: Ronald Dean *Ower; US, Gary Lynn *Mills; US, James Anthony *Malachowski; US

(74) Fuldmægtig: Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til dyrkning af askokarper af en art tilhørende slægten Morchella

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

6309-86

Dyrkning af askokarper eller frugtlegerne af arten tilhørende slægten Morchella. Mycelier tilføres næringsstoffer og frembringer derefter næringsrige mycelier og medfølgende sklerotier. Mycelierne og de medfølgende sklerotier oplagrer tilstrækkeligt med næringsstof til at nære askokarperne, som udvikles senere. Mycelierne og de medfølgende sklerotier etableres i et næringsfattigt substrat. Mycelier og medfølgende sklerotier foranlediges til at fremkalde askokarpdannelse ved i begyndelsen at opretholde mycelievæksten og de medfølgende sklerotier i omgivelser, som er fattige på exogene næringsstoffer, og ved at udsætte mycelierne og de medfølgende sklerotier for store vandmængder. Efter fremkaldelse kommer primordier til syne. Perioden fra primordiernes tilsynekomst til halvvejs frem til modning af frugtlegerne repræsenterer en kritisk periode, under hvilken frugtlegerne er tilbøjelige til abort. Under denne kritiske periode må der rettes særlig opmærksomhed på at opretholde favorable omstændigheder. Frugtlegerne, som kan være udvoksede til modenhed, høstes.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til dyrkning af askokarper af en art tilhørende slægten Morchella omfattende dyrkning af mycelier og tilhørende sklerotier af arterne i nærværelse af en næringskilde, som tilvejebringer både
5 organiske og uorganiske næringsstoffer, i et tidsrum, som er tilstrækkeligt til, at nævnte mycelier og tilhørende sklerotier kan lagre den næringstilførsel, som kræves til efterfølgende askokarpudvikling, og fremgangsmåden er ejendommelig ved, at modning af de næringsrige mycelier og tilhørende sklerotier
10 fremmes ved passende regulerende betingelser, mycelierne og de tilhørende sklerotier induceres ind i den seksuelle vækstcyklus for arterne ved at berøve mycelierne og de tilhørende sklerotier exogene næringsstoffer og ved at udsætte mycelierne og de tilhørende sklerotier for høje vandkoncentrationer, og betingelser
15 passende for udvikling og modning af askokarperne af arterne opretholdes.

Disse og andre træk ved opfindelsen fremgår af patentkravene.

Den foreliggende opfindelse angår således dyrkning af morkel-
20 svampe, dvs. arter af Morchella indbefattende deres modne, spiselige askokarper (frugtlegemer).

Slægten Morchella omfatter svampearterne, der kendes som morkler (eng: morels or sponge mushrooms). De tilhører askomycetterne (sæksporesvampe). Ægte morkler er spiselige og velsmagende.
25 Faktisk anses de af nogle for at være de mest delikate af alle svampe. Medens smagen af disse svampe er kendt og elsket af de, som gennemleder skovene i det tidlige forår, er morkler utilgængelige for den almene befolkning, fordi de hidtil har været udelukket fra en sådan dyrkning, som ville være
30 praktisk for kommerciel produktion året rundt.

For svampekendere er morkler kendt ved deres askokarp eller frugtlegeme (den synlige svamp). Man skulle tro, at hvis disse svampe vokser frit uden dyrkning i vildtvoksende eller naturligt forekommende tilstand, ville dyrkningsmetoder være blevet

udviklet for at maksimere produktion deraf. Dette har imidlertid ikke været tilfældet. Der er rapporter om dyrkning af morkler udendørs, ingen har imidlertid haft succes med at dyrke morkler som den almindelige Agaricus-art eller andre spiselige former i rum med kontrollerede omgivelser til høst i løbet af hele året.

Askokarp- eller frugtlegemedannelse er den modne udformning af morklens seksuelle reproduktionscyklus. Den modne askokarp indeholder askosporer eller kimsporer (eng: germ spores), som repræsenterer kulminationen af en livscyklus, hvis højdepunkt er en indre parring mellem to haploide kerner til dannelse af en diploid kerne, som undergår meiose til dannelse af nye haploide askosporer. For Morchella er der blevet rapporteret både autogam og heterogam parring før meiose. En alternativ livscyklus er en aseksuel proces, hvor konidier (aseksuelle sporer) dannes, og ud fra hvilke nyt mycelium, der indeholder haploide kerner, kan dyrkes.

Som en måde til beskyttelse af arten vokser de vegetative mycelier under visse omstændigheder også sammen til hærdede legemer, der kendes som sklerotier, som kan ligge i hvile under perioder med ugunstige betingelser. Derfor forekommer frugtdannelse af morklen under særlige betingelser, en situation, der kendes af svampeplukkere, der har oplevet "dårlige år" for morkelsamling.

Det er et generelt formål med opfindelsen at tilvejebringe en fremgangsmåde til dyrkning af morkler på en måde, der er egnet til kommerciel produktion af askokarper i løbet af hele året under kontrollerede betingelser.

For klarheds skyld er udtrykkene, der anvendes i denne beskrivelse, defineret generelt som det ses i C.J. Alexopoulos og C.W. Mims, Introductory Mycology, 3rd Ed., John Wiley & Sons New York (1979):

Askokarp - et frugtlegeme, der indeholder asci.

Askospore - en meiospore, der er dannet i en ascus (sporesæk).

Ascus - (flertal asci) en sæklignende celle, der generelt indeholder et bestemt antal askosporer (typisk otte) dannet ved
5 fri celledannelse, sædvanligvis efter karyogami og meiose, kendetegnende for klassen askomyceter.

Konidiofor - en simpel eller forgrenet hyfe, der opstår fra en somatisk hyfe, og i stand til at bære en eller flere konidio-
gene celler på dens spids eller side.

10 Konidium - (flertal konidier) til tider kaldet konidiosporer, en ikke-bevægelig aseksuel spore, der sædvanligvis dannes ved spidsen eller på siden af en celle, i nogle tilfælde kan en før-eksisterende hyfecelle omdannes til et konidium.

15 Hyfe - (flertal hyfer) enheden af de fleste svampes vegetative struktur, en rørformet, trådformet celle, der indeholder aseksuelle kerner.

Mycelium (flertal mycelier) hyfemasse, der udgør legemet (thallus) af en svamp.

20 Primordium (flertal primordier) begyndelsestilstanden for enhver struktur.

Sklerotium (flertal sklerotier) for denne beskrivelses formål, defineres sklerotium som hyfer, som indeholder oplagrede næringsreserver, som kan aggregere, som kan indeholde indlejrede substratmængde, og som også kan danne hærdede strukturer (re-
25 feret til heri som hærdede sklerotier).

Substrat (flertal substrater) (for denne beskrivelses formål defineres substrat som) det jordlignende materiale, som tjener som voksestedet, hvor svampen gror, og ud fra hvilken svampen

danner frugtlegemer.

Opfindelsen angår som nævnt dyrkning af arter tilhørende slægten *Morchella* til fremstilling af modne askokarper eller frugtlegemer. Vegetative mycelier tilføres næringsstoffer til udvikling til sklerotier, som under nogle dyrkningsformer kan tage form af hærdede sklerotier. De næringsrige sklerotier indeholder en tilstrækkelig mængde oplagrede næringsstoffer til i alt væsentligt at dække hele næringsbehovet for efterfølgende udvikling af frugtlegemer. Efter tilførsel af næring ændres mycelievæksten og de medfølgende sklerotiers omgivelser i det væsentlige for at fremme den seksuelle vækstcyklus, i hvilken der dannes askokarper (synlige svampe). Medvirkende til denne proces er fjernelse af tilgængelige exogene næringsstoffer. Ligeledes bidragende til denne proces er det at udsætte mycelievæksten og de medfølgende sklerotier for høje vandkoncentrationer. Den seksuelle vækstcyklus viser sig først ved fremkomsten af primordier og kulminerer i modne frugtlegemer. Vækstperioden fra primodiens tilsynkomst til omkring frugtlegemets modningstidspunkt er en særlig kritisk udviklingstid, og betingelserne styres omhyggeligt for at minimere abort af det udviklede frugtlegeme. En vigtig faktor ved minimering af abort af det udviklede frugtlegeme er at sikre forudgående lagring af tilstrækkeligt med næringsstoffer i mycelievæksten og de medfølgende sklerotier, især neutrale lipider, for at understøtte frugtlegememodning. Andre vigtige faktorer er opretholdelsen af korrekt luftfugtighed og substratfugtighed under frugtlegemeudvikling og passende ventilation under frugtlegemeudvikling. Andre faktorer omfatter optimal lufthastighed i forhold til voksestedet og opretholdelsen af et dagligt vandtab fra voksestedet.

Opfindelsen muliggør således dyrkning af morkler til fremstilling af askokarper eller frugtlegemer. De udgangsmaterialer eller kilder, som anvendes til morkeldyrkning, er næringsstofrig mycelievækst og medfølgende eller tilhørende sklerotier omfattende hærdede sklerotier, som er hvilende legemer og nærings-

reservoirer, der i nogen grad er modstandsdygtige over for ugunstige betingelser. Den næringsrige mycelievækst og de medfølgende sklerotier kan, afhængigt af omgivelsernes betingelser, enten opretholde yderligere vegetativ mycelievækst eller
5 induceres til at give anledning til den seksuelle cyklus og modne askokarper. Næringsstoffer, især neutrale lipider i form af triglycerider, lagres i mycelievæksten og de medfølgende sklerotier, og under den seksuelle cyklus hentes i det væsentlige alle næringsstofferne til frugtlegemeudvikling ud fra
10 disse og andre oplagrede næringsstoffer.

Opfindelsen angår derfor fremstilling eller dyrkning af mycelievækst og medfølgende sklerotier, idet disse forsynes med næringsstoffer, således at der sikres tilstrækkelig oplagring af næringsstoffer i mycelievæksten og de medfølgende sklerotier
15 til efterfølgende udvikling til askokarper. Derefter indstilles betingelserne, så de er passende til at fremkalde den seksuelle vækstcyklus hos mycelievækst og de medfølgende sklerotier. Der drages væsentlig omhu under udvikling fra primordi-
ers tilsynekomst til askokarpmodning for at opretholde betin-
20 gelser som sikrer, at de udviklende askokarper ikke aborterer. Især indstilles jordfugtighedsbetingelser, luftfugtighedsbetingelser og luftudvekslingsbetingelser til at fremme askokarpudvikling og minimere sygdom.

Det første trin i morkelproduktion er udviklingen af en sklerotiekilde. Anvendelsen af sklerotier som kilde repræsenterer et foretrukket aspekt af opfindelsen med hensyn til effektiv morkelproduktion. Selv om morkeldyrkning kan udføres ved at begynde hver cyklus med sporer, er produktionen meget langsom-
25 mere, og det er således upraktisk for kommerciel dyrkning at begynde hver vækstcyklus med sporer. Derudover er den traditionelle anvendelse af en kornkilde (eng: grain spawn) som substratpodestof generelt uhensigtsmæssig, fordi podning med en kornkilde har en tendens til at føre til kulturer, som i
30 høj grad er forurenede med andre svampe og bakterier.

- En metode til dyrkning af hærdede sklerotier til anvendelse som podestofkilde er at fylde en beholder med hvede eller andet vegetativt materiale til mellem ca. 40 til ca. 80% af dens volumen. Hveden dækkes derefter med et perforeret foer, typisk
- 5 en plastfilm eller et metalfolie, selv om andre materialer kan anvendes, og de resterende 20 til 60% af beholdervolumenet fyldes derefter næsten med fugtig jord. Beholdervolumenet kan ligge i området fra ca. 50 ml til flere liter, men er typisk ca. 500 ml. Hvedekornene (eng: wheat berries) eller andet ve-
- 10 getativt materiale kan suppleres med yderligere næringsstoffer bestående af både organiske og uorganiske nitrogenkilder, andre mineraler, vitaminer og carbohydrater, som bidrager til at fremme oplagring af de næringsstoffer, som er nødvendige under efterfølgende askokarpudvikling. Beholderen dækkes og autokla-
- 15 veres for at dræbe eventuelle forurenende organismer. Jordlaget i den steriliserede beholder podes med askosporer, med vegetative hyfer eller med små stykker sklerotier, og beholderen forsegles igen. Beholderen holdes ved en temperatur mellem ca. 10°C og ca. 30°C og fortrinsvis mellem ca. 18°C og ca. 22°C.
- 20 Hyfer fra podestoffet vokser gennem jordlaget og koloniserer kornet. Efter ca. 1 uge kommer en løst sammenpakket masse af hyfer til syne i jordlaget. Mikroskopisk set bliver hyfecellerne rigt forgrenet, septerer og svulmer til en tøndeform. Dette efterfølges af adhæsionen af tilstødende celler til dan-
- 25 nelse af en fast masse, som er synlig for det blotte øje. Det er sklerotiernes hyfeceller, som oplagrer materialerne, som opnås fra det koloniserede korn. Sklerotierne, som er dyrket på denne måde, er, når de er modne, hårde strukturer, som kan blive ganske store. Faktisk kan hele det samlede jordlag blive
- 30 indviklet i de hærdede sklerotier.

På dette tidspunkt høstes de hærdede sklerotier til anvendelse som kilde. Nogle af de udviklede, hærdede sklerotier kan reserveres som "beholderpodestof" til fremstilling af yderligere sklerotier eller til andre formål.

Anvendelsen af sklerotier som kilde har flere fordele med hensyn til effektiv produktion af morkler. Ud over at vokse med en hastighed, som står i rimeligt forhold med at tjene som en stabil kilde for podestof, kan sklerotier bevares i lange tids-

5 perioder. Det er muligt, at sklerotier i naturen forbliver hvilende i lange tidsperioder, såsom i vintermånderne, indtil betingelserne er gunstige for begyndelse af vækst. Lagring ved ca. 5°C har vist sig at være tilfredsstillende til langtidsbevaring.

- 10 Modne sklerotier anvendes som kilde til at pøde substratet. Der kan følges to variationer i fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse. I den første af variationerne deles modne sklerotier i stykker, som anvendes til at pøde et substrat. Disse sklerotiestykker frembringer hyfer, som efter
- 15 tilsætning af næringsstoffer giver yderligere mycelievækst og medfølgende sklerotiemasse i substratet før fremkaldelse af den seksuelle cyklus. I den anden variation podes sklerotier, dvs. hærdede sklerotier, som er blevet udviklet i beholderne, direkte i et substrat, og de yderligere mycelier, som vokser
- 20 derfra, indføres i den seksuelle cyklus uden tilsætning af næringsstoffer.

- Et vigtigt aspekt af den foreliggende opfindelse er fremkaldelse eller udløsning af svampens seksuelle vækstcyklus, i hvilken der dannes askokarper. En vigtig medvirkende faktor
- 25 ved fremkaldelsen er berøvelse af svampen for tilgængelige exogene næringsstoffer, således at svampens assimilering og oplagring af næringsstoffer ophører eller bliver signifikant langsommere. Således ændres svampens omgivelser fra næringsrige omgivelser til næringsfattige omgivelser. Til denne op-
- 30 findelses formål er "næringsfattige" omgivelser omgivelser, som mangler let tilgængelige næringsstoffer til supplerings til udviklende askokarper, hvorved næringsstofferne for sådanne udviklende askokarper er næringsstoffer, som er blevet oplagret i myceliet og de medfølgende sklerotier før fremkaldelsen.

- En anden vigtig faktor, som ser ud til at medvirke til fremkaldelse, er at udsætte svampen for store mængder vand i substratet, hvori svampen vokser. Typisk hydratiseres substratet i det væsentlige til mætning med det formål at fremme fremkaldelse af den seksuelle cyklus hos næringsrige mycelier og medfølgende sklerotier. Ved i det væsentlige at mætte menes mindst ca. 90% af substratets kapacitet, men fortrinsvis nær ved 100% af dets kapacitet. Fortrinsvis er der under udsættelse for høje mængder af vand en kontinuert udveksling af vand.
- 10 Dette kan opnås f.eks. ved at perkolere vand gennem substratet, i hvilket svampen gror. Selv om ansøgerne ikke er bundet til nogen teori om, hvorfor det høje vandniveau ser ud til at fremme fremkaldelse, kan vandet tilvejebringe et udløsende "chok" for systemet, f.eks. ved ændring i det osmotiske tryk.
- 15 I den første variation deles sklerotier i stykker mellem ca. 0,5 og ca. 4 cm³ i størrelse og podes i et tyndt lag substrat med en dybde mellem 1 til 4 cm. Der opnås gode resultater, når der er 6 til 30 cm³ opdelte sklerotier pr. m² substratoverflade. Hvis der anvendes hærdede sklerotier, forøges mycelievæksten ud fra podestoffet ved gennemblødning af skletoriestykkerne i vand lige før podning af dem i substratet.
- 20

- Et foretrukket bærersubstrat er næringsfattigt, hvilket tillader, at tilgængeligheden af næringsstoffer kan styres ved tilsætning og efterfølgende fjernelse af en ekstern næringskilde til substratet. Egnede substrater omfatter en hvilken som helst standard bark, jord eller savsmuldskompost eller pottejord med eller uden tilsatte mineraler, der er kendt for fagmanden inden for området. F.eks. har Supersoil® (R.McL. Co., San Francisco) været anvendt med succes enten direkte fra den kommercielt solgte sæk eller udludet 2 gange med to lige store volumener (vol./vol.) vand. Substratet bør tillade passende dræning, bør tilvejebringe pufferkapacitet, bør have gode vandtilbageholdende evner og bør tilvejebringe passende gennemluftning til at tillade passende gasudveksling. Substratet, som nu anvendes, er ca. 25% sand og ca. 75% organisk materia-
- 30
- 35

le. En lille mængde kalk tilsættes også. Den organiske andel af jorden er primært knust granbark (85%) og indeholder også 10% spagnum og 5% rødtræbark. Jordblandingen har et tilgængeligt vandindhold på 55% og en luftkapacitet på 25%. Det antages imidlertid, at der kan udvikles et mere optimalt substrat.

Substratet pasteuriseres med damp eller med varmt vand eller autoklaveres. Pasteuriseret substrat blandes derefter typisk med vand til fremstilling af en håndterlig opslæmning. Opslæmningen holdes i en bakke, som har huller i dens bund til dræning. Efter at der er tilsat opslæmning til den ønskede dybde i bakken, får den lov til at dræne, indtil jorden er tømt for frit vand, dvs. er under den naturlige kapacitet på marken, og derved tillade maksimal luftrum. Dette er fordelagtigt på mindst to måder. For det første tillader det øget produktion af mycelier og medfølgende sklerotier, og mere specifikt dannes der mycelier og medfølgende sklerotier over alt i substratet. For det andet bidrager fjernelse af stående vand til at minimere senere mikrobielle forureningsproblemer. Som en alternativ fremgangsmåde ved bakkefremstilling kan bakkerne også først fyldes med substratet som ovenfor og derefter pasteuriseres.

Efter at det påhældte substrat er podet med sklerotiestykker, holdes temperaturen omkring bakken på mellem 10°C og 22°C, den relative fugtighed holdes på mellem 75 og 95%, og vandindholdet i substratet holdes på mellem 50% og 75%. Hurtigt efter podning vokser hyfer fra sklerotierne frem og koloniserer bakken fuldstændigt på ca. en uge. I takt med at mycelierne og de medfølgende sklerotier udvikler sig, tilsættes der ikke noget yderligere vand, hvorved substratet får lov til at tørre, fortrinsvis til et substratfugtighedsindhold på under ca. 75%. Tørring af substratet før tilførsel af næring anses for at være en vigtig faktor til inhibering af vækst af bakterier og andre svampe, som kunne skade eller konkurrere med de udviklende morkler.

Morkler, der er svampe, producerer ikke deres egen føde sådan som fotosyntetiserende planter gør, men opnår snarere deres totale næringstilførsel fra eksterne kilder. Da der med vilje gives et næringsfattigt substrat, skal morkelvævet på et tidspunkt gives de nødvendige næringsstoffer, og ved denne variation tilføres næringsstoffer til mycelierne, der vokser ud fra podestoffet. De yderligere mycelier samt tilhørende sklerotier, som udvikles fra den vegetative vækst efter næringsstoftilsætning, bør i oplagret form indeholde i det væsentlige alle de næringsstoffer, som er nødvendige til effektiv frugtlegemeudvikling.

Næringsstoffer gives til mycelievæksten på en måde, således at næringsstofferne senere kan tilbagetages og efterlade substratet næringsfattigt igen. Fjernelse af næringsstoffer fremmer differentiering i den seksuelle cyklus og formindsker forekomsten af forurening.

Som en hensigtsmæssig måde til tilvejebringelse af en fjernelig næringskilde placeres et næringsrigt medium på substratet, ind i hvilken kilde hyfer kan vokse, og fra hvilken kilde hyferne kan distribuere næringsstoffer overalt i myceliekolonien. Som en måde til tilvejebringelse af en sådan kilde fremstilles beholdere lignende sådanne, som blev anvendt til at dyrke hærdede sklerotier. Typisk fyldes beholdere næsten med organisk materiale, et perforeret varmemodstandsdygtigt foer (sædvanligvis et metalfolie) placeres over det organiske materiale, og foeret dækkes med jord til toppen af beholderen. Beholderen dækkes igen med et andet lag af perforeret folie, forsegles yderligere med et lag metalfolie og steriliseres derefter.

Næringskilden, med hvilken beholderen fyldes, tilvejebringer det organiske materiale. Det organiske materiale metaboliseres og oplagres til sidst i mycelierne og de medfølgende sklerotier som carbohydrater og lipider. Det oplagrede materiale anvendes til sidst til askokarpdannelse. Den mest almindeligt

anvendte næringskilde ved udvikling af denne dyrkningsmetode er hvedekorn. Andet vegetativt materiale omfattende blandet kompost er imidlertid også egnet. Hvis hvedekorn er næringskilden, bør de tilvejebringes i et forhold på ca. 1000 g til
5 ca. 8000 g (tør vægt) pr. m² substrat. Imidlertid kan dette forhold varieres signifikant og kan kun anses for at være en generel tilnærmelse.

Det er ønskeligt, at der fremstilles så mange næringsrige mycelier og medfølgende sklerotier inden i substratet som muligt
10 under dette trin, fordi der tilsyneladende er et direkte forhold mellem mængden af mycelier og medfølgende sklerotier i substratet og den totale vægt af askokarper, som udvikles pr. arealenhed af substratet. Vækst af mycelier og medfølgende sklerotier i substratet er parallel med vækst af hærdede sklerotier i beholdere, og de samme næringsfaktorer, som forøger
15 vækst i beholderne, forøger vækst i substratet. Derfor kan det organiske materiale suppleres med vitaminer, mineraler, yderligt protein og andre stoffer.

I denne første variation af metoden fjernes det øverste lag
20 folie fra de afkølede steriliserede beholdere, og beholderne vendes om på overfladen af substratet. Hyfer gror opad gennem hullerne i det andet lag folie, samler næringsstoffer og distribuerer næringsstofferne til myceliekolonierne. Under næringstilførsel holdes jordfugtigheden ved et niveau på mellem
25 45% og 70%, den relative fugtighed holdes på mellem 85% og 95%, og temperaturen holdes på mellem 10°C og 22°C. Næringstilførslen fortsætter i en periode på mellem 7 og 40 dage, typisk ca. 16 dage. Ved afslutningen af næringstilførselsperioden kan både konidier og sklerotier iagttages i væsentligt
30 antal på overfladen af substratet.

Efter at have tilført myceliekolonierne og nyligt dannede medfølgende sklerotier i det væsentlige alle de nødvendige næringsstoffer for efterfølgende askokarpdannelse, fjernes næringskilden. Fjernelse af næringsstofferne er et nødvendigt

trin ved dyrkning, fordi den seksuelle cyklus ikke vil påbegynde i nogen væsentlig udstrækning ved tilstedeværelse af overskud af næringsstoffer, som er eksterne i forhold til mycelierne. Anvendelse af en omvendt beholder eller lignende, der indeholder næringsmateriale, muliggør øjeblikkelig fjernelse af de fleste af de tilgængelige næringsstoffer efterladende mycelierne i et næringsfattigt substrat.

Efter fjernelse af næringskilden tilsættes en lille mængde yderligere fugtighed til substratet, f.eks. ca. 1 l pr. m² substratoverflade, og vegetativ vækst får lov til at fortsætte i en periode på ca. 10 dage. Under denne periode holdes substratfugtighedsindholdet ved mellem 45% og 70%, den relative fugtighed holdes ved mellem 85% og 95%, og temperaturen holdes ved mellem 10°C og 22°C. Efter denne periode er sklerotierne modne.

De modne mycelier og medfølgende sklerotier, som er rige på oplagrede næringsstoffer, men berøvet exogene næringsstoffer, er nu parat til at blive udsat for store mængder vand, som bidrager til fremkaldelse af den seksuelle cyklus. Fortrinsvis hydratiseres substratet og mørkelmycelierne ved en langsom perkolering af vand gennem substratet i en periode på mellem 12 og 36 timer. Vand sættes til substratet ved en hastighed på mellem 250 og 1000 ml pr. time pr. m² substratoverflade. Substratet og det perkolerende vand holdes ved en temperatur på mellem 10°C og 22°C.

I den anden variation podes modne sklerotier, såsom de hærdede sklerotier, som fremstilles i beholderne, i et befugtet, næringsfattigt substrat i en meget højere mængde, f.eks. typisk mellem 1500 og 4000 cm³ pr. m² substratoverflade. Disse sklerotier indeholder de oplagrede næringsstoffer, som er nødvendige for hyfeformering og efterfølgende frugtlegemeudvikling. Sklerotierne kan podes i substratet hele eller delte, de kan også podes direkte fra beholderne eller først befugtes med vand f.eks. typisk en 18 til 24 timers neddykning. Podning i

det næringsfattige substrat repræsenterer udelukkelse af exogene næringsstoffer for sklerotierne, en af de faktorer, der har vist sig at bidrage til fremkaldelse af den seksuelle vækstcyklus.

- 5 Den anden faktor, som har vist sig at bidrage væsentligt til fremkaldelse, dvs. udsættelse for store mængder vand, kan begynde samtidigt med podning i substratet eller en ganske kort tidsperiode derefter. Substratet kan befugtes omhyggeligt på omkring podningstidspunktet til frembringelse af den store
10 vandmængde, som fremmer fremkaldelse. Der opnås imidlertid bedre resultater, hvis sklerotierne holdes i substratet, og deres mycelier får lov til at kolonisere substratet i ca. 7 dage under betingelser, der ligner betingelserne under den periode i den første variation, hvor sklerotierne holdes i næringsfattigt substrat, men før vand perkoleres gennem substratet.
15 Dernæst, på en måde lignende den i den første variation anvendte, perkoleres vand gennem substratet, hvilket fremmer begyndelse af primodier ud fra mycelierne.

- Der er flere fordele ved den anden variation af metoden sammenlignet med den første variation. En af de mere bemærkelsesværdige fordele ved den anden variation er den tilladelige substratdybde. I denne metode kan substratet være betydeligt
20 dybere, f.eks. imellem 6 og 16 cm. Kulturer med et tykkere substrat kan indeholde flere sklerotier og således sluttelig ernære flere askokarper pr. arealenhed substratoverflade end
25 et tyndere substratlag.

- Den første variation kan imidlertid foretrækkes, fordi den er mere nært analog med fremgangsmåder, der anvendes til at dyrke andre svampetyper, og derfor lettere kan tilpasses til dyrkning i eksisterende faciliteter eller med tilgængeligt apparatur.
30

Efter hydratation i enten den første eller anden variation får substratet lov til at dræne, og kulturerne kan blive aspireret

for yderligere fjernelse af vand. Den relative fugtighed holdes på mellem 85% og 95%, og temperaturen holdes på mellem 10°C og 22°C. Substratfugtighedsindholdet holdes ved mellem 55% og 65% i denne periode.

- 5 Ved afslutningen af denne periode, dvs. ca. 1 til 3 dage efter hydratation, begynder morkelprimordier at dannes. Primordier er sfæriske hyfeaggregater, som er ca. 1 mm i diameter. Inden for få dage danner primordierne udvækster, som repræsenterer det første tegn på askokarpbasisdannelse.
- 10 En vækstperiode, der strækker sig fra den begyndende tilsynkomst af primordier, indtil morkelaskokarpen når en højde på ca. 30 mm, betegner en vigtig periode i askokarpudvikling. I denne periode holdes temperaturen ved mellem 10°C og 22°C og fortrinsvis ca. 18°C, den relative fugtighed ved mellem 85 og
- 15 95% og substratfugtighedsindholdet ved mellem 50 og 60%. Medmindre der holdes meget gunstige vækstbetingelser, er umodne askokarper tilbøjelige til abort.

- Det har vist sig, at der opnås maksimale udbytter af askokarper, når lufstrømmen nær ved substratet holdes ved en i det
- 20 væsentlige stabil hastighed på mellem 20 og 40 cm pr. minut.

- Efter at morkelaskokarpen når højden på 30 mm, opretholdes betingelser, som er gunstige for fortsat udvikling og modning. Temperaturen under denne del af modningen kan ligge i området fra 10°C til 27°C, den relative fugtighed kan ligge i området
- 25 fra 80% til 95%, og jordfugtigheden kan ligge i området fra 30% til 55%. I takt med at askokarperne fortsætter med at udvikles, kan de blive mørkegrå, og efter at have nået modenhed ændres askokarparfarven fra grå til gyldenbrun, ved hvilket punkt morklerne er modne. Efter at den første askokarpafgrøde
- 30 er høstet, kan kulturerne foranlediges til at producere en eller flere efterfølgende afgrøder.

Under anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen med Mor-

chella esculenta kan der opnå udbytter på 25 til 500 askokarper pr. m².

Selv om det meste af udviklingen af metoden har drejet sig om isolater af *Morchella esculenta*, er fremgangsmåden ifølge opfindelsen generelt anvendelig for andre arter inden for slægten *Morchella*. F.eks. er der blevet opnået succes med de arter, der forsøgsvis er bestemt som *Morchella crassipes* og *Morchella costata*.

P a t e n t k r a v

10 -----

1. Fremgangsmåde til dyrkning af askokarper af en art tilhørende slægten *Morchella* omfattende dyrkning af mycelier og tilhørende sklerotier af arterne i nærværelse af en næringskilde, som tilvejebringer både organiske og uorganiske næringsstoffer, i et tidsrum, som er tilstrækkeligt til, at nævnte mycelier og tilhørende sklerotier kan lagre den næringstilførsel, som kræves til efterfølgende askokarpudvikling, k e n d e t e g n e t ved, at modning af de næringsrige mycelier og tilhørende sklerotier fremmes ved passende regulerende betingelser, mycelierne og de tilhørende sklerotier induceres ind i den seksuelle vækstcyklus for arterne ved at berøre mycelierne og de tilhørende sklerotier exogene næringsstoffer og ved at udsætte mycelierne og de tilhørende sklerotier for høje vandkoncentrationer, og betingelser passende for udvikling og modning af askokarperne af arterne opretholdes.

2. Fremgangsmåde til dyrkning ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at næringsrige mycelier og tilhørende sklerotier podes i et næringsfattigt substrat, hvori yderligere mycelievækst fremmes ved passende regulering af miljøet.

30 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at mycelierne dyrkes ved at tilvejebringe en fugtig, vegetativ næringskilde, sterilisere den og pode den fugtige næ-

ringskilde med stykker valgt fra gruppen bestående af sklerotier, askosporer, vegetative hyfer og konidier.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 3, k e n d e t e g n e t ved, at mycelievæksten i det podede substrat fremmes før næringstilførslen ved at opretholde et substratfugtighedsindhold på mellem 50% og 75%, en relativ fugtighed på mellem 75% og 95% og en temperatur på mellem 10°C og 22°C.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 4, k e n d e t e g n e t ved, at modning af mycelievæksten og tilhørende sklerotier efter fjernelse af næringskilden fremmes ved at opretholde fugtighedsindholdet i substratet mellem 45% og 70%, den relative fugtighed mellem 85% og 95% og temperaturen mellem 10°C og 22°C.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 5, k e n d e t e g n e t ved, at substratet hydratiseres ved at perkolere vand gennem substratet.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 6, k e n d e t e g n e t ved, at efter substrathydratiseringen indstilles vandindholdet i substratet til mellem 55% og 65%, den relative fugtighed opretholdes mellem 85% og 95%, og temperaturen opretholdes mellem 10°C og 22°C, indtil primordia kommer til syne.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 7, k e n d e t e g n e t ved, at fra tilsynekomsten af primordia og indtil askokarpdannelse til en højde på omkring 30 mm holdes vandindholdet i substratet på mellem 50% og 60%, den relative fugtighed holdes mellem 85% og 95%, og temperaturen holdes mellem 10°C og 22°C.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at næringsrige mycelier og tilhørende sklerotier podes i et næringsfattigt substrat, hvori yderligere mycelievækst fremmes ved passende regulering af miljøet, og efter denne yderligere vækst tilføres mycelievæksten i et forudbestemt tidsrum en næ-

ringskilde, som tilfører både organiske og uorganiske næringsstoffer.