



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103250552 B

(45)授权公告日 2016.09.28

(21)申请号 201210134511.3

(22)申请日 2012.05.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103250552 A

(43)申请公布日 2013.08.21

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:M2012115 2012.04.15

(73)专利权人 广东海洋大学
地址 524000 广东省湛江市麻章区湖光岩
东广东海洋大学

(72)发明人 刘月廉

(74)专利代理机构 广州市南锋专利事务所有限
公司 44228

代理人 刘广生

(51)Int.Cl.

C12N 1/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 102523923 A,2012.07.04,说明书第
0005-0017段.

CN 1058504 A,1992.02.12,全文.

CN 101759460 A,2010.06.30,全文.

李青松等.香蕉茎叶栽培草菇实验初报.《广
西热带农业》.2005,(第01期),9.

黄庆生等.香蕉茎叶栽培草菇.《福建农业》
.1995,(第01期),11.

审查员 蔺国强

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种利用香蕉叶生产的高产草菇菌株

(57)摘要

本发明涉及一种利用香蕉叶生产的高产草菇菌株,该草菇菌株Vb已于2012年4月15日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏号为CCTCC M 2012115;把发现的草菇菌株采集回,采用子实体组织分离法,无菌操作下,将子实体的菌盖去除,菌柄纵向撕成两半,用镊子镊取菌柄内部接近菌盖部位的菌肉,接于PDA平板上,保鲜薄膜密封后置于30℃的恒温培养,获得一株纯的菌丝体培养物,编号为Vb;草菇菌株Vb培养方法简单,材料来源丰富,对香蕉叶、稻草、甘蔗渣等材料有较强的分解能力,并且有较高的生物学效率,在生产上有良好的稳定性,对于实现对香蕉等废弃资源的充分利用,缓解原材料紧缺压力、保护环境、提高农田肥力,提高农民收入,具有积极的现实意义。



1. 一种利用香蕉叶生产的高产草菇菌株,其特征在于:该草菇菌株Vb已于2012年4月15日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏号为CCTCC M 2012115。
2. 权利要求1所述的利用香蕉叶生产的高产草菇菌株在草菇生产上的应用。

一种利用香蕉叶生产的高产草菇菌株

技术领域

[0001] 本发明涉及一种能够利用香蕉叶生产的高产草菇(*Volvariella volvacea*)菌株,特别涉及高产草菇菌株的选育。

背景技术

[0002] 草菇学名*Volvariella volvacea* (Bull.ex Fr.)Sing,别名兰花菇、美味苞脚菇、中国蘑菇、南华菇,是世界四大栽培食用菌之一,也是我国广东地区的食用菌主打品种之一。其子实体肉质肥嫩、味道鲜美,且富含容易被人体吸收利用的优质蛋白质、不饱和脂肪酸、碳水化合物、多种维生素和矿物元素。

[0003] 草菇喜温、喜湿,夏季生长于稻草等禾本科草类或棉、麻等纤维废料上的草质腐生菌。草菇的生产目前主要原料是废棉和稻草。但是随着原材料的紧缺,这些原本不值钱的材料也价格上涨,导致了草菇生产成本的提高,抑制了菇农的种植草菇的积极性。

[0004] 香蕉叶是香蕉收获后产生的废弃物,含有丰富的纤维等物质。据不完全统计,我国每年约有2325.05万吨的香蕉废物被遗弃。目前人们尝试着对香蕉叶等废物进行综合利用的研究,如在堆制有机肥料、开发新型饲料和造纸等方面取得一定的进展,但在实际应用上还没有取得突破。另外也有利用香蕉废物进行栽培食用菌的报道,如在香蕉园行间栽培平菇;利用蕉叶代替稻草栽培草菇;以棉籽壳、香蕉茎叶为主料制作草菇菌种等。但由于现有菌种在香蕉废物上的适应性较差,生物学较低(低于10%)而至今没有得到推广应用。

[0005] 因此,目前还没有一种能够利用香蕉叶生产草菇的实用的高产菌株。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种利用香蕉叶生产的高产草菇菌株。本发明具体是这样实现的:

[0007] (1)野生草菇菌株的分离

[0008] 在广东省湛江地区,5月至9月份期间,选择雨天第二天,对香蕉园进行野生草菇资源的调查。2009年7月4日,本发明人在广东海洋大学香蕉园中发现一个草菇子实体(说明书附图1),该子实体发生于两株香蕉假茎之间的枯死叶鞘上。当天把它采集回,采用子实体组织分离法,无菌操作下,将子实体的菌盖去除,菌柄纵向撕成两半,用镊子镊取菌柄内部接近菌盖部位的菌肉,接于PDA平板上,保鲜薄膜密封后置于30℃的恒温培养。3天后,获得一株纯的菌丝体培养物,编号为Vb(说明书附图2)。该菌株已在中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏号为CCTCC M 2012115;中国典型培养物保藏中心(CCTCC)的地址:湖北省武汉市武昌珞珈山;

[0009] (2)菌株Vb子实体形态特征

[0010] 对菌株Vb子实体的菌盖、菌柄、菌褶、菌托等的大小厚度颜色形状进行测量。采用配置Nikon显微镜观测担孢子的形态及大小,并拍照。其特征表现为:菌盖灰褐色,光滑干燥、中部较暗,直径3.5cm;菌肉白色,松软;菌褶肉桂色,稍密、平行、等长;菌柄白色中生,

下宽上细、表面光滑、实心、内部松软、无菌环,长度2 cm;菌托灰褐色,杯状,非常薄,宽大,整齐。侧缘囊状体梭形,丰富,褶间囊状体棒状。担子棒状,着生4个担孢子。担孢子 $8.2-5.4 \times 3.5-5.5 \mu\text{m}$,卵形,光滑,顶端具萌发孔(说明书附图3)。孢子印粉红色肉桂。以上的形态特征与Singer(1951)和 Chang(1965)报道的草菇形态特征一致;

[0011] (3)菌株Vb分子特征

[0012] 直接用无菌牙签挑取PDA上培养的菌丝体,参考Ward et al. (2005)方法进行DNA的提取。得到的DNA加入70%乙醇清洗,晾干。将风干的DNA溶于100微升双蒸水中,存于4℃冰箱备用。使用通用引物ITS1和ITS4,聚合酶链式反应体系(25微升)包括:10倍聚合酶链式反应缓冲剂(含二价镁离子) 2.5微升、脱氧核糖核苷三磷酸(2.5微摩尔/升) 1微升、模板DNA(约30 纳克) 1 微升、引物ITS1(5微摩尔/升)和ITS4(5微摩尔/升)各1微升、*Taq*DNA聚合酶(5单位/微升) 0.5微升、双蒸水18微升。聚合酶链式反应扩增程序为:94 ℃预变性2 分钟,94 ℃ 30秒、55 ℃ 30秒、72 ℃ 1 分钟,35个循环,72 ℃ 10 分钟,4 ℃保存。PCR产物经纯化、回收后,送华大生物工程技术服务有限公司进行测序。将获得的序列在NCBI上进行Blast比对,并选取同源性较高和形态相近菌株序列用MEGA v4.0中的邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,并用bootstrap对系统发育树进行检验,1 000次重复。其特征表现为;其ITS扩增产物的序列为721bp。经正反双向测序结果验证,双向测序结果基本一致。利用Blast比对结果表明,菌株Vb与*V. volvacea* (FJ379273.1, FJ379274.1, FJ379272.1等)同源性都为100%。进一步采用MEGA4软件,采用邻近相邻法构建系统发育树,结果表明,菌株Vb与*V. volvacea*处在同一发育枝上,而与同属的其他种有较大的遗传差距(说明书附图4)。因此,结合形态特征,菌株Vb鉴定为草菇(*Volvariella volvacea* Vb)。该成果已发表于Scientia Horticulturae(Liu Yue-Lian. 2011. Identification and cultivation of a wild mushroom from banana pseudo-stem sheath. Scientia Horticulturae, 129 :922-925),得到了国际同行的认可。

[0013] (4)菌株Vb生物学特性

[0014] A、最适碳源

[0015] 以蛋白胨0.3%,琼脂2.0%为基础培养基,分别添加葡萄糖2%、蔗糖2%、麦芽糖2%、乳糖2%、可溶性淀粉2%为处理,以不添加碳源为对照。培养基灭菌后制成平板,接种入活化的菌种 5.0 mm^2 ,置于30℃恒温培养,第三天每24小时观察记录一次,当有任一处理菌丝长满培养皿时即结束记录。按照菌丝生长速度(cm/d)=菌落直径(cm)/菌丝生长天数(d) 公式来计算菌丝生长平均速度。每种配方3次重复。

[0016] 试验结果表明,菌株Vb菌丝生长速度最快的为蔗糖,为1.92cm/d,比对照提高30.61%,与可溶性淀粉组没显著差异,在5%水平上与葡萄糖组有显著差异。因此蔗糖为菌株Vb菌丝生长的最佳碳源。

[0017] B、最适氮源

[0018] 以葡萄糖2.0%,琼脂2.0%为基础培养基,分别添加酵母膏0.3%、蛋白胨0.3%、牛肉膏0.3%、 NH_4NO_3 0.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%为处理,以不添加氮源为对照。结果显示,以蛋白胨和牛肉膏为氮源的菌丝长势强、生长速度快,两者没显著差异,生长速度相当。选择生长速度略快的牛肉膏为最佳N源,菌丝生长速度达1.67cm/d,比CK提高70.06%。

[0019] C、最适pH值

[0020] 选择蔗糖为碳源、牛肉膏为氮源,调节pH值为5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0共8个梯度进行试验,每种处理3次重复。接种后置于30℃恒温培养。结果表明,pH7.0、pH7.5和pH8.0时菌丝的生长速度最快,与其他处理有显著性的差异;即菌株菌丝适宜在中性偏碱的环境中生长,过酸或过碱的环境对菌丝生长不利。

[0021] D、最适温度

[0022] 选择蔗糖为碳源、牛肉膏为氮源、pH值为7.5配成培养基,设置20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃共6个温度梯度进行试验。结果表明,30℃和35℃下菌丝生长速度最快,与其他设置的温度有显著差异。其次是25℃和20℃,与40℃和45℃下的菌丝生长速度有显著差异。因此该菌株为高温型菌。

[0023] E、最适自然基质培养料

[0024] 麦麸10%、含水量65%为基础,分别用90%的香蕉茎、香蕉叶、园林草、稻草、甘蔗渣、棉籽壳和杂木屑作为培养主要原料。试验结果表明,自然基质培养基中香蕉叶培养基与稻草培养基效果最好,菌丝生长速度最快,与其他处理有显著差异。园林草、棉籽壳、香蕉茎和蔗渣之间差异不显著,但与杂木屑显著性差异。该菌株在自然基质培养基中菌丝生长速度从快到慢的顺序为:香蕉叶>稻草>园林草>棉籽壳>香蕉茎>甘蔗渣>杂木屑。

[0025] (5)菌株Vb子实体产生的最适培养料

[0026] 分别使用香蕉叶、稻草、甘蔗渣、棉籽壳为培养料,每批培养料2.5 kg,三级菌种2 kg,3次重复,随机排列。用5%的石灰水分别浸泡不同的基质超过24小时,捞出,将吸水充分的材料沥去多余的水;一层料一层菌种地进行铺料播种,共铺料3层。在最后一层铺料上,撒满菌种,最后覆膜。发菌7-8天,第8-9天,采菇。测试结果表明,以香蕉叶栽培草菇所获得的产量或生物转化率最高,达24.17%,稻草的其次,为23.42%,甘蔗渣有17.03%,棉籽壳的最低,只有14.58%(说明书附图5)。

[0027] 按照中国专利法和其实施细则的规定,本发明的草菇菌株Vb已于2012年4月15日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏号为CCTCC M 2012115。

[0028] 草菇菌株Vb培养方法简单,材料来源丰富,对香蕉叶、稻草、甘蔗渣等材料有较强的分解能力,并且有较高的生物学效率,在生产上有良好的稳定性。这些特点对于实现对香蕉等废弃资源的充分利用,缓解原材料紧缺压力、保护环境、提高农田肥力,提高农民收入,丰富菜篮子,具有积极的现实意义。

附图说明

[0029] 图1为野生草菇菌株Vb子实体;

[0030] 图2 为菌株Vb纯菌丝体;

[0031] 图3为菌株Vb的担子及担孢子形态;

[0032] 图4为菌株Vb系统发育树;

[0033] 图5为菌株Vb利用香蕉叶生产的草菇。

具体实施方式

[0034] 下面通过实施例对本发明做进一步详细说明,这些实施例仅用来说明本发明,并不限制本发明的范围。

[0035] 实施例1

[0036] (1)野生草菇菌株的分离

[0037] 在广东省湛江地区,5月至9月份期间,选择雨天第二天,对香蕉园进行野生草菇资源的调查。2009年7月4日,本发明人在广东海洋大学香蕉园中发现一个草菇子实体(说明书附图1),该子实体发生于两株香蕉假茎之间的枯死叶鞘上。当天把它采集回,采用子实体组织分离法,无菌操作下,将子实体的菌盖去除,菌柄纵向撕成两半,用镊子镊取菌柄内部接近菌盖部位的菌肉,接于PDA平板上,保鲜薄膜密封后置于30℃的恒温培养。3天后,获得一株纯的菌丝体培养物,编号为Vb(说明书附图2)。该菌株已在中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏,保藏号为CCTCC M 2012115;

[0038] (2)菌株Vb子实体形态特征

[0039] 对菌株Vb子实体的菌盖、菌柄、菌褶、菌托等的大小厚度颜色形状进行测量。采用配置Nikon显微镜观测担孢子的形态及大小,并拍照。其特征表现为:菌盖灰褐色,光滑干燥、中部较暗,直径3.5cm;菌肉白色,松软;菌褶肉桂色,稍密、平行、等长;菌柄白色中生,下宽上细、表面光滑、实心、内部松软、无菌环,长度2 cm;菌托灰褐色,杯状,非常薄,宽大,整齐。侧缘囊状体梭形,丰富,褶间囊状体棒状。担子棒状,着生4个担孢子。担孢子8.2-5.4×3.5-5.5μm,卵形,光滑,顶端具萌发孔(说明书附图3)。孢子印粉红色肉桂。以上的形态特征与Singer(1951)和 Chang(1965)报道的草菇形态特征一致;

[0040] (3)菌株Vb分子特征

[0041] 直接用无菌牙签挑取PDA上培养的菌丝体,参考Ward et al. (2005)方法进行DNA的提取。得到的DNA加入70%乙醇清洗,晾干。将风干的DNA溶于100微升双蒸水中,存于4℃冰箱备用。使用通用引物ITS1和ITS4,聚合酶链式反应体系(25微升)包括:10倍聚合酶链式反应缓冲剂(含二价镁离子) 2.5微升、脱氧核糖核苷三磷酸(2.5微摩尔/升) 1微升、模板DNA(约30 纳克) 1 微升、引物ITS1(5微摩尔/升)和ITS4(5微摩尔/升)各1微升、*Taq*DNA聚合酶(5单位/微升) 0.5微升、双蒸水18微升。聚合酶链式反应扩增程序为:94℃预变性2分钟,94℃30秒、55℃30秒、72℃1分钟,35个循环,72℃10分钟,4℃保存。PCR产物经纯化、回收后,送华大生物工程技术服务有限公司进行测序。将获得的序列在NCBI上进行Blast比对,并选取同源性较高和形态相近菌株序列用MEGA v4.0中的邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,并用bootstrap对系统发育树进行检验,1000次重复。其特征表现为;其ITS扩增产物的序列为721bp。经正反双向测序结果验证,双向测序结果基本一致。利用Blast比对结果表明,菌株Vb与*V. volvacea* (FJ379273.1, FJ379274.1, FJ379272.1等)同源性都为100%。进一步采用MEGA4软件,采用邻近相邻法构建系统发育树,结果表明,菌株Vb与*V. volvacea*处在同一发育枝上,而与同属的其他种有较大的遗传差距(说明书附图4)。因此,结合形态特征,菌株Vb鉴定为草菇(*Volvariella volvacea* Vb)。该成果已发表于Scientia Horticulturae(Liu Yue-Lian. 2011. Identification and cultivation of a wild mushroom from banana pseudo-stem sheath. Scientia Horticulturae, 129 :922-925),得到了国际同行的认可。

[0042] (4)菌株Vb生物学特性

[0043] A. 最适碳源

[0044] 以蛋白胨0.3%,琼脂2.0%为基础培养基,分别添加葡萄糖2%、蔗糖2%、麦芽糖2%、乳

糖2%、可溶性淀粉2%为处理,以不添加碳源为对照。培养基灭菌后制成平板,接种入活化的菌种 5.0 mm^2 ,置于 30°C 恒温培养,第三天每24小时观察记录一次,当有任一处理菌丝长满培养皿时即结束记录。按照菌丝生长速度(cm/d)= $\text{菌落直径}(\text{cm})/\text{菌丝生长天数}(\text{d})$ 公式来计算菌丝生长平均速度。每种配方3次重复。

[0045] 试验结果表明,菌株Vb菌丝生长速度最快的为蔗糖,为 1.92cm/d ,比对照提高30.61%,与可溶性淀粉组没显著差异,在5%水平上与葡萄糖组有显著差异。因此蔗糖为菌株Vb菌丝生长的最佳碳源。

[0046] B. 最适氮源

[0047] 以葡萄糖2.0%、琼脂2.0%为基础培养基,分别添加酵母膏0.3%、蛋白胨0.3%、牛肉膏0.3%、 NH_4NO_3 0.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%为处理,以不添加氮源为对照。结果显示,以蛋白胨和牛肉膏为氮源的菌丝长势强、生长速度快,两者没显著差异,生长速度相当。选择生长速度略快的牛肉膏为最佳N源,菌丝生长速度达 1.67cm/d ,比CK提高70.06%。

[0048] C. 最适pH值

[0049] 选择蔗糖为碳源、牛肉膏为氮源,调节pH值为5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0共8个梯度进行试验,每种处理3次重复。接种后置于 30°C 恒温培养。结果表明, pH7.0、pH7.5和pH8.0时菌丝的生长速度最快,与其他处理有显著性的差异;即菌株菌丝适宜在中性偏碱的环境中生长,过酸或过碱的环境对菌丝生长不利。

[0050] D. 最适温度

[0051] 选择蔗糖为碳源、牛肉膏为氮源、pH值为7.5配成培养基,设置 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C 、 45°C 共6个温度梯度进行试验。结果表明, 30°C 和 35°C 下菌丝生长速度最快,与其他设置的温度有显著差异。其次是 25°C 和 20°C ,与 40°C 和 45°C 下的菌丝生长速度有显著差异。因此该菌株为高温型菌。

[0052] E. 最适自然基质培养料

[0053] 以麦麸10%、含水量65%为基础,分别用90%的香蕉茎、香蕉叶、园林草、稻草、甘蔗渣、棉籽壳和杂木屑作为培养主要原料。试验结果表明,自然基质培养基中香蕉叶培养基与稻草培养基效果最好,菌丝生长速度最快,与其他处理有显著差异。园林草、棉籽壳、香蕉茎和蔗渣之间差异不显著,但与杂木屑显著性差异。该菌株在自然基质培养基中菌丝生长速度从快到慢的顺序为:香蕉叶>稻草>园林草>棉籽壳>香蕉茎>甘蔗渣>杂木屑。

[0054] (5)菌株Vb子实体产生的最适培养料

[0055] 分别使用香蕉叶、稻草、甘蔗渣、棉籽壳为培养料,每批培养料2.5 kg,三级菌种2 kg,3次重复,随机排列。用5%的石灰水分别浸泡不同的基质超过24小时,捞出,将吸水充分的材料沥去多余的水;一层料一层菌种地进行铺料播种,共铺料3层。在最后一层铺料上,撒满菌种,最后覆膜。发菌7-8天,第8-9天,采菇。测试结果表明,以香蕉叶栽培草菇所获得的产量或生物转化率最高,达24.17%,稻草的其次,为23.42%,甘蔗渣有17.03%,棉籽壳的最低,只有14.58%(说明书附图5)。



图1

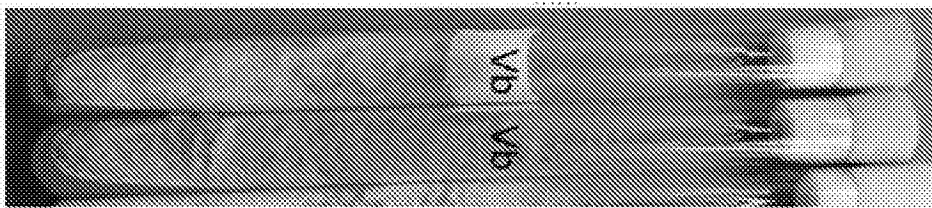


图2

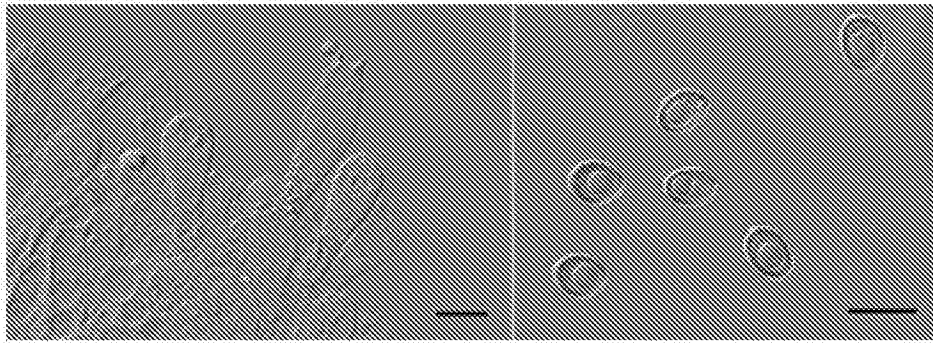


图3

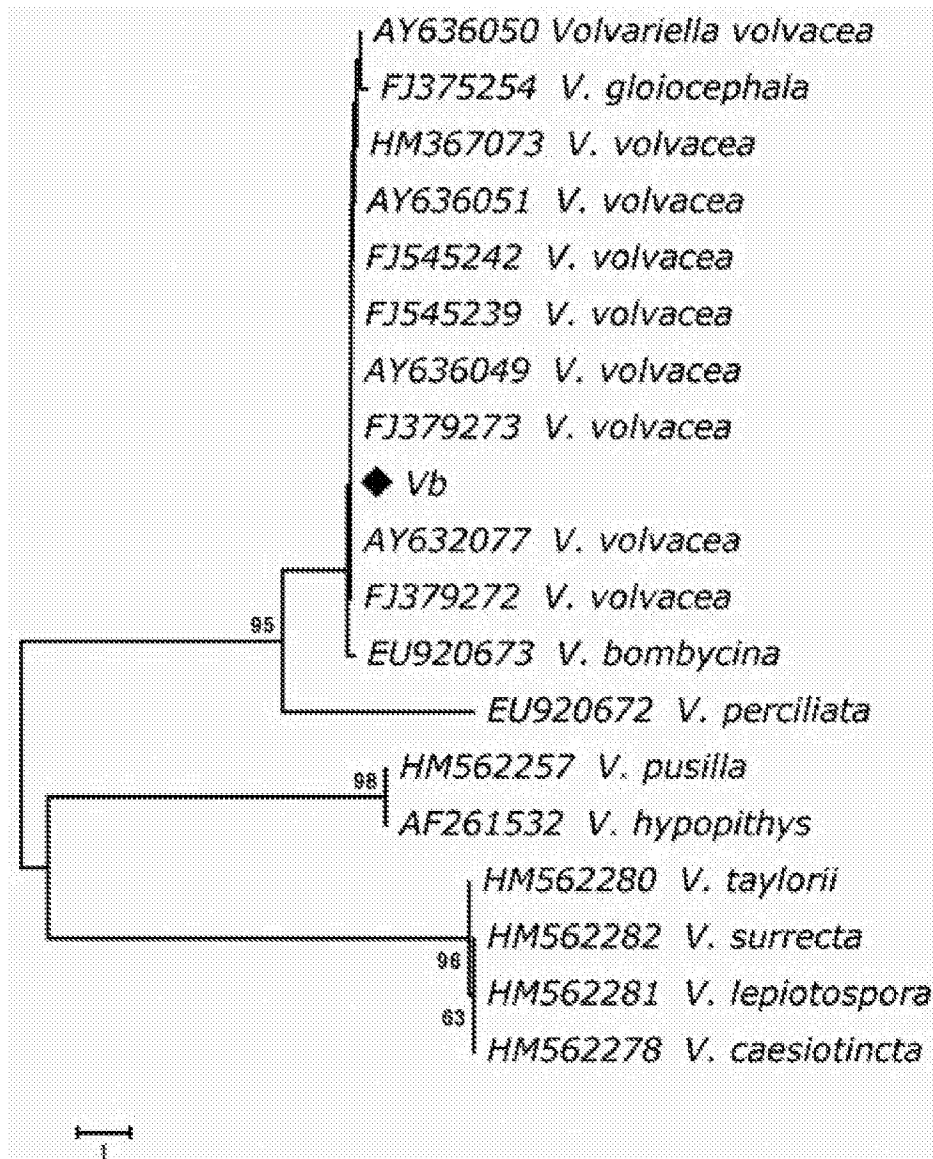


图4



图5