



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107771613 A

(43)申请公布日 2018.03.09

(21)申请号 201711006182.3

A01G 18/20(2018.01)

(22)申请日 2017.10.25

A01G 18/40(2018.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC No:M2017212 2017.04.27

(71)申请人 广东省微生物研究所

地址 510070 广东省广州市先烈中路100号
大院58栋广东省微生物研究所

申请人 广东粤微食用菌技术有限公司

(72)发明人 胡惠萍 刘远超 谢意珍 莫伟鹏
熊卫萍 夏凤娜

(74)专利代理机构 广州弘邦专利商标事务所有
限公司 44236

代理人 张钰斌

(51)Int.Cl.

A01G 18/00(2018.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种黄褶裸伞新菌种及其栽培方法和用途

(57)摘要

本发明涉及一种新菌种及其人工栽培方法,尤其涉及一种黄褶裸伞新菌种及其栽培方法和用途,所述黄褶裸伞新菌种为黄褶裸伞 *Gymnopilus luteofolius* HMGIM-X120086,保藏编号为CCTCC No:M2017212。所述栽培方法包括将分离母种后,制备原种,制作生产种,将生产种接种到栽培料后,进行栽培管理。经过发明人反复试验研究,摸索得到了适合于本发明所述黄褶裸伞新菌种的栽培培养基和栽培方法,可成功实现黄褶裸伞的人工栽培。



1. 一种黄褶裸伞新菌种,所述黄褶裸伞新菌种为黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius* HMGIM-X120086,保藏编号为CCTCC No:M2017212。

2. 一种上述黄褶裸伞新菌种CCTCC No:M2017212的栽培方法,其特征在于,所述方法包括将分离母种后,制备原种,制备生产种,将生产种接种到栽培料后,进行栽培管理,所述栽培管理的主要步骤包括:在20-25℃避光培养30-35天,菌丝成熟后,置于20-25℃遮光处,再经10-15天,菌丝完成后熟期,控制温度在18-22℃,空气相对湿度85-95%之间,光照强度约200-300lux,每日光照10-12小时,二氧化碳含量在1200ppm以下,直至菌盖平展,采收,其中,所述栽培料成分包括:木屑55-58%、棉籽壳31-33%、麸皮8-10%、CaCO₃ 1-2%,所述栽培料的含水量60-65%。

3. 根据权利要求2所述的栽培方法,其特征在于,所述栽培管理的主要步骤包括:

(1) 在20-25℃避光培养30-35天,此时菌丝已基本长满栽培料;

(2) 菌丝成熟后,置于20-25℃遮光处,再经10-15天,菌丝完成后熟期;

(3) 控制温度在18-22℃,空气相对湿度85-95%之间,光照强度约200-300lux,每日光照10-12小时,二氧化碳含量在1200ppm以下,直至菌盖平展,采收。

4. 根据权利要求2所述的栽培方法,其特征在于,所述分离母种步骤包括:无菌操作接入组织分离的菌种,置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝长满母种培养基例如母种培养基斜面后则可进行转接,其中,所述分离母种过程使用的分离母种培养基包含以下重量百分比的组分:马铃薯20%、葡萄糖2%、琼脂2%、磷酸二氢钾0.3%、硫酸镁0.15%、维生素B1微量,其余为水。

5. 根据权利要求2所述的栽培方法,其特征在于,所述制备原种的步骤包括:向原种料中无菌操作接入母种,接种时确保母种料块埋入原种料中,把已接种的原种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为原种转接;所述制备原种的原种料包括以下重量百分比的组分:高粱75-79%、小米16-20%、CaCO₃ 1-2%,所述原种料的含水量55-60%。

6. 根据权利要求2所述的栽培方法,其特征在于,所述制备生产种的步骤包括:向生产种料中无菌操作接入原种,接种时确保原种料块埋入生产种料中,把已接种的生产种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为生产种转接;所述制备生产种的生产种料包括以下重量百分比的组分:棉籽壳87-89%、麸皮10-12%、CaCO₃ 1-2%;或棉籽壳48-52%、木屑25-30%、麸皮18-20%、碳酸钙1-2%、硫酸钙1-2%,所述生产种料的含水量为55-60%。

7. 根据权利要求2所述的栽培方法,其特征在于,所述将生产种接种到栽培料的步骤包括:将生产种无菌操作转入栽培料中,后续栽培管理。

8. 根据权利要求2所述的栽培方法,其特征在于,包括:

1、分离母种:无菌操作接入组织分离的菌种,置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝长满母种培养基例如母种培养基斜面后则可进行转接;

2、制备原种:向原种料中无菌操作接入母种,接种时确保母种料块埋入原种料中,把已接种的原种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为原种转接;

3、制备生产种:向生产种料中无菌操作接入原种,接种时确保原种料块埋入生产种料中,把已接种的生产种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为生产种转接;

- 4、将生产种接种到栽培料：将生产种无菌操作转入栽培料中，栽培管理；
- 5、栽培管理，包括：
 - (1) 在20-25℃避光培养30-35天，此时菌丝已基本长满栽培料；
 - (2) 菌丝成熟后，置于20-25℃遮光处，再经10-15天，菌丝完成后熟期；
 - (3) 控制温度在18-22℃，空气相对湿度85-95%之间，光照强度约200-300lux，每日光照10-12小时，二氧化碳含量在1200ppm以下，直至菌盖平展，采收。
9. 权利要求1所述的黄褶裸伞新菌种CCTCC No:M2017212或黄褶裸伞新菌种CCTCC No:M2017212提取物在制备预防和/或治疗肿瘤药物中的用途，所述肿瘤优选包括乳腺癌。
10. 根据权利要求9所述的用途，其特征在于，所述提取物为乙酸乙酯提取物。

一种黄褶裸伞新菌种及其栽培方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新菌种及其人工栽培方法,尤其涉及一种黄褶裸伞新菌种及其栽培和用途。

背景技术

[0002] 据报道,目前存在于地球上的大型真菌约为150000种,已经为人们所知的不超过10%,除了我们大家熟知的香菇、木耳、平菇等食用菌,灵芝、虫草等药用菌外,还有大量的大型真菌的丰富资源亟待科研工作者去揭示与利用。

[0003] 我国野生菌种类繁多,绝大多数野生菌是可以被人们采集和食用的,有些种类是有毒的,不能直接食用,但是可以提取其中的毒素作为人或动物的药物,或者作为杀虫剂等进行开发。有些野生菌种类子实体坚硬,无法被人直接食用,但是可以利用它们来生产各种有用的酶,用于生产纤维素或对有机物进行降解。有些种类是松树、桦树、栎树等树木的共生菌,可以利用他们来繁育树苗,提高幼苗的栽培成活率。

[0004] 虽然野生菌数量众多,目前能人工栽培的仅占不到3.4%,绝大多数都处于自然生长状态,野生菌驯化研究仍具很大潜力,其中不乏质地优良,具有食用或药用价值的种类。开展野生菌的驯化工作,不仅可以增加市场食药菌种类,促进我国食药菌产业发展,对增加农民收入,促进农业发展,推动社会主义新农村建设都具有重要意义。

[0005] 裸伞属*Gymnopilus*是属于伞菌目(Agaricales)、球盖菇科(Strophariaceae)的一类大型真菌,该属内许多品种具有毒性,我国已报道的橘黄裸伞*Gymnopilus spectabilis*、绿褐裸伞*Gymnopilus aeruginosus*、条纹裸伞*Gymnopilus liquieiriae*、储黄裸伞*Gymnopilus penetrans*、杉木黄裸伞*Gymnopilus picrina*等均为有毒种类,中毒类型多为胃肠炎型或神经精神型。研究表明,裸伞含有裸盖菇素,它是一类具神经致幻作用的神经毒素,含裸盖菇素的蘑菇在墨西哥等地的土著人的某些宗教仪式中使用了数百年。裸盖菇素的毒理作用机制现在还没有完全弄清,通常认为它首先进入血液循环,再到达神经系统,然后激活5-羟色胺受体而引起神经兴奋作用。裸盖菇素主要作用于自主神经,引起神经兴奋、致幻,严重的出现心动过速、瞳孔放大、排尿困难,但一般不会危及生命。

[0006] 在裸伞属中研究得较多的是橘黄裸伞。橘黄裸伞(*Gymnopilus spectabilis* (Fr.) Sing.),中文俗称“大笑菌”,广泛分布于世界各地。据报道,橘黄裸伞是一种有毒的蘑菇,误食后可引起头眼昏花、如醉酒者步态不稳,轻者轻狂大笑,重者昏迷甚至死亡。此外,橘黄裸伞中的苦味成分还具有神经兴奋和抗肿瘤作用。从上个世纪70年代,人们就开始对橘黄裸伞子实体化学成分进行研究,并发现了许多结构新颖并具有一定生理功能的化合物。曾有研究报道表明,黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*是一种有希望对伐木厂受污染土壤进行生物降解的真菌。

[0007] 在人工驯化方面,包海鹰等人首次实现对该菌株的驯化栽培,结果表明:橘黄裸伞能在麦麸、锯末、石膏、石灰,且不添加多菌灵的培养料上长出子实体,从接种到现原基时间为6个月。橘黄裸伞是一种可以实现人工栽培的菌物,但因周期长、子实体产量低等因素,目

前尚未进行商业化栽培。

[0008] 鉴于裸伞属的有毒品种较多,而目前对黄褶裸伞的研究几乎为空白,针对它的野生菌种进行人工驯化研究及功能方面进行研究,提供黄褶裸伞的菌种及栽培方法,对于野生食用菌的应用有积极的作用和意义。

发明内容

[0009] 针对以上不足,本发明提供一种黄褶裸伞新菌种及其栽培和用途。

[0010] 本发明通过以下方案达到上述目的:

[0011] 在本发明的第一方面,提供一种黄褶裸伞新菌种,该新菌种在西藏林芝地区色季拉山观景台采集得到,经过形态学和分子生物学鉴定为黄褶裸伞新菌种,通过对子实体部分进行组织分离得到原始菌株,命名为黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius* HMGIM-X120086,已于2017年4月27日保藏于中国典型培养物保藏中心(简称CCTCC,地址为:武汉市洪山区八一路武汉大学),保藏编号为CCTCC No:M2017212。

[0012] 经分子生物学测定其ITS分子序列,与黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*相似性高达99%,经过形态学鉴定,其宏观特征和显微特征与黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*一致,鉴定为黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*。

[0013] 黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius* HMGIM-X120086具有以下形态特征:子实体小型至中等大小,菌盖直径1.5-5cm,凸镜形,后期渐平展;菌盖表面黏,初期紫红色至红褐色,后期中部淡紫红色,边缘逐渐变浅,呈现粉黄色。菌肉薄,初期为淡紫色,后期变黄色,味道苦,气味不明显。菌褶直生至稍延生,初期肉桂色,后期黄褐色,褶幅宽,密。菌柄中生,长1.5-3.5cm,粗0.3-0.8cm,等粗或向下渐粗,与菌盖表面近同色,基部颜色较深,菌环以下具纤毛状鳞片,中实。菌环上位,纤维质,易脱落。

[0014] 担孢子椭圆形至卵圆形,5.5-7×4-5μm,芽孔微小,壁薄,光滑,遇KOH溶液呈浅锈褐色至锈褐色;孢子印锈褐色。担子棍棒状,17-23×4-5.5μm,具2-4个担孢子小梗,长约2.5μm,壁薄,光滑,遇KOH溶液内含物呈现浅黄色。褶缘囊状体丛生,25-40×8-10μm,呈拟纺锤形至近棍棒状,壁薄,光滑,遇KOH溶液透明至带褐色。菌褶菌髓平行型,菌丝直径约10μm,壁薄,光滑,遇KOH溶液透明至带黄色。菌盖皮层菌丝直径2.5-5μm,壁薄,光滑,遇KOH溶液透明。菌肉菌丝细胞略膨大,直径6.5-8.5μm,壁薄,光滑,遇KOH溶液透明至带黄色,具锁状联合。

[0015] 黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*最早由Charles Horton Peck记载于1875年,命名为*Agaricus luteofolius*,将它列为蘑菇属的一种,1887年Pier Andrea Saccardo将其易名为*Pholiota luteofolius*,归属于鳞伞属。1951年真菌学家Rolf Singer将其命名为现名。

[0016] 黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*经常被认为是黄色菌褶的裸伞,广泛分布于密树丛的枯的阔叶树和针叶树上。在北美的东海岸发生于七月末,西海岸则发生于冬季。它具有锈橙色的孢子印和苦味。它含有致幻的裸盖菇素。

[0017] 国内对此有研究的学者图力古尔根据微观特征认为*Gymnopilus luteofolius*仍应命名为黄褶鳞伞*Pholiota luteofolia* (Pk.) Sacc,提出其在中国的分布地为黑龙江,俄罗斯(远东地区)也有分布(2005)。认为该种的主要特征为:菌盖凸镜形,表面黏,中部淡紫

红色,边缘渐浅,呈粉黄色;菌柄与盖面近同色;担孢子侧面为菜豆形;侧生囊状体呈中间膨大的拟纺锤形。该种曾被Singer R.放在裸伞属(*Gymnopilus* Karst.)中,作为*Gymnopilus luteofolius* (Pk.) Sing.。但裸伞属与鳞伞属的主要区别在于担孢子壁的状态:裸伞属担孢子壁粗糙、具小瘤、无芽孔;鳞伞属的担孢子壁光滑、芽孔有或无。

[0018] 发明人观察研究发现本发明的菌种的担孢子壁状态更倾向于鳞伞属,故暂将该种放入鳞伞属中,并作为国内新记录种。

[0019] 根据Laura Guzman-Davalos等的研究结果,裸伞属的传统分类与分子鉴定的结果并不能够完全吻合,鉴于Laura Guzman-Davalos阐述的观点结合在Indexfungorum上的目前命名,发明人仍将其命名为*Gymnopilus luteofolius*。

[0020] 本发明的第二方面,提供了一种上述黄褶裸伞新菌种(CCTCC No:M2017212)的人工栽培方法,作为一种珍稀食用菌,其人工栽培的成功,具有重要的经济价值和社会价值。

[0021] 一种上述黄褶裸伞新菌种(CCTCC No:M2017212)的栽培方法,主要包括分离母种后,制备原种,制备生产种,将生产种接种到栽培料后,进行栽培管理,所述栽培管理的主要步骤包括:在20-25℃避光培养30-35天,菌丝成熟后,置于20-25℃遮光处,再经10-15天,菌丝完成后熟期,控制温度在18-22℃,空气相对湿度85-95%之间,光照强度约200-300lux,每日光照10-12小时,二氧化碳含量在1200ppm以下,直至菌盖平展,采收,其中,所述栽培料成分包括:木屑55-58%、棉籽壳31-33%、麸皮8-10%、CaCO₃1-2%,所述栽培料的含水量60-65%。

[0022] 一种优选的栽培方法,主要包括包括将分离母种后,制备原种,制备生产种,将生产种接种到栽培料后,进行栽培管理,所述栽培管理的主要步骤包括:在25℃避光培养30-35天,菌丝成熟后,置于25℃遮光处,再经10-15天,菌丝完成后熟期,控制温度在18-22℃,空气相对湿度85-90%之间,光照强度约200-300lux,每日光照12小时,二氧化碳含量在1200ppm以下,直至菌盖平展,采收,其中,所述栽培料成分包括:木屑55-58%、棉籽壳31-33%、麸皮8-10%、CaCO₃1-2%,所述栽培料的含水量60-65%。

[0023] 进一步优选的,所述栽培管理的主要步骤包括:

[0024] (1) 在20-25℃避光培养30-35天,此时菌丝已基本长满栽培料;

[0025] (2) 菌丝成熟后,置于20-25℃遮光处,再经10-15天,菌丝完成后熟期;

[0026] (3) 控制温度在18-22℃,空气相对湿度85-95%之间,光照强度约200-300lux,每日光照10-12小时,二氧化碳含量在1200ppm以下,直至菌盖平展,采收。

[0027] 优选的,所述分离母种过程使用的分离母种培养基包含以下重量百分比的组分:马铃薯20%、葡萄糖2%、琼脂2%、磷酸二氢钾0.3%、硫酸镁0.15%、维生素B1微量,其余为水。

[0028] 优选的,所述制备分离母种培养基的步骤包括:将分离母种培养基的组分混合,溶解琼脂后分装试管,高温灭菌,得到分离母种培养基。

[0029] 进一步优选的,所述高温灭菌包括:在0.11MPa大气压、121℃高温高压湿热灭菌30min。

[0030] 优选的,所述分离母种步骤包括:无菌操作接入组织分离的菌种,置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝长满母种培养基例如母种培养基斜面后则可进行转接。

[0031] 进一步优选的,所述分离母种步骤包括:无菌操作接入组织分离的菌种,置于25℃

培养箱中恒温暗培养,待菌丝长满母种培养基例如母种培养基斜面后则可进行转接;其中,所述分离母种过程使用的分离母种培养基包含以下重量百分比的组分:马铃薯20%、葡萄糖2%、琼脂2%、磷酸二氢钾0.3%、硫酸镁0.15%、维生素B1微量,其余为水。

[0032] 优选的,所述制备原种的原种料包括以下重量百分比的组分:高粱75-79%、小米16-20%、CaCO₃1-2%,所述原种料的含水量55-60%。

[0033] 优选的,所述制备原种料的步骤包括:将高粱经水浸泡,例如浸泡过夜,按比例混入小米、碳酸钙,装入透明聚丙烯菌种袋中,装好料后在袋口套上塑料环,扣上配套的盖子,即得到原种料。

[0034] 进一步优选的,所述透明聚丙烯菌种袋为13cm×25cm耐高温的透明聚丙烯菌种袋,折合每袋装干料60-80g。

[0035] 进一步优选的,将所述原种袋料高温灭菌后制备原种。

[0036] 进一步优选的,所述高温灭菌步骤包括:在0.11MPa大气压、121℃高温高压湿热灭菌30min。

[0037] 进一步优选的,所述制备原种的步骤包括:向原种料中无菌操作接入母种,接种时确保母种料块埋入原种料中,把已接种的原种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为原种转接。

[0038] 进一步优选的,所述制备原种的步骤包括:向原种料中无菌操作接入母种,接种时确保母种料块埋入原种料中,把已接种的原种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为原种转接,所述步骤大概需要15d左右;所述制备原种的原种料包括以下重量百分比的组分:高粱75-79%、小米16-20%、CaCO₃1-2%,所述原种料的含水量55-60%。

[0039] 优选的,所述制备生产种的生产种料包括以下重量百分比的组分:棉籽壳87-89%、麸皮10-12%、CaCO₃1-2%;或棉籽壳48-52%、木屑25-30%、麸皮18-20%、碳酸钙1-2%、硫酸钙1-2%,所述生产种料的含水量为55-60%。

[0040] 优选的,所述制备生产种料的步骤包括:将棉籽壳经水浸泡,优选泡湿过夜,按比例混入木屑、麸皮、碳酸钙,装入透明聚丙烯菌种袋中,装好料后用小木棒在袋料中打洞,洞深至袋底,然后在袋口套上塑料环,扣上配套的盖子,得到生产种袋料。

[0041] 优选的,所述透明聚丙烯菌种袋为13cm×25cm耐高温的透明聚丙烯菌种袋,折合每袋装干料250-300g。

[0042] 进一步优选的,将所述生产种袋料高温灭菌后制备生产种。

[0043] 进一步优选的,所述高温灭菌包括:在0.147MPa大气压、128℃高温高压湿热灭菌90min。

[0044] 进一步优选的,所述制备生产种的步骤包括:向生产种料中无菌操作接入原种,接种时确保原种料块埋入生产种料中,把已接种的生产种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为生产种转接。

[0045] 进一步优选的,所述制备生产种的步骤包括:向生产种料中无菌操作接入原种,接种时确保原种料块埋入生产种料中,把已接种的生产种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为生产种转接,所述这一步骤大概需要30d左右;所述制备生产种的生产种料包括以下重量百分比的组分:棉籽壳87-89%、麸皮10-12%、CaCO₃1-2%;或棉籽壳48-52%、木屑25-30%、麸皮18-20%、碳酸钙1-2%、硫酸钙1-2%,所述生产种料的含水量

为55-60%。

[0046] 优选的,所述栽培料包括以下重量百分比的组分:木屑55-58%、棉籽壳31-33%、麸皮8-10%、CaCO₃1-2%,所述栽培料的含水量60-65%。

[0047] 优选的,所述制备栽培料的步骤包括:将棉籽壳经水浸泡,优选泡湿过夜,按比例混入木屑、麸皮、碳酸钙,装入透明聚丙烯菌种袋中,装好料后用小木棒在袋料中打洞,洞深至袋底,然后在袋口套上塑料环,扣上配套的盖子,得到栽培料。

[0048] 优选的,所述透明聚丙烯菌种袋为17cm×35cm耐高温的透明聚丙烯菌种袋,折合每袋装干料450-500g。

[0049] 优选的,所述将生产种接种到栽培料的步骤包括:将生产种无菌操作转入栽培料中,后续进行栽培管理。

[0050] 在一个优选的实施例中,所述黄褶裸伞新菌种(CCTCC No:M2017212)的栽培方法,包括:

[0051] 1、分离母种:无菌操作接入组织分离的菌种,置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝长满母种培养基例如母种培养基斜面后则可进行转接;

[0052] 2、制备原种:向原种料中无菌操作接入母种,接种时确保母种料块埋入原种料中,把已接种的原种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为原种转接,所述步骤大概需要15d左右;

[0053] 3、制备生产种:向生产种料中无菌操作接入原种,接种时确保原种料块埋入生产种料中,把已接种的生产种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后则可作为生产种转接,所述这一步骤大概需要30d左右;

[0054] 4、将生产种接种到栽培料:将生产种无菌操作转入栽培料中,栽培管理;

[0055] 5、栽培管理,包括:

[0056] (1) 在20-25℃避光培养30-35天,此时菌丝已基本长满栽培料;

[0057] (2) 菌丝成熟后,置于20-25℃遮光处,再经10-15天,菌丝完成后熟期;

[0058] (3) 控制温度在18-22℃,空气相对湿度85-95%之间,光照强度约200-300lux,每日光照10-12小时,二氧化碳含量在1200ppm以下,直至菌盖平展,采收。

[0059] 在另一个优选的实施例中,所述黄褶裸伞新菌种(CCTCC No:M2017212)的栽培方法,除包括上述方法步骤外,还包括培养基如下:

[0060] 所述分离母种过程使用的分离母种培养基包含以下重量百分比的组分:马铃薯20%、葡萄糖2%、琼脂2%、磷酸二氢钾0.3%、硫酸镁0.15%、维生素B1微量,其余为水;

[0061] 所述制备原种的原种料包括以下重量百分比的组分:高粱75-79%、小米16-20%、CaCO₃1-2%,所述原种料的含水量55-60%;

[0062] 所述制备生产种的生产种料包括以下重量百分比的组分:棉籽壳87-89%、麸皮10-12%、CaCO₃1-2%;或棉籽壳48-52%、木屑25-30%、麸皮18-20%、碳酸钙1-2%、硫酸钙1-2%,所述生产种料的含水量为55-60%;

[0063] 所述栽培料成分包括:木屑55-58%、棉籽壳31-33%、麸皮8-10%、CaCO₃1-2%,所述栽培料的含水量60-65%。

[0064] 在另一个优选的实施例中,所述黄褶裸伞新菌种(CCTCC No:M2017212)的栽培方法,包括:

[0065] 1、分离母种：无菌操作接入组织分离的菌种，置于25℃培养箱中恒温暗培养，待菌丝长满母种培养基例如母种培养基斜面后则可进行转接；其中，所述分离母种过程使用的分离母种培养基包含以下重量百分比的组分：马铃薯20%、葡萄糖2%、琼脂2%、磷酸二氢钾0.3%、硫酸镁0.15%、维生素B1微量，其余为水；

[0066] 2、制备原种：向原种料中无菌操作接入母种，接种时确保母种料块埋入原种料中，把已接种的原种置于25℃培养箱中恒温暗培养，待菌丝吃满料后则可作为原种转接，所述步骤大概需要15d左右；所述制备原种的原种料包括以下重量百分比的组分：高粱75-79%、小米16-20%、CaCO₃1-2%，所述原种料的含水量55-60%；

[0067] 3、制备生产种：向生产种料中无菌操作接入原种，接种时确保原种料块埋入生产种料中，把已接种的生产种置于25℃培养箱中恒温暗培养，待菌丝吃满料后则可作为生产种转接，所述这一步骤大概需要30d左右；所述制备生产种的生产种料包括以下重量百分比的组分：棉籽壳87-89%、麸皮10-12%、CaCO₃1-2%；或棉籽壳48-52%、木屑25-30%、麸皮18-20%、碳酸钙1-2%、硫酸钙1-2%，所述生产种料的含水量为55-60%；

[0068] 4、将生产种接种到栽培料：将生产种无菌操作转入栽培料中，栽培管理；所述栽培料成分包括：木屑55-58%、棉籽壳31-33%、麸皮8-10%、CaCO₃1-2%，所述栽培料的含水量60-65%；

[0069] 5、栽培管理，包括：

[0070] (1) 在20-25℃避光培养30-35天，此时菌丝已基本长满栽培料；

[0071] (2) 菌丝成熟后，置于20-25℃遮光处，再经10-15天，菌丝完成后熟期；

[0072] (3) 控制温度在18-22℃，空气相对湿度85-95%之间，光照强度约200-300lux，每日光照10-12小时，二氧化碳含量在1200ppm以下，直至菌盖平展，采收。

[0073] 采用本发明的栽培方法进行栽培，使得本发明中的黄褶裸伞新菌种的栽培周期较短，从接种到子实体发育约2个月即可完成，采用的培养基（种料）中以棉籽壳为主，木屑为辅，不同于现有技术的同属其他品种例如橘黄裸伞的栽培培养基（种料）和栽培方法。特别地，在黄褶裸伞的栽培中，母种分离、原种制作及栽培管理过程中培养基的配制及温度湿度光照等条件的控制对于其快速出菇有着重要的影响。

[0074] 与现有技术相比，本发明不仅成功人工驯化了新菌种黄褶裸伞新菌种（CCTCC No：M2017212），并且人工栽培周期短，只需要1-2个月为一期，具有重要的经济价值和推广意义。

[0075] 在本发明的第三方面，本发明还提供一种上述黄褶裸伞新菌种CCTCC No：M2017212或黄褶裸伞CCTCC No：M2017212提取物在制备预防和/或治疗肿瘤药物中的用途。

[0076] 优选的，所述肿瘤包括乳腺癌。

[0077] 优选的，所述乳腺癌为人恶性乳腺癌细胞（MT-1）引起的乳腺癌。

[0078] 优选的，所述黄褶裸伞CCTCC No：M2017212提取物为有机溶剂提取物，进一步优选为酯类提取物，例如乙酸乙酯提取物。

[0079] 在一个优选的实施例中，提供了一种黄褶裸伞CCTCC No：M2017212乙酸乙酯提取物在制备预防和/或治疗肿瘤药物中的用途，肿瘤包括乳腺癌，例如抗肿瘤细胞MT-1。

[0080] 经过发明人反复试验研究，摸索得到了适合于本发明所述黄褶裸伞新菌种的栽培培养基和栽培方法，可成功实现黄褶裸伞的人工栽培。并且证实了其乙酸乙酯提取物等在

抗肿瘤方面的显著效果。

附图说明

[0081] 图1为实施例1的栽培得到的黄褶裸伞新菌种孢子实体图。

[0082] 图2为实施例2的野外采集的黄褶裸伞新菌种图。

具体实施方式

[0083] 以下结合具体实施例对本发明进行进一步说明。

[0084] 实施例1

[0085] 一、黄褶裸伞新菌种 (CCTCC No:M2017212) 的栽培方法,培养基如下:

[0086] 1、母种培养基

[0087] 配方:马铃薯20%+葡萄糖2%+琼脂2%+磷酸二氢钾0.3%+硫酸镁0.15%+维生素B1微量,水1000毫升。

[0088] 2、原种料

[0089] 配方:高粱75-79%,小米16-20%,CaCO₃1-2%,含水量55-60%。

[0090] 3、生产种料

[0091] 配方1:棉籽壳87-89%,麸皮10-12%,CaCO₃1-2%,含水量55-60%。

[0092] 或;

[0093] 配方2:棉籽壳48-52%+木屑25-30%+麸皮18-20%+碳酸钙1-2%+硫酸钙1-2%,含水量55-60%。

[0094] 4、栽培料

[0095] 木屑55-58%,棉籽壳31-33%,麸皮8-10%,CaCO₃1-2%,含水量60-65%,pH自然。

[0096] 二、黄褶裸伞新菌种 (CCTCC No:M2017212) 的栽培方法,步骤如下:

[0097] 1、分离母种:

[0098] 按配方制作母种培养基,溶解琼脂后分装试管,在0.11MPa大气压、121℃高温高压湿热灭菌30min,取出冷却无菌操作接入组织分离的菌种。

[0099] 置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝长满斜面后则可进行转接。

[0100] 2、制备原种:

[0101] 称取所需比例的高粱,经水泡湿过夜,按比例混入小米、碳酸钙,装入13cm×25cm耐高温的透明聚丙烯菌种袋中,折合每袋装干料60-80g。装好料后在袋口套上塑料环,扣上配套的盖子,即得一个制好的原种袋料。在0.11MPa大气压、121℃高温高压湿热灭菌30min,取出冷却后无菌操作接入母种。接种时确保母种料块埋入原种料中。把已接种的原种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后(大概15天左右)则可作为原种使用接入栽培袋中。

[0102] 3、制备生产种:

[0103] 称取所需比例的棉籽壳,经水泡湿过夜,按比例混入木屑、麸皮、碳酸钙,装入13cm×25cm耐高温的透明聚丙烯菌种袋中,折合每袋装干料250-300g。装好料后用小木棒在袋料中打洞,洞深至袋底,然后在袋口套上塑料环,扣上配套的盖子,即得一个制好的生产种袋料。

[0104] 在0.147MPa大气压、128℃高温高压湿热灭菌90min,取出冷却后无菌操作接入原种。接种时确保原种料块埋入生产种料中。把已接种的生产种置于25℃培养箱中恒温暗培养,待菌丝吃满料后(大概30d左右)则可作为生产种使用接入栽培袋中。

[0105] 4、将生产种接种到栽培料:

[0106] 栽培料袋的制作过程同生产种,但所用配方不同,所用袋子为17cm×35cm耐高温的透明聚丙烯菌种袋。折合每袋装干料450-500g。将生产种接种到栽培料中。

[0107] 5、栽培管理:

[0108] (1) 在20-25℃避光培养30-35天,此时菌丝已基本长满栽培料;

[0109] (2) 菌丝成熟后,置于20-25℃遮光处,再经10-15天,菌丝完成后熟期;

[0110] (3) 控制温度在18-22℃,空气相对湿度85-95%之间,光照强度约200-300lux,每日光照10-12小时,二氧化碳含量在1200ppm以下,直至菌盖平展,采收。

[0111] 三、栽培结果如下:

[0112] 1、出菇期:子实体从原基发生至菌盖平展需时约20天。

[0113] 2、产量:第1潮子实体约47.9g/袋(鲜重)。

[0114] 3、栽培得到的子实体性状:子实体小型至中等大小,菌盖凸镜形,后期渐平展;菌盖表面黏,淡紫红色,边缘逐渐变浅,呈现粉黄色。菌肉薄,初期为淡紫色,后期变黄色,味道苦,气味不明显。菌褶直生至稍延生,黄褐色,褶幅宽,密。菌柄中生,菌环以下具纤毛状鳞片,中实。菌环上位,纤维质,易脱落。如图1所示。

[0115] 与野生状态相比,该菌种在人工驯化后从采集的单生状态变为丛生状态,能够培养出较多的子实体,且可以在袋料上长出子实体,产量增加,子实体的菌柄增长,体现出较为典型的子实体特征。

[0116] 实施例2菌种鉴定

[0117] 于西藏林芝地区色季拉山观景台采集得到的本发明的菌种野生子实体,如图2所示,通过组织分离法得到其纯培养物,对驯化子实体分别取样,得到其菌褶和菌柄组织低温(40℃)烘干,使用液氮研磨,利用Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒,进行DNA基因组的提取,得到的DNA溶液。

[0118] 通过真菌核糖体基因间隔区通用引物ITS1/ITS4(引物1ITS1:TCCTAGGTGAACCTGCGG,引物2ITS4:TCCTCCGCTTATTGATATGC,进行ITS-PCR实验,PCR反应液组成(共50μl)为:

TaKaRaTaq (5 units/μl)	0.25 μl
10×PCR Buffer	5 μl
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4 μl

[0119] DNA 模板 2 μl

引物 1 (10μmol·L⁻¹) 5μl

引物 2 (10μmol·L⁻¹) 5μl

灭菌蒸馏水 28.75μl

[0120] 反应条件为:

[0121] 94℃反应5min;94℃反应1min,55℃反应1min,72℃反应1min,30个循环;72℃反应10min。

[0122] 将得到的PCR扩展产物测序,得到的ITS序列与GenBank进行序列Blast,发现与黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*相似性高达99%。

[0123] 进一步地,结合形态学鉴定,该菌种宏观特征和显微特征与黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*描述一致,鉴定结果为黄褶裸伞*Gymnopilus luteofolius*。

[0124] 实施例3抗肿瘤功能测定

[0125] 1、乙酸乙酯提取物的制备

[0126] 将本发明的菌株进行液体发酵,收集菌丝体抽滤后60度烘干,烘干的菌丝体用乙酸乙酯浸泡时间可在10小时后超声提取,超声100min,提取二次,合并二次有机相,将收集好的有机相进行抽滤后,将抽滤得到的液体用旋转蒸发器旋蒸至无液滴状态,低温保藏(4℃)备用。

[0127] 2、肿瘤细胞培养

[0128] 用含青霉素、链霉素和10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液进行人恶性乳腺癌细胞(MT-1)培养。将含有10%FBS的DMEM细胞悬液接种于24孔组织培养板上,细胞浓度为 0.5×10^5 /孔。培养物置于37℃、5%CO₂的组织培养箱中培养4小时待用。

[0129] 3、抑制肿瘤细胞实验

[0130] 将菌丝体的乙酸乙酯提取物溶解于DMSO中,再加入培养基,配成50mg/mL的母液,过滤后用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液将母液分别稀释为50、100、200、400、800、1600μg/ml的样品溶液,小心吸去96孔培养板里的细胞培养液,分别加入终浓度分别为50、100、200、400、800、1600μg/ml的样品溶液,然后置于37℃、5%CO₂组织培养箱中培养48小时。对照组只含PBS和培养基。

[0131] 培养结束后,收集细胞,与台酚蓝1:1混合进行拒染法染色。死细胞被染成蓝色,活细胞因有完整的细胞膜而未着色。用细胞计数器测定活细胞数。每个实验重复三次。

[0132] 4、结果

[0133] 使用SPSS.16专用统计软件进行统计,计算不同浓度的黄褶裸伞CCTCC M 2017212乙酸乙酯提取物对体外肿瘤乳腺癌细胞MT-1的抑制率,采用配对t检验,P<0.05具有显著性差异。由实验数据计算得出IC₅₀为50μg/mL,具体结果如表1所示。

[0134] 表1:黄褶裸伞CCTCC M 2017212乙酸乙酯提取物对于体外肿瘤乳腺癌细胞MT-1的抑制作用实验结果

[0135]

供试样品浓度(μg/mL)	抑制率
50	56.57%
100	70.03%

[0136]

200	95.77%
400	100.00%
800	100.00%
1200	100.00%

[0137] 从表1的数据可知,黄褶裸伞体外抑制乳腺癌细胞MT-1的效果很强,由于灵芝的乙酸乙酯提取物的IC50值在200-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间,而它的乙酸乙酯的IC50在50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。实验证明,黄褶裸伞CCTCC M 2017212醇提物体外抑制乳腺癌细胞MT-1的效果非常明显,是具有开发前景的一个野生品种。

[0138] 以上所述,仅为本发明的较佳的具体实施例,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围内。



图1

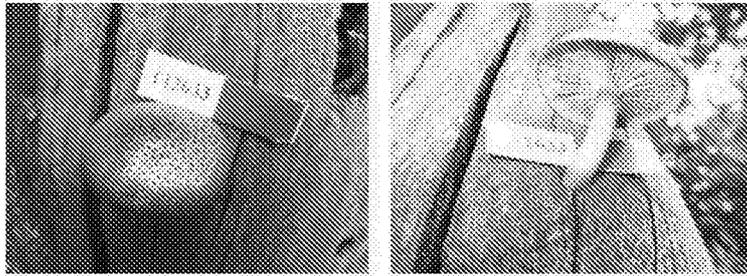


图2