

六种蜜环菌固体培养基配方的筛选

刘太林, 李 黎, 周正涛, 黎 祥

(天津天狮学院 生物与食品工程学院, 天津 301700)

摘 要:引种了6个蜜环菌菌种分别接种于8个不同配方的固体培养基中进行筛选试验。从萌发时间、满皿时间、生长势、菌索干重等方面进行评价。结果表明:菌种 AM7 在培养基配方 8 (马铃薯 20 g, 木屑 20 g, 麦麸 20 g, 胡萝卜 20 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 5 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 10 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 1 g, 维生素 B_1 10 mg, 水 1 000 mL) 上萌发时间最短, 生长速度快, 生长生物量最大, 与其它菌种和配方组合差异达显著或极显著水平, 是最佳组合; 菌种 AM6 和宁强 A9 菌种在配方 8 培养基上生长生物量较高, 与其它组合差异显著, 也是较好的菌种。该研究筛选出的优良品种和配方组合可以用于生产。

关键词:蜜环菌; 菌种; 固体培养基; 筛选

中图分类号:S 646.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0145-04

蜜环菌(*Armillaria mellea*)属担子菌亚门, 层菌纲, 伞菌目, 白蘑科, 蜜环菌属(*Amillaria* (Fr.) Staude) 的一种药食两用真菌^[1], 又名蜜环蕈、青闪蕈等。其子实体虽小但味道鲜美, 富含多种营养素, 菌丝、菌索在暗处会发出荧光^[2]且均可入药。蜜环菌与天麻和猪苓等名贵中药材存在着特殊的共生关系^[3], 蜜环菌类似线绳的黑色菌索侵入天麻块茎或猪苓等菌核后被消化利用, 为天麻或猪苓提供营养, 供其生长所需^[4-5]。

在自然界中, 蜜环菌主要从富含枯枝落叶的土壤基质中获取碳源、氮源、无机盐及维生素等营养物质。在人工栽培培养基上不同的菌株表现出的生长特性差异较明显^[6-7], 蜜环菌种类繁多, 分布广泛^[8], 在中国用于天麻、猪苓栽培伴生的蜜环菌种类报到较多^[9-10]。蜜环菌

菌种的质量决定着二者的产量及品质。筛选优良的蜜环菌株和培养基配方是生产高品质天麻的基础^[11-12]。该研究结合前人的研究基础, 搜集国内几种主要蜜环菌栽培菌种, 采用不同的培养配方, 以期筛选出优质菌种, 获得最佳培养配方。促进蜜环菌的扩大生产, 进而为天麻和猪苓等经济作物的人工栽培提供优质的菌株, 提高产量和产品品质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试6种蜜环菌菌株如表1所示。设有8个不同蜜环菌培养基配方, 如表2所示。仪器为高压灭菌锅, 超净工作台, 电热恒温培养箱, 组织捣碎匀浆机, 电磁炉等。

1.2 试验方法

1.2.1 固体培养基制备 将各个配方的马铃薯、胡萝卜、麦麸、木屑、玉米粉按照比例称好, 加入500 mL左右的去离子水, 倒入组织搅拌匀浆机中匀浆15 min, 然后转

第一作者简介:刘太林(1983-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事药用植物栽培育种与生物技术等研究工作。E-mail: huajizi83@126.com.

基金项目:天津天狮学院校内资助项目(K13005)。

收稿日期:2015-05-25

Abstract: *Lycium barbarum* L. was used as raw material, and spectrophotometry was used to determine content of ammonium alkaloids in methanol extract of *Lycium barbarum* L., based on the reaction of ammonium alkaloids with Remecke salt. The aim was to establish a method for quantitative determination of ammonium alkaloids in methanol extract of *Lycium barbarum* L. The results showed that the average recovery rate of filtrate and precipitation methods was 97.57% and 98.06%, and relative standard deviation was 1.02% and 1.10% (n=6), respectively. Conclusion, the results were consistent for determination of ammonium alkaloids by the two methods, and filtrate method was comparatively simple.

Keywords: *Lycium barbarum* L.; ammonium alkaloids; Reinecke's salt; spectrophotometry; filtrate method; precipitation method

移入电磁炉煮锅中大火煮沸,小火加热 30 min,加热过程中及时搅拌。之后用 3 层纱布过滤,收集滤液,反复冲洗残渣补足培养基为 1 000 mL,之后按照组分表加入剩余的其它组分煮沸。倒入 500 mL 三角烧瓶中,用胶塞密封。高温、高压灭菌。最后置于超净工作台中倒入事先灭菌的 18 mm×180 mm 的试管中,或直径 12 cm 的培养皿中,冷却凝固待用。

1.2.2 接种培养 将事先扩大培养的菌种在超净台下定量接种到试管中或培养皿的中部,每水平接种重复

表 2

蜜环菌固体培养基配方

Table 2

Armillaria solid culture medium formulas

编号 Serial number	组分 Component
1	葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,KH ₂ PO ₄ 2 g,MgSO ₄ 1 g,维生素 B ₁ 10 mg,木屑 100 g,水 1 000 mL
2	葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,KH ₂ PO ₄ 2 g,MgSO ₄ 1 g,维生素 B ₁ 10 mg,麦麸 100 g,水 1 000 mL
3	葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,KH ₂ PO ₄ 2 g,MgSO ₄ 1 g,维生素 B ₁ 10 mg,胡萝卜 100 g,水 1 000 mL
4	葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,KH ₂ PO ₄ 2 g,MgSO ₄ 1 g,维生素 B ₁ 10 mg,玉米粉 100 g,水 1 000 mL
5	改良 PDA:葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,KH ₂ PO ₄ 2 g,MgSO ₄ 1 g,维生素 B ₁ 10 mg,马铃薯 100 g,水 1 000 mL
6	改良 PDA+蛋白胨:葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,KH ₂ PO ₄ 2 g,MgSO ₄ 1 g,维生素 B ₁ 10 mg,马铃薯 100 g,蛋白胨 10 g,水 1 000 mL
7	改良 PDA+牛肉膏:葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,KH ₂ PO ₄ 2 g,MgSO ₄ 1 g,维生素 B ₁ 10 mg,马铃薯 100 g,牛肉膏 10 g,水 1 000 mL
8	混合培养基:马铃薯 20 g,木屑 20 g,麦麸 20 g,胡萝卜 20 g,蛋白胨 5 g,牛肉膏 5 g,葡萄糖 20 g,琼脂 10 g,KH ₂ PO ₄ 2 g,MgSO ₄ 1 g,维生素 B ₁ 10 mg,水 1 000 mL

3 次。培养皿用封口膜封好,置于电热恒温培养箱中 25℃ 恒温培养。

1.3 项目测定

接种后每天观察蜜环菌的生长状况,记录每个处理的萌发时间、满皿时间(满管时间)、生长情况,生长 30 d 后,将培养物转移到目筛中,用流水冲洗掉固态培养基,纱布挤干水分,置于鼓风干燥箱中烘干,测量干重即为蜜环菌生长生物量。

2 结果与分析

2.1 6 种蜜环菌在不同配方培养基上的萌发时间差异

由表 3 可知,各个品种蜜环菌因培养基配方不同,表现出萌发时间有较大差异,其中 4 号蜜环菌 AM7 在 8 种培养基上的萌发时间均值较短,平均只有 4.0 d,其中

表 3

蜜环菌在不同培养基上的萌发时间

Table 3

Armillaria on different culture media

d

菌种 Strain	培养基 Medium								均值 Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	
1	5.7aA	4.7bAB	4.0bB	5.3abAB	5.0abAB	4.3bB	4.3bB	4.0bB	4.7
2	8.0abAB	7.3bAB	7.7abAB	7.7abAB	7.7abAB	8.3aA	8.7aA	6.7bB	7.8
3	7.0aA	7.0aA	6.0bA	6.3abA	6.7abA	6.3abA	6.3abA	5.7bA	6.4
4	4.7aAB	5.0aA	3.3bCB	4.7aAB	4.3abAB	3.3bCB	3.7bB	2.7cB	4.0
5	6.0bAB	5.7bB	6.0bAB	5.3bB	6.7aA	6.3aAB	6.3aAB	5.7bB	6.0
6	5.0aA	4.7aA	5.0aA	5.3aA	5.3aA	3.3bB	4.3aAB	3.3bB	4.5
均值	6.1	5.7	5.4	5.6	6.0	5.3	5.6	4.8	

注:表 3 是将数据均值进行 Duncan 多重比较。大写字母表示在 0.01 水平差异显著,小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下表同。

2.2 蜜环菌 AM7 在不同培养基中生长速度差异

由表 4 可知,同一蜜环菌 AM7 在不同培养基上有不同的生长速度,最短 13.3 d 即可长满培养皿,最长得将近 1 个月满皿。具体而言,蜜环菌在 8 号混合培养基

表 1

供试蜜环菌株来源

Table 1 Selected source of *Armillaria* strains

编号 Serial number	菌株 Strain	来源 Source
1	AM3	贵州遵义市
2	AM4	华中农业大学菌种中心
3	AM6	华中农业大学菌种中心
4	AM7	华中农业大学菌种中心
5	蜜 A9	四川绵阳食用菌研究所
6	宁强 A9	陕西省宁强县真菌研究所

AM7 在混合培养基中平均 2.7 d 即开始萌发,与 3 号和 6 号培养基萌发时间差异不显著,与其它 4 种培养基上的萌发时间都达到了极显著差异水平。表明此菌种在这种培养基中表现出高活力。6 号菌种宁强 A9 在 8 种培养基中的萌发时间平均值为 4.5 d,相对较短,在 3 种附加牛肉膏或蛋白胨的培养基上萌发时间明显小于其它几种,达到了显著差异水平($r < 0.01$),说明这个菌种在含有蛋白胨和牛肉膏的培养基上表现出较高萌发活力。6 种蜜环菌中萌发时间较长的 2 号 AM4,在不同培养基中的平均萌发时间为 7.8 d,表明相对活力较弱。其它 3 个菌种在 8 种不同培养基上的萌发时间差异不明显,处于中间水平。

中的生长速度最快,平均为 13.3 d,多重比较分析表明与所有其它各种培养基满皿时间都达到显著差异水平,且与 1~5 号培养基数据达到极显著差异水平,表明蜜环菌在这种培养基中具有最快的生长速度。其中在改良

PDA 附加牛肉膏或蛋白胨的培养基上生长速度相对也较快,与其它培养基均达到极显著差异水平,表明蛋白胨和牛肉膏更有利于为蜜环菌提供生长的营养素。由表 4 分析得出,混合培养基和改良 PDA 附加牛肉膏或蛋白胨的培养基比较适合作为蜜环菌的培养基。图 1 为菌种在 8 种不同培养基上培养 15 d 后的生长情况,图中数字代表培养基编号。

表 4 AM7 菌种在不同培养基上的满皿时间

Table 4 Dish full time of AM7 strain cultured on different media d

培养基 Medium	满皿时间 Dish full time			均值 Mean
	1	2	3	
1	28	27	28	27.7aA
4	27	27	27	27.0aA
3	23	23	24	23.3bB
5	19	20	22	20.3cBC
2	19	20	20	19.6cC
7	15	16	15	15.3dD
6	15	14	14	14.3deD
8	13	13	14	13.3eD

2.3 蜜环菌菌种在不同培养基上的生长情况评价

由表 5 可知,不同蜜环菌品种在不同培养基上生长情况差异较大。就蜜环菌品种而言,4 号 AM7 和 6 号宁强 A9 在各种培养基上生长情况均最佳;从培养基来看,3、6、7、8 号培养基上的蜜环菌生长情况较好。具体而言

表 5

蜜环菌在不同培养基上的生长情况

Table 5 Comprehensive evaluation of *Armillaria* growth on different culture media

菌种 Strain	培养基 Medium							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	++	+++	+++	++	++	++	++	+++
3	++	++	+++	++	+	+++	+++	+++
4	+++	+++	++++	+++	++	++++	++++	+++++
5	++	++	+++	+	++	+++	+++	+++
6	+++++	+++	++++	++	+++	++++	++++	+++++

注:6 个不同菌种在培养基上的生长情况主要考察指标有菌索的生长势、菌索粗度、密度、边缘整齐度和老化状况等综合评价。用“+”表示正向指标,“+”越多表示生长情况越好。

2.4 蜜环菌在不同培养基中的生长生物量

由表 6 可知,AM7 在各种培养基中的平均生长量最高为 0.355 3 g;AM6 次之为 0.347 0 g,宁强 A9 菌种的平均生长量处于第 3 位,为 0.335 4 g。通过多重比较得出 AM7 菌种在 8 号混合培养基和 3 号添加胡萝卜的培养基上生长量较大,与其它培养基上的生物量都达到了极显著差异水平,表明这 2 种培养基较适合培养 AM7。AM6 菌种在各种培养基上的生长量差异较明显,在改良 PDA 上生物量最低,且与其它组均达到极显著差异水平,在混合培养基和添加胡萝卜的培养基上也表现出较好的生长量。宁强 A9 在混合培养基上生物量与在其它培养基上的生物量也都达到了极显著差异水平,可见混合培养基比较适合培养宁强 A9。不同培养基上的生物量均值也差异较大,在 8 号混合培养基上生

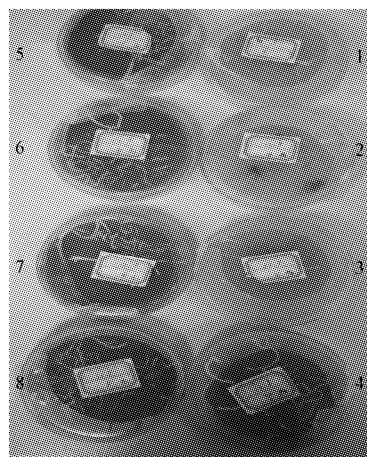


图 1 蜜环菌在不同培养基上生长速度

Fig. 1 Growth speed of *Armillaria* on different media

AM7 在混合培养基上生长情况最好,菌索粗度及密度较大,边缘比较整齐。在胡萝卜(3 号)和附加蛋白胨(6 号)和牛肉膏(7 号)的培养基上也表现较好。宁强 A9 在 1、3、6、7、8 培养基上生长情况接近,表现也较好。其中在含有木屑的 1 号培养基上表现出与其它菌种截然不同的较好长势,可见能够很好的利用木屑培养菌种。

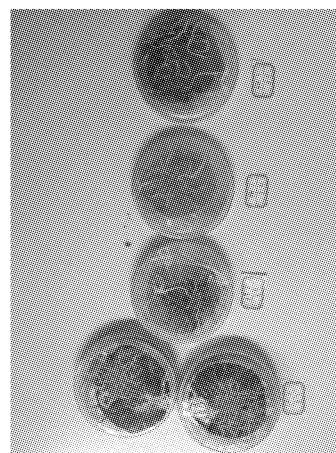


图 2 蜜环菌培养 30 d 的生长状况

Fig. 2 Growth of *Armillaria* cultured for 30 days

表 6

蜜环菌在不同培养基中的生物量

Table 6

Armillaria biomass on different media

g

菌种	培养基 Medium								均值
Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean
1	0.245 1bAB	0.236 2cB	0.252 3aA	0.244 3bB	0.238 8bcB	0.245 0bAB	0.246 1abA	0.252 2aA	0.245 0
2	0.302 4cC	0.298 3cC	0.334 2bB	0.289 0dD	0.299 1cC	0.341 3bB	0.348 1bB	0.381 1aA	0.324 2
3	0.352 3bB	0.334 5cC	0.374 5aA	0.342 1cBC	0.300 3dD	0.350 1bcB	0.350 4bB	0.372 1aA	0.347 0
4	0.372 7bB	0.302 4eD	0.400 2aA	0.334 5dC	0.308 0eD	0.354 0cC	0.363 5bcBC	0.407 4aA	0.355 3
5	0.321 7cC	0.341 3aA	0.347 1aA	0.289 1dD	0.298 1dD	0.334 3bB	0.324 1cC	0.338 1abAB	0.324 2
6	0.343 2bB	0.299 8cC	0.336 8bB	0.335 6bB	0.304 0cC	0.339 0bB	0.342 4bB	0.382 3aA	0.335 4
均值	0.322 9	0.302 1	0.340 9	0.305 8	0.291 4	0.327 3	0.329 1	0.355 5	

物量平均值最高为 0.355 5 g, 在 3 号培养基上次之为 0.340 9 g。通过综合分析, AM7 在 8 号和 3 号培养基表现出极好的生长状态, 生物量处于前 2 位; 宁强 A9 在 8 号混合培养基生长量也较高, AM6 菌种在 3 号和 8 号培养基上的生长量也比较好。可以考虑作为合适的培养基配方和菌种搭配的组合。

3 结论与讨论

每个蜜环菌菌种均有适合的培养基, AM7 在 8 号混合培养基上萌发时间最短, 生长速度快, 生长量多, 是最佳的组合; 其次宁强 A9 菌种相对活力也较好, 生长势较好, 适合在混合培养基上培养; AM6 在 3 号和 8 号培养基上生长量较好, 也可以作为选择方案。只是, 从菌种活力方面, 表现出萌发时间慢, 长势一般。培养基中添加蛋白胨和牛肉膏蜜环菌菌索的粗度、密度及顶端整齐度都有正效应, 可以改善生长情况, 减缓老化。该研究重点考察蜜环菌的培养基配方的筛选, 在数据分析时主要以培养基配方为单因素进行分析, 在后续试验中将进行蜜环菌及配方、培养条件等多因素组合进行研究, 进一步筛选不同菌种不同的培养条件。

参考文献

- [1] 贺伟, 秦国夫, 沈瑞祥. 大兴安岭和长白山地区蜜环菌生物种的研究[J]. 真菌学报, 1996(1): 9-16.
- [2] 卯晓岚. 中国经济真菌[M]. 北京: 北京科学出版社, 1998.
- [3] 周西贝. 蜜环菌优化培养及生物活性的研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2013.
- [4] 王守现, 刘宇, 许峰, 等. 蜜环菌原种品种及配方筛选试验[J]. 中国食用菌, 2010, 29(5): 17-18, 20.
- [5] 熊鹰, 姜邻, 唐利民. 蜜环菌母种培养基筛选试验[J]. 中国食用菌, 2004(5): 25-26.
- [6] 程显好, 郭顺星. 蜜环菌固体培养特性[J]. 中国医学科学院学报 2006, 28(4): 553-557.
- [7] 赵俊, 赵杰. 中国蜜环菌的种类及其在天麻栽培中的应用[J]. 食用菌学报, 2007(1): 67-72.
- [8] 秦国夫, 赵俊, 田淑敏, 等. 中国蜜环菌的新生物种[J]. 菌物系统, 2000(4): 509-516.
- [9] 任思竹, 郭亚萍, 张国庆, 等. 蜜环菌菌种及配方的筛选[C]. 2013 全国首届猪苓会议论文集, 2013: 27-30.
- [10] 顾雅君, 赵刚勇, 薛刚, 等. 食用菌类食品作为功能食品的优势[J]. 中国食用菌, 2002(5): 46-48.
- [11] 陈顺方, 祁岑, 黄先敏. 蜜环菌的生产技术[J]. 现代农业科技, 2009(14): 125-127.
- [12] 李景惠. 天麻蜜环菌的特征与特性[J]. 特种经济动植物, 2002(11): 25-27.

Selection of Solid Media Formulations for Six *Armillaria mellea*

LIU Tailin, LI Li, ZHOU Zhengtao, LI Xiang

(Bioengineering and Food Engineering College, Tianjin Tianshi College, Tianjin 301700)

Abstract: Six *Armillaria mellea* strains were introduced to culture in eight different solid media for selection. The time of germination and overgrow of utensil, the growth potential and the shoestring dry weight were evaluated. The results showed that the best combination was the AM7 strain cultured in medium 8 (potato 20 g, sawdust 20 g, wheat bran 20 g, carrot 20 g, peptone 5 g, beef extract 5 g, glucose 20 g, agar 10 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 1 g, vitamin B_1 10 mg, ddH_2O 1 000 mL), which had the shortest germination, fast growth, the largest growth biomass. There was a significant or extremely significant difference with other combinations. The bacteria strains AM6 and Ning Qiang A9 in the formula 8 medium had a significant difference with other combinations, which were also good strains. The good species and formula combination selected by this study can be used for production.

Keywords: *Armillaria mellea*; strain; solid medium; selection