

王彩云,王 永,严显进,等. 黔西北优质蜜环菌菌株的初步筛选[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):117-119.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.033

黔西北优质蜜环菌菌株的初步筛选

王彩云,王 永,严显进,张翔宇,吉 云,阮培均

(毕节市中药研究所,贵州毕节 551700)

摘要:比较 5 株黔西北本地蜜环菌与引进的 A9 菌株的生长速度、生物量、菌索形态、荧光强度等生物学特性。结果发现,各菌株间存在明显差异,菌索平均生长速度依次为 MHJ-3 > MHJ-1 = A9 > MHJ-6 > MHJ-7 > MHJ-8,菌索平均生物量依次为 MHJ-3 > A9 > MHJ-1 > MHJ-6 > MHJ-8 > MHJ-7, MHJ-3 在菌丝萌发速度、分枝状况、荧光强度及暗培养 20 d 后菌索生物量等生长特性方面均优于 A9。5 株本地天麻共生蜜环菌中,菌株 MHJ-3 活性最强、性状最优, MHJ-1 菌株次之。

关键词:天麻;蜜环菌;黔西北;优质菌株;生长特性

中图分类号: Q949.329+.81 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0117-03

蜜环菌(*Armillaria mellea*)别称榛蘑、榛子蘑,属担子菌亚门(Basidiomycotina)伞菌目(Agaricales)白蘑科(Trichomataceae)蜜环菌属^[1]。自 1790 年 Vahl 首次鉴定蜜环菌后,发现蜜环菌在全世界广泛存在,且能侵染 600 多种树木^[2-4],并导致林木根腐病,造成巨大的经济损失。但其致病性并非绝对的,有些植物被侵染后生长旺盛,如天麻(*Gastrodia elata*)、猪苓(*Polyporus umbellatus*),因此蜜环菌由于其致病性及特殊性成为国内外学者的研究热点^[5-6]。此外,蜜环菌又是一类药食兼用菌,具有重要价值,其产品制剂是治疗眩晕、头痛、神经衰弱的有效药物,目前已广泛应用于临床治疗^[7];其深层发酵产物中富含多糖、必需氨基酸、倍半萜类及嘌呤类化合物等多种有效成分^[8],具有较强的增智健脑、镇痉熄风、神经调节、延缓衰老以及抗癌等药理作用^[9-11],并可增强机体免疫力,与天麻药理作用及临床疗效类似^[12]。

目前由于野生天麻资源的大量采挖导致市场供求关系紧张,天麻仿野生种植成为开发市场、提高产量的重要手段。用于栽培天麻的蜜环菌经连续无性繁殖,菌种会发生严重退化,

从而导致天麻的产量和天麻素含量的急剧下降^[13],黔西北地区栽培天麻所用的蜜环菌大多为引进种,且已出现菌索细、生长缓慢、易感杂、抗旱能力差等缺陷,仿野生栽培中出现菌索过细、“空窝”、菌索过早干枯等状况^[14],这些问题严重影响了天麻的产量及质量。此外,赵俊和赵杰研究表明,全国各个地区天麻种类不同且存在地域差异,跨区域引进菌种或推广存在不科学性^[15]。因此,选育适宜当地种植的优良蜜环菌菌株成为天麻仿野生栽培综合配套技术研究的瓶颈,也是提高天麻产量与质量的迫切问题。本研究针对黔西北地区长期引种造成的蜜环菌菌种退化及天麻产量、质量下降等问题,比较 5 株本地野生蜜环菌及引进种 A9 的菌索生长速度、平均生物量、荧光反应强度等生物学特性,以期黔西北地区筛选出较好的天麻伴生蜜环菌菌株,为解决蜜环菌的跨地区引种问题提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

蜜环菌 MHJ-1、MHJ-3、MHJ-6、MHJ-7、MHJ-8 从黔西北地区野生天麻生长地长有蜜环菌的菌材上分离获得(表 1),蜜环菌 A9 购自陕西省西乡食用菌研究所。

1.2 培养基

PDA 固体培养基(200 g 马铃薯、20 g 蔗糖、8 g 琼脂、1 000 mL 水)、PDA 半固体培养基(200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、5 g 琼脂、1 000 mL 水)、PDA 液体培养基(200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、1 000 mL 水),按常规方法制作。试管 PDA 斜面

收稿日期:2015-11-13

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2015BAI05B00);贵州省毕节市成果转化项目(编号:毕科成字[2014]8号)。

作者简介:王彩云(1989—),女,云南宣威人,硕士,助理研究员,主要从事药用植物资源评价与利用研究。E-mail:wangcaiyun0716@126.com。

通信作者:阮培均,研究员,主要从事药用植物遗传与育种研究。E-mail:rpy3819@126.com。

[6]Hormann H, Neubauer C, Schreiber U. On the relationship between chlorophyll fluorescence quenching and the quantum yield of electron transport in isolated thylakoids[J]. Photosynthesis Research, 1994, 40(1):93-106.

[7]刘思言,关淑艳,姚 丹,等. 番茄种子消毒方法及愈伤组织诱导的初步研究[J]. 河南农业科学, 2012, 41(3):113-115.

[8]王宝山. 逆境植物生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2010: 209-215.

[9]谢英赞,何 平,王朝英,等. 外源 Ca^{2+} 、SA、NO 对盐胁迫下决明

幼苗生理特性的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(3):36-43.

[10]谭会娟,李新荣,赵 昕. 红砂愈伤组织适应盐胁迫的渗透调节机制研究[J]. 中国沙漠, 2011, 31(5):1119-1123.

[11]张丽丽,张 战,赵一洲,等. NaCl 胁迫对水稻苗期生长及离子吸收和转运的影响[J]. 北方水稻, 2014, 44(3):10-13.

[12]马红媛,梁正伟,孔祥军,等. 盐分、温度及其相互作用对羊草种子发芽率和幼苗生长的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(10): 4710-4717.

培养基:配制 PDA 培养液(200 g 马铃薯、20 g 蔗糖、8 g 琼脂、1 000 mL 水),装入试管中达试管 1/3,灭菌后,45°倾斜放置至培养基冷却。所有培养基均在 101 kPa、121 ℃ 下灭菌 20 min。

1.3 试验方法

1.3.1 蜜环菌菌索分离 将长有蜜环菌的菌材削去外层树皮,用洗洁精清洗后于自来水下自然冲洗 30 min。转移到超净工作台中,75% 乙醇浸泡 45 s 后用无菌水冲洗 5 次,再用 0.1% HgCl₂ 溶液中浸泡约 8 min,取出后用无菌水冲洗 5 次,

取出置于无菌培养皿中,用无菌滤纸吸净表面水后,切成 1.0 cm×0.5 cm 左右大小,置于 PDA 试管斜面上,每支试管放置一段时间。25 ℃ 暗培养,定期观察记录。

1.3.2 生长速度测定 在 PDA 培养皿上接种蜜环菌菌种,每皿接种量为 1 根长 0.7 cm 的成熟菌索段,在 25 ℃ 下静置暗培养,每 3 d 测量每组菌索的生长速率,直至菌索停止生长,然后计算菌索平均生长速率;观察记录菌索颜色、密度、粗细、分枝数等指标,每组 3 次重复。

表 1 野生蜜环菌取样地点及详细信息

编号	取样地点	海拔 (m)	经纬度	年均降水量 (mm)	年均日照时数 (h)	年均气温 (℃)
MHJ-1	毕节市织金县	1 693.8	26.58°N,105.86°E	1 436.0	1 172.0	14.1
MHJ-3	毕节市大方县	1 910.9	27.20°N,105.77°E	1 150.0	1 133.0	12.0
MHJ-6	毕节市赫章县	2 114.5	27.13°N,104.64°E	1 100.0	1 260.8	12.0
MHJ-7	毕节市大方县	2 215.3	27.25°N,105.45°E	1 155.0	1 131.2	11.8
MHJ-8	毕节市纳雍县	2 217.7	26.86°N,105.15°E	1 243.5	1 179.9	13.6

1.3.3 生物量测定 将 100 mL PDA 液体培养基装入 250 mL 三角瓶中,用封口膜封口,121 ℃ 灭菌 20 min,冷却后挑取 1 块 0.5 cm×0.5 cm 的菌块于三角瓶中,在 25 ℃ 下黑暗条件下振荡培养,每隔 48 h 观察菌丝体和菌索的形态特征。20 d 后在网袋上用自来水冲洗菌索上附着的培养基,洗净后的培养物在 50 ℃ 下烘干,冷却后称其质量,每组 3 次重复。

1.3.4 其他培养性状对比 在培养瓶中倒入 30 mL PDA 半固体培养基,并接种蜜环菌,每瓶接种 1 块 0.5 cm×0.5 cm 的菌块,接种后于 25 ℃、相对湿度 80% 的条件下静止暗培养,每 24 h 观察 1 次生长情况,并记录菌丝萌发和菌索开始生长的时间,菌索形态、生长状况及荧光反应等生长特性。

2 结果与分析

2.1 各蜜环菌的生长速度对比

6 株蜜环菌在相同生长条件下菌索平均生长速度存在差异,其中蜜环菌 MHJ-3 的菌索生长速度最快,平均生长速度达 1.17 cm/d;其次是 MHJ-1 和 A9,其平均生长速度均为 0.95 cm/d;MHJ-6、MHJ-7 次之;MHJ-8 菌株平均生长速度最慢,仅为 0.60 cm/d。此外,MHJ-3 和 MHJ-1、A9 的生长速度达到显著差异,与 MHJ-6、MHJ-7、MHJ-8 的生长速度达到极显著差异;蜜环菌 MHJ-1 与 A9 在生长速度上无显著差异,与 MHJ-7、MHJ-8 的菌索生长速度差异极显著(表 2)。

表 2 各蜜环菌菌株在 25 ℃ 培养下菌索生长速度

菌种 编号	生长速度(cm/d)			平均生长速度 (cm/d)
	固体培养基	液体培养基	半固体培养基	
MHJ-3	1.14	1.21	1.17	1.17Aa
MHJ-1	0.98	1.02	0.86	0.95ABb
A9	0.89	0.96	0.99	0.95ABb
MHJ-6	0.79	0.92	0.86	0.86BCb
MHJ-7	0.72	0.59	0.66	0.66Cc
MHJ-8	0.57	0.64	0.58	0.60Cc

注:同列数据后不同大写、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。表 3 同。

2.2 各蜜环菌的生物量对比

6 株蜜环菌在 25 ℃ 下暗培养 20 d 后生物量存在明显差异,其中 MHJ-3 的生物量最大,平均生物量达 1.580 6 g,比对照菌株 A9 的平均生物量(1.537 6 g)高约 2.6%;其他 4 株菌株的生物量均低于 A9,其中 MHJ-7 的平均生物量最小,仅为 0.948 6 g。此外,蜜环菌 MHJ-3 与 A9 的生物量差异显著,与 MHJ-1、MHJ-6、MHJ-8、MHJ-7 菌株的生物量差异极显著;对照菌株 A9 的生物量与 MHJ-1、MHJ-6、MHJ-8、MHJ-7 菌株的生物量之间存在极显著差异;MHJ-1 与 MHJ-6、MHJ-7、MHJ-8 的生物量间存在极显著差异;菌株 MHJ-8 与 MHJ-7 的生物量差异不显著(表 3)。

表 3 各蜜环菌菌株在 25 ℃ 培养下菌索的生物量

菌种 编号	生物量(g)			平均生物量 (g)
	固体培养基	液体培养基	半固体培养基	
MHJ-3	1.580 3	1.584 2	1.577 2	1.580 6Aa
A9	1.547 3	1.529 6	1.535 9	1.537 6Ab
MHJ-1	1.470 9	1.425 8	1.496 3	1.464 3Cc
MHJ-6	1.334 6	1.332 7	1.320 9	1.329 4Dd
MHJ-8	1.010 9	0.997 3	1.100 6	1.036 3Ee
MHJ-7	0.965 3	0.874 2	1.006 2	0.948 6Ee

2.3 各蜜环菌的培养特征比较

6 株菌株在 25 ℃ 下培养时,各菌株菌丝萌发时间、菌索开始生长时间、菌索分枝状况及荧光反应强度等生长特性有所不同,尤其是菌索的分枝特征和荧光反应强度尤为明显(表 4)。其中,蜜环菌 MHJ-3 的菌菌丝萌发最快,菌索粗壮且分枝多,培养过程中无黑色素产生,生长均匀,荧光反应强烈,生长特性最好。对照菌 A9 菌索黄白色、粗壮、分枝多,但菌索部分卷曲,且有少量黑色素产生,其活性及生长特性弱于蜜环菌 MHJ-3。蜜环菌 MHJ-1 生长状态及活性与 A9 相当,虽然其菌索不及 A9 粗壮,但其菌索有网状分枝,且各菌索生长均匀,在培养过程中无黑色素产生,整体生长性状较优良。蜜环菌 MHJ-6、MHJ-7、MHJ-8 在培养过程中,菌索由白色逐渐变为红棕色,且有黑色素产生,但各菌株的生长状态也有差异,MHJ-6 菌索较粗、分枝多,但生长不均匀,部分卷

表 4 各蜜环菌菌株在 25℃培养下的生长特征

菌种 编号	菌丝萌发 时间(d)	菌索开始生长 时间(d)	菌索生长与分枝特征	荧光反 应强度
MHJ-3	2~3	4~5	菌索白色,较粗,分枝很多,生长均匀,菌索生长不卷曲,无黑色素产生	+++
A9	2~3	5	菌索黄白色,较粗,分枝分叉明显,菌索部分卷曲,产生少量黑色素	+++
MHJ-1	2~3	5~6	菌索黄白色,粗,分枝多,且有网状分枝,生长均匀,菌索部分卷曲,无黑色素产生	+++
MHJ-6	4	5~7	菌索棕红色,较粗,分枝多,生长不均匀,菌索生长卷曲,产生部分黑色素	++
MHJ-7	4~5	6~7	菌索黄白色至棕红色,较细,分枝少,生长不均匀,菌索生长不卷曲,产生部分黑色素	+
MHJ-8	4~5	6~7	菌索红棕色,粗,部分菌索较短,分枝少,生长均匀,菌索生长卷曲,产生少量黑色素	+

注:“+”表示荧光反应不强,“++”表示荧光反应较强,“+++”表示荧光反应很强。

曲;MHJ-7、MHJ-8 的菌索均稍细、分枝少,生长状态及活性整体弱于对照菌 A9。

3 结论与讨论

蜜环菌进行多代天麻栽培后出现明显的菌种退化与变异,如用已发生退化的菌种伴栽天麻则会导致天麻产量与品质急剧下降^[16]。不科学性的跨地区引种及长期引用同样的菌种会造成天麻减产,因此本研究加大了对黔西北地区蜜环菌的筛选力度,致力于选出适合于本地种植的优良蜜环菌。

目前,筛选优良蜜环菌主要依据菌索生长速度、生物量、分枝数量、生长势、菌索的粗细、菌丝萌发和菌索产生的时间、荧光反应强度等标准^[17]。本试验基于以上几点,对黔西北本地 5 株野生天麻共生蜜环菌和 1 株外来优良天麻共生蜜环菌菌株进行了研究,本地菌株 MHJ-3 菌索生长速度、分枝状况、菌索生物量、荧光反应强度等特性均强于 A9,为所有筛选菌株中表现最突出的菌株。菌株 MHJ-1 除生物量弱于 A9 外,生长速度等指标均与 A9 基本持平,其余 3 株蜜环菌菌株的菌索平均生长速度、平均生物量、荧光强度等实验室生理性状指标均弱于 A9。从基本试验性状来看,5 株本地蜜环菌中,MHJ-3 菌株的活性最强、性状最优,MHJ-1 次之。

大量研究表明,蜜环菌不同菌株对天麻产量会产生不同的影响^[18],且不同的蜜环菌-天麻组合对天麻素含量有显著影响^[15],在实际生产中,培养蜜环菌主要是为了伴栽天麻,因而蜜环菌的品质直接影响到天麻的产量和品质。由于不同的地理区域分布着不同种类的蜜环菌^[15],且蜜环菌种类繁多,因此并非所有的蜜环菌都与黔西北地区天麻具有良好的共生关系。而本地蜜环菌 MHJ-3、MHJ-1 菌株与黔西北地区天麻是否具有良好的共生关系、能否有效提高天麻产量及质量,还有待于进一步的野外观察证明。

参考文献:

[1]徐锦堂,兰进. 中国药用真菌学[J]. 医学研究通讯,2002,31(1):29-29.

[2]Rizzo D M, Slaughter G W. Root disease and canopy gaps in developed areas of Yosemite Valley, California[J]. Forest Ecology and Management,2001,146(1):159-167.

[3]Baumgartner K, Bhat R, Fujiyoshi P. A rapid infection assay for

Armillaria and real-time PCR quantitation of the fungal biomass in planta[J]. Fungal biology,2010,114(1):107-119.

[4]Schwarze F, Baum S, Fink S. Resistance of fibre regions in wood of *Acer pseudoplatanus* degraded by *Armillaria mellea* [J]. Mycological Research,2000,104(9):1126-1132.

[5]Collins C, Keane T M, Turner D J, et al. Genomic and proteomic dissection of the ubiquitous plant pathogen, *Armillaria mellea*: toward a new infection model system [J]. Journal of proteome research, 2013,12(6):2552-2570.

[6]黄万兵,桂阳,朱国胜,等. 贵州天麻主产区蜜环菌的分离及 rDNA-ITS 序列分析[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2014,39(6):35-42.

[7]马妍,张泽生. 一种辅助降压保健食品功能性研究[J]. 食品研究与开发,2013,34(17):49-54.

[8]袁兴利,闫利华,张启伟,等. 蜜环菌的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(16):2671-2674.

[9]Wu J, Zhou J, Lang Y, et al. A polysaccharide from *Armillaria mellea* exhibits strong *in vitro* anticancer activity via apoptosis-involved mechanisms[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012,51(4):663-667.

[10]陈亮稳,张云侠,于敏,等. 蜜环菌菌索多糖延缓秀丽隐杆线虫衰老机制研究[J]. 中草药,2013,44(4):449-453.

[11]刘长姣,毛北星,郭镧,等. 蜜环菌有效成分和活性研究进展[J]. 食品研究与开发,2014,35(23):142-145.

[12]谢果珍,申爱荣,谭著明,等. 天麻共生菌研究进展[J]. 湖南中医杂志,2015(4):206-208.

[13]孙士青,马耀宏,孟庆军,等. 野生退化,复壮蜜环菌对天麻产量及天麻素量的影响[J]. 中草药,2009(8):1300-1302.

[14]杨清艳,蔡传涛,刘贵周,等. 黔西北蜜环菌的诱变选育与母种培养基筛选[J]. 中国食用菌,2014,33(3):12-15.

[15]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,2007,14(1):67-72.

[16]孙士青,史建国,李雪梅,等. 连续无性繁殖乙型蜜环菌对天麻生物产量及天麻素含量的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(3):359-360.

[17]王守现,刘宇,耿小丽,等. 蜜环菌母种培养基筛选试验[J]. 食用菌,2010(2):36.

[18]陈明义,李福后,边银丙. 蜜环菌不同菌株对天麻产量的影响[J]. 食用菌学报,2004,11(1):46-48.