



蜜环菌菌种分离新法——天麻组织分离法*

肖波 胡开治 刘杰 刘燕琴

(重庆市药物种植研究所 重庆 408435)

摘要:报道了一蜜环菌菌种分离方法——天麻组织分离法,并对此法与常用分离法——菌索分离法进行比较试验。结果发现,天麻组织分离法分离成功率高(78%),远高于常用的菌索分离法(16%),且前者操作简便、难度低,所得菌种生活活力、生长形态均优于后法。

关键词:蜜环菌,菌索分离,天麻组织分离

中图分类号: S646.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0118-04

A New Method of *Armillaria mellea* Isolation—*Gastrodia elata* Tissue Isolating Method*

XIAO Bo HU Kai-Zhi LIU Jie LIU Yan-Qin

(Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing 408435)

Abstract: This paper reported a new method of *Armillaria mellea* isolation—*Gastrodia elata* tissue isolating. Compared with normal isolating method—rhizomorph isolating method, it showed that the success rate of new method (78%) was higher than the rhizomorph isolating method (16%), besides this, the new method was easier, and growth characteristic of obtained strain was superior to that obtained from rhizomorph isolating method.

Key words: *Armillaria mellea*, Rhizomorph isolation method, *Gastrodia elata* tissue isolating method

蜜环菌 (*Armillaria mellea*) 又名榛蘑、青冈菌,属白蘑科 (Tricholomataceae) 蜜环菌属 (*Armillaria*) 真菌,是一种营养丰富的食、药两用菌,也是名贵中药材天麻、猪苓的共生菌^[1]。因此,分离纯化蜜环菌菌种,对获取优质资源以及开展育种工作都具有十分重要的意义,但当前常用的分离方法中,或者材料难于获得(子实体分离法),或者操作难度大、成功率低(菌索及菌木分离)。我们经过长期研究发现,利用蜜环菌浸染天麻皮层组织作为分离材料,极易获得纯菌种,且分离污染率低,目标性和可操作性都比较强,是当前蜜环菌菌种分离的理想方法。

1 材料与方 法

1.1 分离材料

小白头麻,通过当年天麻有性繁殖获得,取自重庆市药物种植研究所天麻种源繁

*重庆市医学科学计划项目基金资助 (No. 2005-B-56)

通讯作者 Tel: 023-71480786, E-mail: xioxio429@hotmail.com

收稿日期: 2005-08-08, 修回日期: 2005-09-12

殖基地。

具生活力的新鲜蜜环菌菌索，采集地点同上，均为同一菌株。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基：PDA 培养基，按常规方法制成平板。

1.2.2 转接培养基：马铃薯 200g，玉米粉 30g，葡萄糖 20g，琼脂 15g， KH_2PO_4 2g，水定容至 1,000mL，pH 自然，按常规方法制成柱式培养基，柱高 8cm。

1.3 试验方法

1.3.1 蜜环菌菌索分离：分离方法参照文献 [2]，接种材料取用蜜环菌菌索尖端生长锥，接种时，每只平板仅接一段菌索，其他操作同文献记述。

1.3.2 天麻组织分离：取当日采集的生活力旺盛且表面光滑的小白头麻，用自来水冲洗 30min，洗净泥沙（勿损伤天麻），再用蒸馏水冲洗 1~2 次。将洗净的小白麻放于 75% 的酒精溶液中浸泡 30s，取出后在无菌条件下用无菌水冲洗 3~4 次，以无菌滤纸吸干天麻表面水分，再置于 0.1% 升汞溶液中浸泡 8min，用无菌水冲洗 5~6 次，以无菌滤纸将水吸干，置于垫有滤纸的表面皿上（需预先消毒）。用无菌解剖刀和镊子将天麻横切成 0.5cm 长小段，再斜切下每段的表皮，切皮不可过厚，以 2mm 厚为宜，切口面积约 0.2cm²。将切下的薄片接种于 PDA 平板培养基上，切口向下，紧贴培养基，为防止交叉感染，每皿仅接 1 片。

1.3.3 分离菌种培养与转接：将以上接种的培养皿置于 22℃~25℃ 条件下避光培养，在培养过程中，随时严格检查，一旦发现污染，需即时取出另外放置。待蜜环菌菌索长至 0.5cm 左右时，在无菌条件下挑取新生菌索，接种于转接培养基上。

2 结果与分析

2.1 菌索分离法与天麻组织分离法分离效率比较

2.1.1 不同分离法污染率对比（表 1）：菌索分离法在分离第 5d 后，即在部分接种材料边缘可见细菌污染，随着时间的延长，菌斑愈加增大，同时突现真菌污染，第 10d 后，大部分平板长满杂菌。天麻组织分离法在接种后第 15d，极少数平板天麻组织块周围观察到白色真菌菌落，但未见细菌污染。20d 后，两法污染数量趋于稳定。

表 1 不同分离法平板污染数量统计

分离方法	接种数量 (皿)	污染数 (皿)	污染率 (%)
天麻组织分离法	100	15	15
菌索分离法	100	78	78

由表 1 可见，在相同培养条件下，菌索分离法分离污染率（75%）远远高于天麻组织分离法（15%）。

2.1.2 不同分离法蜜环菌萌发比较（表 2）：天麻组织分离法在接种后第 7d 即见表皮组织边缘有蜜环菌菌索长出，且部分先期被杂菌污染的组织块在经一定时间的培养后，可见有菌索长出，而菌索分离处理的材料在接种 12d 后才见萌发，且先期被杂菌污染的材料未见萌发。24d 后，两种方法所用接种材料均不再萌发。

表2 不同分离法蜜环菌萌发数量统计

分离方法	接种数量 (皿)	萌发数 (皿)	萌发比率 (%)
天麻组织分离法	100	82	82
菌索分离法	100	16	16

由表2可见,在相同培养条件下,天麻组织分离萌发率可达82%,远远高于菌索分离的12%。

2.2 不同分离方法对蜜环菌生长形态及生长速率的影响

2.2.1 蜜环菌菌索生长形态差异:将平板内萌发的新生幼嫩菌索及时转入转接培养基,待菌索生长到一定程度,可观察到由天麻组织分离法所得菌种生长健壮、菌索浓密、分枝多,而菌索分离法所得菌种菌索生长纤细、稀疏、分枝少,且后者菌索木质化快,木质化程度也比前者高,根据蜜环菌优劣菌株的生长形态差异^[3],前法所得菌种比后者表现出更强的优良性。

2.2.2 不同分离法对蜜环菌生长速率的影响:将平板内新生的蜜环菌菌索转入转接培养基后,均可见菌索萌动生长,但日生长长度和长满试管时间均有极明显的差异。对每处理随机抽取10支试管统计(表3)可见,天麻组织法分离菌种转接后,平均7.9d即可满管,日平均生长长度达1.05cm,而菌索分离法分别为17.2d和0.47cm,两项指标均远远劣于前者,表明天麻组织分离法分离的蜜环菌菌种具有较优的生长势。

表3 蜜环菌菌索生长速率统计

分离方法	编号	满管时间 (d)	日生长长度 (cm)	平均满管天数 (d)	平均日生长长度 (cm)
天麻组织分离法	1	7.0	1.14	7.9	1.05
	2	7.5	1.26		
	3	9.0	0.89		
	4	10.0	0.80		
	5	8.0	1.00		
	6	9.0	0.89		
	7	7.0	1.14		
	8	6.5	1.23		
	9	7.0	1.17		
	10	8.0	1.00		
菌索分离法	1	14.0	0.57	17.2	0.47
	2	18.0	0.44		
	3	21.0	0.38		
	4	16.5	0.48		
	5	17.5	0.46		
	6	16.0	0.50		
	7	16.0	0.50		
	8	15.5	0.52		
	9	20.0	0.40		
	10	17.0	0.47		

3 讨论

从试验得知,两种分离法污染率之间有极大的差异,菌索法污染率远远高于天麻组织分离法,这可能是由于前者蜜环菌菌索长期暴露于空气中,致使菌丝体与杂菌结合,而后者当蜜环菌菌索侵入天麻皮层组织以后,于皮层细胞内及细胞间生长^[4],相对具有一个无菌的生长空间。这样,本身材料带菌之间的差异导致分离污染程度的差异。

在试验中还发现,蜜环菌萌发率在两种分离法之间有较大的差异,天麻组织分离法萌发率高于菌索法,这可能是由于消毒剂对两种材料杀伤力差异所致,因前者蜜环菌菌丝体穿插于天麻皮层细胞及细胞间,消毒时有表皮组织保护,故在表面杀菌过程中,自然不会对皮层内蜜环菌菌丝造成多大影响;而后法接种材料为新生幼嫩的蜜环菌菌索尖端生长锥,几乎没有什么保护能力,从而导致消毒时蜜环菌菌索严重致死,如若减少消毒时间,又势必造成杀菌的不彻底。

通过两种方法获得菌种生活力对比,发现利用天麻组织分离法所得菌种不管是在生活形态还是生长速率方面都优于菌索分离,这或许是由消毒剂对菌索分离法材料杀伤所致。此外,由于蜜环菌与天麻是一种双方相互受益的共生关系^[5],有可能侵入蜜环菌的天麻,相反地对蜜环菌又起到了复壮作用,激发蜜环菌生长势的提高。

我们在蜜环菌菌种选育过程中,采用天麻组织分离法获得大量蜜环菌优良菌株,即使发现野生蜜环菌未与天麻结合,也可通过天麻有性繁殖的方式使其侵染种麻,再利用小白麻表皮组织分离,即可获得目标菌种。此法成熟可靠、目标性强,是蜜环菌品种选育、天麻生产工作中获取优良菌株的理想手段。

参考文献

- [1] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴. 北京: 中国农业出版社, 1998. 101.
- [2] 贺建超, 贺榆霞. 食用菌, 1998, 20 (5): 16~17.
- [3] 王秋颖, 郭顺星. 天麻人工栽培技术. 北京: 中国农业出版社, 2002. 37~43.
- [4] 徐锦堂. 中国医学科学院学报, 2001, 23 (2): 150~153.
- [5] 兰进, 徐锦堂, 李京淑. 真菌学报, 1994, 13 (3): 219~222.