



王云生,余波.蜜环菌的组织培养技术研究[J].黑龙江农业科学,2020(7):106-109,110.

蜜环菌的组织培养技术研究

王云生,余 波

(凯里学院 大健康学院,贵州 凯里 556011)

摘要:蜜环菌(*Armillaria mellea*)是一种具有重要经济价值的药食两用寄生性真菌。为优选蜜环菌的组织培养方法,以蜜环菌菌索为试验材料,通过设置和比较试验材料不同的消毒时长、接种材料不同部位及使用不同培养基等处理,观察其萌发及生长状况。结果表明:蜜环菌组培菌索的最佳消毒处理方式为75%酒精洗脱2次,0.1% HgCl_2 消毒8 min;最佳接种材料为具分支点的菌索;在本试验的5种培养基中,菌索萌发生长的最适培养基配方为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、蛋白胨5 g、 KH_2PO_4 3 g、 MgSO_4 1.5 g、琼脂20 g及蒸馏水1 L。

关键词:蜜环菌;中药材;菌索;组织培养

蜜环菌(*Armillaria mellea*)是名贵药用植物天麻栽培中必不可少的共生菌,属白蘑科,蜜环菌属的一种好氧性兼性寄生真菌^[1]。蜜环菌广泛分布于世界各地,在我国的山西、吉林、青海、浙江、湖南、贵州等省常见^[2]。子实体和菌丝体是蜜环菌的主要结构组织,富含蛋白质、维生素以及多糖、倍半萜等多种活性物质^[3-4],这些活性物质赋予其良好的催眠、镇静、改善心脑血管血液循环、降低血糖、抗氧化、抗肿瘤等功效^[5-7]。此外,由于其子实体的营养成分丰富、口感鲜嫩多汁,且无毒,蜜环菌还被视作美味食材,深受人们喜爱。蜜环菌的菌丝体,由菌丝分支交错形成,分为菌索和菌丝两种存在形式。菌丝为分支的丝状体,萌发初期为乳白色,镜下观察无色透明,其聚集形成的绳索状长束,俗称菌索,菌索有很多的分支,向周围蔓延生长以吸收营养^[8]。

蜜环菌不仅自身具有较高的经济价值,更为重要的是,它是我国传统名贵中药材天麻的共生真菌。天麻生物学性状特殊,无根无叶,在营养生长阶段,必须依靠其共生真菌-蜜环菌来提供营养^[9-11]。正因为具有较高食药价值及在天麻生产中的重要性,蜜环菌受到国内外广泛的关注与研究。国内对蜜环菌的研究主要集中在多糖的药用功效^[12-16],对天麻的产量及品质的影响研究^[17-19]。国际上对蜜环菌的研究包括生物活性成分的鉴定、提取等^[20-21]。

近年来,为更好利用蜜环菌,室内培养基中培养蜜环菌的研究相继展开,主要集中在探索最适合蜜环菌生长的培养基。然而,不同的研究者由于研究方法、手段等原因,得出的结论不尽相同,各自最适合蜜环菌的配方存在差异^[22-26]。本研究配置5种来自前人研究中认为组培蜜环菌效果最佳的培养基,在相同的条件下接种来自本地的野生蜜环菌菌索,旨在筛选蜜环菌组织培养的最佳培养基配方,为野生蜜环菌的深入研究、驯化利用提供参考,促进蜜环菌产业乃至天麻产业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料

野生蜜环菌菌索采自从黔东南州施秉县牛场镇附近的山林中。

试验仪器主要包括超净工作台、高压灭菌锅、净水机、电磁炉、电子分析天平、恒温培养箱等。

试验试剂:马铃薯、四环素粉、葡萄糖、琼脂、酵母膏、蛋白胨、工业酒精、75%酒精、0.1% HgCl_2 、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 等。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 试验设5个培养基配方,参照表1中所列的5种配方配制培养基。其中配方A参照李代芳^[22],配方B参照邓明贵^[23],配方C参照王振河等^[24],配方D参照张国庆等^[25],配方E参照卢学琴^[26]。将5种培养基所需的马铃薯按照比例称好切成0.5 cm×0.5 cm小方块,分别倒入电磁炉锅中,加入1 000 mL蒸馏水大火煮沸,小火慢煮20~30 min,用5层纱布过滤收集滤液,冲洗残渣2~3次至1 000 mL,之后将加入不同培养基中的剩余组分小火煮沸至琼脂融化,迅

收稿日期:2020-05-15

基金项目:贵州省科技厅省校合作项目[黔科合 LH 子(2015)7754号]。

第一作者:王云生(1975-),男,博士,教授,从事蜜环菌及天麻种质资源评价利用等研究。E-mail:wys3269@126.com。

速分装于培养瓶中。将装有培养基的培养瓶放入高压灭菌锅中,在 0.1 MPa,121 ℃ 的高温高压环境下灭菌 20~30 min,取出冷却待用。

消毒预处理:参照李代芳^[22]的 HgCl₂ 消毒方法,自来水冲洗 15~30 min,75%酒精清洗 2 次,0.1% HgCl₂ 浸泡时间分别为 5,6,7,8,9 和 10 min,无菌水分别清洗 5 次。将 HgCl₂ 消毒处理不同时长的具有分支点的菌索接种到培养基 E 中,每个消毒时间梯度各接种 20 瓶,25 ℃ 条件下

避光培养^[22],记录观察菌索萌发污染情况。后续试验参照预试验得到的最佳消毒时长。

1.2.2 菌索部位对比研究 将具有分支点和不具有分支点的菌索经 HgCl₂ 消毒后切成 1.0~1.5 cm 的菌段分别接种到 A、B、C、D 和 E 种不同培养基中,每种培养基接种具有分支点和不具分支点的菌段各 20 瓶,每个培养瓶中只接种 1 段菌索,放入恒温培养箱中 25 ℃ 遮光培养,记录菌索的萌发数和污染数并拍照观察。

表 1 试验使用培养基及配方

Table 1 Medium and its formula used in experiments

培养基代号 Code of culture medium	组分 Components
A	马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、酵母膏 2 g、琼脂 18 g、KH ₂ PO ₄ 1.5 g、MgSO ₄ 1 g、蒸馏水 1 L
B	马铃薯 200 g、四环素粉 0.05 g、葡萄糖 20 g、KH ₂ PO ₄ 3 g、琼脂 24 g、蒸馏水 1 L
C	马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蛋白胨 5 g、KH ₂ PO ₄ 3 g、MgSO ₄ 1.5 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L
D	马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、KH ₂ PO ₄ 3 g、MgSO ₄ 1.5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L
E	马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L

1.2.3 分离纯化 将 5 种培养基中生长状态良好的菌丝块,切成 0.2 cm×0.2 cm 正方块,转接到各个培养基中,每种培养基接种 20 瓶,比较其菌丝萌发时间及长满整个培养瓶所需的时间、菌索颜色、菌索密度、菌索形态、菌索分支的差异,拍照并作好记录。

1.2.4 数据分析 试验数据采用 SPSS 22.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对菌索萌发的影响

由表 2 可知,0.1% HgCl₂ 浸泡 5,6 和 7 min 3 个时长的菌索污染率均为 100%,萌发瓶数分别

为 8,10 和 13 瓶,萌发率为别为 40%、50% 和 65%;8 min 污染率为 90%,萌发 16 瓶,萌发率为 80%;浸泡 9 和 10 min 菌索污染率为 0,萌发率为 0。综上所述,0.1% HgCl₂ 消毒蜜环菌菌索用于组织培养的最佳时间为 8 min。

2.2 不同形态菌索生长萌发的差异

由表 3 可知,具分支点和未具分支点的菌索接种到培养基 A、B、C、D 和 E 中,萌发瓶数分别为 15、14、19、17 和 13 及 10、7、12、11 和 5 瓶。萌发率分别为 75%、70%、95%、85% 和 65% 及 50%、35%、60%、55% 和 25%。结果显示,具分支点的菌索萌发率全部高于不具分支点的,两种不同菌索在培养基 C 中均显示出最高的萌发率。

表 2 菌索在 0.1% HgCl₂ 消毒不同时间下的萌发及污染状况

Table 2 Situation of germination and contamination of rhizomorph treated by 0.1% HgCl₂ with different times

时间 Time/min	接种瓶数 Number of inoculated bottle	萌发瓶数 Number of germinated bottle	污染瓶数 Number of contaminated bottle	污染率 Contamination rate/%	萌发率 Germination rate/%
5	20	8	20	100	40
6	20	10	20	100	50
7	20	13	20	100	65
8	20	16	18	90	80
9	20	0	0	0	0
10	20	0	0	0	0

表 3 两种不同形态菌索在 5 种培养基中的萌发状况

Table 3 Germination situation of two kinds of rhizomorph with different morphology in five kinds of culture medium					
培养基代号 Code of culture medium	接种瓶数 Number of inoculated bottle	具分支点菌索 Rhizomorph with branch		未具分支点菌索 Rhizomorph without branch	
		萌发瓶数 Number of germinated bottle	萌发率 Germination rate/%	萌发数瓶 Number of germinated bottle	萌发率 Germination rate/%
A	20	15	75	10	50
B	20	14	70	7	35
C	20	19	95	12	60
D	20	17	85	11	55
E	20	13	65	5	25

2.3 不同培养基菌索的萌发时长差异

由表 4 可知,转接菌索在培养基 C 萌发时长和满瓶天数分别是 7 和 22 d,是 5 种培养基中用时最短的,其次为在培养基 D 中;转接菌索培养基 E 萌发时长和满瓶天数是 5 种培养基最长的,分别达到 12 和 28 d。该结果显示培养基 C 最适合蜜环菌菌索的生长。

2.4 不同培养基菌索生长状况的差异

由图 1 可知,转接的菌索在长满整个培养瓶时,蜜环菌菌索颜色在培养基中 A 呈黄白色夹杂褐色,在培养基 B 中白色夹杂黑褐色,在培养基 C 呈淡黄色,在培养基 D 中白色夹杂黄、褐色,在培养基 E 白色夹杂黄色。从菌索的分支来看,显然在培养基 C 中的蜜环菌菌索比其他培养基中的蜜环菌菌索的细小分支多得多,菌丝分布也最为

稠密,是 5 种培养基中蜜环菌菌索生长状况最好的。

表 4 蜜环菌菌索在 5 种培养基中萌发及长满瓶所需天数

Table 4 Days required for hypha of <i>Armillaria mellea</i> to germinate and fill bottle in five kinds of culture medium		
培养基代号 Code of culture medium	萌发时长 Days of germination/d	满瓶时长 Days of fill bottle/d
A	9	25
B	11	26
C	7	22
D	8	24
E	12	28

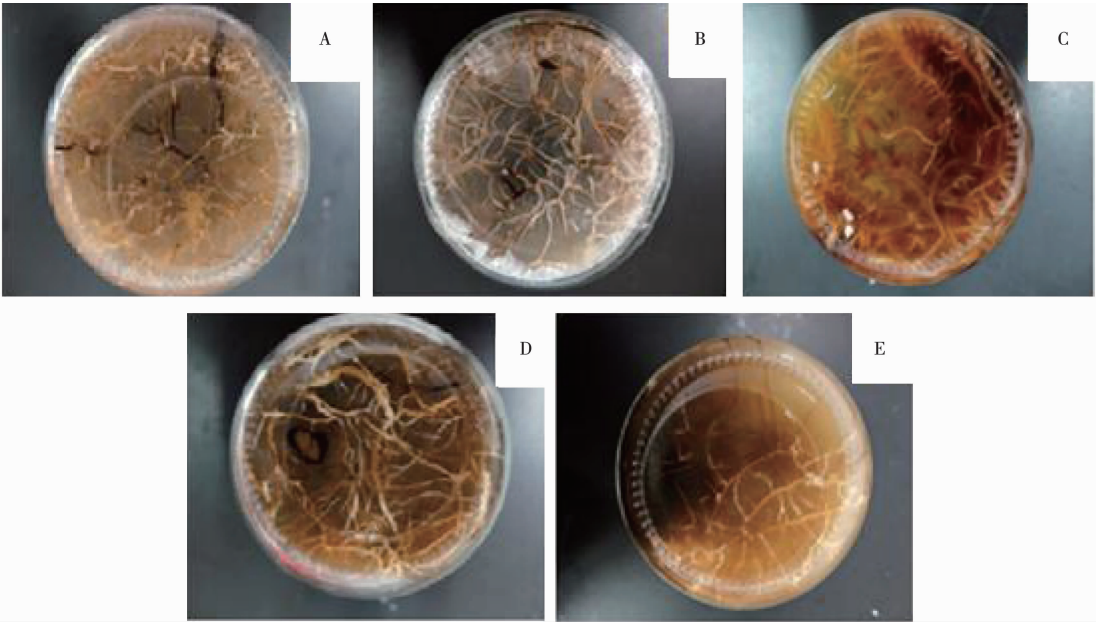


图 1 不同培养基中蜜环菌菌索的生长状况
Fig. 1 Growth situation of rhizomorph of *A. mellea* in different medium

3 结论与讨论

3.1 讨论

蜜环菌菌索生长受多种因子的影响,如对菌索的消毒处理、菌索的生长力,培养基养分不同等因素。李代芳^[22]在《蜜环菌的制种技术》中提出菌索的消毒方法为75%酒精清洗2次,0.1% HgCl₂浸泡5~10 min,无菌蒸馏水清洗。本试验依据其消毒方法,得出菌索最佳的消毒方法为75%酒精洗脱2次,0.1% HgCl₂浸泡8 min,结果稍有不同。本研究中,0.1% HgCl₂消毒5、6和7 min菌索污染率达到100%,8 min菌索污染率达到90%。究其原因是蜜环菌属兼性寄生真菌,菌索表皮内外都寄生有多种细菌及真菌,虽然将表皮外的污染物完全杀死,但在菌索萌发表皮破损后,内部的微生物萌发造成污染。因此,要在培养基得到不受污染的菌索,转接过程必不可少。另外,使用0.1% HgCl₂消毒的时间也不宜过长,本研究显示超过9 min,在杀死其他的真菌及细菌孢子的同时也会将菌索杀死,导致菌索不萌发,因此掌握菌索的消毒时间对其后的组织培养的成功率至关重要。

蜜环菌菌索表皮有很细的,甚至肉眼看不见的菌丝,经过不断的分化可形成菌索的分支,试验中采用具分支点和不具分支点的菌索接种到5种培养基中,全部表明具分支点的菌索更易萌发。推测原因为:菌索的分支是白色菌丝向菌索转化形成生命力较强的菌丝束,在消毒时不易被HgCl₂全部杀死,故在相同生长条件下具分支点的菌索更易萌发。比较5种不同培养基对菌索生长影响,王振河等^[24]发布的培养基培养蜜环菌菌索的生长效果最好,这可能与他在培养基中添加了蛋白胨有关,这与季宁等^[27]试验分析结果大致相同。

3.2 结论

本试验通过对蜜环菌菌丝采用HgCl₂消毒时间梯度处理,对具分支点和不具分支点菌索在相同培养基中萌发率比较以及菌索在5种培养基的萌发时长、满瓶天数、菌索生长发育状态的比较,得出以下结论,蜜环菌菌索最适消毒方法为自来水冲洗15~30 min,75%酒精清洗2次,0.1% HgCl₂浸泡时间为8 min,7 min其次;最佳接种材料为具分支点的菌索;在试验的5种培养基中,王振河等^[24]使用的培养基(马铃薯200 g、葡萄糖20 g、蛋白胨5 g、KH₂PO₄ 3 g、MgSO₄ 1.5 g、琼脂20 g、蒸馏水1 L)表现最好。

本试验对5位研究者优化的蜜环菌组织培养的培养基配方进行了对比研究并发现了其中的最佳配方,对今后进行蜜环菌的组织培养具有较强的指导价值。相关研究对蜜环菌的其他研究如野生蜜环菌室内培养优选驯化等具有较为重要的指

导意义。同时,介于蜜环菌对天麻生产发育的重要性,因此,研究结果对天麻产业的发展也能产生积极的影响。

参考文献:

- [1] 袁媛,刘景圣.蜜环菌液体深层发酵培养基的优选[J].农产品加工,2009(7):57-59.
- [2] 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.
- [3] 刘长姣,毛北星,郭钢,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.
- [4] 黄靖雯,赖长江生,袁媛,等.猪苓与蜜环菌化学成分研究的相关分析进展[J].中国中药杂志,2017,42(15):2905-2914.
- [5] 王锐,张诗悦,穆青.蜜环菌的化学成分及生物活性研究进展[J].中草药,2016,47(11):1992-1999.
- [6] 李露,王思爽,马丽颖,等.蜜环菌的活性成分和药用价值[J].吉林医药学院学报,2018,39(4):307-310.
- [7] 宫海全.蜜环菌多糖口服降血糖作用及其机制研究[D].长春:东北师范大学,2018.
- [8] 于洋,邓志刚,单良.蜜环菌的生物学特性及开发利用[J].国土绿化,2015(8):46-47.
- [9] 张维经,李碧峰.天麻与蜜环菌的关系[J].植物学报,1980,22(1):57-62.
- [10] 徐锦堂,郭顺星.天麻与紫萁小菇和蜜环菌营养关系及其在栽培中的应用[J].医学研究通讯,1991,20(10):31-32.
- [11] 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.
- [12] 史强强,党军,岳会兰,等.黄绿蜜环菌菌丝体多糖分离纯化与含量测定[J].工业微生物,2015,45(2):35-38.
- [13] 吴环.蜜环菌多糖AMP-2的组成分析、活性鉴定及降血糖有效成份的确定[D].合肥:安徽大学,2006.
- [14] 李鹏.蜜环菌多糖对静脉血栓的影响及机制研究[D].延吉:延边大学,2015.
- [15] 安升淑.蜜环菌多糖通过抗凋亡和抗氧化对阿尔茨海默症病理作用的研究[D].长春:吉林大学,2018.
- [16] 吴珂.蜜环菌发酵提取物对小鼠镇痛、镇静及学习记忆作用的研究[D].开封:河南大学,2013.
- [17] 王鑫,亢学平,胡志强.蜜环菌原种配方筛选试验[J].中国林副特产,2017(6):41-42.
- [18] 张维经,李碧峰.天麻与蜜环菌的关系[J].植物学报,1980,22(1):58-61.
- [19] 谢学强.蜜环菌对甘孜州野生乌天麻有性繁殖的影响[J].湖北农业科学,2011,50(17):3562-3565.
- [20] Misiek M, Hoffmeister D. Sesquiterpene aryl ester natural products in North American *Armillaria* species [J]. Mycological Progress, 2010, 11(1):7-15.
- [21] Cremin P, Guiry P, Wolfender J L, et al. A liquid chromatography-thermospray ionization-mass spectrometry guided isolation of a new sesquiterpene aryl ester from *Armillaria novae-zelandiae* [J]. Journal of the Chemical Society Perkin Transactions, 2000, 1:2325-2329.
- [22] 李代芳.蜜环菌的制种技术[J].农村实用技术,1999(4):24-26.
- [23] 邓明贵.蜜环菌抗杂分离及快速培养技术[J].食用菌,2005(1):22.
- [24] 王振河,窦艳萍,赵现方,等.蜜环菌菌索培养特性的研究[J].安徽农业科学,2006(12):2734-2735.
- [25] 张国庆,任思竹,郭亚萍.蜜环菌菌种及配方的筛选[J].北方园艺,2013,(18):27-30.
- [26] 卢学琴.蜜环菌A₉培养基的筛选[J].食用菌,2008(1):25-26.
- [27] 季宁.蜜环菌优良菌株的筛选、鉴定及对乌天麻产量的影响[D].长春:吉林农业大学,2008.



张武,何冰,项鹏,等. 黑龙江省黑河地区大豆生产比较优势分析[J]. 黑龙江农业科学,2020(7):110-112.

黑龙江省黑河地区大豆生产比较优势分析

张 武¹,何 冰²,项 鹏¹,杨 树¹,李宝华¹,李艳杰¹

(1. 黑龙江省农业科学院 黑河分院,黑龙江 黑河 164300;2. 黑河学院,黑龙江 黑河 164300)

摘要:为指导黑河市大豆产业布局,采用黑龙江省统计年鉴 2011-2018 年的数据,依据比较优势指数法对黑河市与黑龙江省大豆和玉米生产的比较优势进行分析。结果表明:黑河市大豆种植具有明显的规模比较优势、效率比较优势和综合比较优势。虽然黑河市玉米不具备规模比较优势和综合比较优势,但玉米具有明显的效率比较优势。因此,大豆与玉米轮作模式在今后一段时间内是黑河大豆的主要栽培模式。

关键词:黑河市;大豆生产;规模比较优势;效率比较优势;综合比较优势

大豆是一种重要的战略性农作物,是我国主要经济和油料作物之一,也是重要的植物蛋白来源。我国是大豆的发源地,大豆消费历史有几千年之久,目前也是世界上大豆的主要生产国和消费国。黑龙江省是我国重要的大豆生产基地,同时也是我国重要的非转基因大豆生产基地。其中黑河市大豆播种面积和产量均居黑龙江省首位,近 5 年来大豆播种面积稳定在 4.27 万 hm^2 以上。刘丹等^[1]利用气候因素分析,黑龙江省最适宜种植大豆的地区集中在黑河地区南部,齐齐哈尔东部等地区。王泓涓^[2]研究表明黑河市辖区以及逊克县在大豆种植效率上具有绝对优势,黑地区其

他县市为一般优势区。但黑河地区种植结构正在由单一大豆型向大豆玉米组合型转变。潘晓卉^[3]通过市场需求、耕地约束和经济效益最大化作为条件对东北地区大豆生产规模进行预测,指出未来东北地区大豆种植面积增加幅度较大的区域主要位于黑龙江省中西部大豆主产区(包括黑河市、齐齐哈尔市、绥化市)和内蒙古自治区东部的呼伦贝尔市。

气候适宜度、产业规模和产业效率等数据是产业结构调整的重要参考。比较优势法采用规模指数和效率指数形成综合比较优势指数对产业情况进行综合分析,因而在对种植产业分析和产业结构调整过程中被广泛采用。朱犁等^[4]对 1996-2003 年江苏省各地市大豆种植情况进行分析,指出大豆综合比较优势的时空特征变化分析的新方法具有更多的优点。张慧琴等^[5]利用大豆产业综合优势的比较分析法,对黑龙江垦区大豆生产力进行了分析。

收稿日期:2020-04-19

基金项目:国家大豆产业技术体系东北特早熟春大豆育种岗(CARS-04-02A-05);黑河学院 2020 年度校级课题(YDF 202009)。

第一作者:张武(1983-),男,硕士,副研究员,从事植物保护、大豆生产形势研究。E-mail:guoguo_zw@163.com。

Study on Tissue Culture Technology of *Armillaria mellea*

WANG Yun-sheng, YU Bo

(School of Life and Health Science, Kaili University, Kaili 556011, China)

Abstract: *Armillaria mellea*, a parasitic fungus, is a valuable Chinese herbal medicine. In order to optimize the method of tissue culture, the rhizomorph of *A. mellea* was used as experiment material in this experiment. The situation of germination and growth of rhizomorph was observed by setting and comparing the diverse treatments with different disinfection time, different parts of inoculated materials and utilization of different culture medium. The results showed that: the best disinfection method for rhizomorph for tissue culture was elution by 75% alcohol twice, then disinfected by 0.1% HgCl_2 for 8 min, the best inoculation material was the rhizomorph segment that including branch point, the most suitable medium was that composed of 200 g potato, 20 g glucose, 5 g peptone, 3 g KH_2PO_4 , 1.5 g MgSO_4 , 20 g agar and 1 L distilled water.

Keywords: *Armillaria mellea*; Chinese medicinal materials; rhizomorph; tissue culture