

一种优化的蜜环菌分离与纯化方法

王传华¹, 王义敏², 暴朝霞³, 李作洲^{3*}

(1. 三峡大学化学与生命科学学院, 湖北宜昌 443000; 2. 葛洲坝集团公司高级中学, 湖北宜昌 443000; 3. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 从分离材料的采集、蜜环菌素的室内培养条件、培养基的改良和分离技术的优化 4 个方面对前人的蜜环菌分离方法进行了系统的完善和改进。结果表明: 采用蜜环菌生长良好的木本植物组织为分离材料, 在 15℃ 保湿的条件下培养可以得到健壮的菌索; 按玉米粉: 黄豆粉: 蔗糖: 水 = 6: 1: 1: 26 的质量比例制作的培养基不仅能满足蜜环菌生长的营养需求, 而且对于其他杂菌具有明显的阻滞作用, 有助于菌株纯化; 分离前对菌索表面进行适当干燥可显著提高分离的成功率。

关键词: 蜜环菌复合种; 分离和纯化方法

中图分类号: Q93-331; Q949.32

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)05-0478-04

An Optimized Isolation and Purification Method for *Armillaria mellea* Complexes

WANG Chuan-Hua¹, WANG Yi-Min², BAO Zhao-Xia³, LI Zuo-Zhou^{3*}

(1. Chemistry and Life Science Institute, Three-Gorges University, Yichang, Hubei 443000, China;
2. The Affiliated High School of Gezhouba Construction (Group) Corp., Yichang, Hubei 443000, China;
3. Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: The free-disinfection isolation method of *Armillaria mellea* complexes was modified in 4 ways. Firstly, the tissues of trees which were well parasitized by *A. mellea* complexes should be selected as the materials for culturing rhizomorph, but the tissues of grasses (or bamboo), or the soil that *A. mellea* complexes existed are not suitable. Secondly, the target tissues were cultured in a high humidity and temperature of 15℃, then well-grown *A. mellea* complexes rhizomorph can be obtained. Thirdly, the culture medium, made up of maize:soya:sucrose:water = 6:1:1:26 in mass, not only can supply enough nutrition, but also can hinder the growth of the bacteria and other fungi, which was a concomitance of *A. mellea* complexes rhizomorph. And last, if the rhizomorph for isolation was exposed in the air for 8–10 minutes, then the infected probability by bacteria can be reduced significantly.

Key words: *Armillaria mellea* complexes; Isolation and purification method

蜜环菌属 [*Armillaria* Fr. (Fr.) Staude] 最初仅蜜环菌 (*A. mellea*) 一个种, 后来研究发现是一个包含多个生物种 (bio-specie) 的真菌类群, 真菌界又称为蜜环菌复合种 (*A. mellea* complexes)^[1-3]。蜜环菌属真菌具有子实体形态变异较大、寄主广泛的特点, 区别于其它属真菌的突出特征是具有根状菌索^[4]。蜜环菌复合种具有重要的经济价值, 体现在以下两个方面: 其一是重要的森林病原菌, 其二是该类

真菌具有药用、食用价值。近年来更因其同天麻、猪苓的共生关系而备受瞩目^[5, 6]。成功分离、纯化、培养大量的蜜环菌株是研究蜜环菌与其它物种关系 (天麻—蜜环菌、猪苓—蜜环菌等共生体相互作用和协同进化) 的基础。

成功分离蜜环菌取决于 3 个重要环节, 即具有可供多次分离长势健壮的蜜环菌材料、采用简便而成功率高的分离方法、应用高效的菌株纯化方法。用

收稿日期: 2005-01-31, 修回日期: 2005-05-12。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370145); 三峡大学青年基金资助项目。

作者简介: 王传华 (1974—), 男, 硕士, 从事生物多样性及真菌系统学方面的教学与研究 (E-mail: wang740301@yahoo.com.cn)。

* 通讯作者 (Email: lizz@rose.whiob.ac.cn)。

于蜜环菌分离的材料有子实体、菌索、被菌索寄生或腐生的植物组织等多种,其中以子实体作为分离材料最容易成功。但是由于子实体只在特定的季节发生,采集困难,因此在实际研究中多以根状菌索作为分离的材料。野外采集的菌索往往由于保存的时间短不能多次分离、或找不到合适的部位不能分离。因此,如何用从野外采集的被蜜环菌寄生或腐生的植物组织,在实验室内培养出健壮菌索,成为获得纯培养蜜环菌株必须解决的首要问题。真菌分离通常采用化学药剂表面消毒的分离方法^[7],但化学消毒剂对蜜环菌索进行表面消毒时也可能杀死蜜环菌,消毒时间的长短成为关键,不易掌握,往往不是蜜环菌被杀死,就是消毒不彻底,分离的成功率极低,不能用于蜜环菌株的大量分离。1995年张玉方^[8]报道了以蜜环菌索为材料的免消毒分离方法,较大地提高了蜜环菌菌株的分离效率。关于真菌的纯化,常规的添加抗生素去除细菌、添加抗真菌剂去除真菌的方法繁琐而缺乏选择性,效率极低,不能满足蜜环菌多样性研究所需大量、高分离率的要求。本研究在张玉方报道的免消毒分离方法^[8]的基础上,从培养材料的野外采集、室内培养蜜环菌索的条件、分离预处理、改良培养基配方4个方面进行了改进和完善,大大提高了蜜环菌株分离的成功率。

1 材料与方 法

1.1 材料与用品

生物材料 从野外采集的试验材料有黑褐色的菌索(A)、长有蜜环菌索的木本植物组织(B)、长有蜜环菌索的竹根或草根(C)、生长有蜜环菌的腐殖土(D)等4种,带回实验室4℃保藏备用。

实验设备 广东医疗 LGH-250A 型光照培养箱、超净工作台、TES-1302 型便携式温湿度仪。

1.2 实验方法

1.2.1 蜜环菌索的室内培养

培养材料的预处理 对 A、B、C 材料用自来水将浮土洗净,并浸泡 2 h,使其吸足水分;对 D 材料适当补充水分。取 2 张报纸折叠(4 层),浸入水中充分吸水,然后将培养材料用报纸紧裹后放入食品保鲜袋,扎紧袋口后用剪刀在口袋底部剪数个小孔排出多余的水分,并保证通气良好。

培养 置培养箱中避光培养,设置 10、15、20、25、30℃ 5 个温度梯度。

后期管理 每周补充一次水分,确保保鲜袋内报纸的含水量在 80% 左右,以维持报纸内小环境的

高湿度。

结果检查 培养 4 周后检查蜜环菌索及其它杂菌的生长情况。

1.2.2 培养基制备与筛选

玉米粉培养基配方 设 4 个水量梯度, M_1 , 玉米粉:黄豆粉:蔗糖:水=6:1:1:19; M_2 , 玉米粉:黄豆粉:蔗糖:水=6:1:1:26; M_3 , 玉米粉:黄豆粉:蔗糖:水=6:1:1:32; M_4 , 玉米粉:黄豆粉:蔗糖:水=6:1:1:39。制备方法是,先称取按 6:1:1 配制的干料 2.5 g,加入 180 mm×18 mm 的试管中,然后量取各梯度的水量分别加入各试管,塞上棉塞、包扎后置 121℃ 下灭菌 30 min,取出后竖直放置至自然冷却。制成的培养基高约 2.5 cm。

对照培养基配方^[9] 蛋白胨 2 g、硫酸镁 0.5 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、 KH_2PO_4 0.4 g、 K_2HPO_4 1 g、 H_2O 1 000 mL,以 M_5 表示。包扎、灭菌方法同上。

1.2.3 分离、纯化与培养

分离部位的选择 选用直径 0.5 mm 以上的浅红(黄)色的菌索、呈白色的菌索尖端、呈深褐色、黑色的老化菌索 3 种不同的部位为分离材料。

分离材料的预处理 分离前,揭开报纸使生长于植物组织上的菌索暴露于空气中,自然干燥 8~10 min,以胶质鞘不出现皱缩为度。

分离过程 参见文献^[7]。

菌株的培养 培养箱中 20~23℃ 避光培养,相对湿度 30%。

菌株纯化 在无菌条件下,取生长点已长至培养基底部的菌株,先用 70% 的酒精对试管作表面消毒,然后用无菌的小铁锤击碎试管底部,再用无菌接种针从破裂处挑取约 1 mm³ 的蜜环菌组织,转接至纯化培养基中,培养方法同菌株的培养。

2 实验结果

2.1 分离材料与培养条件对蜜环菌索生长的影响

菌索的培养结果表明,4 种不同类型的蜜环菌分离材料产生菌索的几率有明显差异。其中生长有良好蜜环菌的木本植物死亡组织(尚未完全腐烂)萌发新生菌索的成功率可达 95% 以上,蜜环菌寄生的活木本植物组织或完全白腐的残渣萌发新生菌索的成功率低于 10%;寄生蜜环菌的草(竹)根、生长有蜜环菌菌索的腐殖土均未萌发出可用于分离的健康新菌索。

不同的温度条件对菌索生长的速度、菌索形态和其它真菌生长有着较明显的影响。15℃ 所得到的菌索粗壮,无其它真菌伴随生长,最适合分离。10℃

时菌索生长缓慢,45 d 后仍未得到合适的菌索。20、25、30℃条件下,其它真菌都有不同程度生长,在随

后的菌株分离过程中真菌感染严重;且在 25、30℃培养所得菌索较细、易老化(见表 1)。

表 1 材料和温度对蜜环菌素培养的影响(培养 30 d)

Table 1 The effect of materials and temperature on *Armillaria* rhizomorph growth(cultured after 30 days)

材料或组织 Material or tissue	培养温度 Culture temperature(℃)				
	10	15	20	25	30
寄生有蜜环菌木本组织 Wood tissues parasitized with <i>Armillaria</i>					
活组织 Living wood tissues	—	△	△△	△△△	△△△
发菌良好的死组织 Die wood tissues	▲	▲▲▲	▲▲▲△△	▲▲▲△△△	▲▲▲△△△
完全白腐的朽木 Rotten wood tissues	—	—	—	—	—
寄生有蜜环菌的竹根 Bamboo root parasitized with <i>Armillaria</i>	—	—	△△	△△△	△△△
寄生有蜜环菌的草根 Herbage root parasitized with <i>Armillaria</i>	—	—	△	△	△
有蜜环菌素生长的腐殖土 Humus containing healthy <i>Armillaria</i> rhizomorph	—	—	—	—	—

注:以▲的数量表示菌索生长的情况,以△的数量表示其它真菌生长的情况。“—”表述无菌群生长。

Notes: The number of “▲” represents the growing state of rhizomorph of *Armillaria*. The number of “△” represents the growing state of non-*Armillaria* fungi. “—” represents no growing fungi.

2.2 培养基种类对菌株培养及纯化的影响

实验表明,在 4 种不同含水量的玉米粉培养基配方中,以 M₂ 号配方(玉米粉:黄豆粉:蔗糖:水=6:1:1:26)最合适,培养 15 d 后培养基仍然呈柱状,既未出现顺试管轴向的裂口,也未出现失水皱缩的情况,于试管底部挑取菌索生长点进行纯化的一次

成功率达 95% 以上;M₁ 号配方,在培养 15 d 后出现皱缩,蜜环菌索深入培养基中较浅,细菌沿培养基与试管壁间的缝隙向下生长,难以纯化;M₃ 和 M₄ 两种培养基表面均有积水,菌索生长极慢。完全培养基培养(M₅)15 d 出现轴向的裂口,采用免消毒法纯化菌株十分困难(见表 2)。

表 2 不同培养基对免消毒法分离纯化菌株成功率的影响(培养 15 d)

Table 2 The rate of successful isolation and purification of *Armillaria* in different culture mediums using free-infection method (after 15 days)

配方类型 Culture medium	菌索生长 Growth of rhizomorph	培养基失水皱缩 Desiccation and crimple of culture medium	培养基裂口 Gape in culture medium	分离纯化成功率 Rate of successful isolation and purification	
代号 Code	玉米粉:黄豆粉:蔗糖:水 Maize:Soya:Sucrose:Water				
M ₁	6:1:1:19	++	++	—	<15%
M ₂	6:1:1:26	+++	—	—	>95%
M ₃	6:1:1:32	+	—	—	<10%
M ₄	6:1:1:39	+	—	—	<10%
M ₅	对照为完全培养基(见方法描述)	+++	+++	+++	极低(very low)

注:以“—”表示培养基性状没有明显变化,“+”的数目表示培养基性状变异的程度或菌索生长状态的良好度。

Notes: “—” represents the medium state that changed not significantly, the number of “+” represents the growing state of rhizomorph, also represents the change of medium.

2.3 分离部位和预处理对分离成功率的影响

应用免消毒法分离蜜环菌的结果表明,不同的菌索部位的分离成功率有明显差异。以其先端的浅黄色部分作为分离材料一次成功率可达 70% 以上,每个菌株重复分离 3 管可以保证一次分离成功;用极幼嫩的白色先端部分不能得到合适的菌髓;采用老化的黑褐色菌索,接种体几乎不萌动并伴随有其它真菌生长(初步鉴定为木霉)。分离前将分离部位置于空气中自然干燥 8~10 min 可降低感染率 50% 以上。

的木本植物组织为材料,在 15℃ 保湿的条件下 3~4 周时间,可以得到健壮的菌索。其中,蜜环菌生长良好的木本植物死体组织比寄生有蜜环菌的活组织好,其原因可能是活组织没有被蜜环菌充分占据,在培养过程中有利于其它真菌大量生长;过度朽烂的木本组织营养已经耗尽,不能供给蜜环菌素生长;蜜环菌为半活体兼性营养型真菌,偏向死体组织营养型^[5, 6],以纤维素为主要成分的竹或草根难以满足蜜环菌生长的营养要求,难以培养出健壮菌索。木霉是蜜环菌的主要寄生真菌,对蜜环菌弱势部位的寄生率达 100%,但木霉生长的适宜温度较高(25~30℃),而蜜环菌在 6~8℃ 的低温就能生长,最适宜温度也相对较低(15~25℃)^[5, 6],通过控制培养温

3 讨论

在蜜环菌素的培养实验中,以蜜环菌生长良好

度可以解决蜜环菌被木霉寄生的问题。研究表明选择 15℃ 的培养温度,既可有效地抑制木霉的生长,又能使蜜环菌较健壮地生长,有利于后期分离纯化。

对培养基进行改良,进而实现菌株的免消毒纯化,主要是考虑到蜜环菌具有不同于其它丝状真菌、细菌的培养特性。蜜环菌的根状菌索能深入培养基向下生长,而其它真菌、细菌一般生长于培养基的表面。因此对于蜜环菌索的先端(生长点),培养基对杂菌(特别是细菌)具有阻滞作用。利用这一特性,可以采用在适当深度的培养基中挑取蜜环菌索的生长点进行纯培养,从而达到去除杂菌、纯化菌株的目的。完全培养基(1.5%琼脂)则容易裂口,必须采用添加抗生素(抗真菌剂)的方法才能加以纯化;按照 M₂ 配方制备的培养基整体呈胶质、柱状,培养 2~4 周内不裂口、不皱缩,完全能够满足纯化蜜环菌株的要求,同 1.5%琼脂培养基相比,玉米粉培养基还具有成本低的特点。

致谢:本实验得到三峡大学 2002 级田东潮同学的帮助,中国科学院武汉植物园研究生吴会芳和王静参与了野外样本的采集,在此表示谢意!

参考文献:

- [1] Guillaumin J J, Lung B, Romagnesi H, Marxmuller H, Lamoure D, Durrieu G, Berthelay S, Mohammed C. The systematics of the *Armillaria mellea* complex phytopathological consequences [J]. *Eur J Forest Pathol*, 1985, 15: 268-277.
- [2] Guillaumin J J. The *Armillaria mellea* complex [A]. In: Smith I M, Dunez J, Phillips D H, Lelliot R A, Archer S A eds. *European Handbook of Plant Diseases* [C]. Oxford: Blackwell, 1988. 520-523.
- [3] 孙立夫. 黑龙江省蜜环菌生物种的研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2003. 2-171.
- [4] 秦国夫. 中国蜜环菌的遗传学与系统学研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2002. 2-55.
- [5] 徐锦堂. 天麻栽培学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1993. 1-294.
- [6] 袁崇文,刘智,袁玉清,饶智刚. 中国天麻[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2002. 1-255.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版,北京:中国农业出版社,1998. 1-427.
- [8] 张玉方. 一种简便的蜜环菌分离方法[J]. 微生物学通报, 1995, 20 (6):382.
- [9] 杨新美. 食用菌栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,1996. 211.