

# 九寨猪苓与蜜环菌共培养条件研究

胡平<sup>1</sup>, 武晋钰<sup>2</sup>, 周先建<sup>1</sup>, 方清茂<sup>1</sup>, 杨玉霞<sup>1\*</sup>

(1.四川省中医药科学院, 四川 成都 610041; 2.长治医学院, 山西 长治 046013)

**摘要:** [目的] 筛选与九寨猪苓共生的高亲和性的蜜环菌提供理论依据。 [方法] 通过平皿培养法, 研究在不同培养基、温度、pH条件下, 九寨猪苓与蜜环菌共培养菌丝生长情况, 综合评价筛选出两者共生的最适宜培养条件。 [结果] 在 pH 6.5 的改良 PDA 培养基上, 25 °C 暗培养条件下, 猪苓菌丝、蜜环菌菌索生长良好, 综合得分高, 是九寨猪苓与蜜环菌共培养的最佳培养条件。 [结论] 此为九寨猪苓和蜜环菌共培养体系的建立以及筛选出猪苓高亲和性蜜环菌指标提供了理论依据。

**关键词:** 九寨猪苓; 蜜环菌; 共培养

**中图分类号:** S646.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1673-1891(2020)02-0013-03

## Study on Co-cultivation of Jiuzhai *Polyporus umbellatus* and *Armillaria mellea*

HU Ping<sup>1</sup>, WU Jinyu<sup>2</sup>, ZHOU Xianjian<sup>1</sup>, FANG Qingmao<sup>1</sup>, YANG Yuxia<sup>1\*</sup>

(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046013, China)

**Abstract:** [Objective] To provide a theoretical basis for screening of *Armillaria mellea* that is highly compatible and co-living with *Polyporus umbellatus*. [Method] The mycelial growth of the combinations was studied in different medium, temperature and pH after co-cultivation on a plate for screening out the most suitable culture conditions. [Results] The mycelium of *Polyporus umbellatus* and *Armillaria mellea* grew well and fast in the improved PDA medium, 25 °C, pH 6.5 and 24 hours dark. [Conclusion] This provided a theoretical basis for establishment of a co-culture system of *Polyporus umbellatus* and *Armillaria mellea*, and for screening of key factors for *Polyporus umbellatus*'s highly compatible *Armillaria mellea*.

**Keywords:** Jiuzhai *Polyporus umbellatus*; *Armillaria mellea*; co-cultivation

## 0 引言

猪苓(*Polyporus umbellatus* (Pers.) Frie) 又名豕苓、猪屎苓、野猪苓、猪粪菌、猪茯苓、地乌桃等, 在分类学上属于真菌门(Eumycophyta)、担子菌纲(Basidiomycetes)、无褶菌目(Aphyllaphorales)、多孔菌科(Polyporaceae)、多孔菌属(*Polyporus*), 是世界一种传统珍贵药用真菌。菌核为药用部分, 具有利水渗湿功效, 是主治小便不利、水肿、泄泻、淋浊、带下等病症的主要中药之一, 其用药已有 2 000 多年历史<sup>[1]</sup>。现代研究发现猪苓多聚糖具有抗肿瘤、提高免疫力和抗辐射作用, 其用途被拓宽, 需求量逐年增加<sup>[2-3]</sup>, 促使了对野生猪苓大规模地无序过度采挖, 致使自然资源遭到严重破坏, 已面临枯竭,

造成医疗用药的长期紧缺局面。

为了保护自然资源, 发展猪苓生产, 解决医疗用药供需矛盾。陕西、四川等省的有关科研单位对猪苓人工栽培和半野生栽培进行了多方面的科学试验, 其人工栽培技术取得成功。然而, 近年来随猪苓栽种面积被盲目扩大, 出现高产者可达到 50 kg/m<sup>2</sup>, 低产者空窖无收; 还有一些农户常出现种下去猪苓, 采收时却找不到猪苓的空窖现象, 损失惨重, 此影响了药农积极性, 阻碍了猪苓产业的进一步发展<sup>[4]</sup>。据报道, 蜜环菌是猪苓栽培必备的共生菌, 侵入猪苓菌核后被猪苓消化利用, 成为猪苓的营养来源, 由于这种共生特殊关系的存在, 使得猪苓在人工栽培中存在着许多关键性的技术难题, 猪苓种质资源及共生蜜环菌的选择、两者高亲和性组

收稿日期: 2020-02-14

基金项目: 四川省中医药管理局项目(2018QN043); 四川省省级科研院所基本科研业务费项目(A-2019N-22); 四川省科技厅项目(2019ZHFP0014); 2018年中医药公共卫生服务补助专项(财社[2018]43号)。

作者简介: 胡平(1979—), 女, 四川成都人, 副研究员, 学士, 研究方向: 中药资源与种植研究。\*通信作者: 杨玉霞(1980—), 女, 四川犍为人, 研究员, 博士, 研究方向: 中药材遗传育种、资源评价与利用等研究。

合的筛选是猪苓种植产业高质高产发展面临的瓶颈<sup>[5-6]</sup>。由此,本研究以四川地理标志产品九寨猪苓为研究对象,针对猪苓与蜜环菌共生的培养条件进行摸索,确立2者的共生培养条件,揭示猪苓与蜜环菌共生培养条件下的生长特性,以期为筛选出猪苓高亲和性蜜环菌指标提供理论依据,从而促进猪苓产业高质高产发展。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料

猪苓菌种:九寨玉瓦乡猪苓菌核(灰苓)分离纯化,PDA试管斜面培养基保存,4℃冰箱保藏,备用。

蜜环菌菌种:蜜环菌A9(四川省绵阳市食用菌研究所提供)。

培养基:(1)PDA培养基:马铃薯200 g/L+葡萄糖20 g/L+琼脂10 g/L。(2)改良PDA培养基:马铃薯200 g/L+葡萄糖10 g/L+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/L+MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g/L+维生素B<sub>1</sub> 0.01 g/L+琼脂10 g/L。(3)GPY培养基:葡萄糖20 g/L+蛋白胨6 g/L+酵母膏10 g/L+琼脂15 g/L。(4)麦麸培养基:麦麸30 g/L+葡萄糖20 g/L+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/L+MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g/L+琼脂10 g/L。(5)黄豆饼培养基:黄豆饼粉40 g/L+葡萄糖20 g/L+琼脂10 g/L。按常规配制,pH 6.0,121℃高压灭菌20 min,分装于直径9 cm培养皿中,每皿倒入约20 mL,备用<sup>[7-14]</sup>。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 共培养

无菌条件下,用直径5 mm打孔器在已培养好的猪苓和蜜环菌菌落边缘打孔,使其成菌片,各一块接入培养皿中,置培养基两侧,相距2.5 cm,人工培养箱中培养。下同。

#### 1.2.2 培养基筛选

试验设置PDA、改良PDA、SPD、麦麸、GPY培养基5个处理,3重复/处理,3皿/重复,25℃黑暗条件下恒温培养,其他条件一致。第3天开始观察记录猪苓菌丝和蜜环菌菌索生长情况;培养8、10和12 d时用直尺测菌落直径,计算菌丝平均长速。菌丝平均长速用菌落直径(mm/d)表示。下同。

#### 1.2.3 温度筛选

试验设置5、10、15、20、25、30℃共6个温度处理,每处理温差±5℃,5重复/处理,3皿/重复,培养基选用改良PDA培养基,其他培养条件一致。第3天开始观察记录猪苓菌丝和蜜环菌菌索生长情况;培养8、10和12 d时用直尺测菌落直径,计算菌丝平均长速。

#### 1.2.4 酸碱度筛选

试验设置5、6、7、8、9共5个酸碱度处理,5重复/处理,3皿/重复,置25℃黑暗条件下恒温培养,其他条件一致。第3天开始观察记录猪苓菌丝、蜜环菌菌索生长情况;培养8、10和12 d时用直尺测菌落直径,计算菌丝平均长速。

#### 1.2.5 数据统计分析

利用Excel2007处理数据,DPS7.05软件进行LSD法多重比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基对猪苓蜜环菌共培养菌丝生长的影响

由表1可知,不同培养基上,猪苓、蜜环菌菌丝生长差异有统计学意义。从菌丝生长情况看,猪苓和蜜环菌菌丝在改良PDA培养基上综合得分最高,猪苓与蜜环菌菌丝都生长良好;PDA培养基和黄豆饼培养基综合得分次之,其中,PDA培养基,蜜环菌生长良好,猪苓生长一般,黄豆饼培养基则相反;GPY培养基和麦麸培养基综合得分都低,其中GPY培养基上,蜜环菌生长良好,猪苓菌丝生长受抑制,麦麸培养基上2种菌都生长一般;从猪苓菌丝平均生长速度看,在改良PDA培养基上,猪苓菌丝平均生长速度最高5.73 mm/d,黄豆粉培养基次之,PDA培养基和麦麸培养基稍慢(2者差异无统计学意义),GPY培养基最慢,猪苓菌丝生长速度仅为改良培养基的69%。综合分析得知,猪苓蜜环菌共培养最适宜培养基为改良PDA培养基。

表1 培养基对猪苓蜜环菌共培养菌丝生长的影响

培养基	猪苓菌丝平均生长速度/ (mm·d <sup>-1</sup> )	菌丝生长情况		
		猪苓	蜜环菌	综合得分
PDA培养基	4.98±0.07bcB	1	2	3
改良PDA	5.73±0.11aA	2	2	4
GPY培养基	3.98±0.06dC	0	2	2
麦麸培养基	4.85±0.07cB	1	1	2
黄豆饼培养基	5.18±0.04bB	2	1	3

注:不同小写字母表示 $P < 0.05$ 差异有统计学意义,不同大写字母表示 $P < 0.01$ 差异有统计学意义。猪苓菌丝生长情况:2表示生长束状并扭结,1表示正常生长,0表示生长受抑制;蜜环菌菌索生长情况:2表示菌索中空,1表示正常生长,0表示生长受抑制。下同。

### 2.2 温度对猪苓蜜环菌共培养菌丝生长的影响

由表2可知,不同温度条件下,猪苓、蜜环菌共培养菌丝生长有显著影响。从菌丝生长情况看,10~25℃时猪苓菌丝能生长,15~25℃时蜜环菌能生长,25℃下,猪苓、蜜环菌菌丝都生长良好,综

合得4分,排第1,5℃和30℃,猪苓和蜜环菌菌丝生长受抑制;从猪苓菌丝平均生长速度看,随温度升高,猪苓、蜜环菌菌丝生长速度逐渐升高,25℃时,猪苓菌丝生长速度最高为5.73 mm/d,30℃后菌丝生长速度降低。综上分析得知,猪苓蜜环菌共培养最适宜为温度为25℃。

表2 温度对猪苓蜜环菌共培养菌丝生长的影响

温度/℃	猪苓菌丝平均生长速/ (mm·d <sup>-1</sup> )	菌丝生长情况		
		猪苓	蜜环菌	综合得分
5	1.27±0.01eE	0	0	0
10	2.24±0.05dD	1	0	1
15	3.58±0.03cC	1	1	2
20	4.19±0.02bB	1	2	3
25	5.73±0.03aA	2	2	4
30	4.13±0.08bB	0	0	0

### 2.3 酸碱度对猪苓蜜环菌共培养菌丝生长的影响

由表3可知,不同酸碱度对猪苓、蜜环菌共培养菌丝生长有显著影响。从菌丝生长情况看,pH 5.5、6.5、7、8、9时,猪苓菌丝都可以生长,pH 6.5猪苓菌丝生长良好;pH 5.5、6.5、7时,蜜环菌可以生长,pH 8、9时蜜环菌生长受抑制,pH 6.5猪苓、蜜环菌菌丝生长良好,综合得4分,排第1;从猪苓菌丝生长速度看,pH 5.5、6.5时,猪苓菌丝生长速度升高,pH 6.5时,猪苓菌丝生长速度最高为4.78 mm/d;pH 5.5次之,pH 7.0时猪苓菌丝平均生长速度开始降低,pH 9时最低,仅为3.02 mm/d。综上分析得知,猪苓蜜环菌共培养最适宜酸碱度为pH 6.5。

表3 酸碱度对猪苓蜜环菌共培养菌丝生长的影响

pH	猪苓菌丝平均生长速 度/(mm·d <sup>-1</sup> )	菌丝生长情况		
		猪苓	蜜环菌	综合得分
5.5	4.47±0.08bB	1	2	3
6.5	4.78±0.03aA	2	2	4
7	4.32±0.04bB	1	1	2
8	3.83±0.01cC	1	0	1
9	3.02±0.07dD	1	0	1

### 3 结论与讨论

猪苓作为一种名贵中药材,近些年被不断深挖,野生猪苓几乎遭到“满门抄斩”<sup>[7]</sup>。人工种植方面一直没有明显的突破,猪苓与蜜环菌存在复杂的共生关系,2者亲和性是影响猪苓产业发展的重要因素,而猪苓和蜜环菌共生培养条件的确立是首要任务。猪苓菌丝和蜜环菌丝的生长发育和繁殖形成,主要受到培养基、温度、pH培养条件的制约。本试验在所用的培养基及各种培养条件下,筛选出最适合九寨猪苓和蜜环菌A9共培养的培养条件是改良PDA培养基,25℃,pH 6.5,黑暗培养24 h,在此条件下,猪苓、蜜环菌菌丝生长良好、生长速度快,综合得分高,此为九寨猪苓和蜜环菌共培养体系的确立以及筛选出九寨猪苓高亲和性蜜环菌指标提供了理论依据。而对于如何引导猪苓与蜜环菌在原种培养基上共同生长并建立共生关系,以及筛选出的猪苓和蜜环菌的组合是否适合生产使用,还有待于进行野外栽培试验,进一步验证筛选结果。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典·一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:318.
- [2] 陈晓梅,田丽霞,郭顺星.猪苓化学成分及药理活性研究进展[J].菌物学报,2017,36(1):35-47.
- [3] 王天媛,张飞飞,任跃英,等.猪苓化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2017,51(4):109-112.
- [4] 张彤.中国猪苓药材产业发展现状及趋势调查报告[D].杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [5] 柳玲玲,秦松,朱国胜,等.猪苓与蜜环菌共生体系的研究进展[J].湖北农业科学,2012,51(4):655-659.
- [6] 柳玲玲,刘永翔,毛堂芬,等.猪苓与蜜环菌高亲和性组合的筛选[J].菌物学报,2015(6):1068-1077.
- [7] 刘国库,杨太新,吴和平,等.猪苓培养条件的确立及其与蜜环菌共同培养的研究[J].时珍国医国药,2016(4):950-953.
- [8] 徐青松,骈跃斌,肖晋川,等.猪苓的生态学研究[J].现代农业科技,2016(6):103-104.
- [9] 戚淑威,袁理春,赵琪,等.不同培养条件对野生猪苓菌丝生长的影响[J].中国食用菌,2007(5):41-43.
- [10] 陈德育,来航线,林雁冰.猪苓的菌丝生长和菌核形成特性及驯化研究[J].食用菌,2004(6):8-11.
- [11] 李彩萍,葛存梅.猪苓纯菌种的分离及培养条件的研究[J].食用菌,2011(6):15-16+24.
- [12] 邢咏梅,郭顺星.环境因子对猪苓菌丝体生长发育的影响[J].中国药理学杂志,2011(7):493-496.
- [13] 程显好,郭顺星.猪苓菌丝固体培养特性研究[J].中药材,2009(1):11-14.
- [14] 殷红,顾芳红,任宏强.环境因素对猪苓发育影响的初步研究[J].西北大学学报(自然科学版),2001(4):337-338.