

乌蒙山区小菇属萌发菌的分离鉴定及其菌种生产优化

王绘¹, 袁青松¹, 周涛^{1*}, 袁媛², 徐娇¹, 江维克¹, 张进强¹, 王晓³,
刘大会⁴, 张光文⁵, 潘成⁵

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700;
3. 山东省分析测试中心, 济南 250014; 4. 湖北中医药大学, 武汉 430065;
5. 贵州乌蒙腾菌业有限公司, 贵州大方 551600)

[摘要] 目的:分离鉴定小菇属菌,扩展萌发菌种质资源和优化萌发菌培养条件,为天麻萌发菌菌种的生产提供资料和指导。方法:采用米麻组织块分离法和转接纯化培养技术进行菌株的分离纯化,运用传统形态学、显微技术对分离菌株的菌落、菌丝、孢子等形态特征进行鉴定,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增rDNA(Ribosomal DNA)内转录间隔区(ITS)进行测序分析,进一步与美国国家生物信息中心(NCBI)数据库进行同源性检索比对,利用MEGA6软件采用最大似然法(Maximum Likelihood, M-L)构建系统进化树,对分离菌株进行分类鉴定;同时,采用正交试验优化萌发菌生长条件。结果:分离获得86株菌株,分别属于12个属的21个物种,其中WMMFJ, SHXG, WMM-21和MFJ8103菌株鉴定为*Mycena purpureofusca*, ZT01-6和ZT01-8菌株鉴定为*M. cf. purpureofusca*。萌发菌在麦麸培养基上的生长速率显著快于PDA培养基,且萌发菌生长的最佳培养基组成为土豆100 g,麦麸150 g,玉米粉100 g,葡萄糖20 g;间苯三酚的2种浓度对WMMFJ菌株有显著促进生长作用,对WMM-21和ZT01-6菌株有促进作用;2-甲氧基酚的2种浓度对WMMFJ菌株也具有促进作用。结论:新分离鉴定6株萌发菌菌种,其中4株为*M. purpureofusca*, 2株为*M. cf. Purpureofusca*,采用的分离方法提高了萌发菌菌株的分离效果。

[关键词] 天麻; 萌发; 小菇属菌; 分离; 鉴定

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0043-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202068

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200728.1602.007.html>

[网络出版日期] 2020-7-29 09:06

Isolation and Identification of *Mycena* of *Pleurotus* in Wumeng Mountain Area and Optimization of Its Production Conditions

WANG Hui¹, YUAN Qing-song¹, ZHOU Tao^{1*}, YUAN Yuan², XU Jiao¹, JIANG Wei-ke¹,
ZHANG Jin-qiang¹, WANG Xiao³, LIU Da-hui⁴, ZHANG Guang-wen⁵, PAN Cheng⁵

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550025, China;
2. National Resource Center for Chinese Meteria Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Shandong Analysis and Test Center, Ji'nan 250014, China;
4. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
5. Guizhou Wumengteng Fungus Industry Limited Company, Dafang 551600, China)

[Abstract] **Objective:** Isolate and identify *Mycena*, expand the resources of geminating fungus of *Gastrodia elata* and optimize the culture conditions of *Mycena*, in order to provide information and guidance for

[收稿日期] 20200216(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81960694);中央本级重大增减支项目(2060302);贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2019]5611号);贵州省百层次创新型人才项目(黔科合平台人才[2018]5638);贵州省教育厅创新群体重大项目(黔教合KY字[2018]022);现代农业产业技术体系建设项目(CARS-21)。

[第一作者] 王绘,在读硕士,从事中药及民族药资源分类鉴定与质量控制工作, E-mail:1785227180@qq.com

[通信作者] *周涛,博士,教授,从事中药资源调查与整理工作, E-mail:taozhou88@163.com

the production of germinating fungus of *G. elata*. **Method:** Juvenile tuber tissue mass transfer separation and purification technology was used for the separation and purification of strains, traditional morphology microscopy was used to isolate the colony mycelia spores morphological characteristics, such as identification, polymerase chain reaction(PCR) amplification rDNA (Ribosomal DNA) internal transcribed spacer(ITS) was used for sequencing analysis and further homology with NCBI database retrieval, MEGA6 software was used to establish Phylogenetic tree by the Maximum likelihood method (MaximumLikelihood, M-L), so as to classify and identify isolated strains. At the same time, orthogonal test was used to optimize the optimal growth conditions of *Mycena*. **Result:** A total of 86 strains were isolated, which belong to 21 species in 12 genera. WMMFJ, SHXG, WMM-21 and MFJ8103 were identified as *M. purpureofusca*, and ZT01-6 and ZT01-8 were identified as *M. cf. purpureofusca*. The growth rate of *Mycena* in wheat bran medium was significantly higher than in PDA medium. The optimal medium composition for the growth of germinating bacteria was 100 g potato, 150 g wheat bran and 20 g corn flour, 100 g glucose. And 1, 3, 5-Trihydroxybenzene significantly promoted the growth of WMMFJ, and played a role in promoting the growth of WMM-21 and ZT01-6, and 2-Methoxyphenol promoted the growth of WMMFJ. **Conclusion:** Six strains of *Mycena* were isolated and identified, four of them are *M. purpureofusca*, and two of them are *M. cf. Purpureofusca*. The separation method improved the separation effect of germinating bacteria.

[Key words] *Gastrodia elata*; germination; *Mycena*; separation; identification

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎,最早记载于《神农本草经》,列为上品,具有息风止痉,平抑肝阳,祛风通络的功效,临床用于治疗头晕目眩,小儿惊风,癫痫,肢体麻木等^[1]。现代药理研究发现,天麻有抗惊厥、眩晕、镇静、抗心肌缺血、血栓形成,降血压等作用^[2-4]。2019年11月,天麻被列入药食同源试点后,在食用及保健品方面的需求量将会大幅提升,优质天麻更受到消费者的青睐。

天麻是一种高度退化的兰科植物,其种子必须在小菇属真菌的帮助下才能萌发,而后必须与蜜环菌共生,方能正常生长繁殖。萌发菌是一类会发光的好氧真菌,主要营腐生生活,多腐生于林间枯枝落叶、朽枝、植物腐生根上^[5]。其分离筛选工作始于20世纪70年代。用于生产的萌发菌主要是石斛小菇 *Mycena dendrobii* 和紫萁小菇 *Mycena osmundicola* 2种,但在长期的无性繁殖过程中,菌种退化现象十分严重,萌发菌种质资源严重缺乏,因此,筛选优质萌发菌,扩展萌发菌种质资源显得尤为迫切。

石斛小菇和紫萁小菇2种萌发菌均属于担子菌门大型子实体真菌,对培养条件苛刻,培养过程中生长时间长,生物量低,严重影响萌发菌菌种的生产效益。因此,本研究拟从野生米麻样品(指由种子萌发后原球茎继续生长形成的天麻块茎,或是白麻、箭麻等分生出较小的天麻块茎个体,且不具有明显顶芽,顶端只有生长锥,长2 cm以下,粗

1.2 mm,次年顶芽不能分化出箭麻)中分离鉴定萌发菌菌株,初步从生长表型筛选出长势优良的萌发菌菌株,并对萌发菌生长最适培养条件和促生长物质进行筛选,为提升萌发菌生产工艺,缩短生产周期,减少生产成本奠定前期技术基础。

1 材料

2019年3月,分别于昭通市小草坝天麻种植基地(纬度:N27°45'18",经度:E104°12'11") and 贵州大方县天麻种植基地(纬度:N27°10'29",经度:E105°56'7")采集健康米麻样品10份,置于-20℃保存,用于后续萌发菌分离。实验对照菌株是目前云贵普遍用于种植的菌株JZ1H,收集于贵州乌蒙腾菌业有限公司。

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)提取液;硫酸镁、葡萄糖(天津市永大化学试剂有限公司,批号20180419,20190801);磷酸二氢钾(批号20170110,天津市科密欧化学试剂有限公司);琼脂粉(索莱宝生物科技有限公司,批号909A024);75%乙醇,95%乙醇,1%次氯酸钠,三氯甲烷,异戊醇,Mix酶[Premix Taq™(Ex Taq™ Version 2.0 plus dye),宝生物工程(大连)有限公司],引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')[生工生物工程(上海)股份有限公司合成];Marker(Takara,批号AJ91887A);GZX400EF型光照培养箱(天津市泰斯特有限公司);TOMYES-315型自动蒸汽灭菌锅(日

本基因公司);ME204102型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];Nanodrop 2000型核酸定量仪(美国 Thermo 公司);C1000 Touch Thermal Cycler型PCR扩增仪,Powerpac Basic型电泳仪,ChemiDoc Touch型凝胶成像仪(美国伯乐 Bio-Rad 公司);移液器(德国 Eppendorf 公司)。槲皮苷(上海易恩化学技术有限公司,批号 RH113930),槲皮素(上海吉至生化科技有限公司,批号 M2162c186),间苯三酚(国药集团化学试剂有限公司,批号 20151027),2-甲氧基酚(美国 Solarbio 公司,批号 20141103)等。

PDA(Potato Dextrose Agar)固体培养基:土豆 200 g,去皮水煮 20 min,取过滤液,葡萄糖 20 g,磷酸二氢钾 1.5 g,硫酸镁 3 g,琼脂 15 g,胰蛋白胨 10 g,定溶至 1 L,pH 5~5.5。于 101 kPa,121 °C 灭菌 20 min。

麦麸固体培养基:土豆 100 g,去皮水煮 20 min,取过滤液,麦麸 150 g,玉米粉 100 g 水煮 20 min,取过滤液,20 g 葡萄糖,15 g 琼脂,定容至 1 L,调节 pH 5~5.5,于 101 kPa,121 °C 灭菌 20 min。

2 方法

2.1 萌发菌分离 米麻是萌发菌诱导花粉种子萌发形成原球茎,再与蜜环菌建共生关系后形成的小球茎。此生长阶段的米麻还存活有萌发菌,且便于野外收集样品。因此本研究采取健康米麻作为分离萌发菌的样品。取健康米麻,流水冲洗表面泥砂,于超净工作台中切成 2 mm 大小,置于无菌锥形瓶中,无菌水清洗 1 次,75%乙醇浸泡 30 s,1%次氯酸钠浸泡 6 min 后无菌水清洗 3 次,无菌滤纸晾干,接种于 PDA 培养基,25 °C 暗培养。待组织块长出菌丝,挑取菌落边缘菌丝转移至新 PDA 平板上,纯化数次,得到纯菌种。将纯菌株接种至 PDA 固体斜面培养基上,25 °C 暗培养,待菌落长满斜面,观察无污染后,于 4 °C 保存。

2.2 萌发菌形态学鉴定 乳酸棉兰染色液进行菌丝染色,400 倍显微镜下观察菌丝、孢子。从菌落表面形状、菌丝状态、菌落边缘以及培养基基质颜色等方面对分离纯化的菌株进行形态鉴定。

2.3 萌发菌分子生物学鉴定

2.3.1 真菌 DNA 提取 改良 CTAB 法提取纯化菌株的基因组 DNA。收集菌丝于 2.0 mL 离心管中,加入 3×CTAB 溶液 1 500 μL 和 β-巯基乙醇 40 μL,于球磨仪中 45 MHz,震荡研磨 5 min,65 °C 水浴锅中水浴 1 h,其间每 5 min 颠倒混匀 1 次,12 000 r·min⁻¹

离心 10 min,吸取上清液 1 000 μL 置新的离心管中;加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1)溶液颠倒混匀,静置 10 min,12 000 r·min⁻¹离心 10 min 后,吸取上清液,重复该步骤一次,将上清液转移至新离心管中。加入等体积的异丙醇,于冰上沉淀 40 min,12 000 r·min⁻¹离心 10 min 后,弃废液。加入 75%乙醇 1 000 μL 洗涤沉淀,12 000 r·min⁻¹离心 5 min 后,弃废液。加入 1 000 μL 95%乙醇洗涤沉淀,12 000 r·min⁻¹离心 5 min 后,弃废液。室温晾干,加 25 μL ddH₂O 溶解。-20 °C 保存备用。

2.3.2 真菌 ITS 区 PCR 扩增 引物 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG),ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)对核糖体转录间隔区进行 PCR 扩增。DNA 模板 2 μL, Mix 酶 12 μL,引物(10 μmol)各 1 μL,加 ddH₂O 补至 25 μL。PCR 扩增程序:95 °C 5 min,95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环,72 °C 5 min,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,送生工生物工程有限公司(上海)测序。

2.3.3 分离菌株系统发育分析 通过 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线 BLAST 将测序获得的各菌株 ITS 序列与 NCBI 上现有小菇属序列进行比对,MEGA6.0 软件最大似然法(Maximum Likelihood,M-L),构建系统进化树。

2.4 不同萌发菌菌株生长能力分析 25 °C 暗培养 15 d 的萌发菌,用 1 000 μL 的枪头与菌落边缘打孔后接种于新的麦麸培养基和 PDA 培养基上,以生产上常用菌株 JZ1H 作为对照菌株,3 个重复,于 25 °C 培养。第 10 天用十字交叉法测量菌落直径,SPSS 17.0 单因素方差分析(One-way ANOVA)统计, $P < 0.05$ 表示具有明显差异。

2.5 萌发菌最适培养基优化 根据基地调研,现主要的生产培养基为 PDA 培养基(土豆 200 g·L⁻¹,葡萄糖 20 g·L⁻¹,麦麸 100 g·L⁻¹,玉米粉 100 g·L⁻¹,KH₂PO₄ 15 g·L⁻¹,MgSO₄ 3 g·L⁻¹,琼脂 15 g·L⁻¹,pH 5~5.5),因此,在前期培养基配方基础上,设计土豆,麦麸,玉米粉,葡萄糖 4 个因素 3 个水平的培养基正交优化试验见表 1,5 个重复,用于筛选最优培养条件,以萌发菌 SHXG 作为测试菌株,SPSS17.0 分析数据。

2.6 萌发菌生长促进物质筛选 于 PDA 固体培养基中加入间苯三酚,2-甲氧基酚,槲皮苷 3 种物质,使其终浓度为 300,100 μmol·L⁻¹[6],并在 PDA 培养基中加入等体积溶解间苯三酚的 50%乙醇溶液作为对照,并以生产上常用菌株 JZ1H 作为对照菌株,

表1 因素水平

Table 1 Factor level table

水平	A土豆/g	B麦麸/g	C玉米粉/g	D葡萄糖/g
1	300	150	150	30
2	200	100	100	20
3	100	50	50	10

表2 分离菌株PDA生长表型分类

Table 2 Growth phenotype classification of isolated strain in PDA

分类	菌株数/株	分类的菌株编号	菌株形态描述	典型菌株
1	6	ZT01-6, ZT01-8, WMM-21, SHXG, MFJ8103, WMMFJ	菌丝洁白, 毛绒状, 气生根发达, 边缘整齐, 呈辐射状生长, 培养基底部呈黄色	ZT01-6, ZT01-8, WMM-21, SHXG, MFJ8103, WMMFJ
2	3	SW-1, SW-2, SW-4	菌丝洁白色, 致密, 呈放射状生长, 中心菌丝呈黄色, 底部培养基淡黄色	SW-1, SW-2
3	3	SW-3, SW-5, SW-6,	菌丝洁白色, 呈放射状生长, 中间菌丝致密, 边缘稀疏, 培养基底部淡黄色	SW-3, SW-5, SW-6
4	5	WMM-3, WMM-5, WMM-11, WMM-19, WMM-7	菌丝白色, 絮状, 气生根不发达, 底部培养基淡黄色	WMM-3, WMM-5, WMM-7, WMM-11, WMM-19
5	7	ZT01-10, ZT01-23, ZT01-24, WMM-4, WMM-12, WMM-25, WMM-18	菌丝白色, 菌丝类似起球, 中间密, 边缘稀疏, 培养基底部白色	WMM-12, ZT01-10, WMM-4, WMM-18
6	3	WMM-6, WMP-5, WMM-22,	菌丝白色, 絮状态, 气生根不发达, 培养基底部白色	WMM-6
7	1	ZT01-15	菌丝边缘呈灰绿色, 毛绒状, 气生根不发达, 培养基底部白色	ZT01-15
8	3	ZT01-3, ZT01-18, ZT01-19,	菌丝边缘白色, 中间呈黄褐色, 气生根不发达, 培养基底部边缘呈白色, 中间黄褐色	ZT01-3
9	5	WMM-2, WMM-8, WMM-14, WMM-15, WMM-16	菌丝白色, 中间致密, 边缘较稀疏, 气生根不发达, 培养基底部白色	WMM-2, WMM-15
10	3	WMM-9, WMM-13, ZT01-2	菌丝洁白色, 浓密, 气生根较发达, 培养基底部白色	WMM-9, WMM-13, ZT01-2
11	17	WMP-1, WMP-6, WMM-17, ZT01-16, ZT01-20, ZT01-21, ZT01-36, ZT01-37, ZT01-38, ZT01-39, ZT01-43, ZT01-44, ZT01-45, ZT01-46, ZT01-47, ZT01-48, ZT01-49	菌丝白色, 浓密, 气生根发达, 气生菌丝上有黑色小点	WMP-1, WMM-17, ZT01-16
12	3	ZT01-13, ZT01-17, ZT01-22	菌丝灰白色, 边缘灰褐色, 较稀疏, 絮状, 气生根不发达, 培养基底部白色	ZT01-13, ZT01-17
13	1	ZT01-12	菌丝白色, 中间菌丝致密, 边缘稀疏, 培养基底部中间棕色, 边缘淡黄色	ZT01-12
14	4	WMP-8, WMP-9, WMP-12, WMP-13	菌丝白色, 稀疏, 培养基底部白色	WMP-8, WMP-9
15	17	ZT01-5, ZT01-25, ZT01-28, ZT01-29, ZT01-31, ZT01-32, ZT01-33, ZT01-35, WMP-2, WMP-3, WMP-10, WMP-11, WMP-14, WMP-15, WMP-18, WMP-19, WMP-20	菌丝前期白色, 后变浅橙色, 气生根不发达, 培养基底部橙色	ZT01-5, ZT01-14, WMP-3, WMP-10, WMP-11
16	3	ZT01-4, ZT01-7, ZT01-9	菌丝前期白色, 后变浅咖色, 培养基底部深褐色	ZT01-4, ZT01-7, ZT01-9
17	1	ZT01-11	菌丝白色, 较密, 轮廓整齐, 培养基底部白色	ZT01-11
18	1	ZT01-1	菌丝洁白色, 浓密, 气生根十分发达	ZT01-1

3个重复, 25 °C暗培养, 于第5天, 15天测量菌落直径。

3 结果

3.1 菌株分离与表型分析 从样本中分离获得共生菌86株。通过在PDA培养基中的生长表型和显微鉴定方法, 将分离菌株分为18类, 见表2, 图1。

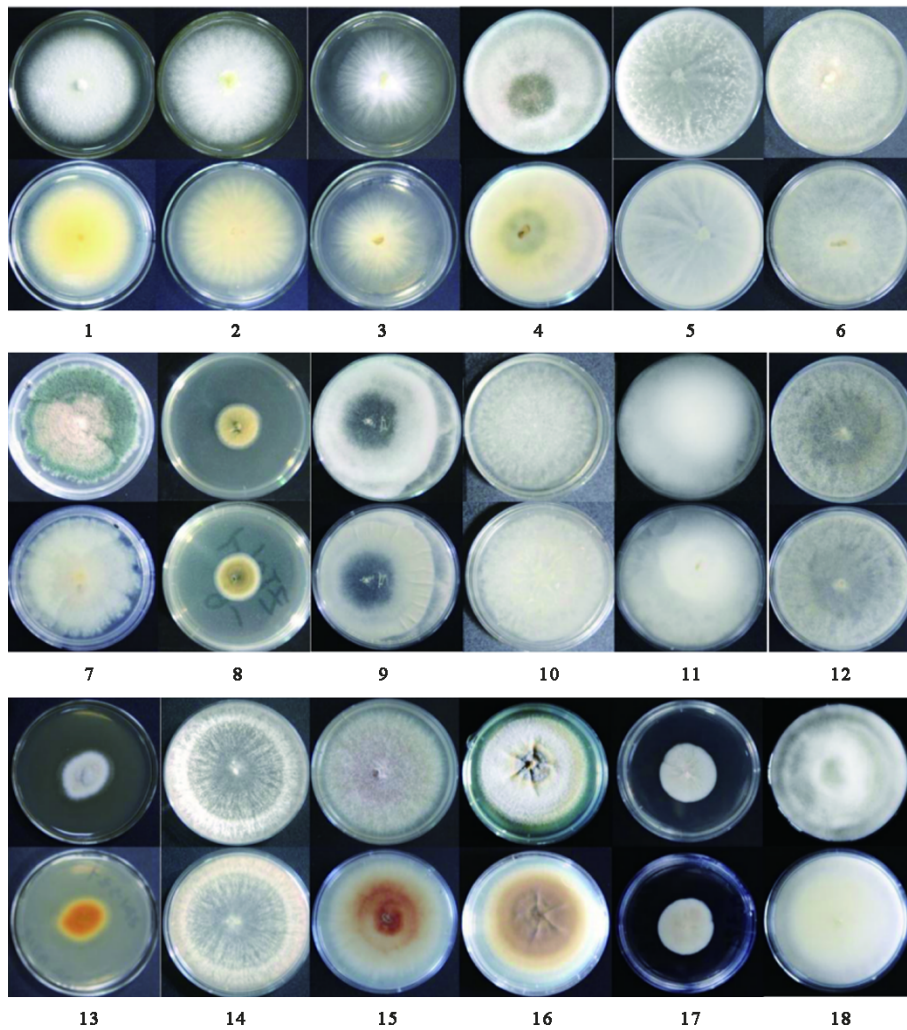


图1 十八类菌株典型形态

Fig. 1 Eighteen typical morphology of strains

3.2 萌发菌分子鉴定 在生长表型和显微鉴定的18类菌株中,每类选择典型菌株共47株进行总DNA提取,扩增ITS区,电泳检测DNA条带在500~750 bp大小测序,见图2。

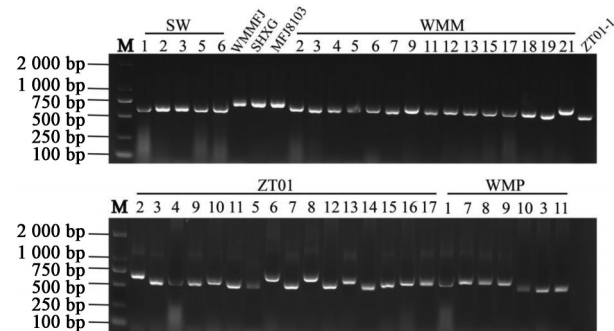


图2 菌株特异 rDNA ITS 区扩增

Fig. 2 Amplification figure of its region of strain specific rDNA

获得的ITS序列与NCBI数据库比对分析,菌株分为21个物种,分属于12个属,见表3。其中6株为

小菇属 *Mycena* 真菌,占总数的6.98%,而毛壳属 *Mucor* 菌占比最高达到26.75%,其次是木霉属 *Trichoderma* 菌,占比为20.93%,赤壳属 *Ilyonectria* 菌占比为19.77%。其他真菌与小菇属真菌占比相当。

3.3 萌发菌生长能力测定 为了筛选生长速度快的萌发菌,通过在PDA培养基和麦麸培养基中对生长能力进行测定。多重比较发现,在PDA培养基中,菌株WMMFJ和ZT01-8显著快于菌株WMM-21菌株和对照菌株JZ1H。在麦麸培养基中,对照菌株JZ1H生长速度最快,MFJ8103, WMMFJ和ZT01-8次之,见表4。

3.4 萌发菌最适培养基筛选 萌发菌在麦麸培养基中生长速度显著快于PDA培养基。设计土豆(A),麦麸(B),玉米粉(C),葡萄糖(D)4因素3水平的正交试验,筛选结果显示,各因素对萌发菌生长

表3 真菌分类及所占比例

Table 3 Classification and proportion of fungi

属名	物种名	株数/株	属占比/%	物种占比/%
<i>Mycena</i>	<i>Mycena purpureofusca</i>	6	6.98	6.98
<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	6	20.93	6.98
	<i>Trichoderma virens</i>	5		5.81
	<i>Trichoderma</i> sp.	1		1.16
	<i>Trichoderma atroviride</i>	4		4.65
	<i>Trichoderma crassum</i>	2		2.33
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium perangustum</i>	3	3.49	3.49
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>	1	1.16	1.16
<i>Mortierella</i>	<i>Mortierella</i> sp.	6	9.3	6.98
	<i>Mortierella verticillata</i>	1		1.16
	<i>Mortierella globulifera</i>	1		1.16
<i>Mucor</i>	<i>Mucor aff. abundans</i>	15	26.75	17.45
	<i>Mucor racemosus</i>	3		3.49
	<i>Mucor abundans</i>	1		1.16
	<i>Mucor racemosus</i> f.	4		4.65
<i>Ceratobasidium</i>	<i>Ceratobasidium</i> sp.	4	4.65	4.65
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium solani</i>	1	1.16	1.16
<i>Ilyonectria</i>	<i>Ilyonectria radicola</i>	17	19.77	19.77
<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium homophilatum</i>	3	3.49	3.49
<i>Pseudoclathrosphaerina</i>	<i>Pseudoclathrosphaerina</i>	1	1.16	1.16
<i>Lecanicillium</i>	<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	1	1.16	1.16

的速率的综合影响顺序为 $C > A > D > B$, 综合得出最佳方案为土豆、麦麸、玉米粉、葡萄糖 $A_3B_1C_2D_2$ 。即土豆 100 g, 麦麸 150 g, 玉米粉 100 g, 葡萄糖 20 g。见表 5, 6。

3.5 小菇属萌发菌菌落形态特征 将分离鉴定的 6 株萌发菌及对照菌株 JZ1H, 在 PDA 培养基和麦麸培养基中进行形态学观察, 见图 3。从图 5 中可以看出菌落形态存在差异, 生长表型共同点有菌丝洁

表4 萌发菌在 PDA 培养基和麦麸培养基中生长情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Growth of *Mycena* in wheat bran and PDA medium ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PDA 培养基	麦麸
SHXG	18.045±2.958 ^{ab}	41.658±0.591 ^{abc}
MFJ8103	17.563±2.008 ^{ab}	43.952±3.532 ^c
WMMFJ	20.785±1.449 ^b	42.080±1.762 ^{abc}
WMM-21	13.427±2.447 ^a	38.185±1.053 ^{ab}
ZT01-6	16.537±0.258 ^{ab}	37.383±1.287 ^a
ZT01-8	20.683±2.645 ^b	43.401±3.491 ^{bc}
JZ1H	18.140±1.413 ^a	48.220±1.855 ^d

注: 不同小写字母表示有明显差异 ($P < 0.05$)。

表5 萌发菌最适生长培养基筛选 $L_9(3^4)$ 正交试验

Table 5 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test for optimum growth medium of *Mycena*

因素	A 土豆	B 麦麸	C 玉米粉	D 葡萄糖	实验结果/mm
1	1	1	1	1	23.943
2	1	2	2	2	28.003
3	1	3	3	3	23.814
4	2	1	2	3	28.69
5	2	2	3	1	23.72
6	2	3	1	2	25.20
7	3	1	3	2	30.05
8	3	2	1	3	26.33
9	3	3	2	1	28.97

表6 方差分析

Table 6 Analysis of variance results

因素	离差平方和	自由度	F	P
土豆	100.303	2	12.700	0.000
麦麸	27.588	2	3.493	0.039
玉米粉	113.678	2	14.394	0.000
葡萄糖	43.208	2	5.471	0.008
误差	173.748	8		

白、气生菌丝绒毛状, 培养基底部呈黄色等; 主要差异存在于气生根、菌落边缘、气生菌丝质地等。通过对萌发菌的形态差异可以初步用于其活性筛选。

3.6 促进萌发菌生长物质筛选 菌落直径分析结果显示, 生长第 5 天时, 间苯三酚, 2-甲氧基酚, 斛皮苷的 2 种浓度, 对 7 株萌发菌都具有显著抑制作用, 其中斛皮苷对萌发菌的抑制能力最强, 但 3 种物质对对照菌株 JZ1H 的抑制率显著高于其他菌株; 而

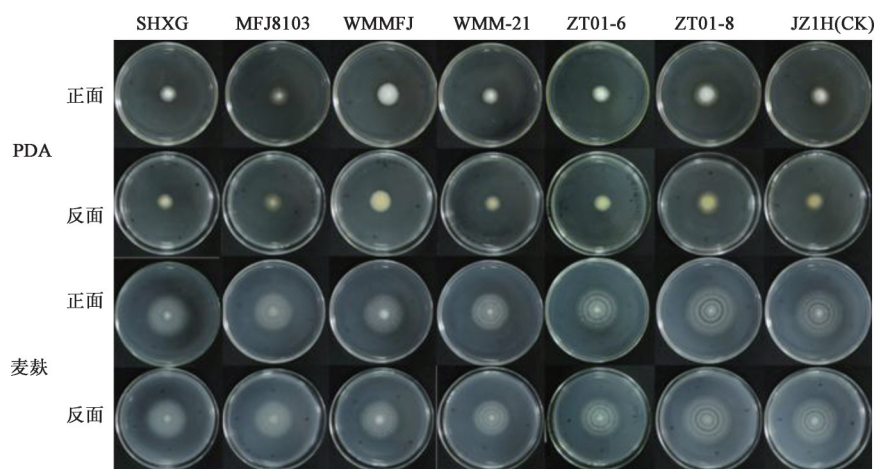


图3 萌发菌在麦麸培养基和PDA培养基生长情况

Fig. 3 Growth of germinating bacteria in wheat bran and PDA media

生长第15天时,间苯三酚的2种浓度对WMMFJ菌株有显著促进生长作用,对WMM-21和ZT01-6菌株有促进作用;2-甲氧基酚的2种浓度对WMMFJ

菌株也具有促进作用。因此,间苯三酚和2-甲氧基酚可用作萌发菌的潜在促进生长物质,见表7,8。

表7 3种物质处理萌发菌第5天生长情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Growth of *Mycena* treated with three substances on 5th day($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	间苯三酚 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	间苯三酚 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2-甲氧基酚 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2-甲氧基酚 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	槲皮苷 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	槲皮苷 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	对照
SHXG	6.342±1.260	4.255±0.425 ¹⁾	3.493±0.873 ¹⁾	4.273±1.051 ¹⁾	0 ¹⁾	2.351±0.119 ¹⁾	7.722±1.057
MFJ8103	7.855±1.260 ¹⁾	8.213±1.175 ¹⁾	5.300±0.924 ¹⁾	6.925±1.475 ¹⁾	0 ¹⁾	1.972±0.263 ¹⁾	9.327±0.272
WMMFJ	7.763±0.268	6.822±0.960 ¹⁾	4.912±0.866 ¹⁾	6.233±0.697 ¹⁾	0 ¹⁾	3.070±0.273 ¹⁾	8.867±0.113
WMM-21	6.450±1.584	6.237±1.163	1.798±0.172 ¹⁾	4.533±0.965	0 ¹⁾	1.983±0.205 ¹⁾	6.627±0.878
ZT01-6	5.157±0.978 ¹⁾	8.072±0.606	3.753±0.459 ¹⁾	6.613±0.868 ¹⁾	0 ¹⁾	2.597±0.470 ¹⁾	8.888±0.127
ZT01-8	6.940±0.524 ¹⁾	7.380±1.553 ¹⁾	8.090±1.078 ¹⁾	6.433±1.082 ¹⁾	0 ¹⁾	2.553±0.378 ¹⁾	10.437±0.398
JZ1H	4.657±0.822 ¹⁾	3.883±0.730 ¹⁾	3.977±0.327 ¹⁾	5.443±0.284 ¹⁾	0 ¹⁾	1.927±0.231 ¹⁾	8.882±0.313

注:采用Dunnnett法进行多重比较,与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表8 3种物质处理萌发菌第15天生长情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Growth of *Mycena* treated with three substances on the 15th day($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	间苯三酚 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	间苯三酚 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2-甲氧基酚 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2-甲氧基酚 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	槲皮苷 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	槲皮苷 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	对照
SHXG	31.680±1.623	28.732±1.762	28.010±0.820 ¹⁾	27.680±2.047 ¹⁾	0 ¹⁾	4.022±0.420 ¹⁾	32.513±2.142
MFJ8103	37.038±1.832	38.330±1.392	33.000±0.106 ¹⁾	39.905±0.361	0 ¹⁾	11.923±3.249 ¹⁾	41.845±1.457
WMMFJ	39.765±0.424 ¹⁾	39.650±2.382 ¹⁾	34.942±1.501	35.340±1.671	0 ¹⁾	17.578±0.811 ¹⁾	32.758±1.409
WMM-21	37.493±1.771	33.733±0.300	22.530±1.926 ¹⁾	30.478±2.298	0 ¹⁾	10.832±2.053 ¹⁾	34.598±2.399
ZT01-6	44.042±0.754	44.730±1.266	36.643±0.272 ¹⁾	41.828±1.323	0 ¹⁾	12.160±2.645 ¹⁾	43.180±1.424
ZT01-8	39.038±0.476	35.980±0.028 ¹⁾	38.587±1.642	35.238±0.032 ¹⁾	0 ¹⁾	18.577±1.663 ¹⁾	39.323±1.006
JZ1H	37.415±1.564	34.292±0.991 ¹⁾	30.705±1.274 ¹⁾	34.475±0.728	0 ¹⁾	3.105±0.604 ¹⁾	37.068±1.285

3.6 分离菌株遗传系统发育分析 通过GenBank数据库中同源性比对,获得ITS同源性大于99%序列。MEGA软件最大似然法构建系统发育树,见表9,图4,5。结果显示,WMMFJ,SHXG,WMM-21,

MFJ8103和*M. purpureofusca*均聚类在同一个分支,亲缘关系较近;WMMFJ,SHXG,WMM-21和MFJ8103与*M. purpureofusca*菌株的相似度达到99.67%。而ZT01-6,ZT01-8和*M. cf. purpureofusca*

TMSC109 聚类在同一个分支,亲缘关系较近, ZT01-6和ZT01-8与*M. cf. purpureofusca* TMSC109菌株相似度达到100%。将WMMFJ, SHXG,

WMM-21和MFJ8103鉴定为*M. purpureofusca*, 而将ZT01-6和ZT01-8鉴定为*M. cf. purpureofusca*, 属于小菇。

表9 小菇属真菌序列比对

Table 9 Sequence comparison results of *Mycena*

菌编号	比对物种名	相似度/%	NCBI编号
ZT01-6	<i>Mycena cf. Purpureofusca</i> TMSC109	100	JQ676208.1
ZT01-8	<i>Mycena cf. Purpureofusca</i> TMSC109	100	JQ676208.1
SHXG	<i>Mycena Purpureofusca</i>	99.67	JQ364945.1
WMM-21	<i>Mycena Purpureofusca</i>	99.67	JQ364945.1
MFJ8103	<i>Mycena Purpureofusca</i>	99.67	JQ364945.1
WMMFJ	<i>Mycena Purpureofusca</i>	99.67	JQ364945.1

注:覆盖度均为100%,E值均为0。

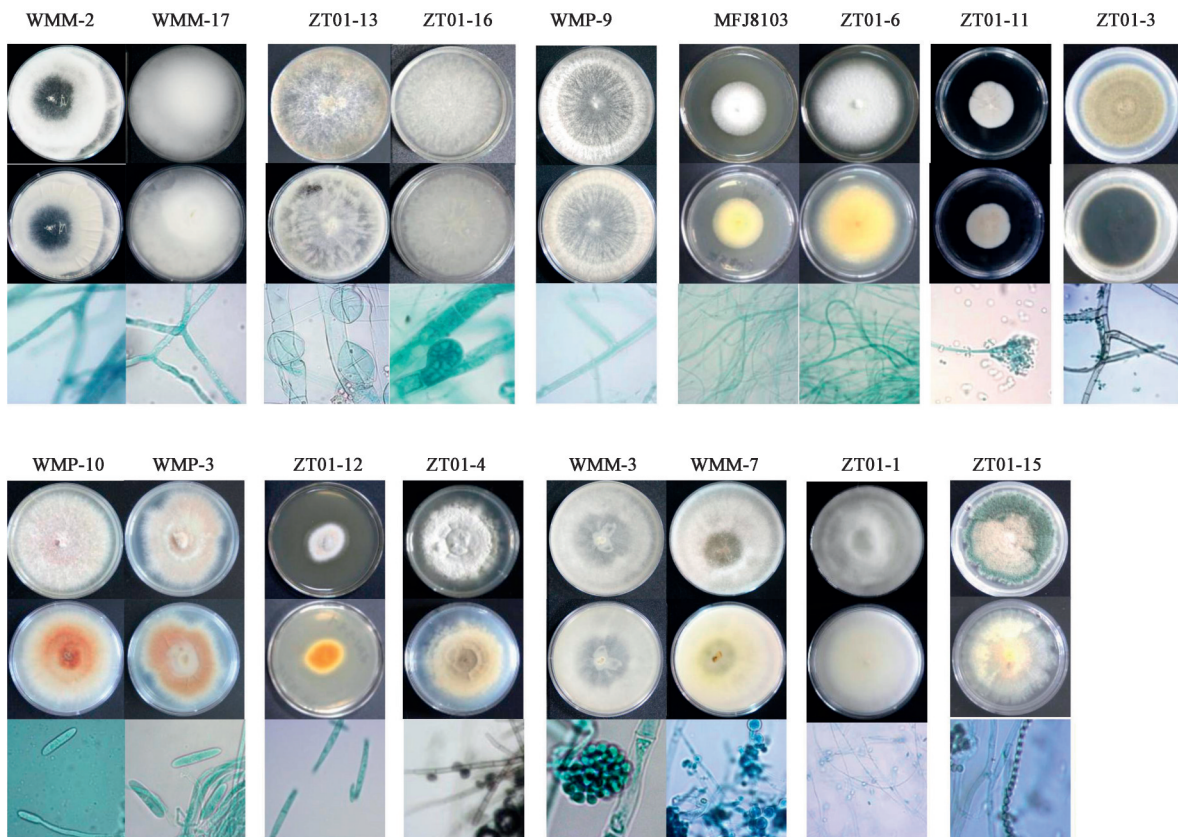


图4 小菇属菌株分类

Fig. 4 Classification of *Mycena*

4 讨论

目前,主要生产用的萌发菌菌株有紫萁小菇、石斛小菇等小菇属真菌^[7-9]。由于长期的无性繁殖,萌发菌退化明显,在培养中污染杂菌率也大大增加^[10]。本研究在菌株分离结果中,发现小菇属菌占比只有6.98%,显著低于毛壳属、木霉属和赤壳属等真菌。推测可能是小菇属菌生长速度显著慢于毛壳属、木霉属和赤壳属等菌,在菌株分离过程中,由

于小菇属菌还未开始生长,毛壳属、木霉属和赤壳属等菌已经长满培养皿,在纯化过程中这些菌对潜在的小菇属菌的生长具有有竞争性抑制作用。但利用米麻组织块分离小菇属效率显著比利用树叶分离的效率要高^[11]。因此,本研究分离萌发菌的方式提高了菌株的分离效果。

小菇属真菌是弱腐生真菌,多腐生于林间的枯枝、落叶上,对培养营养需求比较复杂。本研究发

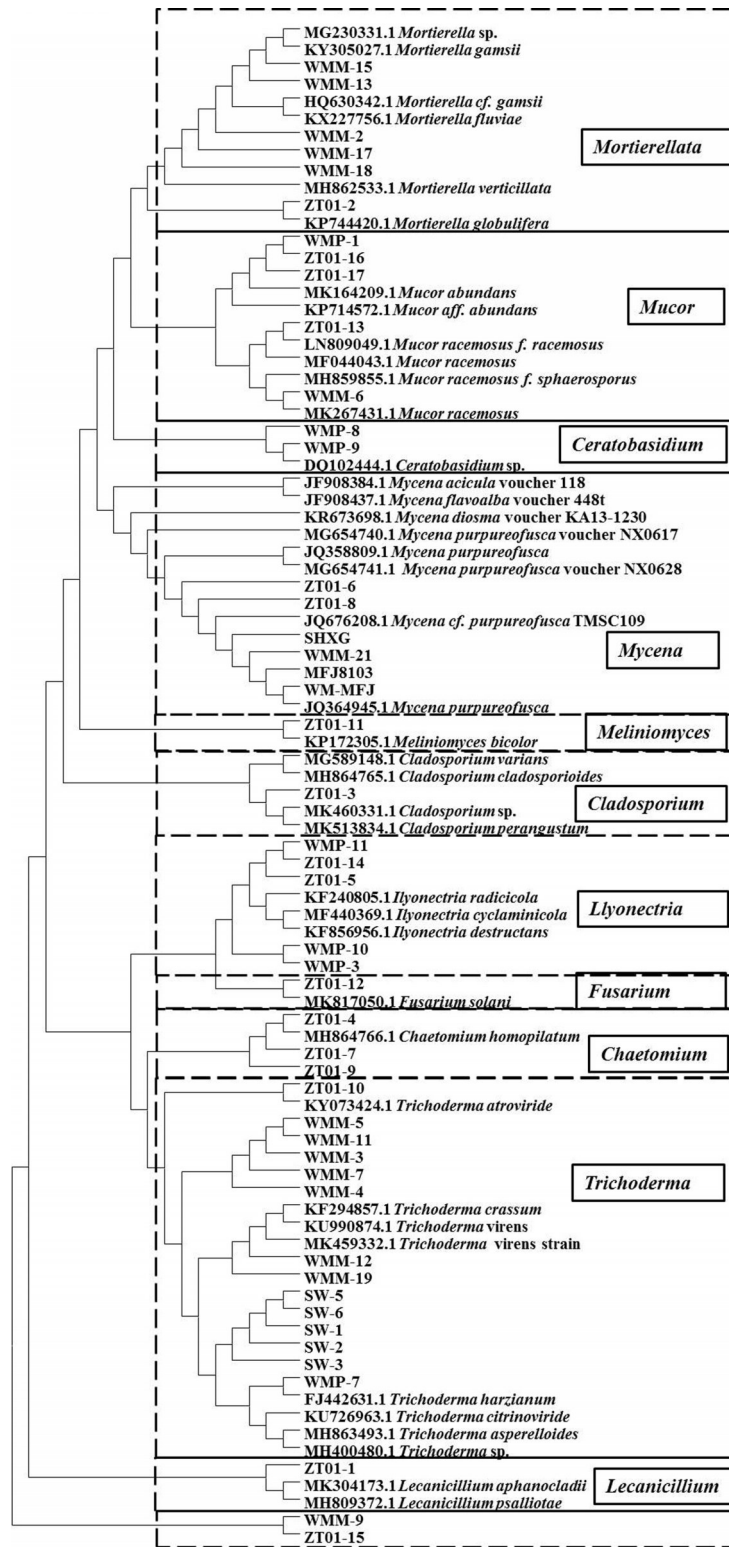


图5 进化树分析

Fig. 5 Result figure of evolutionary tree analysis

现萌发菌在PDA培养基的生长显著慢于在麦麸培养基的生长。有研究报道,玉米粉为萌发菌最佳碳源^[12],复合维生素B能促进菌丝生长^[13]。因此,本文所用麦麸培养基中,含有玉米粉、麦麸、葡萄糖等

成分,不仅为萌发菌提供充足碳氮源,且玉米、麦麸还含有脂肪类、维生素B类等成分,比PDA培养基提供的成分更丰富,萌发菌生长更好,故得出最佳麦麸培养基配方为土豆100g,麦麸150g,玉米粉

100 g,葡萄糖 20 g。酚类(间苯三酚,2-甲氧基酚)和黄酮类(斛皮苷)对蜜环菌的生长具有促进作用^[14],在本研究中证实间苯三酚的2种浓度对WMMFJ菌株有显著促进生长作用,对WMM-21和ZT01-6菌株有促进作用;2-甲氧基酚的2种浓度对WMMFJ菌株也具有促进作用。

本文通过米麻组织块分离得到的6株小菇属菌株中,WMMFJ,SHXG,WMM-21和MFJ8103鉴定为*M. purpureofusca*,而ZT01-6和ZT01-8鉴定为*M. cf. purpureofusca*。这6株萌发菌为新报道的萌发菌物种,这为扩展天麻萌发菌种质资源具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 邹宁,吕剑涛,薛仁余,等. 天麻素对小鼠的镇静催眠作用[J]. 时珍国医国药,2011,22(4):807-809.
- [3] 李作兴,聂容荣. 天麻素治疗眩晕的临床研究[J]. 中国伤残医学,2013,21(6):237-238.
- [4] 张莹,王云瑶,杜红安,等. 天麻地上部分降压作用的实验研究[J]. 云南中医学院学报,2007,30(6):28-30.
- [5] 袁崇文. 中国天麻[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2010.
- [6] CURIR P, DOLCI M, COREA G, et al. The plant antifungal isoflavone genistein is metabolized by *armillaria mellea vahl* to give non-fungitoxic products [J]. *Plant Biosystems*, 2006, 140(2):156-162.
- [7] 徐锦堂,郭顺星. 供给天麻种子萌发营养的真菌——紫萁小菇[J]. 真菌学报,1989,8(3):221-226.
- [8] 范黎,郭顺星,徐锦堂. 天麻种子萌发过程中与其共生真菌石斛小菇间的相互作用[J]. 菌物系统,1999,18(2):219-225.
- [9] 范黎,郭顺星,徐锦堂. 天麻种子与兰小菇共生萌发过程中超微结构变化研究[J]. 菌物系统,1999,18(4):431-435.
- [10] 徐锦堂,中国天麻栽培学[M]. 北京:北京医科大学&中国协和医科大学联合出版社,1993.
- [11] 古海刚,白红进,曾艳波,等. 中国红树植物角果木内生真菌的分离及其初步鉴定[J]. 微生物学杂志,2012,32(6):1-6.
- [12] 虞小燕. 天麻萌发菌遗传多样性的研究及优良菌株筛选[D]. 汉中:陕西理工学院,2016.
- [13] 程立君,李世辉,胡志芳,等. 一株乌天麻共生萌发菌培养条件的优化[J]. 北方园艺,2016(19):175-177.
- [14] BARZ W, SCHLEPPHORST R, LAIMER J. Ueber den abbau von polyphenolen durch pilze der gattung *Fusarium*[J]. *Phytochemistry*, 1976, 15(1):87-90.

[责任编辑 顾雪竹]