

文章编号:1674-7054(2011)03-0209-05

野生喜热灵芝菌种分离技术研究

刘国民, 李娟玲, 周经阳

(海南大学 苦丁茶研究所 海南 海口 570228)

摘要: 采用类似于植物组织培养中对外植体进行表面消毒的处理方法,对野生喜热灵芝的子实体进行表面消毒,然后取小块子实体进行离体培养,继而用小容器栽培检测法检测菌种是否分离提纯。结果表明,通过该方法,现已从9个野生喜热灵芝子实体中获得了纯化的菌种。这种分离纯化野生喜热灵芝菌种的方法是行之有效的。

关键词: 灵芝属; 喜热灵芝; 菌种分离

中图分类号: Q 949.32

文献标志码: A

自1948年Donk建立灵芝科以来,全世界已报道了该科的有效种类200余种^[1]。中国利用现代科学方法研究灵芝这一类群真菌始于20世纪30年代。《中国的真菌》^[2]中记载了灵芝属和假灵芝属29种、1变种、1变型。《中国真菌总汇》^[3]中详细记载了灵芝27种,假芝属11种。《中国灵芝图鉴》^[4]中记载了中国已知的灵芝4属、3亚属、103种。海南岛的灵芝资源种类较为丰富,在中国已报道的103种灵芝中,海南岛已发现了72种,约占全国灵芝总数种类的70%^[1-4]。

喜热灵芝(*Ganoderma calidophilum*)原产中国海南^[4-5],隶属于真菌门(Eumycota)、担子菌亚门(Basidiomycota)、层菌纲(Hymenomycetes)、无隔担子菌亚纲(Holobasidiomycetae)、非褶菌目(Aphyllophorales)、灵芝科(Canodermataceae)、灵芝属(*Canoderma*)^[2-4,6-7]。因其通常生长于竹林下富含腐熟竹叶的地表,故在海南民间通常称之为“竹灵芝”。喜热灵芝具有多种药用功效和保健作用,故在海南深受人们欢迎,野生喜热灵芝干品的价格约高达700元·kg⁻¹。由于受经济利益的驱使,大批村民进山采集野生喜热灵芝,使其野生资源濒于灭绝。正是由于近年来人们对野生灵芝的过度采摘,以及生态环境条件的破坏或恶化,野生灵芝(也包括野生喜热灵芝)的数量已日趋减少。笔者拟通过本课题的工作,研发出一套用于大型真菌喜热灵芝菌种分离和人工商业化栽培的新方法、新工艺,从而使人们从单独依靠采摘野生喜热灵芝的状态过渡到人工商业化栽培喜热灵芝。这项工作对于灵芝科大型真菌及其他大型真菌相关的应用性基础研究(特别是菌种分离、鉴定和驯化栽培技术体系的研发)有重要的借鉴意义,而且在森林生态条件和生物多样性的保护以及真菌系统演化研究等方面均具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验时间及地点 于2006年5月下旬进行野外取样;菌种分离及小容器栽培检测等室内工作于2006年5月至2007年6月上旬在海南大学苦丁茶研究所科研基地内进行。

1.2 试验材料 野生喜热灵芝新鲜子实体(图版1)采自海南省儋州市八一农场1分场的竹林,经表面消

收稿日期: 2011-07-26

基金项目: 国家科技基础条件平台建设子项目(2005DKA21006); 海南省教育厅高等学校科研资助项目(Hjkj200614)

作者简介: 刘国民(1955-)男,湖南祁东人,海南大学农学院教授,博士,博士生导师。E-mail: 13005082258@163.com

毒灭菌后,切取子实体小块作为试验材料。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种分离纯化

1.3.1.1 子实体表面消毒 切取子实体较新鲜的部分,先用 $\varphi = 5\%$ 的清洁精溶液清洗去表面粘附的杂质,然后用清水冲洗干净,并在超净工作台上无菌条件下,将较幼嫩的子实体切成约 $3.0\text{ cm} \times 3.0\text{ cm}$ 的小块,用 $\varphi = 75\%$ 的酒精消毒 1 min ;倒去酒精消毒液,接着用 $w = 0.15\%$ 的 HgCl_2 溶液浸泡并轻摇 12 min (加入几滴吐温);倒去 HgCl_2 溶液,再用无菌水冲洗消毒好的喜热灵芝子实体 $4 \sim 5$ 遍,放在无菌盘中切取大小约为 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 的小块,并接种到初代培养基上进行培养。

1.3.1.2 初代培养基配方 MS无机盐+肌醇 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +烟酸 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +盐酸硫胺素 $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +盐酸吡哆素 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +甘氨酸 $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + w (蔗糖) $= 2.5\%$ + w (卡拉胶粉) $= 0.7\%$ pH 5.8。

1.3.1.3 用小容器栽培检测法检测菌种是否分离提纯 待初代培养基上的菌丝体长满培养基表面时,首先用目测法对每瓶菌种菌丝体进行初筛,淘汰有明显杂菌或有污染的菌瓶。通常,所有灵芝科灵芝属的新鲜菌丝体均是纯白色的,故凡不是白色菌丝体的菌瓶,以及有明显杂菌的菌瓶,可全部淘汰。留下来的纯白色菌瓶,尚不能确切地证明都是喜热灵芝的菌种,要通过代料栽培法进一步验证是否提纯。因为,并非所有白色的菌丝都是灵芝。

本研究工作中采用小容器栽培检测法是自行设计的检测方法。具体做法:在1个容积只有 200 mL 的小玻璃瓶中装满代料,经高温高压灭菌后,按菌株将分离出的菌丝体分别接入到小容器盛装的代料中。经过一段时间的培养(70 d 左右),凡是长出了子实体的(无论其大小如何),便可证明该菌株是提纯的菌种,否则为杂菌,应弃去。

小容器栽培检测法所采用的代料配方: $w = 70\%$ 的木屑、 $w = 10\%$ 的麦麸、 $w = 5\%$ 的玉米粉、 $w = 13.9\%$ 的油棕渣、 $w = 0.1\%$ 的 KH_2PO_4 、 $w = 1\%$ 的氢氧化钙;其含水量为 $w = 65\%$,将各种成分充分混匀后,装入 250 mL 培养瓶中。

1.3.2 初代培养基成分 初代培养基用于菌种分离,其成分为:MS无机盐+肌醇 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +烟酸 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +盐酸硫胺素 $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +盐酸吡哆素 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +甘氨酸 $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + w (蔗糖) $= 2.5\%$ + w (卡拉胶粉) $= 0.7\%$ pH 5.8。

1.3.3 继代增殖培养基配方 继代增殖培养基用于已分离纯化的菌种之扩大繁殖以及为驯化栽培制备菌种,其配方与初代培养基的配方完全相同。

1.3.4 小容器栽培检测法中的装料、灭菌及接种方法 采用植物组织培养常用的 200 mL 玻璃培养瓶装料,用母指向瓶的四周压实;往代料中间插入直径约为 1.0 cm 的木棒并整平代料,然后拔出木棒,预留小孔洞以便于下一步的接种操作。注意,填料的松紧度要适宜。填料过松,前期菌丝体生长快,但易于老



图版1 用于分离菌种的喜热灵芝子实体材料及已分离纯化的菌株

1 2 为子实体材料(编号为0637),用于分离菌种,并获得成功。其中1和2系分别从菌盖上方和下方2个不同角度拍摄的照片;3 4 为分离获得的一批已纯化的菌株。

化,后期营养不足;反之,透气性差,菌丝生长缓慢,出芝晚。代料装好后用无菌耐高压薄膜封口并用麻绳扎紧。在0.14 MPa、121 ℃条件下灭菌80 min,冷却后备用。瓶装培养料冷却到35 ℃左右抢温接种。接种时,在超净工作台上打开瓶盖,把菌种从预留的小孔洞中接入培养料中,接种后仍按原方式盖紧瓶盖。

1.3.5 培养条件 菌种分离及扩大繁殖期间,于植物组织培养实验室内进行培养,培养室内温度为 (25 ± 2) ℃;每天光照10 h(8:00~18:00),用日光灯照明,光照强度约1 500 lx。小容器栽培过程中,接种后初期30 d内将菌瓶置于植物组织培养室内培养,以后转入盖有双层70%遮阳网的荫棚下的培养架上,并用塑料膜罩覆培养架保湿。每2 d揭开膜罩喷雾1次,将空气湿度控制在90%左右。

2 结果与分析

2.1 菌种分离(初代培养)试验结果 供试的子实体样品切片接种到初代培养基(菌种分离培养基)上4~5 d后,可用肉眼看到子实体切片周围有白色菌丝体出现。如为纯净的喜热灵芝菌丝,一般不会夹有杂色。由于灵芝是在杂菌繁生的环境中生长的,其子实体切片上不仅有自身的菌丝体,常常还有粘附或夹杂着多种杂菌(包括真菌和细菌等)。因此,每个子实体材料,尽管都接种了25~30瓶,但是大部分都被杂菌污染了。例如,编号0638的子实体,一共接了25瓶,最后只有3瓶是未被污染。笔者以这3瓶分别作为菌株的株系,编号分别为0638-1、0638-2和0638-3,再进行扩大繁殖,并将每个株系编号至少保留10瓶,提交中国西南地区生物种质资源库永久保存。其他各个供试的子实体材料的分离纯化结果详见表1。

在实验过程中,一共用了11个喜热灵芝的子实体进行菌种分离试验,其中有9个子实体获得成功。目前,这些菌种已保存在实验室。

表1 用于分离纯化的喜热灵芝子实体编号及试验结果

| 子实体编号 | 接种瓶数/瓶 | 纯化瓶数/瓶 | 污染率/% | 备注 |
|-------|--------|--------|-------|----------------------------|
| 0629 | 30 | 11 | 63 | 获得11瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |
| 0630 | 25 | 2 | 92 | 获得2瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |
| 0631 | 25 | 4 | 84 | 获得4瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |
| 0632 | 25 | 3 | 88 | 获得4瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |
| 0633 | 25 | 1 | 96 | 获得1瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |
| 0634 | 25 | 1 | 96 | 获得1瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |
| 0635 | 25 | 5 | 80 | 获得5瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |
| 0636 | 25 | 0 | 100 | 全部污染,弃去。 |
| 0637 | 25 | 0 | 100 | 全部污染,弃去。 |
| 0638 | 25 | 3 | 88 | 获得3瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |
| 0639 | 25 | 4 | 84 | 获得4瓶初代纯化菌种。按初代菌瓶号分别扩繁和保存。 |

2.2 小容器栽培检测法检测结果 经初代培养后,淘汰了一大批初代材料,留下的纯白色菌瓶,尚不能百分之百地充分肯定都是喜热灵芝的已纯化的菌种。为了验证是否为纯化的菌种,将每个菌瓶作为一个株系繁殖10瓶,从每个株系中取1瓶作菌种,接到代料上(用250 mL培养瓶盛装)。经过70 d的培养,如果是纯化的菌种,则可以长出子实体来。一般每个小代料培养瓶只长一个子实体,形态上与野外采回的相近,只是由于所用的是小容器,代料较少,故子实体个体很小(图版2,图版3)。

目前,通过上述方法,已从9个喜热灵芝的子实体中分离纯化出菌种,共得到34个株系。这些株系均已用小容器栽培检测法证明是纯化的喜热灵芝菌种。已将每个株系繁殖20瓶,准备近期内提交中国西南野生生物种质资源库长期保存。

3 讨论

笔者采用类似于植物组织培养中初代培养时对外植体进行表面消毒的方法来分离和提纯喜热灵芝菌种,而不是像其他科研工作者那样在进行大型真菌的分离纯化时,采用传统的单孢分离法。单孢分离法虽然简单易行,但是容易受杂菌污染,故往往导致分离纯化的效率较低。本研究中采用的组织分离法从9个子实体中,获得34个株系的纯净的喜热灵芝菌种,因而被证明是行之有效的。另外,如果采用单孢分离法,必须首先要采集到正处于孢子粉散布时期的子实体,后续的工作才能展开。而野外工作中,很难遇到样本材料处于孢子粉散布时期。基于以上2个方面的原因,笔者认为,灵芝科大型真菌的菌种分离,采用组织分离法反而比单孢分离法更方便得多。



图版2 小容器栽培法检测过程

1. 将分离所得的菌株,经初步筛选淘汰后,分株接种到用小培养瓶盛装的代料中置于培养室下培养;2. 在培养室内经3周培养后,菌丝体已长满整个小容器中的代料。然后移入荫棚下管理;夏季期间,如经60~70d荫棚管理可出菌(子实体);3. 编号为0638的菌株所形成的子实体。



图版3 4个分离成功的菌株

1. 编号为0629的菌株所形成的子实体;2. 编号为0631的菌株所形成的子实体;3. 编号为0632的菌株所形成的子实体;4. 编号为0634的菌株所形成的子实体。

参考文献:

- [1] 赵继鼎. 中国灵芝新编[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 1-5.
- [2] 吴兴亮, 戴玉成. 中国灵芝图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 1.
- [3] 刘国民, 吴兴亮, 李娟玲, 等. 野生热带灵芝 *Ganoderma tropicum* (Jungh.) Bres. 菌种分离与驯化研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2009, 27(1): 24-29.
- [4] 周选围, 林娟. 中国野生灵芝的开发利用[J]. 食用菌学报, 1999, 6(1): 58-64.
- [5] 佚名. 山海经·中山径[M]. 袁珂 校注. 上海: 上海古籍出版社, 1980: 142.
- [6] 列子. 列子·汤问篇[M]. 北溟, 严捷, 译注. 上海: 上海古籍出版社, 1986: 116.
- [7] 章灵华, 肖培根. 近十年灵芝研究的进展[J]. 西北药学杂志, 1993, 8(1): 31-35.

- [8] 蔺丽, 方能虎, 吴旦. 灵芝有效成份的研究概况[J]. 中成药, 2002, 24(10): 793-796.
- [9] 郁建强, 王益坤. 灵芝高产栽培技术[J]. 现代化农业, 1999, (12): 18-19.
- [10] 孙琪. 灵芝一年三收栽培技术[J]. 中国食用菌, 2001, 21(1): 23-24.
- [11] 贺世红. 水分对灵芝菌丝体和子实体的影响[J]. 中国食用菌, 2000, 19(5): 16-17.
- [12] 吴晓明, 方树平. 仿野生灵芝栽培技术[J]. 浙江食用菌, 2008, 16(3): 42-43.
- [13] 练长勋, 毛可红. 短段木熟料栽培灵芝技术[J]. 中国食用菌, 2007, 26(1): 68.
- [14] 徐新春, 吴惠玲, 刘佑波. 各种栽培因子下培养的灵芝无机元素含量比较测定[J]. 广东微量元素科学, 2000, 7(2): 64-66.
- [15] 杜欣, 周明, 程薇, 等. 不同棉花副产物对灵芝菌丝体生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2010(8): 3989-3990.
- [16] 周全, 陈灵芝. 灵芝栽培培养基筛选试验[J]. 武汉生物工程学院学报, 2006, 2(1): 15-17.
- [17] 李明, 崔胜, 张宏荣, 等. 玉米芯栽培灵芝试验[J]. 河北农业大学学报, 1996, 19(3): 64-66.
- [18] 何彬, 阿牛. 灵芝菌种的分离及生产栽培技术[J]. 四川农业科技, 1992(5): 32.
- [19] 胡昭庚. 食用菌菌种分离制作与贮藏[M]. 中国农业出版社, 2001: 1-146.
- [20] 严清波, 刘云. 名贵珍稀菇菌栽培新法—灵芝、虫草、天麻与密环菌[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2002: 1-66.

Study on the Spawn Isolation of Wild *Anoderma Calidophilum*

LIU Guo-min, LI Juan-li, ZHOU Jin-yang

(The Kudingcha Research Institute of Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The surface sterilization of fruit body was performed via a method which was similar to the surface sterilization for the explants in plant tissue culture to treat wild *Anoderma calidophilum*, and the little pieces of the fruit body were cut down and used for the in vitro culture, and the “small-container-cultivation” method was applied to determine the isolation and purification results of spawn. The result showed that the method for the spawn isolation of *G. calidophilum* was rapid, simple and effective, by which purified spawn were successfully isolated from 9 fruit bodies of *G. calidophilum*, respectively.

Key words: *Ganoderma*; *Ganoderma calidophilum*; spawn separation