

猪苓菌核的组织分离及纯菌种的固体培养*

王淑芳 王成福

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

猪苓 [*Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. 异名: *Griofola umbellata* (Pers. ex Fr.) Pilát] 菌核是一种很好的利尿中药, 随着药用范围的扩大, 野生资源将不能满足日益增多的需要。所以如何分离及培养猪苓纯菌种, 如何以人工栽培或发酵生产的方法得到更多驯化猪苓来代替野生猪苓, 成为人们比较重视的一个问题。为此, 我们从 1974 年开始开展了这方面的工作, 现将部分结果介绍如下:

一、菌核的组织分离

(一) 选择菌核

挑选新鲜、健壮饱满、中等偏小(长约 5—10 厘米)的成熟猪苓菌核, 其外皮要求完整、黑亮、无杂色斑点。体具弹性, 横切面质地均匀、白色。

(二) 分离方法

分离前先用清水将菌核表面冲洗干净, 然后于 5% 来苏儿溶液中浸泡半小时左右, 再用无菌水冲洗两次。放在无菌平皿中, 用灭菌的刀片将菌核切割成片状, 每片厚度约 0.5 厘米。为了防止细菌污染, 可将菌核片在 0.2% 金霉素水溶液中沾一下, 立即取出。或快速通过酒精灯火焰, 灼热灭菌。然后放入装有培养基的灭菌平皿(直径 6—9 厘米)中, 每平皿放 1—3 块。

如遇到放久较干硬的菌核, 分离前要先进行沙埋处理, 即将干菌核埋入饱和水分的纯沙中 5—7 天。使其恢复弹性及活力。如用正在生长的嫩白苓(即苓芽或称苓头), 因其组织幼嫩, 可缩短来苏儿溶液浸泡时间或不经浸泡, 直接挑取白苓内部组织放在试管斜面上。嫩白苓

含水量较高(83% 左右)。需及时分离, 否则易被杂菌污染, 影响分离效果。

(三) 培养基与培养温度

培养基: 粗制麦芽糖** (或饴糖) 2.5 克, 琼脂 2 克, 自来水 100 毫升。若无粗制麦芽糖可用商品麦芽糖 2.5 克, 蛋白胨 0.5 克, 20% 的大麦芽煮汁(或自来水) 100 毫升。琼脂 2 克。pH6—6.5。

培养温度: 25℃ 左右较适于菌核萌发, 培养 3—4 天, 皿内菌核即开始萌发出白色短密菌丝(见图 1), 7—8 天时菌丝伸入到基质中去, 长约 1—2 毫米。若在 10℃ 左右, 7—8 天菌核也可萌发, 但菌丝稀弱, 淡白色, 形似一层薄霜, 以后菌丝较难伸入到基质中。

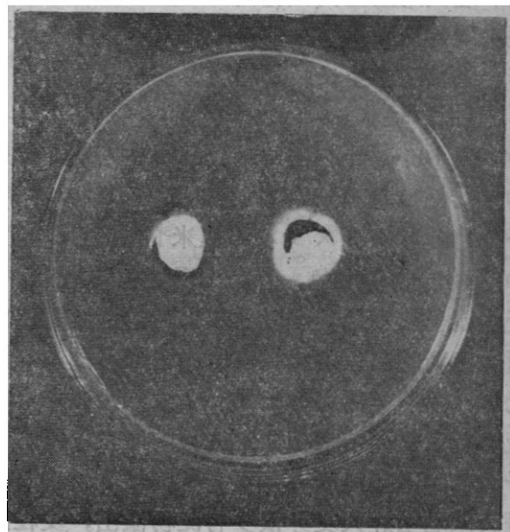


图 1 猪苓菌核的萌发

* 工作中曾得到华北农大俞大绂教授指导。由中国科学院微生物研究所刘锡铤及陈庆海二同志帮助鉴定菌株。

** 地方国营上海酵母厂出品。

要获得纯菌种,须用伸展到培养基里的菌丝体(包括气生菌丝及基质菌丝)。菌核萌发出的白色气生菌丝,在平皿中半个月即开始老化,变成灰褐色,因此移植菌种宜在菌丝伸入到基质初期进行。

二、纯菌种的固体培养

(一) 菌源

将野生菌株(萌发出菌丝的菌核片)和驯化菌株(在培养基上多代培养的菌种)分别接种在用干大麦芽碎粒和椴木屑(重量比为2:5)混和掺水制成的培养基上,在25℃条件下培养,结果二者生长情况不同,接种的野生菌株逐渐老化,菌丝均未伸入到培养基内,26天后有的出现杂菌。而驯化菌株生长15天后萌发菌丝开始向基质内蔓延。30天瓶内最小菌落直径达2×4厘米。由此可见,驯化菌株经过多代培养,逐渐适应了培养条件,用它作菌源虽然恢复期较长(约2周左右),但比野生菌株容易定植生长。

(二) 培养基

经试用土豆块、胡萝卜块、玉米芯、大麦芽、硬木屑、燕麦芽等农副产品作为培养基进行培养。结果菌丝生长最好的培养基是大麦芽。

(三) 培养

用100毫升的三角瓶,每瓶装入干大麦芽10克,水35毫升,灭菌后接入菌种,25℃培养,一个月即形成3×3×2厘米³的白色菌丝团。40天菌丝团稍褐色,开始出现变色的趋势,45天明显呈灰褐色,但以后灰褐色的菌丝团上仍可生出新的白色菌丝。在瓶内水分不散失的情况下,新菌丝可继续出现。用大三角瓶和克氏瓶多次重复,结果相似。试验中还发现虫蛀的干大麦芽比新鲜大麦芽更有利菌丝生长。原因是灭菌后虫蛀大麦芽很少有淀粉溢出,麦粒间不会结成块,基质疏松。

菌丝在大麦芽上开始生长后,在无菌条件下打开瓶口,用灭菌的接种针拨松基质,可以促进菌丝生长。

(四) 小菌核的出现

目前,在培养基上直接培育出有黑色外皮并有使用价值的菌核,难度较大。但本菌在大麦芽上形成的白色菌丝团,在外皮变灰褐色时,取出浸入75%酒精内,皮则呈黑褐色,其质地相似于天然嫩白苓。另外,菌丝在碾谷(碾碎的带壳小米)培养基(重量比为碾谷:水=1:3)上生长的旺盛程度不如大麦芽培养基,但1975年5月6日接种在碾谷培养基内的猪苓菌种,在室温条件下培养到次年2月27日观察,发现紧贴瓶壁的菌落边缘均出现线状不规则黑色细边,在瓶底部有空隙的基质上形成具有黑色外皮的小菌核(见图2)。由这一现象可看出,利用纯菌种栽培猪苓,在自然条件下,有形成菌核的可能。

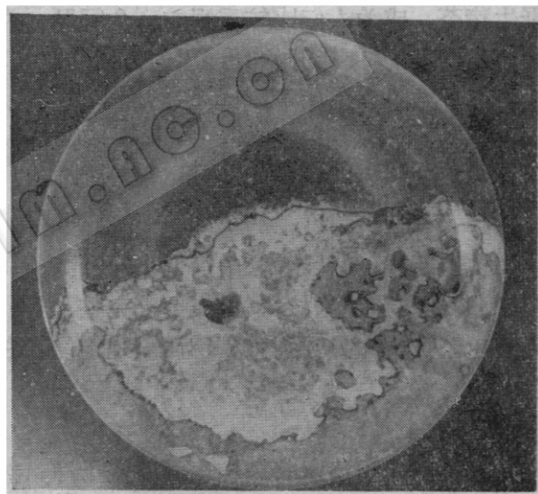


图2 猪苓菌在小米培养基上出现小菌核
(1975.5.6—1976.2.27 于瓶底部出现黑皮、白心紧贴瓶壁)

三、猪苓的培养特性

(一) 菌落形态

菌落形态随培养基种类而异。同一菌株的同一代,在Murashige-Skoog培养基上形成白色和后期微灰白色的紧密菌丝层,在察氏培养基上则形成均匀的淡白色薄粉层。在分离菌种的培养基或其他培养基上,由于菌丝疏密分布不同,常形成轮状或带状菌落。菌株生长后期(接种后1个半月到2个月)大多数出现节孢子(也可称其为粉孢子),即菌落上面及其边缘部分呈现出薄粉层。有些菌株还产生黄色、胶质、半透

明的小片状物,形似幼嫩的银耳。

(二) 颜色变化

旺盛生长期的猪苓菌丝体呈白色,生长后期变成土黄、灰褐及棕褐等颜色。在马铃薯葡萄糖琼脂或马铃薯综合培养基上,接种3天左右,围绕接种点产生黑色或黑褐色色素渗透在基质内形成黑色晕斑,此时尚未萌发出新菌丝。一周后出现短而白的菌丝,黑晕渐渐消失。

(三) 生长温度

由猪苓菌丝形成的节孢子与菌核分别在察氏培养基上平板接种,在不同温度(10℃、15℃、25℃、30℃)下培养20天,每个温度设三个重

复,由测量其菌落扩展直径(三平皿平均值)的结果看出,节孢子萌发与菌核萌发所需的最低温度不同,节孢子在15℃时不萌发,而菌核在10℃时即可萌发长出菌丝。但二者生长的最适宜温度是一致的,均在25℃左右,菌落直径平均达2.16厘米,30℃时生长就缓慢了,直径仅有0.77厘米左右。

(四) 草酸钙棱晶

显微镜下观察野生猪苓菌核的横断面切片,可看到不少草酸钙棱晶散布于菌丝之间。不同菌株的草酸钙棱晶含量不同,同一菌株一般是旺盛生长的白色气生菌丝间较少或无。基质菌丝间则较多。