

白车轴草提取液在蜜环菌培养中的应用研究

熊 城, 梁晓霞*, 刘 静, 范巧佳*

四川农业大学动物医学院, 成都 611130

摘要:为提高蜜环菌(*Armillaria mellea*)的生产效率,以白车轴草(*Trifolium repens* L.)作为培养基主原料,经单因素筛选确定最优白车轴草用量、煮沸时间、葡萄糖用量,再由正交试验筛选出最佳培养基配方,即:白车轴草 100 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L,煮沸 30 min。在此培养基配方下,蜜环菌萌发仅需 2 d,远低于常用的 PDA 培养基的 6 d,同时干物质积累能够达到 0.0216 g/d,约为 PDA 培养基中的 2.8 倍。

关键词:蜜环菌;白车轴草;改良培养基;条件优化

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.017

Application of *Trifolium repens* L. Water Extract for Culturing *Armillaria mellea*

XIONG Cheng, LIANG Xiao-xia*, LIU Jing, FAN Qiao-jia*

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: In order to improve the production efficiency of *Armillaria mellea*, taking *Trifolium repens* L. as the main material of medium, the optimization of the culturing conditions was carried out using orthogonal analytical method after single factors screening, including the consumption of *T. repens* and glucose, as well as the boiling time. The optimal formula was the boiled mixture of *T. repens* 100 g/L, glucose 20 g/L and agar 20 g/L. Using this new medium, the germination time of *A. mellea* was decreased from 6 d in the PDA to 2 d, while the dry weight of mycelium reached to 0.0216 g/d, 2.8 times of that in PDA.

Key words: *Armillaria mellea*; *Trifolium repens* L.; modified medium; formulation optimization

蜜环菌(*Armillaria mellea*)属于担子菌亚门,层菌纲,伞菌目,口蘑科,蜜环菌属^[1],我国已报道的有 14 种^[2],是为数不多的具有菌索的真菌之一。蜜环菌是一种食药兼用型真菌^[3],但关于蜜环菌的培养基的研究却始于天麻(*Gastrodia elata* Bl)的人工栽培。天麻是我国的一种传统名贵中药,而其生长却离不开蜜环菌提供营养,蜜环菌的质量决定了天麻的质量^[4],天麻生产上所用的蜜环菌是通过蜜环菌原种继代培养而来的。

关于蜜环菌原种的培养,已有不少的研究和报道。所用的培养基大致分为:食用富营养类:胡萝卜、大豆粉、玉米粉等以及无机盐。但根据周西贝^[5]的研究表明,在现有培养基条件下,蜜环菌萌发速度较慢,生长周期较长,在培养皿中培养时易老化,菌索量稀疏。通过对传统培养基进行改造,将马铃薯培养基(PDA)中马铃薯用其他材料替换,以提

高蜜环菌生长速度的研究还鲜有报道。

白车轴草(*Trifolium repens* L.)又名白三叶、白花三叶草、白三草、车轴草、荷兰翘摇等,多年生草本,地域分布广,生长速度快。新鲜的白车轴草富含蛋白质和各种微量元素,是一种优良牧草^[6]。其营养与马铃薯相比,除可溶性糖类略低于马铃薯外,蛋白质和矿物质等含量均高于马铃薯^[7,8]。为此,本研究选定白车轴草作为 PDA 中马铃薯的替代材料,对其用量及煮沸时间、葡萄糖用量等因素进行优选,拟获得较 PDA 传统蜜环菌培养基相比,培养时间更短、质量更好的培养基。

1 材料与方法

1.1 材料

供试蜜环菌(CFCC5898) *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. 2015 年 4 月购于中国林业微生物菌种保藏管理中心(CFCC);实验用白车轴草 2015 年 6 月采自四川省成都市温江区郊区,经四川农业大学药学院副教授范巧佳鉴定为白车轴草(*Trifolium repens* L.)。

收稿日期:2016-12-07 接受日期:2017-03-20

基金项目:四川省科技富民强县专项(00221501)

* 通信作者 Tel: 86-28-86290111; E-mail: fanqj@live.cn; liangxiaoxia@sicau.edu.cn

1.2 培养基

PDA 基础培养基的配制:马铃薯 200 g 去皮切成小块,用沸水煮 30 min,四层纱布过滤。收集滤液,加葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水补足 1000 mL,即可。

白车轴草培养基的配制:采集白车轴草地上部分,去除杂质。120 °C,30 min 杀青,在电热烘箱中 50 °C 烘至恒重;称取不同用量的干白车轴草,蒸馏水 1000 mL,煮沸,过滤,取滤液加蒸馏水补足 1000 mL,加入无水葡萄糖,琼脂粉 20 g,即可。

1.3 菌种的活化

将在保存于 4 °C 冰箱中的蜜环菌转接于 90 mm 的 PDA 培养皿中,25 °C 培养 30 d,活化两次,备用。

1.4 白车轴草培养基单因素筛选

白车轴草用量的筛选:分别使用 20、40、60、80、

100、120 g/L 干白车轴草,煮沸 30 min,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L,121 °C 高压灭菌。按常规蜜环菌的接种、培养。并观察、测定对蜜环菌生长的影响。

煮沸时间的筛选:使用等量的白车轴草,分别煮沸 10、20、30、40、50 min,葡萄糖 20 g/L。按常规蜜环菌的接种、培养。并观察、测定对蜜环菌生长的影响。

葡萄糖用量的筛选:使用等量的白车轴草,煮沸 30 min,分别添加 0、20、40、60、80 g/L 的无水葡萄糖。按常规蜜环菌的接种、培养。并观察、测定对蜜环菌生长的影响。

1.5 白车轴草培养基正交试验设计

通过单因素试验测定对蜜环菌生长状况的对比,确定出菌丝生长状况优良的因素水平,采用 $L_9(3^3)$ 进行正交试验,如表 1 所示。

表 1 $L_9(3^3)$ 正交试验表

Table 1 Design of $L_9(3^3)$ orthogonal test

水平 levels	因素 Factor		
	白车轴草用量 <i>T. repens</i> levels (g/L)	煮沸时间 Boiling time (min)	葡萄糖 Glucose levels (g/L)
1	60	20	0
2	80	30	20
3	100	40	40

1.6 蜜环菌菌索的测量和干物质量的测定

菌索长度的测量:在培养基上预先确定两个垂直方向,从有菌索生长开始,每天相同时间用游标卡尺测量菌索从接种处到形态学尖端的长度,并作好记录。

干物质量的测定:培养 20 d 后,将培养基中的蜜环菌菌索取出,用温水轻柔冲洗掉菌索上附着的 PDA,清洗干净后置于 50 °C 恒温鼓风干燥箱中烘至恒重,在电子天秤上称量干物质的重量,并作好记录。

1.7 对比试验

使用正交所得最佳配方,配制三叶草培养基。

表 2 不同白车轴草含量培养基中蜜环菌生长状况

Table 2 Growth status of Rhizomorph of *A. melle* with different *T. repens* content

配方编号 No.	白车轴草 <i>T. repens</i>	10 d 长度 Length of 10 d (cm)	20 d 干重 Dry weight of 20 d
1	120	2.734 ± 0.5328 ^{Aa}	0.2783 ± 0.0834 ^{Aa}
2	100	2.836 ± 0.7153 ^{Aa}	0.2933 ± 0.0528 ^{Aa}
3	80	2.588 ± 0.6271 ^{Aa}	0.2223 ± 0.0443 ^{Bb}
4	60	2.829 ± 0.4748 ^{Aa}	0.1776 ± 0.0184 ^{BCc}

同时在新培养基和普通 PDA 培养基中接种蜜环菌并培养,观察并记录生长状况,绘制生长曲线。

1.8 数据分析

数据处理应用 SPSS 22.0,使用 OriginPro 8.0 作图,所有试验 $n = 5$ 。

2 结果与分析

2.1 不同白车轴草用量对蜜环菌生长的影响

使用不同白车轴草用量制作的培养基,培养蜜环菌并记录生长数据。其对蜜环菌菌索在 10 d 时生长长度、20 d 时的干物质积累影响,见表 2。

配方编号 No.	白车轴草 <i>T. repens</i>	10 d 长度 Length of 10 d (cm)	20 d 干重 Dry weight of 20 d
5	40	2.567 ± 0.5086 ^{Aa}	0.1490 ± 0.0106 ^{Ced}
6	20	1.228 ± 0.5708 ^{Bb}	0.1219 ± 0.0153 ^{Cd}
PDA	-	1.929 ± 0.6702 ^{Cc}	0.1522 ± 0.0177 ^{Ced}

* Comparison between groups, abcd $\alpha \leq 0.05$; ABCD $\alpha \leq 0.01$.

由表2中可以看出,10 d后菌索的长度的数据,当白车轴草含量大于40 g时,蜜环菌菌索长度与在普通PDA培养基上相比,有极显著优势($P < 0.01$),且最高达到了2.836 cm;白车轴草含量在40 g时,20 d后所得蜜环菌的干物质量与在PDA上的无显著,但随着白车轴草含量的增加,最后所得蜜环菌干物质量有明显的提高,含量达到100 g/L时所得干物质量最大,含量达120 g/L时,反而有所下

降,且与其他配方相比有极显著优势($P < 0.01$)。实验得出,白车轴草浓度较适宜用量的为100 g/L > 120 g/L > 80 g/L。

2.2 不同白车轴草煮沸时间对蜜环菌生长的影响

使用白车轴草不同煮沸时间下制作出的培养基,培养蜜环菌并记录生长数据。其对蜜环菌菌索在10 d时生长长度、20 d时的干物质积累的影响,见表3。

表3 白车轴草不同煮沸时间下培养基中蜜环菌生长状况

Table 3 Growth status of Rhizomorph of *A. melle* with different boiling times

配方编号 No.	煮沸时间 Boiling time (min)	10 d 长度 Length of 10 d (cm)	20 d 干重 Dry weight of 20 d
1	50	2.787 ± 0.4293 ^{Aa}	0.1477 ± 0.0252 ^{ABb}
2	40	2.821 ± 0.6764 ^{Aa}	0.1717 ± 0.0139 ^{Aab}
3	30	2.829 ± 0.4748 ^{Aa}	0.1776 ± 0.0184 ^{Aa}
4	20	2.760 ± 0.6921 ^{Aa}	0.1368 ± 0.0147 ^{Bb}
5	10	2.526 ± 0.3152 ^{Aa}	0.1303 ± 0.0084 ^{Bb}
PDA	-	1.929 ± 0.6702 ^{Bb}	0.1522 ± 0.0177 ^{ABb}

* Comparison between groups, abcd $\alpha \leq 0.05$; ABCD $\alpha \leq 0.01$.

由表3可知,改变配方中的白车轴草煎煮时间对蜜环菌菌索生长的影响不明显,但是与在PDA培养基上所得的结果相比均有极显著优势($P < 0.01$);当煮沸时间为30 min的时候,所得干物质量最大,且与普通PDA相比差异显著($P < 0.05$),但与40 min组相比差异不明显,与50 min组有显著差异($P < 0.05$),与20 min组有极显著差异($P < 0.01$)。可能是由于煮沸加热时间过短,白车轴草

中的营养成分无法充分煎出,加热时间过长又会使得其中营养成分被破坏。故制作此种培养基时较适宜的煮沸时间为30 min > 40 min > 20 min。

2.3 不同葡萄糖添加量对蜜环菌生长的影响

白车轴草培养基中不同的葡萄糖添加量,对蜜环菌菌索在10 d时生长长度、20 d时的干物质积累影响,见表4。

表4 不同葡萄糖含量培养基中蜜环菌生长状况

Table 4 Growth status of Rhizomorph of *A. melle* with different glucose content

配方编号 No.	葡萄糖含量 Glucose levels	10 d 长度 Length of 10 d (cm)	20 d 干重 Dry weight of 20 d
1	80	-	-
2	60	1.081 ± 0.4354 ^{dC}	0.0810 ± 0.0195 ^{dC}
3	40	1.521 ± 0.4069 ^{Cc}	0.1202 ± 0.0266 ^{Bc}
4	20	2.829 ± 0.4748 ^{Aa}	0.1776 ± 0.0184 ^{Aa}
5	0	2.057 ± 0.5028 ^{Bb}	0.0596 ± 0.0098 ^{Cd}
PDA	-	1.929 ± 0.6702 ^{BbC}	0.1522 ± 0.0177 ^{Ab}

* Comparison between groups, abcd $\alpha \leq 0.05$; ABCD $\alpha \leq 0.01$.

由表 4 可知改变配方中的葡萄糖含量对蜜环菌菌索生长影响明显,葡萄糖含量为 20 g/L 时,生长速度最快,与 PDA 培养基相比有极显著优势($P < 0.01$),实验组之间也有显著差异。同时当葡萄糖含量为 20 g/L 时,最后所得干物质量最大,与 PDA 培养基相比有显著优势($P < 0.05$)。综上可得葡萄糖含量为 20 g/L 时蜜环菌长势最旺盛,所得干物质量最重,当葡萄糖含量大于 20 g/L 时,增加葡萄糖含量蜜环菌的长势及生物量有明显的下降,葡萄糖含量增加到 80 g/L 后,蜜环菌不再生长;葡萄糖含量为 0 g/L 时,长势一般且所得干物质量很少。由

此可得,葡萄糖为培养基中所必须的碳源,但葡萄糖的含量过高反而会使蜜环菌长势变慢。因此,培养基中较适宜的葡萄糖浓度为 20 g/L > 0 g/L > 40 g/L。

2.4 正交试验结果

根据单因素筛选的结果,对 1000 mL 培养基白车轴草用量(A)、煮沸时间(B)、葡萄糖的量(C)三个因素进行正交试验考察。以菌索所需长满培养皿的时间为指标,按 $L_9(3^3)$ 正交表(表 1)分别进行制作培养基,试验设计及结果见表 5。不考虑交互作用,进行方差分析,结果见表 6。

表 5 $L_9(3^3)$ 正交试验设计与结果

Table 5 Design and results of $L_9(3^3)$ orthogonal test

实验号 No.	因素 Factor			菌索长满时间 Time of rhizomorph growing full(d)
	A	B	C	
1	1	1	1	26.2 ± 7.2
2	1	2	3	20.9 ± 4.8
3	1	3	2	19.6 ± 4.3
4	2	1	3	27.2 ± 9.3
5	2	2	2	12.7 ± 1.7
6	2	3	1	18.2 ± 1.5
7	3	1	2	9.7 ± 0.4
8	3	2	1	11.8 ± 1.2
9	3	3	3	17.0 ± 2.5
K_1	66.7	63.1	56.2	
K_2	58.1	45.4	42	
K_3	38.5	54.8	65.1	
R	28.2	17.7	23.1	

表 6 正交实验方差分析表

Table 6 Analysis of variance for intracellular polysaccharide yield

因素 Factor	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 df	MS	F 临界值 Critical value of F	显著性 Significance
A	529.377	2	264.689	6.47	0.005
B	150.142	2	75.071	1.835	0.178
C	320.474	2	160.237	3.917	0.031
误差 Error	1186.399	29	40.91		
总变异 Total variance	14205.86	36			

由极差的大小可知,各因素作用的影响程度依次为 A(28.2) $>$ C(23.1) $>$ B(17.7),在方差分析中同样满足 A(264.689) $>$ C(160.237) $>$ B

(75.071)。即表明对蜜环菌生长的影响顺序为白车轴草 $>$ 葡萄糖 $>$ 煮沸时间。根据每个单因素的 K 值大小比较确定最优组合为 $A_3B_2C_2$,即:白车轴草

用量 100 g、煮沸时间 30 min、葡萄糖浓度 20 g/L。

2.5 对比试验结果

按照 $A_3B_2C_2$ 的试验组合,配制新培养基,同时

与 PDA 培养基作为对照,按照常规方法灭菌、接种蜜环菌、培养 20 d,并从菌丝出现开始每天记录其长度。

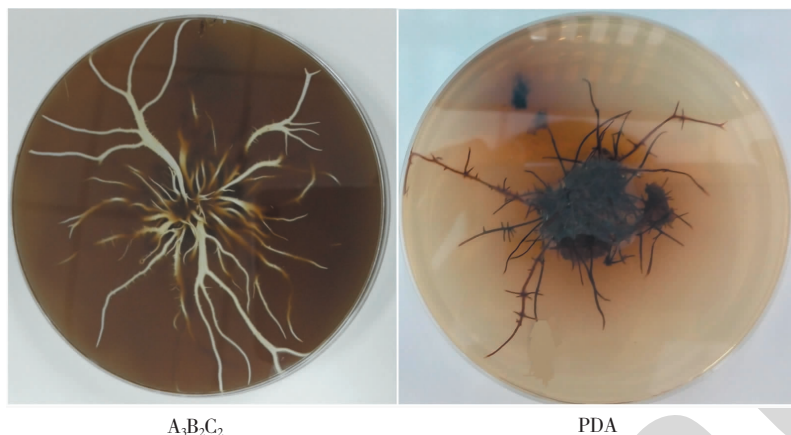


图 1 两种培养基培养 10 d 后蜜环菌形态

Fig. 1 Growth status of *A. mellea* on different medias

从图 1 中可以看出,在新培养基中所培养的蜜环菌,不管是长势还是数量上都远远优于 PDA 培养基中生长的。以时间为横坐标,菌丝长度为纵坐标作生长曲线图,见图 2。收集生长 20 d 时不同培养基中所得蜜环菌,干燥,称重,结果见图 3。

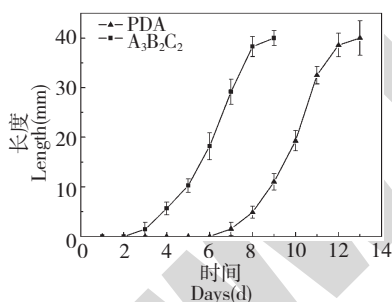


图 2 两种培养基中蜜环菌生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *A. mellea* on different media

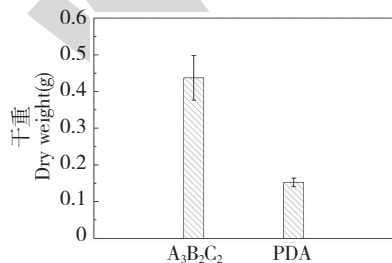


图 3 不同培养基中培养 20 d 蜜环菌干重

Fig. 3 20 d dry weight of *A. mellea* on different media

如图 2 所示,蜜环菌在 $A_3B_2C_2$ 培养基中的萌发时间为 2 d,远远短于在 PDA 培养基中的 6 d。同时

如图 3 所示,在相同时间内,即 20 d 时,蜜环菌干物质的累计量 $A_3B_2C_2$ 为 0.4371 g 远大于 PDA 中的 0.1522 g,其长满培养皿时间仅为 9 d。

3 讨论与结论

实验表明,以白车轴草用量 100 g、葡萄糖浓度 20 g/L、煮沸时间 30 min 配制的培养基为最佳组合,培养效果显著优于传统 PDA 培养基。白车轴草是一种世界上分布最广的豆科牧草,为多年生草本植物,抗逆性强^[10,11],一年可多次刈割,栽种容易^[12]。白车轴草在 115 °C 杀青,50 °C 恒温烘干后,可长期在常温下保存。白车轴草富含维生素、蛋白质以及微量元素等,正好提供蜜环菌生长所需的物质。但由于白车草中还含有一定量的无机盐,当浓度过高时,会导致培养基中无机盐浓度过高,反而不利于蜜环菌的生长。

PDA 培养基中的蜜环菌菌索老化为深褐色,而在白车轴草培养基中蜜环菌菌索呈浅白色,充满生长活力。分析认为是由于白车轴草含有大量黄酮类化合物、多糖等多种活性成分^[13],具有很强的抗氧化活性,能够有效的抑制蜜环菌菌索的氧化衰老。白车轴草还具有一定的抑制细菌生长的作用,能够在一定程度上促进蜜环菌生长。

资料表明^[9],现对蜜环菌的培养基条件优化,大部分是在基础 PDA 培养基中添加大豆粉、玉米粉等氮源和无机盐。与之相比,使用白车轴草取代马

铃薯,并添加一定量的葡萄糖制作简便,成本低、效果好,值得推广。

本研究结果表明,白车轴草培养基中蜜环菌萌发仅需 2 d,远低于于 PDA 中的 6 d,干物质积累能够达到 0.0216 g/d,约为 PDA 培养基中的 2.8 倍,蜜环菌的生产效率大大得到提高,同时在白车轴草培养基中培养的蜜环菌更具有生产活力。具有较大的生产使用价值和市场推广潜力。

参考文献

- 1 Dai FL(戴芳澜). Sylloge Fungorum Sinicorum(中国真菌总汇). Beijing: Science Press, 1979. 1-1527
- 2 Zhao J(赵俊), Zhao J(赵杰). *Armillaria* species indigenous to China and their application to *Gastrodia elata* cultivation. *Acta Edulis Fungi*(食用菌学报), 2007, 14(1): 67-72.
- 3 Hu ZG(胡昭庚). Rare Edible Fungus Cultivation(名贵食用菌栽培). Shanghai: Shanghai science and Technology Publishing House, 2001. 1-203
- 4 Xu JT(徐锦堂), Mu C(牟春). The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi. *Chin Bull Botany*(植物学报), 1990, 32(1): 26-31
- 5 Zhou XB(周西贝). The optimum conditions for growth of and biological properties of *Armillaria mellea*. Taiyuan: Shanxi Agricultural University(山西农业大学), MSc. 2013.

- 6 Zhang L(张莉). Different types of clover part nutrition ingredient content determination and comparison. *Mod Agric Sci Technol*(现代农业科技), 2014, 14: 238-239.
- 7 Peng SM(彭述敏), Chen YH(陈玉惠), Lei R(雷然), et al. Optimization of medium for Rhizomorph of *Armillaria mellea* based on response surface methodology. *J Southwest Univ, Nat Sci*(西南大学学报, 自科版), 2011, 33: 68-73.
- 8 Zhang XY(张小燕), Yang BN(杨炳南), Liu W(刘威), et al. Analysis of main nutrients in potatoes by near infrared spectroscopy. *Food Sci*(食品科学), 2013, 34: 165-169.
- 9 Xiong Y(熊鹰), Jiang L(姜邻), Tang LM(唐利民). Screening tests of *Armillaria mellea* mother strain of medium. *Edible Fungi China*(中国食用菌), 2003, 23(5): 25-26.
- 10 Feng SH(冯淑华). Study on responses and adaptability of clovers under drought stress. Harbin: Northeast Agricultural University(东北农业大学), MSc. 2012.
- 11 Fan YZ(范玉贞). A study on physiological characters of *Trifolium repens* Linn in the condition of cold stress. *J Cangzhou Teachers Coll*(沧州师范专科学校学报), 2009, 25(3): 94-95.
- 12 Liu LL(刘丽霞). Cultivation techniques of *Trifolium repens* L. *Anhui Agric Sci Bull*(安徽农学通报), 2011, 17: 206-207.
- 13 Wang YX(王亚茜), Chen NN(陈楠楠), Lin JJ(林晶晶), et al. The new research of *Trifolium*. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2016, 37: 197-201.

(上接第 866 页)

- 9 Tsai MK, Lin YL, Huang YT. Effects of salvianolic acids on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 242: 155-164.
- 10 Kan SD, Chen ZZ, Shao L, et al. Transformation of salvianolic acid B to salvianolic acid A in aqueous solution and the *in vitro* liver protective effect of the main products. *J Food Sci*, 2014, 79: C499-C504.
- 11 Oh KS, Oh BK, Mun J, et al. Salvianolic acid A suppress lipopolysaccharide-induced NF-kappa B signaling pathway by targeting IKK β . *Int immunopharmacol*, 2011, 11: 1901-1906.
- 12 Xia HR, Sun LR, Lou HX, et al. Conversion of salvianolic acid B into salvianolic acid A in tissues of radix *Salviae miltiorrhize* using high temperature, high pressure, and high hu-

midity. *Phytomedicine*, 2014, 21: 906-911.

- 13 Fu CY(傅春燕), Liu YH(刘永辉), Chen DW(陈代武), et al. Study on extraction and purification techniques and free radical scavenging activity of total flavonoids from *Fissistigma oldhamii*. *Chin Med Mat*(中药材), 2011, 34: 446-449.
- 14 Xu YF(徐运飞), Liu Q(刘琴), Song K(宋坤), et al. Optimization of extraction of polysaccharide from *Sphallerocarpus gracilis* using response surface methodology and study on its antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27: 2116-2123.
- 15 Wu XD(吴小东), Wang HL(王红蕾), Qi W(齐崑), et al. Separation and purification of salvianolic acids by macroporous resin. *Ion Exchange Adsorpt*(离子交换与吸附), 2009, 25: 241-252.