

猪苓菌丝菌核的显微结构及其多糖含量研究

李萍^a, 梁宗锁^{a,b}, 陈德育^a, 张跃进^a, 邱鹏程^a

(西北农林科技大学 a 生命科学学院; b 陕西省中药指纹图谱与天然产物研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了选择猪苓的最佳菌株及其采收的最佳发育阶段, 研究了猪苓 3 个菌株菌丝体的形态结构、多糖含量, 并对不同发育阶段菌核的显微结构和多糖累积进行了研究。结果表明, 猪苓 3 个菌株在孢子形态和数量、菌索形成和草酸钙方晶上存在明显差异; 菌株 X2 的菌丝生长快、长势旺, 菌丝体浓密洁白, 易形成菌索, 菌丝体及发酵液的多糖含量最高, 分别为 30.4 mg/g 和 0.111 mg/mL, 菌丝体生长速度最快, 为 0.245 8 cm/d; 人工白苓与野生白苓在形态和显微结构上相似; 野生黑苓菌核的多糖含量最高, 达 56.41 mg/g, 人工白苓最低, 为 15.95 mg/g。说明在 3 个菌株中, X2 合成猪苓多糖的能力较强, 药用价值高, 质量最优; 3 种不同发育阶段的菌核中, 野生黑苓的质量最优。

[关键词] 猪苓; 显微结构; 猪苓多糖

[中图分类号] S646.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0218-05

Studies on microstructure and polysaccharides content of hyphae and sclerotia of *Grifola umbellata*

LI Ping^a, LIANG Zong-suo^{a,b}, CHEN De-yu^a, ZHANG Yue-jin^a, QIU Peng-cheng^a

(a College of Life Sciences, b Shaanxi Research Center in TCM Fingerprint & NP Library, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Morphology and polysaccharides content of hyphae of 3 different *Grifola umbellata* strains and microstructure and polysaccharides sclerotia of *Grifola umbellata* in various developmental stages were studied. The study showed that hyphae of 3 strains were apparently different in morphology and amount of asexual spores, formation of rhizomorph and calcim oxalate crystal; the hyphae of X2 strain was the best in growth speed, which grew prosperously and thickly, and content of intracellular polysaccharides and extracellular polysaccharides of X2 strain were both the highest, being 30.4 mg/g and 0.111 mg/mL; sclerotia derived from hyphae and sclerotia obtained in the field were similar in morphology and microstructure; in polysaccharides content, wild black sclerotia was the highest, being 56.41 mg/g, while artificial white sclerotia derived from hyphae was the lowest, being 15.95 mg/g. It could be concluded X2 strain was the best one in 3 different *Grifola umbellata* strains, and black sclerotia was the highest one in quality.

Key words: *Grifola umbellata*; microstructure; polysaccharides of *Grifola umbellata*

猪苓 [*Grifola umbellata* (Pers.) Pilat] 是一种药用真菌, 又名猪屎苓、野猪苓等。在分类学上, 猪

苓隶属于真菌门 (Eumycota)、担子菌亚门 (Basidiomycotina)、层菌纲 (Hymenomycetes)、非褶菌目

收稿日期: 2006-09-26

基金项目: 陕西省陕南中药产业发展基金项目 (2005-2); 陕西汉王略阳中药科技有限公司科研基金项目

作者简介: 李萍 (1982-), 女, 黑龙江林口人, 在读硕士, 主要从事中药材规范化生产理论与技术研究。
E-mail: sleep1022@163.com

通讯作者: 梁宗锁 (1965-), 男, 陕西扶风人, 研究员, 博士, 主要从事植物水分生理和中药材规范化生产理论与技术研究。
E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

(Aphyllphorales)、多孔菌科(Polyporaceae)^[11]。猪苓的药用价值在我国古代早有应用和记载,中医临床上常用于治疗急性肾炎、淋病、糖尿病、全身浮肿、小便不畅、急性胃炎等疾病。

猪苓的有效成分为猪苓多糖,猪苓多糖含量是控制猪苓药材质量的一个重要指标^[2]。目前,对猪苓的研究大多集中在猪苓的培养条件、培养基筛选和猪苓实用栽培技术等方面,而对猪苓的许多生物学特性尚不清楚。为此,本试验研究了猪苓3个菌株菌丝体的形态结构、多糖含量,并对不同发育阶段菌核的显微结构和多糖累积进行了研究,以期进一步了解猪苓的生长发育特性和多糖积累规律。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株 野生鲜猪苓采自太白山阴坡、阳坡,以及陕西略阳猪苓种植厂,分离获得 X1、X2 和 X3 共 3 个菌株。

1.1.2 菌 核 猪苓菌核在不同发育阶段时,其形态有较大差别,从母体菌核上萌发产生的新猪苓颜色洁白,称为白苓;生长的当年由于气候条件的变化白苓很快变为灰色或次年完全变为灰褐色,称为灰苓;再经 1 个冬季完全变成黑色,称为黑苓。试验中人工白苓为实验室内人工培养出菌株 X1 的白苓;野生的白苓、灰苓和黑苓均采自陕西略阳猪苓种植厂,即菌株 X3 的野生菌核。

1.2 方 法

1.2.1 菌株培养 采用菌核内部组织分离法。

(1) 固体培养基培养。选用 PDA 固体培养基,自然 pH,24 ℃、黑暗条件下培养。

(2) 液体培养。选用 PDA 液体培养基,自然 pH,24 ℃、120 r/min,黑暗条件下培养^[3-4]。

1.2.2 菌株菌丝生长速度测定 选择生长良好的菌株 X1、X2 和 X3 的平板培养菌丝体,用 1 cm 打孔器转接,转接后固体培养,培养过程中每 3 d 测量 1 次菌落直径,计算菌丝生长速度。

1.2.3 菌丝体显微观察 选择生长良好菌株 X1、X2 和 X3 的平板培养菌丝体,采用水浸片法^[5]观察菌丝及孢子形态,用乳酸石炭酸棉兰液染色,在光学显微镜下观察并拍照。

1.2.4 菌核显微观察 取新鲜、生长良好的人工白苓、野生白苓、灰苓和黑苓,分别将 4 种菌核切成边长约 5 mm 的立方小块,FAA 固定,常规方法石蜡切片^[6],片厚 7 μm,番红-固绿染色,光学显微镜下

观察并拍照。

1.2.5 猪苓多糖含量的测定^[7-9] 采用苯酚-硫酸法。

(1) 回归方程的建立。精确称取无水葡萄糖(105 ℃干燥 4 h 至恒重) 25 mg,置 500 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精确吸取上述溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于具塞刻度比色管中,加蒸馏水至 1 mL,然后加体积分数 5% 苯酚溶液 1 mL,硫酸 5 mL,混匀,置沸水浴中加热 15 min,取出置冰浴中冷却 30 min,在 490 nm 波长处分别测定其吸光度(A 值)。

(2) 菌核多糖含量的测定。分别洗净人工白苓、野生白苓、灰苓和黑苓,于 60 ℃烘干至恒重,粉碎机粉碎。精确称取干燥的猪苓粉末 0.2 g,加体积分数 80% 乙醇 100 mL,置水浴中回流 1 h,3 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,加蒸馏水 80 mL,90 ℃水浴中加热回流 2 h,提取 2 次,3 000 r/min 离心 10 min,残渣及烧瓶用热水洗涤 3 次,合并滤液与洗液,浓缩后,转移至 100 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀。精确量取 1 mL 至试管中,加体积分数 5% 苯酚溶液 1 mL,硫酸 5 mL,混匀,置沸水浴中加热 15 min,取出置冰浴中冷却 30 min,在 490 nm 波长处分别测定其吸光度(A 值)。

(3) 菌丝体多糖含量的测定。分别真空抽滤液体摇瓶中培养的猪苓菌株 X1 和 X2 发酵液(滤液备用),所得菌丝体用蒸馏水冲洗 3 次,冲去菌丝体上的培养基,置于放有滤纸的培养皿上自然干燥去除大量水分,然后 60 ℃烘干至恒重,研磨至粉末状。称取粉末 0.2 g,其余步骤同 1.2.5(2)。

(4) 发酵液多糖含量的测定。分别量取 1.2.5(3)中抽滤所得滤液 20 mL,置于三角瓶中,加入 80 mL 无水乙醇,混匀,其余步骤同 1.2.5(2)。

2 结果与分析

2.1 不同猪苓菌株菌丝体形态的比较

表 1 和图 1 表明,在猪苓 3 种菌株中,X1、X2 和 X3 的菌丝直径相同。X1 和 X2 菌株的菌丝形态、菌落生长状态、锁状联合、无性孢子数、草酸钙方晶数均基本相同。X1、X2 和 X3 菌株的孢子形态、菌索数和菌索形态均不相同。

X2 菌株的菌丝体生长快、长势旺,有锁状联合(图 2),菌丝体浓密洁白,且很容易形成菌索,是 3 种猪苓菌株中生命力最强的。

X3 菌株菌落不完整,菌丝生长十分缓慢,且很

很快就停止生长,形成大量的无性孢子和草酸钙方晶。索,该菌株菌丝体的生长能力较差,但是形成休眠体在 X3 菌株培养的菌丝体中未观察到锁状联合和菌无性孢子的能力强。

表 1 不同猪苓菌株菌丝体形态的比较

Table 1 Morphology comparison in hyphae of 3 different *Grifola umbellate* strains

菌株 Strains	菌丝直径/ μm Hyphae diameter	菌丝形态 Hyphae morphology	菌落生长状态 Colony growth	锁状联合 Clamp connection	无性孢子数 Asexual spores
X1	2~3	丝状,多级分枝 Filiform,multilevel branches	浓密、紧凑 Dense,compact	有 Exist	少 Less
X2	2~3	丝状,多级分枝 Filiform,multilevel branches	浓密、紧凑 Dense,compact	有 Exist	少 Less
X3	2~3	片段菌丝 Fragment hyphae	生长缓慢、蓬松 Slow growth,fluffy	无 Non-exist	多 More

菌株 Strains	孢子形态 Asexual spores morphology	孢子大小(长 $\times$ 宽)/ μm Dimensions of asexual spores (length $\times$ breadth)	草酸钙方晶数 Calcium oxalate	菌索数 Rhizomorph	菌索形态 Rhizomorph morphology
X1	介于短棒状与哑铃 状间 Between short rod-shaped and dumbbell-shaped	(10~12) $\times$ 2	少 Less	少 Less	细 Thin
X2	哑铃形 Dumbbell-shaped	(8~10) $\times$ 2	少 Less	多 More	粗 Thick
X3	短棒状 Short rod-shaped	(8~10) $\times$ 2	多 More	无 Non-exist	-

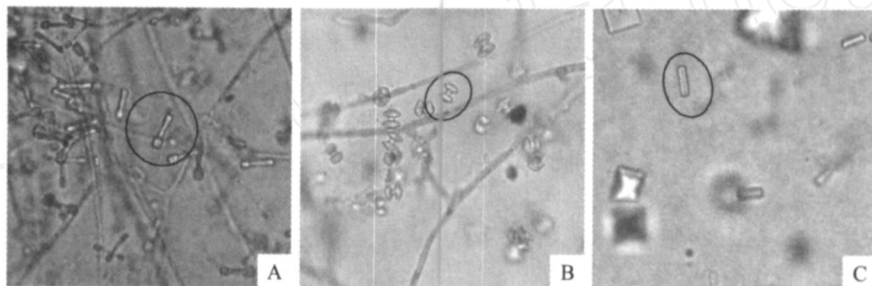


图 1 3 种不同猪苓菌株无性孢子的显微结构(×400)

Fig. 1 Asexual spores microstructure of 3 different *Grifola umbellate* strains (×400)

A. X1;B. X2;C. X3

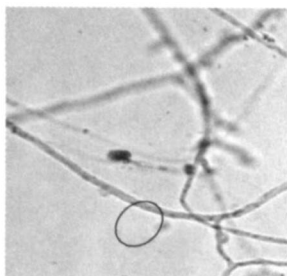


图 2 菌株 X2 的锁状联合(×400)

Fig. 2 Clamp connection of strain X2(×400)

2.2 不同猪苓菌株菌丝生长速度的比较

图 3 结果表明,随培养时间的延长,X1 和 X2 菌株的菌落半径迅速增加,但 X3 菌株的菌落半径增加缓慢。菌株 X2 的菌丝体生长速度最快,为 0.245 8 cm/d;X1 的生长速度次之,为 0.228 6 cm/d;X3 的生长速度最慢,为 0.034 3 cm/d。由此可知,在

PDA 培养基中,3 种猪苓菌株的菌丝体生长速度为: X2>X1>X3。菌丝体的生长,在营养供应等条件适宜的情况下没有明显的波动,大体上呈匀速生长。经观察可知,菌株 X1 和 X2 菌丝体的长势始终很旺,直至长满培养皿,但菌株 X3 在菌落直径生长至 3 cm 左右就几乎停止生长。

2.3 不同猪苓菌株菌丝体及发酵液多糖含量的比较

由于菌株 X3 的菌丝生长缓慢,且很快停止生长,所以在液体培养时,没有得到 X3 的菌丝体和发酵液,只对 X1 和 X2 进行比较。

经测定可知,菌株 X1 菌丝体的多糖含量为 27.4 mg/g,其发酵液多糖含量为 0.095 mg/mL;菌株 X2 菌丝体的多糖含量为 30.4 mg/g,其发酵液多糖含量为 0.111 mg/mL。

根据液体培养时每瓶抽滤所得菌丝体与发酵液

的量计算认为,菌丝体内含有的多糖总量高于发酵液,前者约为后者的 2~3 倍,即猪苓菌丝体产生胞内多糖的量是胞外多糖的 2~3 倍。X2 菌株菌丝体

和发酵液中的多糖含量均高于 X1,说明 X2 合成猪苓多糖的能力较强,药用价值高,质量较优。

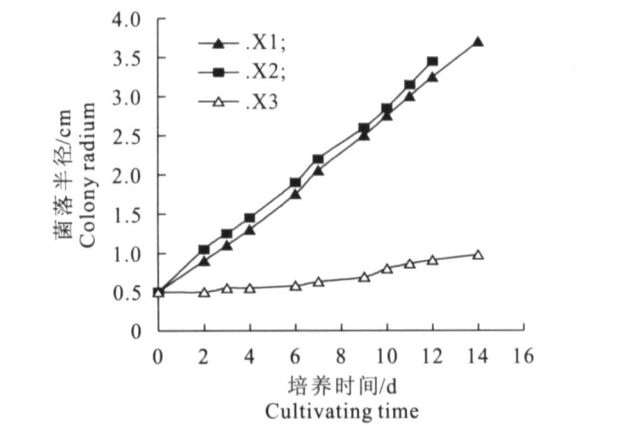


图 3 不同猪苓菌株菌丝生长速度的比较
Fig.3 Growth speed of hyphae in different *Grifola umbellate* strains

2.4 不同发育阶段猪苓菌株菌核多糖含量的比较
由图 4 可见,野生黑苓的多糖含量高达 56.41 mg/g,其次为野生白苓 26.14 mg/g 和野生灰苓 21.93 mg/g,人工白苓的多糖含量最低,为 15.95 mg/g。

从图 4 可以看出,随着菌龄的增加,菌核中多糖含量基本呈上升趋势。菌核多糖含量的高低顺序为野生黑苓>野生白苓>野生灰苓>人工白苓,其中野生黑苓菌核多糖含量约为野生白苓和灰苓的 2 倍,为人工白苓的 3~4 倍。由此可知,野生黑苓是猪苓菌核入药的最佳发育阶段,应选择野生黑苓作为商品苓。野生灰苓多糖含量较白苓低,这可能与蜜环菌的侵入有关,需进一步研究。人工白苓的多

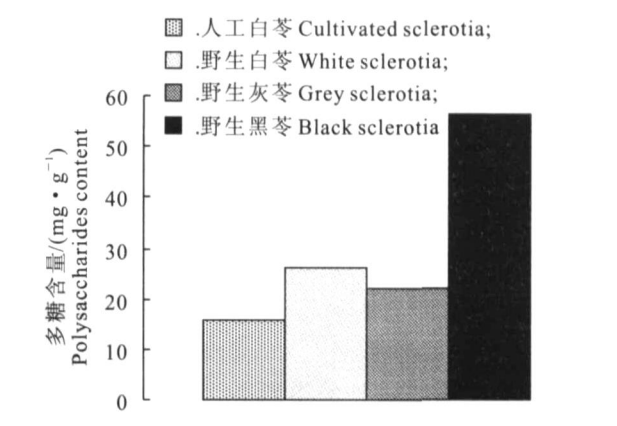


图 4 不同发育阶段猪苓菌株菌核多糖含量的比较
Fig.4 Polysaccharides content of sclerotia in various developmental stages

糖含量仅为野生白苓的 61%,这可能是因为自然界中环境和营养更适宜猪苓生长。

2.5 不同猪苓菌核显微结构的观察比较
由显微观察可知,野生白苓的内部结构幼嫩,菌丝分布均匀,排列较疏松,菌丝分化不明显,菌丝直径基本相同;未观察到有蜜环菌侵入点,菌核体内也未发现有包围蜜环菌的隔离腔;没有明显的表皮、表皮下层、疏松菌丝层的分化,表皮番红染色呈红色,紧贴表皮内侧有一层排列相对紧密的菌丝,但只是一薄层,厚度约为表皮的 1/2,这很可能就是正在分化的表皮下层(图 5A)。

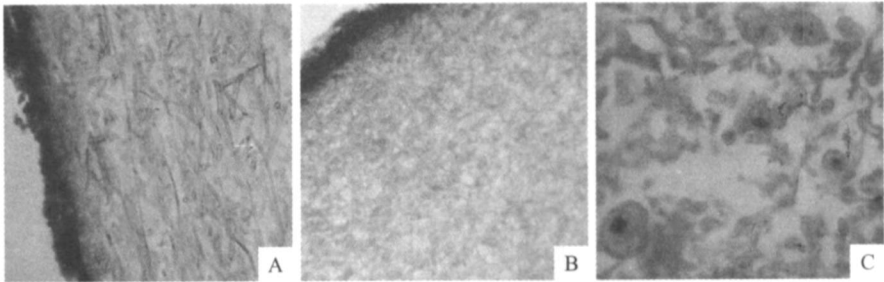


图 5 3 种不同猪苓菌核的显微结构 (×400)
A. 野生白苓;B. 野生灰苓;C. 野生黑苓
Fig.5 Microstructure of 3 different *Grifola umbellate* sclerotia (×400)
A. White sclerotia;B. Grey sclerotia;C. Black sclerotia

人工白苓与野生白苓的显微结构相似。
野生灰苓的结构中,菌丝分化程度高,可明显观察到粗菌丝和细菌丝两种菌丝,其直径分别为 5~6

μm 和 2 μm。已经有了明显的表皮、表皮下层、疏松菌丝层的分化,其表皮木质化程度高,番红染色呈红色;表皮下层菌丝排列十分紧密,厚度为表皮的 4~

5 倍,菌丝多为细菌丝,最细菌丝的直径约 $1\ \mu\text{m}$;疏松菌丝层中菌丝排列疏松,粗菌丝和细菌丝交错排列,但是两种菌丝并不是均匀分布,或者以细菌丝为主,或者以粗菌丝为主。从表皮开始,由外向内,粗菌丝所占比例越来越大,最粗菌丝的直径可达 $5\sim 7\ \mu\text{m}$ 。粗菌丝和细菌丝的这种有规律排布,可能与其在菌核生长发育中的分工不同有关。野生灰苓结构中,可观察到个别被染成粉红色的点,这可能是菌核中贮存的某种物质的颗粒或晶体。偶尔可看到蜜环菌侵入点,菌核体内可观察到隔离腔,但数量少、体积小(图 5B)。

野生黑苓菌核结构已经高度分化,可以观察到粗菌丝和细菌丝两种菌丝形态,其菌丝直径分别为 $5\sim 6\ \mu\text{m}$ 和 $2\ \mu\text{m}$,粗菌丝较少,出现很多圆形的结构。可观察到很多膨大的结构,仍然有一些很细的菌丝,但是粗菌丝大多数已经变形。有明显的表皮、表皮下层、疏松菌丝层的分化。可看到被蜜环菌侵入的侵入点及隔离腔,有的隔离腔已开始变空(图 5C)。

3 结论与讨论

(1) 本试验结果表明,3 种猪苓菌株 X1、X2 和 X3 的孢子形态存在明显差异。这可能是由于其在猪苓属中分属不同的种,也可能是猪苓的一种进化或变异所致。

(2) 3 种猪苓菌株 X1、X2 和 X3 中,X2 菌株的菌丝体生长快、长势旺、有锁状联合,菌丝体浓密纯白,且很容易形成菌索、多糖含量高,因此,X2 菌株可能是人工种植猪苓时比较理想的种苓。

(3) 菌丝体中多糖含量(X1 菌株 $27.4\ \text{mg/g}$,X2 菌株 $30.4\ \text{mg/g}$)高于野生白苓($26.14\ \text{mg/g}$)、灰苓($21.93\ \text{mg/g}$)。许广波等^[10]研究表明,猪苓菌丝体和猪苓菌核中提取多糖的主要组成成分均相同。因此,单从多糖这种药用成分来考虑,可以认为菌丝体的药用价值与菌核相当。在菌丝体和菌核的其他有效营养成分上,仍需进一步研究。若能通过发酵,短期内得到各种有效成分均合格的猪苓菌丝体,可以考虑用菌丝体入药来代替菌核,从而解决菌核生长周期长的问题。

(4) 对菌丝体及菌核显微结构观察发现,培养基上未形成菌核的菌丝与菌核中的菌丝直径存在差

异。培养基中只有一种菌丝,直径约为 $2\sim 3\ \mu\text{m}$;菌核中存在粗菌丝和细菌丝,直径分别为 $5\sim 6\ \mu\text{m}$ 和 $2\ \mu\text{m}$ 。培养基中菌丝多糖含量明显低于野生黑苓。因此,在由培养基上纯培养的菌丝分化为膨大菌丝,再由此形成具有高度组织分化的猪苓菌核的过程中,菌丝不仅在形态结构上发生了变化^[11],同时有效成分的积累也在递增。

(5) 野生黑苓多糖含量远高于其他发育阶段的菌核,这一方面与随生长年限的延长,多糖积累的越多有关,另一方面可能与蜜环菌的侵染有关。郭顺星等^[12]曾指出,蜜环菌侵染的猪苓菌核部位糖类成分含量高于其他部分,蜜环菌的侵染不但促进了猪苓菌核的繁殖和生长,而且对猪苓菌核糖类成分含量的提高也有显著作用。

【参考文献】

- [1] 徐锦堂. 中国药用真菌学[M]. 北京:中国医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1997:518-534.
- [2] 罗英,李梁. 猪苓生长的土壤条件研究[J]. 核农学报,2002,16(2):115-118.
- [3] 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.
- [4] 顾芳红,殷红,马劲. 碳、氮源对猪苓菌丝生长与胞外多糖含量的影响[J]. 西北大学学报:自然科学版,2001,31(5):437-440.
- [5] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000:38.
- [6] 慕小倩. 植物显微技术实验指导[G]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2003:8-9.
- [7] 苏德龙,史红波,裴福成,等. 正交试验法研究猪苓多糖提取工艺[J]. 基层中药杂志,2002,15(1):27-28.
- [8] 李菲. 分光光度法测定黄金睡福中黄精多糖的含量[J]. 中华医学写作杂志,2005,12(11):935-936.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2005 版. 北京:化学工业出版社,2005:215.
- [10] 许广波,李太元,李艳茹,等. 液体浅层培养对猪苓菌丝体生长及其多糖含量的影响[J]. 吉林农业大学学报,2004,26(3):287-290.
- [11] Wang Q Y, Guo S X, Fan J Y. Characterization of sclerotial formation from hyphae of *Grifola umbellata* [J]. Acta Botanica Sinica,2004,46(3):328-331.
- [12] 郭顺星,曹文琴,王秋颖,等. 与蜜环菌共生过程中猪苓菌核不同部位糖类成分的含量研究[J]. 中国药理学杂志,2002,37(7):493-495.