



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106416744 B

(45)授权公告日 2020.04.10

(21)申请号 201610155997.7

(22)申请日 2016.03.18

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106416744 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(83)生物保藏信息  
CGMCC No.11902 2016.01.18

(73)专利权人 中国科学院昆明植物研究所  
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(72)发明人 郭婷 杨祝良

(74)专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务  
所(普通合伙) 53108  
代理人 马晓青

(51)Int.Cl.

A01G 18/00(2018.01)

(56)对比文件

CN 101999295 A,2011.04.06,说明书第17-24段.

CN 105255747 A,2016.01.20,全文.

CN 104805023 A,2015.07.29,全文.

CN 104611237 A,2015.05.13,全文.

王岚等.中国西南的蜜环菌属真菌.《中国食用菌》.2003,第22卷(第5期),第4-6页.

王岚等.中国西南的蜜环菌属真菌.《中国食用菌》.2003,第22卷(第5期),第4-6页.

审查员 张晶

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种天麻共生蜜环菌菌种及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种天麻共生蜜环菌菌株及其制备方法。该菌株的分类学名称为Armillaria cepistipes Velen.,保藏登记号为CGMCC No.11902。本发明方法包括菌种的选择、分离纯化、鉴定和培养。使用本发明,一是降低了因选育菌种不当造成天麻产量低或零产出的“空塘”现象的风险;二是该菌种和乌天麻具有较好的亲和力,能保证主产乌天麻地区大规模人工栽培条件下乌天麻的原有品质。

1. 一种蜜环菌菌株在天麻栽培中的应用,其特征在于所述的应用是先制备蜜环菌试管菌种,再进行菌种扩繁,然后将三级树枝菌种伴栽天麻,所述的制备试管菌种包括:

1) 野外选择蜜环菌源:采集昭通乌天麻产区不同地区的蜜环菌源材料作为引菌,与直径50-80mm阔叶树枝拌合并植入林下塘穴作为菌材,在次年7-8月再将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒在塘穴内的菌材上,覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育,16-24个月后,选择塘穴内天麻生长数量多、形状好的菌源材料培养菌索;

2) 菌索分离、纯化:在培养好的菌材上挑选色浅健壮的菌索数段置于培养皿内,按无菌操作规程接种到PDA试管斜面培养基上,把接种好的试管贴上标签作好记录,放入25℃恒温箱,在相对湿度60%~80%的条件下培养7-10天,再选择长入培养基内的幼嫩菌索进行纯化,直至筛选得到菌索生长形态高度一致的,即试管种母种;

3) 所述的菌种扩繁是:按照麦麸或米糠20%,葡萄糖2%,琼脂2%的比例加水配制成500ml瓶装固体培养基,自然pH值,遵循无菌操作过程,将试管种转接到灭过菌的固体培养基上,放入室温25℃,湿度70%-80%的暗室培养25天,即可长成为二级菌种;三级种配制为:基料1为阔叶树木屑78%、米糠或麦麸20%、石膏10%、蔗糖1%;基料2为浸泡24-48小时的长度2-3cm、径粗1-2cm的阔叶树鲜枝节;基料1:基料2为1:2,总基料和水比例为1:1.5,将配好的基料装入750ml的菌种瓶中至瓶肩处,经加盖灭菌后,无菌操作接入二级菌种,把接种后的瓶子放进室温22℃-25℃,相对湿度70%-80%的暗室培养50-60天,得到三级树枝菌种,三级树枝菌种直接用于云贵川地区的乌天麻伴栽使用;

所述试管种为*Armillaria cepistipes*Velen.,保藏登记号为:CGMCC No.11902。

2. 如权利要求1所述的一种蜜环菌菌株在天麻栽培中的应用,其特征在于所述*Armillaria cepistipes*Velen.菌株的培养特征是在通用PDA培养基上菌丝较少,为白色,基内菌索为白色至浅黄色,气生菌索为黄褐色至红褐色;菌索为单轴分枝,生长快,吐水较晚,培养基颜色少变或不变。

## 一种天麻共生蜜环菌菌种及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地,涉及一种天麻共生蜜环菌及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 蜜环菌属真菌 (*Armillaria*) 俗名榛蘑、苞谷菌,隶属于真菌界、担子菌亚门 (*Basidiomycotina*)、伞菌纲 (*Hymenomyces*)、伞菌目 (*Agaricales*)、膨瑚菌科 (*Physalacriaceae*)。该属真菌在世界约有40种,在中国分布也较为广泛,华中、西南地区和东北地区均有分布。蜜环菌是名贵中药天麻 (*Gastrodia elata* Bl.) 重要的共生菌,天麻95%的生长期间均需要蜜环菌以根状菌索的形式提供营养物质。有研究表明用不同来源的蜜环菌伴栽天麻,天麻的产量和质量不同。因此,选择与天麻亲和性高的蜜环菌菌种栽培天麻是保障天麻生产的关键因素之一。

[0003] 迄今,现有技术中未见有天麻共生蜜环菌菌种 *Armillaria cepistipes* Velen., 菌株保藏登记号为:CGMCC No.11902,及其制备方法和应用的报道。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种天麻生长所必需的蜜环菌菌种 *Armillaria cepistipes* Velen., 菌株保藏登记号为:CGMCC No.11902,及其制备方法和应用,该菌种能确保天麻的人工种植生产,减少了天麻种植的风险。

[0005] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0006] 一种天麻共生蜜环菌菌株,该菌株的分类名为 *Armillaria cepistipes* Velen., 保藏登记号为:CGMCC No.11902。

[0007] 如所述的一种天麻共生蜜环菌菌株,该菌株的培养特征为:在通用PDA培养基上菌丝较少,为白色,基内菌索为白色至浅黄色,气生菌索为黄褐色至红褐色。菌索为单轴分枝,生长快,吐水较晚,培养基颜色少变或不变。

[0008] 所述的蜜环菌菌株的制备方法,该方法包括野外采集蜜环菌菌株,筛选、分离、纯化出母种,首先采集野外蜜环菌源材料作为引菌,与直径50-80mm阔叶树枝拌匀,埋入林下塘穴作为菌材,在次年7-8月将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒在塘穴内的菌材上,覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育,16-24个月后,选择塘穴内生长天麻数量多、形状好的菌材培养菌索;然后在培养好的菌材上挑选粗细适宜、生长健壮、色浅的菌索进行分离,用无菌手术刀截取数段菌索,置于PDA培养基上培养培养7-10天后选择长入培养基内的幼嫩菌索进行纯化,直至筛选得到菌索生长形态高度一致的纯菌株,最后按无菌操作规程将纯菌株接种到PDA试管斜面培养基上,所有的培养条件均为恒温25℃,相对湿度60~70%。

[0009] 如所述的蜜环菌菌株的制备方法,该方法包括进一步对纯化所得菌株进行鉴定和保存,选取3个以上的试管菌株进行遗传鉴定,确定其为同种蜜环菌。鉴定后的纯菌株为保持其活性放置4℃低温保存以用于后续的生产应用。

[0010] 所述的蜜环菌菌株的制备方法,先制备试管菌种,再进行菌种扩繁,所述的制备试

管菌种包括：

[0011] 1) 野外采集天麻产区不同地段的蜜环菌源材料作为引菌，与直径50-80mm阔叶树枝拌合并植入林下塘穴作为菌材，在次年7-8月将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒在塘穴内的菌材上，覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育，16-24个月后，选择塘穴内生长天麻数量多、形状好的菌材培养菌索。

[0012] 2) 菌索分离、纯化：在培养好的菌材上挑选丛生、粗细适宜、生长健壮、顶端白色的菌索数段置于培养皿内，按无菌操作规程接种到PDA试管斜面培养基上，把接种好的试管贴上标签作好记录，放入25℃恒温箱，相对湿度60%~80%，培养7-10天，再选择长入培养基的幼嫩菌索进行纯化，直至筛选得到菌索生长形态高度一致的纯菌株，即试管种母种；

[0013] 所述的菌种扩繁是：按照麦麸或米糠20%，葡萄糖2%，琼脂2%的比例加水配制成500毫升瓶装固体培养基，自然pH值。遵循无菌操作过程，将试管菌种母种转接到灭菌过的固体培养基上，放入室温25℃，湿度70%-80%的暗室培养25天，即可长成二级菌种；将长度2-3cm、直径1-2cm的阔叶树鲜枝节浸泡24-48小时，装入750ml的菌种瓶中至瓶肩部位，向瓶内注入清洁水到半淹没表面枝节，经加盖灭菌后，无菌操作接入二级菌种，把接种后的瓶子放进室温22℃-25℃，相对湿度70%-80%的暗室培养50-60天，培育出三级菌种；生产好的三级菌种可直接伴栽乌天麻。

[0014] 所述的蜜环菌菌株的制备方法，先制备试管菌种，再进行菌种扩繁，所述的制备试管菌种包括：

[0015] 1) 野外选择蜜环菌源：采集昭通不同乌天麻产区的蜜环菌源材料作为引菌，与直径50-80mm阔叶树枝拌合并植入林下塘穴作为菌材，在次年7-8月将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒在塘穴内的菌材上，覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育，16-24个月后，选择塘穴内生长的天麻数量多、形状好的菌材培养菌索。

[0016] 2) 菌索分离、纯化：在培养好的菌材上挑选色浅健壮的菌索数段置于培养皿内，无菌操作接种到PDA试管斜面培养基上，把接种好的试管贴上标签作好记录，放入25℃恒温箱，在相对湿度60%~80%的条件下培养7-10天后选择长入培养基内的幼嫩菌索进行纯化，直至筛选得到菌索生长形态高度一致的纯菌株，即试管种母种。

[0017] 3) 所述的菌种扩繁是：按照麦麸或米糠20%，葡萄糖2%，琼脂2%的比例加水配制成500ml瓶装固体培养基，自然pH值。按照无菌操作要求，将试管种转接到灭过菌的固体培养基上，放入室温25℃，湿度70%-80%的暗室培养25天，长成二级菌种；三级种配制为：基料1为阔叶树木屑78%、米糠或麦麸20%、石膏10%、蔗糖1%。基料2为浸泡24-48小时的长度2-3cm、径粗1-2cm的阔叶树鲜枝节；基料1：基料2为1:2，总基料和水的比例为1:1.5，将配好的基料装入750ml的菌种瓶中至瓶肩处，经加盖灭菌后，无菌操作接入二级菌种，把接种后的瓶子放进室温22℃-25℃，相对湿度70%-80%的暗室培养50-60天，得三级树枝菌种，三级树枝菌种可直接伴栽乌天麻。

[0018] 所述的蜜环菌菌株在天麻栽培中的应用，将该菌种试管种母种扩转成二级固体菌种，用二级固体菌种扩转培养为三级树枝菌种，使用三级树枝菌种作引菌培育菌材，供天麻栽培使用，提供给天麻生长所需的营养物质。

[0019] 所述的蜜环菌菌株在天麻栽培中的应用，先制备蜜环菌试管菌种，再进行菌种扩繁，然后用三级树枝菌种伴栽天麻，所述的制备试管菌种包括：

[0020] 1) 野外选择蜜环菌源:采集昭通不同乌天麻产区的蜜环菌源材料作为引菌,与直径50-80mm阔叶树枝拌合并置入林下塘穴作为菌材,在次年天麻种子自然成熟的7-8月将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒在塘穴内的菌材上,覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育,待16-24个月后选择塘穴内天麻生长数量多、形状好的菌材培养菌索;

[0021] 2) 菌索分离、纯化:在培养好的菌材上挑选色浅健壮的菌索数段置于培养皿内,按照无菌操作规程接种到PDA试管斜面培养基上,把接种好的试管贴上标签作好记录,放入25℃恒温箱,相对湿度60%~80%,培养7-10天,再选择长入培养基内的幼嫩菌索进行纯化,直至筛选得到菌索生长形态高度一致的纯菌株,即试管种母种;

[0022] 3) 所述的菌种扩繁是:按照麦麸或米糠20%,葡萄糖2%,琼脂2%的比例加水配制成500ml瓶装固体培养基,自然pH值。遵循无菌操作过程将试管种转接到灭菌过的固体培养基上,放入室温25℃,湿度70%-80%的暗室培养25天,长成二级菌种;三级种配制为:基料1为阔叶树木屑78%、米糠或麦麸20%、石膏10%、蔗糖1%。基料2为浸泡24-48小时的长度2-3cm、径粗1-2cm的阔叶树鲜枝节;基料1:基料2为1:2,总基料和水的比例为1:1.5,将配好的基料装入750ml的菌种瓶中至瓶肩处,经加盖灭菌后,无菌操作接入二级菌种,把接种后的瓶子放进室温22℃-25℃,相对湿度70%-80%的暗室培养50-60天,得三级树枝菌种,三级树枝菌种直接伴栽天麻。

[0023] 所述的蜜环菌菌株在天麻栽培中的应用,先制备蜜环菌试管菌种,再进行菌种扩繁,然后将三级树枝菌种伴栽天麻,所述的制备试管菌种包括:

[0024] 1) 野外采集天麻产区不同地段的蜜环菌源材料作为引菌,与直径50-80mm阔叶树枝拌合并植入林下塘穴作为菌材,在次年天麻种子自然成熟的7-8月再将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒播在塘穴内的菌材上,覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育,16-24个月后,选择塘穴内天麻生长数量多、形状好的菌源材料培养菌索;

[0025] 2) 菌索分离、纯化:在培养好的菌材上挑选丛生、粗细适宜、生长健壮、顶端白色的菌索数段置于培养皿内,按无菌操作规程接种到PDA试管斜面培养基上,把接种好的试管贴上标签作好记录,放入25℃恒温箱,相对湿度60%~80%,培养3-10天,再选择长入培养基的幼嫩菌索进行纯化,直至筛选得到所需的纯菌株,即试管菌种母种。

[0026] 3) 所述的菌种扩繁是:按照麦麸或米糠20%,葡萄糖2%,琼脂2%的比例加水配制成500毫升瓶装固体培养基,自然pH值,按照无菌操作要求将试管菌母种转接到灭过菌的固体培养基上,放入室温25℃,湿度70%-80%的暗室培养25天,长成二级菌种;将长度2-3cm、直径1-2cm的阔叶树鲜枝节浸泡24-48小时,装入750ml的菌种瓶中至瓶肩部位,向瓶内注入清洁水到半淹没表面枝节,经加盖灭菌后,无菌操作接入二级菌种,把接种后的瓶子放进室温22℃-25℃,相对湿度70%-80%的暗室培养50-60天,培育出三级菌种,三级菌种可直接伴栽天麻。

[0027] 本发明利用野外采集的优势蜜环菌菌株,筛选、分离、纯化出能保持昭通乌天麻优良特性的蜜环菌菌株,该菌株的分类命名为*Armillaria cepistipes* Velen.,于2016年01月18日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏登记号为:CGMCC No.11902。鉴定参据的生物材料(株)为HKAS86545。

[0028] 本发明的技术方案为:

[0029] 1、采集野外蜜环菌源材料作为引菌，与直径50-80mm阔叶树枝拌匀埋入林下塘穴作为菌材，在次年7-8月将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒在塘穴内的菌材上，覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育，16-24个月后选择塘穴内生长天麻数量多、形状好的菌材培养菌索。

[0030] 2、在培养好的菌材上挑选粗细适宜、生长健壮、色浅的菌索数段进行分离，用无菌手术刀截取数段置于PDA培养基上培养，再选择长入培养基内的幼嫩菌索进行纯化，直至筛选得到菌索形态高度一致的纯菌株。然后按无菌操作规程将纯菌株接种到PDA试管斜面培养基上，把接种好的试管贴上标签作好记录。所有的培养过程均为恒温25℃，相对湿度60~70%，培养7-10天。

[0031] 3、选取3个以上的试管菌株进行系统分类鉴定，确定其为同一种蜜环菌。

[0032] 4、该菌种的培养特征：在PDA培养基上培养15天左右长满整个培养皿，培养皿表面多白色菌丝，基内菌索为乳白色至浅黄白色，分支多，黑色素分泌少。

[0033] 5、菌株试管种扩转成二级固体菌种，用二级固体菌种扩转培养三级瓶装树枝菌种，使用树枝菌种作“引菌”培育菌材供天麻栽培使用。

[0034] 本菌株特性：该菌种在通用PDA培养基上菌丝较少为白色，菌索为白色、浅黄色至红棕色，分支较多，生长快，菌索吐水较晚，培养基颜色少变或不变。

[0035] 与现有技术相比，本发明具备如下的优点：一是本发明菌种和乌天麻具有较好的亲和力，使用该菌种可减少“空塘”现象的出现；二是该菌种在乌天麻生长地区具有自然的分布，充足的菌源能保证当地天麻产业的持续稳健发展。本发明蜜环菌菌株 *Armillaria cepistipes* Velen.，保藏登记号为：CGMCC No.11902用于伴栽天麻，天麻的产量比传统方法可提高至少3-5倍。

#### 具体实施方式：

[0036] 下面用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容，但并不以此来限定本发明。

[0037] 实施例1：

[0038] 1、制备试管菌种：

[0039] 1) 野外选择蜜环菌源(采集昭通天麻产区不同地段的蜜环菌源材料)作为引菌，与直径50-80mm阔叶树枝拌合并植入林下塘穴作为菌材，在次年7-8月将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒在塘穴内的菌材上，覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育，16-24个月后，选择塘穴内生长天麻数量多、形状好的菌材培养菌索。

[0040] 2) 菌索分离、纯化：在培养好的菌材上挑选丛生、粗细适宜、生长健壮、顶端白色的菌索数段置于培养皿内，按无菌操作规程接种到PDA试管斜面培养基上，把接种好的试管贴上标签作好记录，放入25℃恒温箱，相对湿度60%~80%条件下培养7-10天，再选择长入培养基的幼嫩菌索进行纯化，直至筛选得到菌索生长形态高度一致的纯菌株，即试管种(母种)。

[0041] 2、菌种扩繁：

[0042] 按照麦麸或米糠20%，葡萄糖2%，琼脂2%的比例加水配制成500毫升瓶装固体培养基，自然pH值。遵循无菌操作过程，将母种(本发明利用野外采集的优势蜜环菌菌株，筛选、分离、纯化出能保持昭通乌天麻优良特性的蜜环菌菌株，该菌株的分类命名为

*Armillaria cepistipes* Velen., 于2016年01月18日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心CGMCC, 保藏地址: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号, 保藏登记号为: CGMCC No.11902) 转接到灭过菌的固体培养基上, 放入室温25℃, 湿度70%-80%的暗室培养25天, 即可长成二级菌种。将长度2-3cm、直径1-2cm的阔叶树鲜枝节浸泡24-48小时, 装入750ml的菌种瓶中至瓶肩部位, 向瓶内注入清洁水到半淹没表面枝节, 经加盖灭菌后, 无菌操作接入二级菌种, 把接种后的瓶子放进室温22℃-25℃, 相对湿度70%-80%的暗室培养50-60天, 即可培育出三级菌种。

[0043] 3、生产出的三级菌种即可直接用于云贵川等地区的乌天麻伴栽使用。

[0044] 实施例2:

[0045] 1、制备试管菌种:

[0046] 1) 野外选择蜜环菌源: 广泛采集昭通乌天麻产区不同地区的蜜环菌源材料作为引菌, 与直径50-80mm阔叶树枝拌合并植入林下塘穴作为菌材, 在次年天麻种子自然成熟的7-8月再将与萌发菌拌好的天麻种子均匀撒播在塘穴内的菌材上, 覆盖阔叶树鲜叶和砂土进行培育, 16-24个月后, 选择塘穴内天麻生长数量多、形状好的菌源材料培养菌索。

[0047] 2) 菌索分离、纯化: 在培养好的菌材上挑选色浅健壮的菌索数段置于培养皿内, 按无菌操作规程接种到PDA试管斜面培养基上, 把接种好的试管贴上标签作好记录, 放入25℃恒温箱, 相对湿度60%~80%, 培养3-10天, 再选择长入培养基的幼嫩菌索进行纯化, 直至筛选得到菌索生长形态高度一致的纯菌株, 即为试管菌种(母种)。

[0048] 2、菌种扩繁:

[0049] 按照麦麸或米糠20%, 葡萄糖为2%, 琼脂2%的比例加水配制成500毫升瓶装固体培养基, 自然pH值。遵循无菌操作过程, 将试管种(保藏号为CGMCC No.11902) 转接到灭过菌的固体培养基上, 放入室温25℃, 湿度70%-80%的暗室培养25天, 即可长成二级菌种。三级种配制为: 基料1为阔叶树木屑78%、米糠或麦麸20%、石膏10%、蔗糖1%。基料2为浸泡24-48小时的长度2-3cm、径粗1-2cm的阔叶树鲜枝节。基料1:基料2为1:2, 总基料和水的比例为1:1.5。将配好的基料装入750ml的菌种瓶中至瓶肩处, 经加盖灭菌后, 无菌操作接入二级菌种, 把接种后的瓶子放进室温22℃-25℃, 相对湿度70%-80%的暗室培养50-60天, 即可培育出三级树枝菌种。

[0050] 3、生产出的三级菌种即可直接用于云贵川等地区的乌天麻伴栽使用。