

外生菌根真菌菌剂的制备及其 对松苗生长效果的研究*

周玉芝 刘 忱 齐玉臣 韩桂云 周崇莲

(中国科学院沈阳应用生态研究所)

摘要 从不同林型下分离获得的外生菌根真菌纯培养菌株中, 选择了劣味乳菇、美味红菇、赭丝膜菌、彩色豆马勃四株菌根菌, 进行菌剂制备及其对松苗生长效果的试验。结果表明, PDMA和PD培养基是培养外生菌根真菌较适合的培养基; 木屑、麸皮、米糠、玉米粉、珍珠岩、蛭石等是培养菌根菌剂较适宜的基质。供试菌对油松、马尾松、落叶松、樟子松、红松苗都具促进生长作用, 效果较明显的是丝膜菌, 其次是劣味乳菇、美味红菇、彩色豆马勃, 对促进火炬松苗生长效果最明显的是劣味乳菇, 其次是美味红菇、彩色豆马勃。四种菌对湿地松苗生长效果均高于对照。

关键词 外生菌根真菌; 菌剂; 松苗

早在1956年前本所曾对松树(*Pinus* spp.)和柞树(*Quercus* sp.)的外生菌根真菌进行了分离, 并对油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)、樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongolica* Litv.)幼苗进行接种试验, 促进了松苗的生长和成活^[1]。自1978年以来, 又对外生菌根进行了研究。从不同地区、不同林型下采集真菌子实体, 在无菌条件下用切割组织法分离菌根真菌, 获得纯培养菌株。但大部分菌根真菌在人工培养条件下, 不能繁殖出足够的菌丝体, 以满足林业育苗的需要。目前, 世界上研究菌根的学者, 已采用人工纯培养体进行人工接种, 加速了松苗菌根的形成, 促进苗木生长。因此, 研究有效菌根真菌的培养并制成菌剂, 实现林木幼苗人工菌根化, 在造林生产实践上具有重要意义。

本研究选择了四种对松树幼苗回接效果较好的菌根真菌, 进行菌剂培养条件的研究。并将培养好的菌剂在不同地区对不同树种的松苗进行接种试验。现将1985~1989年的研究结果予以报道。

1 材料和方法

1.1 菌种

见表1。供试菌种子实体种名由本所植物室王云先生鉴定。

1.2 树种

油松、马尾松(*P. massoniana* Lamb.)、兴安落叶松(*Larix gmelini* (Rupr.) Rupr.)、樟子松为盆栽直播苗。红松(*P. koraiensis* Sieb. et Zucc.)为盆栽一年生幼苗。火炬松

本文于1990年8月29日收到。

*本研究为国家自然科学基金项目“菌根真菌与植物共生营养的研究及其在林业生产上的应用”部分内容。

表1 外生菌根真菌菌种来源

菌	种	采 集 地 点	生 境
劣味乳菇 (<i>Lactarius insulsus</i> Fr.)		吉林长白山	红松混交林
美味红菇 (<i>Russula delica</i> Fr.)		广州龙眼洞, 湖南会同	马尾松混交林
赭丝膜菌 (<i>Cortinarius russus</i> Fr.)		沈阳 东陵	油松混交林
彩色豆马勃 (<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker et Couch)		广东雷州半岛	湿地松人工林

(*P.taeda* L.)和湿地松(*P.elliottii* Engelm.)为春播40天的塑料薄膜袋幼苗。

1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基 选用马铃薯葡萄糖麦芽汁琼脂培养基(PDMA),组成为20%马铃薯汁500 ml, 麦芽汁(波美3度)500 ml, 葡萄糖20 g, 维生素B₁ 0.05 g, 琼脂18 g, pH 5.5, 0.7大气压灭菌20 min。

1.3.2 液体种子培养基 选用综合马铃薯培养基(PD),组成为20%马铃薯汁1 000 ml, 葡萄糖20 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄·7H₂O 0.15 g, 维生素B₁ 微量, pH 5.5。

1.3.3 固体培养基 选用木屑、麸皮、玉米粉、稻糠、蛭石、珍珠岩、草灰等为培养菌根真菌的固体基质,按不同百分比组成固体培养基(见表2)。

1.3.4 营养液 为补充固体培养基中营养不足,加速菌根真菌的生长,选用修改的(MMN)营养液拌料。组成为CaCl₂ 0.05 g, NaCl 0.025 g, MgSO₄·7H₂O 0.15 g, (NH₄)₂HPO₄ 0.25 g, KH₂PO₄ 0.5 g, FeCl₃(1%)1~2 ml, 葡萄糖5 g, 维生素B₁ 0.025 g, 水1 000 ml, pH 5.5~5.7。

1.4 菌剂培养方法

采用斜面培养→液体培养→固体培养三级扩大的培养方法。

1.4.1 斜面培养 将供试菌种接种在斜面培养基上,置25~28℃恒温培养5~7天。

1.4.2 液体种子培养 取斜面菌种切割成小块,接种在无菌的盛有100 ml液体培养基的500 ml三角瓶内,置25~28℃摇床上振荡(往复式)培养7~10天。

1.4.3 固体培养 将固体基质按比例配好拌匀,把料装在罐头瓶内压实,中心插一孔,封好瓶口,行1气压1 h灭菌备用。将种子液15~20 ml接入固体培养基内,置25~28℃培养。劣味乳菇、美味红菇和赭丝膜菌培养15~20天,彩色豆马勃培养50~60天。

1.5 菌根真菌对松苗接种试验

1.5.1 试验用载体 无菌盆栽试验载体为:河沙:森林土=3:1,过磷酸钙和腐熟马粪为重量的1%。载体拌匀经1.5大气压1 h灭菌,待用。薄膜袋容器苗载体为:深层黄泥心土:火烧土:过磷酸钙=10:20:1。

1.5.2 接菌试验 油松、马尾松、落叶松、樟子松和红松为无菌盆栽试验。每盆定苗5株,接菌剂15 g。每个处理设5次重复。对照不接菌。按一般温室盆栽管理。火炬松、湿地松每薄膜袋一株苗,接菌剂5 g,每个处理为30株苗。

1.5.3 试验地点 樟子松在本所内蒙昭乌达盟、乌兰傲都试验站;火炬松和湿地松在广东省阳江林场罗琴分场进行人工纯培养接种试验;其余树种在本所温室进行无菌盆栽接种试验。

2 结果和讨论

通过对几种外生菌根真菌扩大培养的研究^[2], 选出制备四种菌根真菌菌剂的培养基和培养条件, 见表2。

表2 四种菌根真菌生长的培养基和培养条件

菌种	培养基			培养条件				
	斜面	种子液	固体	营养液	固液比	pH	温度(℃)	时间(d)
劣味乳菇	PDMA	PD	木屑70%, 麸皮30%	MMN或水	1:2	5.5~6.5	28~30	15~20
美味红菇	PDMA	PD	麸皮60%, 稻糠20%, 玉米粉20%	MMN	1:1	5.0~5.5	25~28	15~20
赭丝膜菌	PDMA	PD	麸皮70%, 稻糠30%, 木屑70%或麸皮30%	MMN或水	1:1.5	5.5~6.5	25~28	10~15
彩色豆马勃	PDMA	PD	蛭石70%, 玉米粉20%, 草炭10%或珍珠岩70%, 草炭30%	MMN	1:0.5~1	4.0~5.0	28~30	50~60

2.1 菌根真菌的适合培养基

菌根真菌对培养基有着特殊的营养要求。在添加维生素 B₁ 之类物质的天然培养基上生长好, 菌丝初期生长快, 后期旺盛, 不易衰老。在以无机盐为主的培养基上菌丝生长缓慢, 个别菌种几乎不生长。

彩色豆马勃在以蛭石70%、草炭10%、玉米粉20%的培养基上能较好地生长。

菌根真菌在生长过程中一般要求较高营养条件, 木屑、麸皮、玉米粉、稻糠等是培养菌根较适合的自然培养基, 是菌丝体生长的重要碳、氮和维生素的主要来源。但不同菌根真菌产生纤维素酶和半纤维素酶的活性不同, 因此对基质有着不同要求。彩色豆马勃对基质有着特殊营养要求, 在天然培养基上普遍生长不好, 而在添加草炭的珍珠岩或蛭石的培养基上菌丝能不断持续生长。在以草炭为主的培养基上供试菌均生长不好。

2.2 菌根真菌菌剂的培养条件

培养基: 菌根真菌生长缓慢, 为了加速其生长, 补充固体基质中营养不足, 选用了修改的MMN营养液拌料。这四株供试菌在这种培养基上菌丝初期生长快, 后期不易衰老。而在用水拌料的培养基上菌丝虽然能生长, 但生长后期菌丝易衰老。

水分: 固体培养基的含水量过高, 通气不良, 影响菌丝生长; 含水量过低, 菌丝生长不旺盛, 且易衰老。一般固液比以1:1~1.5为宜(即含水量以75%~80%为宜)。

温度: 培养劣味乳菇、彩色豆马勃适宜温度为28~30℃; 赭丝膜菌、美味红菇为25~28℃。但不同菌种对温度的适应性不同。赭丝膜菌、劣味乳菇对温度适应范围较广泛, 在10~30℃可正常生长。彩色豆马勃在37℃时仍能正常生长, 是一株较耐高温的菌种。

pH: 劣味乳菇、赭丝膜菌生长最适pH为5.5~6.5, 美味红菇为5.0~5.5, 彩色豆马勃为4.0~5.0。但劣味乳菇、赭丝膜菌在pH7.5时菌丝仍能生长旺盛, 是两株适合北方盐碱地造林生产的优良菌种。彩色豆马勃在pH4.0时生长旺盛, 是一株适合南方酸性土壤造林的优良菌株。

在固体培养基上菌丝的生长时间为: 赭丝膜菌和劣味乳菇3~5天开始生长, 15天左右

生长繁殖最旺盛; 美味红菇 5~7 天才开始生长, 15~20 天生长繁殖丰满; 彩色豆马勃则生长缓慢, 10~15 天才开始生长, 需培养 60 天左右。

2.3 菌根真菌对松苗生长的影响

菌剂对五种国内松接种后 180 天, 两种国外松接种 270 天, 对苗木进行生长量测定。结果表明, 菌根真菌具有不同程度的促进苗木生长作用, 但不同树种的苗木速生效果, 因不同菌种有明显差异。同一树种接种不同菌种又各具异。赭丝膜菌是促进油松、落叶松苗生长最佳的菌种; 彩色豆马勃促进马尾松、湿地松苗生长最佳; 劣味乳菇促进樟子松、红松、火炬松苗生长最佳(见后页表 3)。

供试菌株均具有较强的共生性, 与苗木根系形成菌根后扩大根系面积, 增加根系的吸收能力, 加速苗木生长。其中赭丝膜菌、劣味乳菇表现最明显, 而且对生长温度、pH 的适应范围广泛, 是很有应用前景的优良菌株。五种国内松苗以樟子松对供试菌根真菌的接菌效果最明显, 这为东北地区沙地营造樟子松, 实行人工菌根化措施提供了优良菌种。

本研究为菌根真菌作为一种生物技术应用用于造林生产, 提供了优良菌种和菌剂的制备, 这对绿化荒山, 提高我国森林覆盖率, 具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 张宪武等, 1964, 菌根化和施用胡敏酸肥料对樟子松幼苗成活及菌根形成的研究初报, 林业科学, 9(1): 61~64。
- [2] 周玉芝等, 1984, 几种外生菌根真菌扩大培养的研究。第四届全国菌根会议报告。
- [3] 孙红珠译, 1979, 菌根担子菌的人工培养, 应用微生物, 6: 91~94。
- [4] Nancy, H. et al., 1969, In Vitro Culture of *Pisolithus tinctorius* Mycelium, *Mycologia*, 61: 195~198。
- [5] 郭秀珍等, 1989, 林木菌根及应用技术, 中国林业出版社。

Inocula Preparation of Ectomycorrhizal Fungi and Their Effects on the Growth of Pine Seedlings

Zhou Yuzhi Liu Chen

Qi Yuchen Han Guiyun Zhou Chonglian

(Shenyang Institute of Applied Ecology, Academia Sinica)

Abstract In the experiment, four species of ECM fungi, *Lactarius insul-sus* Fr., *Russula delica* Fr., *Cortinarius russus* Fr. and *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch, were isolated from the fruit bodies collected from different forest types. The species were cultured in different media and inoculated on the seedlings of *Pinus tabulaeformis* Carr., *P. massoniana* Lamb., *Larix gmelini* (Rupr.) Rupr., *P. sylvestris* var. *mongolica* Litv., *P. koraiensis* Sieb. et Zucc., *P. taeda* L., *P. elliotii* Engelm.

The results indicated that PDMA and PD were suitable media for the four ECM fungi. Saw-dust, wheat brans, rice brans, corn folur, vermiculate, peat, perlite were suitable solid media for the development of the ECM fungi.

The four species of ECM fungi could enhance the growth of 5 pines. An excellent fungus for symbiont of the pines was *C. russus*, then *L. insul-sus*, *R. delica*, *P. tinctorius* successively. For *P. taeda*, the best one was *L. insul-sus*, successively *R. delica*, *P. tinctorius*. The seedling growth of *P. ell-iottii* is better than that of the controls. *P. sylvestris* var. *mongolica* possessed the strongest adaptability to the infection of these mycorrhizal fungi,

Key words ectomycorrhizal fungi; inocula; pine seedlings

表 3 四种菌根真菌对松苗生长的影响

菌 种	油 松				马 尾 松				落 叶 松			
	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)
	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值
劣味乳菇	5.20	0.16	1.90	172.7	5.30	0.13	1.80	141.5	5.50	0.17	1.10	124.4
美味红菇	5.75	0.16	1.70	154.5	5.76	0.14	1.90	149.1	9.40	0.20	2.10	233.3
赭丝膜菌	6.40	0.18	2.20	194.7	5.80	0.13	1.70	131.5	12.5	0.27	3.80	422.2
彩色豆马勃	4.90	0.17	2.00	182.4	6.60	0.15	2.30	176.9	4.80	0.17	0.94	104.4
对 照	4.60	0.16	1.10	100	5.20	0.13	1.30	100	4.80	0.17	0.90	100
樟 子 松												
菌 种	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)
	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值
	劣味乳菇	5.40	0.17	1.00	166.7	18.60	108.8	0.44	110.0	9.20	173.6	1.01
美味红菇	5.20	0.16	0.87	144.6	17.10	100.6	0.40	0	6.80	127.9	0.88	146.6
赭丝膜菌	5.20	0.16	0.90	150.0	17.80	104.7	0.46	115.0	7.80	147.5		
彩色豆马勃	5.50	0.15	0.80	133.3				0.70	116.7	1.70	136.4	0.71
对 照	3.80	0.13	0.60	100	17.0	100	0.40	0.40	100	5.30	100	0.60
火 炬 松												
菌 种	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)
	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值
	劣味乳菇	5.40	0.17	1.00	166.7	18.60	108.8	0.44	110.0	9.20	173.6	1.01
美味红菇	5.20	0.16	0.87	144.6	17.10	100.6	0.40	0	6.80	127.9	0.88	
赭丝膜菌	5.20	0.16	0.90	150.0	17.80	104.7	0.46	115.0	7.80	147.5		
彩色豆马勃	5.50	0.15	0.80	133.3				0.70	116.7	1.70	136.4	
对 照	3.80	0.13	0.60	100	17.0	100	0.40	0.40	100	5.30	100	0.60
湿 地 松												
菌 种	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)	株 高 (cm)	基 径 (cm)	鲜 重 (g)	增 长 率 (%)
	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值	平均 值
	劣味乳菇	5.40	0.17	1.00	166.7	18.60	108.8	0.44	110.0	9.20	173.6	1.01
美味红菇	5.20	0.16	0.87	144.6	17.10	100.6	0.40	0	6.80	127.9	0.88	
赭丝膜菌	5.20	0.16	0.90	150.0	17.80	104.7	0.46	115.0	7.80	147.5		
彩色豆马勃	5.50	0.15	0.80	133.3				0.70	116.7	1.70	136.4	
对 照	3.80	0.13	0.60	100	17.0	100	0.40	0.40	100	5.30	100	0.60