

## 马尾松共生真菌(P.t)增殖培养条件\*

裴致达 陈连庆

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所)

**关键词** 马尾松; 彩色豆马勃; 培养条件

马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)是我国亚热带地区主要用材树种之一,具有分布面积广、生长快、经济效益高等优点。它又是典型的外生菌根树种,抗逆性强,适应性广,是我国荒山绿化的先锋树种。研究表明,马尾松苗木菌根感染率不同,对其造林成活率有着明显的不同,且菌根化苗木造林后缓苗期短,生长快,株高、茎粗、新梢高度均大大超过无菌根化苗木<sup>[1]</sup>。因此,马尾松苗木菌根化是十分必要的。

用高效益的优良菌种对马尾松苗期进行人工接种,是培育菌根化壮苗的重要措施。在对马尾松菌根真菌调查研究和优良菌株筛选的基础上<sup>[1~2]</sup>,选择了彩色豆马勃 [*Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch] 液体培养菌丝体作为接种剂得到了较好的效果,马尾松苗木菌根感染率达75.7%。为了扩大培养马尾松菌根菌(P.t),对其增殖技术条件进行了研究,目的是确定最佳方案,为生产马尾松菌根菌剂提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株

彩色豆马勃 *P. tinctorius* (简称 P.t) 是从马尾松林内采集、分离的(亚林)86902 菌株。

#### 1.2 培养基

改良的菌根菌合成培养基<sup>[3]</sup>。

#### 1.3 接种培养

取 P.t 菌菌丝接种于盛有100 ml 培养液的250 ml三角瓶中,在HSZ-1型弧型往返生物液体培养振荡台上振荡培养,接种量为3.2 mg(干)/100 ml菌丝,每个处理重复3次,培养周期为30天。

1.3.1 温度试验 分别在15, 20, 25, 30, 35, 40℃共6个梯度条件下恒温培养。

1.3.2 pH值试验 在pH值为2.5~8.0范围内,间隔0.5为一梯级共设12个梯度处理,灭菌后备用。

1.3.3 碳源试验 在pH值为5.6、温度为20~25℃条件下,以单糖类葡萄糖、果糖,双糖类麦芽糖、蔗糖,多糖类可溶性淀粉、糊精为碳源,加上对照共设7个处理。

本文于1991年1月12日收到。

\*本研究系“七五”国家科技攻关项目“菌根在林业上应用——马尾松菌根研究”内容的一部分。

1.3.4 氮源试验 用无机态氮： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 和有机态氮：酒石酸铵、尿素、蛋白胨及酵母浸汁为N源，共设8个处理，在pH值5.6、温度20~25℃条件下振荡培养。

#### 1.4 菌丝体生物量测定

分别取试验后的培养液经抽提、过滤、清洗，105℃烘干至恒重，计算每百毫升培养液中菌丝干物质重量。

#### 1.5 培养液pH值测定

取25 ml培养液，用SPM-10型数字式pH计测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 温度与P.t菌菌丝体增殖

在25℃与30℃条件下，菌丝体2~3天便开始萌动，增殖速度快，菌丝浓密，菌落正常。25℃时菌丝体日平均增长量为1.2 mm，随着温度的降低或升高，菌丝体萌动时间推迟。在温度降低或升高10℃(15℃、35℃)条件下，菌丝体日增长量是25℃时菌丝增长量的十分之一。温度在10℃时，从接种到菌丝萌动需18天，且生长缓慢，菌丝长势稀、弱；温度在40℃时，菌丝体根本不萌动(表1)。

表1 不同温度下P.t菌生长情况

培养温度 (℃)	萌动始时 (d)	基内颜色	菌丝颜色	菌落直径 (cm)	菌丝增长量 (mm/d)	气生菌丝形态
10	18	浅褐色	棕黄	0.7	0.035	菌丝长势稀弱、量少
15	9~11	褐黄色	褐棕黄	1.192	0.125	菌丝较密、绒状爬壁差
20	6~7	暗褐黄色	褐黄	1.720	0.26	菌丝浓密、整齐絮状爬壁
25	3~4	褐黄色	金黄	3.80	1.2	菌丝浓密、絮状或匍匐爬壁
30	2~3	黄褐色	杏黄	2.60	0.375	菌丝浓密、絮状整齐爬壁
35	6	黄褐色	杏黄	1.25	0.125	菌丝浓密、短绒状整齐
40	—	—	—	—	—	—

### 2.2 pH值与P.t菌菌丝体增殖

pH值是影响菌丝体新陈代谢的重要因素，在pH 2.5~8的范围内P.t菌均能生长，但菌丝球的大小、形态及菌丝体生物量各有不同。pH值4.0~5.5适合P.t菌菌丝体的增殖，每100 ml培养液中菌丝增殖量为65.2~77.1 mg(干重)，增殖倍数为20.37~24.09倍，其最佳pH值为5.5(表2)。我们还发现在pH值2.5~5.5范围内，P.t菌菌丝体增殖量随着pH值的增大而增加，呈极显著正相关， $r = 0.9524$  ( $r_{0.05} = 0.754$ ,  $r_{0.01} = 0.874$ )，pH值(x)与菌丝体干重(y)的回归关系为 $y = -7.3166 + 16.508x$ ；而在pH值6.0~8.0范围内，菌丝体增殖量是随pH值的增加而减少，呈极显著负相关， $r = -0.9937$  ( $r_{0.05} = 0.878$ ,  $r_{0.01} = 0.959$ )，理论回归方程为 $y = 202.85 - 23.918x$ 。

还要提及的是pH值4.5以下的培养液经高压灭菌后pH值略有增大，pH值5.0以上的培养液经高压灭菌后pH略减小，pH值大于7.0的培养液经高压灭菌均产生沉淀物，液体颜色呈

铁锈色,这是由于在碱性高温条件下,培养液中一些物质发生化学反应所致,P.t菌菌丝体生长较差。

表2 各pH值液培养P.t菌菌丝体增殖情况

培养液pH值		培养液颜色		菌丝球形态			培养后 培养液 pH值	菌丝体 干重 (mg)	增殖倍数
灭菌前	灭菌后	培养前	培养后	颜色	直径 (cm)	形状			
2.50	2.56	无色透明	无色透明	金黄	0.2~1.5	绒球少长绒	2.47	25.2	7.87
3.00	3.05	无色透明	白黄透明	褐黄	0.5~2	绒球细长绒	2.81	44.3	13.84
3.50	3.55	无色透明	土黄透明	褐黄	0.5~2	长毛绒球	3.23	55.9	17.47
4.01	4.04	无色透明	浅褐黄透明	黄褐	1~3	长毛绒球	3.51	65.2	20.37
4.50	4.52	无色透明	褐黄透明	黄褐	1~3	长毛绒球	3.96	70.1	21.90
5.00	4.96	无色透明	黄褐透明	黄棕褐	1~3	大长绒球	4.02	74.2	23.18
5.50	5.45	无色透明	黄褐透明	黄棕褐	1~3	大长绒球	4.13	77.1	24.09
6.01	5.98	无色透明	黄褐透明	黄棕褐	1~3	绒球片状	4.48	59.1	18.46
6.50	6.38	浅黄透明	黄褐透明	黄棕褐	1~2	线球片状	5.15	48.9	15.28
7.00	6.53	浅锈黄有沉淀	土黄透明	白黄	0.5~1	短密绒球	6.35	32.2	10.06
7.47	6.87	黄锈色有沉淀	浅土黄透明	白黄	0.5~1	短密绒球	6.74	26.0	8.13
7.87	—	铁锈色有沉淀	黄色透明	白色	0.5~1	短密绒球	6.88	14.5	4.53

在菌丝体增殖过程中由于新陈代谢所产生的有机酸(醋酸、琥珀酸、草酸等)的积累,也会使培养液pH值降低<sup>[4]</sup>,但初始pH值与培养后培养液的pH值之间是极显著的正相关关系, $r = 0.9701$  ( $r_{0.05} = 0.576$ ,  $r_{0.01} = 0.706$ ),理论回归方程为 $y = 0.1842 + 0.8189x$ 。我们在文中所采用的pH值是指培养液灭菌前的初始pH值。

### 2.3 碳源与P.t菌菌丝体增殖

碳源是菌丝体最重要的营养来源,它不仅能提供碳素以作为合成碳水化合物和氨基酸的原料,而且也是重要的能量来源。在基础培养液中分别加入葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、糊精等作碳源,其菌丝球的形态、大小各异。菌丝生物量(除果糖外)均比对照增加,以葡萄糖作碳源,菌丝球多,且大,形态正常,每100 ml培养液菌丝干重达62.7 mg,增殖19.6倍,是对照的16倍,效果最好。双糖中以麦芽糖作碳源为好,仅次于葡萄糖(表3)。本试验中P.t菌菌丝体对各种碳源利用情况排序是:葡萄糖>麦芽糖>糊精>可溶性淀粉>CK>果糖。可溶性淀粉作为大分子化合物不能直接被P.t菌菌丝吸收利用,需经淀粉酶分解,因而效果较差,而P.t菌对果糖所提供的碳源反应最差,其机理有待进一步探讨。

表3 不同碳源培养液对P.t菌增殖生长的影响

碳源种类	营养液颜色		菌球形态			菌丝干重	
	接种前	培养后	颜色	直径 (cm)	形状	(mg)	增殖 倍数
葡萄糖	无色透明	褐色透明	黄褐色	1~2	长毛绒球状	62.7	19.6
果糖	褐棕色透明	黄色透明	土黄色	0.5~1	不规则片状	2.3	0.72
麦芽糖	无色透明	黄棕色透明	黄棕色	0.5~1.5	近似球形,菌丝长短不齐	24.7	7.7
蔗糖	无色透明	黄棕色透明	黄棕色	0.5~1.5	绒球片状	13.0	4.1
可溶性淀粉	微乳白色	白黄色乳状	土黄色	0.5~1	片状,菌丝细弱	4.7	1.5
糊精	无色透明	黄棕色稍乳	土黄色	0.5~1.5	绒球、片状不规则	16.4	5.1
CK	无色透明	无色透明	土黄色	0.5~1.5	片状	4.4	1.4

## 2.4 氮源与 P.t 菌菌丝体增殖

氮素是菌丝体合成蛋白质和核酸的重要营养物质, P.t 菌能利用的氮源很多, 在其生长过程中, 无机态氮源最易被吸收利用, 菌丝体增加量大, 其中以氨态氮为最好, 100 ml 培养液菌丝体干重达 51.6 mg, 增殖 23.45 倍; 硝态氮次之。P.t 菌对有机态氮分解利用能力较差, 以尿素、蛋白胨为氮源的培养基, P.t 菌菌丝生长差, 菌丝球小, 菌丝短, 说明所提供的这些氮源难以利用, 尤其是酵母浸汁提供的氮源, P.t 菌几乎不能利用, 其菌丝体不萌动(表 4)。

表 4 P.t 菌液培氮源选择试验结果

氮源种类	培养液颜色		菌球形态			菌丝干重	
	接种前	培养后	颜色	直径 (cm)	形状	(mg)	增殖倍数
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	无色透明	棕褐透明	棕褐色	1	丝片状	51.6	23.45
KNO <sub>3</sub>	无色透明	暗棕褐透明	棕褐色	1~2	绒球状	35.5	16.14
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	无色透明	浅褐棕透明	褐棕色	1~2	绒球状	34.5	15.68
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	无色透明	黄棕透明	黄棕色	1	绒球状	39.9	18.14
酒石酸铵	无色透明	棕褐透明	棕褐色	0.5~1.5	毛绒球状	37.7	17.14
尿素	无色透明	产生白色沉淀	白色	0.5	不规则片状	3.0	1.36
蛋白胨	褐黄透明	褐黄透明	褐黄色	0.5	不规则片状	3.1	1.40
酵母浸汁	黄色乳状	—	—	—	—	—	菌丝不起劲至污

## 3 小 结

通过对马尾松菌根菌——P.t 菌液体培养的温度、pH 值、碳源、氮源等试验得知: P.t 菌菌丝体在 10~35 °C 时均能生长, 适宜的温度是 20~30 °C, 25 °C 是其生长最佳温度。P.t 菌菌丝喜酸性环境, 且适应范围较宽, 最适 pH 值为 5.5。培养用的碳源以葡萄糖最好, 果糖最差。在对氮源的利用上, 是无机态氮优于有机态氮; 无机态氮中, 铵态氮优于硝态氮, 以硫酸铵效果最好。

在进行以上内容研究的同时, 还进一步对碳氮比、矿质元素、维生素等组合配比进行了筛选试验, 已确定了马尾松菌根菌——P.t 菌增殖的最佳培养基、培养条件及菌剂生产工艺, 以上内容将于另文报道。

## 参 考 文 献

- [1] 陈连庆等, 1990, 马尾松菌根真菌的筛选及圃地接种效应, 林业科学研究, 5(1): 65~70。
- [2] 陈连庆, 1989, 马尾松共生菌根真菌调查研究, 林业科学研究, 2(4): 357~362。
- [3] 俞大猷, 1975, 植物病理学和真菌学技术汇编, 人民教育出版社, 74。
- [4] 杨庆尧, 1981, 食用菌生物学基础, 上海科学技术出版社。

## The Cultural Conditions for the Proliferation of a Symbiotic Fungus (P.t) with Masson Pine

Pei Zhida                      Chen Lianqing

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

**Abstract** The cultural conditions for the proliferation of a strain, SF-86902 selected from *Pisolithas tinctorius* (P.t), a species of symbiotic fungi with Masson Pine, have been studied. The results showed that under artificial pure-culture, the optimum growth temperature was 25 °C; the optimum pH in the culture solution was 5.5; the sources of carbon and nitrogen which are easily absorbed and used were monosac glucose and inorganic ammonium nitrogen respectively. The research provided scientific basis for preparing mycorrhiza inoculum by the P.t fungus of ectotrophic mycorrhiza with Masson Pine.

**Key words** Masson Pine; *Pisolithas tinctorius*; cultural condition

---

### “浙江省林木良种选育技术推广和 繁育体系的建立”通过鉴定

由浙江省种苗站牵头，组织中国林科院亚林所、浙江省林科所、浙江省林学院、浙江林校和良种基地的科技人员协同攻关。坚持以科研为先导，基地建设为中心，推广为手段，实现造林良种化为目标，建立起一个良种科研、生产、管理和推广四大系统为支柱的完整的林木良种繁育体系。十八年来，推广应用27个树种有关种源选择、种子园、引种、无性繁殖技术和基因资源保存，利用46项科研成果，建立28个林木良种基地17 923亩，生产良种 43.9万kg，优良穗条1 687万根，苗木354万株，在全国17个省(区)、浙江省70个县(市)推广良种造林，面积达405万亩，取得极显著的经济效益和社会效益。良种选育技术推广和繁育体系的建立，使科研、生产和推广工作的运行机制发生了深刻的变化，加快了科研成果转化为生产力的速度，科研成果应用率达到95.7%，促进了良种基地稳产和丰产，目前杉木良种基地单产居全国领先水平，实现了杉木、桉树、油茶、油桐、乌桕和柏木等树种造林良种化，提高了其他主要造林树种良种化水平，加速了全省造林良种化进程。

经省科委批准，1991年12月7~8日，由浙江省林业厅科教处主持，邀请了中国林科院副院长洪菊生研究员、林业部种苗管理总站站长王琪高级工程师、北京林业大学沈熙环教授、东北林业大学张培泉教授和南京林业大学王章荣教授等12位国内著名的遗传育种和管理专家，对项目进行了鉴定。专家们一致认为：该项目在推广实施过程中技术配套，组织严密，措施得当，基地规划布局合理，研究目的明确，管理体系科学，技术档案完备，质量把关严格，推广效益显著，为在一个省开展良种繁育和推广创出了一条新路。

(赵锦年)