

三种桉树菌根菌培养条件的研究*

弓明钦 陈羽 王凤珍

摘要 多根硬皮马勃 9215、彩色豆马勃 9216 及西澳粘滑菇 E4070 菌株是广东地区应用较多、效果也较好的菌根真菌,为摸清其培养条件,分别进行了适温范围、最适 pH 以及 C 源、N 源需求的测定。其结果表明:菌株 9216 适温范围最广,为 10~38 C,菌株 E4070 适温范围最窄,为 15~30 C;最适 pH 范围以 9215 菌株最广,为 3~7,菌株 E4070 最窄,仅为 5~7;除菌株 9216 不能利用有机 N 源中的牛肉膏及酵母浸膏外,其它 8 种 N 源均有不同程度的利用,9215 菌株对有机 N 利用较好,而 9216 菌株对氨态 N 利用较好;除 9215 菌株对果糖的利用较差外,其它 C 源差异不大,菌株 9216 对麦芽糖及葡萄糖利用较好,而 E4070 对 6 种 C 源利用效果差异不大。

关键词 桉树 菌根菌 培养条件

菌根菌彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch)及多根硬皮马勃(*Scleroderma polyrhizum* Pers.)是华南地区桉树林中比较常见的两种外生菌根菌^[1],而西澳粘滑菇(*Hebeloma westraliense* Bougher, Tommerup & Malajczuk)是近年从澳大利亚引进的桉树菌根菌种^[2]。这三种菌根菌生长较好,繁殖容易,应用较多,效果也较好,是桉树应用最有前途的菌根菌种^[3]。为了便于扩大繁殖及应用推广,我们开展了有关生物学特性的研究,分别对三个菌株的适温范围、最适 pH 范围,以及对不同的 C 源及 N 源利用情况进行测定,初步明确了三菌种生物学及营养的有关特性和要求。

1 材料及方法

1.1 供试菌种

彩色豆马勃 9216 菌株,分离自海南省隆缘桉(*Eucalyptus exserta* F. V. Murr.)林下的子实体。

多根硬皮马勃 9215 菌株,分离自广东西部尾叶桉(*E. urophylla* S. T. Blake)林下的子实体。

西澳粘滑菇 E4070 菌株,原产澳大利亚西部干热地区的赤桉(*E. camalgulensis* Dehnh.)林中^[2],由澳大利亚联邦科学与工业组织(CSIRO)N. Malajczuk 博士提供。

1.2 适是范围的测定

在消毒培养皿中倒入 MMN 培养基(Marx, 1969),冷却后每皿定量接入生长期一致的,0.25 cm² 大小的菌种 3 块,分别放入 8、10、15、20、25、30、35、38、40 C 条件下恒温培养,每种温

1995-05-04 收稿。

弓明钦研究员,陈羽,王凤珍(中国林业科学研究院热带林业研究所 广州 510520)。

* 本研究为中澳合作 9044 项目(1991~1994 年)及国家“八五”攻关子课题“桉树菌根应用技术研究”(1991~1995 年)部分内容,澳大利亚 CSIRO 的 N. Malajczuk 博士提供 *Hebeloma* 菌种,谨致谢意。

度处理重复 5 次,定期测定每个菌落直径(十字定向测量 2 次,取平均数)。

1.3 摇床培养试验

菌种的 pH 范围测定,C 源试验及 N 源试验均放置于 HYA 型恒温摇床上进行。采用 150 mL 三角瓶,每瓶装入培养液 75 mL,经高压消毒后每瓶接入相当于 2~4 mg/100 mL 菌丝体(干重)的培养菌块 3 小块,每处理 3~4 次重复,培养温度为 25~28 °C,摇床转速为 150 rpm,培养周期为 30 d。

1.3.1 pH 范围试验 从 pH3~8 共设 6 个梯度,相隔值为 1。将配好的 MN 培养液(MN 培养基不加琼脂)用 1 mol NaOH 调节 pH 值至试验值,装瓶后消毒,每瓶定量接入 3 小块同样大小的平板菌种(0.25 cm²/块),试验每处理重复 4 次,在摇床上振荡培养 30 d 后进行生物量测定。

1.3.2 N 源试验 将培养基中的氮源分别选用 8 种不同的有机或无机氮,同时设不加 N 源的处理为对照。其 N 源分别为 NH₄NO₃、NH₄Cl₂、KNO₃、NaNO₃、牛肉浸膏、蛋白胨、酵母浸膏及尿素等,每处理重复 3 次,按上述方法进行消毒、接种,并在摇床上进行恒温振荡培养 30 d,测定生物量。

1.3.3 C 源试验 将培养基中的 C 源分别选用葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉及糊精等 6 种,另设不加 C 源的培养基为对照,每处理重复 3 次,按前述方法进行消毒、接种,在摇床上恒温培养 30 d,按上述方法测定各菌种生物量。

1.3.4 生物量的测定 上述三个试验的菌种经摇床培养 30 d 后,分别将培养液进行过滤、抽提,滤出全部菌丝体,用无菌蒸馏水冲洗数次,将滤纸连同菌丝体放入 105 °C 干燥箱中烘干至恒重,同时设无菌丝体的滤纸相同处理以校正其纸重,在电子天平上称量并计算出各处理菌丝体的生物量。前述接种量计算也按此方法得出。

2 试验结果

2.1 三菌种适温范围测定结果

菌种适温范围测定结果(表 1)表明:三种菌根菌的适温范围明显不同,彩色豆马勃 9216 菌株的温度范围最广,为 10~38 °C,以 20~35 °C 为最适温度,10 °C 以下,38 °C 以上难以生长;多根硬皮马勃 9215 菌株温度范围为 15~35 °C,以 20~30 °C 为最适温度,15 °C 以下,30 °C 以

表 1 三菌种适温范围测定结果

菌种	测定项目	测定温度(°C)								
		8	10	15	20	25	30	35	38	40
9215	菌落萌动天数(d)	16	14	8	3	3	3	3	14	-
	菌落平均直径(cm)	+	+	0.9	1.88	2.5	3.64	1.12	+	
	菌丝体生长量(mm/d)			0.33	1.15	1.66	2.61	0.50		
9216	菌落萌动天数(d)	16	14	8	3	3	3	3	8	-
	菌落平均直径(cm)	+	0.8	1.18	1.76	2.1	2.24	1.76	1.22	
	菌丝体生长量(mm/d)		0.025	0.483	1.05	1.33	1.45	1.05	0.6	
E4070	菌落萌动天数(d)	16	14	6	3	3	3	11	-	-
	菌落平均直径(cm)	+	+	1.5	2.28	2.92	2.7	+		
	菌丝体生长量(mm/d)			0.83	1.48	2.01	1.83			

注:“+”表示菌落边缘菌丝体刚有萌动,“-”表示不萌动。

上难以生长;西澳粘滑菇 E4070 菌株温度范围最窄,为 15~30 ℃,以 20~30 ℃最适合,15 ℃以下,30 ℃以上难以生长。菌丝体生长情况表明,在适温范围内菌丝体生长浓密,较厚,长势旺盛;在高温条件下,菌丝体生长稀疏,菌丝层较薄。

2.2 三菌种对不同 pH 值的生长反应

三菌种在不同 pH 条件下生长反应结果表明:菌株 9215 对 pH 值的反应不敏感,适应范围较广,从 pH3.0~5.5 都能较好生长,菌丝体增殖倍数达 25~31 倍;菌株 9216 的 pH 值范围为 2.3~3.8,增殖倍数可达 58.13~64.25 倍,但以 pH2.8~3.8 为最好;菌株 E4070 的 pH 适应范围最窄,为 4.0~5.5,以 pH 为 4.5~5.0 为最好,菌丝体增殖倍数可达 39.5~42 倍(表 2)。

培养液 pH 值在 4 以下时,经灭菌后的 pH 值都略有升高,而 pH6 以下的培养液经灭菌后则 pH 值略有下降;pH3.8~5.4 的培养液经灭菌消毒后有少量沉淀产生,这些现象同前人^[3]研究结果是一致的。

表 2 三菌株对不同 pH 值的生长反应

培养液 pH		<i>Scleroderma</i> 9215				<i>Pisolithus</i> 9216				<i>Hebeloma</i> E4070			
灭菌前	灭菌后	培养后的 pH 值	菌丝体生长情况	菌丝体干重 (mg)	增殖倍数	培养后的 pH 值	菌丝体生长情况	菌丝体干重 (mg)	增殖倍数	培养后的 pH 值	菌丝体生长情况	菌丝体干重 (mg)	增殖倍数
3	3.5	3.0	A	51.52	25.63	2.3	B	92.75	46.38	3.0	B	51.0	25.0
4	4.5	3.5	B	62.0	31.00	2.8	B	128.5	64.25	3.7	B	50.75	25.38
5	5.0	4.5	C	50.75	25.38	3.0	B	98.75	49.37	4.0	C	79.0	39.5
6	5.5	5.0	C	53.5	26.75	3.8	C	116.25	58.13	4.5	C	84.0	42.0
7	6.0	5.5	D	50.5	25.00	4.8	D	58.0	29.0	5.0	C	83.0	41.5
8	6.5	6.0	E	29.75	14.87	5.4	D	53.0	13.25	5.5	D	61.25	15.31

注:A 为短绒状白色菌球;B 为短绒状淡黄色菌球;C 为短绒状褐色菌球;D 为短绒状黑褐色菌球;E 为短绒状橙黄色菌球。

2.3 不同 N 源利用的试验结果

不同 N 源利用试验结果表明,除菌株 9216 不能利用有机 N 源中的牛肉浸膏和酵母浸膏外,其余 N 源三菌株均可不同程度地利用(表 3)。菌株 9215 对氨态 N 的利用较其它 N 源为好,不仅菌丝体生长旺盛,增殖倍数也较高,达 49.9~51 倍,其次为硝态 N,菌丝体增殖倍数为 39.0~43.4 倍,在有机源中,以蛋白胨及酵母浸膏效果好,菌丝体增殖倍数为 31~43.8 倍,但

表 3 不同 N 源对三种菌根菌培养生长的影响

N 源种类	<i>Scleroderma</i> 9215					<i>Pisolithus</i> 9216					<i>Hebeloma</i> E4070				
	培养液颜色		菌丝体生长情况	菌丝体干重 (mg)	增殖倍数	培养液颜色		菌丝体生长情况	菌丝体干重 (mg)	增殖倍数	培养液颜色		菌丝体生长情况	菌丝体干重 (mg)	增殖倍数
	接种前	培养后				接种前	培养后				接种前	培养后			
硝酸铵	淡黄色	橙黄色	A	102.0	51.0	淡黄色	橙黄色	D	109.0	54.5	淡黄色	无色	B	99.7	33.2
氯化铵	淡黄色	橙黄色	A	99.7	49.9	淡黄色	橙黄色	D	92.3	46.2	淡黄色	无色	B	80.0	26.6
硝酸钾	淡黄色	黑褐色	A	86.7	43.4	淡黄色	黑褐色	E	125.0	62.5	淡黄色	无色	B	77.7	25.9
硝酸钠	淡黄色	黑褐色	A	78.0	39.0	淡黄色	黑褐色	E	123.0	61.7	淡黄色	无色	B	77.7	25.9
牛肉膏	黄色	未变	A	35.3	17.7	黄色	未变	—	—	—	黄色	暗褐色	B	121.3	40.4
蛋白胨	淡黄色	黄褐色	A	87.5	43.8	淡黄色	黄褐色	D	70.7	35.3	淡黄色	无色	B	96.3	32.1
酵母浸膏	棕黄浑浊	未变	A	62.5	31.3	棕黄浑浊	未变	—	—	—	棕黄浑浊	暗褐色	B	123.3	41.1
尿素	淡黄色	棕褐色	B	29.0	14.5	淡黄色	黄褐色	D	119.7	59.8	淡黄色	无色	B	135.0	45.0
对照(无 N 源)	淡黄色	未变	B	60.0	20.0	淡黄色	黄色	F	9.0	4.5	淡黄色	无色	C	51.0	17.0

注:A 为黄色棉球状;B 为白色棉球状;C 为白色片状;D 为黄褐色绒毛珊瑚状;E 为棕灰色绒毛珊瑚状;F 为黄色绒毛团状。

是,对牛肉浸膏及尿素的利用效果则较差;菌株 9216 的试验结果表明,对硝态 N 的利用比氨态 N 效果好,菌丝体增殖倍数最高,说明该菌对硝态 N 的利用能力强,对氨态 N 的利用虽然稍差,但菌丝体增殖倍数仍可达 46~54 倍,此外,对尿素的利用效果亦较好,而对蛋白胨的利用效果则稍差;而 E4070 菌株的试验结果表明,它对有机 N 源的利用效果,远远超过对无机 N 源的利用效果,菌丝体增殖倍数增幅较大,其中,以牛肉浸膏、酵母浸膏及尿素这三种 N 源效果最好,菌丝体增殖达 40~45 倍,而利用无机 N 源的处理,其增殖倍数仅 25~33 倍。无 N 源的对照处理,增殖倍数都较低,唯有菌株 9215 的牛肉浸膏及酵母浸膏两种 N 源处理,其菌丝体增殖倍数低于对照。

2.4 不同 C 源利用的试验结果

对三菌株不同 C 源利用情况试验表明,对供试的 6 种 C 源均有不同程度利用,对多糖类的可溶性淀粉及糊精的利用稍好,除果糖以外的其它 C 源的利用情况差别不大(表 4)。其中,菌株 9216 对麦芽糖及葡萄糖的利用较好,菌丝体增殖倍数分别为 115.5~71.4 倍,其次为可溶性淀粉、糊精及蔗糖等,但对果糖的利用较差。菌株 9215 与菌株 9216 对 C 源利用情况相似。菌株 E4070 对供试的几种 C 源的利用效果差异不大,但以蔗糖及可溶性淀粉效果稍好。无 C 源的对照处理,其菌丝体增殖倍数普遍较低,证明 C 源确实为这些真菌营养生长所需。

表 4 不同 C 源对三菌株生长的影响

C 源种类	<i>Scleroderma</i> 9215					<i>Pisolithus</i> 9216					<i>Hebeloma</i> E4070				
	培养液颜色		菌丝体生长情况	菌丝体干重(mg)	增殖倍数	培养液颜色		菌丝体生长情况	菌丝体干重(mg)	增殖倍数	培养液颜色		菌丝体生长情况	菌丝体干重(mg)	增殖倍数
	接种前	培养后				接种前	培养后				接种前	培养后			
葡萄糖	A	B	呈淡	69.7	34.9	A	A	呈深	142.2	71.4	A	A	呈白	75.5	25.2
果糖	A	B	褐色	45.2	22.6	A	D	褐色	91.0	45.5	A	A	色皱	65.5	21.8
麦芽糖	A	B	绒毛	69.0	34.5	A	D	绒毛	231.0	115.5	A	A	毛	75.5	25.1
蔗糖	A	B	状	67.0	33.5	A	A	状	104.0	52.2	A	A	状	85.5	28.5
可溶性淀粉	C	B	菌	78.7	39.4	C	D	菌	124.7	62.3	C	A	菌	77.7	25.9
糊精	C	B	丝	78.0	39.0	C	D	丝	111.0	55.5	C	A	丝	66.7	22.3
对照(无 C 源)	A	B	球	53.0	13.3	A	D	球	85.0	21.2	A	A	球	63.0	15.7

注:A 为淡黄色透明; B 为橙黄色透明; C 为白色浑浊; D 为暗橙色透明。

3 结 语

通过对三菌株(菌株)对温度、pH、N 源及 C 源等要求的测定,明确各菌株的不同条件要求,将为这些菌种的扩大繁殖提供基础。

(1)菌株 *Scleroderma* 9215,温度范围为 15~35 C,适温范围 25~30 C;对 pH 的反应不敏感,3.5~6.0 的范围内均可较好生长;对 N 源利用以氨态 N 效果为好,在有机 N 源中以蛋白胨、酵母浸膏效果好;该菌株除对果糖的利用稍差外,其余 5 种 C 源的利用均较好,尤以多糖类 C 源效果更好。

(2)菌株 *Pisolithus* 9216,温度范围为 10~38 C,以 20~35 C 最好,最适温度为 30 C;pH 范围 2.3~3.8,以 2.8~3.8 为最好;该菌株不能利用有机 N 源中的牛肉浸膏及酵母浸膏,同他人研究结果一致^[3],对无机 N 源的利用以硝态 N 效果优于氨态 N,这一点却与他人研究结果相反^[3,4],也许是由于菌株之间的差异;对 C 源的利用以麦芽糖及葡萄糖的效果好,对果糖利用的效果差,这同他人研究结果一致,此外,对多糖类 C 源的利用效果也较好。

(3)菌株 *Hebeloma* E4070 的温度范围最窄,为 15~30 C,最适温度为 25~30 C;pH 适应范围也最窄,为 4.0~5.5,最适 pH 为 4.5~5.0;对 N 源的利用以有机 N 源为好,无机 N 源次之,有机 N 源中以牛肉浸膏、酵母浸膏及尿素等效果好;该菌对供试的 6 种 C 源均可利用,但以蔗糖及可溶性淀粉效果稍好些。

参 考 文 献

- 1 弓明钦,陈羽,王凤珍. 桉树幼苗菌根接种及其生长效应的研究. 林业科学研究,1992,5(6):639~645.
- 2 Bougher N, Malajczuk N. Ectomycorrhizas of *Casuarina* and *Eucalyptus*. CSIRO Division of Forestry and Forest Products, Western Australia 6014, Canberra: Australia Center for International Agricultural Research, 1989, 1~405.
- 3 裴致达,陈连庆. 马尾松共生菌(*P. t.*)的增殖培养条件. 林业科学研究,1992,5(2):231~234.
- 4 郭秀珍,毕国昌. 林木菌根及应用技术. 北京:中国林业出版社,1989.

A Study on Environmental Condition for the Growth of 3 Species of *Eucalyptus* Mycorrhizal Fungi

Gong Mingqin Chen Yu Wang Fengzhen

Abstract The results of the study on environmental condition for the growth of 3 species of *Eucalyptus* mycorrhizal fungi, *Scleroderma* 9215, *Pisolithus* 9216, *Hebelima* E4070 showed that isolate 9216 had the widest suitable temperature range for growth, from 10 to 38 C, and isolate E4070 had the narrowest suitable temperature range for growth, from 15 to 30 C; isolate 9215 had the widest suitable pH range, from 3 to 7, and isolate E4070 had the narrowest suitable pH range, from 5 to 7. Except that isolate 9216 could not use organic N from beef extract and yeast extract, the others could use 8 kinds of N resource at different levels, and isolate 9215 could use organic N better than other N resources, isolate 9216 could use ammonia N better than nitrate N as to the use of C, except that fructose could not be used well by isolate 9215, the difference of C resources to isolate 9215 was not obvious; maltose and glucose were quite good for isolate 9216, and there was no difference between 6 kinds of carbon resource to isolate E4070.

Key words *Eucalyptus* ectomycorrhizal fungi cultural condition

Gong Mingqin Professor, Chen Yu, Wang Fengzhen (The Research Institute of Tropical Forestry, CAF Guangzhou 510520).