

文章编号:1001-1498(2004)02-0246-05

红汁乳菇菌种分离培养及其 对马尾松苗木生长效应研究

刘君昂

(中南林学院,湖南 株洲 412006)

摘要:红汁乳菇菌种分离实验表明,红汁乳菇可通过组织分离获得纯菌,不同地域的红汁乳菇子实体在相同条件下进行分离时,菌丝生长的快慢不同。红汁乳菇一级菌种培养时,菌丝在 PDA、MMN、酵母葡萄糖酸钙培养基上生长较快和旺盛,菌丝在 MS、查氏、蛋白胨培养基上生长缓慢,且生长很弱。用液体培养的红汁乳菇接种马尾松幼苗可形成菌根化苗,苗木菌根形成率为 73.3%,且菌根明显促进马尾松苗木生长。马尾松菌根化苗可以提高马尾松苗出圃率及造林成活率,促进马尾松生长,为实现红汁乳菇的半人工栽培提供基础。

关键词:红汁乳菇菌种;分离培养;马尾松;苗木;生长效应

中图分类号:S791.248 **文献标识码:**A

红汁乳菇(*Lactarius hatsudake* Tanaka)是一种菌根食用菌,隶属红菇科(Russulaceae)、乳菇属(*Lactarius* DC. ex Gray),常于春末夏初和秋末冬初散生于马尾松林地上。红汁乳菇肉质细嫩,味道鲜美独特,营养丰富,可制作菌油;其提取物对肉瘤 180 和艾氏腹水癌有抑制作用^[1~4],该菌产生的乳菇紫素可起抗菌作用^[5]等。由于菌根是菌根植物的根专性或非专性的与菌根菌所形成的共生体^[6~8],因此,分离、培养其中一些真菌十分困难,特别是使其形成子实体就更为困难^[9]。红汁乳菇与马尾松共生形成的菌根,有特殊的生态条件、营养方式和子实体分化发育条件,人工栽培有很大的难度。市场供应全依赖于野生采集,由于市场紧缺,过度采伐,导致产地自然资源破坏严重,产量逐渐减少。为保护野生菌根资源并合理开发应用,人工驯化栽培是当务之急^[10]。分离制作母种,是野生菇人工栽培的首要环节。

红汁乳菇的菌丝能与马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)、云杉(*Picea asperata* Mast.)等针叶树形成菌根,增强植物防病、抗污染、抗严寒、抗干旱能力^[11],促进林木生长,同时可生产红汁乳菇。

1 材料与方法

1.1 红汁乳菇子实体

6个不同地域的新鲜子实体,有两种颜色(灰绿色红汁乳菇子实体、橘红色红汁乳菇子实体)。

收稿日期:2003-09-08

基金项目:湖南省自然科学基金项目[01JJY2076]研究部分内容

作者简介:刘君昂,男,湖北钟祥人,副教授,在职博士生。

1.2 马尾松的种子

来源于湖南省林业科学研究院。

1.3 供试培养基

1.3.1 子实体组织分离培养基 PDA 培养基。

1.3.2 一级斜面培养基 PDA 综合培养基、松针 PDA 综合培养基、松针 MS 培养基、松针查氏培养基、松针蛋白胨培养基、改良的 MMN 培养基、松针 MMN 培养基。

1.3.3 液体种子培养基 改良的 PDA 液体培养基,将 50 mL 液体培养基装入 150 mL 的三角瓶。

1.4 菌种的分离

采用食用菌菌种组织分离法。

1.5 菌种培养基筛选

将不同培养基配制成一级培养基平板,在预先培养好的母菌落边缘,用孔径为 6 mm 的灭菌打孔器打成 28 mm^2 大小的圆形菌块,接种在不同培养基平板中央。25 ~ 28 °C 恒温培养 15 d,在两个固定的垂直方向测量菌落的直径,比较红汁乳菇菌丝在各种培养基上的生长情况。

1.6 马尾松苗木的菌根合成

1.6.1 马尾松无菌苗的培养 马尾松种子经去杂后用高锰酸钾进行表面消毒,然后用升汞灭菌,再用无菌水仔细漂洗。用镊子将消毒后的种子排列到经灭菌并装有湿滤纸的培养皿中,放在 20 ~ 25 °C 的培养箱中催芽。当根长达 1 cm 左右时即可播入灭菌培养基质(红壤 珍珠岩 = 1:1)中(培养马尾松的花盆先灭菌。培养马尾松的基质装入塑料袋中进行灭菌,灭菌后装入灭菌的花盆内)。播种在无菌条件下进行,每个花盆播 4 行,中间两行每行 5 株,另两行每行 3 株,行距和株距都是 5 cm,不接菌种作为对照。

1.6.2 接种 将培养 7 ~ 10 d 的斜面菌种,接入种子培养基的三角瓶中,进行液体振荡培养 10 ~ 15 d 后,接种马尾松无菌苗,然后喷少量的 MMN 营养液。对照不接种红汁乳菇。

1.7 苗期管理

待苗木出齐后,每隔 15 d 浇 1 次灭菌的 MMN 营养液,每盆 200 mL 左右。在气温高、气候干燥时,每天浇 1 次无菌水;室温保持 15 ~ 25 °C。苗木栽培 150 d 后起苗,每处理随机取苗 50 株,在显微镜下观测有无菌根形成以及菌根形态,统计其菌根感染率;分别测量苗高、地径、鲜质量、干物质量,并计算各指标的单株平均值。

2 结果与分析

2.1 红汁乳菇菌种的分离

从 6 个不同地域的红汁乳菇子实体中取组织,用 PDA 培养基进行组织分离培养。表 1 表明:来自不同地域的红汁乳菇子实体其生长出菌丝体所需的天数不同,橘红色的红汁乳菇子实体的分离要比灰绿色的子实体容易,受污染的程度小且长出菌丝体所需时间要短。选取 A1 菌株进行斜面菌种培养。

2.2 不同培养基对红汁乳菇菌丝生长的影响

从表 2 可看出:红汁乳菇菌丝在 PDA、松针 PDA、松针查氏、MMN、松针 MMN、松针酵母葡萄糖钙培养基上,菌丝生长比较迅速,且生长旺盛,它们是培养红汁乳菇较好的培养基。其中

松针酵母葡萄糖钙是菌丝生长最佳培养基,酵母葡萄糖钙次之。红汁乳菇菌丝在加了松针汁的培养基上生长要比不加松针煮出汁的同一种培养基上旺盛,生长速度也明显加快。因此,松针煮出汁在红汁乳菇培养中有促进菌丝生长的作用。

表 1 不同地域红汁乳菇菌株分离情况

菌株	子实体来源	子实体颜色	菌丝始萌时间/ d	菌丝生长特征
A1	湖南醴陵	灰绿色	6	菌丝浅黄色,放射状平铺,很密,部分呈绒毛状向上生长
A2		橘红色	4	菌丝淡黄色,放射状平铺,较密,菌丝很细,呈绒毛状
B1	湖南新化	灰绿色	5	菌丝浅黄色,放射状平铺,稠密,部分呈绒毛状向上生长
B2		橘红色	4	菌丝淡黄色,放射状平铺,较密,气生菌丝很细,呈绒毛状
C1	湖南怀化	灰绿色	7	菌丝浅黄色,放射状平铺,较密,部分呈绒毛状向上生长
D2	湖南株洲	橘红色	4	菌丝淡黄色,放射状平铺,菌丝束细,气生绒毛状菌丝多
E1	湖南永州	灰绿色	4	菌丝浅黄色,放射状平铺,较密,向上生长菌丝绒毛状
F1	江西萍乡	灰绿色	8	菌丝浅黄色,放射状平铺,菌丝束较粗,气生菌丝绒毛状

表 2 不同培养基对红汁乳菇菌丝生长的影响

培养基	始萌时间/ d	菌落直径/ cm	气生菌丝形态
PDA	4	2.4	菌丝放射状平铺,较密,少许菌丝绒毛状向高生长
松针 PDA	3	3.0	菌丝放射状平铺,较密,有较多的菌丝绒毛状向高生长
MS	10	0.8	菌丝放射状平铺,较稀,长出少许绒毛状菌丝
松针 MS	5	1.0	菌丝放射状平铺,较稀,少许菌丝绒毛状向高生长
查氏	4	1.2	气生菌丝极稀
松针查氏	3	2.8	菌丝放射状平铺,较稀,菌块上有少许菌丝毛发状向高生长
蛋白胨	7	1.0	菌丝放射状平铺,较稀,菌块上有少许菌丝毛发状向高生长
松针蛋白胨	7	1.2	菌丝放射状平铺,较稀,菌块上有浓密的菌丝毛发状向高生长
MMN	2	2.2	菌丝放射状平铺,较稀,菌块少许菌丝毛发状向高生长
松针 MMN	2	2.9	菌丝放射状平铺,较密,菌块上有许多菌丝毛发状向高生长
酵母葡萄糖钙	2	3.1	菌丝放射状平铺,较密,少许菌丝呈绒毛状向高生长
松针酵母葡萄糖钙	2	3.3	菌丝放射状平铺,较密,很多菌丝呈绒毛状向高生长,菌块上也有很多菌丝绒毛状向高生长。

2.3 红汁乳菇人工接种马尾松苗木

人工接种红汁乳菇菌丝液后,马尾松苗木在无菌的容器土壤中生长繁殖,菌丝体接触马尾松幼根时,两者发生共生关系,形成珊瑚状分叉的外生菌根(图 1)。接种红汁乳菇的苗木菌根感染率达 73.3%,而对照容器土壤无菌根菌干扰,一直处于非菌根化状态,起苗时菌根感染率为 0,见表 3。

2.4 红汁乳菇对马尾松苗木生长的影响

红汁乳菇与马尾松具有较强的共生性,与苗木根系形成菌根后扩大根系面,增加根系的吸收能力,加速苗木生长。从表 3 可以看出,培养 150 d 的菌根化苗木高生长可达 12.1 cm,比对照苗木提高 19.8%;地径增 0.84 mm,提高 27.3%;鲜质量提高 73.3%,干质量提高 200%。红汁乳菇与马尾松形成菌根能力强,在马尾松容器育苗实验中菌根形成率为 73.3%,明显促进了马尾松苗木的生长。从植株生长势来看,接种处理的苗木叶色浓绿,根系发达,苗木粗壮;而对照苗木矮小,叶色青黄,根系不发达。

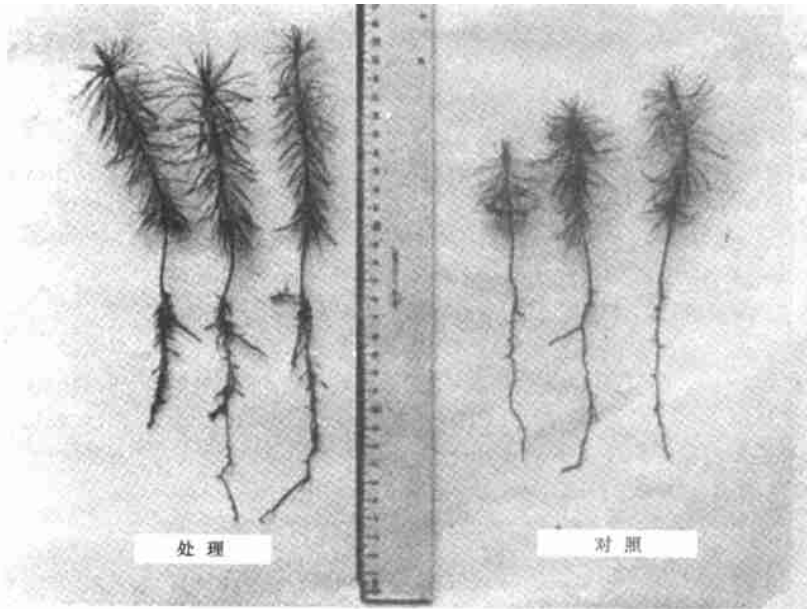


图 1 马尾松菌根化苗和非菌根化苗

表 3 红汁乳菇对马尾松苗木生长的影响

苗木种类	苗高		地径		鲜质量		干质量		菌根
	平均值/cm	提高率/%	平均值/cm	提高率/%	平均值/cm	提高率/%	平均值/cm	提高率/%	感染率/%
菌根化苗木	12.1	19.8	0.84	27.3	0.312	73.3	0.156	200	73.3
(对照)	10.1	0	0.66	0	0.180	0	0.052	0	0

3 小结与讨论

(1) 红汁乳菇菌种分离实验表明, PDA 是分离红汁乳菇较好的培养基, 红汁乳菇可以通过组织分离获得纯菌, 但必须以新鲜的、无病虫害的子实体作为分离材料, 分离成功率与消毒的方式及培养基中抗生素的含量有关。不同地域的红汁乳菇子实体在相同条件下分离, 菌丝生长的快慢不同, 并且两种颜色差异大的子实体分离的难易程度不同。

(2) 红汁乳菇一级菌种培养显示, 菌丝在 PDA、MMN、酵母葡萄糖钙培养基上生长较快, 菌丝生长旺盛, 在这些培养基中加入松针煮出汁, 菌丝生长速度都有不同程度的加快, 说明松针煮出汁中某种成分能促进红汁乳菇的生长。

(3) 红汁乳菇与马尾松苗木根系合成菌根后, 苗木生长明显增长。因菌根形成扩大了根面积, 能将更多的水分、养分吸收到菌根中来, 供马尾松苗木利用; 而红汁乳菇在共生生活中, 分泌多种生长激素, 刺激苗木生长; 红汁乳菇还产生抗生素, 增强苗木的抗逆性^[2,6], 这些作用都促进了苗木的快速生长。

(4) 用液体培养的红汁乳菇用于马尾松育苗, 形成的菌根化苗木可使马尾松苗提高出圃率。同时, 粗壮的菌根化苗木对环境的适应性也相对强一些, 能提高造林成功率。用马尾松菌根化苗造林, 既促进马尾松生长, 又可进行红汁乳菇的半人工化栽培, 达到红汁乳菇驯化栽培目的, 使林木和红汁乳菇生产并举, 为林业生产的多种经营提供新的途径。

参考文献:

- [1] 方平夷. 红汁乳菇的纯种分离和驯化栽培[J]. 食用菌, 1994, (3): 10
- [2] 郭嘉铭, 上官舟建, 陈景潮. 药用真菌的研究与开发概述[J]. 中国食用菌, 1994, 13(3): 9
- [3] 柯丽霞. 红汁乳菇和多汁乳菇的化学成分及其开发利用前景[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 2000, 23(4): 391 ~ 394
- [4] 莫美华, 马红梅. 红汁乳菇生态习性及应用前景[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2003, 21(1): 56 ~ 59
- [5] Lewis D H. Concepts on fungal nutrition and the origin of biotrophy[J]. Biol Rev, 1973, 48: 261 ~ 278
- [6] 弓明钦. 西澳滑菇在尾叶桉上的菌根合成[J]. 林业科学研究, 1995, 8(1): 11 ~ 13
- [7] 刘建成, 陈先玉, 李文艺. 湘西红汁乳菇的分布及生态研究[J]. 中国食用菌, 1995, 14(6): 37 ~ 38
- [8] 陈应龙, 弓明钦, Mark Brundrett, 等. 蓝桉和尾叶桉混合菌根研究. 菌根合成及真菌间的相互作用[J]. 林业科学研究, 1999, 12(5): 452 ~ 460
- [9] Chen YL, Gong M Q, Wang F Z, et al. Diversity and colonization of putative mycorrhizal fungi in Eucalyptus plantations in southern China [J]. Forestry Studies in China, 2000, 2(2): 34 ~ 42
- [10] 童竞新. 纯培养彩色豆马勃菌丝体接种国外松研究初报[J]. 林业科学, 1983, 19(3): 332
- [11] Bucking H, Heyser W. The effect of ectomycorrhizal fungi on Zn uptake distribution in seedlings of *Pinus sylvestris* L. [J]. Plant and Soil, 1994, 167: 263 ~ 272

Study on Isolation Culture of *Lactarius hatsutake* and Its Effects on Growth of Masson Pine Nursery Stock

LIU Jun ang

(Central-South Forestry University, Zhuzhou 412006, Hunan, China)

Abstract: The results showed that PDA was a more suitable medium for isolation culture of *Lactarius hatsutake*. Through tissue separation, the pure mycelium could be obtained. When fruit bodies of *L. hatsutake* from different districts isolated at the same condition, the growth velocity of mycelium was different. Mycelia grew faster on PDA, MMN, Yeast-glucose-gallium, while slowly and weakly on the medium of MS, Cha, and peptone. Using liquid ferment Mycelia of *L. hatsutake* as inoculum to nursery stock of Masson Pine, mycorrhizal seedling could be formed. Formed mycorrhiza could improve the growth of Masson Pine, and achieve the aim of taming culture, which will provide a new way for multi-management of forest production.

Key words: *Lactarius hatsutake*; pure mycelium; *Pinus massoniana*; nursery stock; growth effects