

马尾松优良菌根真菌(*S. l*)液培条件的研究*

陈连庆 裴致达

关键词 马尾松 褐环乳牛肝菌 液培条件

作者经过对褐环乳牛肝菌[*Suillus luteus* (L. ex Fr.) Gray]的一系列研究,业已证明它是我国亚热带地区特有树种马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)共生的优良菌根真菌。它具有生长快速、繁殖容易、拮抗性、适生范围广、制剂简便、菌根效益显著等特点,是马尾松菌根应用大有前途的真菌^[1,2]。为了对其进行开发利用,作者对该菌株有关生物学特性、营养条件及其最适范围等进行了研究,现将结果报道如后。

1 材料与方 法

1.1 材 料

褐环乳牛肝菌(简称*S. l*),取自浙江富阳虎山马尾松林下,经子实体分离、培养而获得,编号9108菌株。

培养液采用改良的菌根真菌合成培养基配方^[3]。

1.2 方 法

1.2.1 接种物的制备 取*S. l*菌试管种,接入基础培养液中,间歇培养,制备成试验接种物。

1.2.2 平板适温范围测试 向灭过菌的培养皿倒入培养液(厚度3mm),接入同龄定量的菌种块(约4mm²)静置于10、15、20、25、30、35、40 7级梯度恒温箱中,每个梯度重复6次,隔2d测定每个菌落直径。

1.2.3 pH梯度试验 在pH3~8间,分11级梯度,级间差为0.5,3次重复。培养液装瓶灭菌后,用无菌的酸碱溶液调节pH,使之达到试验值。接种后置HSZ-1型生物液体培养振荡台上,进行间歇培养。根据预备试验(菌丝体生长曲线),取生物量最大值的天数(10d)作为培养周期。培养10d后,分别测定同温下(23)各处理菌丝体生长量。

1.2.4 N源试验 分别以(NH₄)₂SO₄、(NH₄)₂HPO₄、NH₄NO₃、KNO₃所提供的无机态N和脲、酒石酸铵、甘氨酸、谷氨酸所提供的有机态N,为培养基的N源,并设无N源为对照。探索不同N源对*S. l*菌菌丝体生长的影响,3次重复。无N基础培养基配方为:葡萄糖10g、KH₂PO₄1g、MgSO₄0.5g、VB₁微量、水1000mL。在pH值5.0、温度23 条件下,进行培养。

1.2.5 C源试验 分别以葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乙醇、甘露醇、可溶性淀粉、糊精为培养基的C源,另设无C源为对照进行对比试验,3次重复。基础培养基去掉葡萄糖C源,换上酒石酸铵N源,其它成分不变。按以上方法进行接种培养,最后测定菌丝体生物量。

1997—11—19收稿。

陈连庆副研究员,裴致达(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

* 本文系国家“八五”攻关子课题“马尾松菌根应用技术研究”的部分内容。

1.2.6 C/N 试验 将培养基中的 C 源(葡萄糖)与 N 源(酒石酸铵),按预计比例进行配制,设 C/N 分别为 10、20、30、40、50,进行对比试验,3 次重复。按上述方法进行培养,最后测定菌丝体生物量。

1.2.7 菌丝体生物量测定 除温度试验外,其它各试验每 250 mL 三角瓶中,加入培养液 100 mL,接种量(母种)为 1 mg 菌丝体(干重),经 10 d 增殖培养后,通过抽提、过滤、无菌水冲洗,排出一切有机物的干扰,于 105℃ 烘干至恒重。最后计算每百毫升培养液中,产生的菌丝体干物质重量。

2 结果与分析

2.1 温度对 *S. l* 菌菌丝体生长的影响

液培 *S. l* 菌菌丝体对温度的适应范围较广,在 10~35℃ 之间,*S. l* 菌均能萌动并不同程度地增殖生长,适宜的生长温度在 20~30℃ 之间。25℃ 为最适宜温度,此温度下平均每天增殖生长长度达 3.55 mm(表 1)。当培养温度高达 40℃ 时,*S. l* 菌菌丝体萎缩枯黄而死亡,这是该菌生活的上限温度。在适温区,其菌落洁白,气生菌丝浓密茁壮。

2.2 pH 值对 *S. l* 菌菌丝体生长的效应

pH 值在 3~8 之间 *S. l* 菌都能生长,其适生范围较广,尤以 pH 值为 4~4.5 时最佳,

表 2 不同 pH 值条件下 *S. l* 菌菌丝体的生长状况

培养液 pH	菌丝体形状	菌丝体干重 (mg)	增殖倍数
3.0	云片状	30.7	30.7
3.5	云片状	52.7	52.7
4.0	云片状	79.1	79.1
4.5	云片状	73.6	73.6
5.0	云片状	65.4	65.4
5.5	球状	53.6	53.6
6.0	球状	44.8	44.8
6.5	球状	44.3	44.3
7.0	云片状	44.2	44.2
7.5	云片状	43.5	43.5
8.0	云片状	43.2	43.2

同含 C 物质供 *S. l* 菌吸收利用。结果(表 3)表明:可溶性淀粉所提供的 C 源最易被 *S. l* 菌吸收利用,菌丝体增殖倍数可达 52.1 倍,是无 C 源(对照)处理菌丝体增殖量的 11.17 倍。*S. l* 菌对各种 C 源利用效果排序依次是:可溶性淀粉、果糖、葡萄糖、糊精、蔗糖、麦芽糖、乙醇、甘露醇。无 C 源对照处理,菌丝体增殖只有 4.7 mg(干重),培养基中缺乏 C 源大大抑制了菌丝体的生长繁殖。

表 1 不同温度下 *S. l* 菌生长状况

温度 (°C)	开始萌动时间 (d)	菌丝颜色	菌落直径 (cm)	菌丝增长量 (mm/d)	菌丝形态
10	10	白色	0	0	菌丝刚萌动
15	3.5	白色	1.10	1.10	疏绒状
20	2.5	白色	2.35	2.35	密絮状
25	1.5	白色	3.55	3.55	浓密絮状
30	1.5	白色	3.10	3.10	浓密絮状
35	1.5	白色	0.60	0.60	疏绒状
40	-	-	-	-	-

注:接种量(干重)为 1 mg/100 mL,培养周期为 10 d,表 2~5 同。

菌丝体增殖倍数达 73.6~79.1 倍(表 2),当 pH 值从 3 向 4 过渡时,*S. l* 菌菌丝体急剧增殖,并达到最高值,当 pH 值超过 4 以后,菌丝体的增殖开始减缓,当 pH 值升到 6 以后至 8 时,其菌丝体生长量缓慢下降。对照作者以前所做的 *P. t* 菌液培试验结果^[4],发现 *S. l* 菌适生 pH 值范围要比 *P. t* 菌宽得多。这也正好说明为何在我国南北方不同 pH 土壤上,均可广泛居生 *S. l* 菌的原因。

2.3 C 源对 *S. l* 菌菌丝体增殖效应

C 源是 *S. l* 菌生活的重要营养和能量来源^[5]。在无 C 基础培养基中,分别加入 8 种不

表 3 不同 C 源对 *S. l* 菌菌丝体生长的影响

C 源种类	培养后 培养液颜色	菌 丝 体		菌丝体干重 (mg/100 mL)	增殖倍数
		颜色	形状		
葡萄糖	透明无色	乳白	片絮	33.8	33.8
果糖	透明土黄色	土白	丝絮	35.0	35.0
蔗糖	透明无色	乳白	片絮	26.0	26.0
麦芽糖	透明无色	乳白	丝絮	24.8	24.8
乙醇	透明无色	乳白	团絮	18.0	18.0
甘露醇	透明浅土色	白	团絮	17.2	17.2
可溶性淀粉	透明无色	乳白	丝片絮	52.1	52.1
糊精	透明无色	乳白	丝片絮	28.5	28.5
CK	透明无色	乳白	片絮	4.7	4.7

2.4 N 源对 *S. l* 菌菌丝体的增殖效应

N 是 *S. l* 菌合成蛋白质和核酸的重要营养元素^[5]。不同 N 源对 *S. l* 菌菌丝体的增殖生长, 表现出不同的效果。从表 4 中可以看出: *S. l* 菌吸收利用有机态 N 比无机态 N 的效果要好, 无机态的氨态 N 利用效果又好于硝态 N。*S. l* 对 KNO_3 提供的 N 源吸收利用效果最差, 增殖量(干重)只有 6.2 mg/100 mL, 比无 N 源(对照)还少 3 mg/100 mL, 是否有抑制因素干扰, 有待进一步研究; 谷氨酸所提供的有机态 N 源效果最佳, 菌丝体增殖量达 33.4 mg/100 mL, 是对照的 3.63 倍; 磷酸氢二铵所提供的 N 源和脲所提供的 N 源, 分别使 *S. l* 菌菌丝体增殖 25.2 倍和 22.4 倍。该 3 种 N 源可谓 *S. l* 菌液培较好的 N 源。

表 4 N 源对 *S. l* 菌菌丝体的增殖效应

N 源种类	培养后 培养液颜色	菌 丝 体		菌丝体干重 (mg/100 mL)	增殖倍数
		颜色	形状		
硫酸铵	无色透明	白色	绒絮	20.1	20.1
磷酸氢二铵	浅褐色透明	褐白	绒球	25.2	25.2
硝酸铵	无色透明	白色	云絮	18.2	18.2
硝酸钾	无色透明	白色	丝絮	6.2	6.2
脲	浅褐色透明	白色	丝球	22.4	22.4
酒石酸铵	浅黄色透明	褐白	绒球	21.3	21.3
甘氨酸	无色透明	白色	绒球	21.8	21.8
谷氨酸	无色透明	白色	丝絮	33.4	33.4
CK	无色透明	白色	丝絮	9.2	9.2

2.5 C/N 对 *S. l* 菌增殖生长的影响

C、N 营养元素的不同配比, 也是影响 *S. l* 菌菌丝体增殖生长的重要因素之一。试验结果(表 5)说明: C、N 配比适当, 可以互相促进吸收, 加速菌丝体的增殖, 相反, C/N 的比例失调, 只能使 *S. l* 菌增殖生长减缓。当 C/N 等于 20:1 时, *S. l* 菌菌丝体增殖量最大, 达到 49.1 mg(干重)/100 mL; 当 C/N 值小于或大于 20:1 时, 对 *S. l* 菌菌丝体的生长繁殖均呈现减缓的走势。故选择适当的 C、N 源后, 还必须重视两者的合理比例。

综上所述, *S. l* 菌菌丝体对温度适应范围较广, 10~35℃ 间均能增殖生长, 20~30℃ 为适宜温度, 25℃ 为最适温度。*S. l* 菌在 pH 3~8 范围中, 均能增殖生长, 最适 pH 值为 4~4.5。*S. l* 菌对所提供的单糖、双糖、多糖和醇类 C 源, 均能不同程度地吸收利用, 利用效果优劣次序依

表 5 不同 C/N 条件下 *S. l* 菌菌丝体生长状况

C/N	培养后培养液颜色	菌丝体形状	菌丝体干重 (mg/100 mL)	增值倍数
10 1	浅黄透明	绒片	37.1	37.1
20 1	浅黄透明	长绒片	49.1	49.1
30 1	浅黄透明	大绒片	38.1	38.1
40 1	浅锈透明	大绒片	34.7	34.7
50 1	浅锈透明	绒片	33.5	33.5

注: 菌丝体颜色均为乳白色。

次为: 可溶性淀粉、果糖、葡萄糖、糊精、蔗糖、麦芽糖、乙醇、甘露醇。*S. l* 菌对有机态 N 和无机态 N (硝酸钾例外), 都能不同程度地吸收利用, 促繁效果最突出的当属谷氨酸。*S. l* 菌对 C/N 有一定要求, 当其比例适当时, 促繁效果显著, 尤以 C/N 为 20 1 时效果最好。

参 考 文 献

- 1 陈连庆. 马尾松共生菌根真菌调查研究. 林业科学研究, 1989, 2(4): 357 ~ 362.
- 2 陈连庆, 裴致达. 马尾松容器育苗菌根化对苗木生长及基质的影响. 林业科学研究, 1995, 8(1): 44 ~ 47.
- 3 俞大绂. 植物病理学和真菌技术汇编. 北京: 人民教育出版社, 1975.
- 4 裴致达, 陈连庆. 马尾松共生菌(*P. i*) 的增殖培养条件. 林业科学研究, 1992, 5(2): 231 ~ 234.
- 5 杨庆尧. 食用菌生物学基础. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.

A Study on the Liquid Cultural Conditions for a Mycorrhiza Fungi (*S. l*) with *Pinus massoniana*

Chen Liangqing Pei Zhida

Abstract *Suillus luteus* (L. ex Fr.) is a superior mycorrhiza fungi being symbiosis with *Pinus massoniana* in the subtropical area of China. The fungi is widely distributed and has been effectively applied to the pine. In order to examine the liquid cultural conditions of the *S. luteus*, the temperature, pH, carbon-sources, nitrogen-sources and C/N for the growth and the propagation of the fungi were tested in the study. The results showed that for the growth and propagation of the hyphae of the strain *S. l*, the suitable temperature range was 20 ~ 30 °C, the optimum 25 °C; the suitable pH was 3 ~ 8, the optimum 4 ~ 4.5. All the carbon-sources tested can be absorbed (glucose, fructose, saccharose, amylo maltose, ethanol, mannitol, soluble starch, dextrin) but the optimum was soluble starch; all the nitrogen-sources [(NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄NO₃, KNO₃, Urea, tartaric acid, aminoacetic acid, glutamic acid], except inorganic nitrogen (KNO₃), can be absorbed but the optimum was glutamic acid. A wider range of C/N was effective but the optimum was 20 1.

Key words *Pinus massoniana* *Suillus luteus* liquid cultural condition