

文章编号: 1001-1498(2000) 04-0410-06

两个松茸菌株培养条件的研究*

陈羽, 王凤珍, 陈应龙, 弓明钦

(中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要: 对两个松茸菌株培养条件研究的结果表明, 在适温范围、最适 pH 范围、C 和 N 源利用以及维生素等生长物质的作用结果等方面, 两个菌株之间存在差异。9924 菌株适温范围较 99606 菌株宽, 为 10~25℃, 后者为 15~25℃; pH 值范围仍以 9924 菌株为宽, 为 3.5~7.5, 而 99606 菌株为 4.5~5.5; 对 C 源的利用, 9924 菌株以葡聚糖为最好, 其次为葡萄糖、果糖、麦芽糖、淀粉等, 而 99606 菌株以玉米粉为最好, 其次是葡萄糖、糊精、麦芽糖、蔗糖、乳糖和淀粉等; 对 N 源的利用, 两个菌种都不能利用磷酸氢二铵和尿素, 但都可利用硫酸铵、氯化铵、硝酸铵以及蛋白胨等, 9924 菌株利用酵母浸膏效果好, 而 99606 菌株则不能利用; 维生素类生长物质对两个菌种均有促生效果, 特别以 99606 菌株的效果好, 其中以天门冬氨酸、烟酸、叶酸以及维生素 B₆、B₁ 的促生效果较突出。

关键词: 松茸; 菌株; 培养条件

中图分类号: S718.81

文献标识码: A

松茸(*Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing.) 学名松口蘑, 又叫松蕈、鸡丝菌等, 是世界上最名贵的野生食用菌之一, 也是一种可与多种树木根系共生的著名菌根真菌。松茸是亚洲地区的特有种, 主要分布在日本、朝鲜半岛以及我国东北、西南和台湾等地区^[1]; 松茸在国际市场上价格十分昂贵, 每千克鲜品约 120~150 美元, 甚至更高。日本是松茸的主要消费国, 在历史上松茸向来是百姓效忠天皇的贡品, 在现代消费者餐桌上的松茸则是地位与富有的象征。据估计, 日本每年消耗的松茸约 5 000~7 000 t。

近年来, 国际市场对松茸的需求不断增加, 而国内外松茸产量却连年下降。早在 40 年代, 日本本土年产鲜松茸高达 12 000 t^[2], 之后其产量一落千丈, 到了 90 年代年产量仅有 400~500 t, 远远满足不了市场的需求。国内情况也是如此, 以云南省为例, 在松茸主产区的中甸县, 年均产量以 5% 的速度下降, 1997 年该县仅收购松茸 300 t, 比 1996 年的 500 t 少了 200 t, 减产幅度达 40%^[3]; 其它产区如楚雄、丽江等地也有类似现象。照此下去不用多少年云南许多地方将再无松茸可采。为此, 国内外的科学家们对松茸都进行了广泛而深入的研究。我国的松茸研究大大滞后于其它国家, 80 年代至今, 多数研究仅限于松茸分类或生态分布及生长环境等方面^[4~7], 对松茸菌本身的研究较少。韩桂云等^[8]曾报道过对东北松茸培养条件的研究, 除此以外国内其它相关报告则少见。

松茸是一种较难分离且生长极慢的菌种, 研究松茸菌种培养条件, 不仅是为了解松茸生物学及生理学特性的需要, 也是菌种分离及人工培养的需要, 是开展松茸研究的基础性工作。通

收稿日期: 1999-05-10; 修回日期: 1999-09-21

基金项目: 国家林业局重点项目(95-07-02)“松茸人工促繁及半人工模拟合成研究”的部分内容

作者简介: 陈羽(1965-), 女, 海南文昌人, 工程师。

* 澳大利亚 CSIRO 的 N. Malajczuk 博士提供参试菌种, 谨致谢意。

过研究,人们可以找出松茸菌种培养的最佳培养条件,加速菌种繁殖以及其它研究的进程。本文仅报道两个参试松茸菌株基本营养条件的研究结果。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

松茸 99606 菌株和 9924 菌株。99606 菌株原产日本广岛,菌种由澳大利亚 CSIRO 的 N. Malajczuk 博士提供;9924 菌株由作者分离自我国云南产的松茸子实体。

1.2 适温范围的测定

在装有改良的 PDA 培养基(即有 PDA 培养基加入适量维生素 B₁)的无菌培养皿中,每皿放入大小约 0.25 cm²、生长日龄基本一致的斜面菌种各 3 小块,呈品字形排列,分别放入 30、28、25、20、15、10、8 ℃ 恒温条件下培养,每个温度处理重复 4 次,定期观测其菌种生长情况,用垂直交叉法定向测定并记录每个菌落平均直径,60 d 后收获。

1.3 摇床培养测定

两个菌株的 pH 适应范围、C 源和 N 源利用以及维生素类生长物质作用等试验,均在 LRH250Z 型振荡培养箱中进行,在 20~21 ℃ 条件下,以 150 r·min⁻¹ 的转速进行回旋式振荡培养。试验采用 150 mL 三角瓶,每瓶放入相应培养基 75 mL,然后分别接入生长日龄一致、大小等量的斜面菌种;同时取等量菌种放于滤纸上,经烘干称质量作为菌种接种干质量;振荡培养结束后,滤其培养液,将留下的菌丝体经冲洗、烘干后称质量,最后计算出菌丝体增殖倍数,并确定其最适条件。

1.3.1 最适 pH 范围的测定 利用上述改良的 PDA 培养液(PDA 培养基不加琼脂),调节其 pH 值,使培养液 pH 分别为 2、3、4、5、6、7 共 6 个处理,每处理重复 4 次,经高压灭菌后再测定培养液的 pH 值,并每瓶接入等量的松茸菌种,振荡培养 60 d 后测定其菌丝体干质量的增量。

1.3.2 C 源试验 以上述 PDA 培养液为基本培养液,改变其 C 源分别为蔗糖、果糖、麦芽糖、乳糖、葡聚糖、糊精、玉米粉等,另设不加 C 源的空白对照进行培养试验。试验每种 C 源处理重复 4 次,40 d 后观测各处理菌丝体的增殖倍数。

1.3.3 N 源试验 将天门冬酰胺培养基^[8]中的 N 源天门冬酰胺分别改用硫酸铵、硝酸钾、磷酸氢二铵、氯化铵、酒石酸铵、硝酸钠、硝酸铵、尿素、牛肉浸膏、干酪素、蛋白胨等,同时设不加 N 源为空白对照进行培养试验。每个 N 源处理重复 4 次,60 d 后收获。

1.3.4 维生素类生长物质试验 以改良的 PDA 培养液为基本培养液,分别将维生素 B₁ 改换成烟酸、叶酸、维生素 B₆、肌醇及天门冬氨酸等,同时设空白对照等分别进行培养试验,各处理重复 4 次,60 d 后收获。

2 试验结果

2.1 两株松茸菌适温范围测定结果

两个松茸菌株适温范围测定结果表明,菌株 99606 的适温范围明显比 9924 菌株窄,在 15 ℃ 条件下经 12 d 后萌动,生长范围 15~25 ℃,特别以 20 ℃ 左右为最好,菌落直径大,菌丝体稠密、较厚;温度为 10 ℃ 和 28 ℃ 时菌丝体有萌动,但难于计算生长量,温度低于 8 ℃ 或高于

28 时,菌丝体不生长。9924 菌株的适温范围相对较宽,在 10 条件下经 10 d 后即萌动,从 10~25 均可生长,最佳温度为 15,比 99606 菌株稍低;在 8 和 28 条件下菌丝体有萌动。温度达 30 时两个菌株均不能生长(表 1)。

表 1 不同松茸菌株适温范围测定结果

菌株号	测 定 内 容	测 定 温 度 /						
		8	10	15	20	25	28	30
99606	菌丝萌动所需天数/d	-	14	12	25	30	60	-
	60 d 菌落平均直径/mm	-	++	30.3	39.6	29.5	++	-
	菌丝体生长速度/mm·月 ⁻¹	-	-	15.2	19.8	14.8	-	-
9924	菌丝体萌动所需天数/d	-	13	12	25	28	60	-
	60 d 菌落平均直径/mm	+	18.0	34.5	29.2	28.3	++	-
	菌丝体生长速度/mm·月 ⁻¹	-	0.9	17.3	14.6	14.1	-	-

注:“+”表示菌丝有萌动;“++”表示菌丝萌动较明显,但尚无法计算生长量;“-”表示不萌动。

2.2 松茸菌株 pH 范围的测定结果

两个松茸菌株的 pH 适应范围测定结果表明,不同菌株的 pH 适应范围明显不同。按照灭菌后培养液实际 pH 计算,菌株 9924 的适应范围较广,在 pH 3.5~5.5 为好,尤以 4.5 的条件下菌丝体生长最好,增殖倍数最高(表 2)。99606 菌株的 pH 适应范围较窄,仅在 4.5~5.5 之间,其中 pH 为 5.0 时效果最好,菌丝增殖倍数最高。而两个菌株在 pH 为 3 的条件下均不能生长,99606 菌株甚至在 pH 为 3.5 和 6 的条件下也不能生长。

表 2 不同松茸菌株 pH 范围测定结果

9924 菌 株							99606 菌 株						
培养液 pH			菌丝体生长情况 ^①	菌液颜色	菌丝体干质量/mg	菌丝增殖倍数	培养液 pH			菌丝体生长情况 ^①	菌液颜色	菌丝体干质量/mg	菌丝增殖倍数
灭菌前	灭菌后	培养后					灭菌前	灭菌后	培养后				
2	3.0	2.6	-	浅橙色	50	0	2	3.0	2.6	-	浅橙色	50	0
3	3.5	3.2	++	浅橙色	699	13.98	3	3.5	3.2	-	浅橙色	50	0
4	4.5	5.5	+++	橙色	868	17.36	4	4.5	4.9	++	橙色	674	13.48
5	5.0	7.9	++	茶色	683	13.66	5	5.0	6.9	+++	茶色	736	14.72
6	5.5	7.7	++	茶色	641	12.83	6	5.5	6.8	++	茶色	535	10.7
7	6.0	7.5	+	茶色	356	7.12	7	6.0	6.6	-	茶色	50	0

①“+”菌丝球量较少;“++”菌丝球量多,绒球状;“+++”菌丝球极多,大小不等,绒毛状;“-”菌丝体不生长。

2.3 松茸菌株对 C 源的利用

试验结果表明,两个松茸菌株对供试的 9 种 C 源均有不同程度的利用,但不同菌株对同一 C 源的利用能力不相同(表 3)。9924 菌株对 C 源的利用以葡聚糖为最好,菌丝体生长旺盛,增殖倍数也最高,其次为果糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉和蔗糖等,乳糖、糊精、玉米粉再次之,但仍较好的增殖效益。菌株 99606 则以玉米粉、糊精和葡萄糖为最佳,菌丝体增殖倍数都在 11 倍以上,其次为麦芽糖、蔗糖、乳糖、淀粉等,果糖和葡聚糖虽然相对较差,但仍较高的增殖效果。两个菌株在无 C 源条件下均不能生长。方差分析结果表明,所有 C 源与对照处理间的差异极显著($P < 0.01$)。

表 3 不同松茸菌株对 C 源利用的试验结果

C 源	9924 菌株					99606 菌株				
	培养基颜色		菌丝体生长情况 ^①	菌丝体干质量 /mg	菌丝体增殖倍数	培养基颜色		菌丝体生长情况 ^①	菌丝体干质量 /mg	菌丝体增殖倍数
	培养前	培养后				培养前	培养后			
葡萄糖	橙黄透明	未变	++	628***	10.13	橙黄透明	未变	+++	702***	11.323
蔗糖	橙黄透明	未变	++	612***	9.87	橙黄透明	未变	++	631***	10.18
果糖	橙黄透明	未变	++	646***	10.42	橙黄透明	未变	++	530***	8.55
麦芽糖	橙黄透明	未变	++	628***	10.13	橙黄透明	未变	++	662***	10.68
乳糖	橙黄透明	未变	++	608***	9.81	橙黄透明	未变	++	610***	9.84
葡聚糖	橙黄透明	未变	+++	821***	13.24	橙黄透明	未变	++	510***	8.23
淀粉	乳白浑浊	未变	+	624***	10.07	乳白浑浊	未变	++	601***	9.69
糊精	黄褐浑浊	未变	+	498***	8.03	黄褐浑浊	未变	+++	698***	11.26
玉米粉	乳黄浑浊	乳白色	+	439***	7.08	乳黄浑浊	乳白色	+++	802***	12.94
空白对照	橙黄透明	未变	-	62	0	橙黄透明	未变	-	62	0

①表注同表 2。*** 示差异极显著 ($P < 0.01$), 下同。

2.4 松茸菌株对 N 源的利用

松茸菌株对供试的 12 种 N 源利用情况的试验结果表明, 两个菌株对同一 N 源的利用既有相同处也各自有差别。两个菌株对硫酸铵、硝酸铵、氯化铵和蛋白胨 4 种 N 源的利用均较好, 不仅菌丝体生长旺盛, 增殖倍数相对也较高; 但它们对磷酸氢二铵、尿素以及牛肉浸膏等 N 源不能利用或基本不能利用, 菌丝体不生长或仅生长少许; 对酒石酸铵、硝酸钠、硝酸钾以及干酪素的利用属一般, 菌丝体可以生长但增殖倍数不太高; 此外, 两个菌种在没有 N 源的情况下不能生长(表 4)。但是就酵母浸膏而言情况则不同, 9924 菌株的利用效果较好, 而 99606 菌株则不能利用。方差分析结果表明, N 源试验的差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 4 不同松茸菌株对 N 源利用的试验结果

N 源	9924 菌株					99606 菌株				
	培养液颜色		菌丝体生长情况 ^①	菌丝体干质量 /mg	菌丝体增殖倍数	培养液颜色		菌丝体生长情况 ^①	菌丝体干质量 /mg	菌丝体增殖倍数
	培养前	培养后				培养前	培养后			
硫酸铵	淡色透明	未变	+++	454***	3.88	淡色透明	未变	++	370***	3.16
硝酸铵	淡色透明	未变	+++	492***	4.21	淡色透明	未变	+++	398***	3.32
氯化铵	淡色透明	未变	+++	466***	3.98	淡色透明	未变	+++	396***	3.38
酒石酸铵	淡色透明	未变	++	420***	3.59	淡色透明	未变	+	201***	1.72
磷酸氢二铵	褐色透明	未变	-	117	0	褐色透明	未变	-	117	0
硝酸钾	茶色透明	未变	++	362***	3.09	茶色透明	未变	+	198***	1.69
硝酸钠	淡色透明	未变	++	368***	3.15	淡色透明	未变	++	220***	1.88
尿素	肉色透明	未变	-	117	0	肉色透明	未变	-	117	0
牛肉浸膏	茶色透明	未变	-	117	0	茶色透明	未变	+	181***	1.55
酵母浸膏	茶色透明	未变	+++	534***	4.56	茶色透明	未变	-	117	0
干酪素	无色沉淀	未变	+	341***	2.91	无色透明	未变	+	210***	1.79
蛋白胨	淡色透明	淡茶色	+++	662***	5.66	淡色透明	淡茶色	+++	485***	4.15
空白对照	无色透明	未变	-	117	0	无色透明	未变	-	117	0

①表注同表 2。

2.5 不同维生素类物质对松茸菌生长的影响

6 种维生素类物质对松茸菌丝体生长影响的试验结果表明, 两个菌株在无维生素类物质

的条件下不能生长,证明松茸菌种的培养需加入一定的维生素类物质,供试的 6 种因子都可促进松茸菌丝体的生长。对 9924 菌株而言,6 种供试因子对松茸菌的促生效果相近,但对 99606 菌株而言,6 种供试因子对松茸菌丝体生长同样有较好的促生效果(表 5),其中,尤以天门冬氨酸、烟酸、叶酸和维生素 B₆ 的效果更好,菌丝体繁殖快,增殖倍数较高。方差分析结果差异极显著($P < 0.01$)。

表 5 不同维生素类物质对松茸菌生长的影响

维生素类因子	9924 菌株					99606 菌株				
	培养液颜色		菌丝体生长情况 ^①	菌丝体干质量/mg	菌丝体增殖倍数	培养液颜色		菌丝体生长情况 ^①	菌丝体干质量/mg	菌丝体增殖倍数
	培养前	培养后				培养前	培养后			
维生素 B ₁	茶色浑浊	未变	++	519***	3.28	茶色浑浊	未变	++	465***	5.67
烟 酸	茶色浑浊	未变	++	585***	3.7	茶色浑浊	未变	+++	677***	8.26
叶 酸	茶色浑浊	未变	++	482***	3.5	茶色浑浊	未变	+++	610***	7.44
维生素 B ₆	茶色浑浊	未变	++	508***	3.22	茶色浑浊	未变	+++	495***	6.04
肌 醇	茶色浑浊	未变	++	590***	3.73	茶色浑浊	未变	++	365***	4.45
天门冬氨酸	茶色浑浊	未变	++	520***	3.29	茶色浑浊	未变	+++	728***	8.88
空白对照	淡色浑浊	未变	-	158	0	淡色浑浊	未变	-	82	0

①表注同表 2。

3 小结与讨论

(1) 不同地理来源的松茸菌株,其对温度、pH、C 源和 N 源利用以及对维生素类生长物质的要求条件各不相同,培养不同来源的菌株应满足其生长的必要条件。

(2) 原产于我国云南的 9924 菌株适温范围较宽,为 10~25℃,以 15℃ 为佳,pH 适应范围在 3.5~5.5,以 3.5~4.5 为佳;该菌株对多种 C 源均可利用,以葡聚糖、果糖、葡萄糖、麦芽糖和淀粉较好;对 N 源的利用以蛋白胨、硝酸铵、酵母浸膏、氯化铵、硫酸铵等为佳,但不能利用磷酸氢二铵、尿素、牛肉浸膏等 N 源;对维生素类物质的应用效果,维生素 B₁、烟酸、肌醇、叶酸、维生素 B₆ 以及天门冬氨酸等都有相似的结果。

(3) 产于日本的 99606 菌株的适温范围较窄,仅为 15~25℃,以 20℃ 左右为最佳;pH 适应范围同样也较窄,为 4.5~5.5,以 5.0 的条件下效果最好;对常用的 9 种 C 源均可利用,尤以玉米粉、糊精、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、果糖等的利用效果好;对 N 源的利用以蛋白胨、氯化铵、硝酸铵和硫酸铵的效果好,其次为硝酸钠等,但 99606 菌株与 9924 菌株一样不能利用磷酸氢二铵和尿素,此外它不能利用酵母浸膏,而对牛肉浸膏则有少许利用能力,这与 9924 菌株又有不同;对维生素类物质的应用效果则基本一致,但天门冬氨酸、烟酸、叶酸、维生素 B₆ 及 B₁ 的促生效果则更突出一些。

(4) 有研究指出^[10],松茸对铵态 N 的利用远远优于对硝态 N 和亚硝态 N 的利用,本研究结果也证实了这一事实。但是,并不是所有铵态 N 都一样,对于磷酸氢二铵,试验中的两个菌株都不能利用。无论松茸在菌丝体生长阶段还是子实体形成阶段,都明显地需要一定的维生素类物质,本研究结果也再次证实,这类物质有明显促进菌丝体生长的作用。

参考文献:

- [1] 上海市农业科学院食用菌研究所. 中国食用菌志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988.
- [2] Wang Yun, Lan R Hall, Lynley A Evans. Ecto-mycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 1. *Tricholoma matsutake* and related [J]. *Economic Botany*, 1997, 51(3).
- [3] 史效轩. 中甸县松茸出口不容乐观[N]. 春城晚报, 1997-10-06(3).
- [4] 王云, 谢支锡. 松口蘑初探[J]. 食用菌, 1982, (1): 7~8.
- [5] 臧穆. 松茸群及其近缘种的分类地理研究[J]. 真菌学报, 1990, 9(2): 113~127.
- [6] 孙成壁, 韩联生, 白德智. 松口蘑研究初报[J]. 食用菌, 1989, (5): 7~9.
- [7] 鲜明耀. 四川松茸分布及其生态环境[J]. 食用菌, 1989, (5): 9~10.
- [8] 韩桂云, 何兴元, 齐玉臣, 等. 名贵食用真菌松茸的初步研究[J]. 土壤学报, 1994, 31(增刊): 182~186.
- [9] Oyama. Proceedings of the ninth international scientific congress on the cultivation of edible fungi[J]. *Mushroom Science*, 1976, (Part 1): 719~731.
- [10] 杨新美. 中国食用菌栽培学[M]. 北京: 农业出版社, 1988.

Studies on Culture Conditions of *Tricholoma matsutake*

CHEN Yu, WANG Feng-zhen, CHEN Ying-long, GONG Ming-qin

(Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: Experimental results demonstrated various responses of two geographical strains of *Tricholoma matsutake* (9924 and 99606) in the culture conditions. The suitable temperature ranges for the growth of strains 9924 and 99606 were 10~25 and 15~25 respectively. The suitable pH ranged from 3.5 to 7.5 for strain 9924 while relative short range (4.5~5.5) for strain 99606. Regarding the requirement of carbon, polymeric glucose was the optimum sources for strain 9924, and glucose, fructose, maltose and starch were also suitable for its growth. Comparably, cornpowder was the best carbon source for the strain 99606 and followed with glucose, dextrin, maltose, sucrose, starch, etc.. Both strains were able to absorb such nitrogen sources as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 other than $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ or urea. Results also showed that vitamin could benefit the growth of both strains, especially for the strain 99606.

Key words: *Tricholoma matsutake*; strain; culture conditions