

文章编号: 1001-1498(2003)01-0052-06

黑孢块菌的苗木菌根化合成效果研究

弓明钦, 陈羽, 王凤珍

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要: 黑孢块菌菌根化幼苗是该菌在树木上完成半人工模拟栽培的基础。采用黑孢块菌的液体纯菌种 1-4 mL 对 4 个树种幼苗进行接种, 90 d 后都能形成菌根, 其感染率达 94.4% - 100%; 菌根形态主要有 4 种类型, 以珊瑚状居多, 其次为棒状及二叉状, 但不同树种上其各类型所占比例各不相同; 黑孢块菌不同接种量的云南松幼苗, 平均高比对照增加 76.67% - 131.74%, 而生物量则增加 1.62 - 2.17 倍, 以每株接种 4 mL 菌液的效果为佳; 不同 pH 值的基质试验结果表明, pH 值为 6.5 - 7.0 时其菌根感染率高, 生物量增加明显, 苗木长势也较好。

关键词: 黑孢块菌; 人工接种; 菌根化苗木

中图分类号: S718.87

文献标识码: A

黑孢块菌 (*Tuber melanosporum* Vittad) 是世界上最著名的珍稀食用菌之一, 也是世界上价值最昂贵的一种食用菌, 被欧洲人誉为森林中的“黑色钻石”^[1], 颇受世人关注。黑孢块菌原产于欧洲地中海地区的法国、意大利及西班牙等国家^[2], 由于其市场价格极高而市场需求日甚, 导致人们超强度采挖, 资源也因此锐减, 供需矛盾更加突出。因此, 发展块菌的人工栽培就成为众多科学家和企业家争相研究的重点。

黑孢块菌与其它多种名贵食用菌如松茸 (*Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing.)、美味牛肝菌 (*Boletus edulis* Bull.: Fr.) 及鸡油菌 (*Cantharellus cibarius* Fr.) 等一样, 都属于营共生生活的菌根真菌, 在它们的生活史中其菌丝体必须与适合的树木营养根生长在一起, 形成一种特殊的共生体——菌根, 之后才能进一步发展并长出子实体, 完成其生活史, 没有完成这一过程, 子实体无法形成^[3]。正因为这个原因, 许多菌根型食用菌至今尚无法进行人工栽培, 而必须依赖天然资源满足人们的需求。

其实, 欧洲人早就发现利用生长黑孢块菌的林地土壤来培育橡树 (*Quercus* sp.) 幼苗, 或者在生长黑孢块菌的林中挖取天然橡树树苗, 将它们移植到其它适合的地上, 几年之后橡树林中都可长出块菌来^[4]。

随着菌根技术的不断发展, 人们将黑孢块菌的子实体经匀浆后制成孢子悬浮液, 或者将黑孢块菌的纯菌种接种在橡树幼苗根部, 让其形成带有菌根的菌根化苗木, 将这些幼苗在适合林地上栽种, 几年之后这片林地中就可以长出黑孢块菌来。这种方法的前段工作在人工条件下完成, 而后一阶段又在自然条件下完成, 整个过程模拟了块菌的生活史^[5], 因此, 人们将这种方法称之为半人工模拟栽培 (semi artificial simulation cultivation) 或菌根合成 (mycorrhizal synthe-

收稿日期: 2001-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39870614, 1999—2001 年)

作者简介: 弓明钦 (1939—), 男, 四川彭州人, 研究员。

sis)^[6],在有的食用菌书籍中也称为感染苗移植法(infective seedling transplanting method)^[7]。

从理论上说,半人工模拟栽培的方法或技术可以适用于所有的菌根型食用菌,但迄今为止真正完成菌根合成,并成功长出子实体的例子并不太多,而能够进行商业化规模生产的例子却只有黑孢块菌这一种^[8]。这种方法不仅在欧洲获得成功,在美洲、大洋洲以及亚洲一些国家和地区也同样获得成功,有的已开始进入商业化生产^[9]。因此,黑孢块菌的半人工模拟栽培,就成为其它菌根食用菌发展的一种模式。

而在这种半人工模拟栽培技术之中,菌根化苗的合成与生产就成为其中关键技术之一。为了探讨黑孢块菌对国产树种的共生能力,以及形成菌根化苗的有关接种技术,1998—2001年在广州温室条件下开展了有关研究。本文主要报道黑孢块菌对 5 个国产树种幼苗的感染,以及形成菌根化苗木的有关接种条件,为在田间完成黑孢块菌的菌根合成奠定基础。

1 材料及方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌种 黑孢块菌纯菌种原产法国,从台湾大学农学院森林学系引进。菌种经在平板上扩大培养后,在改良的 YMD 液体培养基^[10]中继续繁殖,在 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 旋转式摇床上振荡培养 20 d,在无菌条件下匀浆成液体菌剂,测定其每 mL 菌剂含干菌丝质量为 50 mg,保存备用。

1.1.2 供试树种 供试树种有云南松(*Pinus yunnanensis* Franch)、马尾松(*P. massoniana* L.)、黎蒴(*Castanopsis fissa* Roha. et Wils.)、栓皮栎(*Quercus variabilis* Bl.)和 高山栎(*Castanopsis delavayi* Franch)等 5 种。种子经表面清洗后再用 0.1% HgCl_2 溶液表面消毒 30 s,无菌水清洗 3 次后放于洁净沙床上进行催芽,待苗高 3—4 cm 时进行移植;育苗基质采用混合基质(蛭石 泥炭 河沙 = 1 1.5 2(体积比),自然 pH 值为 5.2),经 126 °C 高温蒸汽条件下消毒 2 h 后,装入直径为 10 cm 的黑色育苗袋,每袋分别移植上述幼苗 1 株,按常规方法每天两次淋浇自来水,每两周淋施 1% 复合肥(N P K=15 5 10)液 1 次,60 d 后进行人工接种。

1.2 试验方法

1.2.1 人工接种 接种时先在幼苗根基附近打一直径约 1 cm,深约 3—4 cm 的小孔,用滴管或注射器将上述液体菌液注入小孔,每株 2 mL 或按试验要求量注入,用基质填埋小孔。接种后苗木放置于垫有塑料薄膜的常规苗床上,自然温湿度;每天淋浇清水(pH 值 6.0)1 次。90 d 和 180 d 后进行观测,或按设计要求进行有关观测。

1.2.2 试验设计 不同树种苗木的接种试验,小区试验株为 8 株,重复 4 次,随机排列;不同接种量的试验分别设 1、2、4 mL 3 种不同接种处理,以不接种为对照共 4 个处理,小区试验苗为 10 株,重复 3 次,随机排列;不同 pH 基质试验同上述混合基质,利用 10% NaOH 溶液进行调节,pH 值分别为 6、7、8,另设自然 pH 值 5.2 的混合基质为对照,小区试验株为 10 株,重复 4 次,随机排列。为保证基质 pH 值的稳定,每月再调节 1 次。

1.2.3 苗木观测与调查 在 40 倍显微镜下观察菌根形态,同时统计菌根感染率;切片观测和有关计测在 40 倍体视显微镜下进行;菌根感染情况及调查按有关分级标准及计算公式进行^[11];生物量测定按常规方法;分析方法见有关试验注释。

2 结果与分析

2.1 黑孢块菌对几个国产树种幼苗的感染

黑孢块菌对4个国产树种幼苗人工接种的试验结果表明:在广州地区温室条件下,黑孢块菌对供试的4个树种均有较好的感染效果,接种6个月的菌根感染率在90%~100%,菌根感染指数达60~76(表1)。试验结果还表明,产于欧洲的黑孢块菌,对生长于亚洲的属于3个属的4个供试树种,全都可以侵染并形成菌根,证明黑孢块菌对树种的适应范围较广,其侵染专化性不太强。菌根初期,特别在端部呈白色或浅色,之后颜色逐渐变深呈浅肉色或浅棕色。此外,试验结果还表明,本试验所采用的接种方法及接种体,可以完成苗木菌根合成,也是适合与可行的,因此,黑孢块菌对供试的4个国产树种可以形成菌根感染并形成菌根化苗木。

表1 黑孢块菌对不同宿主植物的感染情况

宿主植物	接种日期 (年-月-日)	调查日期 (年-月-日)	调查根 段数	感染根 段数	菌根感染 率/%	菌根感染 指数	初期菌根 颜色
云南松	2000-06-12	2001-01-12	50	50	100	68	浅肉色
黎蒴	2000-06-12	2001-01-12	50	50	100	76	浅肉色
栓皮栎	2000-06-12	2001-01-12	50	45	90	60	浅棕色
高山栎	2000-06-12	2001-01-12	50	50	100	74	浅棕色

2.2 不同接种幼苗上的菌根形态

黑孢块菌在不同树种上形成菌根的形态及结构的观察结果表明,其主要菌根形态有4个类型,即棒状、二叉状、珊瑚状和绣球状,其中绣球状菌根仅在黎蒴幼苗上发现,而每个树种幼苗上所形成不同形态菌根所占的比例亦有不同(图1)。其中,多叉状菌根在4种不同形态中

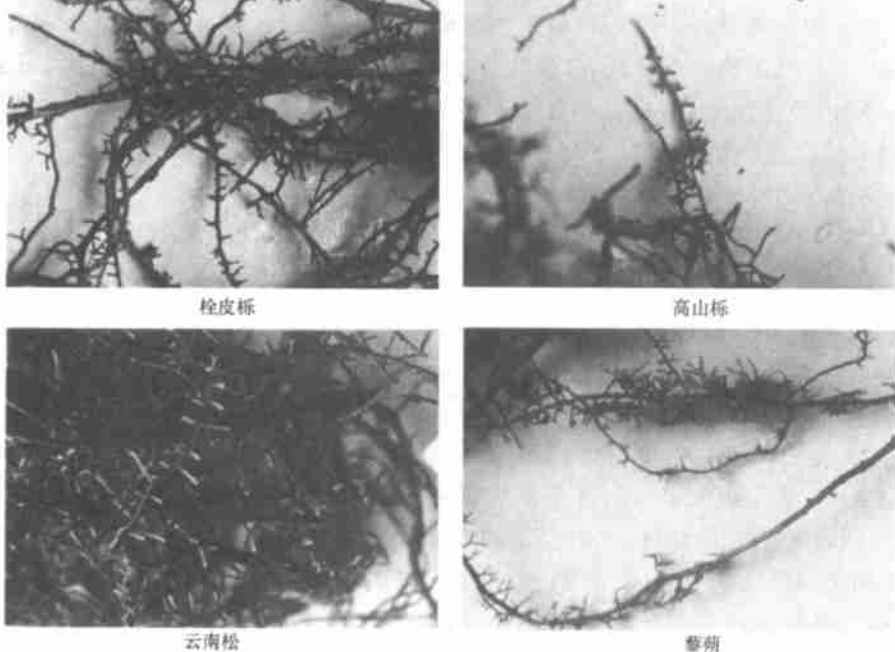


图1 黑孢块菌在4个树种幼苗上的菌根形态

相对所占比例较高。此外,各不同树种上形成菌根的长度及粗细也有差异,云南松同藜蒴之间比较接近,而栓皮栎同高山栎之间比较接近,前者在菌根长度及粗度方面明显大于后者,长度相差近 1.09—1.79 mm。就总体而言,棒状及二叉状菌根所占比例大致相当。在菌套厚度方面,云南松稍薄一些而以栓皮栎及高山栎较厚;哈蒂氏网层数则以藜蒴较少,仅 1—2 层,而其它均 2—3 层(表 2)。

表 2 黑孢块菌在不同树种上的菌根形态

宿主植物	调查株数	菌根形态所占/ %				菌根平均长/mm	菌根平均直径/mm	菌套厚度/ μm		哈蒂氏网层数
		棒状	二叉状	多叉状	绣球状			42.0	56.0	
云南松	32	22	32	46	0	3.00	0.18	22.0	42.0	2—3
藜蒴	32	24	22	48	6	2.33	0.15	28.0	42.0	1—2
栓皮栎	32	38	24	38	0	1.14	0.13	33.6	56.0	2—3
高山栎	32	24	30	46	0	1.24	0.11	28.0	56.0	2—3

2.3 不同接种量对云南松幼苗生长的影响

不同接种量对云南松幼苗生长的影响试验结果表明,采用的 3 个接种量对云南松幼苗均可形成较好的菌根感染;除了接种 1 mL 处理的菌根感染率为 94.4%,感染指数为 52 外,其它接种 2 mL 及 4 mL 处理的感染率均达 100%,感染指数达 70—78(表 3)。说明黑孢块菌与云南松幼苗之间具有较好的共生亲合力,可以形成较好的共生效果。

表 3 黑孢块菌不同接种量对云南松菌根感染及苗木生长影响

接种量/ mL	苗木平均 高/cm	平均地 径/cm	苗高增 幅/%	地径增 幅/%	菌根感 染率/%	感染 指数	地上干 质量/g	地下干 质量/g	生物量/ g	生物量 增加/%
1	15.9a	0.614a	76.67	83.83	94.4	52	3.614	1.797	4.811a	162.18
2	17.5a	0.638b	94.40	91.02	100.0	70	4.181	1.144	5.325a	190.19
4	18.3a	0.774b	103.3	131.74	100	78	5.42	1.981	7.401a	217.53
CK (不接种)	9.0b	0.334c	—	—	—	—	1.453	0.383	1.835b	—

注:同竖行中字母不相同者差异显著($P=0.01$)

不仅如此,黑孢块菌菌种不同接种量对云南松幼苗的生长也有明显的影响,随着接种量的增加,苗高、地径、地上干质量及生物量指标等,均呈现差异逐渐增加的趋势。接种幼苗的平均高比对照增加 76.67%—103.30%;地径比对照增加 83.83%—131.74%;地上干质量比对照增加 148.7%—273.0%;生物量的增幅更大,分别为对照幼苗的 1.62、1.90、2.17 倍。其中尤以接种 4 mL 菌液处理的地径增长效果为最好。

方差分析及多重比较结果表明,3 个接种处理的苗高、地径及生物量等,与对照未接种处理间存在着极显著的差异,不同接种量之间仅在地径增长上存在着极显著的差异($P=0.01$)。从而证明黑孢块菌对云南松幼苗生长也有明显的促生效果。

2.4 不同 pH 值的基质对黑孢块菌侵染及苗木生长之影响

不同 pH 值的基质对黑孢块菌的侵染及苗木生长影响的试验表明,在 pH 值为 5.5—7.5 的条件下,黑孢块菌对云南松及马尾松均可形成侵染,根段菌根感染率达 60.0%—86.7%,感染指数达 48—78,但就总体情况来看,pH 值在 5.5—6.5 时随 pH 值增大菌根感染率随之提高,而当 pH 值达 7.5 时其菌根感染率反而下降,其中以 pH 值 6.5 为最好(表 4)。

表4 不同 pH 的基质对黑孢块菌侵染及苗木生长的影响

试验号	树种	pH 值		苗木平均 高/cm	根系平均 长/cm	根段菌根 感染率/%	感染 指数	地上干 质量/g	地下干 质量/g	生物 量/g
		试验前	实际值							
T ₁	云南松	5.5	5.5	32.33	32.17	73.3	68.5	3.71	0.70	4.40
	马尾松	5.5	5.5	30.17	34.67	76.7	67.0	3.03	0.83	3.86
T ₂	云南松	6.0	6.0	28.56	34.50	80.0	68.0	5.23	0.70	5.94 ^{**}
	马尾松	6.0	6.0	33.67	31.00	76.7	65.0	3.28	0.67	3.95
T ₃	云南松	7.0	6.5	31.59	38.33	86.7	78.0	7.29	1.22	8.51 ^{***}
	马尾松	7.0	6.5	34.83	32.17	83.3	77.5	3.53	0.66	4.19
T ₄	云南松	8.0	7.5	29.17	33.17	63.3	50.5	2.31	0.45	2.77
	马尾松	8.0	7.5	26.83	42.00	60.0	48.0	1.60	0.36	1.96

注: *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ 。

对苗木高生长而言,马尾松有同上述规律相似的结果,而云南松表现不明显;在地上、地下干质量以及生物量等指标方面,两树种都有上述相似规律,其中尤以云南松更为明显。就总体而言,黑孢块菌由于适合于在 pH 值 6.5—7.0 条件下生长,因此当基质 pH 值在 6.5 时,无论菌根感染率及生长等指标都优于其它 pH 值条件,但当超过或低于这个范围时,无论菌根感染或幼树生长等指标都相对较差。因此,黑孢块菌接种的最佳 pH 值条件应在 6.5—7.0 之间。统计分析结果表明, T₂ 与 T₃ 的云南松生物量与 T₁ (常规 pH 值,对照) 之间的差异显著或极显著,其它之间无差异或差异不显著。

3 结论与讨论

(1) 黑孢块菌在常规条件下对国产 4 个树种均可侵染并形成典型的外生菌根,证明黑孢块菌的专化性并不强,且宿主范围较广,在我国有发展应用前途。

(2) 黑孢块菌在供试的 4 个树种上形成菌根的形态主要有 4 种,不同树种上不同形态菌根所占比例各不相同,其中多叉状分枝比例较大,而棒状、二叉状菌根所占比例相当,绣球状菌根则仅在藜蒴上发现。此外,不同树种上的菌根粗细及长度也略有不同,云南松和藜蒴的菌根相对较长较粗,其它两个树种则相对较短较细。

(3) 黑孢块菌不同接种量的试验结果显示,苗木生长及生物量,均与对照呈极显著的差异,就比较而言,以接种 4 mL 菌剂的地径增长效果更明显。但是,如果考虑成本,仍以每株接种 2 mL 菌剂更为经济与合算。

(4) 黑孢块菌菌根化苗木合成研究的效果表明,黑孢块菌菌株对国产供试树种均可形成侵染,菌根化苗木形成的技术也并不复杂;在接种量为 2—4 mL, pH 值为 6.5—7.0 的室内条件下可以形成较好的菌根化苗木,可以进一步进行田间造林试验。

参考文献:

- [1] 弓明钦, 王凤珍, 陈羽, 等. 我国的块菌资源及其利用前景[J]. 林业科学研究, 2000, 13(专刊): 173—179
- [2] 刘波, 陶恺. 地下真菌研究简史及我国已知种[J]. 食用菌, 1989, 11(1): 2
- [3] 胡弘道. 块菌与林木共生关系之研究(1)[J]. 台大实验林研究报告, 1987, 1(1): 1—6
- [4] 胡弘道. 块菌之培育[A]. 见: 台湾区第 7 届食用菌研讨会报告[C]. 台北, 1989. 34—41
- [5] 王云. 菌根研究与食用菌栽培[J]. 食用菌, 1990, 12(1): 1—2

- [6] 弓明钦, 陈应龙, 仲崇禄. 菌根研究与应用[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997. 181—193
- [7] 黄年来. 中国食用菌百科[M]. 北京: 农业出版社, 1993. 1—448
- [8] Hall Ian R, Brown G T, Byars J. The Black Truffle —Its History, Uses and Cultivation[M]. New Zealand, 1995. 1—105
- [9] 陈应龙, 弓明钦. 块菌资源多样性及其地理分布[J]. 中国食用菌, 2000, 19(5): 6—7
- [10] 胡弘道. 台湾二叶松与松茸共生关系之研究, 松茸与台湾二叶松之半无菌菌根合成[J]. 台大实验林研究报告, 1994, 8(3): 47—54
- [11] 弓明钦, 王凤珍, 陈羽, 等. 相思菌根的菌种筛选及其接种效果研究[J]. 林业科学研究, 2000, 13(3): 268—273

A Study of Mycorrhizal Synthesis Effect of *Tuber melanosporum* on Seedlings

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

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

Abstract : Mycorrhizal seedlings are the basis of mycorrhizal synthesis of *Tuber melanosporum* on the trees roots in the soil. Four species of seedlings were inoculated by using 1—4 mL liquid inoculum of *T. melanosporum*. After 90 days, the percentages of mycorrhizal infection were 94.4%—100%. The mycorrhizas had four forms, in which the coral form was the most common, followed by the stick and bifurcate forms, while the spherical form was the least. But the proportion of each mycorrhizal form was different on various tree species. After inoculation, the height of seedlings of *Pinus yunnanensis* with *T. melanosporum* was increased by 76.67%—131.74%, the mean dry weight was increased by 162%—217%. The seedlings with 4 mL liquid inoculum performed better. The results of media experiment with different pH values showed that the pH 6.5—7.0 had higher inoculation rate and biomass increment as well as better seedling growth.

Key words : *Tuber melanosporum*; artificial inoculation; mycorrhizal seedlings