

松乳菇菌丝培养基的筛选

孙慧娟 (西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所, 西藏拉萨 850030)

摘要 [目的]筛选松乳菇菌丝培养最佳培养基配方。[方法]以松乳菇菌种(编号 NZ1)为供试菌株,设计 2 组不同的培养基配方进行菌丝培养的比较试验。[结果]松乳菇菌丝培养的最佳培养基配方为新西兰进口 PDA 培养基。[结论]该研究可为更好地进行松乳菇人工培养提供科学依据。

关键词 松乳菇;培养基;菌丝

中图分类号 S646 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)14-0020-02

Screening of Mycelium Culture Medium of *Lactarius deliciosus*

SUN Hui-juan (Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa, Tibet 850030)

Abstract [Objective]To screen the optimum culture medium for mycelia of *Lactarius deliciosus*. [Method]Taking *L. deliciosus* strains(number NZ1) as the tested strains, a comparative experiment was conducted to design mycelia culture with two different culture medium recipes. [Result]The best medium for cultivating mycelia of *L. deliciosus* was PDA medium which import from New Zealand. [Conclusion]The study provides a scientific basis for better cultivating *L. deliciosus*.

Key words *Lactarius deliciosus*; Medium; Mycelia

松乳菇,拉丁学名为 *Lactarius deliciosus* (L. ex Fr.) Gray, 系红菇科乳菇属外生菌根真菌,它是 Fries 在 1921 年命名的,俗名有很多,如美味松乳菇、松菌、寒菌等^[1-3]。松乳菇是与植物根系共生的菌根食用菌,具有较高的营养价值、经济价值和生态价值。过度采摘导致野生资源产量不断下降^[4],然而目前还难以实现人工栽培^[5]。松乳菇菌丝生长缓慢且组织分离过程中极易被污染,筛选合适的培养基配方对组织分离培养菌丝具有重要意义。

目前松乳菇菌种分离采用较多的方法是孢子分离法和组织分离法^[6],前人对松乳菇菌丝培养的最佳条件筛选做了大量的试验^[7-11]。笔者研究不同培养基配方及化学试剂来源不同的 PDA 培养基对松乳菇菌丝生长的影响,以期筛选出更优配方组合,为今后松乳菇的驯化栽培提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用菌株是西藏自治区农牧科学院蔬菜

研究所食用菌课题组采集的野生松乳菇菌种(编号 NZ1)。

1.2 试验设计

1.2.1 母种制备。将采集的野生松乳菇带回实验室,挑选菌盖直径为 2~3 cm 的无蛆虫、菇柄实心的松乳菇,去除附着于松乳菇的泥土,用 75% 乙醇棉球轻轻擦洗菇体 2 次。在无菌操作台取菌柄与菌盖交界处的组织,接种到供试斜面培养基中,置于 23 ℃ 恒温培养箱中培养。对组织分离得到的菌丝转管纯化,再转接到装有 PDA 培养基的培养皿中,观察菌丝生长特征,再对菌丝进行显微观察。

1.2.2 不同培养基配方及化学试剂来源不同的 PDA 培养基筛选试验。试验共设计 8 种培养基(表 1、2),在无菌条件下,用直径 3 mm 打孔器在菌种上打孔,在平板培养基上接 2 个直径为 3 mm 菌种,封口并做标记,设置 3 个重复,置于 23 ℃ 恒温培养箱中培养。每隔 7 d 观察并测量菌丝生长指标,筛选适宜的培养基。

表 1 不同培养基配方

Table 1 Different culture medium formula

序号 No.	培养基名称 Medium name	主要成分配比 Proportions of the main ingredients
1	松针浸出液培养基	马铃薯 200 g, 松针浸出液 400 mL, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 600 mL
2	松乳菇浸出液培养基	马铃薯 200 g, 松乳菇浸出液 300 mL, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 700 mL
3	马铃薯综合培养基	马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蛋白胨 5 g, KH ₂ PO ₄ 2 g, MgSO ₄ 1 g, 蒸馏水 1 000 mL
4	MMN	CaCl ₂ 0.05 g, MgSO ₄ 0.15 g, NaCl 0.025 g, FeCl ₃ (1%) 1.2 mL, KH ₂ PO ₄ 0.5 g, 硫酸素 100 μg, (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.25 g, Wort(12 Be') 100 mL, 葡萄糖 10~15 g, 柠檬酸 0.2 g, 蒸馏水 900 mL
5	自制马铃薯培养基	马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL

1.2.3 数据分析。用 Excel 对试验数据进行基本计算和制图,SPSS 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养基配方筛选结果 由于松乳菇菌丝萌发较慢,所以在接种后第 11 天测量数据,之后每隔 7 d 测量 1 次,不同培养基配方对菌丝生长的影响见表 3。

由表 3 可以看出,MMN 培养基和自制马铃薯培养基中菌丝长势均较好。在不同培养基配方条件下菌丝生长速度的快慢依次为自制马铃薯培养基、MMN 培养基、松乳菇浸出液培养基、马铃薯综合培养基、松针浸出液培养基。且 PDA

基金项目 国家现代食用菌产业技术体系拉萨综合试验站资助项目(CARS-24);西藏自治区财政预算项目“西藏菌根食用菌人工培育技术研究”。

作者简介 孙慧娟(1987—),女,黑龙江鹤岗人,助理研究员,硕士,从事食用菌研究。

收稿日期 2017-03-20

培养基中菌丝生长速度极显著高于 MMN 培养基, 试验结果表明 PDA 培养基为培养松乳菇菌丝的最佳培养基。

表 2 化学试剂来源不同的 PDA 培养基

Table 2 PDA medium form different chemical sources

序号 No.	培养基名称 Medium name	主要成分配比 Proportions of the main ingredients
1	新西兰进口培养基	马铃薯浸出粉 2 g, 葡萄糖 4 g, 琼脂 10 g, 蒸馏水 1 000 mL
2	美国进口培养基	马铃薯浸出粉 20 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL
3	国产培养基	马铃薯浸出粉 20 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL
4	自制马铃薯培养基	马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL

表 3 不同培养基配方对菌丝生长的影响

Table 3 Effect of different medium formula on mycelia growth

序号 No.	培养基名称 Medium name	菌丝颜色 Mycelia color	第 11 天菌落直径 Colony diameter on the 11th day//cm	第 18 天菌落直径 Colony diameter on the 18th day//cm	第 26 天菌落直径 Colony diameter on the 26th day//cm	菌丝平均生长速度 Average growth rate of mycelia mm/d	生长势 Growth vigor
1	松针浸出液培养基	白	0	0.1	0.2	0.08 dD	较弱
2	松乳菇浸出液培养基	白	0	0.3	0.3	0.12 cC	中等
3	马铃薯综合培养基	白	0.1	0.2	0.3	0.12 cC	中等
4	MMN	白	1.5	1.8	2.0	0.77 bB	较强
5	自制马铃薯培养基	白	1.4	1.7	2.1	0.81 aA	较强

注: 同列数据后小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 同列数据后大写字母不同表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: Different small letters within the same column mean significant difference ($P < 0.05$), different capital letters within the same column show extremely significant difference ($P < 0.01$)

2.2 化学试剂来源不同的 PDA 培养基筛选结果 虽然利用实验室自制马铃薯浸出液的方法所做出的 PDA 培养基培养松乳菇菌丝取得了较好的效果, 但是培养基颜色较深不利于观察松乳菇菌丝。由于松乳菇菌丝生长缓慢且为白色, 需

要培养基具有较高的纯度和投射度, 所以又做了进一步试验, 通过比较化学试剂来源不同的 PDA 培养基对菌丝生长的影响来选择一个更加适宜培养松乳菇菌丝的培养基配方。化学试剂来源不同的 PDA 培养基对菌丝生长的影响见表 4。

表 4 化学试剂来源不同的 PDA 培养基对菌丝生长的影响

Table 4 Effect of PDA medium from different chemical sources on mycelia growth

序号 No.	培养基名称 Medium name	菌丝颜色 Mycelia color	第 11 天菌落直径 Colony diameter on the 11th day//cm	第 18 天菌落直径 Colony diameter on the 18th day//cm	第 26 天菌落直径 Colony diameter on the 26th day//cm	菌丝平均生长速度 Average growth rate of mycelia mm/d	生长势 Growth vigor
1	新西兰进口培养基	白	1.5	2.8	3.3	1.27 aA	较强
2	美国进口培养基	白	0.8	1.5	1.8	0.69 bB	中等
3	国产培养基	白	0	0.1	0.2	0.08 cC	较弱
4	自制马铃薯培养基	白	1.4	1.7	2.1	0.81 bB	中等

注: 同列数据后小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 同列数据后大写字母不同表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: Different small letters within the same column mean significant difference ($P < 0.05$), different capital letters within the same column show extremely significant difference ($P < 0.01$)

由表 4 可以看出, 在化学试剂来源不同的 PDA 培养基中菌丝生长速度快慢依次为新西兰进口培养基、自制马铃薯培养基、美国进口培养基、国产培养基, 其中新西兰进口培养基中菌丝生长速度极显著高于自制马铃薯培养基。松乳菇菌丝培养的最佳 PDA 培养基为新西兰进口培养基。

3 结论与讨论

试验结果表明, 在新西兰进口 PDA 培养基中松乳菇菌丝表现出较好的长势, 而松针浸出液培养基配方效果并不好, 表现为菌丝长势很弱, 这与前人的研究^[12]有所不同。不同培养基配方对松乳菇菌丝生长的影响很大, 从试验看无论是哪种配方的培养基, 松乳菇菌丝生长速度都比一般腐生性菌类慢很多, 这可能与与其共生的特殊营养需求有关, 这一观点与林亲雄等^[13]的结论一致。前人实践及该研究表明, 组

织分离获得松乳菇菌种时, 一定要选取新鲜且无病虫害的子实体作为分离材料, 保证无菌操作能有效提高组织分离培养菌丝的成功率^[12]。

参考文献

- [1] FRIES E M. Syst. Mycol[M]. Lund: Ex officina Berlingiana, 1921.
- [2] 陈士瑜. 食用菌生产大全[M]. 北京: 北京农业出版社, 1988.
- [3] 卯晓岚. 中国食用菌图谱[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [4] 马琼, 黄建国, 蒋剑波. 接种外生菌根真菌对马尾松幼苗生长的影响[J]. 福建林业科技, 2005, 32(2): 85-88.
- [5] 王辉宪, 李会良, 姚俊. 湘西松乳菇、红汁乳菇中金属元素的测定及其营养价值研究[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 1994, 15(5): 63-66.
- [6] 陈少珍, 韦仕岩, 吴圣进, 等. 野生松乳菇菌丝分离试验[J]. 食用菌, 2004, 26(1): 12-13.
- [7] 杜丽飞, 肖兵南, 曾胜, 等. 松乳菇菌种分离及菌丝生长特性的研究[J]. 食用菌, 2009, 31(1): 9-10.

带上 10 cm 左右空间的泥土应当使用碎土) 或者在彩布条上适量摆放稻草或其他杂草, 淮山药结薯时, 其垂直生长的生长点, 遇到彩布条带时即往低处拐弯生长, 实现顺带而下的定向结薯, 其生长需要良好疏松的土壤环境。最后, 回填土的垄畦从彩布条以上达 25 ~ 30 cm 厚度, 垄面可呈龟背型, 也可以呈平顶型(方便滴灌)。

在林下应用种植可利用 10° ~ 25° 的土地斜坡, 顺地势斜坡按上述整地技术原理和要求, 进行纵带定向种植法的整地。

淮山药纵带定向种植中整地所施用的基肥, 原则上施放在塑料彩布条带的两侧, 然后回土覆盖, 达到保肥保水的目的, 同时避免生长在彩布条带上的薯条接触农家肥等肥料, 以保证其薯条外观光滑光亮。

2.2 平面耕地整地技术 平面耕地整地技术基本原理与 10° ~ 25° 的旱坡地、山地及林下整地技术相似。但是, 在整地方面有明显区别, 为了使每条带种植一端高一端低、承载淮山药定向结薯的塑料彩布条带 10° 以上的斜坡度必须分段设置淮山药定向结薯的塑料彩布条带, 满足种植带斜坡错落, 以适应薯条定向生长。首先采用粉垄机械或拖拉机将耕地进行 15 ~ 20 cm 耕作粉碎, 然后按照上述方法分段设沟, 铺垫彩布条等硬质材料, 一般每段 4 ~ 5 m, 沟底呈 10° 左右的高低落差, 铺垫彩布条时, 注意将其平展拉直, 两侧垂直立起 1 ~ 2 cm, 然后回放一薄层稻草或杂草, 或直接将碎土回填形成“薯床”, 最终垄畦厚度 25 ~ 30 cm, 基肥分两侧施放(不宜放到“薯床”上), 待种。

3 种植及田间管理

3.1 种薯种植 应用该技术, 种薯处理与常规种植基本相似。种薯经常规消毒等处理, 在种植季节内进行种植。具体方法是根据不同品种采用适宜密度, 南方桂淮系列品种, 种植 22 500 ~ 27 000 株/hm², 在建造好的纵带定向垄畦上, 按照“品”字形或“S”形, 种植 3 ~ 4 株/m, 所种植的种薯不宜超出“薯床”宽度, 以便种薯出苗后、结薯时能够垂直生长, 不偏

离彩布条带, 保证其在彩布条“薯床”上自由定向结薯生长(最长的薯条可达 2 ~ 3 m); 北方型品种, 也可按此原理种植, 但是其种植密度应适当增加, 尤其是铁棍类型, 可适当加大种植密度, 以保证产量。

3.2 田间管理 为保证薯条商品性和合理重量, 出苗后, 发现单株苗数达 3 条时, 间苗定苗, 每株保留 1 条壮苗, 方法是用左手压住种薯, 右手将多余苗连其种薯皮一起扯去。其他搭架、施肥、喷滴灌等按常规方法进行。

3.3 结薯期间管理 南方型品种, 往往到夏秋交替时期开始结薯。为了促进高产, 该时期的肥水管理尤为重要, 要保证足够的肥水供应, 使淮山药获得足够营养, 促进其薯条快速伸长膨大, 该时期少施氮肥, 多施磷钾肥; 北方型品种, 在北方地区种植, 有效生长期短, 在前期、中期都要加强肥水管理, 促进高产。

4 采收

该技术为淮山药多薯条同床结薯生长提供了良好的“纵带薯床”, 薯条依塑料彩布条带自由生长, 均下沉摆在“纵带薯床”上, 为机械化或半机械化采收提供了良好的条件。可人工将塑料彩布条纵带上 15 cm 左右的土壤耙开并露出薯条, 然后直接收取淮山药, 也可以采用机械化将塑料彩布条纵带上 15 cm 左右的土壤耙开并露出薯条, 再用人工或机械直接收取淮山药。

参考文献

- [1] 韦本辉. 中国淮山药栽培[J]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [2] 韦本辉, 甘秀芹, 韦威旭, 等. 不同淮山药品种(种质)资源营养特性与聚类分析[J]. 广西农业科学, 2008, 39(5): 596 - 600.
- [3] 韦本辉, 甘秀芹, 韦威泰, 等. 淮山生食性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 317 - 321.
- [4] 李艳英, 甘秀芹, 韦本辉, 等. 64 份淮山种质资源品质性状分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 7(2): 246 - 251.
- [5] 杨学梅. 山药营养保健成分及其应用前景[J]. 当代生态农业, 2012(3/4): 131 - 134.
- [6] 刘丽旋, 杨碧敏, 张婷婷, 等. 淮山的化学成分和药理作用研究进展[J]. 包装与食品机械, 2015, 33(1): 46 - 50.
- [7] 刘丽旋, 林毅雄, 段起, 等. 淮山的功能特性与加工技术研究进展[J]. 生物技术进展, 2013(6): 443 - 447.
- [8] 李文艺, 刘建成. 松乳菇菌丝生长营养需求的初步研究[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(2): 41 - 43.
- [9] 周传云, 廖兴华, 谭周进, 等. 野生松乳菇菌种分离与培养特性的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 66 - 69.
- [10] 冀宝莹, 陈超, 邓春海, 等. 野生松乳菇菌种分离的研究[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(2): 56 - 60.
- [11] 李忠海, 敖常伟, 钟海雁. 松乳菇菌丝体固体平板培养的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(3): 11 - 13.
- [12] 周国英. 松乳菇菌丝体培养及其分离物的 DNA 指纹研究[D]. 长沙: 中南林学院, 2002.
- [13] 林亲雄, 陈京元. 碳源和氮源对松乳菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌学报, 2002, 9(1): 44 - 46.

(上接第 21 页)

本刊提示 来稿请用国家统一的法定计量单位的名称和符号, 不要使用国家已废除了的单位。如面积用 hm² (公顷)、m² (平方米), 不用亩、尺² 等; 质量用 t (吨)、kg (千克)、mg (毫克), 不再用担等; 表示浓度的 ppm 一律改用 mg/kg、mg/L 或 μL/L。