

4 种外生菌根真菌培养条件的研究

李 翠^a, 杨 艳^a, 张茹琴^a, 唐 明^b

(西北农林科技大学 a. 生命科学学院, b. 林学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】明确黄地勺菌(*Spathularia flavida*)、美丽褶孔牛肝菌(*Phylloporus bellus*)、灰鹅膏菌(*Amanita vaginata*)和褐黄牛肝菌(*Boletus luridus*)的最佳培养条件,为其菌丝体扩繁和菌剂生产奠定基础。【方法】采用固体培养,用十字交叉法测量菌落直径,研究不同温度(5,10,15,20,25,30,35,40 ℃)、pH(3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0)、碳源(葡萄糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、甘露醇)及氮源(磷酸氢二铵、硝酸铵、硝酸钾、蛋白胨、麦芽浸膏)对 4 种外生菌根真菌生长的影响。【结果】4 种外生菌根真菌生长的最佳条件不一:黄地勺菌、美丽褶孔牛肝菌和灰鹅膏菌最适生长温度为 25 ℃,属中温菌,褐黄牛肝菌为 30 ℃,属耐高温菌;4 种外生菌根真菌在 pH 3.0~9.0 都能生长,黄地勺菌和美丽褶孔牛肝菌最适生长 pH 为 8.0,灰鹅膏菌为 6.0,褐黄牛肝菌为 7.0;黄地勺菌、美丽褶孔牛肝菌、灰鹅膏菌和褐黄牛肝菌生长速度最快的碳源分别为甘露醇、葡萄糖、可溶性淀粉和麦芽糖;黄地勺菌、美丽褶孔牛肝菌和褐黄牛肝菌生长最适氮源均为麦芽浸膏,灰鹅膏菌为蛋白胨。【结论】初步确定了 4 种外生菌根真菌的最佳培养条件。

【关键词】 外生菌根真菌;培养条件;温度;pH;碳源;氮源

【中图分类号】 Q949.32 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)02-0155-05

Cultivating conditions on the growth of 4 ectomycorrhizal fungi *in vitro*

LI Cui^a, YANG Yan^a, ZHANG Ru-qin^a, TANG Ming^b

(a. College of Life Sciences, b. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The objective of this research was to examine the optimum culture conditions for *Spathularia flavida*, *Phylloporus bellus*, *Amanita vaginata* and *Boletus luridus*. 【Method】 Ectomycorrhizal fungi were cultured on solid medium, and colony diameter was measured by cross method at different temperatures(5,10,15,20,25,30,35,40 ℃), carbon sources(glucose, maltose, lactose, soluble starch, mannitol), nitrogen sources((NH₄)₂HPO₄, NH₄NO₃, KNO₃, peptone, malt resinoid), and the dry weight were measured at different pH(3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0). 【Result】 The optimum conditions for 4 ectomycorrhizal fungi to grow were different. The optimum growth temperature of *S. flavida*, *P. bellus* and *A. vaginata* was 25 ℃, belonging to moderate temperature fungi; and that of *B. luridus* was 30 ℃, belonging to high temperature fungi. These 4 ectomycorrhizal fungi were able to grow in pH ranging from 3.0 to 9.0, while the optimum pH value of *S. flavida* and *P. bellus* was 8.0, *A. vaginata* 6.0, *B. luridus* 7.0. 4 kinds of ectomycorrhizal fungi applied a wide range of carbon sources, *S. flavida*, *P. bellus*, *A. vaginata* and *B. luridus* grew fast as mannitol, glucose, soluble starch, maltose as carbon source respectively. The optimum nitrogen source of *S. flavida*, *P. bellus* and *B. luridus* was malt resinoid, and *A. vaginata* was peptone. 【Conclusion】 The cultivating conditions for these 4 ectomycorrhizal fungi were confirmed preliminarily,

* [收稿日期] 2008-04-14
[基金项目] 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0748); 自然科技资源共享平台资助项目(2005DKA21207-10)
[作者简介] 李 翠(1983—), 女, 河北唐山人, 在读硕士, 主要从事微生物研究。E-mail: licui121@163.com
[通信作者] 唐 明(1962—), 女, 安徽涡阳人, 教授, 主要从事微生物学和森林保护学研究。E-mail: tangm@nwsuaf.edu.cn

which would provide foundation for culture enlargement and fungi-agent production.

Key words: ectomycorrhizal fungi; cultivating condition; temperature; pH; carbon source; nitrogen source

外生菌根真菌(Ectomycorrhizal fungi, ECMF)能扩大宿主植物根系的吸收面积,产生植物激素、酶、抗生素和挥发性物质,促进宿主植物的径高生长,增加作物产量;对根部土传病害有屏障作用,能增强宿主植物的抗逆性;提高新建苗圃、引进树种的育苗成活率,且在干旱地区及撂荒地等恶劣条件下造林中作用更为显著^[1-2]。

ECMF 的纯培养是其研究和应用的基础,菌种的扩繁、菌剂的制备、菌根及菌根真菌的其他研究都需要适宜的条件。由于 ECMF 与林木之间为共生关系,对其共生理理涉及的代谢产物等诸多方面不明^[3],使得菌根深入研究较难;而纯培养作为一种基础研究手段,可简化研究条件,为其机制的深入研究提供可行性。

黄地勺菌(*Spathularia flavida* Pers.:Fr.)、美丽褶孔牛肝菌(*Phylloporus bellus* (Mass.) Corn.)、灰鹅膏菌(*Amanita vaginata* (Bull.:Fr.) Vitt.)和褐黄牛肝菌(*Boletus luridus* Schaeff. Fr.)均是与林木共生的 ECMF,其在西北干旱地区的植树造林中可用于提高苗木的成活率。但目前关于这 4 种 ECMF 纯培养的研究尚未见报道。本研究测定了温度、pH、碳源及氮源对 4 种 ECMF 生长的影响,旨在探索适宜于其生长的最佳条件,以期 ECMF 菌丝体的扩繁和菌剂生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 黄地勺菌(*S. flavida*, 简称 SF)、美丽褶孔牛肝菌(*P. bellus*, 简称 PB)、灰鹅膏菌(*A. vaginata*, 简称 AV)、褐黄牛肝菌(*B. luridus*, 简称 BL),均由西北农林科技大学林学院微生物实验室提供。

1.1.2 供试基础培养基 MMN(Modified Melin-Norkans)培养基^[4]。

1.2 方法

1.2.1 温度对外生菌根真菌生长的影响 在 MMN 培养基上活化的 ECMF 菌落边缘打取直径 5 mm 菌饼,接种于装有 20 mL MMN 固体培养基的培养皿(直径 90 mm)中央。置于温度分别为 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 和 40 ℃恒温箱内培养,每处理设 3

个重复。于接种第 7 天用十字交叉法测量菌落直径。

1.2.2 pH 值对外生菌根真菌生长的影响 分别用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH,将 MMN 液体培养基 pH 值分别调为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 和 9.0,之后装入 2.2 cm×20 cm 试管(25 mL/支),在 121 ℃、0.05 MPa 条件下灭菌 20 min,冷却后每管接种 1 块直径 5 mm 菌饼,25 ℃恒温振荡培养(100 r/min)。第 10 天用滤纸过滤菌丝体,80 ℃烘箱内烘至恒质量,称量菌丝体干质量。每处理 3 个重复。

1.2.3 碳源对外生菌根真菌生长的影响 以 MMN 固体培养基为基础培养基,分别用 20 g/L 的葡萄糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉和甘露醇代替 MMN 培养基中的碳源物质(葡萄糖+麦芽汁)。接种方法同 1.2.1,置于 25 ℃恒温培养,第 7 天时测量菌落直径。每处理 3 个重复。

1.2.4 氮源对外生菌根真菌生长的影响 将 MMN 培养基中的氮源物质((NH₄)₂HPO₄+麦芽汁)分别用 0.25 g/L 的无机氮源((NH₄)₂HPO₄、NH₄NO₃、KNO₃)和 3 g/L 的有机氮源(蛋白胨、麦芽浸膏)替代。接种方法和培养条件同 1.2.3,第 7 天时测量菌落直径。每处理 3 个重复。

1.3 数据分析

试验数据用 SAS-V8 版数据统计分析软件和 Microsoft Excel 2003 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 温度对外生菌根真菌生长的影响

对同种 ECMF 不同温度菌落直径进行单因素方差分析,结果(表 1)表明,温度对 4 种 ECMF 生长的影响均极显著($P<0.01$)。由图 1 可以看出,随着培养温度的升高,4 种 ECMF 的菌落直径均呈先逐渐增加,达峰值后迅速降低的趋势;其中 SF、PB 和 AV 均在 25 ℃时菌落直径最大,表明其生长最适温度为 25 ℃,属于中温菌,且这 3 种 ECMF 在 35 ℃下停止生长;BL 在 30 ℃时菌落直径最大,表明其生长最适温度为 30 ℃,且在 40 ℃时仍可以生长,说明该菌属于耐高温菌。4 种 ECMF 在 5 ℃下均不生长,但一旦置于其生长最适温度下,均能很快恢复生

长。

表 1 温度对外生菌根真菌生长影响的方差分析

Table 1 ANOVA of effect of temperature on the growth of ectomycorrhizal fungi					
外生菌根真菌 ECMF	自由度 DF	离均差平方和 Anova SS	均方 Mean square	F 检验值 F value	Pr>F
SF	7	120.429 9	17.204 3	240.41	<0.000 1
PB	7	78.064 6	11.152 1	90.81	<0.000 1
AV	7	35.884 6	5.126 4	121.51	<0.000 1
BL	7	134.064 6	19.152 1	359.80	<0.000 1

2.2 pH 值对外生菌根真菌生长的影响

对同种 ECMF、不同 pH 值间菌丝体干质量进行单因素方差分析,结果(表 2)表明,pH 值对 SF 生长影响显著($P<0.05$),对 PB 和 BL 生长影响极显著($P<0.01$),对 AV 生长无显著影响($P>0.05$)。

表 2 pH 值对外生菌根真菌生长影响的方差分析

Table 2 ANOVA of effect of pH value on the growth of ectomycorrhizal fungi					
外生菌根真菌 ECMF	自由度 DF	离均差平方和 Anova SS	均方 Mean square	F 检验值 F value	Pr > F
SF	6	0.004 9	0.000 8	3.32	0.030 3
PB	6	0.001 8	0.000 3	6.69	0.001 7
AV	6	0.012 0	0.002 0	2.51	0.073 0
BL	6	0.028 8	0.004 8	15.04	<0.000 1

由图 2 可以看出,4 种 ECMF 在 pH 值 3.0~9.0 都能生长,且随着 pH 值的升高,菌丝体干质量逐渐增加,达到最适宜生长 pH 值后,随着 pH 值的升高,菌丝体干质量逐渐减少。SF 和 PB 生长的最适 pH 值为 8.0,AV 为 6.0,BL 为 7.0。

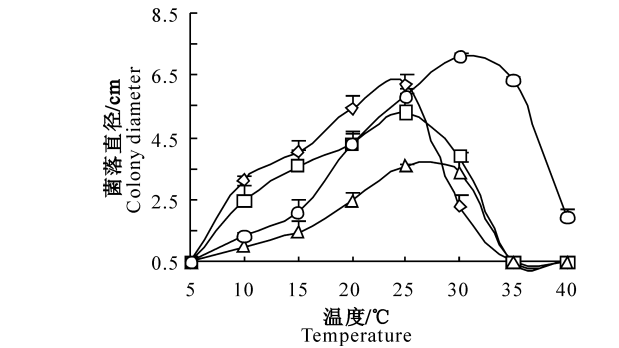


图 1 温度对外生菌根真菌生长的影响

—◇—, SF; —□—, PB; —△—, AV; —○—, BL

Fig. 1 Effect of temperature on the growth of ectomycorrhizal fungi

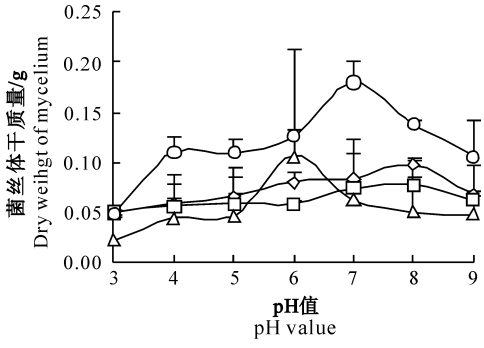


图 2 pH 值对外生菌根真菌生长的影响

—◇—, SF; —□—, PB; —△—, AV; —○—, BL

Fig. 2 Effect of pH value on the growth of ectomycorrhizal fungi

2.3 碳源对外生菌根真菌生长的影响

对同种 ECMF、不同碳源间菌落直径进行单因素方差分析,结果(表 3)表明,碳源对 SF 生长无显著影响($P>0.05$),对 PB、AV 和 BL 生长影响极显著($P<0.01$)。由图 3 可以看出,4 种 ECMF 对碳

表 3 碳源对外生菌根真菌生长影响的方差分析

Table 3 ANOVA of effect of carbon sources on the growth of ectomycorrhizal fungi					
外生菌根真菌 ECMF	自由度 DF	离均差平方和 Anova SS	均方 Mean square	F 检验值 F value	Pr>F
SF	4	3.869 3	0.967 3	3.44	0.051 4
PB	4	11.055 0	2.763 7	106.30	<0.000 1
AV	4	5.372 3	1.343 0	13.99	0.000 4
BL	4	25.410 7	6.352 7	111.13	<0.000 1

源的利用范围较广,不同菌株对碳源利用情况不同。SF、PB、AV 和 BL 生长速度最快的碳源分别为甘露醇、葡萄糖、可溶性淀粉和麦芽糖;其中 SF 对 5 种碳源利用情况相当,PB 对甘露醇的利用最差;AV 和 BL 对乳糖的利用最差。

2.4 氮源对外生菌根真菌生长的影响

对同种 ECMF、不同氮源间菌落直径进行单因素方差分析,结果(表 4)表明,氮源对 4 种 ECMF 生长的影响均极显著($P<0.01$)。由图 4 可以看出,不同种属 ECMF 对氮源利用情况不同,除 BL 对磷酸氢二铵的利用优于蛋白胨外,其余对有机氮源的利用普遍优于无机氮源。SF、PB 和 BL 在麦芽浸膏

为氮源时生长速度最快,说明其最适氮源为麦芽浸膏;AV 在氮源为蛋白胨时生长速度最快,说明其最适氮源为蛋白胨。无机氮源的利用中,SF 和 PB 对硝酸铵利用较好,而对硝酸钾利用最差;AV 对硝酸钾利用较好,而对硝酸铵利用最差;BL 以磷酸氢二铵较好,其次为硝酸铵,硝酸钾最差。

表 4 氮源对外生菌根真菌生长影响的方差分析

外生菌根真菌 ECMF	自由度 DF	离均差平方和 Anova SS	均方 Mean square	F 检验值 F value	$Pr>F$
SF	4	37.559 3	9.389 8	17.7 5	0.000 2
PB	4	26.459 0	6.614 8	51.7 5	<0.000 1
AV	4	21.994 3	5.498 6	36.5 0	<0.000 1
BL	4	14.304 0	3.576 0	66.4 3	<0.000 1

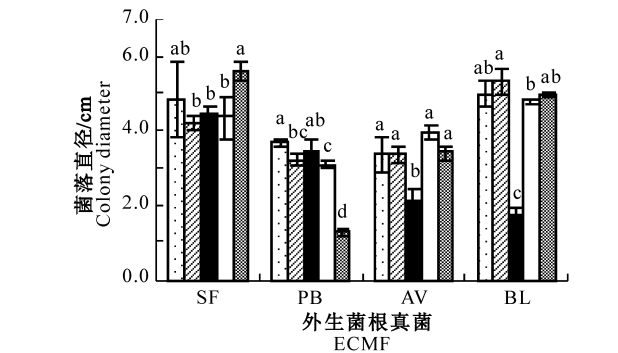


图 3 碳源对外生菌根真菌生长的影响

□.葡萄糖;▨.麦芽糖;■.乳糖;▤.可溶性淀粉;▩.甘露醇;
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Fig.3 Effect of carbon sources on growth of ectomycorrhizal fungi

□.Glucose;▨.Maltose;■.Lactose;▤.Soluble starch;▩.Mannitol;
Those with different small letters within significantly ($P<0.05$)

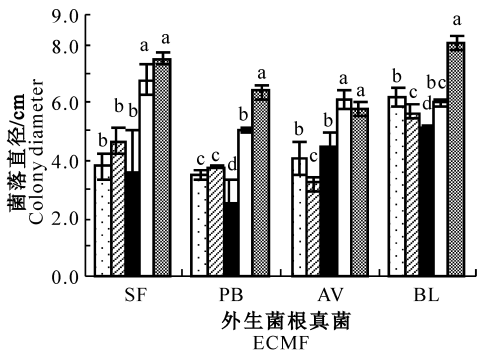


图 4 氮源对外生菌根真菌生长的影响

□.磷酸氢二铵;▨.硝酸铵;■.硝酸钾;▤.蛋白胨;▩.麦芽浸膏;
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Fig.4 Effect of nitrogen sources on the growth of ectomycorrhizal fungi

□. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; ▨. NH_4NO_3 ; ■. KNO_3 ; ▤. Peptone; ▩. Malt resinoid;
Those with different small letters within significantly ($P<0.05$)

3 结论与讨论

试验初步确定了 SF、PB、AV 和 BL 的最佳纯培养条件,发现其最佳生长条件存在一定差异,且其生长温度、pH、碳源和氮源范围较广,可见这 4 种 ECMF 对环境条件的适应性非常强。

温度是影响 ECMF 生长发育的重要因素之一,不同 ECMF 生长的最适温度不尽相同。一般而言,多数菌根真菌适宜在 20~28 ℃ 条件下生长,最高温度极限为 35 ℃,但少数菌种可达 40 ℃^[5]。毕国昌等^[4]对云南省不同针叶林下常见 ECMF 的 44 个菌株进行纯培养,发现绝大多数菌株最适生长温度为 25 ℃,最高临界生长温度为 40 ℃,少数菌株在 5 ℃ 时也能缓慢生长,长期放在 5 ℃ 低温下的菌株即使已经停止生长,一旦置于适温条件下,均能很快恢复生长,生活力并不受影响。本研究 SF、PB、AV 生

长的最适温度为 25 ℃,BL 为 30 ℃,且 BL 在 40 ℃ 下仍可生长,与前人研究结果一致。值得注意的是,同一菌株在人工纯培养条件下与在自然条件下对温度的要求不同。自然条件下,适宜生长温度的范围往往要宽一些,而且因为菌根的形成受诸多条件影响,其中还包括温度对宿主植物的影响,所以菌根真菌菌丝体生长的最适温度不一定是形成菌根的最适温度^[5]。

一般来说,菌根真菌喜酸性,最适 pH 为 4.0~6.0,但是少数菌根真菌喜弱碱性生长条件^[6]。本研究中,AV 在微酸条件下生长较好,BL 在中性条件下生长较好,SF 和 PB 在微碱条件下生长较好。谢一青等^[7]、赵志鹏等^[8]研究也表明,不同菌株的适宜 pH 不尽相同,彩色豆马勃(*Pisolithus tinctorius*)、红绒盖牛肝(*Xerocomus chrysenteron*)和灰盖牛肝菌(*Boletus griseus*)较适宜在酸性条件下生长,厚环

乳牛肝菌 (*Suillus grevillei*) 喜中性, 小美牛肝菌 (*Boletus speciosus*) 则偏碱性, 劣味乳菇 (*Lactarius insulsus*) 在碱性条件下生长较好, 适宜于扩大培养及推广应用的 pH 在 7.0~8.0, 但专一性不强, 相互差别也较小。

大多数研究表明, 不同种类 ECMF 在碳源的利用方面存在较大差异, 所能利用的碳源种类也较多, 既可以利用单糖和双糖, 也可利用简单的多糖, 甚至还可以利用醇类^[6]。宋微等^[9]对 12 种林木 ECMF 生物学特性的研究发现, 牛肝菌 (*Boletus* sp.)、漆蜡蘑 (红蜡膜) (*Laccaria laccata*) 和褐疣柄牛肝 (*Leccinum scabrum*) 在碳源为葡萄糖时生长最快, 赭丝膜 (*Cortinarius russus*)、臭黄菇 (*Russula foetens*)、红绒盖牛肝菌、劣味乳菇和血红铆钉菇 (*Gomphidius rutilus*) 在碳源为蔗糖时生长最快, 美味牛肝菌 (*Boletus edulis*) 和褐环乳牛肝 (*Suillus luteus*) 能很好的利用甘露醇, 褐色滑锈伞 (*Hebeloma mesophaeum*) 和铆钉菇 (*G. viscidus*) 在麦芽糖和可溶性淀粉为碳源时生长最快。本研究中 4 种 ECMF 对碳源的利用也说明了这点。

许多研究证明, 大多数菌根真菌对有机氮的利用最好, 其次是铵态氮, 而对硝态氮的利用一般较差^[6]。本研究中, 4 种 ECMF 均对有机氮源利用较好, 这与宋微等^[9]、刘雪峰等^[10]的研究结果基本一致, 原因可能是有机氮源成分较复杂, 除提供氮素外还能提供一些其他生长物质。研究中发现, 以麦芽浸膏为氮源时基生菌丝比较旺盛, 氮源为蛋白胨时气生菌丝比较旺盛, 因此在配置培养基时, 二者以适当的比例配合使用将更利于 ECMF 的生长。

温度、pH 等因素影响 ECMF 的生长, 而 Strzelczyk 等^[11]研究表明, 生态因子, 如温度、pH 等能够影响激素的分泌。ECMF 分泌的激素能促进宿主植物的生长, 因此, 研究 ECMF 纯培养条件的同时, 兼顾最佳条件下各类激素的分泌研究, 能更好地研究 ECMF 对植物生长的促进作用, 同时为菌剂的应用奠定基础。

[参考文献]

- [1] Takeshi T, Ryota K, Kazuyolii F. Plant growth and nutrition in pine (*Pinus thunbergii*) seedlings and dehydrogenase and phosphatase activity of ectomycorrhizal root tips inoculated with seven individual ectomycorrhizal fungal species at high and low nitrogen conalitions [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40 (5): 1235-1243.
- [2] 栾庆书, 李 立, 李希桥. 中国外生菌根研究的 20 年成就 [J]. 辽宁林业科技, 2000(6): 36-39.
- [3] Luan Q S, Li L, Li X Q. The 20 years' achievements on ectomycorrhizal in China [J]. *Journal of Liaoning Forestry Science & Technology*, 2000(6): 36-39. (in Chinese)
- [4] 于富强, 纪大千, 刘培贵. 云南外生菌根真菌分离培养研究 [J]. *植物研究*, 2003, 23(1): 66-71.
- [5] Yu F Q, Ji D G, Liu P G. Studies on pure culture of the ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus yunnanensis* [J]. *Bulletin of Botannical Research*, 2003, 23(1): 66-71. (in Chinese)
- [6] 毕国昌, 郭秀珍, 臧 穆. 在纯培养条件下温度对外生菌根菌生长的影响 [J]. *林业科学研究*, 1989, 2(3): 247-253.
- [7] Bi G C, Guo X Z, Zang M. The effect of temperature on ectomycorrhizal fungi under pure culture conditions [J]. *Journal of Forestry Research*, 1989, 2(3): 247-253. (in Chinese)
- [8] 蒋盛岩, 张 平, 胡劲松, 等. 外生菌根菌白毒伞 (*Amanita verina*) 菌丝体纯培养条件 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2002, 25(1): 75-77.
- [9] Jiang S Y, Zhang P, Hu J S, et al. Study on pure culture of ectomycorrhizal fungi *Amanita verna* [J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2002, 25(1): 75-77. (in Chinese)
- [10] 弓明钦, 陈应龙, 仲崇禄, 等. 菌根研究及应用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1997: 37-46.
- [11] Gong M Q, Chen Y L, Zhong C L, et al. Mycorrhizal research and application [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1997: 37-46. (in Chinese)
- [12] 谢一青, 李志真, 杨宗武. pH、盐浓度及铝离子对菌根菌生长的影响 [J]. *江西农业大学学报: 自然科学版*, 2002, 24(2): 204-207.
- [13] Xie Y Q, Li Z Z, Yang Z W. Effect of pH value, salt concentration and Al^{3+} on mycorrhizal fungus growth [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis: Natural Sciences Edition*, 2002, 24(2): 204-207. (in Chinese)
- [14] 赵志鹏, 郭秀珍. 外生菌根真菌纯培养的生态学研究 [J]. *林业科学研究*, 1989, 2(2): 136-141.
- [15] Zhao Z P, Guo X Z. Ecology research of pure culture on mycorrhizal fungus [J]. *Journal of Forestry Research*, 1989, 2(2): 136-141. (in Chinese)
- [16] 宋 微, 吴小芹. 12 种林木外生菌根真菌的培养条件 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2007, 31(3): 133-135.
- [17] Song W, Wu X Q. Research of cultivating conditions of 12 wood ectomycorrhizal fungi [J]. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 2007, 31(3): 133-135. (in Chinese)
- [18] 刘雪峰, 冯志伟, 刘永刚. 黄硬皮马勃培养特性的研究 [J]. *云南林业科技*, 2001(4): 50-52.
- [19] Liu X F, Feng Z W, Liu Y G. Study of cultural characteristics of *Scleroderma flavidum* [J]. *Yunnan Forestry Science and Technology*, 2001(4): 50-52. (in Chinese)
- [20] Strzelczyk E, Kamper M, Pachlewski R. The influence of pH and temperature on ethylene production by mycorrhizal fungi of pine [J]. *Mycorrhiza*, 1994(4): 193-196.