

网络出版时间:2023-06-30 15:29 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2024.01.015
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/61.1390.S.20230629.1645.009.html

基于菌株生长和菌根苗品质的红汁乳菇菌株筛选

谭云^{1,2,3}, 谭著明^{1,2,3}, 沈宝明^{1,2,3}, 申爱荣^{1,2,3}, 刘丽娜^{1,2,3}

(1 湖南省林业科学院, 湖南长沙 410004; 2 湖南省菌根性食用菌种质资源保护与利用中心, 湖南长沙 410004;

3 湖南省林下特色生物资源培育与利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410004)

【摘要】【目的】筛选用于菌根苗接种的高质量红汁乳菇菌株, 为提高红汁乳菇产量提供支持。【方法】以 10 个红汁乳菇菌株(JH1、JH2、JH4、JH5、JH7、JH8、JH10、JH11、JH12、JH13)为研究对象, 将菌株分别在 PDA 和 BAF 培养基上培养后, 测定菌株生长势指标(菌丝生长速度、菌丝生物量); 将红汁乳菇液体菌种接种于马尾松幼苗根部合成菌根苗, 以不接种为对照(CK), 培养 210 d 后对菌根合成能力(菌根数量、菌根侵染率、菌根化率)和宿主植物生长量(苗高、主根长、地径、干质量)进行测定。对上述 9 个参数进行相关性分析, 并用隶属函数法对菌株性状进行综合评价。【结果】①在 PDA 固体培养基上, 以菌株 JH1 菌丝生长速度最快, 达到 3.17 mm/d; 在 BAF 液体培养基上, 以菌株 JH5 的菌丝生物量最大, 为 3.28 g/L。②所有菌株均能与马尾松根系形成外生菌根, 但菌根形态并不相同。接种红汁乳菇菌株 JH5 的马尾松苗的菌根数量为 45.65 个/株, 菌根化率为 90.67%, 菌根侵染率为 79.60%, 显著高于其他 9 个菌株, 表现出较强的合成菌根苗能力。③接种不同红汁乳菇菌株的马尾松苗, 在苗高、主根长、地径和干质量等指标上表现各异。接种菌株 JH4 的马尾松苗高、主根长和干质量表现最优, 较对照分别提高 24.45%, 16.72% 和 53.33%; 接种菌株 JH5 的马尾松苗地径生长量表现最优, 较对照提高 5.19%。④相关性分析表明, 菌丝生物量与菌根化率和菌根苗干质量呈极显著正相关($P < 0.01$), 菌根数量与菌根化率和菌根苗地径呈极显著正相关($P < 0.01$)。⑤基于隶属函数法的综合评价结果表明, 红汁乳菇 JH5 为适合培育菌根苗的最佳菌株, JH4 和 JH7 为次优菌株。【结论】筛选出 1 个优良红汁乳菇菌株 JH5, 该菌株的生长势和菌根苗品质整体表现较好。

【关键词】 红汁乳菇; 菌根苗; 菌根合成; 隶属函数法

【中图分类号】 S646.1⁺9

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2024)01-0136-09

Selection of *Lactarius hatsudake* strain based on strain activities and mycorrhizal seedling quality

TAN Yun^{1,2,3}, TAN Zhuming^{1,2,3}, SHEN Baoming^{1,2,3},
SHEN Airong^{1,2,3}, LIU Lina^{1,2,3}

(1 Hunan Academy of Forestry, Changsha, Hunan 410004, China; 2 Hunan Germplasm Resources Protection and Utilization Center for Mycorrhizal Edible Fungi, Changsha, Hunan 410004, China; 3 Hunan Engineering Research Center for Cultivation and Utilization of Distinctive Bio-resources Under Forest, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: 【Objective】The properties of *Lactarius hatsudake* strains were evaluated to screen high-quality strains of *L. hatsudake* for mycorrhizal seedling inoculation and to improve the yield of *L. hatsudake* plantations. 【Method】Ten *L. hatsudake* strains (JH1, JH2, JH4, JH5, JH7, JH8, JH10, JH11, JH12 and JH13) were inoculated into PDA and BAF media to determine strain growth vigor (mycelial growth rate and mycelial biomass). The mycorrhizal synthesis ability (mycorrhizal number, mycorrhizal in-

【收稿日期】 2022-09-29

【基金项目】 湖南省创新平台与人才计划项目(2021NK4186); 湖南省重点研发计划项目(2016NK2161); 湖南省林业科技计划项目(XLK201969, XLK201904)

【作者简介】 谭云(1989—), 男, 湖南长沙人, 助理研究员, 硕士, 主要从事微生物资源学研究。E-mail: tany_hncu@163.com

【通信作者】 申爱荣(1980—), 女, 湖南邵阳人, 副研究员, 博士, 主要从事菌物学研究。E-mail: shenar@hnlky.cn

festation rate and mycorrhizalisation rate) and host plant growth (seedling height, main root length, ground diameter and dry weight) were measured by inoculating *L. hatsudake* strains on seedlings of *Pinus massoniana* after 210 d. Correlation analysis and subordinate function method were used for evaluate strains comprehensively. 【Result】 ① Among the 10 strains, JH1 had the fastest mycelial growth rate of 3.17 mm/d on PDA solid culture, and JH5 had the largest mycelial biomass of 3.28 g/L on BAF liquid culture. ② All strains were able to synthesize ectomycorrhiza with *P. massoniana* and mycorrhizal forms were variable. When the seedlings of *P. massoniana* were inoculated with JH5 strain, average number of mycorrhizae, mycorrhizalization rate and mycorrhizal infestation rate were 45.65, 90.67% and 79.60%, showing significantly higher ability to synthesize mycorrhiza than other strains. ③ Seedlings of *P. massoniana* inoculated with different *L. hatsudake* strains performed differently in terms of seedling height, main root length, ground diameter and dry weight. Seedlings with JH4 performed best in terms of seedling height, main root length and dry weight, which were 24.45%, 16.72% and 53.33% higher than the control, respectively. Seedlings inoculated with JH5 performed best in terms of ground diameter, which was 5.19% higher than to the control. ④ Correlation analysis showed that mycelial biomass was significantly and positively correlated with mycorrhizal rate and dry weight of mycorrhizal seedlings ($P < 0.01$). Mycorrhizal number was significantly and positively correlated with mycorrhizal rate and ground diameter of mycorrhizal seedlings ($P < 0.01$). ⑤ The comprehensive evaluation showed that JH5 was the best strain for cultivating mycorrhizal seedlings, while JH4 and JH7 were superior strains. 【Conclusion】 With better mycelial growth vigor and mycorrhizal seedling quality, JH5 was screened as excellent *L. hatsudake* strain.

Key words: *Lactarius hatsudake*; mycorrhizal seedlings; mycorrhizal synthesis; subordinate function method

红汁乳菇(*Lactarius hatsudake*)为红菇科乳菇属真菌,俗称寒菌、雁鹅菌、枞菌、铜锣菌、紫花菌等,可与松科和壳斗科等经济树种形成外生菌根,是一类珍稀外生菌根性食用菌^[1]。红汁乳菇资源在我国分布广泛,从东北温带到西南、华中、华东等亚热带地区均有分布,其中湖南、贵州和云南等地产量较大,资源丰富,食用历史悠久。红汁乳菇子实体营养丰富、味道鲜美、食药价值高,富含粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、多糖、多种氨基酸及维生素等生物活性成分^[2-3],具有益肠胃、提高免疫力、抗肿瘤、抗炎症等药用功效^[4-6],是一种天然优质多功能菌物食品。红汁乳菇可鲜食、速冻,亦可加工成罐头或者菌油^[7],产业链完整,开发前景广阔。

目前,有关红汁乳菇的研究涵盖菌种鉴定、菌丝发酵、活性成分^[8]、菌根合成^[9]、人工栽培^[10]、功能基因挖掘^[11]、内生细菌生物互作^[12]等多个领域,其中人工栽培与种植园管理是红汁乳菇产业链的核心环节。随着菌根性食用菌种植园建设的逐步兴起,市场对菌根苗质量的要求越来越高,也是种质质量提升的重要方向。红汁乳菇离体菌丝生长速度慢,并伴随有自溶现象,对菌种质量稳定性构成了较大挑战。因此,提高菌种活力,提升生长速度,缩短培

养周期,是改善红汁乳菇菌种品质的主要切入点,也是提高菌根苗品质和子实体产量的关键。

本研究从提高菌种活力入手,将提升菌根苗质量作为目标,比较 10 个红汁乳菇菌株菌丝在相同培养基中的生长速度和生物量等性状,用对应的液体菌种接种宿主植物马尾松,在控制条件下合成菌根,继而评估菌根合成能力和促进马尾松苗生长的能力,遴选出综合表现优异的菌株,以期为优良红汁乳菇菌株的筛选提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

试验菌株于 2017—2019 年由湖南嘉禾县试验基地野生红汁乳菇子实体分离得到,菌株纯度经 ITS 测序确认。供试 10 个红汁乳菇菌株编号分别为 JH1、JH2、JH4、JH5、JH7、JH8、JH10、JH11、JH12、JH13。

1.2 培养基

红汁乳菇固体培养采用 PDA 培养基,液体培养采用 BAF 培养基^[13-14]。所有培养基 pH 值均为 6.0。

1.3 菌株生长活力测定

将 10 株红汁乳菇菌株分别接到 PDA 固体培养

基上,观察菌丝密度、颜色变化,在接种后 7 和 14 d,采用“十字交叉法”测量菌丝直径,计算菌丝生长速度;将 10 株菌株分别接入到 BAF 液体培养基中培养 21 d,培养结束后,将菌丝抽滤后于 80 °C 烘干至恒质量,测定菌丝发酵生物量^[13]。每个试验均重复 3 次,结果用“平均值±标准差”表示。

1.4 红汁乳菇马尾松菌根苗培育

1.4.1 红汁乳菇液体菌种培养 将上述 10 个红汁乳菇菌株分别接种到 121 °C 灭菌 20 min 的 BAF 液体培养基中,于 23 °C、150 r/min^[15] 培养 21 d,形成菌丝球后结束培养。将中止发酵培养的 10 个菌株的液体菌种分别保存,用于接种马尾松苗。

1.4.2 马尾松育苗 马尾松苗培养基质用泥炭土和蛭石以体积比 2:1 混合,121 °C 灭菌 2 h,冷却后平铺于 32 穴育苗穴盘中,备用。选取饱满、无虫害的马尾松种子,用无菌水浸泡 24 h 后,用体积分数 30% 过氧化氢振荡浸泡 15 min,再用无菌水冲洗 5 次,放在垫有灭菌湿润纱布的培养皿中,25 °C 培养箱中催芽,待种子萌发率达 80% 以上时,将萌发的种子点播至育苗穴盘中。

1.4.3 菌根合成 将播种的育苗穴盘置于人工气候室内培养,适时喷水,待马尾松苗高至 3~5 cm 时,接入 1.4.1 节红汁乳菇液体菌种,接种量为 3 mL/株。以不接种的马尾松苗作为空白对照(CK),每个菌株接种 160 株苗。用于盆栽试验的马尾松苗全部置于光照 1 500 lx、气温(25±2) °C、相对湿度 70%~80% 环境下培养,每隔 7 d 用超纯水浇透 1 次。

1.4.4 菌根形态特征和数量观测 接种 210 d 后,每个处理随机抽取 30 株成苗,调查菌根苗的苗高、

主根长、地径、干质量等生长量指标,同时在体视显微镜下观测马尾松苗的菌根形态特征和数量,用 Agerer^[16] 的方法对菌根形态特征进行描述^[17-18],并计算菌根化率^[19]:

$$P_1 = N_1 / N \times 100\% \quad (1)$$

式中: P_1 为菌根化率; N_1 为有菌根的株数; N 为取样总株数。

将马尾松苗的根系剪成 1 cm 等长的根段,随机选取 100 个根段,在体视显微镜下检测并统计外生菌根数量,计算菌根侵染率^[19]:

$$P_2 = \frac{n_1}{n} \times 100\% \quad (2)$$

式中: P_2 为菌根侵染率; n_1 为侵染菌根根段数; n 为总根段数。

1.5 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,采用 Duncan's 法进行单因素和多重比较方差分析,显著性水平设置为 0.05,并对数据进行正态分布检测和 Pearson 相关性分析。

应用模糊数学中的隶属函数法,计算红汁乳菇菌株各参数的隶属函数值:

$$U(X) = \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}} \quad (3)$$

式中: $U(X)$ 为隶属函数值, X 为红汁乳菇某参数因子, X_{\max} 和 X_{\min} 分别为该因子的最大值和最小值。

2 结果与分析

2.1 10 个红汁乳菇菌株生长情况比较

不同红汁乳菇菌株生长活力的比较见表 1。

表 1 不同红汁乳菇菌株生长活力的比较

Table 1 Comparison of strain growth activities of different *Lactarius hatsudake* strains

菌株 Strain	菌丝生长速度/(mm·d ⁻¹) Mycelial growth rate	菌丝颜色 Mycelial color	菌丝生物量/(g·L ⁻¹) Mycelial biomass
JH1	3.17±0.02 a	浅绿色 Light green	2.98±0.05 b
JH2	2.36±0.01 cd	白色 White	2.21±0.03 e
JH4	2.44±0.02 c	白色 White	2.58±0.05 c
JH5	2.81±0.01 b	纯白 White	3.28±0.02 a
JH7	3.12±0.03 a	白色 White	2.96±0.05 b
JH8	2.22±0.02 d	白色 White	2.38±0.03 d
JH10	1.02±0.03 e	黄褐色 Yellowish brown	1.56±0.05 g
JH11	2.15±0.02 d	肉红色 Flesh red	1.88±0.03 f
JH12	2.19±0.01 d	白色 White	1.89±0.04 f
JH13	2.20±0.03 d	白色 White	2.36±0.04 d

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

Note: Different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$). The same below.

由表 1 可知,10 个红汁乳菇在 PDA 固体培养基上培养时,各菌株的菌丝生长速度和形态差异均较大。其中菌株 JH1 和 JH7 菌丝生长速度最快,分别为 3.17 和 3.12 mm/d,两者之间无显著差异,但均显著高于其他 8 个菌株;菌株 JH1 菌丝浅绿色,稀疏,气生菌丝多,菌丝纤细,基内菌丝少;菌株 JH7 菌丝白色,稀疏,气生菌丝多,菌丝纤细。菌株 JH5 的生长速度为 2.81 mm/d,菌丝纯白色,致密,基外菌丝茂盛,不易老化,呈旺盛态,基内菌丝和基外菌丝生长同步。菌株 JH2、JH4 之间及菌株 JH8、JH11、JH12 和 JH13 之间菌丝生长速度无显著差异;菌株 JH10 菌丝生长速度最慢,仅为 1.02 mm/d,菌丝黄褐色,稀疏,气生菌丝多,易老化,呈羸弱态。

由表 1 还可知,在 BAF 液体培养基中培养 21 d 后,红汁乳菇菌株 JH5 的菌丝生物量最大,为 3.28 g/L,显著高于其他 9 个菌株。观察发现,其菌丝颜色呈金黄色,形状为短棒状或短杆状,菌丝球较小;这种短小的菌丝体,利于菌剂制作,可以直接接种马尾松幼苗。菌株 JH1 与 JH7、菌株 JH8 与 JH13、菌株 JH11 与 JH12 相互间菌丝生物量无显著差异;菌株 JH4 的菌丝生物量为 2.58 g/L,菌丝球颗粒直径较大;菌株 JH10 液体培养时菌丝生长最慢,生物量

最低,仅为 1.56 g/L。

综合菌株的生长情况来看,红汁乳菇菌株 JH1、JH5 和 JH7 在菌丝生长速度和生物量上表现良好,整体优于其他 7 个菌株。

2.2 马尾松苗接种红汁乳菇菌株后的菌根形态特征和菌根合成能力

马尾松苗接种不同红汁乳菇菌株 210 d 后,菌根形态观测结果(表 2 和图 1)显示,不同红汁乳菇菌株的菌根形态表现各异,其形态包括二叉分枝状、不规则羽状、珊瑚状和单轴羽状 4 大类;菌根探索类型可以分为接触探索型、短距离探索型和长距离探索型 3 种。从菌根形态看,接种 JH5 菌株的马尾松苗的菌根形态为珊瑚状,接种 JH1、JH8 和 JH10 菌株的马尾松苗的菌根形态为二叉分枝状,接种 JH2、JH4、JH7 和 JH11 菌株的马尾松苗的菌根形态为不规则羽状,接种 JH12 和 JH13 菌株的马尾松苗的菌根形态为单轴羽状。从菌根探索类型看,接种 JH1 和 JH8 菌株的马尾松苗的菌根探索类型为短距离探索型,接种 JH2、JH4、JH7 和 JH13 菌株的马尾松苗的菌根探索类型为长距离探索型,接种 JH5、JH10、JH11 和 JH12 菌株的马尾松苗的菌根探索类型为接触探索型。

表 2 马尾松苗接种红汁乳菇菌株后的菌根形态和探索类型

Table 2 Morphological and exploration type of mycorrhiza after inoculating different *Lactarius hatsudake* strains on seedlings of *Pinus massoniana*

接种菌株 Inoculated strain	菌根形态 Morphological type of mycorrhiza	菌根探索类型 Exploration type of mycorrhiza
JH1	二叉分枝状 Dichotomous	短距离探索型 Short-distance exploration
JH2	不规则羽状 Irregularly pinnate, dichotomous-like	长距离探索型 Long-distance exploration
JH4	不规则羽状 Irregularly pinnate, dichotomous-like	长距离探索型 Long-distance exploration
JH5	珊瑚状 Coralloid	接触探索型 Contact exploration
JH7	不规则羽状 Irregularly pinnate, dichotomous-like	长距离探索型 Long-distance exploration
JH8	二叉分枝状 Dichotomous	短距离探索型 Short-distance exploration
JH10	二叉分枝状 Dichotomous	接触探索型 Contact exploration
JH11	不规则羽状 Irregularly pinnate, dichotomous-like	接触探索型 Contact exploration
JH12	单轴羽状 Uniaxial pinnate	接触探索型 Contact exploration
JH13	单轴羽状 Uniaxial pinnate	长距离探索型 Long-distance exploration

表 3 显示,接种不同红汁乳菇菌株的马尾松苗均形成了形态正常的外生菌根,试验组马尾松苗平均菌根数量为 21.91 个/株,而对照组未形成菌根。其中,接种红汁乳菇 JH5 菌株的马尾松苗的菌根数量为 45.65 个/株,菌根化率为 90.67%,菌根侵染率高达 79.60%,均显著高于其他 9 个菌株,在 10 个菌株中表现最优。接种 JH10 菌株的马尾松苗的

菌根化率最低,仅为 45.00%;接种 JH11 菌株的马尾松苗的菌根侵染率最低,仅为 31.75%;接种 JH12 菌株的马尾松苗的菌根数量最少,仅为 10.16 个/株。由此可见,接种红汁乳菇 JH5 菌株的菌根苗在菌根数量、菌根化率和菌根侵染率上整体显著优于其他 9 个菌株,合成菌根能力最强。

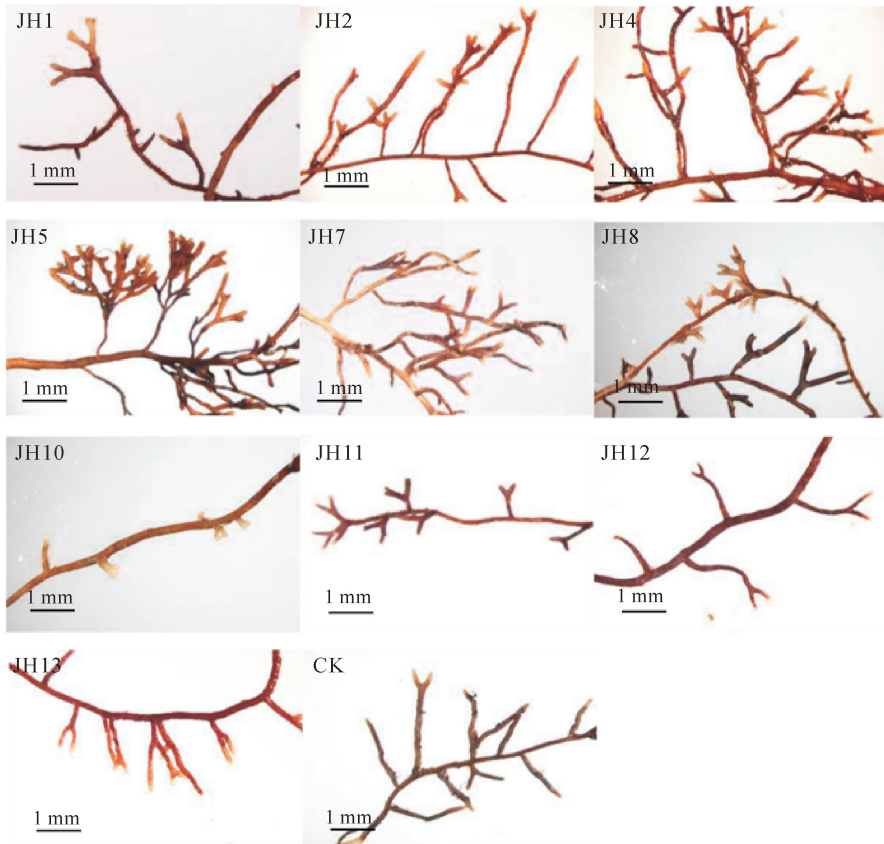


图 1 马尾松苗接种红汁乳菇菌株后的菌根形态

Fig. 1 Mycorrhizal morphology after inoculating different *Lactarius hatsudake* strains on seedlings of *Pinus massoniana*

表 3 不同红汁乳菇菌株合成菌根能力的比较

Table 3 Comparison of mycorrhizal synthesis ability of different *Lactarius hatsudake* strains

菌株 Strain	菌根数量/(个·株 ⁻¹) Mycorrhiza amount	菌根化率/% Mycorrhiza rate	菌根侵染率/% Mycorrhiza infection rate	菌株 Strain	菌根数量/(个·株 ⁻¹) Mycorrhiza amount	菌根化率/% Mycorrhiza rate	菌根侵染率/% Mycorrhiza infection rate
JH1	14.17±0.18 e	62.00±1.46 bc	52.33±9.56 bc	JH10	12.52±0.91 ef	45.00±2.89 c	56.67±1.2 bc
JH2	22.13±0.24 c	64.25±2.64 bc	50.34±8.47 cd	JH11	19.41±0.69 d	49.00±2.57 c	31.75±0.85 e
JH4	28.47±0.65 b	65.67±1.44 bc	48.80±6.88 d	JH12	10.16±0.34 f	63.00±2.55 bc	35.00±0.58 e
JH5	45.65±0.88 a	90.67±9.33 a	79.60±0.75 a	JH13	15.64±0.29 e	58.96±5.48 bc	47.33±2.14 d
JH7	28.15±0.68 b	70.87±6.22 b	68.62±2.68 b	CK	0	0	0
JH8	22.83±1.38 c	69.67±7.13 b	50.83±0.6 cd				

2.3 不同红汁乳菇菌株对马尾松苗生长的影响

2.3.1 苗高 由表 4 可见,不同红汁乳菇菌株接种马尾松后,其对苗高的影响不尽相同。其中接种 JH4 和 JH5 菌株的马尾松苗较高,分别达到 25.25 和 24.61 cm,二者之间无显著差异,但显著高于其他 8 个菌株和对照。接种菌株 JH1、JH2、JH11 和 JH12 的马尾松苗的苗高与对照相比无显著差异。接种红汁乳菇 JH13 菌株的马尾松苗的苗高显著低于对照,说明 JH13 对马尾松苗高的生长具有抑制作用。

2.3.2 主根长 由表 4 可见,接种不同红汁乳菇菌株对马尾松苗主根的促生作用不尽相同。接菌组马尾松苗的平均主根长为 12.49 cm,略高于对照组

(12.20 cm),总体上看差异不大,其中接种 JH4 和 JH5 菌株的马尾松苗的主根较长,分别达到 14.24 和 13.72 cm,均显著高于对照,说明这 2 个菌株可以促进马尾松苗主根的生长。接种 JH10 菌株的马尾松苗主根长显著低于对照,仅为 10.35 cm,说明菌株 JH10 具有抑制马尾松主根生长的效果。接种其余 7 个菌株的马尾松苗的主根长度与对照均无显著差异,说明其对马尾松苗主根生长影响不大。

2.3.3 地径 由表 4 可见,试验组马尾松苗的平均地径为 2.13 mm,略高于对照组(2.12 mm),总体而言接种外生菌根真菌对马尾松苗地径影响不大。10 个接菌处理中,接种菌株 JH4、JH5 和 JH8

的马尾松苗的地径较大,分别达到 2.20, 2.23 和 2.16 mm,显著高于对照,说明接种 JH5、JH4、JH8 能显著促进马尾松苗地径的生长。接种菌株 JH1、JH2、JH7、JH11、JH12 和 JH13 的马尾松苗的地径与对照无显著差异,而接种 JH10 菌株的马尾松苗的地径显著低于对照。说明 JH10 菌株对马尾松苗的地径生长具有抑制效应。

2.3.4 干质量 由表 4 可见,10 个红汁乳菇菌株接种马尾松苗的平均干质量为 1.03 g,显著高于对照,说明接种红汁乳菇可以大幅促进宿主植物马尾

松营养物质的积累。接种菌株 JH4 的菌根苗干质量最大,达到 1.15 g,显著高于其他 9 个菌株。接种菌株 JH1、JH2、JH5、JH7、JH8 的马尾松苗的干质量均大于 1.00 g,但相互间均无显著差异;接种菌株 JH11 的马尾松苗的干质量最低,仅为 0.91 g,但也显著高于对照(0.75 g)。说明各红汁乳菇菌根均能够促进马尾松根系从土壤中吸收养分供自身生长。

上述结果证明,以马尾松苗高、主根长、地径和干质量为评估指标,JH4、JH5、JH7 和 JH8 为优选接种马尾松苗的红汁乳菇菌株。

表 4 不同红汁乳菇菌株接种马尾松苗后植株生长参数的比较

Table 4 Comparison of growth parameters after inoculating different *Lactarius hatsudake* strains on seedlings of *Pinus massoniana*

菌株 Strain	苗高/cm Seedling height	主根长/cm Main root length	地径/mm Ground diamete	干质量/g Dry weightt
JH1	21.51±0.16 def	11.67±0.22 d	2.04±0.06 de	1.07±0.04 bc
JH2	21.81±0.31 def	11.96±0.22 d	2.14±0.02 bc	1.05±0.04 bc
JH4	25.25±0.28 a	14.24±0.38 a	2.20±0.01 ab	1.15±0.01 a
JH5	24.61±0.34 a	13.72±0.28 ab	2.23±0.01 a	1.10±0.01 b
JH7	22.56±0.24 d	12.33±0.16 cd	2.15±0.01 bc	1.06±0.02 bc
JH8	23.14±0.55 bc	12.25±0.36 cd	2.16±0.01 ab	1.08±0.01 bc
JH10	22.31±0.78 cd	10.35±0.22 e	2.03±0.02 e	0.93±0.01 dc
JH11	20.75±0.13 f	12.83±0.31 bc	2.13±0.01 bc	0.91±0.01 e
JH12	20.62±0.18 f	12.98±0.09 bc	2.11±0.01 cd	0.97±0.01 d
JH13	18.15±0.12 g	12.58±0.14 c	2.15±0.02 bc	0.99±0.03 d
CK	20.89±0.31 ef	12.20±0.14 cd	2.12±0.02 cd	0.75±0.01 f

2.4 红汁乳菇菌株及菌根苗各参数因子的相关性分析

采用 SPSS 17.0 软件,对红汁乳菇菌株的菌丝生长速度、菌丝生物量、菌根数量、菌根化率、菌根侵染率,以及马尾松菌根苗的苗高、主根长、地径、干质量等参数因子,进行柯尔莫可洛夫-斯米洛夫检验

(Kolmogorov-Smirnov test),结果显示,红汁乳菇菌株及菌根苗各参数数据均服从正态分布,适于进行 Pearson 相关性分析。

红汁乳菇菌株及菌根苗各参数因子的相关性分析结果如表 5 所示。

表 5 红汁乳菇菌株及菌根苗各参数因子的 Pearson 相关性分析

Table 5 Pearson correlation analysis of parameter factors in *Lactarius hatsudake* strains and mycorrhizal seedlings

因子 Factors	菌株生长参数 Strain activities parameters		菌根参数 Mycorrhizal parameters			生长量参数 Growth parameters			
	L ₁	L ₂	P ₁	P ₂	P ₃	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄
L ₁	1.000	0.871**	0.448	0.647*	0.346	0.178	0.444	0.357	0.621
L ₂		1.000	0.705*	0.818**	0.700*	0.411	0.429	0.486	0.771**
P ₁			1.000	0.823**	0.732*	0.689*	0.577	0.808**	0.627
P ₂				1.000	0.687*	0.521	0.569	0.725*	0.737*
P ₃					1.000	0.531	0.007	0.323	0.520
Z ₁						1.000	0.348	0.429	0.685*
Z ₂							1.000	0.838**	0.497
Z ₃								1.000	0.561
Z ₄									1.000

注:L₁. 菌丝生长速度;L₂. 菌丝生物量;P₁. 菌根数量;P₂. 菌根化率;P₃. 菌根侵染率;Z₁. 苗高;Z₂. 主根长;Z₃. 地径;Z₄. 干质量。表 6 同。

** 表示在 0.01 水平(双侧)显著相关;* 表示在 0.05 水平(双侧)显著相关。

Note:L₁. Mycelium growth rate;L₂. Mycelial biomass;P₁. Mycorrhiza amount;P₂. Mycorrhiza rate;P₃. Mycorrhiza infection rate;Z₁. Seedling height;Z₂. Main root length;Z₃. Ground diameter;Z₄. Dry weight. The same for Table 6. ** indicates significant correlation at 0.01 level (bilateral). * indicates significant correlation at the level of 0.05 (bilateral).

由表 5 可见,菌丝生长速度与菌丝生物量呈极显著正相关($P < 0.01$),与菌根化率呈显著正相关($P < 0.05$);菌丝生物量与菌根数量、菌根侵染率呈显著正相关($P < 0.05$),与菌根化率和菌根苗干质量呈极显著正相关($P < 0.01$)。说明红汁乳菇菌丝的生长速度越快,菌丝生物量越大,液体菌种中红汁乳菇浓度越高,接种到育苗基质中更容易形成优势菌群,有利于加快侵染马尾松根系,促进菌根合成,提高菌根化率和菌根侵染率。

由表 5 还可见,菌根参数各内部因子(P_1 、 P_2 、 P_3)间相关性显著,如菌根数量与菌根化率和菌根侵染率呈极显著或显著正相关,菌根化率与菌根侵染率呈显著正相关($P < 0.05$),说明 3 个因子的变化趋势具有相似性,后续可以根据相关系数对菌根参数进行降维处理。菌根数量与地径、苗高呈极显著或显著正相关,菌根化率与地径和干质量呈显著正相关($P < 0.05$)。表明红汁乳菇菌根的形成能够有效促进马尾松生长和有效物质的积累。生长量参数中,苗高与干质量呈显著正相关($P < 0.05$),表明除

干质量是植株营养积累的直接指标外,苗高也可间接表征植株营养的有效积累程度;主根长与地径呈极显著正相关($P < 0.01$),表明主根越长,根系越发达,营养吸收能力越强,地径越粗。

2.5 红汁乳菇菌株的综合评价

上述研究结果表明,不同红汁乳菇菌株在菌种培养、菌根合成和菌根苗生长等方面表现各异,用单一指标来评价菌株优劣不够科学。由于各指标之间存在较大相关性,可以剔除红汁乳菇的菌丝生物量、菌根数量和菌根化率 3 个显著相关的变量,避免权重的不合理迭加,确保各因子数据的独立性。采用隶属函数法,计算其余 6 个因子的隶属函数值,对 10 个红汁乳菇菌株进行综合评价,结果如表 6 所示。由表 6 可知,红汁乳菇菌株 JH5、JH4 和 JH7 的隶属函数值较高,排名靠前,是培养菌根苗的较优菌株;菌株 JH10、JH11 和 JH12 的隶属函数值较低,菌根合成能力较差,不宜用于菌根苗的规模化生产。

表 6 基于隶属函数值的 10 株红汁乳菇菌株的综合评价

Table 6 Comprehensive evaluation of 10 *Lactarius hatsudake* strains based on membership function values

菌株 Strain	隶属函数值 Membership function value						累计 Total	排名 Ranking
	L_1	P_3	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4		
JH1	1.000	0.430	0.473	0.339	0.050	0.667	2.959	6
JH2	0.623	0.389	0.515	0.414	0.550	0.583	3.074	5
JH4	0.660	0.356	1.000	1.000	0.850	1.000	4.866	2
JH5	0.833	1.000	0.910	0.866	1.000	0.792	5.401	1
JH7	0.977	0.771	0.621	0.509	0.600	0.625	4.103	3
JH8	0.558	0.399	0.703	0.488	0.650	0.708	3.506	4
JH10	0.000	0.521	0.586	0.000	0.000	0.083	1.190	10
JH11	0.526	0.000	0.366	0.638	0.500	0.000	2.030	9
JH12	0.544	0.068	0.348	0.676	0.400	0.250	2.286	8
JH13	0.549	0.326	0.000	0.573	0.600	0.333	2.381	7

3 讨论与结论

高质量的红汁乳菇菌种在合适的固体培养基上,应该具有基外菌丝粗壮、菌丝层厚、菌落边缘整齐、浓密,基内菌丝和基外菌丝同步生长、不易老化、不自溶、白色或肉红色等复合特征。本研究结果表明,10 个红汁乳菇菌株中,JH5 菌株的菌丝形态最符合上述特征,生长势最佳;JH1、JH2、JH4 和 JH7 次之,且较为接近。

本研究通过测定 10 个红汁乳菇菌株的 2 个菌种生长势参数(菌丝生长速度和菌丝生物量)、3 个菌根参数(菌根数量、菌根化率和菌根侵染率)和 4 个宿主植物生长量参数(苗高、主根长、地径和干质量),利用隶属函数法进行综合评价,筛选出适合接

种菌根苗的红汁乳菇最佳菌株 JH5,较优菌株 JH4 和 JH7。JH5 菌株在 PDA 固体培养基上的生长速度达到 2.81 mm/d,在 BAF 液体培养基中的菌丝生物量达到 3.28 g/L。接种红汁乳菇 JH5 菌株的菌根数量、菌根化率和菌根侵染率均显著优于其他 9 个菌株,合成菌根能力最强。接种 JH5 菌株的马尾松苗的地径表现最优,接种 JH4 菌株的马尾松苗苗高、主根长和干质量表现最优。从马尾松苗生长量参数来看,接种菌株 JH4、JH5、JH7 和 JH8 的菌根苗在苗高、主根长、地径和干质量上均显著高于对照,这与祁金玉等^[20]用红汁乳菇接种油松合成外生菌根后,油松苗苗高、地径、干质量显著提高的结论相似。

前人关于同一菌根真菌的不同菌株对相同宿主

植物促生作用的研究,主要集中在牛肝菌^[21]、双色蜡蘑^[21]、松茸^[22]等外生菌根真菌上,尚未见红汁乳菇的相关报道。本研究通过对 10 个红汁乳菇菌株的分析发现,红汁乳菇对马尾松各生长量参数的促生作用并不一致,有的甚至显示出抑制作用;其中, JH5 菌株接种的马尾松菌根苗的菌根化率达到 90.67%,菌根侵染率为 79.60%,苗高、地径和干质量分别较对照提高 17.81%,5.19%,46.67%,这与前人用红汁乳菇接种马尾松^[23]和油松^[20]幼苗后可使之菌根化,且能明显促进苗木生长的结论吻合,但这些研究均未对不同红汁乳菇菌株的菌根化能力进行进一步探讨。本研究表明,接种不同外生菌根真菌菌株后宿主植物的生长表现各异,具体而言,部分菌株能够显著促进宿主植物地上部分的发育,有的菌株则主要作用于根部,刺激幼苗形成次生根,还有的菌株则无明显促生作用^[24],说明各菌株对宿主植物的刺激效应存在一定差异,与宿主植物的亲和力也不尽相同。

相关性分析表明,菌根侵染率和主根长的相关系数仅为 0.007,说明二者之间基本无明显相关性,这与调查过程中未在马尾松菌根菌的主根上直接发现菌根的现象相符,说明红汁乳菇更偏爱于侵染一级、二级侧根等次生根系。已有研究表明,在菌根合成过程中,外生菌根真菌能合成并分泌生长素来实现信号传递,生长素能够抑制宿主植物主根生长而诱导侧根的形成,从而增加菌丝的侵染位点,同时能抑制根毛发生,有效提高菌根侵染效率^[25-26]。有研究表明,生长素在块菌^[27-28]、松茸^[29]等外生菌根合成过程中发挥着重要作用,但外源生长素能否提高红汁乳菇的菌根侵染率,还需进一步验证。

本研究证实,菌种的质量可直接影响菌根合成的水平和能力。此外,宿主植物的种类、育苗基质配方、菌剂类型、接种量、接种方式、接种时间等因素也会影响菌根的发育^[30-31]。因此,后期需对上述因子进行优化,以获取红汁乳菇菌根合成的关键参数的优化组合,实现红汁乳菇高质量菌根苗的高效化生产。

【参考文献】

[1] 魏杰,高巍,黄晨阳. 中国菌根食用菌名录 [J]. 菌物学报, 2021,40(8):1938-1957.
Wei J, Gao W, Huang C Y. A checklist of edible ectomycorrhizal mushrooms in China [J]. Mycosystema, 2021, 40(8): 1938-1957.

[2] 邓百万,杨海涛,李志洲,等. 红汁乳菇子实体营养成分的测定

与分析 [J]. 食用菌学报, 2004, 11(1): 49-51.
Deng B W, Yang H T, Li Z Z, et al. Determination and analysis of main nutrition components in *Lactarius hatsutake* fruitbodies [J]. Acta Edulis Fungi, 2004, 11(1): 49-51.

[3] 董爱文,符星辉,黄美娥,等. 野生松乳菇和野生红汁乳菇蛋白多糖的研究 [J]. 园艺学报, 2006(2): 408-410.
Dong A W, Fu X H, Huang M E, et al. Studies on the proteoglycans isolated from the wild delicious and *Lactarius hatsutake* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006(2): 408-410.

[4] Gao J M, Wang M, Liu L P, et al. Ergosterol peroxides as phospholipase A2 inhibitors from the fungus *Lactarius hatsutake* [J]. Phytomedicine, 2007, 14(12): 821-824.

[5] Xu G H, Kim J, Ryoo I J, et al. Lactariolines A and B: new guaianes sesquiterpenes with a modulatory effect on interferon- γ production from the fruiting bodies of *Lactarius hatsutake* [J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63(6): 335-337.

[6] Yang X L, Luo D Q, Liu J K. A new pigment from the fruiting bodies of the basidiomycete *Lactarius deliciosus* [J]. Zeitschrift für Naturforschung B, 2015, 69(9): 1180-1182.

[7] 高晴晴,谢晶,高芬,等. 均匀试验法优化红汁乳菇保健风味菌油的研究 [J]. 保鲜与加工, 2017, 17(5): 62-68.
Gao Q Q, Xie J, Gao F, et al. Development of healthy and flavorful mushroom oil with *Lactarius hatsutake* Tanaka [J]. Storage and Process, 2017, 17(5): 62-68.

[8] 田雪,许光华. 红汁乳菇子实体的化学成分研究 [J]. 延边大学医学学报, 2015, 38(2): 115-118.
Tian X, Xu G H. The study on chemical constituents from the fruiting bodies of *Lactarius hatsutake* [J]. Journal of Medical Science Yanbian University, 2015, 38(2): 115-118.

[9] 黄兰兰,汪廷良,于富强. 外生菌根合成过程中外源竞争性真菌及其菌根形态 [J]. 菌物学报, 2020, 39(5): 955-962.
Huang L L, Wang Y L, Yu F Q. Exogenous competitive mycorrhizal fungi and their mycorrhiza morphology during ectomycorrhiza synthesis of some *Lactarius* and *Tuber* species on pine and oak seedlings [J]. Mycosystema, 2020, 39(5): 955-962.

[10] 谭著明, Danell E, 申爱荣, 等. 红汁乳菇 (*Lactarius hatsutake*) 的成功栽培: 分子方法评估 [J]. 食用菌学报, 2008, 15(3): 88-91.
Tan Z M, Danell E, Shen A R, et al. Successful cultivation of *Lactarius hatsutake*: an evaluation with molecular methods [J]. Acta Edulis Fungi, 2008, 15(3): 88-91.

[11] 原晓龙, 罗婷, 王毅, 等. 红汁乳菇中一个聚酮合酶基因的鉴定和表达分析 [J]. 微生物学杂志, 2020, 40(5): 18-25.
Yuan X L, Luo T, Wang Y, et al. Identification and optimal expression medium of *LhPKS1* gene from *Lactarius hatsutake* [J]. Journal of Microbiology, 2020, 40(5): 18-25.

[12] 王冉, 于富强. 松乳菇 *Lactarius deliciosus* 与红汁乳菇 *L. hatsutake* 子实体内可培养细菌多样性的研究 [J]. 微生物学杂志, 2017, 37(5): 27-32.
Wang R, Yu F Q. Diversity of culturable bacteria in sporocarp of *Lactarius deliciosus* and *L. hatsutake* [J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(5): 27-32.

- [13] 谭云,申爱荣,谭著明,等. 红汁乳菇培养基和菌株优选[J]. 湖南林业科技, 2021, 48(6): 1-8.
Tan Y, Shen A R, Tan Z M, et al. Optimization of culture medium and strains for *Lactarius hatsutake* [J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2021, 48(6): 1-8.
- [14] 王冉, Guerin-Laguette A, 于富强. 两种乳菇菌丝生长的最适培养基与菌根合成[J]. 菌物学报, 2020, 39(7): 1346-1355.
Wang R, Guerin-Laguette A, Yu F Q. Optimum media for hyphal growth and mycorrhizal synthesis of two *Lactarius* species [J]. Mycosystema, 2020, 39(7): 1346-1355.
- [15] Guerin-Laguette A, Plassard C, Mousain D. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the saffron milk cap under controlled soil-less conditions [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(9): 790-799.
- [16] Agerer R. Exploration types of ectomycorrhizae [J]. Mycorrhiza, 2001, 11(4): 107-114.
- [17] 谭著明, 张志光, 卜晓英, 等. 红汁乳菇及人工合成菌根的形态结构特征[J]. 食用菌学报, 2006, 13(2): 36-40.
Tan Z M, Zhang Z G, Bu X Y, et al. Morphological and structural characteristics of *Lactarius hatsutake* and synthetic mycorrhiza [J]. Acta Edulis Fungi, 2006, 13(2): 36-40.
- [18] 赵燕珍, 孙学广, 冯婧玮, 等. 黔中地区马尾松林菌根食用菌多样性[J]. 菌物学报, 2021, 40(1): 108-123.
Zhao Y Z, Sun X G, Feng J W, et al. Diversity of edible mycorrhizal fungi in *Pinus massoniana* forests of central Guizhou, southwest China [J]. Mycosystema, 2021, 40(1): 108-123.
- [19] 刘润进, 陈应龙. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
Liu R J, Chen Y L. Mycorrhizology [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [20] 祁金玉, 邓继峰, 尹大川, 等. 外生菌根菌对油松幼苗抗氧化酶活性及根系构型的影响[J]. 生态学报, 2019, 39(8): 2826-2832.
Qi J Y, Deng J F, Yin D C, et al. Effects of inoculation of exogenous mycorrhizal fungi on the antioxidant and root configuration enzyme activity of *Pinus tabulaeformis* seedlings [J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(8): 2826-2832.
- [21] Onwuchekwa N E, Zwiazek J J, Quoreshi A, et al. Growth of mycorrhizal jack pine (*Pinus banksiana*) and white spruce (*Picea glauca*) seedlings planted in oil sands reclaimed areas [J]. Mycorrhiza, 2014, 24(6): 434-441.
- [22] Murata H, Nakano S, Yamanaka T, et al. Argon-ion beam induced mutants of the ectomycorrhizal agaricomycete *Tricholoma matsutake* defective in beta-1,4-endoglucanase activity promote the seedling growth of *Pinus densiflora* in vitro [J]. Botany, 2021, 99(3): 139-149.
- [23] 刘君昂. 红汁乳菇菌种分离培养及其对马尾松苗木生长效应研究[J]. 林业科学研究, 2004(2): 246-250.
Liu J A. Study on isolation culture of *Lactarius hatsutake* and its effects on growth of masson pine nursery stock [J]. Forest Research, 2004(2): 246-250.
- [24] 靳微. 几种栎树外生菌根真菌多样性及其对苗木生长和养分吸收的影响[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2019.
Jin W. Diversity of ectomycorrhizal fungi associated with several introduced and native *Quercus* species and their effects on seedling growth and nutrient uptake [D]. Beijing: China Academy of Forestry Science, 2019.
- [25] Felten J, Kohler A, Morin E, et al. The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and arabidopsis through auxin transport and signaling [J]. Plant Physiology, 2009, 151(4): 1991-2005.
- [26] Vayssières A, Pencik A, Felten J, et al. Development of the poplar-*Laccaria bicolor* ectomycorrhiza modifies root auxin metabolism, signaling, and response [J]. Plant Physiology, 2015, 169(1): 890-902.
- [27] Splivallo R, Fischer U, Gobel C, et al. *Truffles* regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene [J]. Plant Physiology, 2009, 150(4): 2018-2029.
- [28] Turgeman T, Lubinsky O, Roth-bejerano N, et al. The role of pre-symbiotic auxin signaling in ectomycorrhiza formation between the desert truffle *Terfezia boudieri* and *Helianthemum sessiliflorum* [J]. Mycorrhiza, 2016, 26(4): 287-297.
- [29] Krause K, Henke C, Asiimwe T, et al. Biosynthesis and secretion of indole-3-acetic acid and its morphological effects on *Tricholoma vaccinum*-*Spruce* ectomycorrhiza [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(20): 7003-7011.
- [30] Iotti M, Piattoni F, Leonardi P, et al. First evidence for truffle production from plants inoculated with mycelial pure cultures [J]. Mycorrhiza, 2016, 26(7): 793-798.
- [31] Zambonelli A, Iotti M, Hall I. Current status of truffle cultivation; recent results and future perspectives [J]. Italian Journal of Mycology, 2015, 44(1): 31-40.