

云南松外生菌根真菌分离培养研究*

于富强 纪大千 刘培贵**

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘 要 就滇中一带云南松林进行了多次调查, 共采集、鉴定标本 130 余号; 从中选取 13 科, 19 属, 33 种真菌进行了菌种分离、培养的研究。选用并修改 4 种培养基进行了外生菌根真菌分离、培养的比较, 结果共有 11 科, 17 属, 25 种真菌分离获得成功, 成功率高达 75.8%, 4 种培养基的分离成功率依次为 36.4%、63.6%、33.3% 和 57.6%。其中, 修改 PDA 培养基和松针、玉米培养基较适宜于云南松外生菌根真菌的分离、纯化和培养。

关键词 云南松; 外生菌根真菌; 纯培养

STUDIES ON PURE CULTURE OF THE ECTOMYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH *PINUS YUNNANENSIS*

YU Fu - Qiang JI Da - Gan LIU Pei - Gui**

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

Abstract Several surveys were carried out under *Pinus yunnanensis* Franch forest in Central Yunnan; the total collections are over 130. 33 species, belonging to 19 genera, 13 families were selected to supply a diversity of pure cultures. 4 types of media were selected for the pure culture study of ectomycorrhizal fungi. As a result, pure cultures of 25 species, 17 genera, and 11 families were obtained. The total isolation success rate reached 75.8%; the success rate of 4 media (No. 1, No. 2, No. 3, No. 4) was 36.4%, 63.6%, 33.3% and 57.6% respectively. Modified PDA medium (No. 2) and pine needles medium (No. 4) are more suitable for the isolation, purification and maintenance of ectomycorrhizal fungi associated with *P. yunnanensis*.

Key words *Pinus yunnanensis* Franch; ectomycorrhizal fungi; pure culture

云南地处我国西南, 地质、地貌独特, 气候条件优越, 植被树种多样、独特, 是中国也是世界真菌资源最丰富的地区之一。云南松是我国西南部尤其是云南省境内主要分布树种之一, 在滇中高原的山地分布极广, 除云南的大部分地区外, 北边一直分布到四川的西昌、木里, 东北分布至贵州的毕节、水

城, 东部延至广西的西部, 其成林分布的西部界线在西藏察隅一带。在垂直分布上, 云南松林所占海拔范围很大, 以 1500 ~ 2800 m 范围内分布最为集中, 与大型真菌集中分布的海拔范围大致相吻合; 大型真菌种类繁多, 其中绝大多数为外生菌根真菌^[1]。

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No 30070004)、云南省自然科学基金 (No 2000C0068M)

第一作者简介: 于富强 (1976 -), 男, 山东人, 硕士, 主要从事真菌分类、菌根学及食用菌引种驯化研究。

收稿日期: 2002 - 08 - 16

** 通信作者

外生菌根研究具有重要的研究和应用价值。目前,外生菌根技术已广泛应用于树木引种驯化、菌根化育苗、逆境造林、经济林木栽培、防止苗木根部病害、菌根食药菌的生产等方面。云南松林下具有丰富的外生菌根资源,但尚缺乏全面、系统的研究。云南松外生菌根的研究,对我国西南部尤其是云南省生态系统的恢复与重建、农林园艺业生产以及社会经济的发展等方面具有重要的意义。

外生菌根真菌的分离培养是外生菌根、大型真菌研究和应用的前提与基础,无论是进行菌种的扩繁、菌剂的制备、菌根及菌根真菌的生物学研究,还是珍稀濒危真菌种质资源的保护、野生菌根食菌的引种驯化,都需要对外生菌根真菌进行分离、培养,获得纯菌株。由于外生菌根真菌与林木之间为复杂的共生关系,其共生理理涉及到的代谢产物等诸多方面不明,许多菌根真菌的分离培养比较困难。因此,摸索菌根真菌的生物学特性,严格分离的技术要求,配制合适的培养基等就成为菌根真菌分离培养成功与否的关键^[2]。为此,将国内外较为常用的 PDA 和 MMN 培养基作了适当的修改,并自行配制了另外 2 种培养基,对 13 科,19 属,33 种真菌进行分离、培养比较研究,并对所得菌株生长状况进行了观察、记录与分析。

1 材料与方法

1.1 外生菌根真菌的采集、鉴定、确认与分离培养

1.1.1 外生菌根真菌的采集和鉴定

2000 年和 2001 年雨季对昆明市辖区内的昆明植物园、黑龙潭公园、老白龙、筇竹寺及嵩明县的阿子营、白邑两乡的云南松林进行了普遍的踏查,共采集、鉴定标本 130 余号。从中选取了 13 科,19 属,33 种真菌进行了菌种分离、培养比较研究。

野外采集过程中,详细记录新鲜子实体的特征,并绘制必要的特征图,同时制作孢子印,记录孢子印的颜色。将标本烘干,带回实验室制作临时切片,进行显微特征的观察,结合新鲜标本的特征及孢子印颜色,进行综合鉴定。引用标本均存放于中国科学院昆明植物研究所隐花植物标本馆(HKAS)。

1.1.2 外生菌根真菌的确认

找出真菌子实体基部根状菌索或菌丝与宿主根部之间的连接,然后确定连接附近宿主营养根部有外生菌根形成。

抽取部分种类进行回接实验。接种方法为袋装云南松幼苗人工接种,菌剂采用纯培养物和子实体。3 个月后采集菌根标本,在解剖镜下进行形态特征的观察、记录和拍照。利用常规石蜡切片法制作永久封切片,在高倍显微镜下进行菌根解剖特征的观察、记录和拍照;最后综合分析,确认是否为云南松外生菌根真菌。将另行报道。

1.1.3 外生菌根真菌的分离、培养

所有分离工作均在超净工作台上完成。分离中尽量选择新鲜幼嫩、无病虫害的完整子实体,及时进行分离。每个种用 4 种培养基同时进行分离培养,每个处理设 3 个重复,从子实体不同部位进行分离。将试管放入恒温培养箱中,25℃ 下培养。4~5 天后检查培养基斜面是否有污染,有污染者及早剔除。根据外生菌根真菌菌丝体直接从接种块上长出、生长较慢及同种真菌形成的菌落形态一致等特点,初步确定所分离是否为外生菌根真菌纯培养物,对其生长特征进行详细观察和记录^[3]。

1.2 培养基配方

培养基配制采用通用的操作程序与方法,4 种培养基及其组分如表 1。

表 1 培养基及其组分
Table 1 The media and their ingredients

成分 Ingredients	修改 MMN 培养基 Modified MMN Medium (No. 1)	修改 PDA 培养基 Modified PDA Medium (No. 2)	乳牛肝培养基 <i>Suillus granulatus</i> Medium (No. 3)	松针、玉米培养基 Pine needles corn Medium (No. 4)
马铃薯(g)		(鲜重)150		
点柄乳牛肝菌(g)			(鲜重)150	
云南松松针(g)				(鲜重)150
玉米(g)				(鲜重)150
酵母浸膏(g)	5	5		

麦芽汁(g)	10	10		
琼脂(g)	17	17	17	17
葡萄糖(g)	10	10	10	10
蛋白胨(g)	2	2	2	2
柠檬酸(g)	0.1	0.1	0.1	0.1
KH ₂ PO ₄ (g)	0.5	0.5	0.5	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O(g)	0.5	0.5	0.5	0.5
FeCl ₃ (1%溶液)(mL)	1.2	1.2	1.2	1.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O(g)	0.15	0.15	0.15	0.15
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g)	0.25	0.25	0.25	0.25
VB ₁ (mg)	10			
pH	6.0	6.0	6.0	6.0
蒸馏水(mL)	加至 1000	加至 1000	加至 1000	加至 1000

表 2 外生菌根真菌种名、共生关系、分离成功率、产地及引证标本

Table 2 The species name, symbiotic relationship, isolation success rate, locality and specimens cited of ectomycorrhizal fungi

种名 Species name	共生关系 Symbiotic relationship	分离成功率 Isolation success rate(%)	产地 Locality	引证标本 Specimens
<i>Agaricus macrosporus</i> *	Saprophytic	100(12/12#)	AZY	HKAS38680
<i>Amanita farinosa</i>	PECMF	25(3/12)	BY	HKAS38679
<i>A. pseudoporphyria</i> *	ECMF	33.3(4/12)	HLT	HKAS38700
<i>A. pseudovaginata</i> *	ECMF	0(0/12)	LBL	HKAS38706
<i>A. virgineoides</i>	ECMF	16.7(2/12)	AZY	HKAS38683
<i>Greastrum hygrometricum</i> *	ECMF	50(6/12)	KBG	HKAS38685
<i>Boletinus pinetorum</i> *	ECMF	33.3(4/12)	LBL	HKAS38694
<i>Boletus aereus</i>	ECMF	50(6/12)	KBG	HKAS37423
<i>B. albidus</i> *	ECMF	41.7(5/12)	BY	HKAS38681
<i>B. edulis</i>	ECMF	58.3(7/12)	AZY	HKAS38686
<i>B. griseus</i> *	ECMF	58.3(7/12)	BY	HKAS38696
<i>Cantharellus minor</i> *	ECMF	0(0/12)	HLT	HKAS38711
<i>Chroogomphis tomentosus</i>	PECMF	0(0/12)	LBL	HKAS38684
<i>Inocybe fastigiata</i>	ECMF	8.3(1/12)	BY	HKAS38703
<i>Laccaria amethystea</i> *	ECMF	50(6/12)	LBL	HKAS38702
<i>Lactarius hatsudake</i> *	ECMF	66.7(8/12)	QZHS	HKAS38689
<i>L. echinatus</i> *	ECMF	0(0/12)	BY	HKAS38695
<i>Lycoperdon perlatum</i> *	PECMF	100(12/12)	KBG	HKAS38687
<i>L. wrightii</i> *	PECMF	100(12/12)	LBL	HKAS38692
<i>Pisolithus tinctorius</i> *	ECMF	100(12/12)	HLT	HKAS38710
<i>Ramariac. flaviceps</i>	OECMF	8.3(1/12)	AZY	HKAS38704
<i>Russula nauseosa</i> *	PECMF	0(0/12)	LBL	HKAS38705
<i>R. nigricans</i>	ECMF	25(3/12)	LBL	HKAS38676
<i>R. sanguinea</i>	ECMF	0(0/12)	BY	HKAS38677
<i>R. virescens</i> *	ECMF	0(0/12)	HLT	HKAS38699

<i>Scleroderma citrinum</i> *	PECMF	100 (12/12)	AZY	HKAS38690
<i>Suillus granulatus</i> *	ECMF	8.3 (1/12)	QZHS	HKAS38709
<i>S. pictus</i> *	ECMF	8.3 (1/12)	LBL	HKAS38697
<i>Thelephora ganbajun</i> *	ECMF	25 (3/12)	HLT	HKAS38691
<i>Tricholoma flavovirens</i> *	ECMF	33.3 (4/12)	LBL	HKAS38688
<i>T. matsutake</i> *	ECMF	0 (0/12)	AZY	HKAS38698
<i>Tylopilus ballouii</i> *	ECMF	75 (8/12)	HLT	HKAS38693
<i>T. fellus</i>	ECMF	16.7 (2/12)	AZY	HKAS38678

(1) ECMF = Ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus yunnanensis* (云南松外生菌根真菌), PECMF = Putative ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus yunnanensis* (可能云南松外生菌根真菌), OEMCF = Ectomycorrhizal fungi associated with other trees (其他树种外生菌根真菌), Saprophytic = (腐生)。

(2) KBG = Kunming Botanic Garden (植物园), HLT = Heilongtan (黑龙潭), LBL = Laobailong (老白龙), QZHS = Qiongzhusi (箬竹寺), AZY = Aziying (阿子营), BY = Baiyi (白邑)。

(3) 以 * 标记者为进行人工接种实验种类;以 # 标记者为:分离成功的试管数/分离的总试管数。

2 结果

对 13 科, 19 属, 33 种真菌进行了菌根真菌分离培养研究, 共有 11 科, 17 属, 25 种真菌分离获得成功, 4 科, 5 属, 8 种真菌未获得纯培养, 分离成功率达 75.8%, 远高于其他文献同类报道 (表 2)^[3,4]。4 种培养基的分离成功率依次为 36.4%、63.6%、33.3% 和 57.6%。其中以修改 PDA 培养基分离效果为最好, 松针、玉米培养基次之, 乳牛肝培养基效果最差。不同种类、不同共生关系的真菌在不同的培养基上分离、培养结果存在着一定的差异 (表 3)。

3 讨论

实验结果表明, 修改 PDA 培养基和松针、玉米培养基分离成功率较高, 适应于多数菌种的分离、培养, 是比较理想的菌根真菌分离培养基。修改 MMN 培养基和乳牛肝菌培养基分离效果较差, 其中修改 MMN 培养基是人们在菌根真菌分离中所经常采用的, 只需对其进行微小的改动, 加入马铃薯煮液即可成为修改 PDA 培养基, 然而二者的分离效果却相差很大, 是否马铃薯中的淀粉或其他类物质在起作用, 值得继续深入研究。

菌根真菌对基质有着特殊的营养要求, 天然基质组成的培养基比人工合成的培养基更有利于其生长。基质中添加马铃薯、玉米及松针等相关天然物质煮液能促进菌根真菌的生长发育 (如: 松针、玉米培养基), 但是加入外生菌根真菌 (如: 乳牛肝菌) 煮液分离效果却很差, 这可能与菌根真菌之间

的竞争性拮抗物质的存在具有一定的关系, 尚需进一步验证。

实验统计结果表明, 不仅不同菌根真菌对生长基质的要求有较大的差异, 有时同种真菌不同个体之间分离效果也会存在着差异。马勃目和硬皮马勃目真菌很容易分离成功, 能在大多数培养基上进行分离、培养; 蘑菇科、牛肝菌科、鹅膏菌科、口蘑科和革菌科等真菌分离成功也不困难; 而红菇科和丝膜菌科真菌的分离具有一定的难度; 铆钉菇科和鸡油菌科的真菌则很难分离成功。

从纯培养菌株的生长特征可以看出, 除了光硬皮马勃和彩色豆马勃菌丝呈淡黄至黄褐色外, 大部分菌丝体呈现白色。马勃类和硬皮马勃类等真菌不但容易分离, 而且菌丝生长速度快、长绒状、多具大量气生菌丝, 易于进一步培养和保藏。牛肝菌类真菌的菌丝多从接种块边缘长出、棉絮质、菌丝浓密、生长速度缓慢; 红菇科、鹅膏科和口蘑科真菌菌丝短或长绒状, 无或少气生菌丝, 生长速度慢, 十分不利于进一步的研究和应用。因此进一步筛选合适的培养基, 摸索适宜的分离、培养条件, 以提高菌丝的生长速度, 对于这些生长缓慢的菌根真菌的基础和应用研究将具有十分重要的意义。

真菌分离部位的比较结果表明, 分离的成功与否与所取部位的菌丝组织的结构和类型有关。一般伞菌类的子实体, 分离菌盖和菌柄连接处的菌肉组织较好; 但是对于红菇科真菌, 因其菌肉主要由已经失去分生能力的泡囊菌丝组成, 很难分离成功, 而选择其菌柄内侧接近表皮处的非泡囊菌丝进行分离, 可获得较高的成功率。对于硬皮马勃目

表3 外生菌根真菌种名、培养基(成功)、分离部位(成功)、生长速度、菌丝习性、菌落特征

Table 3 The species name, media, isolating parts, growth rate, hyphae habit, colony characteristics of ectomycorrhizal fungi

种名 Species name	培养基 Media	分离部位 Isolating parts	生长速度 Growth rate	菌丝习性 Hyphae habit	菌落特征 Colony characteristics
<i>Agaricus macrosporus</i>	1, 2, 3, 4	菌盖肉、连接肉、菌柄肉	快	多气生菌丝和匍匐菌丝	白色、菌丝浓密、长绒绒状、无色素
<i>Amanita farinosa</i>	2	菌盖肉、菌柄肉	慢	少气生菌丝和匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、短绒状、无色素
<i>A. pseudoporphyria</i>	2, 4	菌盖肉、菌柄肉	慢	少气生菌丝和匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、短绒状、无色素
<i>A. virgineoides</i>	2, 4	菌柄肉	慢	少量匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、短绒状、无色素
<i>Greustrum hygrometricus</i>	1, 2, 4	包被内菌肉	中等	基生菌丝组织块表面生长	白色、菌丝浓密、棉絮状、浅褐色色素
<i>Boletinus</i>	2, 4	菌盖肉、菌柄肉	中等	基生菌丝组织块表面生长	白至浅黄、菌丝浓密、近棉絮状、浅褐色色素
<i>Boletus aereus</i>	1, 2, 4	菌盖肉、连接肉、菌柄肉	中等	少气生菌丝和基生菌丝	白色、菌丝浓密、棉絮状、浅褐色色素
<i>B. edulis</i>	2, 3, 4	连接肉、菌柄肉	慢	基生菌丝组织块表面生长	白色、菌丝浓密、棉絮状、褐色色素
<i>B. albidus</i>	2, 3	菌盖肉、连接肉、菌柄肉	慢	基生菌丝组织块表面生长	白色、菌丝浓密、近棉絮状、褐色色素
<i>B. griseus</i>	2, 3, 4	连接肉、菌柄肉	慢	基生菌丝组织块表面生长	白色至浅黄色、菌丝浓密、棉絮状、褐色色素
<i>Inocybe fastigiata</i>	4	菌柄肉	慢	少气生菌丝和匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、近棉绒状、无色素
<i>Laccaria amethystea</i>	1, 2, 4	菌柄肉	快	大气生菌丝和匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、长绒状、无色素
<i>Lactarius hatsudake</i>	1, 2, 4	菌柄内侧近外表皮处	中等	少气生菌丝和匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、长绒状、无色素
<i>Lycoperdon perlatum</i>	1, 2, 3, 4	周皮内侧造孢组织	快	少气生菌丝、多匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、长绒状、无色素
<i>L. wrightii</i>	1, 2, 3, 4	周皮内侧造孢组织	快	少气生菌丝、多匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、长绒状、无色素
<i>Pisolithus tinctorius</i>	1, 2, 3, 4	任意造孢组织	快	多气生菌丝和匍匐菌丝	浅褐黄色、菌丝分布中等、长绒状、褐黄色色素
<i>Ramaria cf. flaviceps</i>	3	菌柄肉	慢	少气生菌丝和基生菌丝	白色、菌丝稀疏、近棉絮状、无色素
<i>Russula nigricans</i>	2	菌柄内侧近外表皮处	慢	少气生菌丝	白色、菌丝稀疏、短绒状、无色素
<i>Scleroderma citrinum</i>	1, 2, 3, 4	周皮内侧未成熟造孢组织	快	多气生菌丝和匍匐菌丝	浅黄色、菌丝分布中等、长绒状、黄褐色色素
<i>Suillus granulatus</i>	1, 2, 4	连接肉、菌柄肉	中等	基生菌丝组织块表面生长	白色、菌丝稀疏、棉絮状、褐色色素
<i>S. pictus</i>	3	连接肉	慢	基生菌丝组织块表面生长	白色、菌丝分布中等、近棉絮状、褐色色素
<i>Telephora ganbajun</i>	1, 2, 3	菌肉组织	快	多气生菌丝、少匍匐菌丝	白色、菌丝分布中等、长绒状、无色素
<i>Tricholoma flavovirens</i>	2, 4	连接肉、菌柄肉	慢	少气生菌丝和匍匐菌丝	白色、菌丝稀疏、短绒状、无色素
<i>Tylopilus ballouii</i>	1, 2, 4	菌盖肉、连接肉、菌柄肉	中等	基生菌丝组织块表面生长	白色、菌丝浓密、棉絮状、浅褐色色素
<i>T. felus</i>	4	连接肉	慢	基生菌丝组织块表面生长	白色、菌丝浓密、棉絮状、浅褐色色素

* 分离成功的菌种在不同培养基上, 其生长速度、菌丝习性、菌落特征无明显差距, 故作同一描述。

和块菌目真菌,分离未成熟的造孢组织,比较容易获得成功。马勃目真菌则以分离革质周皮内面组织的效果为最好。

仍有 4 科,5 属,8 种真菌未获得纯培养,除了这些菌根真菌自身原因,难于分离、培养外,主要是由于没有筛选到合适的培养基和适宜的培养条件。因此,在此基础上进一步的菌根真菌分离、培养研究尚待深入。

参 考 文 献

1. 吴征镒主编. 云南植被. 北京:科学出版社,1987
2. 弓明钦,陈应龙,仲崇禄. 菌根研究及应用. 北京:中国林业出版社,1997
3. Neale Bougher, Mark Brundret, Bernie Dell eds. A practical guide for working with mycorrhizal fungi in Forestry and Agriculture. International Mycorrhizal Workshop. Kaiping China, 1994, 2, 70 ~ 76
4. 周崇莲,韩桂之,周玉芝,等. 几种松树外生菌根真菌的研究. 生态学报,1983,3(2):103 ~ 109