

几种松树外生菌根真菌的研究

周崇莲 韩桂之 周玉芝 刘忱 张维春 许光辉

(中国科学院林业土壤研究所)

早在1956年前我们曾对松树和柞树的外生菌根真菌进行了分离。当时获得3株菌根真菌的纯培养,经初步鉴定属牛肝菌属(*Boletus*)、乳菇属(*Lactarius*)和滑菇属(*Hebeloma*)。对油松(*Pinus tabulaeformis*)幼苗回接试验取得了成功。在樟子松(*Pinus sylvestris*)幼苗的接种试验中,也获得了较好的结果;菌根化促进了樟子松幼苗的成活(张宪武等,1964)。

1978年以来,我们对外生菌根真菌又进行了研究。从不同林分下采集到能形成菌根的真菌子实体,在无菌条件下用切割组织法以分离菌根真菌,获得了纯培养菌株,根据子实体的特征进行了鉴定(邓叔群,1963)。同时对培养基选择及幼苗接种效果也进行了试验。本文是我们研究的初步结果。

一、材料和方法

1. 材料的采集

分离外生菌根真菌的子实体采集于广东、湖南、浙江、辽宁、吉林等地的以湿地松(*Pinus elliottii*)、马尾松(*Pinus massoniana*)、黄山松(*Pinus taiwanensis*)、油松和红松(*Pinus koraiensis*)等针叶树种为主的针阔混交林下。林业土壤研究所植物研究室王云同志协助进行了子实体的鉴定。

2. 分离方法

采集正在开伞的无虫伤破口的菌根真菌子实体,用75%的酒精轻擦子实体的表面,用火焰灭菌的解剖刀或镊子,切开子实体,从内部挑取直径3—5毫米大小的菌褶或菌管,迅速接到灭菌的培养基斜面上,携回室内,培养于25℃的恒温箱中,经数天后,在菌组织上即长出菌丝体。

所用培养基成分和制备方法:20%马铃薯汁500毫升,麦芽汁(波美2度)500毫升,葡萄糖20克,维生素B₁0.05克,琼脂20克,pH=5.5。0.5大气压灭菌20分钟,制成斜面备用。

在培养过程中经常检查由菌褶或菌管直接发育出来的菌丝体。根据菌丝体生长比较缓慢,在显微镜下观察具有锁状联合(Clamp connection);以及同一子实体组织形成的菌落形态一致,而无其他杂菌污染等这样一些特征,确定其菌种的纯度。并用牛肉汁蛋白胨培养基进一步检验是否有细菌的污染。通过反复数次的纯化,即可得到菌根真菌的纯培养菌。

3. 培养基比较试验

为了找出这些菌根真菌生长发育最适的培养基成分,我们采用了下列几种培养基进行比较:

1) 马铃薯葡萄糖麦芽汁琼脂培养基 (P.D.M.A) 配方见前。

2) 马铃薯汁铁镁琼脂培养基 20% 马铃薯汁 1,000 毫升, 葡萄糖 20 克, FeSO_4 0.01 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 克, 琼脂 20 克, $\text{pH}=5.5$ 。

3) 综合马铃薯培养基 (俞大绂, 1959) 20% 马铃薯汁 1,000 毫升, 葡萄糖 20 克, KH_2PO_4 3 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 克, 维生素 B₁ 微量, 琼脂 20 克, $\text{pH}=6.0$ 。

4) 天冬酰胺培养基 (孙红珠译, 1979) (常用于培养牛肝菌) 淀粉 20 克, KH_2PO_4 0.5 克, 天冬酰胺 1.5 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 1,000 毫升, $\text{pH}=5.5$ 。

5) 蔗糖培养基 蔗糖 2.5 克, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 克, CaCl_2 0.05 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 克, NaCl 0.25 克, FeCl_3 (1%) 1—2 毫升, KH_2PO_4 0.5 克, 维生素 B₁ 25 毫克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 1,000 毫升, $\text{pH}=5.5-5.7$ 。

6) 葡萄糖酵母培养基 (宇田川·椿, 1978) (常用于培养松蘑) 葡萄糖 20 克, 酵母粉 5 克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 1,000 毫升, $\text{pH}=5.2$ 。

7) 赫黎氏 (Heli) 培养基 (Nancy 等, 1969) 葡萄糖 0.5 克, KH_2PO_4 1 克, CaCl_2 0.1 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 克, NH_4Cl 0.5 克, FeCl_3 0.01 克, NaCl 0.1 克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 1,000 毫升, $\text{pH}=6.0$ 。

8) 氯化铵葡萄糖培养基 (常用于培养菌根真菌) KH_2PO_4 1 克, NH_4Cl 0.5 克, 葡萄糖 0.5 克, CaCl_2 0.1 克, NaCl 0.5 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 克, FeCl_3 0.01 克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 1,000 毫升。

9) 酵母硫酸锰培养基 (培养一般蘑菇) 酵母膏 5 克, 葡萄糖 20 克, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克, KH_2PO_4 0.5 克, MnSO_4 0.01 克, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 克, ZnSO_4 0.01 克, 琼脂 20 克, 蒸馏水 1,000 毫升, $\text{pH}=5.5-6.0$ 。

10) 牛肉汁蛋白胨培养基 牛肉浸煮汁 (50%) 1,000 毫升, 蛋白胨 5 克, NaCl 5 克, 琼脂 20 克, $\text{pH}=5.5$ 。

把菌种移在上述 10 种培养基上, 于 25℃ 培养 20 天后, 观察其生长情况。

4. 回接试验

分得的菌种, 在温室条件下采用灭菌土壤对松苗进行回接试验, 测定其对油松、马尾松、樟子松、落叶松等幼苗的生长量和根部菌根化强度。

二、结果和讨论

1. 分得菌种的分布情况

我们从不同地区, 不同林分下共采集 30 种不同种的真菌子实体, 其中有 13 种获得了纯培养菌种, 17 种未获得纯培养, 这些菌根真菌的分布与生境条件列于表 1。

从表 1 可以看出, 有些菌种的分离成功机率还是相当高的, 只是这些菌种大多数生长很慢。彩色豆马勃菌主要从南方土壤中采得。美味红菇的分布较广, 从雷州半岛到长白山都有生长。其余菌种多采自于北方。关于这些菌根真菌的生态分布规律有待进一步研究。

表 1 菌根真菌的分布和生境

菌 种	采集地点	生 境	分得菌种 成功率 (%)	
白柄黄盖鹅盖	<i>Amanita junquillea</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
毒 伞	<i>Amanita phalloides</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
角鳞白鹅膏	<i>Amanita solitaria</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
灰托柄菇	<i>Amanitopsis vaginata</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
灰托柄菇	<i>A. vaginata</i>	湖南会同	马尾松混交林	0
灰托柄菇	<i>A. vaginata</i>	辽宁千山	油松混交林	0
蜜环菌	<i>Armillaria mellea</i>	辽宁千山	油松混交林	50
小牛肝菌	<i>Boletinus cavipes</i>	吉林长白山	红松混交林	100
虎皮小牛肝	<i>B. pictus</i>	吉林长白山	红松混交林	100
丝膜菌	<i>Cortinarius</i> sp.	辽宁沈阳东陵	油松混交林	100
铆钉菌	<i>Gomphidius viscidus</i>	辽宁千山	油松混交林	30
铆钉菌	<i>G. viscidus</i>	广东广州龙眼洞	马尾松混交林	0
象牙白腊菌	<i>Hygrophorus eburneus</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
劣味乳菇	<i>Lactarius insulsus</i>	吉林长白山	红松混交林	50
劣味乳菇	<i>L. insulsus</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
红汁乳菇	<i>Lactarius hatsudake</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
红汁乳菇	<i>L. hatsudake</i>	吉林长白山	红松混交林	50
微甜乳菇	<i>L. subdulcis</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
多汁乳菇	<i>L. volemus</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
高环柄菇	<i>Lepiota procera</i>	吉林长白山	红松混交林	50
芽状马勃	<i>Lycoperdom gemmatum</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
芽状马勃	<i>L. gemmatum</i>	广东雷州半岛	湿地松人工林	0
彩色豆马勃菌	<i>Pisolithus tinctorius</i>	广东雷州半岛	湿地松人工林	100
彩色豆马勃菌	<i>P. tinctorius</i>	广东广州龙眼洞	湿地松人工林	100
彩色豆马勃菌	<i>P. tinctorius</i>	湖南会同	马尾松混交林	50
圆齿小脆柄菇	<i>Psathyrella crenata</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
美味红菇	<i>Russula delica</i>	广东广州龙眼洞	马尾松混交林	100
美味红菇	<i>R. delica</i>	湖南会同	马尾松混交林	100
美味红菇	<i>R. delica</i>	吉林长白山	红松混交林	100
草质红菇	<i>R. alutacea</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
毒红菇	<i>R. emetica</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
密褶红菇	<i>R. densifolia</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
臭红菇	<i>R. foetens</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
菱红菇	<i>R. vesca</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
多根硬皮马勃菌	<i>Scleroderma polyrhizum</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
多根硬皮马勃菌	<i>S. polyrhizum</i>	广东雷州半岛	湿地松人工林	0
多根硬皮马勃菌	<i>S. Polyrhizum</i>	广东广州龙眼洞	湿地松人工林	0
乳牛肝菌	<i>Suillus bovinus</i>	辽宁沈阳东陵	油松混交林	100
点柄乳牛肝菌	<i>S. granulatus</i>	辽宁沈阳东陵	油松混交林	100
点柄乳牛肝菌	<i>S. granulatus</i>	辽宁千山	油松混交林	100
褐环乳牛肝菌	<i>S. luteus</i>	辽宁沈阳东陵	油松混交林	100
褐环乳牛肝菌	<i>S. luteus</i>	吉林长白山	红松混交林	66
线柄松塔牛肝菌	<i>Strobilomyces floccosus</i>	浙江天目山	黄山松混交林	0
白蘑属	<i>Tricholoma</i>	辽宁千山	油松混交林	0

除此以外尚有17种真菌的子实体未获得纯培养菌,其失败的原因我们认为,首先是培养基不适宜。在以蛋白胨为氮源的培养基上这些真菌都不生长,例如红汁乳菇和环纹苦乳菇在P.D.M.A培养基上却得到了生长,获得了纯培养。其次可能与菌种的特性不同有关,例如灰托柄菇、多根硬皮马勃、芽状马勃等子实体与担孢子,在不同的培养基上多次分离培养均不生长发育。看来这些真菌的生长,需要特殊的营养物质。还有少数菌则由于子实体过于成熟,分离时被杂菌污染,没有分离成功。

2. 不同菌根真菌纯培养的培养特征

各种菌根真菌在同一P.D.M.A培养基上生长的速度有明显的差异,它们形成的菌落形状,大小、菌丝体性状以及产生色素等特征都不尽相同(见表2)。生长速度快慢不一,快的有5个菌种,它们是彩色豆马勃菌、虎皮小牛肝菌、劣味乳菇,丝膜菌和高环柄菇。而其余菌种都生长缓慢。

表2 菌根真菌的培养特征(25℃,培养20天)

菌名	菌落特征	菌落直径(厘米)	菌落背面	色素
彩色豆马勃菌	黄褐色棉絮状	5	褐色	黄褐色
美味红菇	白-淡黄色天鹅绒状	3—4	黄色,有沟纹	微黄
褐环乳牛肝菌	淡黄-褐色棉毛状、有沟纹	4	黄褐色	褐色
点柄乳牛肝菌	白-淡黄色绒毛状	4	淡褐色	褐色
乳牛肝菌	白-淡黄色绒毛状,有沟纹	3—4	淡黄色	无
空柄小牛肝菌	橙-粉红色天鹅绒状	3	深褐色,有沟纹	无
虎皮小牛肝菌	无色棉絮状	6	深褐色	褐色
铆钉菌	淡粉红色-橙黄色,粉状	3	褐色	深黄褐色
红汁乳菇	淡黄色羊毛状	2	无色	无
劣味乳菇	白色棉毛状	5—6	无色	无
丝膜菌	白色棉毛状	6以上	无色	无
密环菌	黄褐色棉毛状-革质状	4—5	根状菌丝束	褐色
高环柄菇	白色棉毛状	6	无色	无

3. 菌根真菌对营养条件的要求

为了寻找这些慢生菌种比较合适的培养基,我们选择了经常用于培养高等真菌的不同成分的上述10种培养基进行试验,结果列于表3。

结果表明,供试的培养基仍然以马铃薯汁葡萄糖麦芽汁琼脂培养基上生长较好。这不仅表现在初期生长,而且也表现在后期生长中。以无机盐为主要成分的培养基上,这些真菌都生长缓慢,有的几乎不生长。而添加维生素B₁或酵母粉的培养基上,看来生长情况又优于不添加这些物质的处理。因此可以得出初步的结论,菌根真菌较适宜于生长在添加维生素类物质的天然培养基上。这一结果对今后进一步选择扩大繁殖的优良培养基质,有着重要的意义。

4. 回接试验

将13种菌根真菌繁殖后,在温室条件下对油松、马尾松、落叶松、樟子松等幼苗进行了接菌试验,通过6个月盆栽试验证明,接菌后的幼苗受到了不同程度的感染,将调查结果经过生物统计,检验 t 值显著性后,对效果显著者列于表4。

表4结果可以看出,13种菌根真菌中以乳牛肝菌、小牛肝菌、丝膜菌能与4种松树幼苗

表 3 不同培养基上菌根真菌生长情况*

培养基号 菌号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
彩色豆马勃菌	+++	+++	++	±	+	++	-	±		±
美味红菇	++	+++	+++	++	+++	++	++	+	+	±
褐环乳牛肝菌	+++	++	++	+	±	++	-	+	++	-
点柄乳牛肝菌	++	+++	++	±	+	+++		±		-
乳牛肝菌	++	++	++	-	±	++		-		-
空柄小牛肝菌	+++	+++	++	±	+	++	-	±	+	-
虎皮小牛肝菌	+++	++	+	±	±	++	-	±	++	-
铆钉菌	+++	+++	+++	+	+	+++		±		±
红汁乳菇	++	++	+	-	±	++		-		-
劣味乳菇	+++	+++	+++	++	+	++	+++	+	+	+
丝膜菌	+++	++	+	+	±	++		+	+++	+
密环菌	++	++	+	+	±	+	+++	+		+
高环柄菇	+++	+++	+++	+	+	+++		+		±

* 表中“+++”表示菌落直径 2.5 厘米以上;
“++”表示菌落直径 1.0—2.5 厘米;
“+”表示菌落直径 1.0 厘米以下;
“±”表示微有生长;
“-”表示不生长。

表 4 菌根真菌对松苗生长的影响 (每株平均值)

菌名	油 松				马 尾 松				落 叶 松			樟 子 松		
	株高 (厘米)	地径粗 (厘米)	菌*强 根化度	鲜重 (克)	株高 (厘米)	地径粗 (厘米)	菌强 根化度	鲜重 (克)	株高 (厘米)	地径粗 (厘米)	鲜重 (克)	株高 (厘米)	地径粗 (厘米)	鲜重 (克)
乳牛肝菌	6.6	0.19	+	2.4	6.9	0.18	+	5.6	6.5	0.17	0.9	5.1	0.16	0.8
小牛肝菌	6.2	0.19	+	2.2	6.8	0.18	++	2.0	6.9	0.21	1.9	5.2	0.15	0.8
丝膜菌	6.4	0.18	+	2.2	5.8	0.15	+	2.4	12.5	0.27	3.8	5.2	0.16	0.9
铆钉菌	5.8	0.19	+	1.8	6.5	0.17	+	1.7				5.6	0.18	1.0
高环柄菇	5.7	0.17	++	1.6	6.3	0.14	±	1.9	6.5	0.17	1.5			
美味红菇									9.4	0.17	2.1	5.2	0.16	0.9
虎皮小牛肝菌									8.6	0.21	1.7			
彩色豆马勃菌					6.6	0.8						5.5	0.15	0.8
劣味乳菇												5.4	0.17	1.0
点柄乳牛肝菌												5.7	0.20	1.1
密环菌												5.1	0.17	1.0
褐环乳牛肝菌					6.6	0.17	±	2.0				5.6	0.15	0.8
红汁乳菇					5.9	0.17	++	1.4						
对 照	4.6	0.16	±	1.1	5.2	0.13	±	1.3	4.8	0.17	0.9	3.8	0.13	0.6

* ++ 表示菌根化小根占总根 1/3 左右, + 表示菌根化小根占 1/5 左右, ± 表示个别出现菌根化小根。

共生, 促进了苗木的生长。其次为铆钉菌和高环柄菇可以感染 3 种松苗。4 种松苗中以樟子松对真菌的适应性最强。这对砂地造林中人工菌根化措施提供了有利条件。密环菌本是腐生

性真菌,也是天麻的共生菌,据报道有的对林木根部危害很严重。我们分得的密环菌种,在经过灭菌土的回接试验中幼苗并未出现任何病害现象,相反还促进了樟子松幼苗的生长,对此值得进一步研究。回接试验中有的松苗形成了典型的外生菌根。但有的树种则没有形成典型的菌根如落叶松、樟子松,为此有必要做进一步的试验。

三、小 结

1. 我们用从林下采集真菌子实体的方法来分离菌根真菌纯培养,从30个不同种的真菌子实体中分得了13个菌根真菌的纯培养。但有17个种未获得纯培养菌,主要是由于没有找到合适的分离培养基,和分离培养条件。

2. 在北美已经推广应用的彩色豆马勃菌,它们分布于我国南方的一些从国外引进的如湿地松、火炬松等,和部分马尾松林下。其它菌种大多分布于北方,对菌根真菌生态分布规律,有待进一步研究。

3. 培养基的选择试验结果证明,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它的生长。基质中添加维生素B₁之类的物质,能促进菌根真菌的生长发育。用马铃薯葡萄糖麦芽汁琼脂培养基分离培养菌根真菌,是目前较为合适的一种培养基质。

4. 13种菌根真菌分别感染四种松树幼苗,它们在不同程度上促进了幼苗的生长,其中以乳牛肝菌、小牛肝菌和丝膜菌表现最明显。

参 考 文 献

- 张宪武、许光辉、周崇莲 1964 菌根化和施用胡敏肥料对樟子松幼苗成活及菌根形成的研究初报。林业科学9(1): 61—64。
- 邓叔群 1963 中国的真菌。科学出版社。
- 俞大维 1959 植物病理学和真菌学技术汇编。高等教育出版社。
- 孙红珠译 1979 菌根担子菌的人工培养。应用微生物 6: 91—93。
- 宇田川·椿 1978 菌类图鉴(下)。讲谈社サイエンス。
- Nancy H. and F. H. Joe 1969 In Vitro Culture of *Pisolithus tinctorius* Mycelium. *Mycology* 61: 195—198.

STUDIES ON SOME ECTOMYCORRHIZAL FUNGI OF PINE

ZHOU CHONGLIAN HAN GUIZHI ZHOU YUZH

LIU CHENG ZHANG WEICHUN XU GUANGHUI

(*Institute of Forestry and Soil Science, Academia Sinica*)

In 1978–1980, 30 fruit-bodies of fungi were collected from 4 species of pine trees (*Pinus massoniana*, *P. tablaeformis*, *P. koraiensis*, *P. elliotii*) in north-eastern and southern provinces of China. By using sterile methods 13 pure fungi cultures (*Pisolithus tinctorius*, *Suillus granulatus*, *S. bovinus*, *Boletinus cavipes*, *B. pictus*, *Gomphidius* sp., *Armellaria mellea*, *Lepiota procera*, *Russula delica* etc.) were obtained from the mycorrhizal fungi basidiospores collected from 30 fruit bodies. 10 cultured media were used. It denoted that the best medium for fungi development was the one which contained the extract of potato malt extract dextrose and agar (P.D.M.A).

Four species seedlings of pine (*Pinus massoniana*, *P. tablaeformis*, *P. sylvestris*, and *Larix gmelini*) were infected by the 13 pure fungi cultures. These seedlings grew promptly, especially when they were infected by *Suillus bovinus*, *Boletinus cavipes*, *Cortinarius* sp..