

文章编号: 1000-5692(2003)02-0158-04

# 松乳菇菌种分离及菌丝生长特性的研究

周国英<sup>1</sup>, 刘君昂<sup>1</sup>, 李倩茹<sup>2</sup>

(1. 中南林学院 资源与环境学院, 湖南 株洲 412006; 2. 湛江海洋大学 生命科学学院, 广东 湛江 524000)

**摘要:** 采用 5 种培养基配方, 对 2 种不同颜色 6 个不同来源的松乳菇子实体的不同部位进行组织分离, 发现分离松乳菇较好的培养基是 PDA 培养基, 筛选出 8 株生长较好菌株。对菌株 A1 进行生长特性研究表明: 菌株 A1 碳源利用范围广, 蔗糖最好, 葡萄糖次之, 果糖最差; 对氮源的利用, 有机氮单一氮源优于复合氮源, 其中尿素不能利用; 无机氮源铵态氮优于硝态氮, 以硫酸铵效果最好, 亚硝酸盐不能利用; 对盐浓度适应能力很强, 在盐浓度为  $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  条件下也具有生长能力, 适宜生长的盐浓度范围为  $0 \sim 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。生长温度范围为  $7 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 适宜的生长温度是  $15 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 最佳生长温度是  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 。喜中性偏酸性环境, 适宜生长的 pH 值为  $5 \sim 7$ , 最适 pH 值为 6.5。图 2 表 4 参 7

**关键词:** 食用菌类; 松乳菇; 菌种分离; 菌丝; 生长特性

**中图分类号:** S646.9 **文献标识码:** A

松乳菇 *Lactarius deliciosus* 又名松树蘑、松菌、寒菌、紫花菇、松杉菌, 属担子菌亚门层菌纲伞菌目红菇科乳菇属。亚洲、欧洲和北美洲均有分布, 在我国, 河北、辽宁、吉林、江苏、浙江、湖南、四川、青海和台湾等省均有分布。主要生长在松树林下, 是一种很有价值的外生菌根食用真菌。其肉质细嫩, 味道鲜美独特, 营养丰富, 又具有保健功能。该菌提取物对肉瘤-180 和艾氏腹水癌有抑制作用<sup>[1]</sup>, 能产生乳菇紫素起抗菌作用<sup>[2]</sup>。Ondrusek 等<sup>[3]</sup> 从子实体中分离出神经鞘脂类物质, Guillot 等<sup>[4]</sup>, 则从松乳菇中分离出外源凝集素, Bergendorff 等<sup>[5]</sup> 发现子实体受伤时会产生几种倍半萜烯类物质。松乳菇被视为山中珍品, 市场上十分走俏。它能与松树和云杉 *Picea asperata* 等针叶树形成菌根, 增强植物防病、抗污染、抗严寒和抗干旱的能力, 促进林木生长。同时可生产松乳菇, 为我国林业多种经营提供新的途径, 具有良好的经济效益、社会效益和生态效益。目前已报道松乳菇分布与生态特征<sup>[1,6,7]</sup>, 因有特殊的生态条件、营养方式和子实体分化发育条件, 对它的研究与驯化有很大难度。为保护食用菌资源的多样性并合理开发, 本文研究了松乳菇驯化及菌丝生长特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 松乳菇子实体 6 个不同地域的新鲜子实体, 有 2 种颜色 (灰绿色和橘红色)。

1.1.2 供试菌株 中南林学院微生物实验室从灰绿色子实体中分离的松乳菇菌株, 编号为 A1 菌株。

1.1.3 组织分离供试培养基 PDA 培养基 (含链霉素  $120 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、改良的 MS 培养基、查氏培

收稿日期: 2002-12-24; 修回日期: 2003-03-04

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(01JJY2076)

作者简介: 周国英(1966-), 女, 湖北应城人, 副教授, 博士, 从事林业微生物研究。

培养基、蛋白胨培养基、酵母葡萄糖培养基。

1.1.4 生长特性测试培养基 碳源试验培养基: 碳源 10.0 g, 硝酸铵 1.0 g, 硫酸镁 0.5 g, 磷酸氢二钾 0.4 g, 硫酸钾 0.1 g, 氯化钙 0.05 g, 硝酸亚铁 0.02 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 6.0。氮源试验培养基: 将硝酸铵作为氮源 2.0 g+葡萄糖 20.0 g, 其他同碳源试验培养基。其他测试以 PDA 培养基为基础培养基。

## 1.2 方法

1.2.1 菌种的分离 采用食用菌组织分离法, 取子实体菌盖、菌盖和菌柄交接处、菌柄、菌柄中心等 4 个不同部位组织, 置于不同分离培养基上, 于 27 °C 恒温培养。

1.2.2 不同碳源试验 将试验培养基中的碳源分别以葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、淀粉和糊精代替, 作不同的碳源培养基, 另设一无碳源的培养基, 试验设计 8×3 (处理×重复)。然后接入等量松乳菇菌块, 再把接种后的培养皿放在 27 °C 恒温培养 15 d, 测定接种点菌落直径。

1.2.3 不同氮源试验 分别以硝酸钠、硝酸钾、草酸铵、硫酸铵、亚硝酸、尿素、甘氨酸、蛋白胨和酵母浸出汁为氮源作不同氮源的培养基, 另设一无氮源的培养基, 10 个处理。每个处理重复 3 次。接种量及培养条件同碳源试验。

1.2.4 不同盐质量浓度试验 采用 PDA 培养基, 培养基中氯化钠质量浓度分别为 0 g·L<sup>-1</sup>, 2 g·L<sup>-1</sup>, 4 g·L<sup>-1</sup>, 6 g·L<sup>-1</sup>, 8 g·L<sup>-1</sup>, 10 g·L<sup>-1</sup>, 12 g·L<sup>-1</sup>, 14 g·L<sup>-1</sup>, 共 8 个处理, 每个处理重复 3 次。接种量及培养条件同碳源试验。

1.2.5 温度试验范围 采用 PDA 平板, 接种同龄定量的一级松乳菇菌块后, 恒温于 5 °C, 7 °C, 10 °C, 12 °C, 15 °C, 17 °C, 20 °C, 22 °C, 25 °C, 27 °C, 30 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C 和 40 °C 下培养。每个温度处理 3 个重复。培养 15 d 后测定接种点菌落直径。

1.2.6 pH 值试验范围 以 PDA 培养液为基础培养基的 pH 值, 再用 1 molHCL 和 1 molNaOH 准确调节培养基的 pH 至 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10。每一处理 3 个重复。在同温条件 (27±0.5) °C 下置于摇床上振荡培养, 培养 15 d 后观察菌球, 并测菌丝体的生物量 (干质量)。

## 2 结果与分析

### 2.1 松乳菇菌种的分离

选用同一地域松乳菇子实体, 分别取 4 种组织, 发现子实体 4 个部位均可萌发长出菌丝, 以菌盖与菌柄交接处组织萌发最快, 菌丝生长最好。分离所用的培养基中, PDA 培养基上菌丝生长很快, 气生菌丝生长最好; MS 培养基上菌丝生长极缓慢, 气生菌丝少。从 6 个不同地域的松乳菇子实体中取组织, 用 PDA 培养基进行组织分离培养, 获得 8 株生长较好菌株 (表 1)。

表 1 不同地域松乳菇菌株分离情况

Table 1 Isolated strains of *L. deliciosus* in different areas

菌株编号	子实体来源	子实体颜色	菌丝始萌日期/d	菌丝生长特征
A1	湖南醴陵	灰绿色	6	菌丝浅黄色, 放射状平铺, 很密, 部分呈绒毛状向上生长
A2		橘红色	4	菌丝淡黄色, 放射状平铺, 较密, 菌丝很细, 呈绒毛状。
B1	湖南新化	灰绿色	5	菌丝浅黄色, 放射状平铺, 稠密, 部分呈绒毛状向上生长
B2		橘红色	4	菌丝淡黄色, 放射状平铺, 较密, 气生菌丝很细, 呈绒毛状
C1	湖南怀化	灰绿色	7	菌丝浅黄色, 放射状平铺, 较密, 部分呈绒毛状向上生长
D2	湖南株洲	橘红色	4	菌丝淡黄色, 放射状平铺, 菌丝束细, 气生绒毛状菌丝多
E1	湖南永州	灰绿色	4	菌丝浅黄色, 放射状平铺, 较密, 向上生长菌丝绒毛状
F1	江西萍乡	灰绿色	8	菌丝浅黄色, 放射状平铺, 菌丝束较粗, 气生菌丝绒毛状

不同地域的松乳菇子实体其生长出菌丝体所需的天数不同, 橘红色的松乳菇子实体的分离要比灰绿色的子实体容易, 受污染的程度小且长出菌丝体所需时间要短。选择长势较好 A1 菌株进一步作菌丝生长特性研究。

## 2.2 不同碳源对松乳菇菌丝生长的影响

松乳菇 A1 菌株对供试的 7 种碳源均有不同程度的利用 (表 2)。菌丝在含蔗糖的培养基上生长最快, 菌丝生长量为  $1.2 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ; 含葡萄糖培养基上生长速度次之; 在其他几种碳源培养基相差不大, 菌丝生长速度均较缓慢, 其中果糖培养基上生长最缓慢。在 2 种多糖培养基中, 菌丝在糊精培养基上生长的速度比淀粉培养基上快。

## 2.3 不同氮源对菌丝生长的影响

表 3 表明, 松乳菇除了不能利用尿素和亚硝酸钠外, 其余氮源均有不同程度的利用。在无机氮中, 对铵态氮利用情况最好, 菌丝生长速度最快以硫酸铵为氮源的培养基上, 以草酸铵为氮源的培养基次之, 对硝态氮利用情况比铵态氮差; 在有机氮中, 对单一有机氮利用情况比复合有机氮好, 以甘氨酸为氮源的培养基上生长较好, 以蛋白胨、酵母汁为氮源的培养基上生长最差。

## 2.4 不同盐质量浓度对菌丝生长的影响

松乳菇菌丝具有较强的耐盐能力, 在供试的盐质量浓度下均能生长 (图 1)。氯化钠质量浓度为  $0 \sim 6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基上生长迅速, 菌丝生长旺盛; 氯化钠质量浓度为  $8 \sim 14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基上, 松乳菇菌丝生长十分缓慢。

## 2.5 温度对松乳菇菌丝生长的影响

从图 2 可以看出: 松乳菇菌丝适温范围广, 菌丝在  $10 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$  范围均能生长, 适宜生长的温度范围为  $15 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在此温度范围内, 菌丝生长速度较快, 生长较旺盛, 最适生长温度为  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ , 在此温度条件下生长最快, 菌丝生长最旺盛。最低临界生长温度为  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 最高临界生长温度为  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 。从温度与菌丝生长的关系来看, 松乳菇从  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  起菌丝生长就加快, 到  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  时生长速度最快, 在这一段温度范围内菌丝的生长速度是随着温度的升高而加快, 超过了最适生长温度后, 菌丝的生长速度就随温度的升高而迅速降低。

## 2.6 pH 值适应范围

pH 值范围试验结果见表 4。松乳菇在菌丝 pH 值为  $4 \sim 9$  的范围内均能生长, pH 值在  $5 \sim 7$  适合松乳菇菌丝体的增殖, pH 值为  $6.5$  时最适合松乳菇菌丝生长。

## 3 结论与讨论

松乳菇菌丝的分离, 发现不同的组织部位对分离效果影响不大, 各部位取得的组织均能萌发出菌丝; 而不同培养基对分离效果影响较大, PDA 培养基是分离松乳菇较好的培养基, MS、查氏、酵母葡萄糖钙培养基不适合分离松乳菇。松乳菇可以通过组织分离获得纯菌种, 但必须以新鲜的、无

### 表 2 不同碳源对菌丝生长的影响

Table 2 The effects of different carbon sources on the growth of mycelia

碳源	萌发时间/d	菌丝生长量/( $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ )	菌丝密度
葡萄糖	1	1.07	很密
果糖	2	0.53	较稀
蔗糖	1	1.20	很密
麦芽糖	1	0.73	较密
乳糖	2	0.80	较密
淀粉	2	0.67	较密
糊精	2	0.80	较密
无碳	—	0	

### 表 3 不同氮源对菌丝生长的影响

Table 3 The effects of different nitrogen sources on the growth of mycelia

氮源	萌发时间/d	菌丝生长量/( $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ )	菌丝密度
硝酸钠	2	1.33	较稀
硝酸钾	2	1.20	较稀
草酸铵	1	1.47	较密
硫酸铵	1	2.53	较密
甘氨酸	1	2.27	较密
蛋白胨	3	0.27	较密
酵母浸出汁	1	0.60	很密
亚硝酸钠	—	0	
尿素	—	0	
无氮	—	0	

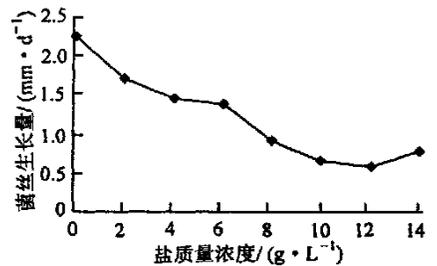


图 1 不同质量浓度对菌丝生长影响

Figure 1 The effects of different salt concentration on mycelia

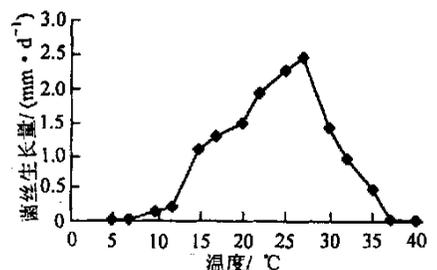


图 2 不同温度对菌丝生长的影响

Figure 2 The effects of different temperature on the mycelia

病虫害的子实体作为分离材料, 并且分离成功率与消毒的方式及培养基中抗生素的含量有关。

松乳菇 2 种颜色子实体分离难易程度不同, 红色子实体组织萌发菌丝容易些, 灰绿色子实体稍难。2 种颜色子实体很可能是 2 个种, 有待进一步研究。不同地域的松乳菇子实体在相同条件下分离, 菌丝生长的快慢不同, 有的产地的子实体分离出菌丝体较易, 有的产地的子实体分离较困难。

松乳菇菌丝固体培养所需的营养因子碳源、氮源利用范围广。碳源中蔗糖最好, 葡萄糖次之, 果糖最差; 氮源中, 有机单一氮源优于复合氮源, 尿素不能利用, 无机氮源铵态氮优于硝态氮, 以硫酸铵效果最好, 亚硝酸盐不能利用。所需环境因子温度, pH 值及盐浓度, 其适应范围较宽, 温度 7~37 °C 均能生长, 适宜的是 15~30 °C, 最佳是 27 °C; pH 值 5~7 适宜生长, 最适 pH 值为 6.5, 喜中性偏酸性环境; 盐质量浓度 0~6 g·L<sup>-1</sup> 适宜生长, 在 14 g·L<sup>-1</sup> 盐浓度条件下也具有生长能力。

表 4 不同 pH 值对菌丝生长的影响

Table 4 Effects of different pH's on the growth of mycelia

pH 值	菌丝生物量/ (mg·L <sup>-1</sup> )
4.5	670
5.5	1 100
6.5	1 560
7.5	1 230
8.5	450
9.5	320

### 参考文献:

- [1] John W. *Introduction to Fungi* [M]. London: Cambridge University Press, 1989.
- [2] 郭嘉铭, 上官舟建, 陈景潮. 药用真菌的研究与开发概述 [J]. 中国食用菌, 1994, 13 (3): 9.
- [3] Ondrusek V, Prostenik M. Sphingolipids in fruit bodies of the basidiomycete [J]. *Lactarius Delicicus Exp Mycol*, 1978, 2 (2): 156-160.
- [4] Guillot J, Ciollant M, Damez M, et al. Isolation and characterization of a lectin from the mushroom *Lactarius delicicus* [J]. *J Biochem* (Tokyo), 1991, 109 (6): 840-845.
- [5] Bergendorff O, Stemer O. The sesquiterpenes of *Lactarius delicicus* and *Lactarius deterrimus* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 27 (1): 97-100.
- [6] 崔波, 马杰, 李良晨, 等. 河南的红菇科真菌资源研究 (1) [J]. 河南大学学报, 1998, 16 (2): 193-198.
- [7] 陈功锡, 李鸣, 向小奇, 等. 湘西低等植物野菜资源及其开发利用 [J]. 吉首大学学报, 1999, 20 (3): 9-16.

## Tissue isolation and mycelium growth characteristics of *Lactarius delicicus*

ZHOU Gou-ying<sup>1</sup>, LIU Jun-ang<sup>2</sup>, LI Qian-ru<sup>2</sup>

(1. College of Resources and Environment, CSFU, Zhuzhou 412006, Hunan, China; 2. School of Life Sciences Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524000, Guangdong, China)

**Abstract:** The tissues on different positions of 6 basidiocarps of different sources are isolated with 5 kinds of culture media. The best medium for tissue isolation of *L. delicicus* is PDA culture medium and 8 well-developed mycelia are singled out. The research of growth characteristics of mycelium A1 indicates that the mycelia can absorb all the carbon sucrose tested. The sucrose is the best utilized carbon nutrition, the glucose is the better and the fructose is the worst. As for the utilization of nitrogen source, of organic nitrogen, single nitrogen is better than compound nitrogen; and urea can't be utilized. Of inorganic nitrogen, ammonium nitrogen is better than nitrate nitrogen, ammonium sulfate has the best effect and nitrite can't be utilized. Mycelia have strong adaptability to salt concentration and can grow when the salt concentration is 14 g·L<sup>-1</sup>. The optimum salt concentration for mycelia growth ranges from 0 to 6 g·L<sup>-1</sup>. The range of temperature for growth is 7~37 °C. The optimum temperature for mycelia growth ranges from 15 to 30 °C. The optimum temperature for growth is 27 °C. The mycelia prefer neutral and acid environment. The pH values suitable for growth is 5~7 and the optimum one is 6.5. [Ch, 2 fig, 4 tab, 7 ref.]

**Key words:** edible fungi; *Lactarius delicicus*; tissue isolation; mycelium; growth characteristics