

# 松乳菇菌种固体培养基筛选初步研究

徐丽丽,郑华英,徐 明,解春霞,刘云鹏

(江苏省林业科学研究院,江苏 南京 211153)

**摘要:**以引自中国林业科学研究院菌种保藏中心菌种资源库的7个松乳菇菌株为材料,通过筛选出的碳源、氮源基础培养基,对菌丝形态、菌丝生长速度进行观察,确定出适宜的松乳菇菌种和固体培养基配方。试验结果表明:不同菌株菌丝生长速度有所不同,其最适碳、氮源亦有所不同;添加松针水可以有效提高菌种菌丝的生长速度。83417菌株为较适宜培养的菌株,其最适固体培养基组成为 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.3 g)、 $\text{MgSO}_4$ (0.5 g)、 $\text{FeSO}_4$ (0.5 g)、蔗糖(19.9 g)、琼脂(20 g)、蛋白胨(1 g)、 $\text{VB}_1$ (0.1 g)、松针水(1000 mL)。

**关键词:**松乳菇;最优菌株;碳源;氮源;菌种;培养基

**中图分类号:**Q93-335;Q949.329+.81;

**文献标志码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2020.01.006

松乳菇 [*Lactarius deliciosus* (L.) Gray] 属红菇科 (Russulaceae) 乳菇属, 又名雁来蕈等, 是松林山地的特产<sup>[1]</sup>。子实体中等偏大, 乳汁量少, 菌盖半球形, 初生时菌盖边缘向下内卷, 后平展, 菌肉虾仁色, 菌褶与菌盖同色, 初略发白, 后呈橘红色, 伤后变绿色<sup>[1-2]</sup>。肉质细腻, 味道鲜美、柔和, 具独特风味, 深受广大食客的喜爱, 市场价格可达200元/kg<sup>[3-4]</sup>。松乳菇更是珍贵的药用真菌, 具有较高的医用价值<sup>[5-6]</sup>。具有极高的营养价值, 富含多种人体所需的游离氨基酸、不饱和脂肪酸、粗蛋白、矿物质元素等, 其根菌提出的松乳菇多糖, 具有抗肿瘤、抗病毒、抑菌、调节机体免疫力等功效<sup>[7-9]</sup>。

松乳菇在中国广泛分布, 以长江南岸的品质、口感最佳。但因其为松、杉、柏等植物根系的外生菌根菌, 目前未见成功的人工驯化栽培, 因而松乳菇的市场供应全依赖于野生人工采摘, 这对松乳菇的野外生长环境破坏极大, 致使其产量逐年下降<sup>[10]</sup>。由于其野外生长受自然因素(降雨量、温度、坡向)影响较大, 松乳菇产量波动极大, 易造成市场紧缺<sup>[11-12]</sup>。为保护食用菌资源的多样性, 规模化开发利用松乳菇半人工栽培广受关注与研究<sup>[13-15]</sup>。规模化培养松乳菇菌丝体是其开发利用的先决条件, 本文对松乳菇不同菌株进行了筛选, 并对菌丝固体培养进行了初步研究, 以期为后期其林下栽培

与开发提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株来源

试验菌株来自中国林业科学研究院菌种保藏中心菌种资源库, 分别为 cfcc 6592(山东济宁)、cfcc 83417(辽宁宽甸)、cfcc 84695(湖北)、cfcc 87505(陕西)、cfcc 6594、cfcc 6593 和 cfcc 7290。

### 1.2 菌株选择试验

基础培养基为实验室原有的松乳菇固体培养基, 配方<sup>[16-17]</sup>组成为 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.3 g)、 $\text{MgSO}_4$ (0.5 g)、蔗糖(19.9 g)、硝酸钠(0.82 g)、 $\text{FeSO}_4$ (0.5 g)、琼脂(20 g)、 $\text{VB}_1$ (0.1 g)、蒸馏水(1000 mL)。将试管斜面培养的7个松乳菇保藏菌株活化培养, 将活化后菌株直径为5 mm的菌丝体, 接种到基础培养基中央, 置于25℃的恒温箱中培养, 每种处理设重复5个。接种1 d后, 每天观察菌丝形态, 使用游标卡尺测量并记录菌落直径, 以确定适宜的松乳菇菌株。

### 1.3 固体培养基配方筛选

碳元素在真菌细胞的干质量中占有一半, 碳源在真菌发育过程中至关重要。本试验选取葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、麦芽糖等真菌培养过程中的常用碳源进行其最适碳源的选择<sup>[17]</sup>。通过相同含碳量换算, 分别用蔗糖(19.9 g)、可溶性淀粉(18 g)、

收稿日期:2019-10-25;修回日期:2019-12-03

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金专项“野生松乳菇优良菌株筛选及高效栽培技术研究”[CX(17)3053]

作者简介:徐丽丽(1991-),女,浙江台州人,硕士。主要研究方向:森林保护学。E-mail:jiangfeimeng@126.com。

麦芽糖(20 g)、葡萄糖(20 g)作为碳源,配制成不同碳源的培养基,其他物质较基础培养基不变。使用筛选出的适宜菌株,取直径 5 mm 的菌丝体,接种到供试培养基中央,置于 25 ℃ 的恒温箱中培养,每个菌株各设 4 个碳源处理,每种处理设重复 5 个。接种 1 d 后,每天使用游标卡尺测量菌落直径并记录,计算出菌丝覆盖面达培养皿培养基表面 50%、达培养皿培养基表面 100%的天数。后续氮源及松针水的试验中接种方法、重复、培养温度、观察方法与此相同。

氮源在真菌生长过程中不可缺少。在完成碳源筛选的基础上,将最适碳源基础培养基中的硝酸钠(0.82 g)分别替用成蛋白胨(1 g)、酒石酸铵(0.89 g)、尿素(0.29 g)、谷氨酸(1.42 g)等氮源<sup>[17]</sup>,配制成不同氮源培养基,以含硝酸钠氮源培养基为对照,筛选出最适氮源。

最终培养基:使用适宜的氮源、碳源替换基础培养基中的碳源、氮源,并使用 1 000 mL 松针水替代基础培养基中等量的蒸馏水,配制最终培养基,接种菌丝体,以未添加松针水的最适碳源、氮源基础培养基作为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同松乳菇菌株菌丝体生长的比较

将供试菌株接种到培养基上,置于恒温箱 25 ℃ 下培养。观察结果如表 1 所示,cfcc 6594,cfcc 84695,cfcc 6592 和 cfcc 83417 菌株的菌丝体生长速度相对较快,在 30 d 内可以长满平板培养皿培养基表面,剩余其他菌株的菌丝体未能长满培养皿培养基表面。因此,选取这 4 个菌株进行后续试验。接种观察发现,不同菌株间菌丝生长速度有所不同,且基础培养基培养的菌丝较为稀薄,生长速度较

慢,需要对基础培养基配方进行改良,使松乳菇菌种菌丝体可以高效生长。

表 1 松乳菇不同菌株菌丝体生长时间比较 d

| 菌株         | 菌丝生长覆盖    |            |
|------------|-----------|------------|
|            | 培养基表面 50% | 培养基表面 100% |
| cfcc 84695 | 6.0±1.7   | 23.3±0.6   |
| cfcc 6594  | 9.5±3.7   | 23.5±1.3   |
| cfcc 6592  | 3.2±0.4   | 9.3±5.8    |
| cfcc 83417 | 8.8±2.3   | 15.4±5.4   |
| cfcc 87505 | 7.8±0.8   | 30.8±2.5   |
| cfcc 6593  | -         | -          |
| cfcc 7290  | -         | -          |

注:表中的数据为平均值±标准误(n=5);“-”表示在 35 d 的观察期内,菌株菌丝生长未达到记录标准。

### 2.2 不同碳、氮源培养基上松乳菇菌种菌丝体生长的比较

2.2.1 不同碳源对松乳菇菌丝体生长的影响 试验结果如表 2 所示,不同碳源对松乳菇菌种菌丝生长情况的影响前期小于后期,后期差异更为明显。综合菌丝生长覆盖培养基表面达 50%和 100%的情况,发现 cfcc 6592,cfcc 83417 菌株在蔗糖碳源培养基上生长速度最快,cfcc84695 菌株在葡萄糖碳源培养基上的生长速度最快。cfcc 6594 菌株在麦芽糖碳源培养基上生长速度最慢,在 30 d 的观察期内,菌丝生长覆盖未达到培养基表面的 50%,在蔗糖和可溶性淀粉上的生长速度显著大于葡萄糖,根据试验所得数值大小,以及试剂配制的便利性,选择蔗糖作为适宜碳源进行下一步氮源试验。在上述碳源上各菌株的生长速度大小顺序依次为 cfcc 6592>cfcc 84695 > cfcc 83417 > cfcc 6594,而以菌株 cfcc6592 菌丝体生长最快,在蔗糖碳源培养基上,平均 9.3 d 可以长满平板培养皿培养基表面。

表 2 不同碳源培养基上菌丝体生长覆盖培养基表面 50%(A)、100%(B)所需时间 d

| 碳源    | cfcc 84695 |            | cfcc 6594  |            | cfcc 6592 |             | cfcc 83417 |             |
|-------|------------|------------|------------|------------|-----------|-------------|------------|-------------|
|       | A          | B          | A          | B          | A         | B           | A          | B           |
| 蔗糖    | 6.0±1.7 a  | 23.3±0.6 b | 9.5±3.7 a  | 23.5±1.3 a | 3.2±0.4 a | 9.3±5.8 a   | 8.8±2.3 a  | 15.4±5.4 a  |
| 可溶性淀粉 | 7.0±1.8 a  | 26.0±2.9 b | 9.0±0.8 a  | 24.3±1.5 a | 4.3±0.5 a | 18.7±8.4 ab | 12.5±2.7 a | 21.0±2.3 ab |
| 葡萄糖   | 4.8±1.3 a  | 13.8±5.6 a | 24.3±0.6 b | -          | 6.3±1.6 b | 27.0±2.0 b  | 10.4±1.8 a | 17.8±3.6 ab |
| 麦芽糖   | 6.0±0 a    | 30.0±0 b   | -          | -          | 6.8±1.0 b | 26.0±3.2 b  | 11.0±2.3 a | 23.4±1.1 b  |

注:表中数据为平均值±标准误(n=5);“-”表示在 35 d 的观察期内,菌株菌丝生长未达到记录标准。同列数据后不同小写字母表示对同一菌株不同碳源生长情况经 Tukey's 多重比较(其中 cfcc 6594 菌株菌丝生长覆盖培养基表面 100%的组间数据分析时,由于葡萄糖和麦芽糖未能出现有效数据,因此采用 t-test 检验),平均值间差异达显著水平(P<0.05)。

2.2.2 不同氮源对松乳菇菌丝体生长的影响 试验结果如表 3 所示,综合菌丝生长覆盖至培养基表面 50%和 100% 这 2 个指标,cfcc6592 菌株菌丝体在以酒石酸铵为氮源的培养基上的生长速度较快,cfcc83417 在以蛋白胨为氮源的培养基上的生长速度最快。cfcc6594,cfcc84695 菌株在硝酸钠氮源培养基上生长速度显著小于其他 4 个不同氮源,其他

4 个氮源上的生长速度无显著差异,但在酒石酸铵上标准误较小,稳定性高于另 3 个氮源,因此选择酒石酸铵为其最适氮源。生长速度大小顺序依次为 cfcc6594 菌株>cfcc6592 菌株>cfcc84695 菌株>cfcc83417 菌株,而 cfcc6594 菌株菌丝体在酒石酸铵培养基上平均 5.8 d 可以长满平板培养皿。

表 3 不同氮源培养基上菌丝体生长覆盖培养表面 50%(A)、100%(B)所需的时间

d

| 氮源   | cfcc 84695 |             | cfcc 6594 |            | cfcc 6592  |           | cfcc 83417 |            |
|------|------------|-------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|------------|
|      | A          | B           | A         | B          | A          | B         | A          | B          |
| 蛋白胨  | 3.2±0.4 a  | 8.0±1.4 a   | 3.2±0.4 a | 7.0±3.5 a  | 4.3±1.5 b  | 7.4±0.5 a | 5.8±0.4 a  | 14.3±1.5 a |
| 酒石酸铵 | 3.3±0.5 a  | 7.4±0.5 a   | 3.5±0.8 a | 5.8±0.4 a  | 3.0±0 a    | 6.4±0.5 a | 18.0±5.8 b | —          |
| 尿素   | 3.3±0.5 a  | 7.7±2.4 a   | 3.2±0.4 a | 6.8±3.3 a  | 2.7±0.5 a  | 7.5±3.2 a | 14.0±2.7 c | 27.3±3.9 b |
| 谷氨酸  | 4.0±1.1 a  | 8.0±2.4 a   | 3.5±0.5 a | 7.8±4.2 a  | 3.2±0.4 ab | 8.2±2.6 a | 24.6±4.2 d | —          |
| 硝酸钠  | 4.8±0.4 ab | 18.0±0.6 ab | 9.5±1.4 b | 23.5±0.8 b | 3.2±0.4 a  | 9.3±1.4 a | 11.7±1.8 d | 19.8±1.0 b |

注:表中的数据为平均值±标准误( $n=5$ );“—”表示在 35 d 的观察期内,菌株菌丝生长未达到记录标准。同列数据后不同小写字母表示对同一菌株不同碳源生长情况经 Tukey's 多重比较,平均值间差异达显著水平( $P<0.05$ )。

2.2.3 添加松针水对松乳菇菌丝体生长的影响 添加松针水对松乳菇菌丝体生长的影响如表 4 所示。从表 4 中可知,添加松针水后各菌株的菌丝生长速度显著提升,可以在更短的时间内长满培养

基面积的 50%和 100%,且添加松针水对接种后期的菌丝生长速度影响更大。其中 cfcc 83417 菌株的生长速度最快,仅需 3.0 d 便可以长满整个培养基表面,cfcc 83417 菌株为最优菌株。

表 4 添加松针水对松乳菇菌丝体生长的影响

| 菌株         | 覆盖面达培养基表面 50%的生长时间/d |         |       | 覆盖面达培养基表面 100%的生长时间/d |         |       |
|------------|----------------------|---------|-------|-----------------------|---------|-------|
|            | 未添加松针水               | 添加松针水   | 差异显著性 | 未添加松针水                | 添加松针水   | 差异显著性 |
| cfcc 84695 | 3.3±0.5              | 3.0±0   |       | 7.4±0.5               | 5.0±0.7 | **    |
| cfcc 6594  | 3.5±0.8              | 2.0±0.7 | *     | 5.8±0.4               | 4.0±0.7 | **    |
| cfcc 6592  | 3.0±0                | 2.5±0.5 | *     | 6.4±0.5               | 5.0±0.7 | **    |
| cfcc 83417 | 5.8±0.4              | 1.5±0.6 | **    | 14.3±1.5              | 3.0±0.7 | **    |

注:表中数据为平均值±标准误( $n=5$ );“\*”表示经  $t$ -test 检验,平均值间差异达显著水平( $P<0.05$ ),“\*\*”表示经  $t$ -test 检验,平均值间差异达极显著水平( $P<0.01$ )。

### 3 结论

(1)不同菌株菌丝生长速度有所不同,其最适碳源、氮源有所不同;添加松针水可以有效提高 4 个菌株 cfcc 6594,cfcc 84695,cfcc 6592 和 cfcc 83417 菌丝的生长速度。其中,碳源和松针水对松乳菇菌丝生长速度的影响在接种前期小于后期。

(2)cfcc 83417 菌株为最优菌株,平均 3.0 d 便可长满培养基表面,在最适培养基中生长速度显著大于其他菌株,其最适碳源为蔗糖,最适氮源为蛋白胨。故确定其最适培养基配方为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.3 g)、 $\text{MgSO}_4$ (0.5 g)、 $\text{FeSO}_4$ (0.5 g)、蔗糖(19.9 g)、琼脂(20 g)、

蛋白胨(1 g)、 $\text{VB}_1$ (0.1 g)、松针水(1 000 mL)。

(3)cfcc 6592,cfcc 6594 菌株的最适碳源为蔗糖,最适氮源为酒石酸铵,其最适培养基配方为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.3 g)、 $\text{MgSO}_4$ (0.5 g)、 $\text{FeSO}_4$ (0.5 g)、蔗糖(19.9 g)、琼脂(20 g)、酒石酸铵(0.89 g)、 $\text{VB}_1$ (0.1 g)、松针水(1 000 mL)。

(4)cfcc 84695 菌株在葡萄糖碳源培养基上生长速度显著大于其他几个碳源培养基,酒石酸铵为其最适氮源,最适培养基配方为  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.3 g)、 $\text{MgSO}_4$ (0.5 g)、 $\text{FeSO}_4$ (0.5 g)、葡萄糖(20 g)、琼脂(20 g)、酒石酸铵(0.89 g)、 $\text{VB}_1$ (0.1 g)、松针水(1 000 mL)。(下转第 41 页)

## 参考文献:

- [1] 严静君,徐崇华,李广武,等.林木害虫天敌昆虫[M].北京:中国林业出版社,1989.
- [2] 祝汝佐,何俊华.寄生性天敌昆虫的寄生现象[J].昆虫知识,1978(1):25-28.
- [3] 何俊华,陈学新.中国林木害虫天敌昆虫[M].北京:中国林业出版社,2006.
- [4] CAI W Z, YAN Y H, LI L Y. The earliest records of insect parasitoids in China [J]. Biological Control, 2005, 32(1): 8-11.
- [5] 江苏省森林病虫普查办公室.江苏省森林病虫普查病、虫、天敌名录(内部资料).1982;245-269.
- [6] 沛县森防检疫站.沛县林木病、虫、天敌名录(内部资料).1990;73-77.
- [7] 铜山县森林病虫普查组.铜山县森林病虫普查病、虫、天敌名录(内部资料).1994;1-4.
- [8] 钱桂芝,郭同斌,胥谦.杨小舟蛾生物学与生态学研究进展[J].江苏林业科技,2008,35(1):52-55.
- [9] 郭加忠,郭同斌,王虎诚,等.红环瓢虫的生物学与应用技术研究进展[J].江苏林业科技,2010,37(4):50-54.
- [10] 王虎诚,郭同斌,杜伟,等.徐州地区红环瓢虫生物学习性研究概况[J].安徽农业科学,2014,42(4):998-999,1001.
- [11] 王菲,张瑞芳,宋明辉,等.徐州市蝴蝶资源调查与分析[J].江苏林业科技,2017,44(4):26-32,39.
- [12] 徐辉筠,王菲,郭同斌,等.徐州半翅目异翅亚目昆虫种类及危害调查[J].江苏林业科技,2017,44(3):9-14.
- [13] 梁艳.兰州南北两山林区蠋蝽生物学特性研究[J].甘肃林业,2015(6):31-32.
- [14] SMITH S M. Insect parasitoids: A Canadian perspective on their use for biological control of forest insect pests[J]. Phytoprotection, 1993, 74(1): 51-67.
- [15] MACQUARRIE C J K, LYONS D B, SEEHAUSEN M L, et al. A history of biological control in Canadian forests, 1882-2014 [J]. The Canadian Entomologist, 2016, 148(S1): 239-269.
- [16] 党英侨,王小艺,杨忠岐.天敌昆虫在我国林业害虫生物防治上的研究进展[J].环境昆虫学报,2018,40(2):242-255.
- [17] MESSELINK G J. Pest management in organic greenhouse horticulture [J]. Acta Horticulturae, 2017(1164): 361-370.
- [18] 国家林业局森林病虫害防治总站.中国林业有害生物风险评估[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,2014;40-41.
- [19] 郭同斌,王振营,梁波,等.杨小舟蛾的生物学特性[J].南京林业大学学报,2000,24(5):56-60.
- [20] 乔秀荣.秦皇岛市美国白蛾天敌调查研究[J].中国森林病虫害,2007,26(3):30-31,34.
- [21] 曲花荣,逢焕臣,邵凌松,等.烟台地区几种鳞翅目食叶害虫天敌的研究[J].山东林业科技,2006(2):44-45.
- [22] 岳喜强,张贵民,姜秀芹,等.聊城地区美国白蛾天敌种类调查及寄生性研究[J].山东农业科学,2016,48(6):95-98.
- [23] 杨大宏,王小纪,高存芳,等.杨小舟蛾天敌类型调查[J].陕西林业科技,1999(4):18-19.
- [24] 严静君,刘后平.中国林木害虫天敌昆虫利用研究进展[J].陕西林业科技,1992(2):24-28.

(上接第31页)

## 参考文献:

- [1] 潘崇环,孙萍,龚翔,等.珍稀食用菌栽培与名贵野生菌的开发利用[M].北京:中国农业出版社,2004:300-309.
- [2] 刘旭东.中国野生大型真菌彩色图鉴[M].北京:中国林业出版社,2004;31-39.
- [3] 彭克俭.松乳菇生物学特性的研究[J].食用菌,1998,20(1):14-16.
- [4] 詹少华.松乳菇子实体人工诱导方法研究[J].皖西学院学报,2018,34(5):73-76.
- [5] 崔亮,国兴明,刘丽.野生松乳菇水溶性多糖提取工艺研究初报[J].山地农业生物学报,2008,27(6):522-526.
- [6] 柯丽霞.松乳菇的抗菌活性研究[J].安徽师范大学学报(自然科学版),2002,25(1):63-64.
- [7] 陈杨琼,丁祥,伍春莲,等.松乳菇多糖抗肿瘤和免疫调节活性研究[J].食用菌学报,2012,19(3):73-78.
- [8] 白瑞,鲍中英,段淑红,等.松乳菇多糖治疗原发性肝癌的细胞实验及机制[J].临床与病理杂志,2019,39(10):2110-2117.
- [9] 敖常伟,惠明,李忠海,等.松乳菇营养成分分析及松乳菇多糖的提取分离[J].食品工业科技,2004,24(9):77-79.
- [10] 熊涛,肖满.松乳菇研究进展[J].食品与发酵工业,2005,31(5):84-86.
- [11] 罗国涛,张文泉.秋季松乳菇微生态环境调查研究[J].贵州科学,2018,36(2):1-4.
- [12] 柯丽霞.黄山地区松乳菇的生态分布和生态环境调查[J].食用菌学报,2003,22(2):21-23.
- [13] 王欢,栾竹青,刘传林,等.组织培养条件下紫色松乳菇培养条件的优化[J].农产品加工,2019(8):43-46,67.
- [14] 傅雁辉,聂丽,夏凡,等.松乳菇液态发酵培养基研究[J].生物灾害科学,2017,40(3):199-204.
- [15] 林荣雄,陈京元.碳源和氮源对松乳菇菌丝生长的影响[J].食用菌学报,2002,9(1):44-46.
- [16] 聂丽,彭惠玲,夏薇,等.松乳菇固体培养条件的研究(英文)[J]. Agricultural Science & Technology, 2015, 16(6): 1162-1164, 1198.
- [17] 邢来君,李明春.普通真菌学[M].北京:高等教育出版社,1999.