

# 黑龙江 0288 松茸菌株生物学特性

蒋中海

(江苏淮阴工学院 生命科学院 江苏 淮安 223001)

**摘要:**以紫外线诱变松茸孢子获得的菌株 0288 其生长速度和生物积累量为指标, 选择优良适于液态发酵松茸菌株为目的, 生长速度快平均菌丝生长量为 0.575 mm/d; 在 0.5、1 和 2 h 下提取到的多糖含量分别为 3.56%、8.14% 和 8.46%; 100 g 菌丝的干重为 10.56 g。液体培养基以 G 培养基提供的氮源较适合松茸生长; 在 0.5、1 和 2 h 下提取到的多糖含量分别为 3.9%、8.59% 和 8.73%; 100 g 菌丝的干重为 7.34 g。液体培养基比母种培养基更适合 0288 松茸菌丝的生长, 发酵罐的批量培养是对液体培养的优化, 与其它供试株比较差异极显著, 经人工培养获得了松茸子实体。

**关键词:** 松茸菌丝; 胞内胞外多糖; 液体培养; 人工培育松茸子实体

**中图分类号:** S 646.1<sup>+</sup>5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)08-0205-04

松茸 (*Tricholoma matsutake*) 又名松口蘑、松蕈等, 是世界珍稀名贵的野生食用菌, 主要分布在日本、朝鲜半岛以及我国东北、西南和台湾等地区。松口蘑具有很高的食用价值和药用价值, 价格极其昂贵, 历来被视为食用菌的珍宝, 素有“菌中之王”、“山中钻石”、“绿色黄金”等美称<sup>[1]</sup>。现国内外研究者, 主要研究人工诱导菌塘, 松茸是共生菌难以人工培养松茸子实体, 野外子实体培养初期选不好培养基分离培养不能生长。共同认为松茸子实体产生担子, 担子中的两个核进行核配, 经过减数分裂产生单核的担孢子, 单核担孢子萌发成单核菌丝, 由两个可亲和的单核菌丝结合形成双核菌丝, 或者单核担孢子自己分裂形成双核担孢子, 由双核担孢子萌发生成双核菌丝。两种方式形成的双核菌丝后有赤松或其他植物供给光合养分后产生新的子实体。怎样才能人工培育出子实体困扰着研究者。因此于 2002 年从黑龙江凤凰山国家自然保护区分离了一株松茸进行了试验, 结果如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 松茸菌种来源与培养

松茸 0288jiang, 松茸子实体于 2002 年 8 月 8 日从国家级黑龙江凤凰山松口蘑自然保护区获得子实体, 其位于黑龙江东南部与俄罗斯接壤的鸡东平房, 四山, 西

**作者简介:** 蒋中海(1954), 男, 教授, 主要从事食用真菌研究工作, 曾在《菌物学报》、《植物杂志》、《北方园艺》、《生物学通报》等杂志发表论文 30 余篇。E-mail: jianghh206@163.com。

**基金项目:** 黑龙江自然科学基金资助项目(黑 2004-30); 淮安科技资助项目(SN0744); 淮阴工学院大学生创新资助项目。

**收稿日期:** 2008-03-04

南岔。地理位置东经 131°4' ~ 15' 和北纬 44°45' ~ 45°3' 之间南与俄罗斯搭界 7 km, 北距鸡东县 35 km。经分离松茸孢子诱变菌株而得。

### 1.2 松茸菌种诱变

松茸菌种诱变是在黑龙江鸡西大学进行的, 在无菌室内将子实体放到灭过菌的黑纸上隔夜第 2 天刮取孢子接种于培养基上, 在 15 W 紫外灯下 30 cm 分别照射不同时间, 然后放入培养箱内培养, 孢子及菌丝经几次试验在 PDA 培养基中不生长, 主要是在 A、B、C 培养基生长良好。

### 1.3 松茸菌株筛选

松茸经过 20 d 培养, 筛选菌落大, 然后再转管再在 15 W 紫外灯下 30 cm 分别照射不同时间, 经过反复试验至 2006 年培养发现有子实体形成, 菌丝在原种培养基培养白色 2 月余后形成是深黄色如鹿角状后逐渐开伞。

### 1.4 培养基的选择

母种培养基的选择培养基及其改良的培养基, 分别以 A、B、C、D、E 表示, 药品如表 1 所示。

液体培养基是在母种培养的基础上对 A 培养基的改良, 选择了 2 种不同的氮源, 分别以 F、G 表示, 药品如表 2。液体深层发酵培养基: 葡萄糖 150 g、酵母片 17.5 g、酒石酸 10.5 g、磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 10 g、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 10 g、硫酸镁( $\text{MgSO}_4$ ) 7 g、大豆 250 g、玉米 200 g、小麦 200 g、水稻 100 g。

## 2 结果与讨论

### 2.1 松茸菌丝的萌发时间和萌发率的测定

从表 3 可以看出 A 培养基萌发的时间最早, 第 10 天开始萌动生长。其次是 B 和 C 培养基, 均为 12 d, 接着在第 13 天发现 D 培养基生长, 最后是 E 培养基。说

明 A 培养基中有促进松茸萌发的物质。另外, A 和 B 培养基的萌发率最高为 90%, 其次为 D 培养基为 80%, 最后是 C 和 E 培养基萌发率为 70%。A 培养基的萌发率最高, 萌发时间最快 说明 A 培养基在一定程度上适应松茸的生长。从感菌的情况来看, 这次试验的接种是成功的, 在 50 支试管的试验中只有 3 支试管感菌, 其中 2 支是萌发后感菌的, 成功率达 94%。

表 1 母种培养基	
序号	药品
A	葡萄糖 10 g, 琼脂 10 g, 马铃薯(去皮) 100 g、石炭铵 0.75 g、磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 0.5 g、硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ) 0.25 g、蛋白胨 1.5 g
B	葡萄糖 10 g, 琼脂 10 g, 马铃薯(去皮) 100 g、硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ) 0.25 g、酒石酸铵 0.75 g
C	葡萄糖 10 g, 琼脂 10 g、磷酸二氢钠(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 0.5 g、酒石酸钾钠 0.75 g、蛋白胨 1.5 g
D	葡萄糖 10 g, 琼脂 10 g、磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 0.5 g、0.5 N HCl、酵母片 1.25 g
E	葡萄糖 10 g, 琼脂 10 g、酵母片 2.5 g、酒石酸铵 0.75 g

表 2 液体培养基	
序号	药品
F	葡萄糖 30 g、酒石酸 1.5 g、磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 1 g、硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ) 0.5 g、蛋白胨 2.5 g
G	葡萄糖 30 g、酒石酸 1.5 g、磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 1 g、硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ) 0.5 g、大豆 20 g、玉米 10 g、小麦 5 g

注: 培养基分别选择不同的氮源: 蛋白胨、大豆、玉米、小麦

表 3 培养基的萌动及萌发时间的统计					
培养基	试管数 / 支	未萌发数 / 支	萌发数 / 支	萌发率 / %	萌发时间 / d
A	10	1	9	90	10
B	10	1	9	90	12
C	10	3	7	70	12
D	10	2	8	80	13
E	10	3	7	70	14

2.2 松茸菌丝的测定

从不同配方的松茸培养基菌丝日生长量方差分析结果(表 4)中可以看出, 在 A 培养基上松茸的菌丝生长速度最快, 与其它配方的培养基相比, 差异都达到了极

显著水平。其后依次为 B 培养基、C 培养基、D 培养基、E 培养基。B 培养基和 C 培养基之间菌丝生长速度存在差异, 但在 0.05 水平上未达到显著水平; C 培养基和 D 培养基之间也存在差异, 但在 0.05 水平上也没有达到显著水平。E 培养基上松茸菌丝生长速度最低, 与 A 培养基、B 培养基、C 培养基、D 培养基相比, 差异都达到了显著水平。

表 4 不同培养基上松茸菌丝生长速度的比较结果(q 法)									
培养基	pH	菌丝生长量/mm · d <sup>-1</sup>					平均值 /mm · d <sup>-1</sup>	差异显著性	
		1	2	3	4	5		0.05	0.01
A	5.50	0.60	0.54	0.60	0.56	0.54	0.575	a	A
B	5.38	0.52	0.52	0.50	0.50	0.48	0.510	b	B
C	5.98	0.47	0.48	0.50	0.48	0.46	0.483	bc	BC
D	6.23	0.47	0.43	0.43	0.45	0.48	0.445	c	C
E	5.05	0.43	0.40	0.40	0.42	0.42	0.413	d	D

松茸纯菌丝体在 A 培养基上之所以表现出较快的生长速度, 其原因是多方面的。首先, 松茸需要同赤松形成营养共生关系, 不仅从赤松根系中吸收养分, 还能从根系中吸收到其生长所需要的元素。A 培养基除给松茸提供基本的能量外, 还能为松茸提供这些元素, 很好的促进松茸的生长。其次, 前人的研究证明, 松茸能够利用的无机态氮源为氨态氮, 而且许多种类的维生素对松茸菌丝生长也有促进作用。A 培养基中含有相应的氮源, 有利于松茸菌丝的生长。最后, 松茸菌丝生长最适 pH 是 5.5<sup>[3]</sup>, 而 A 培养基的 pH 正好是 5.5(表 4), 能够满足松茸菌丝生长对酸碱度的要求。所有这些都为松茸的生长提供了很好的环境, 极大地促进了松茸的生长<sup>[2]</sup>。

B 培养基的配方能够满足松茸生长的营养需要。C 培养基配方是对 PDA 培养基的改良, PDA 培养基是国内外研究者常用的培养基, 也能够满足松茸的生长。B 培养基和 C 培养基的 pH 值都接近于松茸生长的最适酸碱度, 所以这 2 种培养基上的松茸均能生长良好。

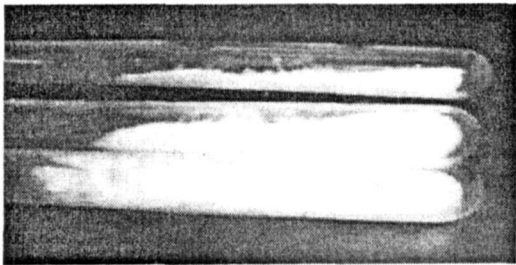
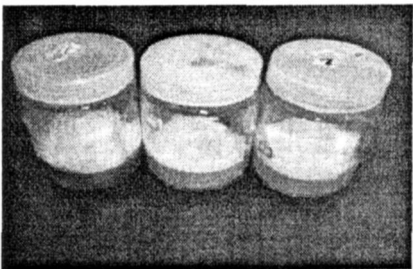


图 1 生长旺盛的松茸菌丝



从松茸的生长需要来说 E 培养基也能够满足松茸生长的要求, 在试验中没有达到理想的效果, 其原因可能是培养基的配方不当。

2.3 不同形式的菌种对松茸菌球的影响

从试验中发现不同的菌种培养出不同形态大小的菌球。用母种培养基上的菌种培养出来的菌球很大, 最

大的菌球可以覆盖三角瓶和组培瓶的瓶底, 1 个三角瓶和组培瓶中只能产生 1 个菌球, 并且液体稀疏; 采用液体培养基里的菌种培养出的菌球小而多, 菌球充满整个培养基, 每个菌球直径只有 2 mm, 培养基液体稠密。并且三角瓶比组培瓶培养菌球的效果更好。

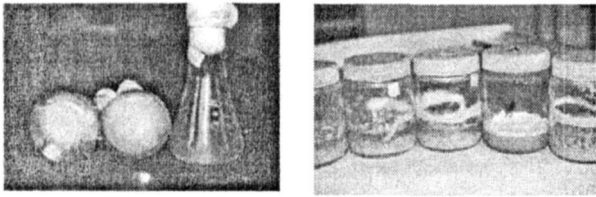


图 2 液体培养基培养的松茸菌丝效果影响

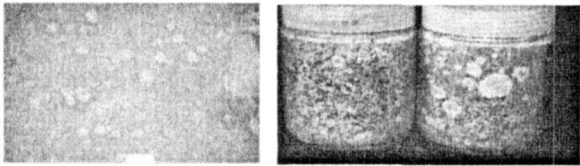


图 3 发酵罐培养松茸菌丝的效果

2.4 发酵罐批量培养松茸菌丝体结果部分

从批量培养松茸菌丝体的过程来看, 发酵罐集灭菌、接种、培养于一体, 操作方便, 节省时间; 从培养时间来看, 发酵罐仅培养了 112 h, 液体培养基培养的最佳时间为 10 d, 母种培养基最早萌动的时间为第 10 天, 说明发酵罐培养得到明显的优化; 从菌丝产量来看, 7 000 mL 培养基共得菌丝体干重 98.14 g, 100 mL 培养基得菌丝体得率为 1.402 g, 比液体培养基得 1.392 g/100mL 高; 从培养的松茸菌球来看, 发酵罐培养的菌球直径有 5mm 左右, 比液体培养的 2mm 菌球明显增大。这些都

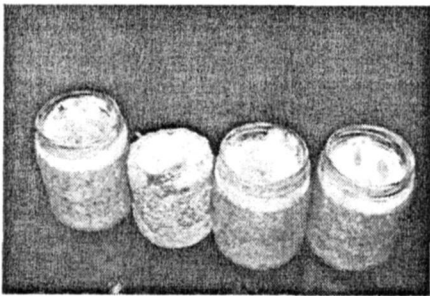


图 6 菌丝人工驯化的小菌蕾

3 讨论

在选用的 5 种母种培养基培养松茸的试验中, A 培养基最好, 松茸菌丝的萌发时间最早, 在第 10 天萌发, 萌发率为 90%; 菌丝的日生长量为 0.575 mm; 在提取时间为 0.5、1.2 h 时得到的多糖含量分别为 3.56%、8.14%、8.46%; 菌丝的干重和水分含量分别为 10.56 g 和

证明了发酵罐培养优于母种培养和液体培养。这与 Kawagoe(1999)采用气泡式柱式发酵罐培养松茸菌丝的菌丝产量和生长速度都优于三角瓶的结果相一致。

2.5 对 0288 松茸菌丝的人工驯化

将液体培养基 G 与松树木屑混合, 木屑的水分含量为 60%~70%, 木屑的 pH 5.5。将木屑装入组培瓶中, 压实, 用 15 mm×15 mm 的试管在木屑中间压一个洞留着接种, 盖紧后在 121℃的高温下灭菌 100 min., 菌种采用母种培养基 A 培养的松茸菌丝体, 然后在 25℃下培养。到现在为止, 松茸菌丝已经长满木屑, 并且出现很多白色的松茸菌丝点, 这可能是产生松茸子实体的前兆。另外, 又用松树的栽培土栽培松茸, 模拟松茸的生长发育条件。

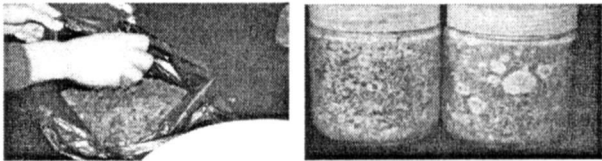


图 4 对松茸菌丝人工驯化的效果

惊菌与促蕾:0288 菌株松茸生产菌丝长满袋后须用竹板拍打地面造成声响, 搬动松茸菌袋进行惊菌移入到栽培室。早、晚、午温差变化在 18~10℃之间; 干湿差空气相对湿度 85%~90%出菇管理; 光暗差以三分阴, 七分阳; 要以足够的通风保证氧气供给。诱导 0288 菌株松茸菌蕾, 其丛状黄色, 基生有时有二叉如鹿角状, 此时要小心把小的菌蕾用镊子去掉一些, 保证营养集中, 15~25 d 0288JiangZhonghai—China 菌株松茸菌蕾逐渐长大成子实体。

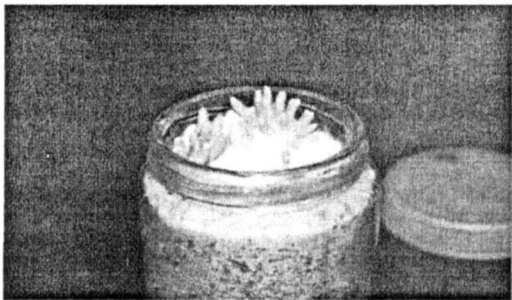


图 7 松茸的鹿角状菌蕾

89.44 g; 菌落的形态特征为草帽状, 有明显外沿, 菌落边缘都有放射状波曲, 菌丝洁白、浓密、生长健壮。

选用的 2 种液体培养基做松茸两种氮源的比较。从结果可以看出, 松茸对 G 培养基氮源的利用更好; 菌球于第 4 天开始形成, 第 15 天达到最大, 菌球直径为 2 mm 左右, 所需时间为 11 d; 在提取时间为 0.5、1.2 h

时得到的多糖含量分别为 3.90%、8.59%、8.73%；菌丝的干重和水分含量分别为 8.34 g/100g 和 91.66 g/100g；摇瓶的最佳装液量为 60 mL；菌丝日生长量达到最大的

时间是第 10 天，每 60 mL 为 0.259 g/d。从以上结果看液体培养基更适合松茸生长。



图 8 松茸人工驯化菌蕾



图 9 松茸人工驯化子实

用发酵罐批量培养松茸菌丝 从结果可以看出，发酵罐培养的效果更佳。培养时间为 112 h，菌丝得率为 1.402 g/100 mL，菌球直径为 5 mm 左右。不足的是由于没有及时调节培养基的酸碱度，最后的 pH 值为 3.8，影响了菌丝的生长，降低了菌丝得率。

对松茸菌丝体得人工驯化也取得一定得进展，能人工诱导出子实体，打破了共生菌不能栽培。试验的结果达到预期的效果，取得了一定的试验成果，基本可以大规模培养松茸菌丝，还须做松茸 DNA 鉴定。试验设计

的还不够很完整，在以后试验中还有待完善。

#### 参考文献

- [1] 蒋中海. 中国松口蘑资源及繁殖技术的研究[J]. 中国食用菌, 2006, 5(3): 8-12.
- [2] 傅伟杰, 许广波, 傅民杰. 长白山松口蘑的驯化研究进展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(6): 105-109.
- [3] 刘萍, 陶文沂, 许正宏 等. 松口蘑深层发酵工艺的研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 5-9.
- [4] 蒋中海. 黑龙江凤凰山自然保护区松口蘑的研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2005, 21(3): 109-111.

## Biological Characteristic of *Tricholoma matsutake* Heilongjiang 0288

JIANG Zhong-hai

(Life College of Huaiyin Engineering Institute in Jiangsu, Huaiyin, Jiangsu 223001, China)

**Abstract:** Took growth speed and biomass of *Tricholoma matsutake* Heilongjiang 0288 as the selection standard and the selection of *Tricholoma matsutake* strain that can be used in liquid fermentation as a goal, one strain obtained from spore separation and then ultra-violet mutation showed high growth speed with average mycelia growth speed of 0.575 mm/d. The contents of polysaccharides in the samples were 3.56%, 8.14%, 8.46% respectively when the distilled time was 0.5, 1, 2 h. Dry weight per 100 g wet mycelium was 10.56 g. Media Gproviding suitable nitrogen source for the mycelium growth was the best media in this story. The selected *Tricholoma matsutake* strain formed mushroom balls on the fourth day and its mushroom balls were the biggest on the fifth day. The contents of polysaccharides in the samples were 3.9%, 8.59%, 8.73% respectively when the distilled time was 0.5, 1, 2 h. The mycelia dry weight reached 8.14%/100g. Liquid media were better than solid stock media for the growth *Tricholoma matsutake* strain 0288, and the optimal condition for liquid mycelium culture was batch culture with fermentation tin. This strain had significant difference in mycelium dry weight and conetents of polysaccharides from other stains, and *Tricholoma matsutake* fruit-body were cultured.

**Key words:** *Tricholoma matsutake* mycelium; Liquid culture; Extracellular polysaccharides Intracellular polysaccharides; Fruit-body growth *Tricholoma matsutake* fungi