

# 添加不同氮源对紫铜色松乳菇菌丝生长的影响

李 静<sup>1</sup>, 马 媛<sup>1</sup>, 徐彦军<sup>2</sup>

(1. 黔南民族师范学院 民族生物资源研究所, 贵州 都匀 558000; 2. 贵州大学 农学院 贵州 花溪 550025)

**摘 要:** 研究在 PDA 培养基中添加不同氮源对紫铜色松乳菇菌丝的生长速度和干重的影响。结果表明: 在 PDA 培养基中添加 KNO<sub>3</sub> 和牛肉膏菌丝生长速度最快。添加酵母膏与和牛肉膏菌丝的干重最重, 综合分析, 牛肉膏不仅使菌丝生长快, 而且菌丝生长浓密, 干重最重, 所以最适宜紫铜色松乳菇的生长, 适宜浓度 0.1%~0.5%, 有机氮源比无机氮源更适宜紫铜色松乳菇的生长。

**关键词:** 有机氮; 无机氮; 浓度梯度; 方差分析

**中图分类号:** S 646.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0171-03

松乳菇 (*Lactarius deliciosus* (L. ex Fr.) Gray) 为担子亚门层菌纲伞菌目红菇科乳菇属<sup>[1]</sup>, 是贵州少数民族地区传统食用的野生食用菌, 每年 5~6 月和 9~11 月均有松乳菇上市<sup>[2]</sup>。根据野外调查发现, 5~6 月以橙黄色的松乳菇为主, 零星夹杂有紫铜色松乳菇, 9 月中旬至 11 月中旬以紫铜色松乳菇为主, 零星夹杂有橙黄色松乳菇。紫铜色松乳菇同橙黄色松乳菇相比, 形态基本相似, 只是在颜色、乳汁、气味、口感有些区别, 紫铜色松乳菇发生的时间比橙黄色松乳菇晚, 原基的形成要求的温度比橙黄色松乳菇要低一些<sup>[3]</sup>。

由于橙黄色松乳菇味道稍辛辣, 而紫铜色松乳菇没有辛辣味, 口感比橙黄色松乳菇细腻, 因此紫铜色松乳菇倍受当地人们的喜爱。近年来由于温室效应, 加之环境污染, 在城市周边山林里, 已找不到紫铜色松乳菇的踪影, 农村也是在较远林地才能找到, 因此紫铜色松乳菇的产量下降的很明显, 每年紫铜色松乳菇供不应求, 市场价格一涨再涨, 从过去的 1~2.5 元/kg, 涨到现在的 12.5~40 元/kg, 因此保护和研究紫铜色松乳菇已迫在眉睫<sup>[4-5]</sup>。

课题组已对紫铜色松乳菇的野外生态环境进行了大量调查, 采集子实体, 制作孢子印, 采用孢子分离菌种已获得成功, 初步进行了基因鉴定, 对栽培培养基筛选工作已经完成, 正在进行仿生态环境的栽培研究。在研究过程中发现, 用 PDA 培养基进行菌种保藏, 3 次转管

后就开始退化, 5 次转管后菌丝长势很弱, 就不能再用, 采用重新复壮和分离的方法可以获得生长旺盛的菌种, 但较为麻烦, 现通过添加不同的氮源成分, 寻找适合紫铜色松乳菇菌丝生长的菌种培养基, 延缓菌种的退化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

有机氮源: 牛肉膏、蛋白胨、酵母膏; 无机氮源: 硝酸氨、硫酸氨、硝酸钾; 供试菌株: 紫铜色松乳菇菌种, 由黔南民族师范学院生物生命科学系微生物实验室分离纯化。

### 1.2 基础培养基

培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15~20 g, pH 自然, 1 000 mL。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菌种的分离、纯化<sup>[6]</sup> 孢子收集: 采集菌盖开始展开, 但又没有完全展开子实体, 用 75% 的酒精棉球进行消毒, 取掉菌柄, 菌褶朝下, 盖在灭菌的白纸上, 24 h 得到孢子印。用无菌水把孢子洗出, 制成孢子悬液。双抗培养基: 用子实体汁制备 PDA 培养基, 把培养基倒入培养皿, 每皿滴加 50 μg/mL 青霉素钠和 100 μg/mL 链霉素各 0.2 mL, 涂布在 PDA 培养基上, 制成双抗培养基<sup>[7]</sup>。孢子培养: 取 0.2 mL 孢子悬液, 加入双抗培养基, 涂布均匀后, 在 28℃ 恒温箱倒置培养。菌种分离: 孢子萌发菌丝后及时转入普通 PDA 培养基进行培养, 培养 2~3 代, 菌丝生长稳定后, 转入试管斜面培养基培养, 制成菌种, 放入 4℃ 左右的冰箱保藏备用。

1.3.2 菌种鉴定 采用 RAPD 分子标记法进行菌种鉴定。用 NISYS-PC 软件中的 SIMQUAL 程序计算 DNA 指纹间的相似系数, 按加权算术平均组对法(UPGMA 法)构建树状图, 绘制出紫铜松乳菇子实体与分离的菌

第一作者简介: 李静(1968-), 女, 重庆江津人, 副教授, 现主要从事微生物教学与科研工作。

基金项目: 贵州省科技厅 农业攻关资助项目(黔科合(2008)3032)。

收稿日期: 2010-09-30

丝体之间的内缘关系树状图,结果表明,孢子分离的菌丝体系紫铜松乳菇分离的菌株。

1.3.3 添加氮源的浓度梯度<sup>[8]</sup> 有机氮源牛肉膏、蛋白胨、酵母膏和无机氮源硝酸氨、硫酸氨、硝酸钾均采用相同的浓度梯度 0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%添加到 PDA 培养基中,3 次重复。

1.3.4 倒平板、接种 把添加有氮源的 PDA 培养基倒入直径 90 mm 培养皿的 1/3 处,约 15 mL 的培养基;用灭菌的直径 4 mm 打孔器,放入菌种培养皿中,把菌种打成直径大小约 4 mm 菌丝片,接种到培养皿中心,放入 28℃恒温箱培养。

1.3.5 测量方法 菌丝长度测量:从菌丝的中心到生长的最远端测得的长度作为菌丝生长的长度,以每 7 d 测量菌丝的长度作为衡量菌丝生长速度的标准。菌丝干重测量:先将培养 7 d 的松乳菇菌丝体培养皿加热,使其中的琼脂完全溶解,再将其放入 90~100℃热水中漂洗 2 次,放入烘干箱内烘干后,采用电子天平称重。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对紫铜色松乳菇菌丝生长速度的影响

由表 1 可知,不同氮源对菌丝生长速度的影响的差异性极其显著;氮源的不同浓度梯度对菌丝生长速度的影响差异也极其显著。采用 Tukey 固定极差法对不同氮源之间菌丝生长速度的影响进行多重比较。

表 1 不同氮源对紫铜色松乳菇菌丝生长							cm/7d	
氮源(A)	浓度(B)						$T_i$	$\bar{y}_i$
	重复	0.05%	0.10%	0.50%	1%	2%		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	8	7.8	7.8	7.1	7.1	110.2	7.345
	2	5.7	8.2	7.8	7.1	7		
	3	8.2	7.4	7.2	7.1	6.7		
KNO <sub>3</sub>	1	8.5	8.6	8.4	7.6	7.2	121.1	8.073
	2	8.6	8.2	8.6	7.8	7.5		
	3	8.6	8.1	8.3	7.5	7.6		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	7	7.1	7.2	8.1	6.1	104.6	6.973
	2	6.9	7.1	7.1	7.3	5.3		
	3	7.1	7.1	7.1	8.4	5.7		
酵母膏	1	6.3	8.2	7.9	8.5	8.5	115.2	7.680
	2	6.5	7.7	7.7	8.5	8.4		
	3	5.7	7.2	7.1	8.6	8.4		
牛肉膏	1	8.5	8.2	8.5	7.4	7.1	118.5	7.900
	2	8.4	8.3	8.6	7.1	7		
	3	8.6	7.8	8.6	7.3	7.1		
牛肉膏	1	7.2	7.1	8.5	8.2	7.1	111.7	7.447
	2	6.8	7.2	8	8.2	6.8		
	3	7	7	7.9	7.8	6.9		
$T_{ij}$		133.6	138.3	142.3	139.6	127.5		

$S\bar{y} = \sqrt{\frac{MSe}{n}} = \sqrt{\frac{0.129}{12}} = \sqrt{0.01075} = 0.104$ , 根据  $DF=60, K_A=6, \alpha=0.05$  时  $q_\alpha$  临界表,  $q_\alpha=(6, 60)=4.16, TFR_{0.05}=4.16 \times 0.104=0.433$ 。

表 2 不同氮源对紫铜色松乳菇菌丝生长速度影响的方差分析						
变异来源	SS	DF	MS	F	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
A 因素	11.93	5	2.386	18.50 **	2.290	3.339
B 因素	7.53	4	1.883	14.60 **	2.525	3.649
A×B	25.76	20	1.030	7.98 **	1.700	2.115
误差	7.71	60	0.129			
总计	52.93	89				

表 3 不同氮源处理平均数间差异的 Tukey 固定极差法检验		
配比浓度	平均数	$\alpha=0.05$
KNO <sub>3</sub>	8.073	a
牛肉膏	7.900	ab
酵母膏	7.680	b
蛋白胨	7.447	bc
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.345	bc
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6.973	c

由表 3 可知,添加 KNO<sub>3</sub> 促进菌丝生长与添加牛肉膏差异不明显,与酵母膏差异显著;添加酵母膏促进菌丝生长与添加蛋白胨、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的差异不明显,与 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的差异显著。

2.1 不同氮源对紫铜色松乳菇菌丝干重影响

由表 4 可知,不同氮源之间对菌丝干重的影响差异极其显著;氮源的不同浓度之间对菌丝干重的影响差异也极其显著。采用 Tukey 固定极差法对不同氮源之间菌丝干重的影响进行多重比较。

表 4 不同氮源对紫铜色松乳菇干重的影响							g/7d	
氮源	浓度 %						$T_i$	$\bar{y}_i$
	重复	0.05 %	0.10 %	0.50 %	1 %	2 %		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	0.22	0.144	0.203	0.287	0.149	2.929	0.195
	2	0.189	0.214	0.254	0.178	0.208		
	3	0.147	0.171	0.216	0.185	0.164		
KNO <sub>3</sub>	1	0.211	0.15	0.122	0.148	0.11	2.354	0.157
	2	0.17	0.19	0.158	0.146	0.109		
	3	0.178	0.18	0.126	0.15	0.206		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	0.341	0.333	0.376	0.262	0.118	4.28	0.285
	2	0.303	0.308	0.402	0.266	0.116		
	3	0.32	0.373	0.347	0.295	0.12		
酵母膏	1	0.395	0.403	0.401	0.303	0.346	5.6322	0.375
	2	0.392	0.411	0.505	0.354	0.298		
	3	0.4	0.411	0.455	0.4202	0.138		
牛肉膏	1	0.392	0.379	0.44	0.376	0.335	5.572	0.371
	2	0.301	0.372	0.446	0.39	0.275		
	3	0.316	0.358	0.594	0.339	0.259		
蛋白胨	1	0.299	0.337	0.242	0.281	0.211	3.979	0.265
	2	0.318	0.311	0.271	0.211	0.19		
	3	0.283	0.302	0.28	0.237	0.206		
$T_{ij}$		5.175	5.347	5.838	4.8282	3.558		

$S\bar{y} = \sqrt{\frac{MSe}{n}} = \sqrt{\frac{0.0011}{12}} = \sqrt{0.000092} = 0.0096$ , 根据  $DF=60, K_A=6, \alpha=0.05$  时  $q_\alpha$  临界表,  $q_\alpha=(6, 60)=4.16, TFR_{0.05}=4.16 \times 0.0096=0.040$ 。

表 5 不同氮源对紫铜色松乳菇菌丝干重影响方差分析

变异来源	SS	DF	MS	F	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
A 因素	0.602	5	0.1204	109.45 * *	2.290	3.339
B 因素	0.167	4	0.0418	38.00 * *	2.525	3.649
A×B	0.122	20	0.0061	5.54 * *	1.700	2.115
误差	0.097	60	0.0011			
总计	0.988	89				

表 6 6 种氮源处理平均数间差异的 Tukey 固定极差法检验

配比浓度	平均数	α= 0.05
酵母膏	0.375	a
牛肉膏	0.371	ab
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.285	b
蛋白胨	0.265	bc
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.195	c
KNO <sub>3</sub>	0.157	cd

根据以上多重比较可知,添加酵母膏与牛肉膏对菌丝干重的影响差异不显著,对 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 和蛋白胨的差异显著; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 和蛋白胨之间的差异不显著,而对 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 KNO<sub>3</sub> 差异显著;而(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 KNO<sub>3</sub> 之间差异不显著。

3 结论

添加 KNO<sub>3</sub> 和牛肉膏菌丝生长速度最快;酵母膏、蛋白胨和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 次之; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 再次, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 最差。添加酵母膏与和牛肉膏菌丝的干重最重,

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 和蛋白胨次之, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 最差。添加 KNO<sub>3</sub> 氮源,虽然使菌丝生长最快,但菌丝很稀、薄,不浓密,干重最轻,所以不适宜紫铜色松乳菇的生长。添加牛肉膏氮源,不仅菌丝生长快,而且菌丝生长浓密,干重最重,所以较适宜紫铜色松乳菇的生长。根据生长速度和干重的综合分析浓度在 0.1%~0.5% 较为适宜。添加 6 种氮源,其中 3 种有机氮和 3 种无机氮对菌丝的生长速度和干重的影响的对比研究发现,有机氮源比无机氮源更适宜紫铜色松乳菇的生长。

参考文献

[ 1 ] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(1~5 册)[ M ]. 北京: 科学出版社, 1985.

[ 2 ] 李静, 马媛. 紫铜色松乳菇生态环境的调查[ J ]. 食用菌, 2008 30( 4): 16-17.

[ 3 ] 李静, 吴卫东. 紫铜色松乳菇栽培培养基配方筛选的研究[ J ]. 北方园艺 2009( 12), 233-235.

[ 4 ] 雄涛, 肖满. 松乳菇研究进展[ J ]. 食品与发酵工业, 2005 31( 5): 84-86.

[ 5 ] 潘高潮. 贵州野生松乳菇化学成分及产品开发研究[ J ]. 贵州科学 2001, 19( 3): 57-61.

[ 6 ] 冀宝营, 陈超. 野生松乳菇菌种分离的研究[ J ]. 微生物学杂志 2001, 21( 2): 56-57.

[ 7 ] 马琼, 黄建国, 高山, 等. 松乳菇菌种分离及栽培种制作[ J ]. 浙江农业科学 2005( 5): 351-353.

[ 8 ] 李文艺, 刘建成. 不同培养基对松乳菇菌丝生长的影响[ J ]. 食用菌 2004( 4): 10-11.

Effect of the Different Nitrogen Source on the Hyphal Growth of Purple Bronze *Lactarius deliciosus*

LI Jing<sup>1</sup>, MA Yuan<sup>1</sup>, XU Yan-jun<sup>2</sup>

(1. Qiannan Normal College for Nantionalities, Ethnological Biology Research Institute, Duyun, Guizhou 558000; 2. College of Agriculture, Guizhou University, Huaxi, Guizhou 550025)

**Abstract:** The influence for purple bronze *Lactarius deliciosus* the hypha's growth and dry matter weight was PDA culture medium with the different nitrogen source were studied. The growth speed of hypha was fast in PDA medium with KNO<sub>3</sub>. Analysis by synthesis, the hypha was not only with fast growing speed but the dense mass and dry matter weight on PDA medium with beef extract, it was more suitable for the growth of *Lactarius deliciosus* hypha, its concentration about 0.1%~0.5% was more suited for hypha's growth, PDA medium with organic nitrogen was more suitable for the growth of hypha than that with inorganic.

**Key words:** organic nitrogen; inorganic nitrogen; concentration gradient; variance analysis