

# 鲜艳乳菇母种培养基筛选试验

赵 辉, 李 彪, 徐建俊, 孙传齐, 马 洁, 卫其巍

(达州市农业科学研究院, 四川 达州 635000)

**摘 要:**以四川达州当地野生乳菇子实体为试材,采用分离、纯化方式,研究了不同配方对鲜艳乳菇菌丝生长的影响。结果表明:达州地区鲜艳乳菇菌丝生长最适配方是马铃薯 200 g、琼脂 18 g、酵母膏 4 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 20 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g、维生素  $\text{B}_1$  10 mg、松针水 1 000 mL,为达州地区鲜艳乳菇菌种扩繁及人工驯化栽培奠定了基础。

**关键词:**鲜艳乳菇;鉴定;筛选

**中图分类号:**S 646.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)11-0145-04

鲜艳乳菇(*Lactarius vividus* sp.)属担子菌门(Basidiomycota)伞菌纲(Agaricomycetes)红菇科(Russulaceae)乳菇属(*Lactarius*)<sup>[1]</sup>,在达州地区俗称“红松菌”。在世界各地均有分布,广泛分布于中国中部和华南地区。其子实体肉质鲜嫩,美味可口,营养丰富,是一种天然、无公害的珍贵野生食(药)用菌<sup>[1-2]</sup>。目前鲜艳乳菇市场贸易量大,但产量低且全依赖野生采收,导致其自然种群严重下降<sup>[3]</sup>。因此,实现鲜艳乳菇人工驯化栽培是菌物界的研究热点。

鲜艳乳菇是一种外生菌根真菌(ECM),是对松林生长有重要意义的外生菌根菌,主要与马尾松、华山松、黑松等松科植物根系共生并形成菌根,属共生性真菌<sup>[4-5]</sup>,由于鲜艳乳菇特殊的营养方式、生态条件及子实体分化所需条件,人工培养菌丝并利用菌丝取代子实体进行开发是驯化栽培的一条重要途径。该试验通过分离野生鲜艳乳菇子实体获得纯菌丝,并进行了鲜艳乳菇母种培养基筛选,旨在为鲜艳乳菇人工驯化栽培提供种质资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试鲜艳乳菇由达州市农业科学研究院采集的野生子实体分离纯化而来。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌丝分离、鉴定 子实体采集:选取新鲜乳菇子实体,用采样小刀将子实体带根(菌根)、土(子实体生境土壤)拔出,放在干燥报纸或牛皮纸上裹成糖果状带回实验室备用。子实体处理:选取菌柄结实未中空的新鲜子实体,用蒸馏水洗净菌盖及菌柄表面杂物,置于超净工作台上,放置 1~2 h,待菇体散失过多的水分,在无菌条件下用 75%酒精进行表面消毒。子实体分离与转接:在无菌条件下,取乳菇子实体菌柄内部绿豆大小菌肉组织于 PDA 斜面培养基 25℃ 恒温下暗室培养。纯化与鉴定:从 PDA 培养基中挑取菌龄为 5 d 乳菇菌丝在显微镜下观察其形态,利用改良 CTAB 法提取菌龄为 20 d 菌丝 DNA 后,采用引物对 ITS4:5'-TCCTCCGCTTAT-TGATATGC-3'; ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCG-TAACAAGG-3'扩增菌株的 ITS 保守序列,PCR 反应体系为:DNA 模板(50 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ ~1  $\mu\text{g}$ · $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,10×buffer 5  $\mu\text{L}$ ,dNTP mix 4  $\mu\text{L}$ ,Taq 酶 1 U (0.5  $\mu\text{L}$ ),ddH<sub>2</sub>O 38  $\mu\text{L}$ ,总体积 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,延伸 72℃ 1 min,补平 72℃ 5 min,共 30 个循环。产物纯化后进行测序鉴定是否为乳菇菌株。

1.2.2 母种培养基筛选 根据乳菇菌丝生长的营养需求,以 PDA 培养基为对照,设计 6 个不同培养

**第一作者简介:**赵辉(1991-),女,本科,助理农艺师,现主要从事食用菌栽培育种等研究工作。E-mail:1207927707@qq.com。

**责任作者:**李彪(1973-),男,高级农艺师,现主要从事食用菌育种与栽培技术推广等研究工作。E-mail:673918775@qq.com。

**基金项目:**国家现代农业产业技术体系四川省食用菌团队建设资助项目(川农业[2009]75号)。

**收稿日期:**2017-02-07

基配方。配方 1:玉米粉 30 g, 琼脂 18 g, 松针水(干松针 90 g 加水 1 000 mL 煮沸至橙黄色时过滤, 下同) 1 000 mL, 葡萄糖 20 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg。配方 2:玉米粉 30 g, 琼脂 18 g, 松木屑水(干松木屑 90 g 加水 1 000 mL 煮沸至黄色时过滤, 下同) 1 000 mL, 葡萄糖 20 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg。配方 3:马铃薯 200 g, 琼脂 18 g, 松木屑水 1 000 mL, 葡萄糖 20 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg。配方 4:马铃薯 200 g, 琼脂 18 g, 松针水 1 000 mL, 葡萄糖 20 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg。配方 5:马铃薯 200 g, 琼脂 18 g, 酵母膏 4 g, 蛋白胨 5 g, 松针水 1 000 mL, 葡萄糖 20 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg。配方 6:马铃薯 200 g, 琼脂 18 g, 牛肉膏 2 g, 蛋白胨 5 g, 松木屑水 1 000 mL, 葡萄糖 20 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, 维生素  $\text{B}_1$  10 mg。对照(CK):马铃薯 200 g, 琼脂 18 g, 葡萄糖 20 g, 水 1 000 mL。

1.2.3 菌丝培养特性比较试验 取菌龄一致、同等大小菌丝块接种于上述 7 个培养基斜面, 每类培养基接 10 支, 25 °C 恒温暗室培养, 观察并记录菌丝形态、长势及日均生长速度。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 软件对试验数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌丝显微结构

选取 CK 菌丝经复红染料染色后于显微镜下观察, 确定鲜艳乳菇菌丝为双核菌丝, 有横隔并具有锁状联合(图 1)。

### 2.2 DNA 测定结果

由图 2 可知, rDNA ITS 区段长度为 708 bp, 将测得的 ITS 序列(图 3)在 GenBank 序列库中进行 BLAST 对比, 找出与之相似性最大的序列, 下载相似序列的 ITS 区域, 用 DNAMAN 软件进行序列比对(Multiple alignments)后确定菌株为鲜艳乳菇(*Lactarius vividus* sp.)<sup>[1]</sup>。

### 2.3 不同配方菌丝形态及培养特性比较

由图 4 可知, 各配方鲜艳乳菇菌丝在萌发初期淡黄色, 粗壮似霜花状, 成熟后呈绒毛状, 老化后呈匍匐状且颜色加深, 配方 5 菌丝生长最浓密、颜色鲜艳。由表 1 可知, 配方 1、2 接种后菌丝萌发时间最短, 配方 1、5 菌丝长势好于其它配方, 配方 5 与配方 1、6 菌丝日

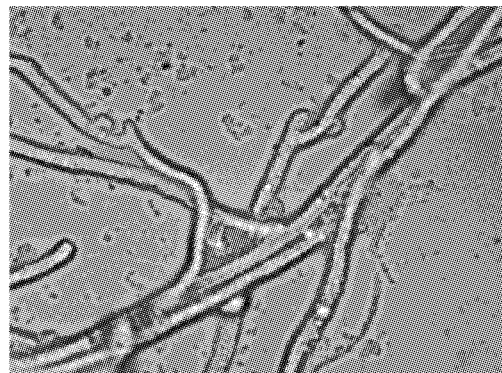
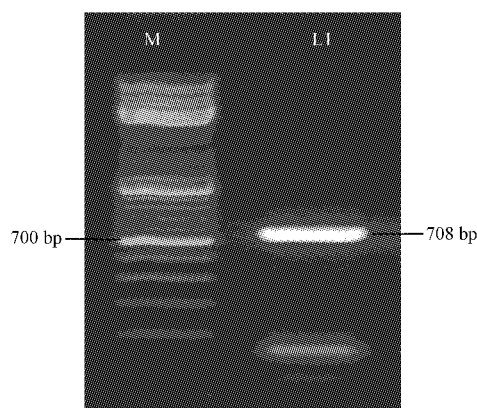


图 1 CK 菌丝显微结构

Fig. 1 Microstructure of mycelium of CK



注:泳道 M, 分子量标记; L1, 供试乳菇菌株。

Note: Lane M. Molecular weight marker; L1, *Lactarius* strains.

图 2 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig. 2 PCR of the electrophoresis pattern

GAAGGATCATTATCGTACAAAATGTGTGAGGCGTTGCGGGGCTGTCGCT  
GACTTTTAAATGCAAAAGTTGTGCACGCTGAGCGCTCTCTACATAAC  
ATCCATCTCACCCCTTTTGTGCACACCGCGTGGGACCCCTTTGGGATCGAA  
CCGATCCGGGAGGGGCTTGCCTTTTACACAAACCCCTTTAAAAAAG  
TGTAGAATGTCCCAATTTTGCATGACACGCAATCAATACAACCTTCAAC  
AACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGAT  
ACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC  
CTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAAGTGTGCGTGA  
ATCTCAACCTTCTCGGTTTCTTCTGACACTGAAGGAGGCTTGGACTTTG  
GAGGCTTTTGCTGGCACTCTCTCTTTTGTAGAGCCAGCTCTCTTAAATG  
AATTAGCGGGTCTCTTTGCGGATCTCTGACATGTGATAAGATGTTCC  
ATGACTTTGGTTTCTGGCTCTGTTCCTTTGGGACCTGCTCTAACCGTCTC  
AAACGAGACAACGGTTTGGGTGTGTCTCCCTCTCGGGGAACACTCTCA  
ACCCCACTGACCCTTGACCTCAAATCGGGTGTGAGACTACCCGCTGAACCTA  
AGCAT

图 3 菌株 ITS 序列

Fig. 3 ITS of the strains

均生长速度不显著, 显著高于其它配方, CK 菌丝日均生长速度最慢; 配方 1、5 气生菌丝少于其它配方, 菌种质量佳。通过各配方鲜艳乳菇菌丝形态及生长特性比较可知, 配方 5 为最佳鲜艳乳菇母种培养基配方。

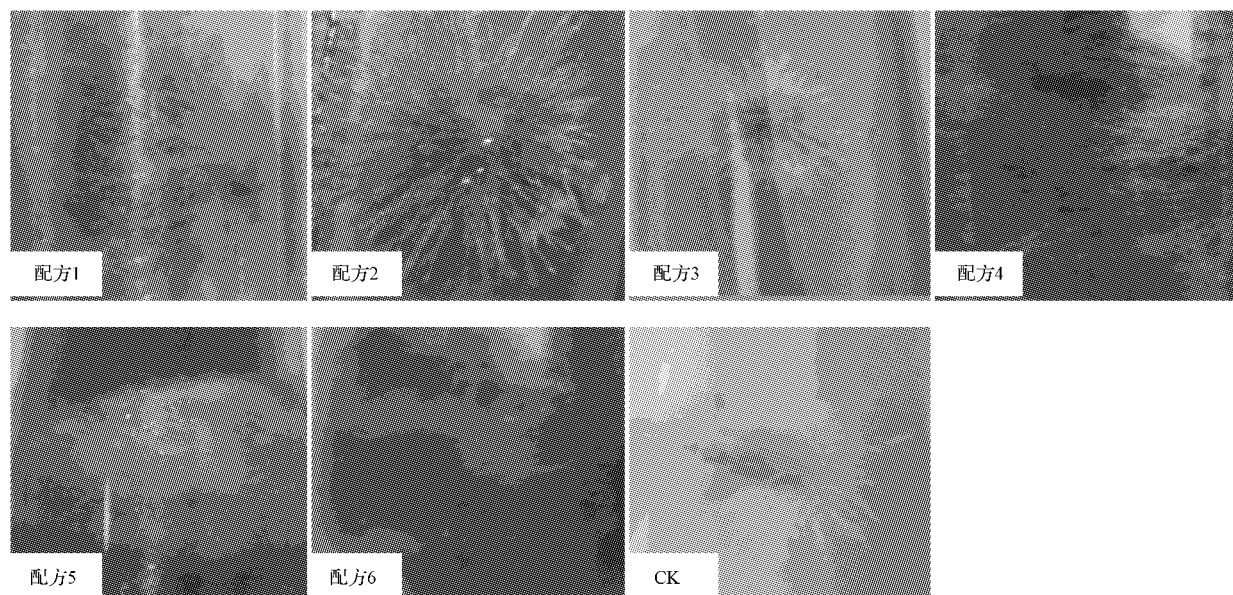


图4 各配方鲜艳乳菇菌丝形态

Fig. 4 Mycelium morphology of *Lactarius vividus* sp. in different medium

表 1

不同母种培养基菌丝特性比较

Table 1

Comparison of characteristics of different parent medium

配方 Formulation	菌丝长势 Mycelial growth	菌丝萌发时间 Mycelial germination time/d	生长速度 Growth rate/(mm·d <sup>-1</sup> )	气生菌丝 Aerial mycelial	菌丝颜色 Mycelial color
1	+++	3	3.93±0.06ab	少	黄色
2	++	3	3.79±0.05c	较旺盛	淡黄色
3	++	4	3.76±0.08c	较旺盛	淡黄色
4	++	5	3.86±0.05b	旺盛	橙黄色
5	+++	4	4.12±0.08a	少	橙色
6	++	5	4.04±0.10ab	旺盛	黄褐色
CK	+	5	3.42±0.09d	旺盛	黄色

注:数据为10次重复的平均值±标准误。不同小写字母表示  $P<0.05$  水平上差异显著。+++生长浓密,++生长密,++生长稀疏。

Note: The data are the mean±standard error of 10 replicates, and the different lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level. +++ denser, ++ dense, + sparsely.

### 3 结论

该试验首次成功分离并纯化培养出达州地区俗称“红松菌”的乳菇纯菌丝,测序后鉴定为鲜艳乳菇(*Lactarius vividus* sp.)。通过母种培养基筛选试验,对比不同配方鲜艳乳菇菌丝形态及生长特性,可知达州地区鲜艳乳菇最佳母种培养基配方为马铃薯200 g、琼脂18 g、酵母膏4 g、蛋白胨5 g、葡萄糖20 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g、维生素B<sub>1</sub> 10 mg、松针水1 000 mL。鲜艳乳菇母种培养基的筛选研究为今后鲜艳乳菇菌根苗培育、仿野生栽培、人工驯化栽培奠定了基础。

### 参考文献

- [1] WANG X H, NUYTINCK J, VERBEKEN A. *Lactarius vividus* sp. (Russulaceae), a widely distributed edible mushroom in central and southern China[J]. Journal of Phytotaxa, 2015, 231(1): 63.
- [2] 郭亮, 刘君昂, 周国英, 等. 中国南方地区松乳菇遗传多样性分析[J]. 菌物学报, 2011, 30(3): 385.
- [3] 吴连旺, 史宁, 陈路, 等. 松乳菇的菌丝培养及人工栽培研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(10): 233.
- [4] 栾庆书, 王琴, 赵瑞兴, 等. 外生菌根真菌研究方法[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2014.
- [5] 唐超, 陈应龙, 刘润进. 菌根食用菌研究进展[J]. 菌物学报, 2011, 30(3): 367-368.

DOI:10.11937/bfyy.201711030

## 菌草栽培猴头菌配方筛选

蔡杨星, 曹秀明, 薛志香, 林占熺

(福建农林大学 国家菌草工程技术研究中心, 福建 福州 350002)

**摘 要:**以 5 种菌草(巨菌草、象草、五节芒、芒萁、类芦)草粉为试材,采用三级系统筛选法对 5 种菌草草粉进行配方筛选优化,以期得到菌草栽培猴头菌的最佳配方。结果表明:5 种菌草草粉中,菌草栽培猴头菌菌丝体的最佳配方为 39% 芒萁、39% 类芦、20% 麸皮、2% 石膏,含水量为 60%。该配方猴头菌菌丝体生长速度快,达  $0.6549\text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ ;当栽培料中的菌草和木屑的混合比例为 28% : 50% 时,猴头菌子实体头茬的产量高,平均每袋产量为 269.24 g。

**关键词:**猴头菌;菌草草粉;配方筛选

**中图分类号:**S 646 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)11-0148-05

猴头菌(*Hericium erinaceus* (Bull.) Pers)属猴头菌科猴头菌属,别名猴头、猴头菇、刺猬菌等,肉鲜美,香醇可口,营养丰富,素有“山珍猴头,海味燕窝”的美称<sup>[1]</sup>。猴头菌的人工栽培比较晚,20 世纪 60 年代前以野外采食为主,1959 年我国开始人工驯化猴头菌并获得成功,1979 年后我国开始对猴头菌进行规模栽培,传统栽培主要是使用木屑作为代料。

**第一作者简介:**蔡杨星(1985-),男,硕士,助理实验师,现主要从事菌草技术应用与推广的辅助教学和科研等工作。E-mail:ccx5835963@163.com.

**责任作者:**林占熺(1943-),男,研究员,博士生导师,菌草技术发明人,首席科学家,现主要从事菌草技术研究与应用及菌草产业发展的教学与科研等工作。E-mail:lxjuncao@163.com.

**基金项目:**福建省农业生物资源保藏资助项目(FJZZZY-1536)。

**收稿日期:**2017-02-14

冯改静等<sup>[2]</sup>研究了 7 种不同碳氮比栽培料对猴头菌菌丝和子实体生长发育及品质的影响。结果表明当培养料碳氮比达到 38 : 1 时,猴头菌的生物学转化率达最高峰。李青松等<sup>[3]</sup>研究发现香蕉茎叶代替部分棉子壳栽培猴头菌是可行的,并且对猴头菌菌丝生长和出菇产量影响均达到极显著水平。张建丽等<sup>[4]</sup>研究表明,玉米芯比例为 55%~65% 时猴头菌具有发菌快、菌丝长势好,子实体产量、品质和生物学转化率高的特点。孙英华等<sup>[5]</sup>研究表明,栽培种以木屑为主要基质物时,虽然猴头菌色泽洁白、块球大、坚实,首潮子实体生物效率高达 38.3%~47.4%,但味道欠佳,有浓烈的木屑味,且较易腐烂。当以甘蔗渣为主要基质物并加入适量的玉米粉和风尾菇下脚料时,虽生物效率略低,但色泽洁白,球块也大,味道鲜美,清香可口。

随着食用菌产业的发展,传统菌业生产与林业

### Medium Screening Test for *Lactarius vividus* sp.

ZHAO Hui, LI Biao, XU Jianjun, SUN Chuanqi, MA Jie, WEI Qiwei  
(Dazhou Academy of Agricultural Sciences, Dazhou, Sichuan 635000)

**Abstract:** *Lactarius vividus* sp. mycelium was obtained by separation and purification from wild *Lactarius* fruiting bodies of Dazhou. The effects of different medium on the growth of mycelial of *Lactarius vividus* were studied. The results showed that the most media component was potato 200 g, agar 18 g, yeast extract 4 g, peptone 5 g, glucose 20 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g, vitamin B<sub>1</sub> 10 mg, pine needles 1 000 mL, this study laid the foundation for propagation and artificial domestication cultivation of *Lactarius vividus* in Dazhou.

**Keywords:** *Lactarius vividus*; identification; selection