

松乳菇菌丝体固体平板培养的研究

Study on fruit body of *Lactarius deliciosus* upon solid culture medium

李忠海 敖常伟 钟海雁

LI Zhong-hai AO Changwei ZHONG Hai-yan

(中南林业科技大学绿色食品研究所, 湖南 长沙 410004)

(Green Food Institute, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:由松乳菇子实体经组织分离得到纯化菌丝体,对其在固体平板培养基上进行培养,结果表明:松乳菇菌丝体生长的适宜条件是 PDA 培养基、温度 28℃、培养基 pH5、无光照培养。研究发现添加马尾松不同组织的提取液对菌丝生长无明显影响。

关键词:食用菌;松乳菇;子实体;组织分离;固体培养

Abstract: Purified mycelium was obtained from the fruit body of *Lactarius deliciosus* through tissue separating. Conditions for *L. deliciosus* on solid culture medium were studied. It was found that *L. deliciosus* grew very well on PDA medium of pH 5 at 28℃ without light. The addition of the extracts from different pine tissues had no significant effect on the growth of *L. deliciosus*.

Keywords: Edible fungi; Fruit body of *L. deliciosus*; Solid culture; Tissue separating

松乳菇 [*Lactarius deliciosus*], 其肉质鲜美, 营养丰富, 具有清爽愉快的香气和甜味^[1,2]。松乳菇通常与马尾松共生繁殖, 在其他种类松, 如国外松等未见其生长。其菌丝体、子实体大量繁殖季节处于春秋两季, 产量受湿度、温度和雨量等因素影响, 故产量不稳定^[3]。因为松乳菇生长习性的复杂性, 当前人工栽培未能成功。为了使这味道鲜美, 营养丰富的珍贵食药兼用的真菌规模化生产, 刘建成^[4]初步研究了松乳菇深层发酵的条件, 筛选出以马铃薯为主料的培养液, 能获得较高产量的松乳菇菌球。Fernando 等^[5]分析松乳菇菌丝体生长习性, 探讨了液体发酵的条件。周国英等^[6]研究了松乳菇深层培养所需的碳源、氮源、矿质元素和维生素等营养因子, 以及发酵的温度和 pH 值。李文艺^[7]也探讨了不同培养基对松乳菇菌丝生长的影响。

由于采用液体培养基培养时, 多次取样测定菌丝生长量容易导致发酵液的杂菌感染, 也会导致菌丝生长的不稳定

性。故在培养条件的前期筛选中, 采用固体平板培养基培养, 通过测量菌落圈直径来量化菌丝生长状况。

1 材料与方法

1.1 材料

松乳菇子实体: 购置于株洲市农贸市场;

BHC - 1300A/B 型生物安全柜 (洁净度等级 100 级): 江苏安泰空气技术有限公司;

MIQ259 - 1 型台式快速压力蒸汽灭菌器: 上海医疗设备厂;

SB - CJ - 2B 标准型净化工作台: 江苏安泰空气技术有限公司;

HPG - 280B 型光照培养箱: 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司制造;

LRH - 250 型生化培养箱: 广东省医疗器械厂。

1.2 培养基

文献报道 [4] 的几类真菌常用培养基:

配方 1: PDA 培养基, 马铃薯 200 g (去皮, 切片, 煮沸 20 min, 用 4 层纱布过滤, 取滤液), 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

配方 2: 蛋白胨 3 g, 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL。

配方 3: 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL。

配方 4: 蔗糖 20 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL。

配方 5: 酵母粉 10 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.3 方法

1.3.1 组织分离与菌种制备 取经消毒后的松乳菇子实体于生物安全柜中在无菌条件下用组织分离刀分离菌盖与菌柄交界处组织, 置于斜面或平板 PDA 培养基中, 轻压使其陷入培养基内, 于 25~28℃ 培养 10 d 直至组织表面长出白色

作者简介: 李忠海 (1954 -), 男, 中南林业科技大学绿色食品研究所教授、博导。E-mail: lizh11@163.com

收稿日期: 2006 - 04 - 15

绒毛状菌丝,如有染菌的组织块则去除染菌的组织,经固体培养基多次分离与转接即得纯菌种。

1.3.2 松乳菇菌丝生长量的测定 取长势良好的松乳菇菌丝按统一量接种于直径 70 mm 培养皿(培养皿内已倒入经融化灭菌的培养基,并冷却到室温)。按规定要求接种进行培养,于不同培养时间测定菌丝菌落圈直径,以此直径的大小作为菌丝的生长量评价指标。

2 结果与分析

2.1 不同培养基的比较试验

为了探讨 1.2 中确定的 5 种培养基对松乳菇菌丝生长的影响。以液体培养基培养的菌球为种源,接种时菌球直径 2 mm,每一培养基设 3 个重复,培养温度 28℃。于固体平板培养基中分别培养 10、13、15 d 后测其菌落圈的生长直径,取其平均值,结果见图 1。由图 1 可以看出,以配方 1 能较好地促进松乳菇菌丝的生长,当培养 15 d 后测得的菌落圈直径最大(25.5 mm),菌丝在后期(>10 d)具有较快的生长速度。配方 3 前期能使菌丝生长较快,后期(>10 d)的生长较为缓慢。据分析其可能原因是配方 1 中的马铃薯可提供充足的维生素类,能满足菌丝体持续的旺盛生长,配方 3 中无外源维生素,导致菌丝在后期因维生素的缺乏而生长缓慢。以配方 5 的培养基对菌丝的生长最为不利。通过配方 2 与配方 3 的菌丝生长状况相比较发现,配方 2 中存在的蛋白胍明显抑制松乳菇菌丝的生长,其原因有待进一步的探讨。配方 5 与配方 1 相比,马铃薯比酵母粉更能促进松乳菇菌丝的生长,据分析这可能与马铃薯中可提供丰富的维生素和糖类有关。

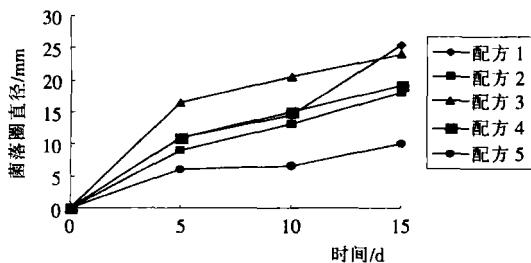


图 1 不同培养基组成对菌丝生长量的影响

2.2 不同培养温度对菌丝生长的比较研究

以 PDA 为培养基,每皿培养基接种 1 ×1 菌丝块,分别置于 20、25、28、30、32℃ 的温度,每一温度重复 3 次,分别培养 5、10、15 d 后测得培养皿内菌落圈的直径,取平均值。其结果见图 2。

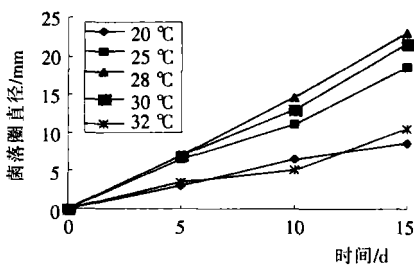


图 2 培养温度对菌丝生长量的影响

由图 2 可知,松乳菇菌丝生长的最适宜温度是 28℃,在该温度下,菌丝的生长速度最快(15 d,直径 23 mm)。25 或 30℃ 的培养温度菌丝长势稍差,低于 20℃ 或高于 32℃ 的培养温度则明显对菌丝生长不利。这与松乳菇易于生长在春夏之交季节及秋季的生长习性相符。据报道^[8,9],灵芝菌丝生长的最适温度是 28 ±1℃。香菇菌丝生长的适宜温度是 25℃。灰树花菌丝适宜于 25℃ 下生长。可见,松乳菇菌丝的生长温度与其它真菌相似。

2.3 不同 pH 对菌丝生长的影响

以 PDA 为培养基,用 0.5 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节培养基 pH 分别为: pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、pH 8,不同 pH 设 3 个重复,每培养皿分别接种 7 ×7 的菌丝块,于 28℃ 温度下分别培养 5、10、15 d 后测菌落圈直径,取其平均值。其结果见图 3。图 3 表明,当培养基 pH 为 4、5、6 时,松乳菇菌丝都具有较好的生长趋势,且以 pH 5 时菌丝生长最快,培养 15 d 后的菌丝生长直径达到 42 mm。当培养基 pH 值大于 7 时则菌丝不易生长,松乳菇菌丝在 pH 8 以上的培养基上则完全不能生长。野生松乳菇的生长环境一般处于马尾松林下的红壤酸性土中,该土质的 pH 一般在 6 以下,pH 5 的生长环境符合松乳菇菌丝的生长习性。Fernando 等^[5]也报道,在 MMN 培养基上,松乳菇菌丝适宜的 pH 是 5.5。

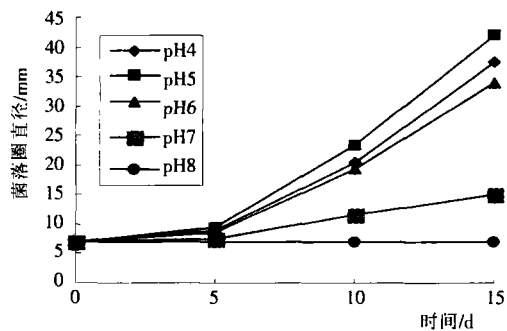


图 3 不同 pH 对菌丝生长量的影响

2.4 不同光照强度对菌丝生长的影响

以 PDA 为培养基,调节 pH 为 5,置于光照培养箱中,接种 7 ×7 菌丝块,以不同光照强度照射,于 28℃ 培养,分别于 5、10、15 d 后测菌落圈直径,其结果见图 4。

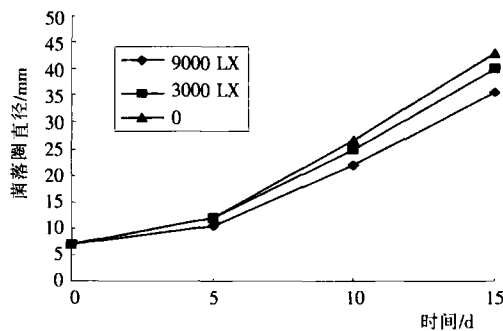


图 4 不同光照强度对菌丝生长的影响

图 4 表明,松乳菇菌丝在不同光照条件下均可生长,光照对菌丝的生长影响不甚明显,但菌丝在黑暗环境(光强度:0 LX)中的生长状态比在光照环境(光强度:3000~9000 LX)中长势要好。其菌落圈直径分别是 43, 35.5 mm (培养 15 d 测定结果)。这与松乳菇的生长环境一般处在阴暗的马尾松林下有关。可以认为松乳菇菌丝的生长适宜于黑暗的环境。

2.5 松针、干枝、腐松针、腐质土提取液对菌丝生长的影响

因松乳菇为生长在马尾松下的共生菌,马尾松的某些组分可能会对松乳菇菌丝的生长产生影响,故分别选取马尾松的鲜松针、干松针、落于地表的腐针、地表下面的腐质土、干枝条各 10 g,捣碎后加 200 mL 蒸馏水浸泡 10 h 后再打浆,过滤。分别取上述滤液 5 mL 于 25 mL PDA 培养基中,调 pH 至 5,并灭菌。取以上不同培养基,以 PDA 培养基作对照,接种 7×7 菌丝块,于 28℃ 培养,各设 3 个重复,分别于 5, 10, 15 d 后测菌落圈直径,取平均值,结果见图 5。

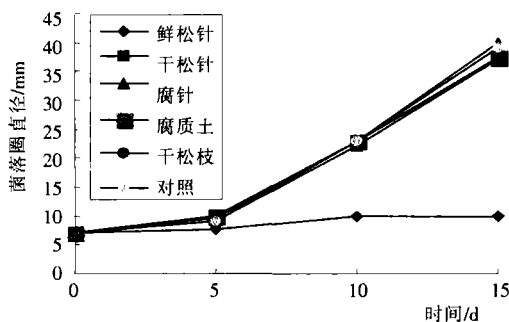


图 5 不同松针提取物对菌丝生长量的影响

由图 5 可见:干松针、干枝、腐松针、腐质土提取液对松乳菇菌丝的生长无明显的促进作用,而鲜松针对菌丝的生长有明显的抑制作用。但野生松乳菇在马尾松林下的土壤环境中却能迅速生长,3~5 d 可产生大量子实体。添加的提取物没有达到应有的促进作用,推测其原因如下:促进因子没有被提取出,或添加于培养基中的促进因子在高温杀菌时被破坏,这有待于今后进一步的探索。鲜松针的提取液对菌丝的生长有明显的抑制作用,这可能与鲜松针中存在较多的挥发性物质有关,据肖靖萍、任宇红^[11]报道松针提取物的抑菌作用确实存在。

3 结论

以野生松乳菇子实体为材料经组织分离可得到纯化的菌丝体。影响松乳菇在固体平板培养基上生长的因素有培养基组成、培养温度、培养基 pH、环境的光照强度等。

比较松乳菇菌丝体在 20~32℃ 的温度范围的生长状态,结果表明菌丝体在 28℃ 生长最快,培养 15 d,菌落圈直径达到 23 mm,温度低于 20℃ 或高于 32℃ 菌丝生长缓慢,15 d 仅为 8~9 mm。

采用常用的几类真菌培养基进行松乳菇菌丝的培养,比较发现菌丝体在以配方 1 确定的 PDA 培养基上长势最好(15 d,菌落圈直径 27 mm),结果也表明蛋白胨明显抑制菌丝体的生长,酵母粉不利于菌丝的生长,而葡萄糖比蔗糖更适宜于菌丝体的培养。

在 pH 4~8 的范围内松乳菇菌丝表现不同的生长趋势。以 pH 5 时菌丝生长最快(15 d,菌落圈直径 42 mm),pH 高于 7 时菌丝生长受阻。结果也表明菌丝在黑暗环境中的生长状态比在光照环境中长势要好。

松乳菇作为马尾松林下的一种菌根菌,马尾松的某些成分可能对其生长有促进作用,然而研究结果发现提取的马尾松不同组分(鲜松针、干松针、腐松针、林下腐质土)并未起到预期的促进菌丝生长的作用。其原因有待进一步的探讨。

参考文献

- 1 杨明毅,徐虹. 松乳菇的研究与开发[J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 29~30.
- 2 周庆珍,潘高潮,龙梅立,等. 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): 56~60.
- 3 刘建成,杜娟. 湘西北松乳菇的分布及生态研究[J]. 中国食用菌, 1999, 18(1): 22~23.
- 4 刘建成. 松乳菇深层发酵试验初探[J]. 中国食用菌, 1997, 17(2): 38~41.
- 5 Fernando sanchez, Mario honrubia & Pilar torres. Effects of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests[J]. Cryptogamie, Mycol, 2001, 22(4): 243~258.
- 6 周国英,李倩茹,刘君昂. 松乳菇菌丝深层培养营养因子及发酵条件研究[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(2): 246~249.
- 7 李文艺,李建成. 不同培养基对松乳菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌, 2004(4): 10~11.
- 8 宋淑敏. 深层发酵灵芝生物工程技术及产品开发[J]. 食品科学, 1999(22): 41~44.
- 9 裘娟萍,孙培龙,朱家荣,等. 灰树花深层发酵工艺条件的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(3): 33~35.
- 10 肖靖萍,任宇红. 松针抑菌作用的研究[J]. 食品科学, 1994(2): 21~23.

(上接第 10 页)

- 9 赖凤英,陈焕章,林福兰. 离子交换树脂对糖浆脱色效能的评价[J]. 中国甜菜糖业, 2000(6): 12~14.
- 10 钱庭宝. 离子交换剂应用技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1984, 77~88.
- 11 李振华,皮洪琼,等. 强酸和弱酸阳离子交换树脂与盐酸维拉帕米的静态交换反应特性研究[J]. 离子交换与吸附, 2001, 17(1): 38~45.
- 12 Irwin H. Suffet, Lewis Brenner, James T. Coyle, and Patrick R. Cain. Evaluation of the capability of granular activated carbon and XAD-2 resin to remove trace organics from treated drinking water[J]. Environ Sci Technol, 1978, 12(12): 1315~1322.
- 13 M. Dutta, N. N. Dutta and K G Bhattacharya. Aqueous phase adsorption of certain beta-lactam antibiotics onto polymeric resins and activated carbon[J]. Sep. Purif Technol, 1999(16): 213~224.
- 14 C. W. Cheung, J. F. Porter and G. McKay. Sorption kinetics for the removal of copper and zinc from effluents using bone char[J]. Sep. Purif Technol, 2000(19): 55~64.