

## 盆栽条件下暗褐网柄牛肝菌人工菌塘 及其子实体的培养\*

纪开萍, 张春霞, 曾雁, 刘昌芬, 何明霞, 王文兵

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

摘要: 在土壤中添加促进暗褐网柄牛肝菌 (*Phlebopus portentosus*) 菌丝及其宿主咖啡生长的营养液, 用暗褐网柄牛肝菌纯培养种接种盆栽条件下的咖啡苗根系, 结果表明: 92.5% 以上的小粒咖啡 (*Coffea arabica*) 苗形成菌根, 菌根上外延菌丝向根尖、侧根及根系周围的土壤延伸生长, 与土粒相互交结形成菌塘。接种 20 天后, 菌塘中子实体紧贴咖啡苗茎基或于咖啡苗株间生长, 共生长 162 个子实体, 发育成熟 52 个。子实体菌柄基部菌索与咖啡苗主根表面菌套连接。

关键词: 暗褐网柄牛肝菌; 营养液; 人工菌塘; 成熟子实体

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2007) 05-554-05

## Artificial Fungal Colony and Its Fruiting of *Phlebopus portentosus* (Boletaceae) in Pot

Ji Kai-Ping, ZHANG Chun-Xia, ZENG Yan, LIU Chang-Fen,  
HE Ming-Xia, WANG Weng-Bing

(Yunnan Tropical Crops Research Institute, Jinghong 666100, China)

**Abstract:** Nutrient solution was added into soil to improve the growth of hyphae and its host seedlings (*Coffea arabica*). Pure culture of *Phlebopus portentosus* was inoculated in the roots of the host seedling. Results showed that over 92.5% of seedlings were found with mycorrhiza. External hyphae develop to the top or side of the roots, and even in the soil around roots. Fungal colonies (shiros) were ultimately formed. It was found that young fruit bodies appeared around or among the host seedlings after inoculation of 20 days. 52 of 162 young fruit bodies grew into mature in pots.

**Key words:** *Phlebopus portentosus*; Nutrient solution; Artificial fungal colony; Mature fruiting

暗褐网柄牛肝菌 [*Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn (Pegler, 1986)], 又名异样脉柄牛肝菌 (宋斌, 2004), 见于亚洲及非洲热带, 国内广西、海南有分布 (臧穆, 2006), 也见于西双版纳景洪 (纪开萍, 2006), 是一种菌根型食用菌。

菌根食用菌人工诱导栽培存在下列困难: 菌种纯培养生长速度极其缓慢, 菌丝体难以迅速扩增。如华美牛肝菌 (*Boletus speciosus* Frost), 其

组织培养获得的纯菌丝生长速度很慢, 菌丝日生长量仅 0.2 mm (吴金荣, 2002); 人工菌根化小苗移栽后, 菌丝体在培养基质中生长缓慢, 难以形成菌落或人工菌塘。如松口蘑 [*Tricholoma matsutake* (S. Ito et S. Imai) Singer], 其菌丝体在宿主植物体内形成哈蒂网后仍难于在菌根周围形成大量菌丝体, 菌根小苗移栽出现菌丝生长退化, 并且有的菌根仅能存活 4 个月左右 (Yamada 等, 2001)。菌根上有限生长的外延菌丝无法形

\* 基金项目: 云南省科技厅预研项目资助

收稿日期: 2007-01-09, 2007-04-04 接受发表

作者简介: 纪开萍 (1966-) 女, 云南临沧人, 助理研究员, 主要从事外生菌根食用菌及食用菌栽培研究。

成天然条件下松口蘑子实体形成的场所 - 菌塘，因而也就无法继续进行子实体的诱导试验（伦志明等，2005）；菌丝体形成子实体原基以及由原基发育成子实体的机理并不清楚。

纪开萍等（2006）报道，暗褐网柄牛肝菌其菌丝生长速度快，添加促进菌丝生长的营养液后，菌丝生长健壮、致密，与培养基质紧密结合形成团块状结构。但培养土中添加营养液形成的菌根苗，子实体收获后菌根上菌膜、菌索枯萎，菌根苗枯萎死亡。本文筛选了适宜宿主树咖啡苗生长的营养液浓度，并将暗褐网柄牛肝菌纯培养固体种接种在小粒咖啡（*Coffea arabica* L.）苗的根系上，盆栽条件下成功培养了暗褐网柄牛肝菌人工菌塘及成熟子实体，为菌根食用菌人工培养奠定了基础并探索出新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

- 1.1.1 供试菌株、营养液 人工分离野生暗褐网柄牛肝菌子实体纯培养 01 菌株，营养液、。
- 1.1.2 供试土壤 晒干的红壤。
- 1.1.3 供试宿主苗 咖啡沙床催芽苗。
- 1.1.4 供试培养盆 口径 30 cm 的花盆。
- 1.1.5 人工培养的子实体凭证标本放在中国科学院昆明植物研究所真菌标本室，编号为 HKAS 49706。

### 1.2 方法

- 1.2.1 菌种扩培 母种扩培成液体种（菌龄 10 d），液体种扩培成固体种（菌龄 40 d）。
- 1.2.2 适宜咖啡苗生长的营养液浓度的筛选 0.02%、0.04%、0.1% 的营养液及 5.0%、10.0%、15.0% 的营养液均匀喷洒在红壤中并混合均匀，对照喷水。用花盆装土壤，10.0 kg（干土计）/盆，移栽苗龄 5 个月的咖啡苗，15 株/盆，每处理 3 个重复，淋水管理。栽苗后 60 d 测苗高、地径，称茎叶及根的鲜重、干重。筛选出适宜咖啡苗生长的营养液浓度。
- 1.2.3 适宜菌根率形成及子实体生长的营养液浓度的筛选 土壤中营养液添加同“1.2.2”，以添加清水为对照。用花盆装土壤，10.0 kg（干土计）/盆，移栽苗龄 18 个月的咖啡苗，10 株/盆，4 次重复。栽苗时接种暗褐网柄牛肝菌 B-01-1 固体原种（对照同样接种），50 g/株，然后淋定根水。培养盆置于塑料棚 + 遮荫网的荫棚中，使菌种萌发生长、侵染宿主形成菌根及菌塘。
- 1.2.4 菌根率、菌塘形成及子实体生长观测 接种后观察子实体生长情况，子实体生长中期或成熟时观测菌根

率及菌塘形成情况。

- 1.2.4.1 子实体生长观测 接种 20 d 后，每天观察记录培养盆中子实体生长的个数、分化出土至成熟的时间（以产孢散射孢子为成熟标准）、成熟的个数，并标记生长子实体的咖啡菌根苗。子实体成熟时采收称重。
- 1.2.4.2 菌塘观测 子实体中等成熟时，观测咖啡菌根苗上菌丝、菌索、菌套的形成情况，菌丝、菌索在土壤中生长、分布及与菌柄基部相连的情况。
- 1.2.4.3 菌根苗、菌根率观测 子实体生长中期或成熟采收后，用头部稍尖的木棍扒开盆中咖啡苗茎基 0.2 ~ 2.5 cm 深的土层，若咖啡苗的茎基或主根上生长菌膜、菌索，说明形成菌根苗。菌根率：接种咖啡苗中菌根苗的百分率。
- 1.2.5 统计分析 利用分析软件 SPSS 11.5，Duncan 氏单因素方差分析（显著水平 0.05、0.01）检验营养液对菌丝日平均生长量、咖啡苗生长量及对子实体生长的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 适宜宿主咖啡苗生长的营养液浓度

营养液、有促进宿主咖啡苗生长的作用。土壤中添加 0.02% 的营养液及 5.0% 的营养液，咖啡苗的根鲜重、茎叶干重、根干重极显著高于对照（表 1）。

### 2.2 菌根苗形成及营养液对菌根率形成的影响

接种 30 d，菌根苗茎基部及主根部被深黄色菌索、菌膜包裹形成菌套，菌套表面粘附土粒，对照（不接种）咖啡苗根系表面无菌膜、菌索（图 1：1 ~ 2）。菌根苗的茎基部及主根部上菌膜、菌索浓密，侧根及根尖上无菌丝或菌丝稀疏。土壤中添加 0.02% ~ 0.2% 营养液，菌根率 92.5% ~ 100.0%；添加 5.0% ~ 10.0% 营养液，菌根率 97.5% ~ 100.0%；对照菌根率 100.0%；三者的菌根率无显著差异（表 2）。

### 2.3 菌塘形成情况

子实体紧贴菌根苗的茎基生长，子实体菌柄基部菌索与菌根上菌索相连接（图 1：3）。咖啡菌根苗周围 0.2 ~ 2.0 cm 深的表层土下，即分布有菌索。菌索自菌根苗的茎基及主根上的菌套延伸生长于土壤中，树状分枝，网状结构，粗 0.24 ~ 2.5 mm，与土粒相互交结形成菌塘（图 1：4），菌根苗位于菌塘中心。菌索旺盛生长与土壤交结形成 0.2 ~ 0.3 cm 厚的“菌块”，菌块上可生

长多个子实体(图1:5)。菌塘中菌索的一端与菌根苗上菌套相连,另一端与子实体菌柄基部相连(图1:6)。

#### 2.4 子实体生长情况

子实体紧贴咖啡苗茎基部生长或位于菌塘中的“菌块”上,多为单生(图1:7~9)。从接种至出菇需20~30 d。从出菇至成熟需5~6 d(图1:10~12)。除添加0.02%营养液出菇仅

2盆外,其余均出菇3~4盆(表3)。

#### 2.5 营养液对子实体生长的影响

土壤中添加0.04%、0.2%的营养液及5.0%、10.0%营养液,子实体生长数、成熟数均高于不添加营养液的对照(表3),但因各重复的子实体生长数、成熟数差异大,因此差异检验不显著。土壤中添加5.0%的营养液,子实体总重及单重均显著高于其它处理(表4)。



图1 1.菌根表面菌索;2.菌根与不接种的苗的根系;3.菌索连接子实体及菌根;4.菌塘中菌索;5.菌塘中菌块连接菌根苗及子实体;6.菌塘中菌索连接菌根苗及子实体;7~9.子实体出菇状;10.出菇第2天;11.出菇第4天;12.出菇第5天  
Fig.1 1. shoestring on mycorrhizal; 2. mycorrhizal and seedling root without inoculation; 3. fruiting was connected by shoestring and mycorrhizal; 4. shoestring in shiro; 5. mycelium was connected with mycorrhizal seedling and fruiting in shiro; 6. shoestring was connected with mycorrhizal seedling and fruiting in shiro; 7-9. fruit body grow up; 10. Mushroom on the second day; 11. On the fourth day; 12. On the fifth day

表 1 土壤中添加营养液、后咖啡苗各项生长量差异显著性分析

Table 1 Analysis of growth of coffee seedlings in soil with nutrient solution、 for their significant difference

营养液 Nutrient solution		株高	地径	茎叶鲜重	茎叶干重	根鲜重	根干重
编号	使用浓度	Height	Diameter	Fresh weight of	Dry weight of	Weight of	Dry weight of
Number	Solution (%)	(cm)	(cm)	leave (g)	leave (g)	root (g)	root (g)
CK	0.1	6.46 a	4.83 a	11.7 b	3.3 b	5.5 b	1.5 b
	0.0	6.61 a	5.02 a	13.0 b	3.4 b	5.6 b	1.8 b
	0.04	6.94 a	4.29 a	13.0 b	3.8 b	6.3 c	1.93 c
	10.0	6.94 a	5.53 a	14.6 b	3.7 b	7.5 d	2.0 c
	15.0	7.18 a	5.56 a	16.3 b	4.2 bc	7.5 d	2.13 c
	5.0	7.58 a	5.87 a	17.3 b	4.8 c	8.2 de	2.6 c
	0.02	7.79 a	5.87 a	22.6 c	6.2 d	8.5 e	3.6 f

以上数据，株高、地径来自 45 株苗的平均值；茎叶鲜重、根鲜重、茎叶干重、根干重来自 3 个重复的平均值。不同字母表示处理间有极显著差异（单因素方差分析，Duncan 方法， $P < 0.01$ ）。

Among the datas above, height and diameter averaged from 45 seedlings; fresh weight of leave/root, dry weight of leave/root averaged from 3 replicates. Different letters indicate significant difference under treatments assessed by Duncan s single range test ( $P < 0.01$ ).

表 2 土壤中添加营养液后咖啡苗菌根率

Table 2 Mycorrhizal ratio of host seedling with nutrient solution in soil

观测指标 Test index	营养液				营养液		CK
	Nutrient solution (%)				Nutrient solution (%)		
	0.1	0.04	0.2	0.02	5.0	10.0	
菌根率 Mycorrhizal ratio (%)	92.5 a	97.5 a	100.0 a	100.0 a	97.5 a	100.0 a	100.0 a

以上数据来自 4 个重复的平均值，同一字母表示处理间差异不显著（单因素方差分析，Duncan 方法， $P < 0.05$ ）。Data averaged from 4 replicates, different letters indicate significant difference under treatments assessed by Duncan s single range test ( $P < 0.05$ ).

表 3 子实体生长情况

Table 3 Survey on growth of fruiting body

观测指标 Test Index	土壤中营养液含量 Nutrient solution in soil (v/v, %)						CK	合计
	Nutrient solution in soil (v/v, %)							
	0.02	0.04	0.1	0.2	5.0	10.0		
接种盆数 Inoculated pot (个)	4	4	4	4	4	4	4	28
生长盆数 Growth number (个)	2	4	3	3	4	4	4	24
生长个数 Fruiting number (个)	13.0	37.0	8.0	43.0	22.0	25.0	14.0	162
成熟数 Mature number (个)	7.0	7.0	6.0	7.0	11.0	10.0	4.0	52
成熟率 Ratio of mature fruiting (%)	53.8	18.9	75.0	16.2	50.0	40.0	28.5	

表 4 营养液对子实体生长影响的差异检验

Table 4 To check the effect of nutrient solution on growth of fruiting

营养液 Nutrient solution		子实体 Fruiting			
编号	使用浓度	生长数	成熟数	总重	平均单重
Number	Solution (%)	Growth number (个)	Mature number (个)	Total weight (g)	Average weight (g)
	0.02	3.25 a	1.75 a	36.25 a	10.20 a
	0.2	10.75 a	2.0 a	45.0 a	17.5 a
	0.04	9.25 a	1.75 a	41.25 a	24.5 ab
	0.1	2.0 a	1.5 a	35.0 a	34.57 ab
	CK	3.5 a	1.0 a	51.25 a	42.5 ab
	10.0	6.25 a	2.5 a	62.5 a	27.5 ab
	5.0	5.0 a	2.75 a	126.25 b	53.75 b

以上数据来自 4 个重复的平均值，不同字母表示处理间有极显著差异（单因素方差分析，Duncan 方法， $P < 0.05$ ）。

Data averaged from 4 replicates, different letters indicate significant difference under treatments assessed by Duncan s single range test ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

3.1 5.0%的营养液 及 0.02%的营养液 促进咖啡苗的生长, 对子实体生长有增重作用。其原因可能是添加的营养物质能被咖啡苗的根系及菌塘中菌丝吸收利用。但土壤中添加营养液后, 咖啡苗的菌根率、子实体生长个数、子实体成熟数与不添加营养液的对照无差异。说明在纯培养土中, 菌丝也可以侵染形成菌根、菌塘并分化、生长子实体, 营养液的添加只是促进了子实体生长, 使之增加重量。

3.2 在外生菌根的形成中, 菌丝发生侵染时, 菌丝体在其分泌的纤维素酶、果胶酶、淀粉酶及其他糖酶等水解的作用下, 由侵染点通过根尖及根毛区进入到皮层细胞间隙进行生长繁殖, 同时分布于根表皮层外表面的菌丝体繁殖成真菌套将根尖包裹, 完成真菌对根的侵染形成菌根 (王琴, 2002)。而暗褐网柄牛肝菌接种咖啡苗形成的菌根, 接种 30 d 形成的菌根苗, 其根尖及侧根无菌膜、菌索生长或生长量很少, 茎基及主根部则被浓密的菌膜、菌索覆盖、包裹, 越往根尖及侧根部, 菌丝越稀疏, 说明菌丝的侵染从茎基及主根开始。其原因及机理有待进一步研究。

3.3 对多数菌根食用菌而言, 人工菌根化苗的菌根外延菌丝难于延伸生长形成菌塘, 因此无法进行子实体分化。本研究在盆栽条件下, 用暗褐网柄牛肝菌接种咖啡苗的根系, 在接种后的 30 ~ 50 d 内完成了菌根苗合成—菌塘形成—子实体分化、生长、成熟等过程。菌根能在短时间内形成, 菌根上外延菌丝能迅速延伸生长, 并与土壤相互交织生长形成菌塘, 其原因应与暗褐网柄牛肝菌菌丝生长速度较快有密切关系。

3.4 盆栽条件下, 菌根苗不用移栽, 菌根苗上的外延菌丝不会受到损伤。菌根形成、菌塘形成及子实体分化为一个连续性过程, 有益于外延菌丝的延伸生长及累积, 当外延菌丝累积到一定量

即形成菌塘, 从而可以分化、生长子实体。另外, 咖啡苗的根系较为发达, 须根较多, 增大了菌种与根系的接触面积, 为菌丝侵染、菌根形成提供了更多的机率。

致谢 栽培试验用种暗褐网柄牛肝菌 *Phlebopus portentosus* 的标本为中国科学院昆明植物研究所杨祝良研究员鉴定; 臧穆研究员、杨祝良研究员、杨雄飞研究员审阅初稿并提出宝贵意见, 侯建勇参加部分工作。

### 〔参 考 文 献〕

- 王琴, 2002. 辽东栎幼苗的外生菌根合成及其生理效应 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学 (硕士学位论文)
- 吴金荣, 2002. 华美牛肝菌的组织分离及其栽培初探 [J]. 食用菌, (5): 14
- 臧穆, 2006. 中国真菌志第 22 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1—215
- \* Ji KP (纪开萍), Zeng Y (曾雁), Liu CF (刘昌芬) *et al.* 2006. Preliminary study on cultivation of *Boletus brunneissimus* Chiu on modelling [J]. *J Yunnan Agri Univ* (云南农业大学学报), 21 (3): 399—405
- Lun ZM (伦志明), Li YH (李玉花), Xing ST (邢树堂), 2005. Induced formation of the artificial shiro of *Tricholoma matsutake* [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 24 (2): 267—276
- Pegler DN, 1986. Agaric Flora of Sri Lanka [M]. Kew: Bulletin Additional Series, 12: 1—519
- Song B (宋斌), Li TH (李泰辉), 2004. A preliminary review on *Boletales* resources in Yunnan, Guizhou and Guangxi, China [J]. *Guizhou Sci* (贵州科学), 22 (1): 90—96
- Yamada A, Ogura T, Ohmasa M, 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. I. Primordium and basidiocarp formation in open pot culture [J]. *Mycorrhiza*, 11: 59—66

\* 云南农业大学学报将于 2007 年第 4 期将文章中所有“茶褐牛肝菌 *Boletus brunneissimus* Chiu”更正为“暗褐网柄牛肝菌 *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn”。