

植物外生菌根菌松茸菌丝培养基的优化研究

王雪颖^{1*}, 张国珍^{1,2*}, 牛蓓^{3#}, 徐莺¹, 秦小波^{1,2#}

¹四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川 成都

²四川省自然资源科学研究院, 四川 成都

³成都大学, 基础医学院, 四川 成都

Email: #qxb_2003@163.com

收稿日期: 2021年6月23日; 录用日期: 2021年7月20日; 发布日期: 2021年7月27日

摘要

松茸是由真菌感染其适宜植物根系形成, 为菌根菌。其是一种名贵的野生药食两用菌, 特别是在日本被视为菇中之珍品, 有很高的营养价值和特殊的药用效果。对松茸的过度挖掘造成野生松茸资源匮乏, 松茸人工栽培技术则是实现松茸产业可持续性发展的重要基础。目前, 半人工模拟栽培主要是设计出一种模拟在自然状态下, 松茸生活史的发生发展及最后形成子实体的过程, 利用人工或天然接种成功的菌根化苗木达到生产松茸的目的。利用松茸菌丝替代子实体孢子悬浮液进行接种, 具有减少对松茸子实体的依赖性和生产成本、保护林下松茸野生资源、促进松茸人工繁育进程的积极意义, 但需要成熟高效的菌丝培养技术。因此该研究从四川等地林下采取松茸样品, 在ITS分子鉴定并纯化得到纯种菌丝的基础上, 以菌丝直径为指标, 筛选得出最适宜的菌丝生长培养基。

关键词

松茸, ITS, 固体培养基, 优化

Study on Optimization of Mycelium Medium for a Plant Mycorrhizal, *Tricholoma matsutake*

Xueying Wang^{1*}, Guozhen Zhang^{1,2*}, Bei Niu^{3#}, Ying Xu¹, Xiaobo Qin^{1,2#}

¹Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu Sichuan

²Sichuan Natural Resource Institute, Chengdu Sichuan

³School of Preclinical Medicine, Chengdu University, Chengdu Sichuan

Email: #qxb_2003@163.com

*第一作者。

#通讯作者。

Abstract

Tricholoma matsutake is a kind of mycorrhizal fungi, which is suitable for root formation of plants infected by fungi. It is a kind of rare wild medicinal and edible fungus, especially in Japan is regarded as the treasure of mushroom and has high nutritional value and special medicinal effect. The over exploitation of *T. matsutake* results in the shortage of wild truffle resources, and the artificial cultivation technology of *T. matsutake* is an important basis for the sustainable development of *T. matsutake* industry. At present, semi artificial cultivation is mainly designed to simulate the occurrence and development of *T. matsutake* life history and the final formation of fruiting body in the natural state, using artificial or natural inoculation of successful mycorrhizal seedlings to achieve the purpose of *T. matsutake* production. Using *T. matsutake* mycelium instead of spore suspension to inoculate *T. matsutake* has the positive significance of reducing the dependence on *T. matsutake* fruiting body and production cost, protecting wild *T. matsutake* resources under forest and promoting the process of *T. matsutake* artificial breeding, but mature and efficient mycelium culture technology is needed. Therefore, in this study, *T. matsutake* samples were taken from the forests of Sichuan and other places. On the basis of its molecular identification and purification, the most suitable mycelial growth medium was selected with the mycelial diameter as the index.

Keywords

Tricholoma matsutake, ITS, Solid Medium, Optimization

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

松茸[*Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing.], 隶属担子菌亚门、口蘑科, 口蘑属, 是世界上珍稀名贵的天然食药菌[1]。松茸得名始于我国, 宋哲宗元佑年间, 唐慎微著《经史证类备急本草》业已启用。因该菌生于松林下, 菌蕾如鹿茸, 故名松茸。宋代陈仁玉著的《菌谱》中称此菌为松蕈[2]。明代李时珍的《本草纲目》把松蕈列在香蕈条下, 又称台蕈、合蕈[3]。松茸为菌根菌, 在长期演化过程中与松属或栎属植物协同进化, 建立起互利互惠的共生关系; 子实体单生或群生, 在林下一般形成圆形蘑菇圈或环形菌环[4] [5]。一方面, 松茸与松属或栎属植物形成外生菌根, 为松茸生长提供营养; 另一方面, 松茸菌丝和菌根的活动改善了土壤组分(包括酶、激素和抗生物质)及植物根际环境, 不仅对植物的生长具有促进作用, 而且提高了共生植物的抗旱性和抗贫瘠性[4] [6] [7]。

松茸不仅香味浓郁、口感爽滑, 而且营养价值和药用价值极高, 在国际上有天然营养宝库的美誉。松茸是一种名贵的野生食用菌, 具有强身、易肠健胃、止痛、理气化痰、驱虫等作用。有研究报道, 鲜松茸中含有 17% 的粗蛋白, 8.7% 的纯蛋白, 5.8% 的粗脂肪, 8.6% 的粗纤维, 7.1% 的灰分; 干松茸子实体中蛋白质含量为 11.0%, 粗脂肪为 4.4%, 粗纤维为 6.3%, 碳水化合物为 56.3%, 灰分为 9.5%。松茸还含有激素、甘露醇、松茸醇、异松茸醇等活性成分; 其子实体内富含的多糖、萜类、醇类和酶类具有抗菌、抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤等生物活性, 且日益受到重视, 具有巨大的应用潜力[1] [4] [8] [9]。

近年来由于开发过度及环境的恶化,野生松茸资源日渐枯竭,全球松茸产量逐年递减,2016年我国鲜松茸的平均年产量仅为2000吨,松茸已成为我国二级濒危保护物种。同时,松茸对生长环境要求极为苛刻,生长过程也极为缓慢,全世界尚无人工栽培的成功先例。目前,随着松茸生理生态研究的深入,松茸菌丝的纯培养及子实体的仿生态栽培已取得了一定的进展[4]。因此根据松茸的生物学特性,设计出一种模拟在自然状态下,松茸生活史的发生发展及最后形成子实体的过程,利用人工或天然接种成功的菌根化苗木进行移栽,可以形成松茸的模拟仿生栽培[4]。本研究从松茸的分子鉴定处着手,通过筛选优良的菌丝培养基,获得优良菌丝,旨在为后续的松茸菌丝接种植物根系,获得菌根和子实体提供理论依据和支持,对降低成本,加快其人工仿生栽培进程具有重要价值,还促进了林下松茸菌根的资源保护。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

从四川、云南等地林下采取松茸子实体,经初步形态鉴定后组织分离培养获得纯种菌丝。

2.2. 菌丝分离纯化

采用组织分离法,以PDA为纯化培养基进行菌丝分离培养。

2.3. 基于 rDNA ITS 序列的分子鉴定

1) 样品 DNA 提取及 rDNA ITS 序列扩增

采用植物 DNA 提取试剂盒提取松茸子实体组织 DNA。采用真菌 ITS 序列通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对样品 rDNA ITS 序列进行扩增。PCR 体系: 2 × primestar Mix 高保真酶 25 μL、模板 2 μL、引物各 2 μL、ddH₂O 19 μL。扩增程序: 98℃ 预变性 2 min, 35 个循环(98℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 10 s), 72℃ 再延伸 2 min, 12℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带大小, 凝胶回收目的条带。

2) 目的条带的载体构建、测序及序列比对分析

采用 T4 连接试剂盒连接目的条带至 T4 载体中,由生物技术服务有限公司测序。将所测 ITS 序列利用 BLAST 程序与 NCBI 中的核酸数据库进行同源性比对,以相似性比对得分最高的参考序列确定所测样品的物种。

2.4. 单因素试验

碳源筛选: 分别以葡萄糖 20 g·L⁻¹、马铃薯 200 g·L⁻¹、蔗糖 20 g·L⁻¹、麦芽糖 20 g·L⁻¹ 作为碳源。其他成分: 3 g·L⁻¹ 酵母膏, 1 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 1 g·L⁻¹ MgSO₄, 1 g·L⁻¹ 的 CaCl₂, 琼脂粉 20 g·L⁻¹。

氮源筛选: 分别以蛋白胨 3 g·L⁻¹、酵母膏 3 g·L⁻¹、牛肉膏 3 g·L⁻¹、酒石酸铵 3 g·L⁻¹、硝酸铵 3 g·L⁻¹ 作为氮源。其他成分: 20 g·L⁻¹ 葡萄糖, 1 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 1 g·L⁻¹ MgSO₄, 1 g·L⁻¹ 的 CaCl₂, 琼脂粉 20 g·L⁻¹。

各设置 3 个重复, 自然 pH, 置于 20℃ 培养, 10 天后统计菌丝生长直径。数据统计及显著性分析采用 GraphPad Prism 5 软件及 SPASS 22.0 软件的 ANOVA 方法完成。

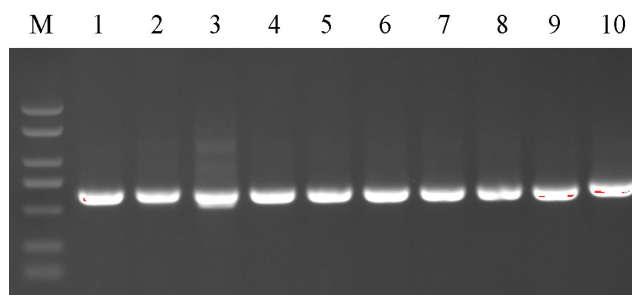
2.5. 正交试验

将单因素试验筛选出的最佳因子进行正交试验,以筛选各因素的最佳组合,各设置 4 个重复,培养条件同上。正交试验极差分析采用 Minitab 17 软件完成。

3. 结果与分析

3.1. 基于 ITS 序列分子鉴定

以子实体提取的 DNA 为模板, 采取真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增, 10 个样品均扩增出清晰条带, 大小约 600 bp (图 1)。将样品序列在 NCBI 核酸数据库中进行比对, 这些样品在分类上属于松茸(*T. matsutake*)。



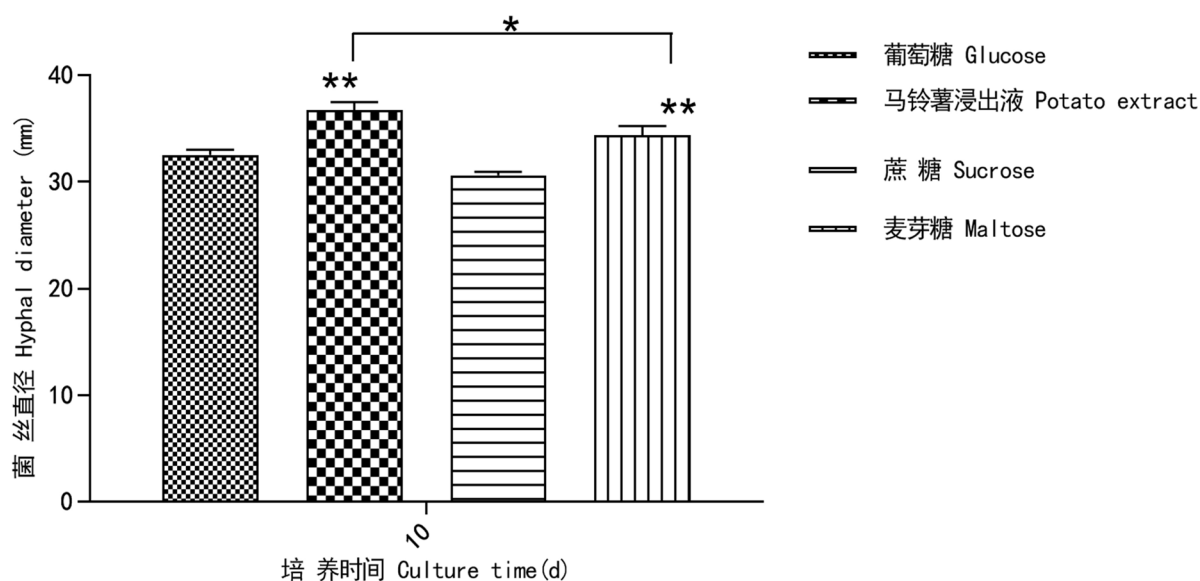
M. Marker DL2000, 1~10. 10 个松茸样品的 PCR 扩增产物。

Figure 1. ITS amplification of 10 *T. matsutake* samples

图 1. 10 个松茸样品的 ITS 扩增

3.2. 单因素试验不同碳源对松茸菌丝生长的影响

以菌落直径为衡量指标, 判断不同碳源对松茸菌丝生长的影响。发现 4 种碳源均能较好地被松茸所利用, 但马铃薯浸出液培养基和葡萄糖培养基上的菌落直径明显大于蔗糖培养基。其中, 马铃薯浸出液组、麦芽糖组与葡萄糖组在 $\alpha = 0.01$ 水平上具有极显著差异; 马铃薯浸出液组与麦芽糖组在 $\alpha = 0.05$ 水平上也具有显著性差异, 故马铃薯浸出液为本试验中松茸最佳碳源, 采用马铃薯进行后续正交试验 (图 2)。



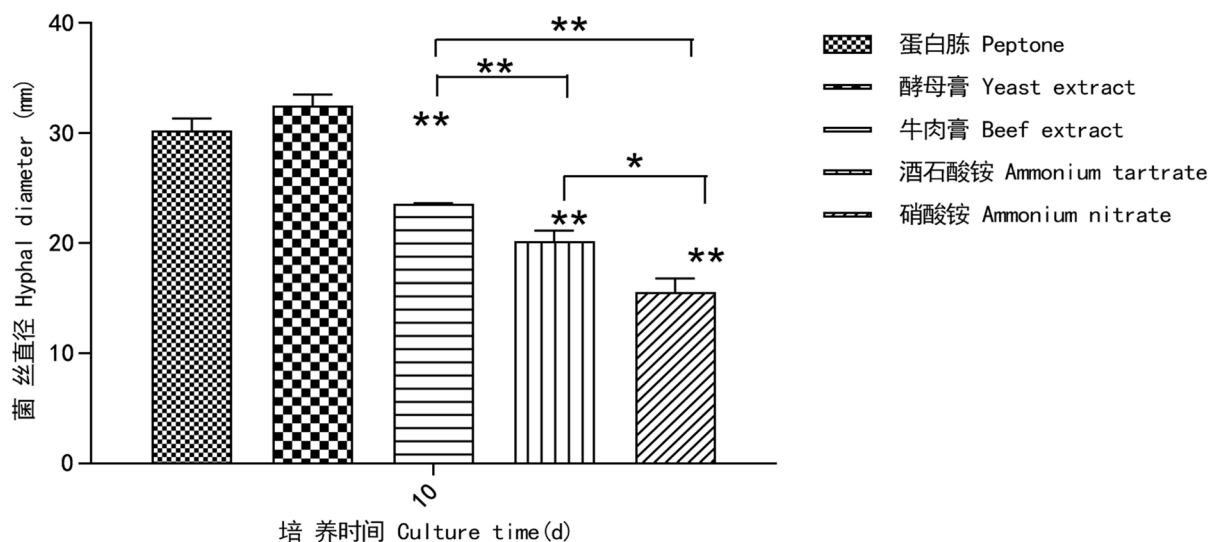
4 种碳源培养基中印度松茸菌落直径。*在 $\alpha = 0.05$ 水平有显著性差异, **在 $\alpha = 0.01$ 水平有极显著差异, 下同。

Figure 2. Colony diameter statistics of *T. matsutake* in 4 carbon medium

图 2. 4 种碳源培养基中松茸菌落直径统计

3.3. 单因素试验不同氮源对松茸菌丝生长的影响

食用菌对无机氮源和有机氮源均能进行吸收利用,部分食用菌对无机氮源利用率更高,故本次以菌落直径为衡量指标,以蛋白胨为对照,对两类氮源均进行了试验(图3)。有机氮源和无机氮源对菌落直径的影响在 $\alpha = 0.01$ 水平上极显著差异,前者的效果明显好于后者,但牛肉膏的效果要逊于蛋白胨和酵母膏。在无机氮源中,酒石酸铵的效果要优于硝酸铵,在 $\alpha = 0.05$ 水平上显著差异。故总体来看,采用酵母膏进行后续正交试验。



松茸在5种氮源培养基中菌落直径。

Figure 3. Colony diameter statistics of *T. matsutake* in 5 nitrogen medium

图3. 5种氮源培养基中松茸菌落直径统计

3.4. 正交试验筛选最佳培养基

将单因素试验所得的最佳碳源、最佳氮源、以及前人研究所得的葡萄糖及叶酸 VB1 (1:1)组合按 $L_9(3^4)$ 4因素3水平设计正交试验,复选优化松茸菌丝生长的固体培养基(表1)。极差 R 的大小代表各个因素在不同水平时对菌丝直径影响程度的大小,其中极差 R 越大,则此因素在不同水平对菌丝直径的影响就越大,故 C 源马铃薯浸出液对松茸菌丝生长直径影响最大,酵母膏次之,再次为 C 源葡萄糖,最后为叶酸 VB1 (1:1)。k 值代表同一因素不同水平对菌落直径的影响,其中 k 值较大者代表此水平对菌落直径有较好的促进作用[10],因此本研究中的松茸菌丝生长的最佳培养条件为 A2B3C3D1,即马铃薯浸出液 $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母膏 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、叶酸 VB1 (1:1) $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Table 1. $L_9(3^4)$ the results of orthogonal test

表1. $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号 Test number	因素				水平组合 Horizontal combination	菌落直径(mm) Colony diameter (mm)
	马铃薯浸出液(A) Potato extract	酵母膏(B) Yeast extract	葡萄糖(C) Glucose	叶酸 VB1 (D) (1:1) Folic acid VB1 (1:1)		
1	150	2	10	1	A1B1C1D1	42.55
2	150	2.5	15	1.5	A1B2C2D2	41.61
3	150	3	20	2	A1B3C3D3	41.00

Continued

4	200	2	15	2	A2B1C2D3	40.23
5	200	2.5	10	1.5	A2B2C1D2	40.72
6	200	3	20	1	A2B3C3D1	43.64
7	250	2	20	1.5	A3B1C3D2	40.35
8	250	2.5	10	2	A3B2C1D3	40.50
9	250	3	15	1	A3B3C2D1	40.42
k1	41.72	41.04	41.26	41.20		
k2	41.53	40.94	40.75	40.89		
k3	40.42	41.69	41.66	40.58		
R	1.30	0.75	0.91	0.62		

4. 讨论

松茸具有独特的食用药用价值,其价格昂贵,人工仿生培育将成为其必然发展趋势。松茸作为外生菌根真菌,能够与松树、栲树、高山栎等树木根系共生,形成特殊的生态环境,因此对松茸资源进行系统收集与研究,保护资源并进行开发是非常必要的[1]。松茸子实体的产量与季节、地理位置有着紧密联系,且保存不易;同时松茸资源连年减少,开发其人工仿生栽培技术特别重要。本研究获得了松茸菌丝培养基,不仅能促进松茸的人工培育进程,而且能促进林下松茸菌根的资源保护。

在多数食用菌碳源筛选中,最佳碳源多为葡萄糖、蔗糖以及麦芽糖等[11][12]。葡萄糖是多数食用菌良好同化利用的碳源,但并非是所有食用菌最好的碳源。马铃薯浸出液的主要成分为淀粉物质,据报道,葡萄糖经高温灭菌后还原糖含量降低,而可溶性淀粉经高温灭菌处理后产生复杂变化,还原糖含量升高,更容易被一些食用菌菌丝吸收利用,例如香菇、柳松茸在高温灭菌的可溶性淀粉为唯一碳源的培养基中生长最快,蛹虫草在间歇灭菌的可溶性淀粉为唯一碳源的培养基中生长最快[13]。本研究中,松茸培养基的最适碳源为马铃薯浸出液,可能是松茸菌丝能产生高活性的淀粉酶,能快速分解淀粉。另外据报道,马铃薯含有多种营养物质、酶类、生理活性物质以及矿物质等微量元素[14][15],具有丰富的营养价值。马铃薯作为松茸的最适碳源,可能是马铃薯浸出液中的有关酶类等生物活性物质,以及矿物质等微量元素弥补了松茸菌塘中细菌产生的有效活性物质,从而促进松茸菌丝的生长。最后,松茸菌根是与其适宜苗木的根系共生而形成,马铃薯块茎可能含有与松茸共生苗木根系的类似成分,而促进松茸菌丝的生长,这暗示也许可从植物的根茎中分离出可促进松茸菌丝生长的物质。

本研究中叶酸 VB1 (1:1)组合对松茸菌丝生长有促进作用。叶酸本来对担孢子萌发和子实体形成也具有显著的促进作用;而 VB1 对某些食用菌如鸡枞菌丝、草原白蘑菌丝等生长也有促进作用[16][17]。其具体的机制等还需进一步研究。

本研究发现,松茸优化的菌丝培养基配方为马铃薯浸出液 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母膏 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、叶酸 VB1 (1:1) $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,在 20°C 下培养 10 d 后可使菌落直接达 43.6 mm。本研究为松茸利用菌丝接种于宿主根系产生子实体提供了研究基础。同时,针对松茸菌丝在固体培养基上培养的优化以及如何运用于后续的人工接种及栽培还需进一步研究。

基金项目

四川省级公益性科研院所基本科研业务费项目、四川省科技计划项目(2020YFS0280, 2020YFN0014, 2021YFN0107)共同资助。

参考文献

- [1] 刘培贵, 袁明生, 王向华, 等. 松茸群生物资源及其合理利用与有效保护[J]. 自然资源学报, 1999, 14(3): 245-252.
- [2] 减穆. 松茸群及其近缘种的分类地理研究[J]. 真菌学报, 1990, 9(2): 113-127.
- [3] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [4] 弓明钦, 陈羽, 王凤珍, 等. 松茸[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1999.
- [5] 谭伟. 松口蘑栽培理论及方法[J]. 食用菌学报, 1994, 1(1): 53-63.
- [6] 高明文, 代贤才. 川西高原的松茸生态[J]. 中国食用菌, 1996, 15(6): 34-35.
- [7] 杨民和, 杨新美, 陈立国. 松茸生态及培养的初步研究[J]. 江西农业大学学报, 1999, 21(1): 83-85.
- [8] 周选围. 松茸资源研究概况[J]. 食用菌学报, 2002, 9(1): 50-56.
- [9] 王永明. 蕈中珍品——松茸[J]. 植物杂志, 1999(6): 10.
- [10] 陈文强, 邓百万, 陈永刚, 等. 用 L9(3~4)正交试验筛选裂褶菌液体培养基[J]. 食品与生物技术学报, 2005(4): 41-44.
- [11] 陈文强, 周选围, 邓百万. 姬松茸母种培养基筛选研究初报[J]. 食用菌学报, 2002(2): 31-34.
- [12] 徐瑞雅, 齐志广, 贾耐兵, 等. 食用菌最佳母种培养基的筛选[J]. 河北农业科学, 2007, 11(1): 23-24.
- [13] 何培新, 徐燕, 张长铠. 8 种食用菌同化利用葡萄糖和可溶性淀粉的探讨[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2003, 31(3): 28-30.
- [14] 吕巨智, 染和, 姜建初. 马铃薯的营养成分及保健价值[J]. 中国食物与营养, 2009(3): 53-54.
- [15] 丁红瑾. 钙处理对贮藏期马铃薯主要成分及生理生化指标的影响[D]: [硕士学位论文]. 银川: 宁夏大学, 2013.
- [16] 王小丹, 刘强, 蔡虹, 等. 鸡枞菌丝的固体培养研究[J]. 内江师范学院学报, 2011, 25(2): 460-461.
- [17] 马荣山, 方蕊. 草原白蘑菌种分离及菌丝体生长因子的筛选[J]. 沈阳农业大学学报, 2011(1): 71-75.