

暗褐网柄牛肝菌半人工模拟栽培及“宿主树”根系上菌丝生长的持久性

纪开萍* 何明霞 张春霞 刘 静 王文兵 侯建勇

(云南省热带作物科学研究所 云南 景洪 666100)

摘 要: 用暗褐网柄牛肝菌纯培养菌种, 接种盆栽及袋栽的小粒咖啡(*Coffea arabica* L.)苗、田间小粒咖啡树的根系, 结果表明: 接种 30 d~90 d, 子实体幼蕾紧靠苗(树)的茎基或于茎基四周土壤中生长子实体并发育成熟。子实体单生或丛生, 出菇至成熟 3 d~4 d, 单个子实体重 20.0 g~62.0 g; 小粒咖啡苗(树)的根茎、主根及侧根被茶褐色的菌索和菌膜包裹, 而根尖及靠近根尖的侧根上没有菌丝和菌索生长或生长很少; 盆栽小粒咖啡苗, 在接种 90 d 后其根系表面的菌索死亡。

关键词: 暗褐网柄牛肝菌, 半人工模拟栽培, 成熟子实体, “宿主树”根系, 菌丝持久性

Semi-artificial Simulate Cultivation of *Phlebopus portentosus* and the Durability of Hyphae on Host Roots

Ji Kai-Ping* HE Ming-Xia ZHANG Chun-Xia LIU Jing
WANG Wen-Bing HOU Jian-Yong

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

Abstract: Pure culture of *Phlebopus portentosus* was inoculated in the roots of coffee tree. The results indicated that the young fruit bodies would come out around the rhizomes of host tree after inoculation in 30 to 90 days, single or cluster, 3 to 4 days for mature, weight 20.0 g to 62.0 g. Brown rhizomorph and hyphae can be seen on the seedlings' rhizome, main root and side root while nothing is on the tip of the root. It was found that rhizomorph on the surface of roots would die after inoculation in 90 days in pot.

Keywords: *Phlebopus portentosus*, Semi-artificial simulate cultivation, Mature fruit bodies, Host roots, The durability of hyphae

暗褐网柄牛肝菌(*Phlebopus portentosus*), 最早描述见于斯里兰卡^[1], 现在斯里兰卡、越南、印度尼西亚、泰国、巴西、墨西哥、澳大利亚、新西兰都有分布^[2-6]。在我国分布于云南、广西和海南等地^[7-9], 是一种味道鲜美, 营养价值丰富, 深受产地

消费者喜爱的美味食用菌。目前市场上销售的暗褐网柄牛肝菌子实体均采自野生自然生长。

多数牛肝菌为菌根食用菌, 目前菌根食用菌栽培研究多为半人工模拟栽培及菌塘人工促繁, 人工培养研究很少报道。纪开萍等报道, 将暗褐网柄牛

基金项目: 云南省科技厅预研项目资助

* 通讯作者: ✉ jkpcnlc@126.com

收稿日期: 2008-08-05; 接受日期: 2008-11-20

肝菌纯培养固体种接种在小粒咖啡苗的根系上,盆栽条件下成功培养了暗褐网柄牛肝菌成熟子实体,但生长子实体的小粒咖啡苗的根系上,茎基及主根则被浓密的菌膜和菌索覆盖包裹,根尖及侧根无菌膜和菌索生长或生长量较少,说明菌丝的侵染从主根及茎基开始,其原因及机理尚不清楚^[10]。同时试验中还观测到,子实体成熟收获后 100 d,生长子实体的小苗根系上的菌丝、菌索基本死亡。本试验继续用暗褐网柄牛肝菌纯培养菌种,接种盆栽、袋栽及田间条件下的小粒咖啡苗(树)的根系,研究不同栽培方式下暗褐网柄牛肝菌子实体生长情况,生长子实体的小粒咖啡苗(树)的根系上菌根形成情况,以及生长子实体的小粒咖啡苗(树)的根系上菌丝、菌索的存活时间,旨在观测暗褐网柄牛肝菌半人工模拟栽培多种栽培方式下子实体“快速分化生长”的原因,并为其提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试 B-01 菌株: 2003 年采自云南景洪凤凰木(*Delomix regia*)树下的野生子实体分离的菌株。母种保存于云南省热带作物科学研究所,其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, HKAS49706 号标本。

1.1.2 供试菌种: 纯培养液体菌种、固体菌种。

1.1.3 供试咖啡树(苗): 田间栽培 2 年生小粒咖啡树、沙床培育 2 年生小粒咖啡苗。

1.1.4 供试培养袋: 口径 10 cm、高 21 cm 的塑料营养袋。

1.1.5 供试培养盆: 口径 30 cm、高 30 cm 的花盆。

1.1.6 供试栽培基质: 果园土[芒果(*Mangifera indica*)园的表层土]、废旧草炭、腐熟牛粪、营养液。

1.2 方 法

1.2.1 人工接种子实体: 1) 盆栽接种。用花盆装栽培基质,栽培基质设纯草炭、纯果园土、50.0%草炭+50.0%果园土+10.0%牛粪、果园土+10.0%牛粪、50.0%草炭+50.0%果园土 5 个处理,移栽苗龄 2 年生的小粒咖啡苗(去茎尖及过长的根尖),每盆栽苗 5 株,5 次重复,栽苗时接入固体菌种,接种量 500.0 g/盆,以纯果园土栽苗不接种为对照。盆中放栽培基质,栽苗时舒展幼苗的根系,菌种撒于根系及土壤中并与根系紧密接触,接好后淋定根水,培

养盆放于塑料膜及遮荫网搭建的荫棚下,保持栽培基质表面湿润培养子实体。

2) 袋栽接种。以果园土壤作栽培基质,在土壤中喷洒 10.0%营养液。用塑料营养袋装基质,移栽苗龄 2 年生的小粒咖啡苗(去茎尖及过长的根尖),在苗的根系及四周土壤中接入固体菌种,菌种量 100.0 g/袋,接种 20 袋,以栽苗不接种为对照,营养袋放于塑料膜及遮荫网搭建的荫棚下,保持栽培基质表面湿润。

3) 田间接种。选二年生小粒咖啡树,用锄头挖开根部土壤露出根系的部分主、侧根,然后在主侧根部接入菌种。设单接液体种、单接固体种、液体种+固体种混接 3 种处理,以不接种为对照。每处理接种 20 株,3 次重复共 60 株。接种量:单接液体种,0.10 L/株;单接固体种,100.0 g/株;液体种与固体种混接,0.10 L 液体种+100.0 g 固体种/株。接种时菌种尽量与茎基及主、侧根紧密接触。接完后接种部位覆土并稍高于地面,接种树的根圈覆盖地膜,防止雨水流入接种部位影响菌种的成活,同时对根圈起保湿作用,利于菌种萌发感染根系。

1.2.2 生长观测: 1) 子实体生长观测及小粒咖啡苗(树)根系上菌丝生长。观测各接种方法子实体从接种至现蕾出菇时间、子实体生长个数、成熟个数、出菇至成熟时间、子实体单重等,并标记生长子实体的咖啡树(苗)。

子实体成熟采收时,用头部稍尖的木棍扒开小粒咖啡苗(树)茎基 0.5 cm~5.0 cm 深的土层或用锄头挖开茎基部土壤露出主、侧根,观测茎基、主根、侧根上菌丝体、菌索或菌膜生长情况及生长子实体的土壤中菌丝、菌索生长情况。若咖啡苗(树)的根系感染生长牛肝菌菌丝体,则苗的茎基部会生长菌索或被菌索包裹。

2) 菌根形成观测。盆栽接种的小粒咖啡苗,田间接种小粒咖啡树,在子实体收获后观测根尖鹿角状分枝、菌丝套生长及哈蒂氏网形成情况。

3) 接种后不同时间段根系表面菌索、菌皮生存活时间、子实体生长观测。在接种后的每个月,观测盆栽接种及田间接种小粒咖啡苗(树)根系表面菌索、菌膜生长、存活时间。盆栽接种苗拔苗观测,每次观测 20.0 株(2 盆),10 次共 200.0 株。田间接种树挖开其主、侧根部土壤观测根系,每次 20.0 株,12 次共 240.0 株。

1.2.3 统计分析：用 DPS7.05 分析软件，LSD 法分析子实体生长、成熟及接种的小粒咖啡苗(树)根系上菌丝体生长、存活的差异显著性。

2 结果

2.1 子实体生长情况

2.1.1 盆栽接种：接种 30 d，子实体幼蕾紧靠咖啡苗的茎基及其四周土壤生长或生长于培养盆边缘。接种的每个培养盆中均生长子实体并发育成熟，子实体单生或丛生(图 1a)，出菇至成熟 3 d~4 d，重 23.0 g~62.0 g。不接种的培养盆(对照)无子实体生长。50.0%草炭+50.0%果园土栽苗接种，子实体生长个数极显著高于其他基质处理。4 个栽培基质间子实体成熟个数及单个子实体重差异不显著(表 1)。

2.1.2 袋栽接种：接种 30 d，20 个营养袋均子实体幼蕾并发育成熟，营养袋中生长的子实体个数 1~10 个不等，平均每个营养袋生长子实体 2.2 个，仅成熟 1 个，平均单个子实体重 20.0 g(图 1b)，不接种的营养袋(对照)无子实体生长(表 2)。

2.1.3 田间接种：接种 30 d~90 d，子实体幼蕾紧靠咖啡树茎基或茎基四周 10.0 cm 范围内生长并发育成熟。子实体单生或丛生，每株树生长 1~3 个，平均单个子实体重 56.0 g~58.0 g(图 1c)。液体种与固体种混接，生长子实体的株数、生长子实体株率(%)极显著高于单接液体种及单接固体种，但 3 个接种处理每株子实体生长个数、子实体成熟数、平均单个子实体重无显著差异。不接种的咖啡树根系上无菌丝、菌索及子实体生长(表 3)。

2.2 接种的咖啡树根系上菌丝生长情况

2.2.1 盆栽接种及袋栽接种：菌丝体从接种的主根、根茎开始生长，然后向侧根延伸。小粒咖啡苗的茎基、主根及侧根上、栽培基质的浅表土壤层均生长茶褐色的菌丝，菌丝形成菌索。用头部稍尖的木棍扒开苗的茎基，可看到茶褐色的菌索包裹小粒咖啡苗的茎基部，而根尖及靠近根尖的侧根部没有菌丝生长或生长很少(图 1d、1e)。

2.2.2 田间接种：菌丝从接种部位开始生长，形成茶褐色的菌膜包裹小粒咖啡树的根茎、主根及侧根，根尖部则生长较少或没有(图 1f)。菌膜厚 0.06 mm~7.0 mm，平均 4.4 mm，在根表面隆起形成圆形或长椭圆形，中空的“菌腔”，菌腔直径 0.2 cm~0.48 cm，高 0.2 cm~0.72 cm，每个菌腔内有 1~2 个活的粉蚧(*Pseudococcus*)(图 1g)。生长子实体的土壤中菌索生长旺盛(图 1h)，有时子实体菌柄基部菌索、土壤中菌索与咖啡根系生长的菌索相连接。

液体种与固体种混接，根系上菌膜生长株数极显著高于单接固体种及单接液体种(表 4)。

2.3 菌根形成情况

盆栽接种、袋栽接种及田间接种生长子实体的小粒咖啡苗(树)根系的根尖上均没有菌丝套生长、鹿角状分枝等结构形成(图 1i)，皮层细胞间无哈蒂氏网(图 1j)，说明生长子实体的小粒咖啡苗(树)没有形成菌根。

2.4 接种后不同时间段小粒咖啡苗(树)根系上菌丝生长、存活及子实体生长情况

2.4.1 盆栽接种：接种 30 d，小粒咖啡苗的主根、

表 1 盆栽接种各个栽培基质上子实体生长差异检验 Table 1 To check the growth of fruiting bodies in different mediums						
基质 Mediums	50.0%果园土+50.0% 草炭 50.0% Carbon+50.0% Orchard soil	纯草炭 Pure carbon	45.0% 草炭+45.0% 果园土+10.0% 牛粪 45.0% Carbon+45.0% Orchard soil+10.0% Shard	纯果园土 Pure orchard soil	90.0%果园土+10.0% 牛粪 90.0% Orchard soil + 10.0% Shard	Ck
生长数(个) Fruiting number	9.3 A	4.3 B	2.0 B	1.0	1.0 B	0.0 C
成熟数(个) Mature number	1.0 A	2.0 A	1.6 A	1.0	1.0 A	0.0 B
单个子实体重(g) Fruiting weight	23.0 A	62.0 A	52.0 A	53.0 A	30.0 A	0.0 B

注：以上数据来自 5 次重复的平均值。
Note: Data averaged from 5 replicates.

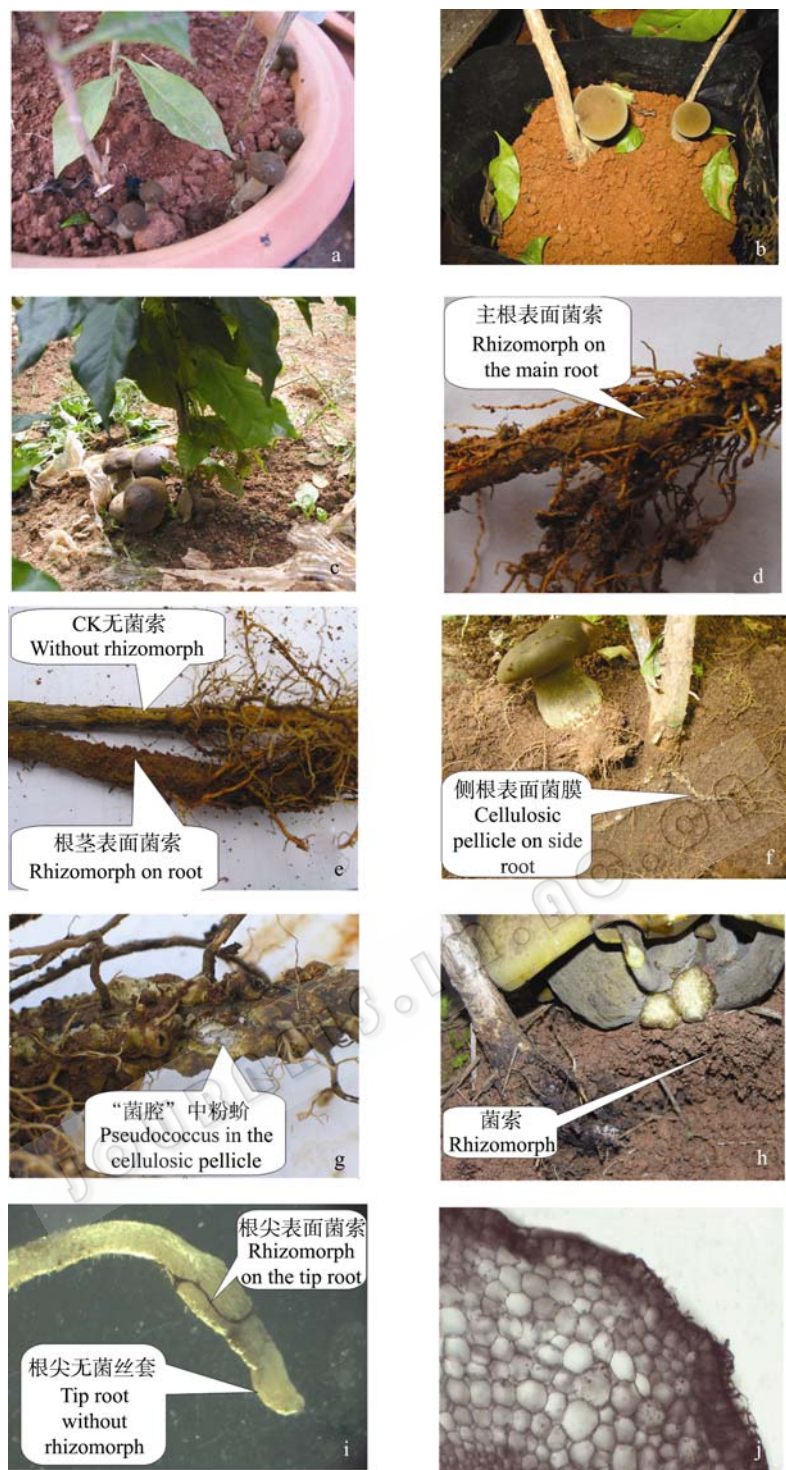


图 1 半人工模拟栽培出菇状及接种的小粒咖啡苗(树)根系上菌索、菌膜、菌丝套、哈蒂网生长情况
Fig. 1 Semi-artificial simulate cultivation of fruiting body and the growth of rhizomorph, cellulosic pellicle, mycelium mantal, hartig net on the roots of *Coffea arabica* seedling

注: a: 盆栽接种出菇; b: 袋栽接种出菇; c: 田间接种出菇; d: 盆栽接种的小粒咖啡苗主根上菌索; e: 接种与不接种小粒咖啡苗根系上菌索生长比较; f: 田间接种的小粒咖啡树根系上包裹的菌膜; g: “菌腔”中生存的粉蚧; h: 田间接种生长的子实体基部土壤中菌丝、菌索; i: 生长子实体的小粒咖啡苗(树)的根尖部无菌丝套; j: 皮层细胞间无哈蒂氏网结构。

Note: a: Fruiting body in pot; b: Fruiting body in bag; c: Fruiting body in the field; d: Rhizomorph on the main root of coffee seedling in pot; e: Rhizomorph comparison between inoculating seedling and non-inoculating seedling; f: Cellulosic pellicle on the root in the field; g: Pseudococcus in the cellulosic pellicle; h: Hyphae and rhizomorph in the field; i: the tip root without mycelium Mantal; j: Hartig Net can't be found among the cortical tissue cells.

表 2 袋栽接种子实体生长情况 Table 2 The growth of fruiting bodies in bag		
	接种 Inoculation number	CK
平均生长子实体数(个) Average number	2.2	0.0
成熟数(个) Mature number	1.0	0.0
平均单个子实体重(g) Average weight	20.0	0.0

根茎及部分侧根生长覆盖由菌丝形成的菌索，两个接种盆(20 株苗)共生长子实体 18 个，成熟 9 个，成熟率 50.0%；至接种 60 d，根系上菌索生长率下降为 60.0%，没有子实体生长。至接种 90 d，小粒咖啡苗

根系上菌丝、菌索死亡脱离根表面，根系上菌索存活为 0(表 5)。

2.4.2 田间接种：接种 30 d~90 d，90.0%~100.0%的小粒咖啡树其主根、根茎及侧根表面覆盖有菌膜，菌膜隆起形成“菌腔”，“菌腔”内有活的粉蚧。子实体生长率在接种 60 d 最高，为 100.0%；随接种时间延长，子实体生长数、成熟数有由低向高的趋势，但子实体成熟率与接种时间关系不大。至接种后 180 d，仍有 80.0%小粒咖啡树根系上生长有菌膜，但无子实体生长。至接种 360 d，有 75.0%的小粒咖啡树根系上仅有少量的菌膜及“菌腔”存活，20.0%的接种树生长子实体(表 5)。

表 3 田间各接种方法子实体生长差异检验									
Table 3 To check the growth of fruiting bodies in various inoculations									
接种方法 Inoculating ways		液体种与固体种混接 Liquid mix with solid		单接固体种 Solid only		单接液体种 Liquid only		CK	
每株树子实体生长数(个) Fruiting number per tree		5.2	A	4.0	A	3.0	A	0.0	C
子实体成熟数(个) Mature fruiting bodies		2.0	A	1.5	A	1.2	A	0.0	C
单个子实体重(g) Unit weight		58.0	A	56.0	A	58.6	A	0.0	C

表 4 田间各接种方法小粒咖啡树根系上菌丝生长差异检验 Table 4 To check the hyphae on the roots of coffee tree in various inoculations											
		液体种与固体种混接 Liquid mix with solid			单接固体种 Solid only			单接液体种 Liquid only		CK	
生长数(株) Hyphae on the roots		54.0 A			54.0 B			15.0 B		0.0 C	
生长率(%) The percent of hyphae		90.0 A			90.0 B			25.0 B		0.0 C	

注：以上数据来自 3 次重复(共 60 株)的平均值。
Note: Data averaged from 3 replicates, 60 seedlings in total.

表 5 接种后不同时间段小粒咖啡苗(树)根系上菌索、菌膜生长、存活情况* Table 5 Rhizomorph and cellulosic pellicle on the roots during different stages of inoculation											
盆栽接种 Pot coffee seedling					田间接种 Coffee tree in the field						
检查时间 Checking time	30 d	60 d	90 d	120 d	30 d	60 d	90 d	120 d	150 d	180 d	360 d
菌索、菌丝存活率(%) Survived rate	100	60	0	0	100	100	90	80	80	80	75
菌索、菌丝生长覆盖情况 Growth of rhizomorph and cellulosic pellicle	主根、根茎、侧根均被菌膜覆盖	主根、根茎、侧根均被菌膜覆盖	主根、根茎、侧根均被菌膜覆盖	主根、根茎、侧根均被菌膜覆盖	主根、根茎及部分侧根覆盖菌膜						少量菌膜存活

3 讨论

1) 盆栽接种、袋栽接种及田间接种均能培养成熟的子实体。盆栽接种及袋栽接种,方法较田间接种简便,从接种至出菇时间(30 d)短于田间接种(90 d),但单个子实体平均重量低于田间接种。3种方法平均每株小粒咖啡苗(树)生长的子实体数不等,但成熟数均没有超过2个,成熟数有限。原因可能是接种培养的时间相对短,培养盆、营养袋及根系所能供给的营养有限。

2) 盆栽接种、袋栽接种及田间接种所用的土壤均没有经过灭菌处理,但3种方法均设了不接入菌种的处理为对照。再者,田间接种也不可能对土壤作灭菌处理。但试验的结果表明,培养盆、营养袋及田间不接入菌种的对照,其小粒咖啡苗(树)的根系上及根系周围土壤中无菌丝、菌索生长,也无子实体生长,说明原土壤中没有菌种存在。接种后出菇及不出菇的小粒咖啡苗(树)根系及土壤中菌丝、菌索均系人工接种来源。

3) 多数牛肝菌为菌根食用菌。许多菌根食用菌半人工模拟栽培的过程相当长,需要4~5年,甚至6~7年才能完成^[11]。目前世界菌根食用栽培最为成功的是黑孢块菌(*Tuber melanosporum*)。在新西兰,黑孢块菌人工栽培从种植园的建立到有块菌子囊果收获需要6~7年时间^[12]。松乳菇(*Lactarius deliciosus*)人工栽培,菌根苗合成需5~8个月时间,用菌根合成苗继续原地栽培或移植到普通土壤中培养出菇需2~3年时间^[13]。本研究用暗褐网柄牛肝菌纯培养菌种接种盆栽条件、袋栽条件及田间条件下的小粒咖啡苗(树)的根系,进行3种栽培方式的半人工模拟栽培,接种后在较短的时间内(30 d~90 d)即生长出子实体并发育成熟。

4) 根尖显微观察表明,生长成熟子实体的小粒咖啡苗(树)根系的根尖没有菌丝套、鹿角状分枝等菌根特征,根尖皮层细胞间也没有哈蒂氏网形成,说明小粒咖啡苗(树)的根系没有形成菌根结构。这是否说明,暗褐网柄牛肝菌可能具有腐生性,在不形成菌根条件下也能生长子实体并发育成熟。本研究中3种栽培方式下生长的子实体并非生长于菌根上外延菌丝延伸生长形成的菌塘,而可能是由单纯接入的菌种扩展生长达到一定的菌丝生物量后分化生长。

5) 接种的小粒咖啡苗(树)根系上菌索、菌膜的

存活与栽培条件关系密切。接种90 d后,盆栽接种苗根系上的菌丝、菌索全部死亡,而田间接种90.0%的小粒咖啡树根系上菌索、菌膜仍然存活。原因可能是盆栽及袋栽条件下土壤的水肥供给及土壤通透性差,影响苗的生长进而影响根系上菌丝、菌索的存活。田间条件下土壤的水肥条件及通透性条件优于盆栽及袋栽,因此根系上菌索、菌膜的存活时间相对长。

6) 田间接种小粒咖啡树的根系上覆盖暗褐网柄牛肝菌菌膜,菌膜形成的“菌腔”中生存着粉蚧,粉蚧一般来源于田间土壤,粉蚧与菌膜的相互关系有待于进一步研究。

致谢:曾雁馆员参加部分工作,在此谨表诚挚的感谢!

参考文献

- [1] Pegler DN. Agaric flora of Sri Lanka. *Kew Bulletin Additional Series*, 1986, **12**: 1-519.
- [2] Barbara P, Segedin. An annotated checklist of Agarics and Boleti recorded from New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 1987, **25**(2): 185-215.
- [3] Watling R. The relationships and possible distributional patterns of Boletes in South-East Asia. *Mycological Research*, 2001, **105**(12): 1440-1448.
- [4] Bandala VM, Montoya L, Jarvio D. Two interesting records of Boletes found in coffee plantations in Eastern Mexico. *Persoonia*, 2004, **18**(3): 365-380.
- [5] Maria alice neves, Marina capelari. A preliminary checklist of Boletales from Brazil and notes on Boletales specimens at the Instituto de Botanica (SP) Herbarium, Sao Paulo, SP, Brazil. *Sitientibus serie ciencias biologicas*, 2007, **7**(2): 163-169.
- [6] Heinemann P, Rammeloo J. Observations sur le genre *Phlebopus* (Boletineae). *Mycotaxon*, 1982, **15**: 384-404.
- [7] 臧 穆. 我国东喜马拉雅及其邻区牛肝菌目的研究(续). *云南植物研究*, 1986, **8**(1): 1-22.
- [8] 臧 穆. 2006. 中国真菌志第22卷. 北京: 科学出版社, pp.1-215.
- [9] 杨祝良, 臧 穆. 中国南部高等真菌的热带亲缘. *云南植物研究*, 2003, **25**(2): 129-144.
- [10] 纪开萍, 张春霞, 曾 雁, 等. 盆栽条件下暗褐网柄牛肝菌人工菌塘及其子实体培养研究. *云南植物研究*, 2007, **29**(5): 554-558.
- [11] 弓明钦, 仲崇禄, 陈 羽. 菌根食用菌及其半人工栽培. 广东: 广东科学出版社, 2006, pp.1-147.
- [12] 谭著明, 傅少春, 刘晓红. 新西兰菌根性食用菌研究开发现状与启示. *湖南林业科技*, 2002, **29**(3): 72-74.
- [13] 谭著明. 松乳菇母种培养基及人工栽培方法. 中华人民共和国专利, ZL98112527.1.