

黑孢块菌、夏块菌菌根苗培育及菌根检测技术研究

林强¹, 冉晓潇¹, 赵军⁴, 刘应雄⁵, 柳成益³, 韩灯²

(1. 四川林业科学研究院, 四川 成都 610081; 2. 攀枝花市林业局, 四川 攀枝花; 617000, 3. 攀枝花市农林科学院, 四川 攀枝花 617065; 4. 北川县林业局, 四川 北川 622750; 5. 松潘县林业局, 四川 松潘县 623302)

摘要: 本文研究了黑孢块菌和夏块菌的云南松菌根苗培育技术和检测技术, 分别介绍了黑孢块菌和夏块菌菌根苗的培育方法及其宏观和显微特征。

关键词: 黑孢块菌; 夏块菌; 外生菌根苗; 培育; 检测

中图分类号: S646 文献标识码: A 文章编号: 1003-5508(2013)01-0041-03

A Study of Techniques of Cultivating and Detecting Ectomycorrhizal seedlings of Black Truffle (*Tuber melanosporum*) and Summer Truffle (*Tuber aestivum*)

LIN Qiang¹ RAN Xiao-xiao¹ ZHAO Jun⁴ LIU Ying-Xiongi⁴
LIU Cheng-yi³ HAN Deng²

(1. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, Sichuan; 2. Panzhihua Bureau of Forestry, Panzhihua 617000, Sichuan; 3. Panzhihua Academy of Agricultural and Forestry, Panzhihua 617065, Sichuan; 4. Beichuan Bureau of Forestry, Beichuan 622750, Sichuan; 5. Songpan County Bureau of Forestry, Songpan 623302, Sichuan)

Abstract: In this paper, studies are made of the technique of cultivating and detecting ectomycorrhizal seedlings of black truffle (*Tuber melanosporum*) and summer truffle (*Tuber aestivum*) in laboratory, and a respective description is given of macro-character and micro-character of morphology of ectomycorrhizal seedlings and techniques of cultivating ectomycorrhizal seedlings (*Pinus yunnanensis*).

Key words: *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*, Ectomycorrhizal seedling, Cultivating, Detecting

块菌(Truffle)属于囊菌亚门(Ascomycotina), 块菌目(Tuberales), 块菌科(Tuberaceae), 块菌属(*Tuber Micheli*: F. H. Wigg.)。欧洲常见的块菌种类60余种, 商业块菌的种类, 主要是黑孢块菌、夏块菌和意大利白块菌。商业的块菌素有“黑钻石”之称, 是食用菌中最珍稀的种类, 鲜块菌价格在欧洲市场500欧元·kg⁻¹~1500欧元·kg⁻¹。

1 材料和方法

本研究供试材料黑孢块菌(*Tuber melanospo-*

rum)、夏块菌(*Tuber aestivum*)由意大利皮埃蒙特大区IPLA林业环境研究所提供。

1.1 种质资源和生态学属性

黑孢块菌(*Tuber melanosporum*)分布在法国、意大利、西班牙等欧洲国家, 目前引种到加拿大、美国、澳大利亚、新西兰等国家已经获得栽培成功。直径5cm~15cm不等, 重量从数十克到1kg。与中国的印度块菌形态特征和遗传特征都十分相似。宿主植物有: 欧洲栎、欧洲榛子、雪松、榆树、山毛榉等多种植物。我们同样也在云南松、滇榛、板栗上成功接种了黑孢块菌。生长土壤要求含钙质较高, pH值

收稿日期: 2012-09-1

基金项目: 优质块菌种质资源及块菌配套造林技术(2009410)。

作者简介: 林强(1963-), 男, 硕士, 高级工程师, 从事菌类栽培及研究工作。

7.5~8.5 范围,冬季平均温度 1℃~8℃,夏季平均温度 17.5℃~22.5℃,年平均降雨量 600 mm~1 500 mm 出产季节,从头年 10 月到次年 3 月。

夏块菌(*Tuber aestivum*)分布在法国、意大利、西班牙等欧洲国家,我国攀西地区会东县也发现有夏块菌分布。目前引种到澳大利亚、新西兰等栽培获

得成功。直径 2 cm~10 cm,重量可以达到几十克到几百克。在晚夏和早秋成熟,生长温度与黑孢块菌类似,土壤 pH 值 6.5~8.5。分布接近土表。宿主植物主要有:欧洲榛子、欧洲栎。我们也在云南松、滇榛、板栗上接种获得成功(参见图 1)。



图 1 欧洲黑孢块菌(左)及夏块菌(右)

1.2 宿主植物云南松无菌苗培育

收集优质的云南松母树园种子用水选法去除空壳种子,用 0.1% 的高锰酸钾液浸泡处理 30 min,用自来水冲洗去表面残留的高锰酸钾溶液,然后再用清水浸泡 1 d~2 d,在这期间换一次清水。将表面灭菌处理后的云南松种子播入混合基质的培育箱中,培养基质为蛭石与珍珠岩的混合物,其体积比为蛭石:珍珠岩:泥炭土为 1:1:1,在 121℃~126℃ 的高压灭菌器下灭菌 2.5 h~3 h 放置一周后使用。播种后,用清水将基质浇透后放置于室内催芽,待 80% 以上的种子发芽后再移入炼苗室内进行无菌苗培育,需注意的是温度要保持在 10℃~30℃ 之间,基质的湿度保持在 50%~70%。云南松无菌苗培育 3 月以上,根部开始木质化后即可进行接种。

1.3 宿主植物接种方法

1.3.1 菌剂的配制方法

将供试的和黑孢块菌及夏块菌分别在碾钵内磨成粉状,粉状菌种按 1:1 的比例和细沙混合即为接种的菌剂,菌剂要随用随配,用不完的需要在冰箱 2℃~5℃ 环境冷藏保存。

1.3.2 接种

将培育好的云南松无菌苗浸泡在自来水里至根部基质松解,在适宜的容器内装入上述培灭菌基质,至 2/3 深度,然后用小勺舀一勺约 3 g 上述菌剂,在容器基质表面,将云南松无菌苗栽入,使根部与菌剂接触,然后覆盖基质压紧,用水浇透,将接种苗放置

在炼苗室培育半月,期间适当浇水,然后移到温室大棚育苗架上培养 6 个月。

1.4 检测方法

采用 OLYMPUS SZ61Q 体式显微镜筛选感染须根, BX41 显微镜观测微观特征。囊状体即晶状附属物,鞘状细胞。

随机选择培育 6 个月龄云南松接种苗,在玻璃钵内浸泡 1 h,用自来水冲洗干净,注意勿伤根部。检测:在解破镜下,先观测接种植物根部,通常感染发生在须根上,确认有感染征兆,再用镊子捏取或用解剖刀切取,感染部位。将切取材料在载玻片上放下,滴一滴清水,盖上盖玻片,挤压盖玻片,然后在显微镜下检测。

2 结果与分析

感染的典型的宏观特征,棒状的须根,二叉分枝,或则珊瑚状分枝;显微特征,随不同的块菌会不一样,一些在菌根表面的翘呈不规则的网格例如夏块菌,一些呈马赛克似的拼图,初期在菌根的表面还会出现囊状体—长长的丝状不分割的有点类似菌丝的附属物,菌根颜色初期为浅肉色,老时变黑,通常具有明显的苍白色的顶部,所有这些是检测的客观的标准(参见图 2)。

用 OLYMPUS BX41 光学显微镜检测。经检测可清晰的看到菌根表面的囊状体。囊状体着生在

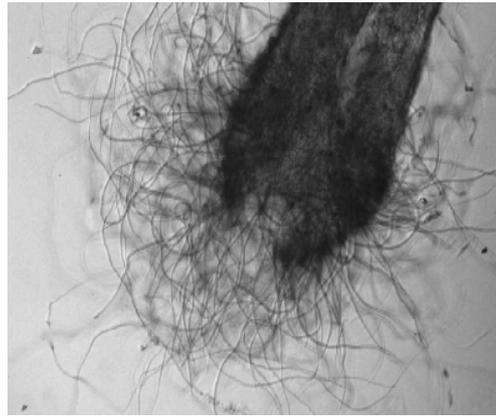
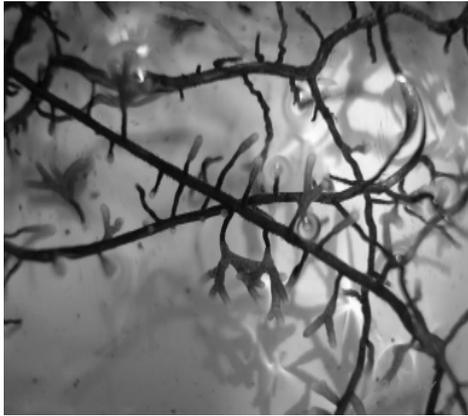


图 2 感染夏块菌菌根的宏观特征二叉、珊瑚状分枝及囊状体

菌根表面,且不分支,较坚硬,囊状体基部细胞较大。菌丝是从根系表皮细胞间隙向皮层伸展,并在皮层细胞之间交织成网状。菌根表面未发现菌索和菌核。菌根横切面上能观察到哈蒂氏网(Hartig net)结构,野外菌根可清晰看到菌丝在营养根表繁殖,层层交织形成的菌套呈暗褐色或黑色,而根组织细胞清晰可见,呈浅褐色或褐色。块菌菌根具有囊状体及独特的菌套结构,这是块菌属菌根显著特征。未形成菌根的营养根横切片,可见小而排列紧密的表皮细胞,其颜色与其它细胞无区别,均呈浅褐色或褐色。与苗圃中的菌根苗菌根观察效果有差别的是,菌根周围有杂菌侵染的情况,菌套颜色要深得多,与天然林中块菌接种后形态类似(参见图 3,图 4 和图 5)。

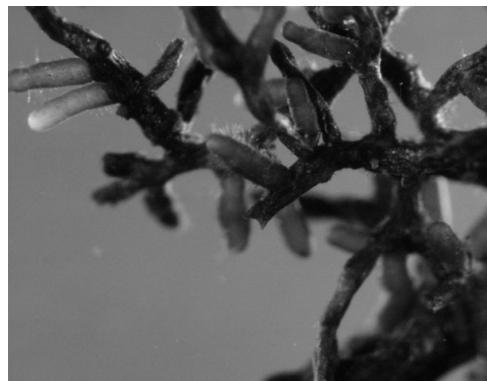


图 4 黑孢块菌菌根形态



图 3 夏块菌感染苗须根表面特征

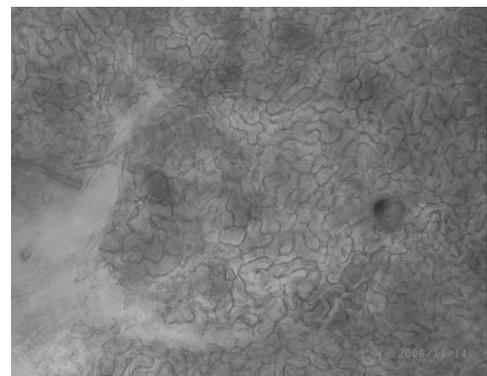


图 5 黑孢块菌鞘状细胞

3 结论和讨论

云南松无菌苗的培育要严格遵从无菌操作技术,否则会造成严重的污染。采用孢子粉菌剂接种宿主植物,感染率极高,通常接种后半年可以观测到感染结果,这个是欧洲常规的块菌接种方法。

块菌菌根宏观上无论夏块菌还是黑孢块菌区别

不大,甚至和大多数的其它菌根真菌很类似。但是微观特征有着明显的区别。第一块菌菌根感染初期,有不分割的丝状的囊状体细胞,第二夏块菌的鞘状细胞是不规则的网格状,而黑孢块菌则是不规则的多角形,有点类似马赛克花纹与印度块菌的花纹极为相似。

菌根微观显微特征是鉴别不同种块菌菌根的关键特征,形态学的特征检测,是欧洲最常用的菌根检测技术,进一步还可以采用 DNA 指纹图谱技术鉴定感染的菌根块菌种类,特别是区分印度块菌和黑孢块菌需要分子生物学的分析手段。