

杨 梅,柳成益,唐 平,等. 印度块菌接种美国山核桃合成菌根技术[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):267-269.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.089

印度块菌接种美国山核桃合成菌根技术

杨 梅¹,柳成益¹,唐 平¹,韩 灯²,郑林用³,陈 宾²,肖玉军¹,杨晓峰¹

(1. 四川省攀枝花市农林科学研究院,四川攀枝花 617061; 2. 四川省攀枝花市林业局,四川攀枝花 617000;

3. 四川省农业科学院,四川成都 610066)

摘要:对印度块菌接种美国山核桃合成菌根苗技术进行研究。结果表明:用印度块菌孢子接种美国山核桃无茵苗,3 个月后形成根尖淡乳色的、基部淡黄色的、黄褐色外生菌根。外生菌根为单轴状和羽状结构,外延菌丝为透明、半透明、近直角分支、絮状着生在菌根表面,菌根横切面上能观察到形状像马蹄形的哈蒂氏网结构。在 Leica S6D 解剖镜测量单根菌根平均长为 0.16 cm,平均直径为 0.039 cm。分子测序 ITS 序列同源性为 100%,同时采用的是 PCR 产物直接测序,测序峰图清晰、无重叠峰,由此可以确定美国山核桃形成菌根的只有印度块菌。

关键词:印度块菌;美国山核桃;菌根;外延菌丝

中图分类号:S664.104 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0267-03

块菌为子囊菌类中的块菌目(Tuberales)块菌科(Tuberaceae)块菌属(*Tuber* spp.)的一类地下珍贵食用真菌^[1]。营养丰富且具有奇异香味,其营养价值和商业价值为世人所瞩目,因产量有限,国际市场上供不应求,价格昂贵,并始终排在所有食用菌之首^[2],被誉为“餐桌上的钻石、地下黄金”^[3]。

攀枝花是商业印度块菌的天然理想产区之一,野生块菌最高产量可达 100 t/年,在我国块菌外贸出口中占有重要地位,成为山区农民增收致富的主要来源,在四川省米易县、盐边县和仁和区的一些采集块菌的村子,平均每户年收入 2 000 元左右,最高的可达 6 万元。由于其市场价格极高而市场需求日甚,人们超强度采挖,导致块菌资源显著减少,濒临灭绝,已经危及到块菌的可持续发展和永续利用。因此,发展块菌的人工栽培势在必行,而块菌菌根苗培育是实现块菌人工栽培的前提。现国内已报道的果树与块菌共生的树种仅有板栗和榛子,2 种树种都是中高海拔的植物,而对低海拔的经济果树与块菌共生的研究未见报道。美国山核桃[*Carya illinoensis* (Wangenn.) K. Koch]属胡桃科高大乔木,是世界上四大坚果之一^[4]。美国山核桃壳薄,易取仁,出仁率 50%~70%,含油率 70%~80%,不饱和脂肪酸含量 60%左右,且不饱和脂肪酸和对人体有益的各种氨基酸比油橄榄高。美国山核桃定植后 4~5 年开始挂果,10 年开始盛产,盛产期 50~70 年,产量达 1 500~3 750 kg/hm²,国际市场上 6~8 美元/kg,国内超市 60~120 元/kg,是普通核桃的 4~6 倍,是唯一一个适合

低海拔栽培的核桃品种。

块菌属于菌根真菌,它必须与适合的宿主植物形成共生关系,否则无法形成子实体^[5]。根据“适树适菌”的原则,为实现美国山核桃和块菌栽培效益的最大化,本试验开展了印度块菌接种美国山核桃合成菌根技术的研究,采用形态学及分子生物学的方法确定印度块菌与美国山核桃能形成菌根^[6],并观察在菌根生长过程中的形态变化,建立了美国山核桃与印度块菌合成菌根苗的显微检测方法,为实现印度块菌人工栽培提供科学依据。本研究为印度块菌的人工栽培提供新的共生树种,填补了低海拔区域没有果树与块菌共生的空白,对实现块菌与果树栽培效益的最大化有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 块菌菌种 在攀枝花市场上购买成熟度高、个头大、外型好、无损伤、香味相对较浓的印度块菌子实体作为菌种(图 1、图 2)。

1.1.2 供试树种 从云南大理的漾濞购买美国山核桃种子(图 3)。

1.2 试验方法

1.2.1 块菌的处理和菌种的制备 将收集的印度块菌先用牙刷轻轻洗净表面泥土,在 75%乙醇中浸泡 3 min,然后在超净工作台上用乙醇灯火焰快速灼烧后与 121~126℃高温高压灭菌 2 h 的河沙混合密封,并于 3~5℃的温度下冷藏保存备用。将块菌子实体取出,用粉碎机粉碎成直径小于 1 mm 的颗粒,与高温高压灭菌 2 h 后用烘箱烘干的细土按照 1:10 的比例混合,放置在 3~5℃的冰箱中保存备用。

1.2.2 育苗基质的处理 接种前培育幼苗所用的基质按照珍珠岩:蛭石=1:1 的比例均匀混合装入布袋中,在 121~126℃下灭菌 2 h。移植和接种苗培育基质按照腐殖土:蛭石:河沙=1:1:2 的比例混合均匀,再用 1 mol/L 的生石灰溶液调 pH 值至 7 左右装入布袋中,在 121~126℃下灭菌 2 h。

收稿日期:2014-09-17

基金项目:四川省科技支撑计划(编号:2013NZ0029);四川省攀枝花市重点科技计划(编号:2011CY-S-24)。

作者简介:杨 梅(1978—),女,云南会泽人,助理研究员,主要从事珍稀食用菌驯化栽培技术研究。E-mail:yangmei13550934780@163.com。

通信作者:柳成益,助理研究员,主要从事块菌驯化栽培技术研究。E-mail:147787071@qq.com。

1.2.3 接种前幼苗培育 将美国山核桃种子用清水冲洗干净,再用 0.3% 高锰酸钾溶液浸种消毒 48 h,清水冲洗干净,用纱布包好放置在 30 ℃ 的恒温箱中进行催芽,坚持每天用清水冲洗,防治杂菌滋生,并捡出裂口的种子,未裂口的继续放入恒温箱中催芽。将裂口的种子播种于处理好的基质中,在攀枝花市农林科学研究院温室大棚中进行育苗管理,待苗木生长到 3 个月达到一定的木质化即茎秆由绿色转为褐色可接种(图 4)。

1.2.4 块菌接种方法 接种时选择根系发达、苗色较好的幼苗,用经过消毒的剪刀剪去主根。在黑色硬塑料杯中先装入 1/3 的上述灭菌基质,将苗放入杯中,再将配置好的印度块菌菌种按照每株含 200 万~700 万个块菌子囊孢子的剂量接种在幼苗根上,使幼苗根系与菌种紧密结合,最后添加灭菌基质,压实。接种后浇透定根水,挂牌并标明接种时间、接种菌名。接种时设置相应的未接种对照,将接种的幼苗和未接种的幼苗放置于攀枝花市农林科学研究院温室大棚中培养,接种苗按常规管理,使基质保持湿润,控温不超过 35 ℃,温度过高要加遮阳网或喷水降温。

1.2.5 试验设计与观察 本试验采用印度块菌接种美国山核桃无菌苗,苗木接种 3 个月开始每个月按 5% 随机抽样在 Leica S6D 解剖镜下观察菌根的感染情况;接种 6 个月,按照接种苗木数量的 10% 进行随机抽样,根部用清水洗净泥土,再用解剖镜 Leica S6D 检查根部感染情况,随机选取 30 个菌根测量菌根的长度和粗度,随意选取任意一株切取菌根的根尖作切片,在显微镜 OLYMPUSBX-41 40 倍下观察菌根的外延菌丝、马赛克现象、菌套,记录其特征并照相。

1.2.6 菌根分子检测 从已接种印度块菌 6 个月后的美国山核桃菌根上采取 20 个左右,在 Leica S6D 解剖镜下用软毛刷刷掉泥土,清洗干净后用改进的 CTAB 法提取菌根的 DNA,方法参考文献[7],通过测定其菌根 ITS 序列的办法鉴定菌根上的真菌,ITS 序列 PCR 扩增引物为 ITS4(5′-TC-CTCCGCTTATGATATGC-3′)和 ITS5(5′-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3′),扩增片段测序后与接种用的印度块菌的序列进行比较,以确定形成菌根菌的是否是印度块菌。

2 结果与分析

2.1 美国山核桃印度块菌菌根特征与感染率检测

对接种印度块菌 3 个月后的美国山核桃树苗进行菌根特征与感染率检测,在 Leica S6D 解剖镜 40 倍下观察,未接种的美国山核桃未见任何菌根形成,仅见粗短的根毛,营养根不膨大,先端尖锐(图 5);接种的根较粗壮,基部淡黄色,顶端淡乳色、发亮的单轴和羽状的菌根形态(图 6),印度块菌与美国山核桃树形成的菌根其外延菌丝呈棉絮状(图 7、图 8)、透明、半透明的。Olympus CX41 显微镜下作菌根切片 10 倍×40 倍下观察到外延菌丝近直角分支(图 9),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,可清晰看到菌丝在营养根表面繁殖,层层交织形成菌套(图 10),用 Olympus CX41 显微镜下作菌根切片 10 ×

40 倍下观察,印度块菌接种美国山核桃的菌根横切面上能观察到形状像马蹄形的哈蒂氏网结构(别称马赛克现象,图 11)。在 Leica S6D 解剖镜下测量单根菌根长 0.16 cm,直径为 0.039 cm。在接种 10 个月部分菌根开始老化,变成黄褐色至黑色;接种 12 个月以后,菌根老化,可见暗褐色及萎缩的老化菌根(图 12)。

对试验苗木接种 3 个月后的菌根进行检测,印度块菌菌根感染率为 40% 左右。接种 6 个月后的菌根检测结果显示,菌根量较丰富,感染率为 95% 以上。

2.2 美国山核桃印度块菌菌根的微观结构形态(分子检测)

通过对美国山核桃菌根的分子检测,PCR 扩增显示,从美国山核桃菌根提出的 DNA 能得到较单一的 700 bp 左右的条带。测序结果表明,与美国山核桃形成的菌根真菌为印度块菌。ITS 序列同源性为 100%,同时采用的是 PCR 产物直接测序,测序峰图清晰、无重叠峰。因此,与美国山核桃形成菌根的只有印度块菌,没有其他菌根类真菌。

3 结论与讨论

印度块菌孢子接种到美国山核桃 3 个月开始形成淡乳色的菌根尖,6 个月后菌根感染效果较好,感染率达 95% 以上菌根量较大,说明美国山核桃是印度块菌很好的宿主植物。本研究采用形态学和分子检测 2 种方法确定印度块菌与美国山核桃能形成菌根,在块菌栽培研究中具有重要的研究意义和极高的应用价值。美国山核桃是唯一一个适合低海拔栽培的核桃品种,美国山核桃印度块菌菌根苗接种成功填补了低海拔区域没有经济树种块菌菌根苗的空白。美国山核桃和印度块菌都是 2 个具有较大发展前景的产业,美国山核桃接种印度块菌的成功,迈出了两大产业高效有机结合的第一步,美国山核桃块菌菌根苗栽培成功将实现产值翻番。因此,美国山核桃块菌菌根苗栽培易推广,市场前景广阔。

致谢:本研究过程中得到新西兰块菌专家王云博士和中国台湾块菌专家胡宏道教授的指导,特此感谢!

参考文献:

- [1] Jasmina G, Radmila V, Jele - Na V. Evidence of truffles in Serbia [J]. Mycotaxon, 1997, 65: 211 - 222.
- [2] 陈应龙, 弓明钦. 块菌资源多样性及其地理分布[J]. 中国食用菌, 2000, 19(6): 25 - 26.
- [3] 蔡珠儿. 吃松露[J]. 中国企业家, 2007(12): 108 - 109.
- [4] 张日清, 吕芳德. 优良经济树种——美国山核桃[J]. 广西林业科学, 1998(4): 202 - 206.
- [5] Marx D H, Cordell C E, Maul S B, et al. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bareroot and container seedling nurseries. I. Efficacy of various vegetative inoculum formulations[J]. New Forests, 1989(3): 45 - 56.
- [6] 苏开美, 李树红, 杨丽芬, 等. 印度块菌、夏块菌与化香树合成菌根苗技术初探[J]. 中国食用菌, 2012, 31(3): 10 - 12.
- [7] 张红, 秦莲花, 谭琦, 等. 用改进的 CTAB 法提取香菇基因组 DNA[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2006, 12(5): 547 - 550.

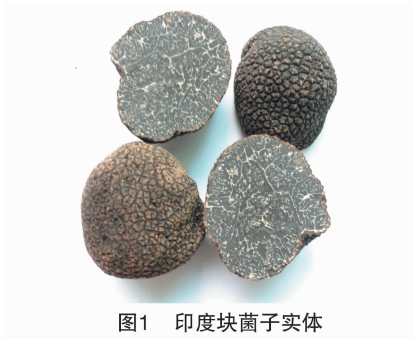


图1 印度块菌子实体



图2 印度块菌孢子



图3 美国山核桃种子



图4 美国山核桃无菌苗

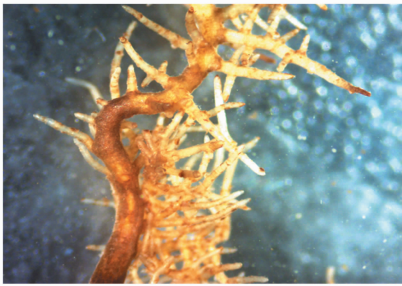


图5 未接种的美国山核桃



图6 已接种美国山核桃

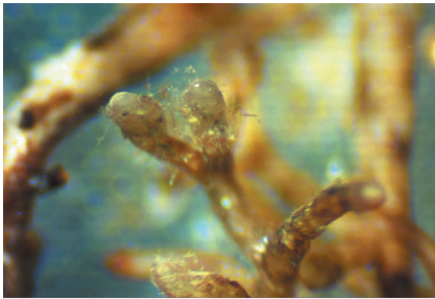


图7 美国山核桃菌根呈棉絮状的外延菌丝

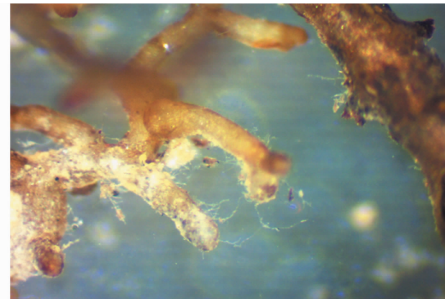


图8 美国山核桃菌根呈棉絮状的外延菌丝

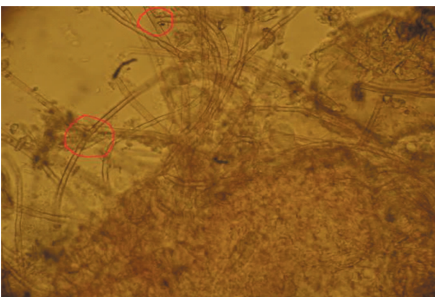


图9 外延菌丝近直角分支

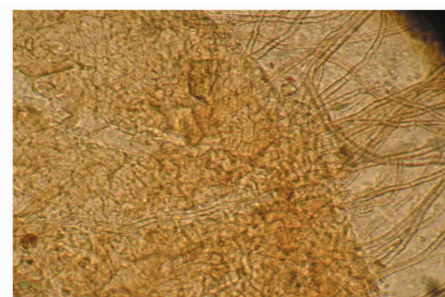


图10 外延菌丝层层交织形成的菌套

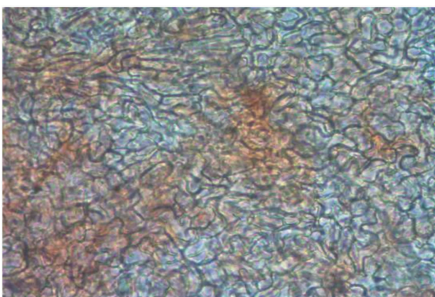
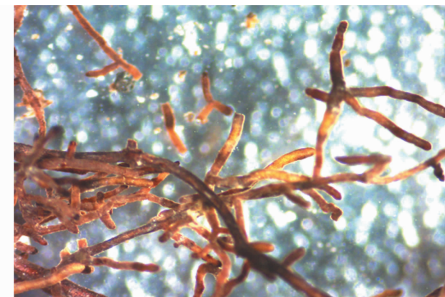
图11 美国山核桃菌根马蹄状的哈蒂氏网
(马赛克现象)

图12 12 个月后老化的菌根