

Isolation, Domestication and Differential Identification of Wild *Dictyophora rubrovalvata* Zang, ji et liou

Yan Sun¹, Lang Li¹, Ni Liu¹, Gaochao Pan¹, Honghong Liu¹, Fanglun Zou^{2*}, Hanwu Long^{2*}, Dongsheng Qiao³

¹Institute of Mountainous Resources, Guihou Academy of Sciences, Guiyang Guizhou

²Institute of Biology, Guizhou Academy of Sciences, Guiyang Guizhou

³The Edible Mushroom Base of Donson-Onlly, Dafang County, Bijie Guizhou

Email: *42008514@qq.com, *zfl636488@126.com

Received: Dec. 20th, 2018; accepted: Jan. 2nd, 2019; published: Jan. 9th, 2019

Abstract

In this paper, the eggs of 8 - 9 mature *Dictyophora rubrovalvata* Zang, ji et liou were collected, the mother species were isolated and domesticated, cultivated species were cultivated, agronomic characters were observed, and the differentiation of cultivated species was carried out. Results: The mycelium of cultivated species was white, dense and vigorous, and about 20 days after cultivation, the colony mycelium of different cultivated species met with each other, forming a deep isolation line and antagonistic reaction. The mycelium of the same cultivated species was fused together and there was no antagonistic reaction. Conclusion: The antagonistic experiment is simple in operation and short in time, and it can be used to distinguish different strains of *Dictyophora rubrovalvata* Zang, ji et liou.

Keywords

Wild *Dictyophora rubrovalvata* Zang, ji et liou, Isolation and Domestication, Different Cultivars, Differential Identification

野生红托竹荪菌株分离驯化与区别性鉴定

孙燕¹, 李浪¹, 刘妮¹, 潘高潮¹, 刘虹虹¹, 邹方伦^{2*}, 龙汉武^{2*}, 乔东生³

¹贵州省山地资源研究所, 贵州 贵阳

²贵州省生物研究所, 贵州 贵阳

³大方县东生昂立食用菌基地, 贵州 毕节

Email: *42008514@qq.com, *zfl636488@126.com

*通讯作者。

收稿日期：2018年12月20日；录用日期：2019年1月2日；发布日期：2019年1月9日

摘要

采集异地野生红托竹荪8~9成熟菌孢子实体，分离驯化母种、栽培种，察看农艺性状，对栽培种作区别性鉴定实验。结果：驯化培育栽培种菌丝洁白、浓密，长势旺盛；对峙培养栽培种，20天左右，不同栽培种菌落菌丝相遇互不相让，形成一道加深隔离线，产生拮抗反应。相同栽培种菌落菌丝融合在一起，没有发生拮抗反应。结论：拮抗实验操作简单，用时短，可以区分红托竹荪不同菌种。

关键词

野生红托竹荪，分离驯化，不同栽培种，区别性鉴定

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

1. 引言

红托竹荪(*Dictyophora rubrovalvata* Zang, ji et liou), 担子菌门, 鬼笔科(Phallaceae)竹荪属(*Dictyophora*)大型食用菌。我国竹荪食用历史悠久, 早在唐代段成式的《酉阳杂俎》一书中已有记载。野生竹荪多生长在有大量竹子残体和腐殖质的竹林地里, 味道鲜美可口, 素有“菌中皇后”、“山珍之王”的称号, 且价格昂贵[1] [2] [3] [4] [5]。现作为商业性生产的红托竹荪, 主要分布在贵州、福建、四川、云南等地。由于得天独厚的气候条件, 贵州已成为红托竹荪主产地。伴随着竹荪产业的快速发展, 菌种使用量急剧增加, 菌种使用过程中, 由于管理意识不强, 菌种存在混乱现象, 造成优劣菌株菌种难以区分, 给引种、栽培、开发利用带来很多困难。

本实验采集异地野生红托竹荪 8~9 成熟菌孢子实体, 分离驯化制作母种、栽培种, 同时对菌种进行拮抗实验。拮抗反应是国家农业部 NY/T 1845-2010 [6] [7]标准中规定的食用菌菌种区别性鉴定方法, 常用于担子菌的菌种鉴别研究, 红托竹荪属担子菌门, 利用拮抗反应对其菌种区别性鉴定目前还未见报道。鉴定包括母种、原种和栽培种, 生产中栽培种用量较多, 本实验对栽培种进行区别性鉴定。

2. 材料与实验步骤

2.1. 仪器设备、试剂

电子分析天平(感量 0.01 g), 高压灭菌锅, 超净工作台, 人工气候箱, 培养皿, 烧杯, 玻璃棒, 漏斗, 煮锅, 电磁炉, 量筒, 花钵, 温湿度计, 土壤湿度计, 接种工具; 马铃薯, 葡萄糖(分析纯), 琼脂, 水, 阔叶杂木屑, 麸皮, 过磷酸钙, 白糖, 拌料盆等。

2.2. 试验步骤

2.2.1. 培养基制备

1、试管、平板 PDA 培养基制备

挑选品相好马铃薯，剜去芽眼部位，削皮切薄片，称取 400 克置煮锅中，加水 2000 ml，加热煮沸约 15 分钟，搅动薯片均匀受热至酥而不烂。4 层洁净纱布过滤至 2000 ml 烧杯中，加水补足 2000 ml。滤液倒入煮锅，加 40 g 葡萄糖，搅拌使其充分溶解，缓慢加入 40 g 琼脂粉，快速搅拌，让琼脂完全溶解，培养基形成。培养基分成两部分，一部分趁热分装入试管，分装量约为试管长度的四分之一，管口不沾染培养基，稍冷却，塞上硅胶塞，形成试管培养基；另一部分趁热装入三角瓶中，装入量约为瓶容量三分之一左右，透气盖密封瓶口，将包装好平面皿、装好培养基的试管和三角瓶于高压锅中灭菌 30 分钟，灭菌后试管培养基趁热摆成斜面，三角瓶中培养基趁热倒入培养皿中，盖好，待培养基冷却，试管及平板培养基制备完成。

2、栽培种培养基制作

1) 原料质量配比及具体要求：阔叶杂木屑 78%，麸皮 20%，过磷酸钙 1%，白糖 1%。原料要求无霉变，含水量 < 12%，粉碎颗粒 > 5 mm，过磷酸钙含有效 P_2O_5 14%~20%，白糖市售食用等级。

2) 培养基制作：称取阔叶杂木屑于干净料盆中，加入水使其全部淹没原料，浸泡过夜，滤去水分，按配比加入麸皮、过磷酸钙、白糖，搅拌均匀，检查调整培养基含水量 55%~60%，形成培养基。

3) 装瓶、装袋：将培养基装入菌种袋或瓶，压紧培养基，用清水洗净菌袋或瓶口内外空置部分，套上菌袋盖或瓶塞。

4) 灭菌：将装好培养基的菌袋和菌种瓶置灭菌锅中，121℃灭菌保持 1 小时，温度降至 60℃~70℃，取出菌种袋和菌种瓶，放入超净工作台内，自然冷却，菌种瓶和菌种袋培养基形成。

2.2.2. 菌种分离、转接

1、菌种分离

1) 采集 8~9 成熟新鲜竹荪蛋子实体，用无菌脱脂棉擦去表面土及其他杂物，装入自封袋，放低温采样箱内保存，及时带回实验室，采集记录见表 1，图 1。

2) 超净工作台内无菌条件下，用解剖刀挑取小块白色组织(菌柄、菌裙)接入试管培养基中部，与培养基充分接触，见图 2。

3) 分离菌种后，试管放入人工气候箱 25℃恒温培养，观察萌发状况，有污染，及时检出。菌丝长满管后，选菌落均匀、菌丝健壮的菌种扩管形成母种，见图 2。

2、菌种转接

在超净工作台无菌条件下，接种针挑取小块母种转接入菌种瓶和菌种袋中，置于人工气候箱 25℃恒温培养，观察菌丝生长情况，无污染菌丝生长浓密、健壮，长满菌种瓶，形成栽培种，见图 3。

2.2.3. 区别性鉴定实验

原理：两个不同菌株对峙培养时发生拮抗反应，是某些真菌识别异己，保持群体遗传多样性的反映。它是由基因组内异核体不亲和(hetero-karyon incompatibility, het)位点控制的。当不亲和的菌株共同培养时，由于 het 位点的识别作用，菌株间就会产生拮抗反应，在交界处形成隆起、沟或隔离，从而防止遗传上明显不同的个体间菌丝的融合，以保持个体遗传上的独立和稳定[7]。红托竹荪两菌株区别性鉴定实验操作如下：

1) 接种组合和重复

接种组合为 3 组。第一组：S1 菌种与 S2 菌种，各接种 1 个接种块；第二组：S1 菌种与 S1 菌种，各接种 1 个接种块；第三组：S2 菌种与 S2 菌种，各接种 1 个接种块。每组 3 个重复。分别进行对峙培养。

2) 接种操作

在超净工作台内严格按无菌接种操作, 分别取菌种作接种块, 两接种块间隔 30 mm 以上, 菌丝朝上, 放在培养皿内(如图 4、图 5、图 6)。

3) 培养条件

红托竹荪属中低温品种, 在 5℃~28℃均能生长, 以 18℃~22℃最为适宜, 调节气候箱, 给予其适宜温度 25℃, 湿度自然, 通风、避光培养 20 d~30 d。

4) 拮抗反应的观察和判断

在灯下或自然光下, 观察培养皿表面红托竹荪两菌株菌落交界处是否呈现隆起型、沟型、隔离型反应。培养物表面菌丝有隆起型、沟型、隔离型三者之一为有拮抗反应, 两个菌种块为不同菌种, 培养物表面菌丝未呈现隆起型、沟型、隔离型三者之一的为无拮抗反应。

3. 结果讨论

3.1. 结果

Table 1. Collection and recording of bacteria eggs of *Dictyophora rubrovalvata* Zang, ji et liou

表 1. 红托竹荪菌蛋采集记录

编号	采集时间	采集地点	采集状态	海拔高度: 米	备注
S1	2018 年 5 月 14 日	贵州大方县	竹荪孢子实体	1300	野生菌株驯化
S2	2018 年 8 月 15 日	贵州贵定县	竹荪孢子实体	1500	野生菌株驯化



Figure 1. Wild situation of S1/S2 bacteria strain

图 1. S1、S2 两菌株野生境地



Figure 2. Production of mother species

图 2. 母种制作



Figure 3. Production of cultivated species

图 3. 栽培种制作

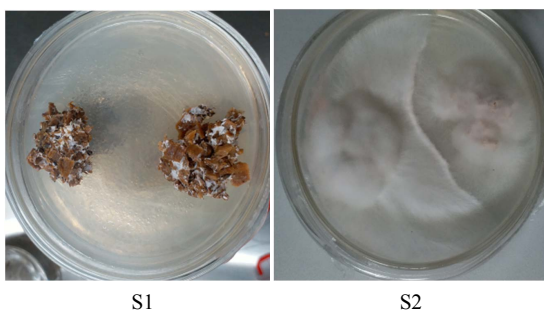


Figure 4. Antagonistic experiment of two different strains of S1 and S2

图 4. S1、S2 两个不同菌种拮抗实验



Figure 5. S1/S1 two identical strains

图 5. S1、S1 两个相同菌种



Figure 6. S2/S2 two identical strains

图 6. S2、S2 两个相同菌种

Table 2. Antagonistic reaction between species of *Dictyophora rubrovalvata* Zang, ji et liou
表 2. 红托竹荪菌种间拮抗反应

编号	S1	S2	备注
S1	-	+	避光培养
S2	+	-	避光培养

注：“+”表明菌株之间有拮抗反应，“-”表明菌株间没有拮抗反应。

表 1、图 1 为项目组人员分别于 2018 年 5 月和 8 月调查当地农户，踩点采集到的野生红托竹荪生境，与文献报道相符合，生长在竹林地里。图 2 为超净工作台内子实体组织分离接种在试管培养基后，放置在 25℃ 恒温培养箱内，竹荪生长 50 天后菌丝长满管。图 3 为栽培料灭菌后接入母种 25℃，培养 90 天菌丝长满瓶，菌丝洁白，浓密，长势良好。图 4、图 5、图 6 为栽培种接种到平板培养基，培养箱 25℃ 对峙培养 20 天产生的性状，图 4 不同栽培种发生拮抗反应，两不通栽培种菌丝形成一道隔离线，互不相让。

图 5、图 6 为两个相同栽培种培养后菌丝融合在一起，没有发生拮抗现象。

3.2. 讨论

采自贵州贵定、大方的野生红托竹荪经组织分离驯化母种(图 2)、栽培种(图 3)，农艺性状表现：菌丝洁白，浓密，生长旺盛，性状良好。食用菌栽培成功与否，高产优质的栽培菌种是关键之一。竹荪母种、栽培种在转管继代培养多代之后，菌株优良性状退化，因此不断采集野生菌株子实体，通过分离菌种、驯化、栽培试验，选育优良菌株及区别性鉴定生产菌种，是竹荪生产的重要环节[8]。判别野生菌株是否为适合人工栽培的优良菌株，需要对菌株分离驯化，并进行栽培小试，中试，根据出菇情况、菌株生长条件、农艺性状及产量，确定是否为优良菌种。本文所采两株野生竹荪，在分离驯化成栽培种后，还需要做出菇试验，才能确定是否为优良菌株菌种。

母种分离可通过孢子、子实体和菌丝体三个途径获得。孢子萌发率低，萌发慢，菌丝长满琼脂斜面需 90~100 天；菌丝体染杂率高，分离技术要求严格，需 50~60 天长满琼脂斜面；子实体的组织分离培养，菌丝萌发快，技术较易掌握，需 40~50 天长满琼脂斜面[9]。子实体分离接种部位包括菌柄、菌裙、中包被、基质层、产孢体、内包被、原基层，生产中菌种分离部位多采用菌柄、菌裙。

区别性鉴定拮抗实验见图 4、图 5、图 6，表 2，红托竹荪菌丝在培养皿内生长，不同时期菌丝形态略有差异。5 天左右开始萌发，初期菌丝洁白，短而融，10 d~30 d 菌丝变长，颜色洁白，浓密，粗壮。温度超过 28℃，菌丝出现变红和倒伏症状。25℃条件，20 天左右，不同菌种菌落相遇互不相让，形成一道明显的白色隔离带，两菌落都不能越过隔离带继续生长，表现出拮抗反应，说明亲缘关系较远。30 天左右气生菌丝布满培养皿，隔离带颜色加深，拮抗更为明显。同一菌种间两菌落菌丝表面平整，无色素沉积或菌丝隆起等现象，菌丝融合在一起生长，无拮抗现象存在。说明红托竹荪拮抗实验对红托竹荪不同菌种进行区分鉴定是可行的，由于操作方便、成本低，且鉴定结果易于观察，在生产上适合推广使用。

基金项目

贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2016]2600)；贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2017]2510-1)；贵州省基金项目：黔科合基础[2018]1147。

参考文献

- [1] 朱利泉, 邓艳霞. 竹荪的研究与利用[J]. 中国野生植物资源杂志, 2000(3): 21-23.
- [2] 潘高潮, 龙汉武, 吴迪, 等. 贵州省红托竹荪菌蛋烂皮病的发生与防治[J]. 中国食用菌, 2015, 34(5): 72-75.
- [3] 邹方伦, 宋培浪, 等. 中国·贵州高等真菌原色图鉴[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2009.
- [4] 邹方伦, 宋培浪, 等. 贵州特色菌物和珍稀菌类的栽培与驯化研究[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2007.
- [5] 吴迪, 邓琴, 秦樊鑫, 等. 黔产红托竹荪基地土壤中重金属含量及其生态危害风险评价[J]. 土壤通报, 2013, 44(3): 719-722.
- [6] 姚方杰, 于娅, 方明, 等. 黑木耳菌种区别性鉴定的对峙培养法及其应用[J]. 食药用菌, 2017, 25(3): 163-165.
- [7] 农业部. 食用菌菌种区别性鉴定拮抗反应[S]. 中华人民共和国农业行业标准, NT/T 1845-2010, 北京: 中国农业出版社.
- [8] 沈伯葵, 郁世军. 竹荪菌种分离培养的研究[J]. 林业科技开发, 1993(1): 37-38.
- [9] 陈仲春, 雷华忠, 杨仲材. 竹荪驯化及栽培试验[J]. 农业科技通讯, 1980(8): 24-25.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2330-1724，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：ojs@hanspub.org