

两种乳菇菌丝生长的最适培养基与菌根合成

王冉^{1,2} Guerin-Laguette Alexis³ 于富强^{1,2✉}

①中国科学院昆明植物研究所东亚植物多样性与生物地理学重点实验室 云南 昆明 650201

②西南林业大学-中国科学院昆明植物研究所联合应用真菌研究所 云南 昆明 650224

③新西兰植物与食品研究所 新西兰 基督城 8053

摘要: 通过测量菌丝直径和干重对松乳菇 (rcb-74) 和靓丽乳菇 (rll-107, rmsh-118) 进行最适菌丝生长培养基的筛选。结果表明所有菌株均在改良的 biotin-aneurine-folic acid (BAF) 培养基上表现出较大的菌丝直径以及最大菌丝干重。用改良的 BAF 培养基制备乳菇液体菌丝, 接种云南松、马尾松和油松, 并在 13–30d 后发现 rcb-74 与云南松和油松形成菌根, rll-107 与马尾松形成菌根, rmsh-118 与云南松形成菌根。

关键词: 乳菇, 培养基, 菌根合成

[引用本文] 王冉, Guerin-Laguette Alexis, 于富强, 2020. 两种乳菇菌丝生长的最适培养基与菌根合成. 菌物学报, 39(7): 1346-1355

Wang R, Guerin-Laguette A, Yu FQ, 2020. Optimum media for hyphal growth and mycorrhizal synthesis of two *Lactarius* species. Mycosystema, 39(7): 1346-1355

Optimum media for hyphal growth and mycorrhizal synthesis of two *Lactarius* species

WANG Ran^{1,2} Guerin-Laguette Alexis³ YU Fu-Qiang^{1,2✉}

①CAS Key Laboratory for East Asia Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650201, China

②SWFU-KIB CAS Joint Institute for Applied Mycology, Kunming, Yunnan 650224, China

③The New Zealand Institute of Plant and Food Research Limited, Christchurch 8053, New Zealand

Abstract: Optimum culture medium for *Lactarius deliciosus* rcb-74, *L. vividus* rll-107 and *L. vividus* rmsh-118 was screened by measuring diameter and dry weight of mycelia. The results showed that all isolates had relatively large diameter of mycelia and the maximum dry weight on modified biotin-aneurine-folic acid (BAF) medium. *Lactarius* mycelium cultured in modified BAF liquid medium was inoculated to *Pinus yunnanensis*, *P.*

基金项目: 国家自然科学基金 (31901204); 中国科学院昆明植物研究所引进人才项目 (Y9627111K1)

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (31901204), and Talent Introduction Project of Kunming Institute of Botany (Y9627111K1).

✉ Corresponding author. E-mail: fqyu@mail.kib.ac.cn

Received: 2019-11-11, accepted: 2019-11-29

massoniana and *P. tabuliformis*, and mycorrhizae were observed in combinations of *L. deliciosus* rcb-74 with *P. yunnanensis* and *P. tabuliformis*, combination of *L. vividus* rll-107 with *P. massoniana*, as well as combination of *L. vividus* rmsh-118 with *P. yunnanensis* in 13–30 days.

Key words: *Lactarius*, media, mycorrhizal synthesis

乳菇属 *Lactarius* Pers.的所有种均为外生菌根真菌, 主要与松科、壳斗科和桦木科等经济树种形成外生菌根。松乳菇组 *Lactarius* sect. *Deliciosi* 是乳菇属中的一个单系群, 该组成员包括大部分可食用或药用且美味的乳菇(戴玉成和杨祝良 2008; 戴玉成等 2010), 这些乳菇具有红、橙黄或蓝色的乳汁, 且大多数子实体伤后变蓝绿色(Nuytinck & Verbeken 2007; 王向华 2008), 主要生长于高山、亚高山带的针叶林。广为采食且具有抗肿瘤等功能的松乳菇 *L. deliciosus* (L.) Gray、红汁乳菇 *L. hatsudake* Nobuj. Tanaka 和橙红乳菇 *L. akahatsu* Nobuj. Tanaka 等具有商业价值的美味乳菇都属于该组成员(Wu et al. 2019)。Poitou et al. (1989) 用松乳菇接种海岸松, 首次获得松乳菇子实体。此后对松乳菇的栽培研究有了不断的进展, 且人工合成菌根成为实现乳菇栽培的重要途径。新西兰植物与食品研究所从 90 年代末开始研究松乳菇的栽培, 通过接种方法的改进实现了松乳菇与辐射松 *Pinus radiata* 的菌根合成, 并在菌根苗移栽后的 1 年半成功获得松乳菇子实体(Wang et al. 2002), 此后种植园内的松乳菇产量也在不断上升(Guerin-Laguette et al. 2014)。除了松乳菇, Yamada et al. (2001) 在实验室条件下合成了橙红乳菇 *L. akahatsu* 与赤松 *P. densiflora* 的菌根, 并在半自然环境下获得了子实体。靛蓝乳菇 *L. indigo* 与新热带界松树菌根的成功合成在一定程度上弥补了靛蓝乳菇菌根研究方面的匮乏, 同时为靛蓝乳菇用于中美洲再造林计划提供了可能性(Flores et al. 2005)。

Nuytinck & Verbeken (2007) 的工作表明松乳菇组在世界范围内包括 38 个分类群, 其中中

国西南地区包括 9 个(Nuytinck et al. 2006), 除常见的松乳菇和红汁乳菇以外, 一些新种近年来陆续被发表(Wang et al. 2015; Wang 2016; Han et al. 2019), 对于该组成员的分类工作还在进行中。中国西南地区有着丰富的乳菇资源, 作为一类贸易量较大的群众喜食的野生食用菌, 乳菇在分类、菌丝发酵和营养成分等方面都有着大量的研究(计红芳等 2006; 杨颖等 2013; 傅雁辉等 2017)。在栽培方面, 现已有许多关于乳菇菌根合成的文章发表, 主要集中于松乳菇和红汁乳菇(杨艳美 2011; 薛振文等 2014), 但缺乏相应的形态和分子证据。另外谭著明等(2006, 2008) 20 年前在湖南建立了超过 65 公顷的红汁乳菇和马尾松种植园, 据报道年产量超过 675 公斤/公顷, 但除此之外再没有相关的报道。为了实现乳菇的栽培与持续利用, 本研究选择了松乳菇和靓丽乳菇 *L. vividus* X.H. Wang, Nuytinck & Verbeken 作为研究对象, 首先比较了菌丝在不同培养基内生长速率和干重, 接着使用两种快速且易于观察的无土菌根合成方法(Guerin-Laguette et al. 2000), 对这两种乳菇与 3 种中国松树种进行了菌根合成, 旨在选出合适的菌丝生长培养基和宿主植物, 为松乳菇组的乳菇菌根化苗的生产奠定基础, 也为其他种类乳菇的栽培提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 真菌材料: 松乳菇(rcb-74)于2015年6月29日购买于云南省昆明市茨坝农贸市场; 靓丽乳菇(rll-107)于2015年9月3日采自贵州省龙里县龙山镇新场村春菜园; 靛蓝乳菇(rmsh-118)

于 2015 年 9 月 10 日购买自昆明市木水花野生菌市场。凭证标本均存放于中国科学院昆明植物研究所隐花植物标本馆（HKAS）。

1.1.2 种子材料：云南松（*Pinus yunnanensis*, PY）购买自昆明；油松（*P. tabuliformis*, PT）购买自江苏；马尾松（*P. massoniana* Lamb., PM）采自贵州。

1.1.3 培养基：M+P[MMN（Marx 1969）与 PDA 等量混合]，modified BAF [BAF 培养基（Moser 1960），微量元素营养液（Wong & Fortin 1989），25mmol/L 的 MES 缓冲液]，PDA，MYA（Endo *et al.* 2014）。培养基组成成分见表 1。

1.2 方法

1.2.1 乳菇子实体组织分离与培养：轻拭乳菇表面杂物，切除菌柄，用 75%的酒精对菌盖表面简单消毒。超净台内用无菌手术刀轻划乳菇菌盖表面，然后掰开子实体，切取菌肉置于 M+P 培养基上。将接种好的培养基置于 23℃培养箱中黑暗培养。

1.2.2 不同培养基上菌丝的生长：一个月后，选择生长状态良好的菌丝在 M+P 琼脂培养基上再培养。再培养的菌丝生长 1 个月后，配置 M+P、modified BAF、PDA 和 MYA 琼脂培养基，待培养基凝固后，在其表面放上直径为 7cm 的无菌玻璃纸。打孔器切取菌丝块置于不同培养基上，不同菌丝与不同培养基的组合各 5 个重复。所有培养基均置于 23℃培养箱中黑暗培养。1 个月 后，用十字交叉法测量菌丝直径，然后将菌丝从玻璃纸上取下置于 80℃的烘箱中 24h 烘干，称其干重。

1.2.3 种子萌发：种子用蒸馏水浸泡 48h，取出种子后用 30%的 H₂O₂ 浸泡 10min 表面消毒，再用无菌水冲洗种子以去除表面残留的 H₂O₂。灭过菌的蛭石和珍珠岩按 1:1 的体积比混合均匀后平铺于育苗盆中，放入种子后再铺上厚薄均匀的一层基质。

表 1 不同培养基中营养成分的组成

Table 1 Composition of nutrient in different media

成分 Compounds	PDA	MYA	M+P	Modified BAF
氯化钠 NaCl (g)	-	-	0.0125	0.025
氯化钙 CaCl ₂ (g)	-	-	0.025	0.05
硫酸镁 MgSO ₄ (g)	-	-	0.05	0.15
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄ (g)	-	-	0.25	0.34
氯化铵 NH ₄ Cl (g)	-	-	-	0.56
磷酸氢二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄ (g)	-	-	0.125	-
2-(N-吗啉)乙磺酸 MES (g)	-	-	-	1.95
肌醇 Inositol (g)	-	-	-	0.05
硫胺素 VB1 (mg)	-	-	0.025	0.1
微量营养 Morizet (mL)	-	-	-	0.2
1%柠檬酸铁 1% ferric citrate (mL)	-	-	0.75	3
酵母提取物 Yeast extract (g)	-	1	0.25	0.2
麦芽提取物 Malt extract (g)	-	10	0.25	-
马铃薯提取物 Potato extract (g)	200	-	100	-
蛋白胨 Peptone (g)	-	-	-	2
葡萄糖 Glucose (g)	20	-	20	20

注：所有营养成分的量均为 1L 培养基中所含的量；培养基的 pH 均用 5mol/L 的 HCl 或 NaOH 调试至 5.6–6.0

Note: Quantity of all compounds are given for 1L of media; pH of media was adjusted to 5.6–6.0 with HCl or NaOH (5mol/L).

1.2.4 菌根合成：袋内菌根合成：（1）液体菌丝的制备：根据 1.2.2 中不同培养基上菌丝生长的结果，选择最适的培养基配置液体培养基。将生长良好的菌丝以 1cm³ 的大小切块后置于培养皿（9cm）内，每个培养皿内放入 4–6 块菌丝块。加入液体培养基，加入的量刚好没过菌丝块，置于 23℃培养箱暗培养。（2）菌根合成：种子萌发 2 个月后，选择侧根发达的松苗进行接种。液体培

培养基内菌丝生长 1 个月后, 选择生长状态良好的菌丝进行接种。无菌水清洗松苗根部, 去除根上的基质。将培养菌丝的液体培养基倒出, 冲洗菌丝数遍后将菌丝切成大约 1cm^3 大小。松苗根部放入装有无菌层析纸的 PVC 自封袋内, 用无菌镊子把松苗的侧根展开, 把切好的菌丝块 (3–5 块) 小心放到松苗侧根附近, 最后加入 25mL MES 缓冲液。所有自封袋放入不透光的容器中, 并在人工气候箱内进行培养 (光照 18h, 温度 23°C ; 黑暗 6h, 温度 18°C ; 光合有效辐射: $100\mu\text{mol}^2/\text{s}$)。不同菌种与不同树种的组合为: rcb-74×PY/PT/PM、rll-107×PY/PT/PM、rmsh-118×PY/PT/PM, 每种组合各 3 个重复。对照组为不接种的 PY、PT、PM, 每个对照各 3 个重复。

培养皿内菌根合成: 基质配制: 蛭石:珍珠岩:草炭:松树皮=4:2:2:1 (体积比), 基质按比例混合后 121°C 下灭菌 60min, 间隔 3–4d 后再灭一次。菌根合成: 液体菌丝的处理与上文袋内菌根合成类似。将松苗放入 $10\text{cm}\times 10\text{cm}$ 的方形无菌培养皿中, 把清洗好的菌丝块 (3–5 块) 小心放到松苗侧根附近, 然后倒入一薄层灭好菌的基质, 加入 10mL MES 缓冲液。将培养皿封口后放入不透光的容器中, 在人工气候箱内进行培养 (18h 光照, 23°C ; 6h 黑暗, 18°C ; 光合有效辐射: $100\mu\text{mol}^2/\text{s}$)。

1.2.5 菌根形态及分子鉴定: 定期在体式显微镜下观察袋内及培养皿中菌根合成的情况。乳菇菌根颜色为浅黄色、亮黄色、橙黄色至橙红色, 菌根表面有或长或短的囊状体, 显微镜下可观察到浅黄色、亮黄色、橙黄色或橙红色乳汁细胞 (Guerin-Laguette 1998; Guerin-Laguette *et al.* 2000a; Wang *et al.* 2002)。试剂盒提取菌根 DNA, 并扩增其 ITS 片段。扩增引物为 ITS1F: 5'-GGTCATTTAGAGGAAGTAA-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。25 μL PCR 体系中包含 1 μL DNA, 正反向引物 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 1 μL , 2.5 μL 10× buffer (Mg^{2+}),

1.5 μL dNTPs (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 1 μL BSA (1%), 0.5 μL MgCl_2 (25mmol/L), 0.3U *Taq* 酶。PCR 条件为: 95°C 5min; 94°C 1min, 50°C 1min, 72°C 1min, 35 个循环; 72°C 10min。PCR 产物经 1.2%的凝胶电泳检测后, 送生物公司进行测序。

1.2.6 数据分析: 不同培养基上菌丝的直径和干重用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析 (ANOVA)。用于接种的乳菇子实体, 菌丝以及合成的菌根均进行 DNA 鉴定, 并使用 BLAST 对获得的所有序列与 GenBank 中的序列进行比对, 相似度大于 98% 的作为一个 OTU。使用 Sequencher (4.1.4) 拼接与编辑序列, 在 BioEdit v7.0.9 中进行比对和自动排序, 排好的序列用 MEGA 6.0 中的 Neighbor-Joining 建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 不同培养基上菌丝生长情况

对不同培养基上生长的菌丝 (图 1) 进行直径和干重的测量, 测量结果见表 2、图 2、图 3。根据结果可知 4 种培养基上的菌丝直径与生物量的测定结果不一致。

rcb-74 的菌丝直径表现为: MYA>PDA>modified BAF>M+P, MYA 培养基上菌丝的直径最大, 且与另外 3 种培养基的差异达到极显著水平 ($P<0.01$)。其次为 PDA, 然后为 modified BAF (PDA 与 modified BAF 上的菌丝直径差异不显著, $P>0.05$), 菌丝直径最小的为 M+P; rcb-74 的菌丝干重表现为: M+P>modified BAF>PDA>MYA, 菌丝直径最小的 M+P 培养基上菌丝干重最大, 其次为 modified BAF (M+P 与 modified BAF 上的菌丝干重差异不显著)。在 MYA 培养基上生长的菌丝干重最低。

rll-107 和 rmsh-118 的菌丝直径都表现为 MYA>modified BAF>M+P>PDA。MYA 培养基上的菌丝直径最大, 且与另外 3 种培养基的差异达到极显著水平 ($P<0.01$)。

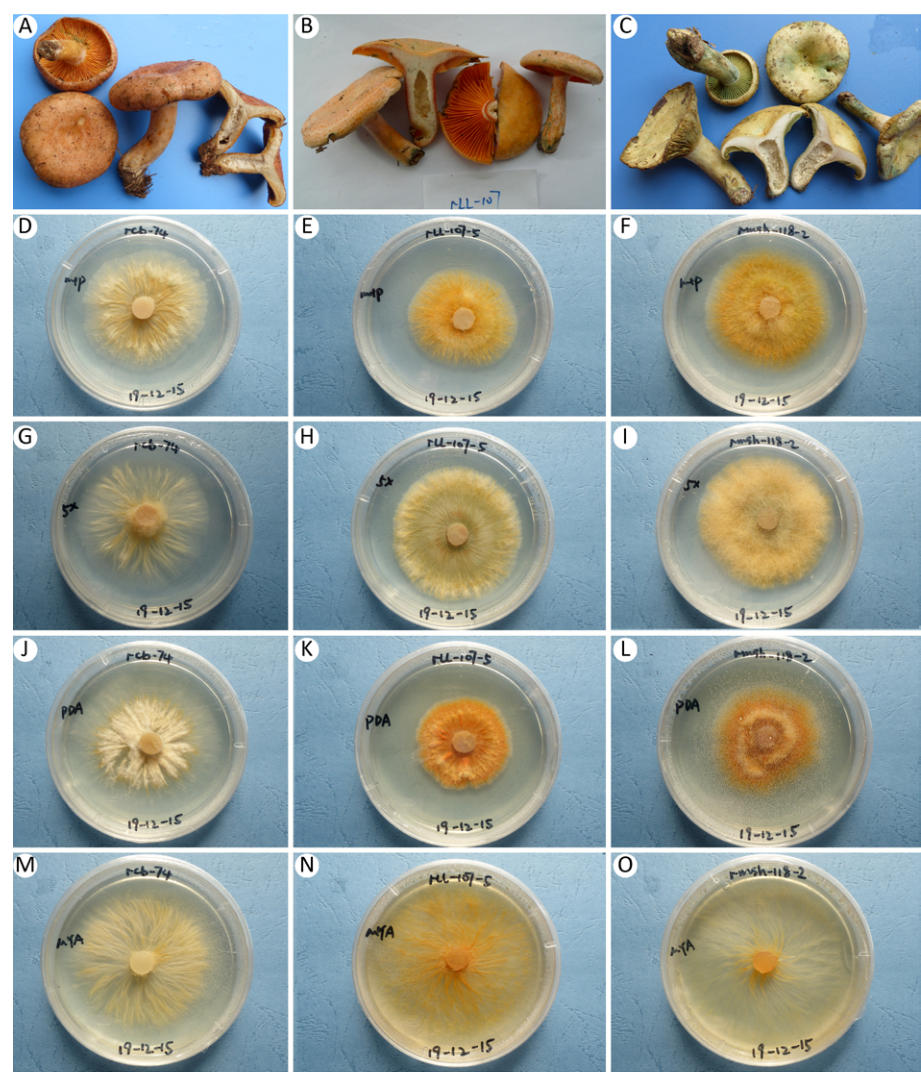


图 1 A–C: 松乳菇 (A: rcb-74) 和靓丽乳菇 (B: rll-107, C: rmsh-118); D–F: M+P 培养基 (D: rcb-74, E: rll-107, F: rmsh-118); G–I: Modified BAF 培养基 (G: rcb-74, H: rll-107, I: rmsh-118); J–L: PDA 培养基 (J: rcb-74, K: rll-107, L: rmsh-118); M–O: MYA 培养基 (M: rcb-74, N: rll-107, O: rmsh-118)

Fig. 1 A–C: *Lactarius deliciosus* (A: rcb-74) and *Lactarius vividus* (B: rll-107, C: rmsh-118); D–F: M+P medium (D: rcb-74, E: rll-107, F: rmsh-118); G–I: Modified BAF medium (G: rcb-74, H: rll-107, I: rmsh-118); J–L: PDA medium (J: rcb-74, K: rll-107, L: rmsh-118); M–O: MYA medium (M: rcb-74, N: rll-107, O: rmsh-118).

表 2 不同菌种在 4 种培养基上的菌丝直径以及菌丝干重

Table 2 Mycelial diameter and dry weight of different isolates on four media

培养基 Media	<i>Lactarius deliciosus</i> rcb-74		<i>L. vividus</i> rll-107		<i>L. vividus</i> rmsh-118	
	直径 Diameter (cm)	干重 Dry weight (g)	直径 Diameter (cm)	干重 Dry weight (g)	直径 Diameter (cm)	干重 Dry weight (g)
M+P	5.03±0.251	0.143±0.0005	4.13±0.115	0.136±0.0012	5.06±0.115	0.136±0.0005
Modified BAF	5.63±0.153	0.141±0.0015	5.13±0.058	0.147±0.0025	5.10±0.000	0.146±0.0021
PDA	5.73±0.115	0.140±0.0017	3.20±0.000	0.137±0.0015	4.03±0.251	0.134±0.0025
MYA	6.43±0.115	0.125±0.0032	6.53±0.058	0.112±0.0020	6.57±0.115	0.103±0.0025

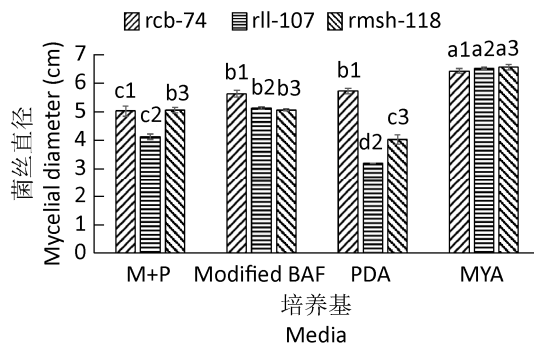


图 2 不同菌种在 4 种培养基上的菌丝直径

Fig. 2 Mycelial diameter of different isolates on four media.

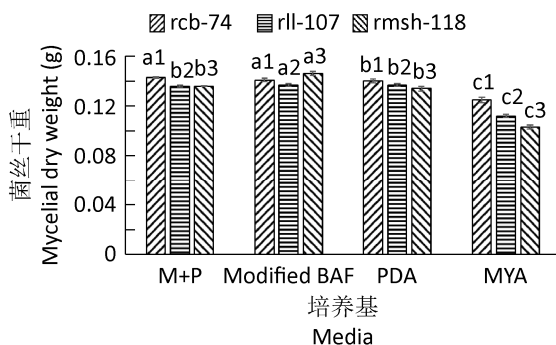


图 3 不同菌种在 4 种培养基上的菌丝干重

Fig. 3 Mycelial dry weight of different isolates on four media.

rll-107 的菌丝干重表现为: modified BAF>PDA>M+P>MYA, modified BAF 培养基上菌丝干重最大, 且与另外 3 种培养基的差异达到极显著水平 ($P<0.01$)。rmsh-118 的菌丝干重表现为: modified BAF>M+P>PDA>MYA。modified BAF 培养基上菌丝干重最大, 且与另外 3 种培养基的差异达到极显著水平 ($P<0.01$)。

以生长速度相对较快、生物量高的培养基作为标准 (孙磊等 2015), 选择 modified BAF 作为菌根合成实验的最适培养基。

2.2 菌根合成

根据不同培养基菌丝生长的实验结果, 选择 modified BAF 作为液体培养基培养菌丝。菌丝接种 3 种不同树种后的 13–30d, 袋内 rcb-74/PT、rll-107/PM、rmsh-118/PY 形成菌根 (图 4A–4C)。13–30d 后培养皿内 rcb-74/PY、rll-107/PM、

rmsh-118/PY 形成菌根 (图 4D–4F)。菌根颜色为浅黄色、黄色、亮黄色至棕色, 表面光滑至长满短针状囊状体菌丝 (图 4), 显微镜下清晰可见浅黄或黄色乳汁细胞 (图 2)。菌根周围有黄色或绿色的菌索 (图 4K, 4L)。菌根 ITS PCR 扩增产物测序后与 GenBank 中的序列进行比对, 将菌根、子实体和菌丝的序列进行排序后用 Mega 建 NJ 树 (图 5), 外类群为 *Lactarius rufus*。菌丝和菌根的序列均提交 GenBank 并获得相应的序列号 (表 3)。

3 讨论

本研究通过分析不同乳菇菌种在不同培养基上的菌丝直径和干重, 筛选出了松乳菇和靓丽乳菇菌丝生长的最适培养基, 根据实验结果, 两种乳菇菌丝都在营养丰富的 modified BAF 培养基上表现出较快的生长速度和最大生物量。在 MYA 培养基上, 所有菌丝的生长速度最快, 但菌丝均表现为稀疏、细弱和颜色暗淡, 最终生物量均小于另外 3 种培养基。实验中所有培养基的 pH 均设为 5.5–6.0, 菌丝生长温度设为 23℃, 这是根据乳菇采集地点土壤的 pH 以及 Guerin-Laguette *et al.* (2000) 的报道设置的。但是为了获得更加准确的信息, 实现标准化的生产, 后期将对 pH 和温度进行优化, 挑选更合适的菌丝生长条件。在本研究中, 利用两种易观察的方法, 将两种乳菇的菌丝与 3 种中国松树树种进行菌根合成, 并在 13–30d 内获得了松乳菇与云南松和油松的菌根, 靓丽乳菇与云南松和马尾松的菌根。菌根合成实验有助于确定真菌-植物宿主相容性 (Giomaro *et al.* 2005), 且菌根的形成与优劣决定了接种后的菌根真菌是否有能力与其他土壤中的菌根真菌进行竞争, 并适应环境和顺利形成子实体 (Kennedy 2010)。菌丝的质量、宿主植物的选择、培养基质或土壤都是影响菌根生长的重要因素 (Zambonelli *et al.* 2010, 2015;

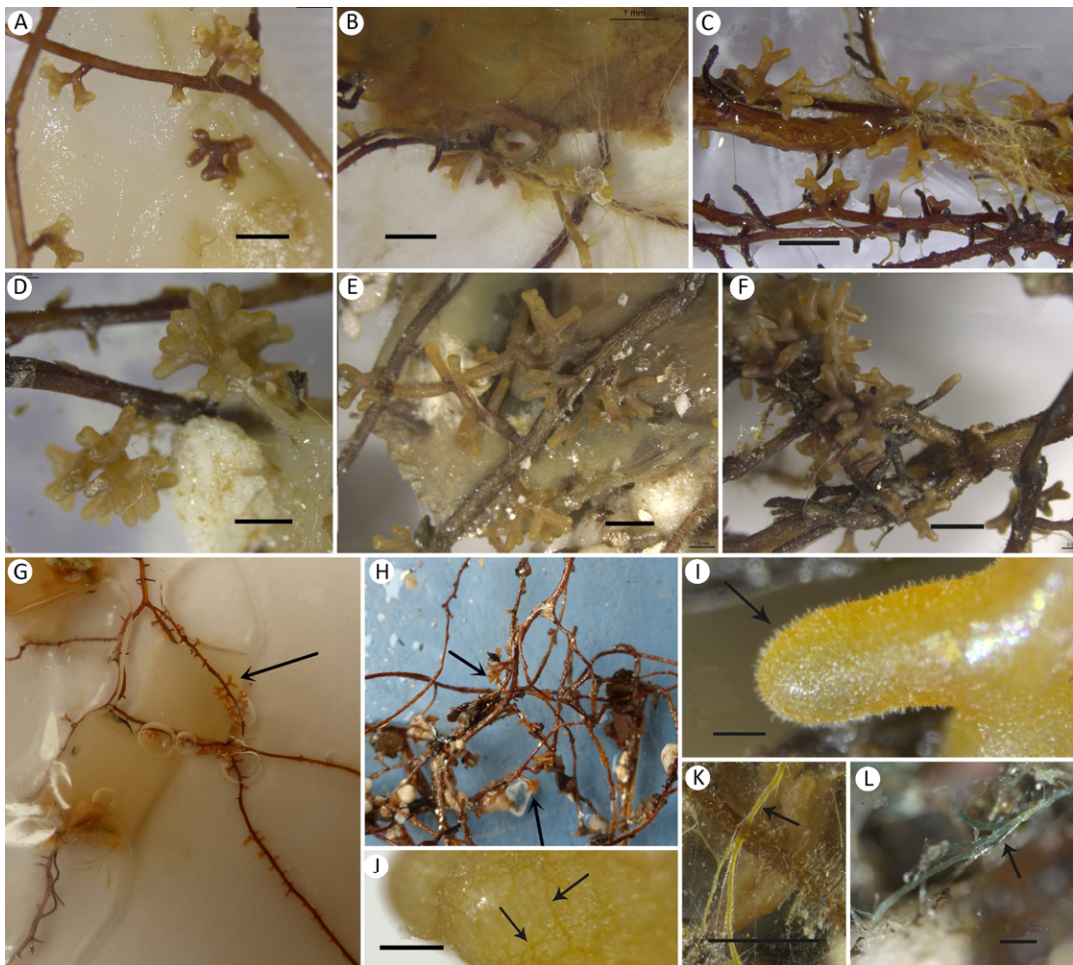


图 4 A–C: 袋内菌根 (A: rcb-74/PT, B: rll-107/PM, C: rmsh-118/PY); D–F: 培养皿内菌根 (D: rcb-74/PY, E: rll-107/PM, F: rmsh-118/PY); G: 袋内形成菌根的根系 (箭头处为菌根); H: 培养皿内形成菌根的根系 (箭头处为菌根); I: 囊状体菌丝 (箭头); J: 乳汁管 (箭头); K, L: 菌索 (箭头)。标尺: I, J=0.5mm; A–H, K, L=1mm. PT: 油松; PM: 马尾松; PY: 云南松

Fig. 4 A–C: Mycorrhizae in sack culture (A: rcb-74/PT, B: rll-107/PM, C: rmsh-118/PY); D–F: Mycorrhizae in plate culture (D: rcb-74/PY, E: rll-107/PM, F: rmsh-118/PY); G: Root system with mycorrhizae in sack culture (arrow mycorrhizae); H: Root system with mycorrhizae in plate culture (arrow mycorrhizae); I: Cystidia-like hyphae (arrow); J: Laticifer (arrow); K, L: Rhizomorph (arrow). Bars: I, J=0.5mm; A–H, K, L=1mm. PT: *Pinus tabulaeformis*; PM: *Pinus massoniana*; PY: *Pinus yunnanensis*.

lotti *et al.* 2012, 2016)。松乳菇组的成员主要生长于高山、亚高山带的针叶林，本研究选择了松属的 3 个种，分别是西南地区的本土树种云南松（陈飞 2012）、广布于华中、华南地区的马尾松（张雷等 2011）以及北方广布种油松（郭泉水和阎洪 1995）。实验得到了能够形成良好菌根的真菌×树种组合。Gomes *et al.*（2016）的研究表明松乳菇可以与杜鹃花科的草莓树 *Arbutus*

unedo 形成菌根，且菌根在基质中的生长表现出了持久性。这在很大程度上丰富了乳菇的宿主范围，为宿主植物的选择提供更多可能性。本研究使用的两种菌根合成方法是参照 Guerin-Laguet *et al.*（2000）的方法加以改进的，这两种方法有助于观察菌根的形成，并能快速判断真菌与树种形成菌根的可能性。下一步我们会尝试更多的真菌树种组合，挑选最优的基质，将菌根苗移栽野

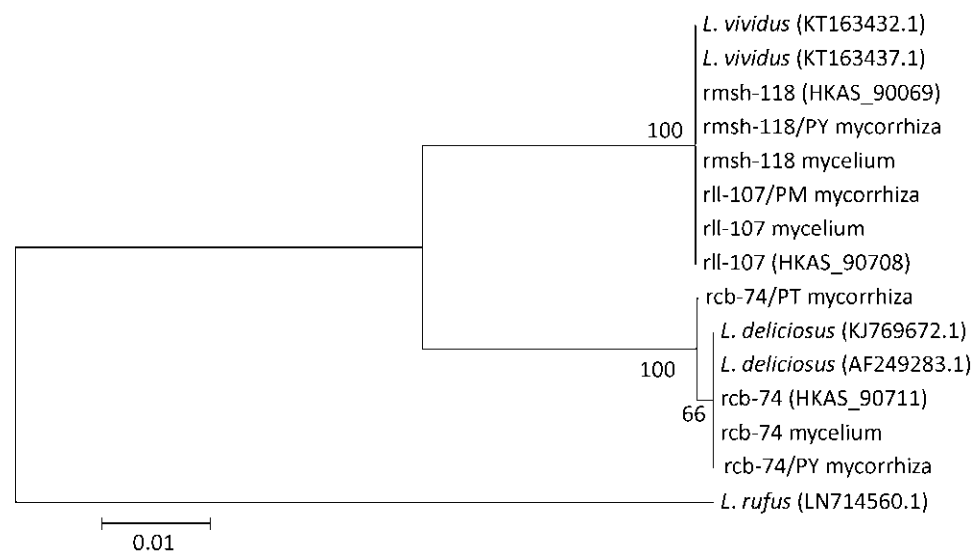


图 5 以 *Lactarius rufus* 为外类群，基于乳菇子实体、菌丝与菌根的 ITS 构建的 Neighbor-Joining 进化树 PT：油松；PM：马尾松；PY：云南松

Fig. 5 Neighbor-Joining phylogenetic analysis based on *Lactarius* fruiting bodies, mycelium and mycorrhizae, with *Lactarius rufus* as outgroup. PT: *Pinus tabulaeformis*; PM: *Pinus massoniana*; PY: *Pinus yunnanensis*.

表 3 乳菇菌丝与菌根的序列在 GenBank 中的序列号

Table 3 GenBank accession numbers of *Lactarius* mycelium and mycorrhiza

序号 No.	菌丝 Mycelium			菌根 Mycorrhiza		
编号 No.	wr-74	wr-107	wr-118	mwr-74	mwr-107	mwr-118
序列号 Accession No.	KY661913	KY661923	KY661925	MG457173	MG457174	MG457175

外，对其生长和菌根的持久性进行监测，为乳菇的栽培和种植园的建立提供科学依据。

致谢：感谢中国科学院昆明植物研究所王向华、黄兰兰、汪延良在试验和文章撰写中所给予的帮助。

[REFERENCES]

Chen F, 2012. Relationship between climate change and geographic distribution community structure and evolution trend of *Pinus yunnanensis*. PhD Dissertation, Chinese Academy of Forestry Sciences, Beijing. 1-48 (in Chinese)

Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27: 801-824 (in Chinese)

Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29: 1-21 (in Chinese)

Endo N, Kawamura F, Kitahara R, Sakuma D, Fukuda M,

Yamada A, 2014. Synthesis of Japanese *Boletus edulis* ectomycorrhizae with Japanese red pine. *Mycoscience*, 55(5): 405-416

Flores R, Díaz G, Honrubia M, 2005. Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. *Mycorrhiza*, 15: 563-570

Fu YH, Nie L, Xia F, Shu QF, Wei SJ, 2017. Study on liquid fermentation medium for the cultivation of *Lactarius deliciosus*. *Biological Disaster Science*, 40(3): 199-204 (in Chinese)

Giomaro GM, Sisti D, Zambonelli A, 2005. Cultivation of edible ectomycorrhizal fungi by *in vitro* mycorrhizal synthesis. In: Declerck S, Strullu DG, Fortin JA (eds.) *In vitro* culture of mycorrhizas. *Soil Biology*. Vol. 4. Springer, Berlin, Heidelberg. 253-267

Gomes F, Suárez D, Santos R, Silva M, Gaspar D, Machado H, 2016. Mycorrhizal synthesis between *Lactarius deliciosus*, and *Arbutus unedo* L. *Mycorrhiza*, 26(3): 177-188

- Guerin-Laguette A, 1998. Les lactaires à lait rouge: mycorrhization contrôlée des pins et caractérisation moléculaire. Application à l'étude de la compétence écologique et de la compétitivité d'isolats de *Lactarius deliciosus* [The red milk cap mushrooms: controlled mycorrhization of pines and molecular characterization. Application to study the ecological competence and the competitiveness of isolates of *Lactarius deliciosus*] in French with English summary, PhD Dissertation, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 10-48
- Guerin-Laguette A, Cummings N, Butler RC, Willows A, Hesom-Williams N, Li SH, Wang Y, 2014. *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand: towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. *Mycorrhiza*, 24(7): 511-523
- Guerin-laguette A, Plassard C, Mousain D, 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(9): 790-799
- Guo QS, Yan H, 1995. Study on the influence of climate change on the geographical distribution of *Pinus tabulaeformis*. *Scientia Silvae Sinicae*, 31(5): 393-402 (in Chinese)
- Han Y, Liang CZ, Liu PG, Nuytinck J, Wang XH, 2019. *Lactarius guangdongensis* sp. nov. (Russulaceae, Russulales), a species of *Lactarius* sect. *Deliciosi* growing with a vulnerable five-needle pine, *Pinus kwangtungensis*. *Phytotaxa*, 393(3): 278-286
- Ji HF, Yang Q, Song RQ, 2006. Advances on applied research of genus *Lactarius* fungi. *Forestry Science and Technology Forestry*, 31(3): 28-30 (in Chinese)
- Kennedy P, 2010. Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytologist*, 187(4): 895-910
- Iotti M, Piattoni F, Leonardi P, Hall IR, Zambonelli A, 2016. First evidence for truffle production from plants inoculated with mycelial pure cultures. *Mycorrhiza*, 26(7): 793-798
- Iotti M, Piattoni F, Zambonelli A, 2012. Techniques for host plant inoculation with truffles and other edible ectomycorrhizal mushrooms. In: Zambonelli A, Bonito G (eds.) *Edible ectomycorrhizal mushrooms*. *Soil Biology*. Vol. 34. Springer, Berlin, Heidelberg. 145-161
- Marx DH, 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-163
- Moser M, 1960. Die Gattung Phlegmacium. Die Pilze Mitteleuropas's. 4.J. Klinkhardt, Bad, Heilbrunn. 1-64
- Nuytinck J, Verbeken A, 2007. Species delimitation and phylogenetic relationships in *Lactarius* section *Deliciosi* in Europe. *Mycological Research*, 111: 1285-1297
- Nuytinck J, Wang XH, Verbeken A, 2006. Descriptions and taxonomy of the Asian representatives of *Lactarius* sect. *Deliciosi*. *Fungal Diversity*, (s1-2): 21-31
- Poitou N, Mamoun M, Ducamp M, Guinberteau J, Olivier JM, 1989. Controlled mycorrhization and experimental cultivation in the field of *Boletus* (=Suillus) *granulatus* and *Lactarius deliciosus*. *Mushroom Sci*, 12(Part II): 551-564
- Sun L, Cheng XH, Li WH, Ou SP, Yang T, 2015. Comparison of the colony diameter diffusion method and dry weight method in optimizing the culture condition of *Hypsizygus marmoreus* strain. *Edible Fungi of China*, 34(3): 28-32 (in Chinese)
- Tan ZM, Danell E, Shen AR, Fu SC, 2008. Successful cultivation of *Lactarius hatsutake*-an evaluation with molecular methods. *Acta Edulis Fungi*, 15(3): 88-91 (in Chinese)
- Tan ZM, Zhang ZG, Pu XY, Fu SC, Zhang P, 2006. Morphological and structural characteristics of *Lactarius hatsudake* and synthetic mycorrhiza. *Acta Edulis Fungi*, 13(2): 36-40 (in Chinese)
- Wang XH, 2008. The genus *Lactarius* in southwestern China: taxonomy, ontogeny, and floristic biogeography. PhD Dissertation, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming. 6-45 (in Chinese)
- Wang XH, 2016. Three new species of *Lactarius* sect. *Deliciosi* from subalpine-alpine regions of central and southwestern China. *Cryptogamie Mycologie*, 37(4): 493-508
- Wang XH, Nuytinck J, Verbeken A, 2015. *Lactarius vividus* sp. nov. (Russulaceae, Russulales), a widely distributed

- edible mushroom in central and southern China. *Phytotaxa*, 231(1): 63-72
- Wang Y, Hall IR, Dixon C, Hance-Halloy M, Strong G, Brass P, 2002. The cultivation of *Lactarius deliciosus* (saffron milk cap) and *Rhizopogon rubescens* (shoro) in New Zealand. In: Hall IR, Wang Y, Danell E, Zambonelli A (eds.) *Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Christchurch, New Zealand, 3-6 July 2001. Crop & Food Research, Christchurch (CD-ROM)
- Wong KKY, Fortin JA, 1989. A Petri dish technique for the aseptic synthesis of ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany*, 67(6): 1713-1716
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Xue ZW, Ying GH, Lü ML, Li LL, Gao FJ, 2014. Studies on mycorrhizal formation of *Pinus massoniana* inoculated with *Lactarius hatsudake*. *Edible Fungi of China*, 33(3): 18-19 (in Chinese)
- Yamada A, Ogura T, Ohmasa M, 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza*, 11: 59-66
- Yang Y, Bao NM, Shao HJ, Wang YL, Zhu L, Duan YF, 2013. Advances on chemical constituents and bioactivities of genus *Lactarius* (Basidiomycetes). *Natural Product Research and Development*, 25(2): 274-279 (in Chinese)
- Yang YM, 2011. Study on mycorrhizal fungi *Lactarius deliciosus* on *Pinus massoniana*. *Jilin Agriculture*, 4: 85 (in Chinese)
- Zambonelli A, Iotti M, Hall I, 2015. Current status of truffle cultivation: recent results and future perspectives. *Micologia Italiana*, 44: 31-40
- Zambonelli A, Piattoni F, Iotti M, Hall I, 2010. What makes a good truffle infected tree? In: Urban A, Pla T, Fodor O (eds.) *Proceedings of the First Conference on the "European" Truffle *Tuber aestivum/uncinatum**. *Osterr Z Pilzk*, 19: 201-207
- Zhang L, Liu SR, Sun PS, Wang TL, 2011. Comparative evaluation of multiple models of the effects of climate change on the potential distribution of *Pinus massoniana*. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 35(11): 1091-1105 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 陈飞, 2012. 气候变化与云南松分布、结构和演变趋势的研究. 中国林业科学研究院博士论文, 北京. 1-48
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. *菌物学报*, 27: 801-824
- 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. *菌物学报*, 29: 1-21
- 傅雁辉, 聂丽, 夏凡, 舒群峰, 魏赛金, 2017. 松乳菇液态发酵培养基研究. *生物灾害科学*, 40(3): 199-204
- 郭泉水, 阎洪, 1995. 气候变化对油松地理分布影响的研究. *林业科学*, 31(5): 393-402
- 计红芳, 杨谦, 宋瑞清, 2006. 乳菇属真菌应用研究进展. *林业科技*, 31(3): 28-30
- 孙磊, 程显好, 李维焕, 欧胜平, 杨涛, 2015. 菌落直径法和菌丝干重法在优化真姬菇菌种固体斜面培养条件的比较. *中国食用菌*, 34(3): 28-32
- 谭著明, Danell E, 申爱荣, 傅绍春, 2008. 红汁乳菇 (*Lactarius hatsudake*) 的成功栽培—分子方法评估. *食用菌学报*, 15(3): 88-91
- 谭著明, 张志光, 卜晓英, 傅绍春, 张平, 2006. 红汁乳菇及人工合成菌根的形态结构特征. *食用菌学报*, 13(2): 36-40
- 王向华, 2008. 中国西南的乳菇属: 分类, 个体发育与区系地理. 中国科学院昆明植物研究所博士论文, 昆明. 6-45
- 薛振文, 应国华, 吕明亮, 李伶俐, 高凤娟, 2014. 红汁乳菇与马尾松幼苗外生菌根合成研究. *中国食用菌*, 33(3): 18-19
- 杨颖, 鲍泥满, 邵红军, 王艳丽, 朱黎, 段玉峰, 2013. 乳菇属真菌化学成分及其生物活性研究进展. *天然产物研究与开发*, 25(2): 274-279
- 杨艳美, 2011. 马尾松外生菌根真菌-松乳菇的研究. *吉林农业*, 4: 85
- 张雷, 刘世荣, 孙鹏森, 王同立, 2011. 气候变化对马尾松潜在分布影响预估的多模型比较. *植物生态学报*, 35(11): 1091-1105

(本文责编: 韩丽)