

硬叶兜兰菌根真菌的分离及培养特性研究

田 凡¹, 朱国胜^{2,3}, 桂 阳^{2,3}, 白新祥¹

(1. 贵州大学, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省农业科学院, 贵州省现代中药材研究所, 贵州 贵阳 550006;

3. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州 贵阳 550006)

摘 要:采用单菌丝团法分离硬叶兜兰菌根真菌, 纯化后, 用打孔法培养菌株并观察形态特征并测定生长速度, 初步鉴定了 8 株内生真菌 (DJYYDL001、DJYYDL003、DJYYDL004、DJYYDL006、DJYYDL008、DJYYDL009、DJYYDL011、DJYYDL015)。结果表明: 单菌丝团法分离出的菌丝团在恒温培养 12 h 后镜检及吸取萌发菌丝团为最佳时间。没有经过升汞处理的根段菌丝团污染率最大, 而处理 2~3 min 后根段的菌丝团污染率最小。

关键词:硬叶兜兰; 菌根真菌; 菌丝团; 分离; 培养

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)07-0061-04

硬叶兜兰 (*Paphiopedilum micranthum*) 属兰科 (Orchidaceae) 兜兰属 (*Paphiopedilum*), 主要分布于我国的重庆南部、广西西部至北部、贵州东北部至西南部、湖南西南部、云南东南部以及越南北部^[1-2]。其株形俊俏, 花形奇特, 具有非常高的观赏价值, 曾勇夺世界兰展全场总冠军, 惊艳兰坛, 园艺学界常称之为“玉女”^[3]。由于过度采集、走私出境猖獗以及生境破坏等原因, 近十几年来野生硬叶兜兰的数量急剧减少, 分布区逐渐萎缩, 已经到了灭绝的边缘。因此, 硬叶兜兰野生资源的保护和人工繁育问题亟待引起社会各界的重视。

自然条件下, 兰科植物的根系与真菌共生, 形成兰科菌根。自 20 世纪初由 Bernard 和 Burgef 揭示兰科植物菌根之谜, 并指出真菌的存在可促进种子萌发后, 国外相继开展了兰科植物菌根真菌的研究。我国在该领域的研究工作起步较晚, 近年来也有一些学者对兜兰属植物菌根真菌进行了研究^[4-6]。由于兰科植物菌根真菌能促进种子胚的萌发和萌发后的生长发育, 因此在兰科植物的人工栽培中, 引入兰科菌根技术具有广阔的应用

前景。现采用新研发的一种兰科植物菌根真菌分离方法-单菌丝团分离法对硬叶兜兰菌根真菌进行分离研究^[7], 为其有性繁殖及人工培育提供理论基础和实践经验, 最终实现硬叶兜兰的保护和开发利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物 野生硬叶兜兰成年植株采于贵州省铜仁地区德江县青龙镇潮水河, 选择长势良好的植株。

1.1.2 培养基 分离菌根真菌培养基: 为双抗 PDA 培养基, 马铃薯 200 g, 琼脂 6 g, 葡萄糖 15 g, 补水至 1 000 mL, pH 自然, 150 μg/mL 庆大霉素和 100 μg/mL 青霉素。培养菌根真菌培养基: 为标准培养基, 美国 BD(Difco) 公司生产的标准 PDA(Potato dextrose agar) 培养基和 CMA(Corn meal agar) 培养基。

1.1.3 主要仪器设备 SW-CJ-IG 单人净化工作台, GZ-250S 生化培养箱, CX21FS1C 生物显微镜, 101-1AB 电热鼓风干燥箱, MLS-3750 全自动高压灭菌器, 电磁炉, 微波炉。

1.2 试验方法

1.2.1 根的处理及含菌丝团根段的选择 截取的硬叶兜兰新鲜根段于流水状态下冲洗干净, 分装于盛有无菌水的培养皿中, 在超净工作台上用解剖刀轻轻刮掉根毛、根被、表皮和其它附属物, 显微镜检。选出具有菌丝团的根段(图 1-1~2), 无菌水冲洗干净, 再用 0.1% 升汞溶液分别处理 0、1、2、3 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 将具有菌丝团的根切成 3 cm 小段(图 1-3), 然后用解剖针和镊子刮根段, 使单菌丝团从皮层细胞中游离出来, 扩散到装有 10 mL 无菌水的直径为 60 cm 培养皿中, 24℃ 恒温箱培养, 分别在 6、12 和 18 h 后显微镜观察。

第一作者简介:田凡(1985-), 女, 硕士, 现主要从事兰科植物菌根真菌研究工作。

责任作者:白新祥(1979-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事兰科花卉资源的遗传多样性与保护利用研究工作。E-mail: 254715174@qq.com。

基金项目:贵州省科技厅社会发展科技攻关资助项目(黔科合 SY 字[2008]3020 号); 贵州大学人才引进基金资助项目(贵大人基合字[2007]41 号); 贵州省农业科学院博士科研启动资助项目(黔农科院人才启动项目[2009]006 号); 贵州省科技计划资助项目(黔科合院所创能[2010]4002)。

收稿日期:2011-12-28

1.2.2 菌丝团的选择及分离培养 在显微镜暗视野中找到生长出菌丝的菌丝团或菌丝结(图 1-4),然后将光线调到最强,肉眼找到视界范围内的菌丝团,用 1 000 μL 的移液枪吸取菌丝团,每次吸取 45 μL 菌丝团液,然后转接到面积为 1 cm^2 小块双抗 PDA 培养基上(图 1-5),置于 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养至菌丝开始生长。

1.2.3 菌丝团的纯化及培养 显微镜下镜检小块培养基,找到长出菌丝的菌丝团,将菌丝团从小块培养基上切下,然后转接至小块 PDA 培养基(图 1-6),24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,当菌丝生长至 0.5 cm 长时,切取菌丝尖端转接直径为 90 cm 的 PDA 培养皿,纯化后转接试管,培养保存。

1.2.4 菌株生长速度的测定 利用直径 0.5 cm 的打孔器打取菌片,转接至 BDPAD 和 BDCMA 标准培养基,每个菌株每种培养做 3 次重复,记录下接种时间,然后以菌片中心为圆点,向 8 个方向各画一条线,在每条线与菌片的交点作上标记,24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。第 2 天开始观察,在每条线上标记对应的菌丝生长点,注明时间,然后选择稳定生长的 2~3 次标记,用此区间的长度除以时间(时间以 h 计)从而算出稳定的生长速度,算出 3 次重复的稳定生长速度,再算出平均值即为该菌株在标准培养基上的生长速度^[8]。

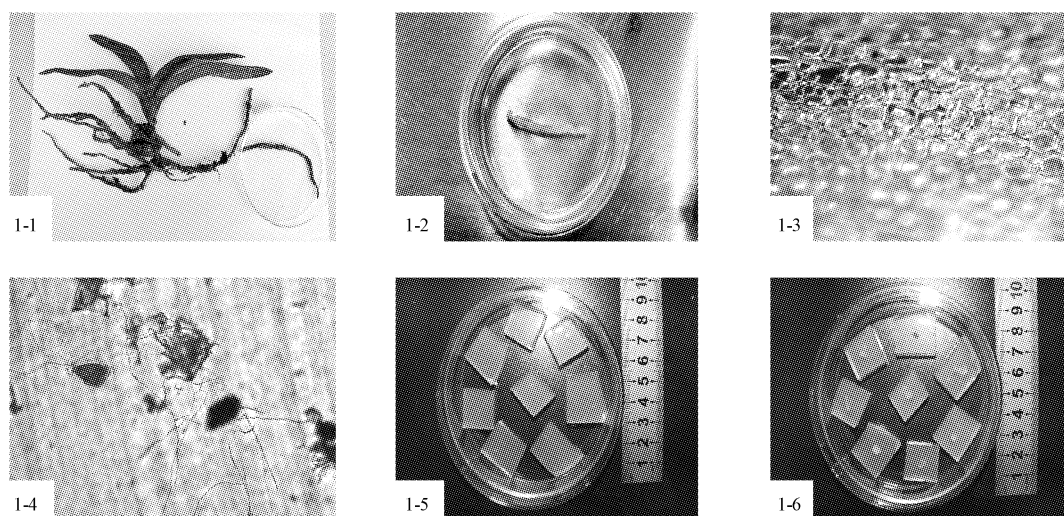


图 1 硬叶兜兰含菌丝团根段的选择

注:1-1:从土壤中挖出的整个植株;1-2:去除了根毛、表皮、根被和其它附属物的根段;1-3:具有菌丝团的根段;1-4:菌丝团被刮制释放于无菌水中,孵育的菌丝团长出菌丝;1-5:抽取的菌丝团液置于小块培养基上;1-6:萌发的菌丝团转接至小块培养基。

2 结果与分析

2.1 试验方法的影响

2.1.1 培养时间对菌丝团萌发率的影响 硬叶兜兰虽然具有典型的兰科植物菌根结构,菌根真菌菌丝团主要分布在根中部的皮层细胞中,经常集中分布于横截面的某一区域,同于杜鹃兰^[9],但分布量较少且活力也较低。由表 1 可知,将刮取的菌丝团在 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 6 h 后显微镜镜检的萌发率很低,12 h 后镜检的萌发率较 6 h 后镜检的萌发率高,而 18 h 后萌发率更高,但是 18 h 后抽取的萌发菌丝团污染量较大,所以筛选出硬叶兜兰菌根真菌采用单菌丝团法分离出的菌丝团在 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h 后镜检及吸取萌发菌丝团为最佳时间。

表 1 培养时间对菌丝团萌发率的影响

24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养时间/h	菌丝团数/个	萌发菌丝的菌丝团数/个	萌发的菌丝团比率/%
6	100	6	6.0
12	100	21	21.0
18	100	28	28.0

2.1.2 升汞灭菌时间对菌丝团液污染率的影响 据报道,刮取的菌丝团恒温培养后的 4~6 h 镜检和吸取菌丝

团为最佳时间^[10],因为培养时间越短菌丝团的污染率也相对较低。但是,由表 1 得知镜检菌丝团萌发率的时间为 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h 后为最佳,所以该试验结果为 12 h 后观察的试验结果。由表 2 可知,没有经过升汞处理的根段菌丝团污染率为 76.7%,而处理 2 min 和 3 min 后根段的菌丝团污染率为 26.7%。由于升汞的毒性很大,处理时间应当越短越好,所以筛选出对硬叶兜兰根段灭菌处理的最佳时间为 2 min。

表 2 升汞灭菌时间对菌丝团液污染率的影响

时间/min	抽取 45 μL 菌丝团液数/次	污染菌丝团液的次数/次	污染率/%
0	30	23	76.7
1	30	13	43.3
2	30	8	26.7
3	30	8	26.7

注:以上是吸取菌丝团液 24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 12 h 后观察的试验结果。

2.2 硬叶兜兰菌根真菌的培养特征

试验通过单菌丝团法分离出 8 株菌根真菌,分别命名为 DJYYDL001、DJYYDL003、DJYYDL004、DJYYDL006、DJYYDL008、DJYYDL009、DJYYDL011、DJYYDL015,各菌株培养特征如下。

2.2.1 DJYYDL001 BDPDA 培养基上气生菌丝绒毛状,菌落边缘整齐,细丝状,淡黄色,形成同心环,菌丝生长速度 $0.13\sim0.18\text{ mm/h}$;BDCMA 培养基上菌丝贴培养基生长,不形成气生菌丝,生长速度 $0.17\sim0.19\text{ mm/h}$ (图 2)。

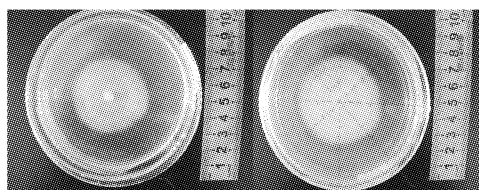


图 2 DJYYDL001 在 BDPDA 培养基上的菌落形态特征
(左:正面;右:背面)

2.2.2 DJYYDL003 BDPDA 培养基上菌落早期边缘整齐,厚薄均匀,气生菌丝细绒毛状,后期菌落中央气生菌丝白色呈棉花状隆起,菌丝的生长速度 $0.12\sim0.15\text{ mm/h}$,念珠状细胞球形或椭圆形;BDCMA 培养基上贴培养基生长,无气生菌丝,生长速度 $0.19\sim0.29\text{ mm/h}$ (图 3)。

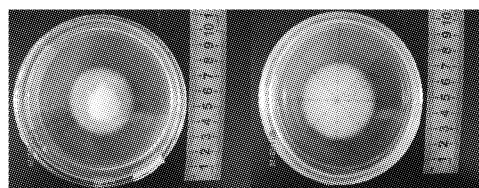


图 3 DJYYDL003 在 BDPDA 培养基上的菌落形态特征
(左:正面;右:背面)

2.2.3 DJYYDL004 BDPDA 培养基上气生菌丝雪白色,细绒毛状,边缘不整齐,生长较慢,菌丝生长速度 $0.08\sim0.13\text{ mm/h}$;BDCMA 培养基上形成气生菌丝,菌丝生长速度 $0.12\sim0.15\text{ mm/h}$ (图 4)。

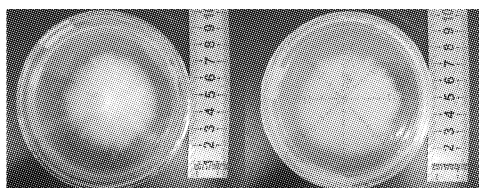


图 4 DJYYDL004 在 BDPDA 培养基上的菌落形态特征
(左:正面;右:背面)

2.2.4 DJYYDL006 BDPDA 培养基上气生菌丝绒毛状,菌落边缘稀疏不均匀,白色,菌丝生长速度 $0.13\sim0.18\text{ mm/h}$;BDCMA 培养基上形成气生菌丝,菌丝生长速度 $0.08\sim0.17\text{ mm/h}$ (图 5)。

2.2.5 DJYYDL008 BDPDA 培养基上菌落早期贴培养基生长,菌落表面光滑,边缘整齐,厚薄均匀,后期产生气生细绒毛状菌丝,不明显,菌落乳白色,形成同心环,菌丝的生长速度 $0.12\sim0.14\text{ mm/h}$,念珠状细胞球形;BDCMA 培养基上贴培养基生长,无气生菌丝,生长速度 $0.19\sim0.29\text{ mm/h}$ (图 6)。

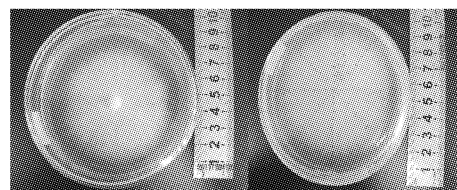


图 5 DJYYDL006 在 BDPDA 培养基上的菌落形态特征
(左:正面;右:背面)

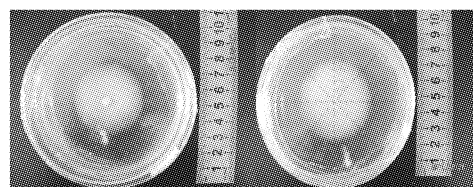


图 6 DJYYDL008 在 BDPDA 培养基上的菌落形态特征
(左:正面;右:背面)

2.2.6 DJYYDL009 BDPDA 培养基上菌落早期贴培养基生长,菌落表面光滑,蜡质,边缘波纹状,厚薄均匀,后期菌落中央开始出现墨绿色孢子,菌丝的生长速度 $0.07\sim0.09\text{ mm/h}$;BDCMA 培养基上贴培养基生长,无气生菌丝,生长速度 0.11 mm/h (图 7)。

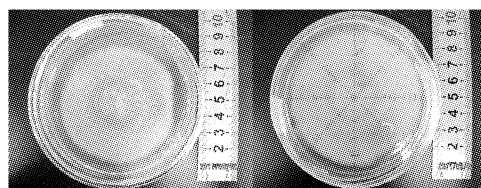


图 7 DJYYDL009 在 BDPDA 培养基上的菌落形态特征
(左:正面;右:背面)

2.2.7 DJYYDL011 BDPDA 培养基上菌落贴培养基生长,菌落表面光滑,菌落边缘整齐,厚薄均匀,较薄显细纹状,淡粉色,质地如粉饼,菌丝的生长速度 $0.08\sim0.09\text{ mm/h}$;BDCMA 培养基上贴培养基生长,无气生菌丝,生长速度 $0.08\sim0.09\text{ mm/h}$ (图 8)。

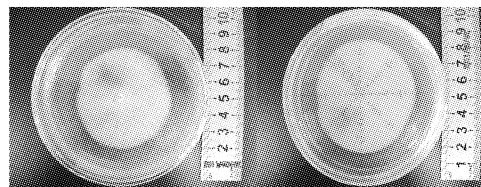


图 8 DJYYDL011 在 BDPDA 培养基上的菌落形态特征
(左:正面;右:背面)

2.2.8 DJYYDL015 BDPDA 培养基上菌落早期贴培养基生长,边缘不规则,厚薄均匀,细绒毛状菌丝,菌丝的生长速度 $0.08\sim0.11\text{ mm/h}$,念珠状细胞球形或椭圆形;BDCMA 培养基上贴培养基生长,无气生菌丝,生长速度 $0.20\sim0.27\text{ mm/h}$ (图 9)。

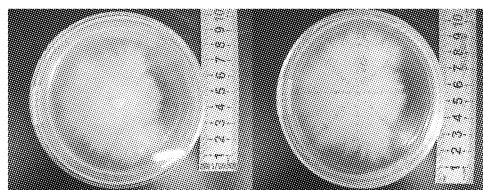


图9 DJYYDL015在BDPDA培养基上的菌落形态特征
(左:正面;右:背面)

3 结论与讨论

兰科植物菌根真菌的分离方法主要包括组织块表面消毒分离法和单菌丝团分离法。该研究采用新建立的单菌丝团法对硬叶兜兰菌根真菌进行分离,解决了兰科植物菌根真菌分离过程中的污染问题和分离效率低的问题。研究过程中,由于硬叶兜兰菌丝团活力较低,不易萌发,所以延长了菌丝团在无菌水中的培养时间,同时也致使菌丝团极易污染,于是在操作过程中将根段用0.1%升汞溶液消毒,可能杀死部分的菌丝团,从而影响了硬叶兜兰菌根真菌动态变化的萌发率。从试验中可以看出,升汞的使用和消毒时间的长短将影响根内内生菌的分离,应根据具体的试验材料对根段的表面消毒做相应的调整,选择适宜的灭菌试剂和灭菌时间是进行内生菌分离培养时应该仔细考虑的问题,需要不断的探索,寻求新的消毒剂加以代替,将是下一步试验的关键所在。

分离得到的菌根真菌在培养过程中观察发现,硬叶兜兰内生真菌不同种类的生长速率差异很大。DJYYDL001、DJYYDL003、DJYYDL008、DJYYDL006这4株菌均能在2周内长满培养皿。DJYYDL009、DJYYDL011、DJYYDL015和DJYYDL004生长速率稍

慢,这可能是真菌本身的生长特性或这种菌的种群数量所决定。

研究兰科植物与共生真菌的关系以及利用共生真菌来促进种子萌发和幼苗生长已成为兰科植物繁殖生物学研究的重要方向。该试验只是对硬叶兜兰菌根真菌共生关系进行初步的观察和探讨,进一步对硬叶兜兰菌根真菌进行系统而深入的研究,将促进兰科植物的快速繁殖、减轻其面临的濒危压力,对其保护与开发利用具有重要意义。

参考文献

- [1] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社,1997:255-256.
- [2] 刘仲健,陈心启,陈利君,等. 中国兜兰属植物[M]. 北京:科学出版社,2009:41-47.
- [3] 龙波,龙春林. 兜兰属植物及其研究现状[J]. 自然杂志,2006,28(6):341-344.
- [4] 李明,张灼. 杏黄兜兰菌根研究与应用[J]. 生物学杂志,2001,18(6):17-18.
- [5] 罗玉容. 硬叶兜兰菌根真菌的观察、分离和鉴定[D]. 广州:华南农业大学,2009.
- [6] Li Y, Yang Z L, Li S Y, et al. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China[J]. Mycorrhiza, 2010,20:559-568.
- [7] Zhu G S, Yu Z N, Gui Y, et al. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi[J]. Fungal Diversity, 2008,33:123-137.
- [8] 朱国胜. 贵州特色药用兰科植物杜鹃兰和独蒜兰共生真菌研究与应用[D]. 武汉:华中农业大学,2009.
- [9] 黄永会,朱国胜,刘作易,等. 杜鹃兰菌根结构显微观察初报[J]. 贵州农业科学,2007,35(1):16-17.
- [10] 罗毅波,贾建生,王春玲. 中国兰科植物保育的现状和展望[J]. 生物多样性,2003,11(1):70-77.

Study on Isolation and Culture Characteristics of *Paphiopedilum micranthum* Mycorrhizal Fungi

TIAN Fan¹, ZHU Guo-sheng^{2,3}, GUI Yang^{2,3}, BAI Xin-xiang¹

(1. Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Institute of Morden Chinese Medical Materials, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006; 3. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang, Guizhou 550006)

Abstract: Eight mycorrhizal endophyte strains were isolated from a single peloton of *Paphiopedilum micranthum*. After purification, the strains were cultured by the hole method and the morphological characteristics were observed. At the same time, the growth rate was determinated. Isolated strains were named as DJYYDL001, DJYYDL003, DJYYDL004, DJYYDL006, DJYYDL008, DJYYDL009, DJYYDL011, DJYYDL015. The results showed that the single sclerotium isolated from the pelotons were cultured in thermostatic, after 12 hours, microscopy and absorb the hyphae grow group was the best time. Without mercuric chloride treatment root sclerotium pollution rate, while processing 2~3 min posterior root segment sclerotium contamination rate minimum.

Key words: *Paphiopedilum micranthum*; mycorrhizal fungi; peloton; isolation; culture