

山兰菌根真菌离体培养条件的研究

王平平, 王玉娇, 陈旭辉, 曲波

(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:通过分离、纯化、培养山兰菌根菌, 设置温度、光照、碳源、氮源和 pH 值等培养条件进行单因素试验, 研究山兰菌根菌在不同培养条件下生长状况及培养性状, 并对数据进行方差分析。结果表明: 该山兰菌根菌在 5~30℃ 都能生长, 最适温度是 20℃; 在各种光照条件下均能生长, 其中 12 h 光照、12 h 黑暗条件下山兰菌根菌生长最好; 适宜生长的 pH 5.0~6.0; 在碳源方面对葡萄糖利用最好; 在氮源方面对甘氨酸利用最好。

关键词:山兰; 菌根真菌; 培养条件; 生长速率

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)09-0066-04

兰科是被子植物的第二大科, 其种类仅次于菊科植物, 在系统演化上是属于最进化、最高级的类群, 一直是人们研究热点类群^[1-2]。19 世纪人们就发现兰科植物根中存在着真菌, Bernard^[3]于 1903 年首次报道了真菌和兰科植物种子萌发的关系, 兰科植物与菌根真菌的关系得到证实。以后国内外学者对兰科植物菌根菌进行广泛研究。目前研究已知, 侵染兰科植物根部并能与之共生的真菌绝大多数属于担子菌(*Basidiomycota*)和半知菌(*Deuteromycotina*), 也有部分属于子囊菌门(*Ascomycota*)^[4-6]。其中, 半知菌门包括丝核菌属(*Rhizoctonia*)^[7]。山兰(*Oreorchis patens*)为兰科山兰属多年生草本植物, 广泛分布于我国西南、华中、西北和东北各地, 其干燥球茎入药, 甘、辛、寒, 有小毒。具有滋阴清肺、化痰止咳的功效, 用于痈疽疮肿、瘰癧, 无名肿毒常作山慈姑用品入药^[8]。目前已有学者开展了山兰繁育系统的初步研究^[8-9]; 同时也有学者对野生山兰的驯化技术进行研究^[10], 包括山兰的生态环境、物候期和生长发育等特点, 而对于山兰菌根真菌类群和真菌的培养性状未见报道^[11]。现以长白山地区的山兰菌根为材料, 分离纯化其菌根真菌。通过对其培养条件的研究, 明确其最适的生长条件, 为山兰种子萌发提供菌源, 并丰富山兰的保护生物学研究内容。

第一作者简介:王平平(1987-), 女, 在读硕士, 现主要从事濒危植物保护方面的研究工作。

责任作者:曲波(1972-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事植物资源保护研究工作。E-mail: qubo-@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100299); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20112103120016); 辽宁省教育厅科学研究一般资助项目(L2011140)。

收稿日期:2012-02-22

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用山兰于 2010 年 6 月采自吉林省抚松县露水河镇(N42°42'12.15", E127°37'15.42")。取山兰根段, 将其用 75% 的酒精溶液浸约 1 min, 再用 0.1% 升汞溶液表面消毒 2~3 min。在无菌条件下将根切成 1 cm 左右的小段, 直接放在 PDA 培养基上, 室温下培养。分离纯化后, 经大连民族学院赵志慧博士根据形态学特征鉴定该菌株属于广义兰科共生丝核菌属(*Orchid Rhizoctonia*) (菌株编号: 山兰-CL001)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌落生长与温度的关系 将山兰-CL001 菌株在 PDA 培养基上培养到菌落直径为 5~6 cm 时, 用直径为 0.7 cm 的灭菌打孔器对其打菌饼, 转接于直径 9 cm 培养皿中心, 每皿事先倒 PDA 培养基 20 mL, 将制好的平板分别置于 5、10、15、20、25、30℃ 遮光条件下恒温培养。

1.2.2 菌落生长与光照的关系 制作平板(方法同上), 将制好的平板分别放于 24 h 日光灯、12 h 日光灯+12 h 黑暗、24 h 黑暗、12 h 自然光(室温 20℃)条件下培养。

1.2.3 菌落生长与碳源的关系 配制培养基时, 分别按 2% 的比例(同 PDA 培养基中葡萄糖所占比例)加入葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露糖、半乳糖、果胶、木糖等, 配制出不同碳源的培养基。将山兰-CL001 菌株在 PDA 上培养到菌落直径为 5~6 cm 时, 用直径为 0.7 cm 的灭菌打孔器对其打菌饼, 转接于直径 9 cm 的培养皿中心, 每皿事先倒不同碳源的培养基 20 mL, 将制好的平板分别放于 20℃ 避光条件下培养。

1.2.4 菌落生长与氮源的关系 配制培养基时, 分别按 0.5% 的比例加入尿素、氯化铵、草酸铵、硫酸铵、硝酸铵、甘氨酸等, 配制出不同氮源的培养基。将山兰-CL001 菌

株在 PDA 上培养到菌落直径为 5~6 cm 时,用直径为 0.7 cm 的灭菌打孔器对其打菌饼,转接于直径 9 cm 的 PDA 培养皿中心,每皿事先倒不同氮源培养基 20 mL,将制好的平板于 20℃ 避光条件下培养。

1.2.5 菌落生长与 pH 的关系 在无菌条件下,用 0.1 mol/L 的 HCl 与 NaOH 及 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液,调节三角瓶中培养基的 pH 值,每加入酸或碱后均要将三角瓶充分摇荡,用酸度计进行测定,分别配出 pH 为 4、5、6、7、8 的 PDA 培养基。将山兰-CL001 菌株在 PDA 上培养到菌落直径为 5~6 cm 时,用直径为 0.7 cm 的灭菌打孔器对其打菌饼,转接于直径 9 cm 的培养皿中心,每皿事先倒不同 pH 的培养基 20 mL,将制好的平板于 20℃ 避光条件下培养。

以上试验均于 24 h 后测量菌落的直径,每隔 24 h 测 1 次,菌落长满培养皿停止测量。每菌株 3 次重复。

1.3 数据统计

用 Microsoft Excel 和 DPS 2000 软件进行数据处理,统计分析菌株生长速率并比较各条件差异的显著性等。

2 结果与分析

2.1 温度对山兰菌根菌生长的影响

由图 1 可知,山兰菌根真菌在不同温度下生长速度不同。在 20℃ 时长势最好,培养 7 d 时菌落直径平均为 6.603 cm,生长速度为 0.843 cm/d。菌丝在 15、25 和 30℃ 时生长速度较慢。但在 5℃ 下菌丝生长最慢,培养 3 d 时菌丝几乎不生长,培养 7 d 时菌落直径平均为 1.353 cm,生长速度为 0.093 cm/d。统计结果表明,山兰菌根真菌在 5℃ 时菌丝生长速度在 0.05 和 0.01 水平上极显著低于其它温度下的生长速度,存在显著性差异。20℃ 为山兰菌根真菌最佳生长温度。

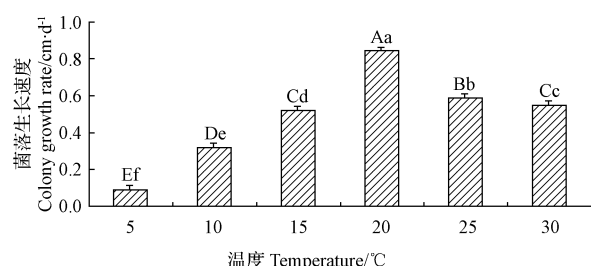


图 1 温度对山兰菌根菌生长的影响

Fig. 1 Effect of temperature on colony growth of *Oreorchis patens* mycorrhizae

2.2 光照对山兰菌根菌生长的影响

由图 2 可知,光照对山兰菌根真菌生长有一定的影响,其中 12 h 日光灯与 12 h 黑暗交替条件下培养生长最快,7 d 菌落直径达 5.785 cm,生长速度为 0.726 cm/d;其次为 24 h 黑暗条件下,生长速度为 0.642 cm/d;24 h

日光灯下生长最差,7 d 菌落直径为 4.593 cm,生长速度为 0.556 cm/d。统计结果显示,12 h 自然光(室温 20℃)时山兰菌根真菌菌丝生长速度在 0.05 水平上显著低于 12 h 日光灯与 12 h 黑暗交替光照处理下的生长速度,存在显著性差异。所以 12 h 日光灯与 12 h 黑暗交替培养为菌丝生长最佳光照条件。

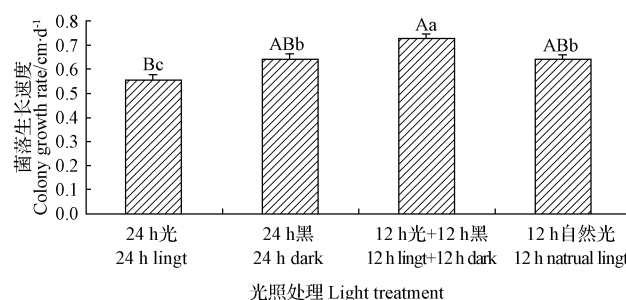


图 2 光照处理对山兰菌根菌生长的影响

Fig. 2 Effect of light treatment on colony growth of *Oreorchis patens* mycorrhizae

2.3 碳源对山兰菌根菌生长的影响

由图 3 可知,山兰菌根真菌对碳源要求不严格。葡萄糖为碳源时菌落长势稍好于其它碳源,7 d 的菌落直径为 6.348 cm,生长速度 0.807 cm/d。蔗糖、甘露糖和半乳糖为碳源时菌落长势相差不大,都高于碳源为果糖、果胶和木糖的条件。在果胶为碳源下菌落生长最差,7 d 菌落直径为 5.222 cm,生长速度为 0.646 cm/d。统计结果可以看出,山兰菌根真菌在碳源为果胶时的生长速度在 0.05 和 0.01 水平是显著低于其它碳源下的生长速度,存在显著性差异。所以山兰菌根菌对葡萄糖利用最好。

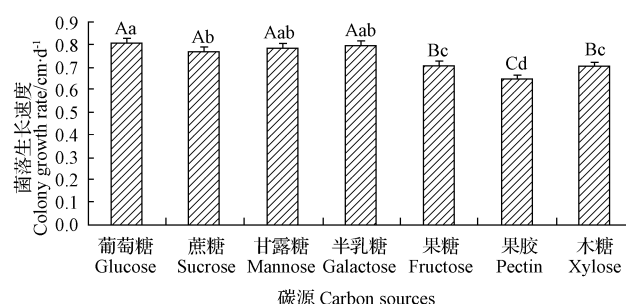


图 3 碳源对山兰菌根菌生长的影响

Fig. 3 Effect of carbon sources on colony growth of *Oreorchis patens* mycorrhizae

2.4 氮源对山兰菌根菌生长的影响

由图 4 可知,不同氮源对山兰菌根菌生长影响较大。山兰菌根真菌在尿素条件下不生长,说明尿素对其有抑制作用。在其它 5 个氮源培养都可以生长,其中在甘氨酸条件下长势最好,7 d 时菌落直径为 6.207 cm,生长速度为 0.787 cm/d。其次为硝酸铵,7 d 时菌落直径为 5.913 cm,生长速度为 0.745 cm/d,其余生长中速。

统计结果表明,山兰根真菌尿素培养的生长速度在 0.05 水平上显著低于其它几个培养条件,存在显著性差异。所以在山兰菌根菌在甘氨酸为氮源条件下长势最好。

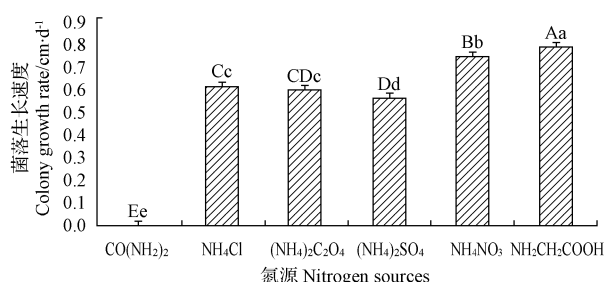


图4 氮源对山兰菌根菌生长的影响

Fig. 4 Effect of nitrogen sources on colony growth of *Oreorchis patens* mycorrhizae

2.5 pH 对山兰菌根菌生长的影响

由图5可知,培养7 d时,山兰菌根菌在5个pH条件下均能生长,但是受其影响不同,随着pH值的增大,菌丝的生长速度是呈先上升,后又下降趋势。菌落在pH为6时生长最好,7 d时菌落直径为6.187 cm,生长速度为0.784 cm/d,其次为pH为7时,菌落直径为5.372 cm,生长速度为0.667 cm/d。长势最差为pH 4时,7 d时直径3.981 cm,生长速度0.469 cm/d,其它条件下菌落生长中速。统计结果显示,山兰菌根菌在pH为4时的生长速度在0.05和0.01水平上显著低于其它pH下的生长速度,存在显著性差异。所以pH为6时山兰菌根菌生长最佳。

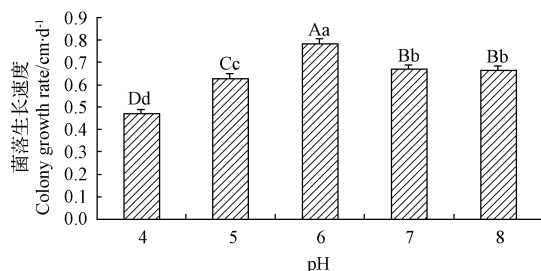


图5 pH 对山兰菌根菌生长的影响

Fig. 5 Effect of pH value on colony growth of *Oreorchis patens* mycorrhizae

3 讨论与结论

山兰菌根真菌为兰科共生真菌丝核菌属。丝核菌是山兰菌根菌的主要因子,从其它地方对兰科菌根的调查显示,采集到的菌种具有相似性,例如,Tsutsui K等^[12]对几种兰科植物的菌根真菌研究证明,在山兰植物中,分离其根内生真菌得到的为丝核菌属双核丝核菌种。

山兰为阴生草本植物,属于陆生兰类型,喜凉爽,所以20℃是较适合山兰生长的温度,超过20℃时,菌丝随着温度的升高而减慢。在12 h光照+12 h黑暗条件下培养,菌丝生长最快,可以看出,山兰内生真菌的生物学

特性与山兰生长环境的生态条件相适应。在pH 5.0~6.0时,菌丝长势较好,这与山兰生存的环境也有密切的联系。该试验用的山兰采自于长白山,长白山土壤pH偏酸性,所以山兰菌根菌生长的适宜范围也为偏酸性。在对碳源条件的利用方面,山兰菌根菌对葡萄糖的利用最好,其次是半乳糖和甘露糖,表明单糖比多糖更有利于山兰菌根菌的生长,其原因可能为:该菌为寄生菌,消化系统简单,不能分解多糖以进行吸收和消化,只能吸收单糖以供其营养生长。在氮源的利用上,该菌对甘氨酸的利用最好,其次是硝酸铵和氯化铵;对草酸铵和硫酸铵的吸收较差,对尿素不吸收。分析其原因,可能为:该寄生真菌只能吸收消化相对分子质量较小的有机物质(甘氨酸75、硝酸铵62、氯化铵40),而对分子质量较大的物质利用较差(草酸铵124、硫酸铵132);至于为什么对尿素(60)条件下不生长,其原因可能为:尿素在高温高压灭菌的条件下,分解过程中产生了有害物质,影响了该真菌的生长。其确定的原因还需进一步考证分析。

该试验结果表明,以山兰为宿主植物的该共生菌根真菌,经鉴定为兰科半知菌丝核菌属,其离体培养最适条件为:最适生长温度为20℃时,最适光照为12 h光照与12 h黑暗交替进行,最适pH为6,最适碳源为葡萄糖,最适氮源为甘氨酸。该真菌与山兰共生,该试验明确了该共生真菌的最佳生长条件,为山兰种子的萌发提供了借鉴。

参考文献

- [1] Petrak F. Plantae sinensis A dre. H. Smith Annis 1921-1922. 1924 et 1934 lectae XLIV micromycetes [J]. Meddel. Goteb. Bot. Tradg, 1947, 17: 113-164.
- [2] 陈心启, 吉占和, 罗毅波. 中国野生兰科植物彩色图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] Bernard N. La germination des orchidées [J]. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 1903, 138: 483-485.
- [4] Index of Parasitic and Symbiotic Microbes on Wild Plants in Japan [M]. Microbial Systematics Laboratory, Inventory center; National Institute for Agro-Environmental Sciences (NIAES), 2004.
- [5] 范黎, 郭顺星, 徐锦堂. 我国部分兰科植物菌根的内生真菌种类研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 1998, 21(2): 169-177.
- [6] 李潞滨, 胡陶, 杨凯, 等. 中国兰属植物菌根真菌 AFLP 多样性分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 81-86.
- [7] 范黎, 郭顺星. 兰科植物菌根真菌的研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 227-230.
- [8] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 1553.
- [9] Batygina T B, Bragina E A, Vasilyeva V E. The reproductive system and germination in orchids [J]. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2003, 45(2): 21-34.
- [10] Sugiura N, Okajima Y, Maeta Y. A note on the pollination of *Oreorchis patens* (Orchidaceae) [J]. Ann Tsukuba Bot. Gard., 1997, 16: 69-74.
- [11] 张正海, 李爱民, 魏盼盼. 野生山兰驯化技术研究[J]. 中药材, 2010, 33(7): 1045-1046.

不同基质对名贵菊花扦插繁殖的影响

李荣华¹, 李宪友², 张仲新³, 马海燕², 宋立立¹

(1. 沧州师范学院 生命科学系, 河北 沧州 061001; 2. 沧州市园林绿化局, 河北 沧州 061001; 3. 北京绿富隆农业股份有限公司, 北京 102100)

摘要:以“嫦娥”、“炼丹炉”、“千秀银针”、“秋水芙蓉”4个名贵菊花栽培品种为试材, 研究不同基质对其扦插繁殖的影响。结果表明: 采用 105℃ 灭菌 2 h 的蛭石效果较好, 可极大提高扦插成活率和移栽成活率。

关键词:菊花; 扦插; 繁殖

中图分类号:S 682.1+1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)09-0069-02

菊花是我国四大切花之一, 集观赏、绿化、饮品、中药等多种用途于一身, 尤其是一年一届的菊花展, 逐渐成为公众放松和休闲的绝佳去处, 而赏菊、种菊也逐渐成为一种社会文化。在花乡沭阳, 菊花产业已经成为当地花卉产业中影响最大和获利丰厚的品种之一^[1]。沧州地处盐碱地区, 菊花销量大, 种植少, 尤其是名贵菊花更是因其繁殖率低而数量稀少, 价格较高, 但由于名贵菊花本身生长势较弱, 需要一定的设施设备, 种植难度较大等原因, 导致菊花在沧州一直没有规模化发展。张孟仁^[2]、杨德江等^[3]进行了 IBA 和 NAA 对菊花扦插生根的试验研究, 赵兰枝等^[4]做了菊花水培扦插生根方面的试验。现对名贵菊花进行了育苗方面的研究, 对充

分利用设施设备为沧州菊花产业的发展提供一定的理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用“嫦娥”、“炼丹炉”、“千秀银针”、“秋水芙蓉”4个名贵菊花栽培品种, 由沧州园林绿化局提供。

1.2 试验方法

采集菊花嫩梢 8 cm 扦插于不同育苗基质的穴盘(规格 50 孔)中, 基质 1: 蛭石: 园土=1: 1, 不灭菌; 基质 2: 蛭石, 经 105℃ 灭菌 2 h。

将穴盘放于温室苗床下, 初期适当遮阳, 叶面喷雾 3 次/d; 2 周以后, 逐渐撤除遮阳网, 叶面喷雾 1 次/d。温度 20~30℃, 光照强度 6 000~7 000 lx。

1.3 项目测定

扦插 50 d 测定扦插成活率, 移栽后 30 d 测定移栽成活率。

第一作者简介:李荣华(1978-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事花卉栽培和植物耐盐性研究工作。E-mail: xiaoxue3719@yahoo. cm. cn。

基金项目:河北省高等学校科学技术研究指导资助项目(Z2010205)。

收稿日期:2012-01-06

[12] Tsutsui K, Tomita M. Differences in the symbiotic capacity among isolates of mycorrhizal fungi on some terrestrial orchids[J]. Journal of the

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, 1988, 63(4): 345-353.

Study on the Affecting Factors of Growth of *Oreorchis patens* Mycorrhizae *in vitro*

WANG Ping-ping, WANG Yu-jiao, CHEN Xu-hui, QU Bo

(College of Biological Sciences and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: By means of separating, purifying, cultivating mycorrhizae of *Oreorchis patens*, setting temperature, light condition, carbon sources, nitrogen source, acidity and alkalinity and so on for single-factor test, the growth conditions and culture traits of mycorrhizae of *Oreorchis patens* were studied in different culture conditions. The results showed that *Oreorchis patens* mycorrhizae could grow within 5~30℃, and 20℃ was its optimum temperature; In all kinds of light conditions could grow, the optimum condition was 12 hours of light and 12 hours of night; the optimum pH was pH 5.0 to 7.0; its optimal carbon sources was glucose; the optimal was glycine.

Key words: *Oreorchis patens*; mycorrhizae; culture conditions; growth rate