

# 灵芝连作障碍下的自毒作用

马红梅, 赵培芳

(海南热带海洋学院 热带生物与农学院, 海南 三亚 572022)

**摘 要:**以灵芝为试材,分别制备灵芝发酵液、灵芝菌丝体及子实体的水提取液,将发酵液和菌丝体提取液分别配制成 25%、50%、75%、100% 4 种体积百分比浓度;灵芝菌盖和菌柄分别配制成 40%、60%、80%、100% 4 种体积百分比浓度后加入等量的 PDA 平板中培养灵芝菌丝体,记录菌丝萌发天数、菌落直径与菌丝干重,并计算自化感效应值(RI),研究灵芝连作障碍下的菌体自毒作用。结果表明:低浓度的菌丝体水提取液和发酵液促进灵芝菌丝伸长,高浓度的菌丝体水提取液和发酵液抑制菌丝的伸长,但不同浓度的菌丝体和发酵液处理组的菌丝干重的自化感效应值均为负值;不同浓度的灵芝菌柄和菌盖水提取液对灵芝均有较强的自毒作用,表现为抑制菌丝的萌发和菌丝的长势;当浓度为 80% 时,子实体的菌盖和菌柄水提取液菌落直径和菌丝干重与对照相差最大,自化感效应值最大,其菌落直径的化感效应分别为 -0.494 和 -0.541,菌丝干重的自化感效应值分别为 -0.750 和 0.808。由此得出,灵芝子实体的水提取液比灵芝菌丝体的水提取液和发酵液有更强的自毒作用。

**关键词:**灵芝;菌丝体;发酵液;子实体;连作障碍;自毒作用

**中图分类号:**S 567.3<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0133-04

连作障碍是作物栽培中普遍出现的问题,粮食作物、果树、蔬菜、瓜果、花卉等经济作物都存在不同程度的连作障碍问题,且连作年限越长其连作障碍就越严重<sup>[1]</sup>,引起连作障碍的因素有很多,包括土壤生物化学因子的改变<sup>[2]</sup>,土壤微生物种群特性的变化<sup>[3]</sup>,作物的自毒作用<sup>[4]</sup>,以及由此引发的病原菌的增殖<sup>[5]</sup>。

灵芝是一种药食两用的大型真菌,其连作也出现连作障碍现象,对其连作障碍机理的探讨包括土壤微生物特性与连作的关系、灵芝栽培料残茬对灵芝的影响、灵芝的自毒作用,前二者已经有文章讨论<sup>[6-7]</sup>,该试验重点探讨灵芝的自毒作用。自毒作用在作物和中药材的栽培中很普遍,王广印等<sup>[8]</sup>研究了辣椒的自毒作用,ASAA 等<sup>[9]</sup>研究了芋头的自毒作用,银福军等<sup>[10]</sup>研究了中药材黄连的自毒作用。RICE<sup>[11]</sup>认为自毒作用是化感作用的一种特殊类型,又称作自化感作用,或自体中毒,植株通过淋溶、残体分解、根系分泌向环境中释放一些化学物

质,而对其自身产生直接或间接的毒害作用。YU<sup>[12]</sup>认为自毒作用是植物种内生长普遍存在的问题之一,是种内关系的一部分,也是导致作物连作障碍的主要因子之一,是化感作用的一种重要形式。有关自毒作用对植物体本身的影响,张晓玲等<sup>[13]</sup>概括为影响植物体细胞膜的透性、植物体酶的活性、植物细胞的分裂和伸长以及植物体对营养物质的吸收和利用。

该试验通过研究灵芝菌丝体对灵芝菌丝体、灵芝代谢产物对菌丝体以及灵芝子实体对菌丝体的自毒作用,了解灵芝栽培过程中菌体不同形式对自身的化感效应,以期揭开灵芝连作障碍的作用机理,以期消除灵芝连作障碍,保持灵芝种植业持续稳定发展提供理论依据和实践指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试灵芝菌株来自琼州学院实验室,编号为 4-2 灵芝。

### 1.2 试验方法

1.2.1 灵芝子实体水提取液的制备 选取干燥、无霉变的 4-2 灵芝子实体,将菌柄与菌盖分开,分别进行研磨、粉碎后取灵芝子实体菌柄和菌盖的粉末各 5 g 置于 150 mL 三角瓶中,分别加入蒸馏水,80℃ 条件下水浴 80 min,过滤后收集滤液,旋转蒸发,浸提物加蒸馏水洗

**第一作者简介:**马红梅(1976-),女,硕士,副教授,现主要从事应用微生物及食用菌等教学与科研工作。E-mail:mahongmei612@163.com.

**基金项目:**海南省自然科学基金资助项目(314082);大学生创新创业训练计划资助项目(201311100038);三亚市院地科技合作资助项目(2015YD31)。

**收稿日期:**2015-12-14

涤出,分别配成40%、60%、80%、100% 4种浓度的菌盖、菌柄浸提液,每种浓度设置3个重复,以蒸馏水处理为对照(CK)。

1.2.2 灵芝发酵液制备 马铃薯综合培养液的pH值调至6,灭菌后接种活化的灵芝菌丝体,于140 r/min,常温下培养7 d,过滤收集发酵液和菌丝体,发酵液配成25%、50%、70%、100% 4种浓度,以未发酵的马铃薯综合培养基为对照(CK),菌丝体烘干后按子实体提取方法将其配制成25%、50%、70%、100% 4种浓度,每种浓度设置3个重复,以蒸馏水处理为对照(CK)。

1.2.3 不同提取液对灵芝菌丝体培养的处理 将含有不同浓度灵芝菌丝体提取液加入到PDA固体培养基,接种活化的灵芝菌丝,倒置平板置温度为28℃,湿度为76.5%培养箱中培养。每12 h观察菌丝的生长状况,记录菌丝的萌发时间;菌丝萌发后,每24 h观察菌丝生长,第10天后用十字交叉法测量菌落直径,每个浓度取其平均值;菌丝停止生长后,用纱布滤出培养基保留菌丝并烘干,测量菌丝干重。

### 1.3 数据分析

按照WILLIAMSON<sup>[14]</sup>提供的方法计算化感作用大小-化感作用效应指数(response indices, RI)。

$$RI = \begin{cases} 1 - C/T, & T \geq C; \\ T/C - 1, & T < C. \end{cases}$$

其中C和T分别代表对照值和处理值。当RI>0时表现为促进作用,RI<0时为抑制作用,RI绝对值等于作用强度。采用WPS表格对数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 灵芝菌丝体水提取液及发酵液对灵芝菌丝长势的影响

将灵芝菌丝接种至含灵芝菌丝体水提取液和发酵液的PDA平板中,倒置恒温箱中培养,待菌丝萌发后不再生长,通过十字交叉法计算菌落最终的直径,并过滤收集菌丝,烘干后测其生物量。由表1可知,菌丝体水提取液和发酵液对菌落直径均是在低浓度时促进菌丝的生长,高浓度抑制菌丝的生长,当浓度小于75%时,菌丝体水提取液和发酵液的菌落直径均稍大于对照,表明低浓度的菌丝体水提取液促进菌丝延长,但菌丝干重均随着浓度的增加而减小,且均比对照小,表明处理液对菌落厚度有抑制作用。当浓度为100%时,菌丝体水提取液的菌落直径比对照小0.5 cm,菌丝干重比对照小0.25 g,发酵液菌落直径比对照小0.5 cm,菌丝干重比对照小0.09 g,由此可知,菌丝在此浓度下,菌丝长势稍慢,菌落厚度稍薄。

表1 灵芝菌丝体水提取液及发酵液对灵芝菌丝长势的影响

Table 1 Effect of water extract of the mycelium and fermentation broth of *Ganoderma lucidum* on mycelium growth

浓度 Concentration /%	菌丝体水提取液 Water extracts		发酵液 Fermentation broth	
	菌落直径 Colony diameter /cm	菌丝干重 Dry weight of mycelium/g	菌落直径 Colony diameter /cm	菌丝干重 Dry weight of mycelium/g
0(CK)	8.5	0.52	9.0	0.35
25	9.0	0.36	9.1	0.34
50	9.0	0.30	9.2	0.31
75	8.2	0.30	8.5	0.30
100	8.0	0.27	8.5	0.26

### 2.2 灵芝菌盖水提取液对灵芝菌丝体生长的影响

将灵芝菌丝接种至含灵芝菌盖水提取液的PDA平板中,倒置恒温箱中培养,待菌丝萌发后,通过十字交叉法计算菌落最终的直径,并收集菌丝烘干后测其生物量。由表2可知,不同浓度的菌盖提取液对灵芝菌丝的萌发均有抑制作用,对照菌丝萌发天数为2 d,而不同浓度的菌盖水提取液菌丝萌发均比对照慢,平均萌发需4 d,其中80%的水提取液对菌丝萌发抑制最强,萌发需4.5 d,比对照延迟2.5 d萌发;不同浓度的水提取液的灵芝菌丝体菌落直径均比对照小,其菌丝菌落直径平均为4.9 cm,比对照小3.6 cm,80%的水提取液菌丝菌落直径最小,为4.3 cm,比对照小4.2 cm;不同浓度的水提取液的灵芝菌丝干重均比对照小,干重平均为0.15 g,比对照小0.37 g,当浓度为80%时,菌丝的干重最小,比对照

小0.39 g,从菌丝长势可知,菌丝在此浓度下,不仅长势慢,菌落也比较薄。

表2 灵芝菌盖水提取液对灵芝菌丝体生长的影响

Table 2 Effect of water extract of the fruiting body pileus of *Ganoderma lucidum* on mycelium growth

浓度 Concentration/%	萌发天数 Germination day/d	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝干重 Dry weight of mycelium/g
0(CK)	2.0	8.5	0.52
40	4.0	4.8	0.14
60	3.5	5.2	0.19
80	4.5	4.3	0.13
100	4.0	5.1	0.15

### 2.3 灵芝菌柄水提取液对灵芝菌丝体生长的影响

将灵芝菌丝接种至含灵芝菌柄水提取液的PDA平板中,倒置恒温箱中培养,待菌丝萌发后,通过十字交叉

法计算菌落最终的直径,并收集菌丝烘干后测其生物量。由表3可知,不同浓度的菌柄水提取液对灵芝菌丝的萌发均有抑制作用,对照菌丝萌发天数为2 d,而不同浓度的菌柄水提取液菌丝萌发均比对照慢,平均萌发需4.3 d,其中40%和80%的水提取液对菌丝萌发抑制最强,萌发需4.5 d,比对照延迟2.5 d萌发;不同浓度的水提取液的灵芝菌丝体菌落直径比对照均小,其菌丝菌落直径平均为4.4 cm,比对照小4.1 cm,当浓度为80%时,菌丝菌落直径最小,为3.9 cm,比对照小4.6 cm;水提取液的灵芝菌丝干重均比对照小,不同浓度的水提取液菌

表3 灵芝菌柄水提取液对灵芝菌丝体生长的影响

Table 3 Effect of water extract of the fruiting body stipe of *Ganoderma lucidum* on mycelium growth

浓度 Concentration/%	萌发天数 Germination day/d	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝干重 Dry weight of mycelium/g
0(CK)	2	8.5	0.52
40	4.5	4.0	0.11
60	4.0	4.9	0.14
80	4.5	3.9	0.10
100	4.0	4.9	0.14

表4 菌丝体及发酵液对灵芝菌丝生长的自化感效应

Table 4 Allelopathy of extract of water extract of the mycelium and fermentation broth on mycelium growth of *Ganoderma lucidum*

浓度 Concentration /%	菌丝体水提取液 Water extracts		发酵液 Anhydrous alcohol extracts	
	菌落直径 Colony diameter /RI	菌丝干重 Dry weight of mycelium/RI	菌落直径 Colony diameter /RI	菌丝干重 Dry weight of mycelium/RI
0(CK)	0	0	0	0
25	0.056	-0.308	0.011	-0.029
50	0.056	-0.423	0.022	-0.088
75	-0.035	-0.423	-0.056	-0.143
100	-0.059	-0.481	-0.056	-0.257

## 2.5 子实体提取液对灵芝菌丝生长的自化感效应

由表5可知,不同浓度的菌盖水提取液对灵芝菌丝的自化感效应指数均为负值,表现为抑制作用,菌落直径与菌丝干重呈正相关,当浓度为80%时,对菌丝的直径化感效应强度为-0.494,表明该浓度下菌丝的生长速度最慢,对菌落的厚度的化感效应强度为-0.750,表明

表5 子实体提取液对灵芝菌丝生长的自化感效应

Table 5 Allelopathy of extract of the fruiting body on mycelium growth of *Ganoderma lucidum*

浓度 Concentration /%	菌盖水提取液 Water extracts		菌柄水提取液 Anhydrous alcohol extracts	
	菌落直径 Colony diameter /RI	菌丝干重 Dry weight of mycelium/RI	菌落直径 Colony diameter /RI	菌丝干重 Dry weight of mycelium/RI
0(CK)	0	0	0	0
40	-0.435	-0.731	-0.529	-0.788
60	-0.388	-0.635	-0.424	-0.731
80	-0.494	-0.750	-0.541	-0.808
100	-0.400	-0.712	-0.424	-0.731

丝干重平均为0.12 g,比对照小0.40 g,当浓度为80%时,菌丝的干重最小,为0.10 g,比对照小0.42 g,从菌丝长势可知,菌丝在此浓度下,不仅长势慢,菌落也比较薄。

## 2.4 菌丝体水提取液及发酵液对灵芝菌丝生长的自化感效应

由表4可知,低浓度的菌丝体水提取液能稍促进灵芝菌丝的伸长,高浓度的水提取液则对灵芝菌体的自化感效应均有抑制作用,但促进和抑制作用均没有超过50%,当浓度为100%时,对灵芝菌落直径的自化感作用虽仅为-0.059,但对菌丝干重的自化感效应却达-0.481,这表明浓度影响菌落的厚度。低浓度的发酵液对灵芝菌丝体的菌落直径有较低的促进作用,高浓度的发酵液对菌落直径的自化感效应均为负值,表明发酵液对灵芝有抑制作用,但抑制作用均很低,当浓度为100%时,对灵芝菌落直径和菌丝干重的自化感效应值为-0.056和-0.257,均没有超过50%,由此可见,灵芝发酵液和菌丝体的水提取液对灵芝自化感效应都较低。

菌落最薄;不同浓度的菌盖水提取液对灵芝菌丝自化感效应指数均为负值,表现为抑制作用,这与菌盖水提取液对灵芝菌丝的自化感效应一致。当浓度为80%时,对菌丝的直径的自化感效应强度为-0.541,对菌丝干重的自化感效应值为-0.808,表明该浓度下菌丝的生长速度最慢,表明菌落最薄。

## 3 讨论

灵芝没有根,它的营养来源于菌丝体,属于大型真菌,主要有2个生命周期,子实体(包括菌盖与菌柄)和菌丝体,菌丝体是子实体生长的基础。人工栽培灵芝主要用长满菌丝的栽培种脱袋覆土栽培,与其它作物一样存在连作障碍,引起灵芝连作障碍的原因主要有4个方面,该研究主要研究灵芝菌体的自毒作用。试验结果表明,菌丝体和发酵液对菌丝的自毒作用没有子实体明显,具有一定的浓度效应,表现为低浓度促进菌丝的生长,高浓度抑制菌丝的生长;子实体的菌柄和菌盖的水溶性成分对菌丝体的自毒作用均比较明显,且菌柄比菌盖对灵芝菌丝的自毒作用大,这可能与灵芝子实体水溶性提取液中含有水溶性蛋白质、多种氨基酸、多肽、多糖类、树脂、内酯、香豆精、核苷类、三萜类物质等有关<sup>[15]</sup>,这些物质曾被报导为作物的主要化感物质成分<sup>[16]</sup>,它们对灵芝生长的影响很可能通过灵芝子实体释放入菌糠和栽培的土壤,进而影响土壤微生物种群的特性,反过来,土壤的微生物种群的特性的改变又影响到栽培灵芝的生长。

## 参考文献

- [1] 董小艳,程智慧,张亮. 百合根系分泌物对4种观赏植物的化感作用[J]. 西北农林科技大学学报,2008,36(9):113-117.
- [2] 吴凤芝,赵凤艳,谷思玉. 保护地黄瓜连作对土壤生物化学性质的影响[J]. 农业系统科学与综合研究,2002,18(1):20-22.
- [3] GUENZI W D, MCCALLA T M. Phenolic acids in oats, wheat, sorghum and corn residues and their phytotoxicity[J]. Agro J, 1966, 58:303-304.
- [4] ASAA T, HASEGAWA K, SUEDA Y. Autotoxicity of root exudates from taro[J]. Scientia Hort, 2003, 97:389-396.
- [5] 胡元森,吴坤. 黄瓜不同生育期根系微生物区系变化研究[J]. 中国农业科学,2004,47(10):1521-1526.
- [6] 马红梅,李小兵,符浩,等. 灵芝连作障碍的土壤微生物种群特性及其生物防治初探[J]. 河南农业科学,2014,43(3):53-58.
- [7] 马红梅,樊荣. 灵芝菌糠提取液对灵芝菌丝体生长的化感效应[J]. 北方园艺,2015(15):136-139.
- [8] 王广印,韩世栋,谢玉会,等. 辣椒植株水浸液对辣椒和番茄种子萌发的自毒作用[J]. 华北学报,2009,24(3):123-127.
- [9] ASAA T, HASEGAWA K, SUEDA Y. Autotoxicity of root exudates from taro[J]. Scientia Hort, 2003, 97:389-396.
- [10] 银福军,翟先友,普伟,等. 黄连不同部位水浸液自毒作用研究[J]. 中药材,2009,32(3):329-330.
- [11] RICE E L. Allelopathy[M]. New York:Academic Press,1974.
- [12] YU J Q. Autotoxic potential of vegetable crops. In: Narwal, S. S. (ed.), Allelopathy: Basic and applied aspect[M]. Scientific Publisher, Inc N H, 1999.
- [13] 张晓玲,潘振刚,周晓峰,等. 自毒作用与连作障碍[J]. 土壤通报, 2007,38(4):781-784.
- [14] WILIAMSON G B. Bioassays for allelopathy measuring treatment responses with independent control[J]. Journal of Chemical Ecology, 1988, 14(1):181-187.
- [15] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 3版. 北京:北京大学医学出版社, 2007:41,199-244.
- [16] RICE E L. Allelopathy(2nd ed)[M]. Orlando:Academic Press,1984:432.

Autotoxicity in Continuous Cropping Obstacle of *Ganoderma lucidum*

MA Hongmei, ZHAO Peifang

(College of Tropical Biology and Agronomy, Hainan Tropical Ocean University, Sanya, Hainan 572022)

**Abstract:** Taking *Ganoderma lucidum* as test material, water extraction of mycelium and fermentation broth with four different gradient volume percentage concentration of 25%, 50%, 75% and 100% and the fruit body with four different gradient volume percentage concentration of 40%, 60%, 80% and 100% were prepared respectively and joined in PDA media to culture *Ganoderma lucidum* mycelium. Response indices (RI) were calculated by doing statistical analysis, in order to study autotoxicity of *Ganoderma lucidum* in continuous cropping obstacle. The results showed that water extraction with the low concentration and fermentation broth could promote mycelium growth and the high concentration inhibited mycelium growth, but the colony thickness was less than the controls. Different concentration of pileus and stipe water extraction of the *Ganoderma lucidum* body fruit had autotoxicity, which inhibited germination and growth potential of mycelium; colony diameters were shorter and the dry biomass were lighter than controls. With the 80% concentration of water extract, RIs were maximum; the colony diameters were  $-0.494$  and  $-0.541$  respectively, dry biomass of mycelium were  $-0.750$  and  $0.808$  respectively. It was concluded the water extract of mycelium and fermentation broth had little effect on the growth of *Ganoderma lucidum*. However, the water extract of the *Ganoderma lucidum* fruiting body had stronger autoallelopathy than water extraction of mycelium and fermentation broth.

**Keywords:** *Ganoderma lucidum*; mycelium; fermentation; autointoxication