

春兰菌根真菌的分离及培养特征研究

陶诗¹, 刘一令¹, 黄小香¹, 徐强¹, 邓娜², 黎勇¹

(1. 内江师范学院 化学与生命科学学院, 四川省特色农业资源研究与利用重点实验室, 四川 内江 641112; 2. 内江市第二中学 四川 内江 641000)

摘要: 采用改良 PDA 分离培养基, 通过切片法从春兰 (*Cymbidium goeringii* Rehb. f.) 菌根中分离内生真菌, 并用打孔法分离得到纯化菌株。初步鉴定为 6 株内生真菌 (LC-1、LC-2、LC-3、LC-4、LC-5、LC-6)。结果表明: 切片分离时的表面消毒条件和方法以及分离培养基的选用, 均直接影响菌根真菌的分离纯化结果, 及分离得到的内生菌的多样性。以 75% 酒精处理 30 s + 0.1% 升汞处理 5 min 进行表面消毒, 效果稳定, 配合改良的 PDA 培养基分离内生菌, 可以分离出较多的内生菌种类。

关键词: 春兰; 菌根; 内生真菌; 分离; 培养特性

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)16-0108-04

兰科植物为多年生草本、亚灌木, 全世界约有 700 属近 20 000 多种以及大量的变种。中国约有 173 属 1 240 多种左右, 主要分布于长江流域和华南、西南以及台湾各省的山区^[1,2]。兰科植物有 2 个重要特征: 第一, 种子细小且不含胚乳, 是分化不全的胚细胞; 第二, 原球茎分化成幼苗的过程中, 依赖真菌建立共生体系, 或在基质中加入特定的营养物质以代替真菌的作用³。在自然条件下, 兰科植物的根与真菌共生, 形成兰科菌根 (Orchidmycorrhizae), 菌根真菌对促进种子萌发, 提高兰花组培苗的成活率, 促进兰花营养生长有重要作用, 菌根真菌的分离对春兰的商品化生产有重要的现实意义。徐锦堂等^[4]已经成功筛选出促进天麻种子萌发和生长的菌根菌并进行了效果良好的侵染试验。因此, 了解与兰根共生的真菌种类, 以及其培养特性的研究有利于进一步探讨兰科植物与真菌间的相互作用机制, 将为自然条件下兰科植物的栽培提供有价值的理论依据。

中国兰花指产于我国的兰科 (Orchidaceae) 兰属 (*Cymbidium*) 植物, 而且主要指其中的地生兰^[5]。春兰是其中较重要的一种。该试验主要以内江师范学院组培春兰的试验成果为参照, 对盆栽春兰中的菌根菌加以分离, 以期为提高组培春兰幼苗移栽成活率及生长势提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物 盆栽春兰, 取自内江师院特色农业资源研究与利用重点实验室种植园圃, 选择长势良好的盆栽春兰 5 盆。

1.1.2 分离菌根菌所用的培养基 PDA-抗生素培养基: (马铃薯 200 g, 琼脂 20 g, 蛋白胨 10 g, 磷酸氢二钾 (K₂HPO₄) 1 g, 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 0.5 g, 七水硫酸镁 (MgSO₄ · 7H₂O) 0.1 g, 水 1 000 mL; 改良 PDA 培养基: 在以上培养基的基础上加入少量酒石酸铵以及微量元素溶液 (每 1 000 mL 微量元素混合液含有 8.45 g H₃BO₃, 5.00 g MnSO₄, 0.63 g CuSO₄ · 5H₂O, 6.00 g FeSO₄, 2.27 g ZnSO₄, 0.27 g (NH₄)₂MoO₄)。

1.2 主要仪器设备

DNP-9272-1A 电热恒温培养箱, BL-50 立式压力蒸汽灭菌器筒, SW-CJ-1CU 双人单面净化工作台, LDZ4-0.8 自动平衡微型离心机, 微波炉。

1.3 试验方法

1.3.1 菌根真菌的分离及纯化培养 分离方法参照郭顺星^[6]等的关于菌根菌的分离方法, 略作改进。自根尖取兰科植物新鲜营养根 8~10 cm, 清水洗净, 用 75% 酒精处理 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 滤纸吸干。再用 0.1% 的升汞溶液分别处理 1、3、5、7 min, 无菌水冲洗 3 次, 滤纸吸干。最后 1 次洗液备用。用灭菌解剖刀在培养皿中将根横切成薄片, 薄片置 PDA 培养基上, 每个培养皿 2~3 个, 以每个灭菌时间为 1 个梯度, 每个梯度接种 10 套平板 (2 种培养各 5 套), 24℃ 恒温培养。最后 1 次洗液各接种 5 套平板, 以作为灭菌程度的对照。薄片边缘长出菌落后, 切取菌落边缘的培养基小块, 转移至另一

第一作者简介: 陶诗 (1986-), 男, 本科在读, 研究方向为植物内生真菌。

通讯作者: 黎勇 (1968-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为微生物学与环境工程微生物学。

收稿日期: 2010-04-27

平板纯化培养, 培养 2~3 d 后, 置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3.2 分离验证及培养特征观察 在分离成功后, 以上述试验结果为基础。基本方法不变, 做重复分离, 以对上述结果加以验证。菌株用打孔法扩大繁殖 培养于 24℃ 恒温条件下, 观察形态特征。

2 结果与分析

2.1 试验方法的影响

2.1.1 升汞灭菌时间对菌落数量形成的影响 由于春兰的根有典型的兰科植物菌根结构, 菌根真菌菌丝团主要分布在兰根中部的皮层细胞中^[7], 所以在灭菌时根据其材料的特性做适当的调整, 通过该试验证明用升汞处理时最好保持在 5 min 为宜, 配合以酒精处理时间维持 30 s 时, 效果更为明显, 而且由于在相关文献中报道在根基和根尖中存在的内生菌较少, 所以在取材时也应注

意尽量选取根中部的材料做切片。从表 1 可以看出, 不同的时间处理, 感染的概率有明显差异。在 1、3 min 处理条件下, 有较多杂菌感染, 主要为细菌, 有个别为霉菌。由此看出, 在 1、3 min 处理下, 明显灭菌未彻底。在 5、7 min 处理下, 仅有极个别平板长菌, 可能为接种感染杂菌所致, 而对照中并无杂菌长出, 说明灭菌较为彻底, 可以确定试验组长出的真菌为内生真菌, 而非菌根外部附属菌或杂菌。

表 1 升汞灭菌时间对菌落数量形成的影响

时间/min	长菌皿数/个	未长菌皿数/个	长菌率/%
1	14	6	70
3	10	10	50
5	2	18	10
7	2	18	10

注: 以上数据是 3 次重复试验的平均值 表 2 同。

表 2 升汞灭菌时间以及培养基对菌根真菌生长的影响

时间/min	PDA 抗生素培养基				改良 PDA 培养基			
	长菌皿数/个	未长菌皿数/个	出菌率/%	感染情况	长菌皿数/个	未长菌皿数/个	出菌率/%	感染情况
1	5	0	100	严重	5	5	100	严重
3	5	0	100	严重	5	5	100	严重
5	3	2	60	基本无感染	4	1	80	基本无感染
7	2	3	40	无感染	3	2	60	无感染

表 3 升汞灭菌时间以及培养基对菌根真菌多样性的影响

时间/min	PDA 抗生素培养基		改良 PDA 培养基	
	菌株种类/株	感染情况	菌株种类/株	感染情况
1	较多	感染严重	较多	感染严重
3	较多	感染严重	较多	感染严重
5	2	基本无感染	5	基本无感染
7	2	无感染	3	无感染

注 以上数据为 3 次平板数据总和 在 1 号基本无内生真菌生长, 基本均为细菌, 在 3 号中仅有少数有真菌菌落生长, 大部分为细菌。

2.1.2 升汞灭菌时间以及培养基对菌根真菌生长和真菌多样性的影响 表 2 中在 1、3 min 中虽然每个平板都长有菌, 但是大部分为细菌, 杂菌较多。从表 2、3 中分析得出, 5 min 处理条件中的出菌率远远高于 7 min, 同时前者菌株多样性与后者也有明显差异。综上所述, 不同的时间处理对内生真菌的多样性有显著影响。该试验中 5 min 处理较为适宜, 但仍有较多需要探索改进的地方, 以便寻求更加适合的浓度时间。国内目前采用的消毒方式较为单一, 大多采用 0.1% HgCl₂ 与 75% 乙醇相结合的方式, 部分采用 5% NaClO 与 75% 乙醇相结合的方式。前者存在毒性残留与对环境危害较大等问题, 需要不断探索, 以寻求新的消毒剂加以代替。

2.2 分离出的典型菌根真菌培养特征

经分离, 得到的 6 株菌根真菌, 分别命名为 LC-1、LC-2、LC-3、LC-4、LC-5、LC-6, 各菌株培养特点如下。

菌落早期为白色, 其后逐渐转变为微黄 较干燥, 边

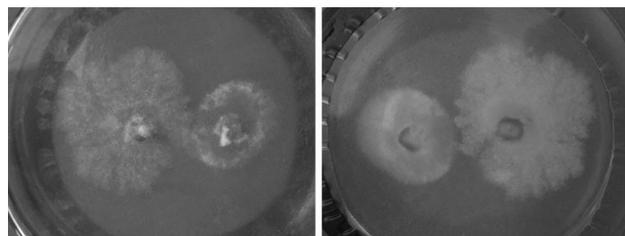


图 1 LC-1 培养形态(左: 正面; 右: 背面)

缘锯齿状。背面颜色较浅, 正背面颜色相差不大。菌丝分布不均匀, 在菌落周围气生菌丝较多, 成茸状, 向上生长。生长时间为 3 d(图 1)。

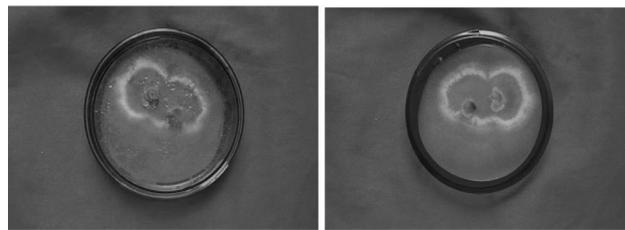


图 2 LC-2 培养形态特征(左: 正面; 右: 背面)

菌落一直为灰白色, 背面颜色微黄, 菌丝分布不均匀, 在菌落中心有较少气生菌丝, 外周部分有大量气生菌丝, 毛状, 平铺生长。生长时间 4~5 d(图 2)。

菌落为白色, 正背面颜色差距较小, 菌落形状圆形

边缘整齐。菌丝较细,无明显分支。整个菌落菌丝分布均匀,周围有较多气生菌丝,毛状,平铺生长。生长时间为3~4 d(图3)。

菌落纯白色,菌丝较多且长,有明显分支,正背面颜色几乎无差异,大量气生菌丝,毛状,平铺生长。整个菌落菌丝分布均匀,边缘锯齿状,生长时间为3~4 d,较易分离(图4)。

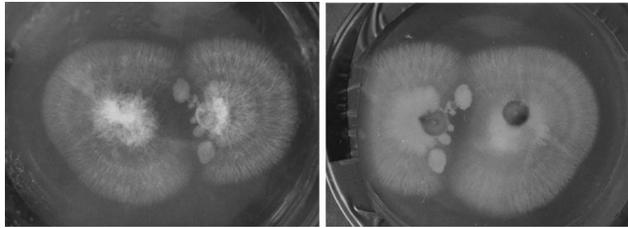


图3 LC-3 培养形态特征(左:正面;右:背面)

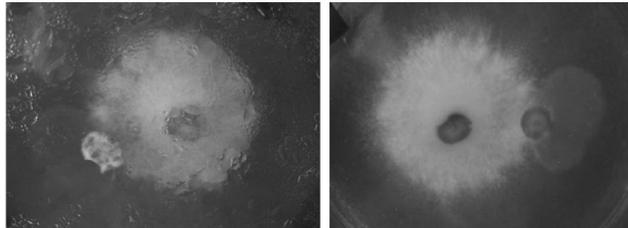


图4 LC-4 培养形态特征(左:正面;右:背面)

菌落较湿润,微黄,边缘锯齿状。菌丝较粗,有明显分支,菌丝弯曲生长,分布不均匀,正背面颜色一致。无明显气生菌丝,生长时间较长,一般5 d左右(图5)。



图5 LC-5 培养形态特征(左:正面;右:背面)

菌落圆形,呈明显的辐射状,菌落颜色灰白,几乎与培养基颜色一致,正、背面无差距。菌丝较细,看不到明显分支,无明显气生菌丝,整个菌落光滑平整。生长时间较长,大约5 d(图6)。

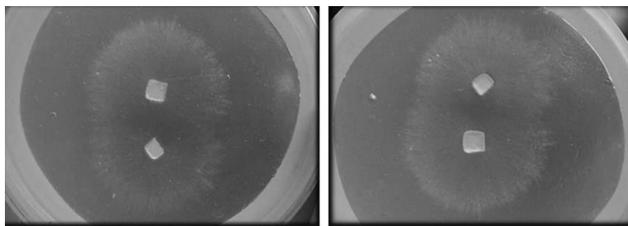


图6 LC-6 培养形态特征(左:正面;右:背面)

说明:以上为各典型菌株试验照片,前4株为分离

照片,后2株为纯化培养后的照片。

3 讨论

研究过程中,观察比较用PDA培养基与改良的PDA培养基分离春兰内生真菌,可看出二者对于内生菌的分离有很大差异。前者分离的菌株明显少于后者,加入的酒石酸铵和特定的微量元素在一定程度上对菌根真菌的生长有良好作用,具体情况仍需进一步探讨。

表面灭菌试剂及不同时长处理,对内生真菌的分离也有很大影响。材料消毒措施的力度(消毒剂的杀菌力、使用浓度、消毒时间等)越大,灭菌就越彻底,污染力就越低。但是消毒剂对植物组织细胞都是有毒的,因此组织细胞的损伤也越重,成活率也就越低^[8]。从试验中可以看出,升汞作用时间过长,将导致根内真菌的分离效果差,所以应根据具体的试验材料对表面灭菌时间做出相应调整,选择适宜的灭菌时间是进行内生菌分离时应该仔细考虑的问题。

分离得到的菌根真菌的培养过程观察发现,春兰内生真菌不同种类的生长情况差异很大。LC-1、LC-3、LC-4生长比较快,2 d就能长出菌落。LC-2、LC-5、LC-6则生长缓慢,要3 d后才会长出来。这可能由真菌本身的生长特性或者这种菌的种群数量决定。

内生真菌(特别是小型丝状真菌)分离鉴定用的培养基有Martin琼脂培养基、PDA培养基、察氏琼脂培养基、麦芽汁培养基、牛肉浸汁(血)琼脂、曲汁培养基、Pfeffer液体培养基、Sabouraud琼脂培养基、玉米粉琼脂和燕麦粉琼脂等^[9]。可试验表明春兰内生真菌的分离采用传统的平板培养方法也可以取得很好的效果。该方法简便、经济,也容易普及。兰草内生菌的分离对于组培苗的驯化与适应能力,或者兰草在自然条件下的栽培均可能起到很好的帮助。兰科内生真菌与真菌形成共生联合体,深入了解兰科菌根的特点,筛选优良的兰科内生真菌资源,加强对防御和次生代谢相关酶的研究,将菌剂技术应用于兰科植物工业化生产上,对解决兰科植物的种植方面的问题有重大意义^[10]。因此,开展兰科植物内生菌的分离与其培养特性的研究对生产实践都具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] Luo Y B, Jia J S, Wang C L. A general review of the conservation status of Chinese orchids [J]. Biodiv Sci, 2003, 11(1): 70-77.
- [2] Chen X Q. A new genus (*Tangtsinia*) in Orchidaceae and on the phylogenetic significance [J]. Acta Phytotaxon Sin, 1965, 16(4): 196-206.
- [3] Peterson R L, Currah R S. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale* [J]. Can J Bot, 1990, 68: 1117-1125.
- [4] Xu J T, Guo S X. Fungus associated with nutrition of seed germination of *Gastrodia elata*-*Mycena osmundicola* Langf [J]. Acta Mycol Sin, 1989, 8(3): 221-226.

珍稀濒危植物双蕊兰的生境调查

张丽杰¹, 周强², 鞠文鹏³, 李海燕³, 王艳杰², 周永斌¹

(1. 沈阳农业大学 林学院 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁省实验林场, 辽宁 清原 113311;

3. 辽宁省老秃顶子国家级自然保护区管理局 辽宁 桓仁 117219)

摘要: 分别于 2007~2009 年对双蕊兰的生境进行了调查, 旨在了解双蕊兰的生活习性, 为其找到无性繁殖的途径提供理论依据。

关键词: 双蕊兰; 天然分布; 生活环境

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)16-0111-02

双蕊兰 (*Diplandrorchis sinica* S. C. Chen) 为兰科双蕊兰属植物, 是兰科植物中最原始的子遗植物, 在世界上唯有老秃顶子自然保护区独有物种^[1], 由于其分布区域及其狭窄, 种群数量逐年出现减少现象, 处于濒危境地, 被列为国家二级保护植物^[2]。因此, 双蕊兰的保护

和管理已成为野生植物保护和科研部门迫切需要解决的问题。

物种是由居群和居群系统构成的, 是和环境相互适应长期进化的产物。科学的保护措施规定, 依赖于对物种与环境关系的深入了解。关于双蕊兰的研究较少, 祝业平等^[3]对双蕊兰生物习性种群分布区域进行了调查研究, 张丽杰等^[3]对双蕊兰的生物学特征以及双蕊兰的特点、研究价值进行了探讨。但对双蕊兰的适生环境还缺乏系统的调查和研究。现通过对双蕊兰的生境进行调查研究, 旨在为双蕊兰的科学保护以及探索一条无性繁殖途径提供理论依据和参考价值。

第一作者简介: 张丽杰(1972-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事林木遗传育种方面的研究工作。

通讯作者: 周永斌(1970-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事森林生态方面的教学和科研工作。

基金项目: 沈阳农业大学青年教师基金资助项目(20060225)。

收稿日期: 2010-05-11

[5] 云南省建设厅, 云南省兰花爱好者协会. 云南兰谱[M]. 昆明: 云南美术出版社, 1996.

[6] 郭顺星, 曹文琴, 高微微. 铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(6): 338-341.

[7] 余知和, 曾昭清, 张明涛. 春兰菌根的显微结构及菌根真菌的分离[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(3): 332-335.

[8] 肖显华, 王顺珍, 林荣双, 等. 植物材料表面消毒方法的改进[J]. 生物技术, 1999, 9(1): 43-45.

[9] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 341-365.

[10] 罗在荣, 乙引, 唐金刚, 等. 兰科植物内生真菌对其宿主植物生理效应研究[J]. 贵州林业科技, 2007, 35(1): 35.

(该文作者还有张霞, 工作单位同第一作者。)

Isolation and Culture Features of *Cymbidium goeringii* Mycorrhizal Fungi

TAO Shi¹, LIU Yi-ling¹, HUANG Xiao-xiang¹, XU Qiang, DENG Na², LI Yong¹

(1. Chemistry and Life Science College, Neijiang Teachers College, Characteristic of Sichuan Agricultural Resources Research and Use of the Laboratory, Neijiang, Sichuan 641112; 2. The Second School in Neijiang, Neijiang, Sichuan 641000)

Abstract: Six Mycorrhizal endophyte strains was isolated from *Cymbidium goeringii*, the modified PDA medium and punching method was used to get purcultures. Isolated strains was named as LC-1, LC-2, LC-3, LC-4, LC-5, LC-6 respectively. The results showed that slice separation conditions, methods of surface disinfection, as well as the selection of media for isolation had a direct impact on the results of mycorrhizal fungi separation. For surface disinfection, 75%ethanol, 30 seconds+0.1%mercuric chloride, five minutes, show stable effect. And this disinfection condition plus the modified PDA medium was an optimum method for mycorrhizal fungi isolating in *Cymbidium goeringii*.

Key words: *Cymbidium goeringii*; endotrophic mycorrhizae; mycorrhizal fungus; isolation; culture features