

不同培养条件对绶草菌根真菌生长的影响

王平平, 陈旭辉, 曲波, 邵美妮, 车明辉

(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以兰科植物绶草菌根真菌为试材,通过分离、纯化、培养其菌根菌的方法,设置温度、光照、碳源、氮源和酸碱度等培养条件进行单因素试验,对菌根真菌在不同培养条件下的生长状况及培养性状进行了研究。结果表明:该绶草菌根菌在 5~30℃ 时均能生长,最适温度为 25℃;在各种光照处理下均能生长,但在黑暗条件下绶草菌根菌生长最好;偏酸性环境(pH 4.0~5.0)更有利于该菌根菌生长;对碳源的利用上,对果糖利用最好;对氮源的选择上,在硝酸铵为氮源的培养基上生长最好。

关键词:绶草;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)19-0170-03

兰科是被子植物的第二大科,其种类仅次于菊科植物^[1],在系统演化上属于最进化、最高级的类群^[2]。19 世纪人们就发现兰科植物根中存在着真菌,之后,兰科植物的菌根关系得到证实,并进行了广泛系统的研究。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了广泛的研究^[4]。目前研究表明,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)^[5-7],其中,半知菌门包括丝核菌属(*Rhizoctonia*)^[8]。绶草 [*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames] 属兰科绶草属多年生宿根草本植物^[6],具有滋阴益气、凉血解毒、润肺止咳、消炎解毒之功效。绶草具有较高的药用价值,已经从中分离出多种化合物^[7-8]。程玉鹏等^[9]研究得出,菌根真菌对兰科植物的种子萌发及植株生长发育均有一定影响,可以促进绶草的种子萌发^[10],并且刘紫英^[11]对绶草的菌根真菌进行了分离及鉴定,从根中分离 7 属 18 菌株,其中优势菌株为镰刀霉属(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillus*),但是对绶草根内生真菌的离体培养性状未见研究报道。该研究以辽东地区的绶草菌根为材料,分离纯化其菌根真菌,研究其生长的最适生长条件,为绶草种子萌发提供菌源,并丰富绶草的保护生物学研究内容,对

开发绶草药用价值具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用菌种分离自绶草根,于 2010 年采自辽宁省大连市庄河市冰峪沟(N 40°01'26.69", E 123°00'52.54")。取绶草根段,将其用 75% 的酒精浸约 1 min,再用 0.1% 升汞表面消毒。在无菌条件下将根切成小段(1 cm 左右),直接放在 PDA 培养基上室温下培养。分离纯化后,经形态学特征鉴定该菌为毛霉属(*Mucor*) (菌株编号:绶草-CL001)。培养基:该试验所用培养基为马铃薯培养基(PDA)。马铃薯 200 g,水 1 000 mL,沸水煮熟后过滤得马铃薯汁,再加入葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,pH 自然。

1.2 试验方法

试验设温度范围为 5、10、15、20、25、30℃;光照条件为 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℃);碳源为葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露糖、半乳糖、果胶、木糖;氮源为尿素、氯化铵、草酸铵、硫酸铵、硝酸铵、甘氨酸;pH 范围是 4、5、6、7、8。每个处理 3 次重复,于接种后 1~7 d 用游标卡尺采用十字交叉法测量菌落直径。

1.3 数据分析

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 不同温度对绶草菌根菌落生长的影响

绶草菌根菌在不同温度下生长速率不同。由图 1 可知,菌落在 25℃ 时生长最快,第 2 天长满 9 cm 的培养

第一作者简介:王平平(1987-),女,硕士,研究方向为濒危植物保护。

责任作者:曲波(1972-),女,博士,副教授,研究方向为植物资源保护利用。

基金项目:沈阳农业大学青年教师基金资助项目(20101004)。

收稿日期:2012-06-19

皿,生长速度为 4.150 cm/d。其次是在 20℃时,第 3 天可长满培养皿,生长速度为 2.767 cm/d。而在 5℃时生长最差,7 d 时菌落直径最大仅为 2.992 cm,生长速度仅为 0.327 cm/d。统计分析表明,在 5℃时菌丝生长速度在 0.05 和 0.01 水平上显著低于其它温度下的生长速度,存在显著性差异。所以,25℃为培养绶草菌根真菌的最佳温度。

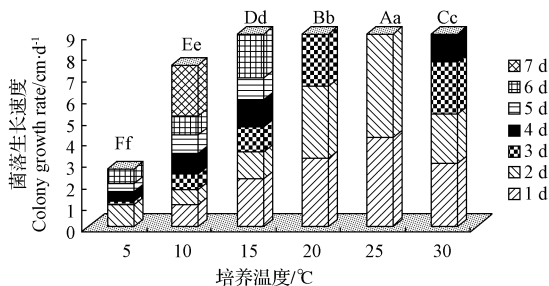


图1 不同温度对菌落生长的影响

2.2 不同光照对绶草根菌菌落生长的影响

光照对绶草根菌生长有一定的影响。由图 2 可知,在 24 h 黑暗条件生长最好,第 3 天测量菌落直径平均 8.14 cm,生长速度为 2.48 cm/d,其次为 12 h 日光灯+12 h 黑暗条件,第 3 天菌落直径最大为 7.186 cm,生长速度为 2.162 cm/d。12 h 自然光室温下菌落长势最差,第 3 天菌落直径仅为 6.260 cm,生长速度为 1.853 cm/d。统计结果表明,12 h 自然光室温下菌丝生长速度在 0.05 和 0.01 水平上显著低于其它处理条件下的生长速度,存在显著性差异。所以,24 h 黑暗条件下菌落生长最好。

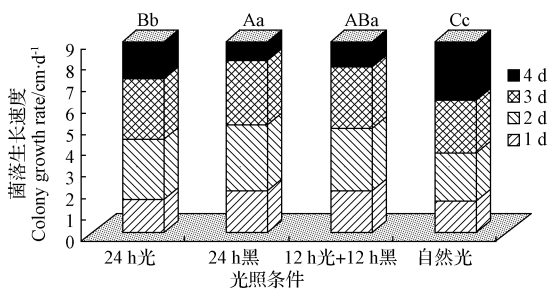


图2 不同光照对菌落生长的影响

2.3 不同碳源对绶草根菌菌落生长的影响

由图 3 可知,培养 3 d 后,绶草根菌真菌在 7 种碳源培养下长势都很好,均能长满培养皿。其中在果糖条件下生长速度较其它条件快,第 2 天时菌落直径可达 6.225 cm,生长速度为 2.763 cm/d。在果胶条件下生长最慢,第 2 天菌落直径为 4.990 cm,生长速度为 2.145 cm/d。统计结果表明,绶草根菌真菌在果胶条件下生长速度在 0.05 和 0.01 水平上显著低于其它培养条件,存在显著性差异。所以该菌在果糖培养下生长最好。

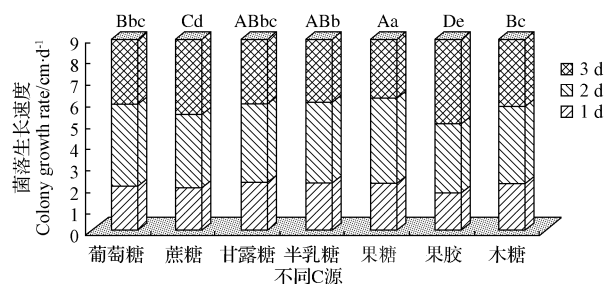


图3 不同碳源对菌落生长的影响

2.4 不同氮源对绶草根菌菌落生长的影响

由图 4 可知,培养 3 d 后,绶草根菌在除尿素外的几种 N 源培养下都可以生长。在硝酸铵条件下长势最好,第 3 天菌落直径达到 8.301 cm,生长速度为 2.767 cm/d。其次是硫酸铵,第 3 天的菌落直径为 8.347 cm,生长速度为 2.549 cm/d。在尿素条件下菌落不生长,说明尿素对菌丝的生长有抑制作用。其它 N 源下菌落生长中速。统计结果表明,绶草根菌真菌在尿素培养下生长速度在 0.05 和 0.01 水平上显著低于其它培养条件的生长速度,存在显著性差异。所以,绶草根菌在硝酸铵培养下长势最佳。

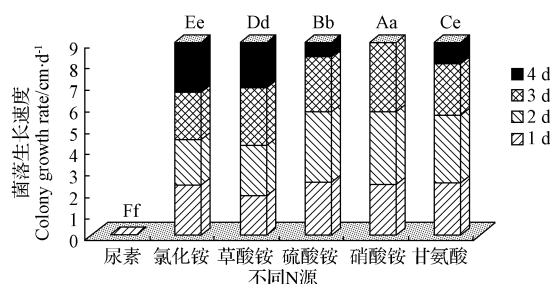


图4 不同氮源对菌落生长的影响

2.5 不同 pH 对绶草根菌菌落生长的影响

由图 5 可知,绶草根菌在 5 个 pH 梯度下都可以生长,但是长势不同。随着 pH 的增大,菌丝生长的速度逐渐减慢。在 pH 为 4 时生长的最好,第 2 天菌落直径可达 7.047 cm,生长速度为 3.174 cm/d。其次 pH 为 5 时,2 d 菌落直径 6.524 cm,速度为 2.912 cm/d。pH 为 8 时菌丝生长最差,2 d 直径仅为 2.555 cm,生长速度 0.928 cm/d。统计结果表示,绶草根菌真菌在 pH 为 8

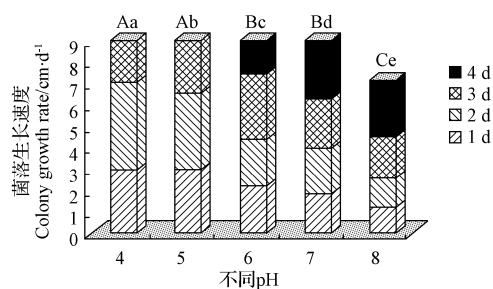


图5 不同 pH 对菌落生长的影响

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。所以在 pH 为 4 时菌落生长最好。

3 结论与讨论

绶草菌根菌在 5~30℃ 都能生长,最适温度为 25℃,在 5℃ 时生长非常缓慢,然后随温度升高生长加快,但超过 25℃ 时随温度升高菌丝生长变慢,说明其在室温条件下适宜生长,温度过高或过低都会影响其生长速度。在各种光照处理下绶草菌根菌均能生长,但在黑暗下绶草菌根菌生长最好,因为真菌自根分离出为无光的生活条件,即是真菌适宜的生存环境,所以在黑暗的条件下生长最佳。绶草菌根菌在偏酸性环境下(pH 4.0~5.0)更有利于该菌的生长,生长速度较其它 pH 条件下快,这与绶草生存环境的土壤 pH 有关,该试验用绶草采于辽宁省东部的大连庄河地区,此地区土壤呈偏酸性,为绶草良好的生存环境,亦为绶草根内生真菌的生活环境,所以该试验真菌在 pH 4.0~5.0 时生长最好。在对各个碳源条件的利用方面,该菌均能很好的生长,但对果糖利用最好,半乳糖和葡萄糖次之,对果胶的利用最差,说明绶草菌根菌对单糖的利用较好于多糖。对氮源的利用有明显的选择性,以硝酸铵为 N 源的培养条件下生长最快,其次为硫酸铵和甘氨酸,说明绶草菌根真菌对硝态铵的利用吸收最好。而在尿素为氮源的培养基上基本不生长,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。

参考文献

- [1] 杨增宏,张启泰,冯志丹,等. 兰科—中国兰科植物采集[M]. 北京:中国世界语出版社,1993:8.
- [2] 郎楷永. 兰科植物区系中一些有意义属的地理分布格局的研究[J]. 植物分类学报,1994,32(4):328-339.
- [3] Bernard N. La germination des orchidees[J]. Revue générale de botanique, 1903,16:405-451,458-475.
- [4] 陈瑞蕊,林先贵,施亚琴. 兰花菌根研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2003,9(1):97-101.
- [5] 余德发,陈任芳. 小巧玲珑的原生植物—绶草[J]. 花莲区农业专讯,2001(36):8-10.
- [6] 万发令,温英萍,李曙我,等. 江西兰科药用植物资源的利用与保护[J]. 江西林业科技,2006(4):41-43.
- [7] 董美伶,谢媛媛,陈剑,等. HPLC 法测定绶草中的绶草黄酮[J]. 中草药,2005,36(6):921-922.
- [8] Lin Y L, Wang W Y, Kuo Y H, et al. Homocyclotriuranolane and two dihydrophenanthrenes from *Spiranthes sinensis* [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2001,49(9):1098-1101.
- [9] 程玉鹏,王振月,李慧玲,等. 盘龙参内生真菌分布特征的研究[J]. 中国林副特产,2008,93(2):22-23.
- [10] Masuhara G, Katsuya K. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames, var. *amoena* (M. Beberstein) Hara (Orchidaceae) [J]. New Phytologist, 1994,127:711-718.
- [11] 刘紫英. 濒危药用植物绶草内生真菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2010(6):553-555.

Effect of the Different Culture Conditions on the Growth of *Spiranthes sinensis* Mycorrhizae

WANG Ping-ping, CHEN Xu-hui, QU Bo, SHAO Mei-ni, CHE Ming-hui

Abstract: With Orchidaceae plant *Spiranthes sinensis* mycorrhizal fungi as the test material, by the mycorrhizal fungi separated, purified and cultivated mycorrhizae of *Spiranthes sinensis*, setting temperature, light condition, carbon sources, nitrogen sources, acidity and alkalinity and so on for single-factor test, the growth conditions and culture traits of mycorrhizae of *Spiranthes sinensis* were studied in different culture conditions. The results showed that *Spiranthes sinensis* mycorrhizae could grow within 5~30℃, and 25℃ was its optimum temperature; in all kinds of light conditions could grow, the optimum condition was dark; the optimum pH was pH 4.0 to 5.0; its optimal carbon sources was fructose; the optimal nitrogen source was NH_4NO_3 .

Key words: *Spiranthes sinensis*; mycorrhizae; culture conditions; growth rate