

越橘菌根菌种子培养基的筛选

龚 娜, 杨 镇, 王 娜, 陈 珣, 肖 军, 杨 涛

(辽宁省农业科学院 微生物工程中心, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以菌丝长速和菌丝干质量为测量指标,结合液体发酵培养生长曲线,研究了越橘菌根菌菌丝生长的最佳培养基和最佳培养时间。结果表明:从4种培养基中初筛出PDMA培养基为适合该菌株生长的基础培养基,得到了该菌株种子培养的最佳液体转接时间为液态发酵的第2~3天,最佳生产时间为第5天,产量最高,为3.45 g/100mL。

关键词:菌根菌;种子培养基;筛选

中图分类号:Q 948.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)20-0110-03

菌根菌作为植物的共生体,对植物的促生作用产生显著影响。大量研究表明,菌根真菌能显著促进植物对土壤中营养物质的吸收、提高植物抗病虫害的能力。研究表明,菌根真菌对越橘的营养吸收和生长发育有重要的生理作用^[1]。新西兰已经将接种菌根真菌作为促进越橘生长、提高肥料利用率、提高产量的一项有效措施^[2]。我国越橘菌根菌是未来生产天然活性物质的有效途径,液体深层发酵是现代大规模工业化生产微生物菌体及代谢产物的主要方法,因此,恰当的培养基配方,对发酵产品的产量有着极大的影响,培养基是微生物生长的主要营养来源,对于微生物生长繁殖、酶的活性与产量都有直接的影响。选择合适的培养基能最大的发挥菌种的特性,提高产量。

该试验以分离自越橘的内生真菌为出发菌株,菌种经过多次分离纯化,发现该菌株在改良MMN培养基上的长势缓慢且菌丝稀疏,极易老化。对该菌株的菌丝生长的种子培养基进行了筛选,在最优生长培养基条件下进行了生长曲线的测定,以期掌握该菌株生长的最佳培养基及最佳培养时间,为菌种的扩繁和菌剂制备的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用菌株D菌由辽宁省农业科学院微生物工程

中心分离自野生越橘根内。1号PDA培养基:葡萄糖20 g,马铃薯200 g。2号改良MMN:葡萄糖10 g,氯化钙0.05 g,麦芽汁(12.7Be°)100 mL,NaCl 0.025 g,KH₂PO₄ 0.025 g,MgSO₄·7H₂O 0.15 g,(NH₄)₂HPO₄ 0.25 g,FeCl₃(1%溶液)1.2 mL,维生素B 10.1 g^[2]。3号PDMA培养基:20%马铃薯汁500 mL,麦芽汁(2Be°)500 mL,葡萄糖20 g,维生素B 10.05 g。4号综合马铃薯汁培养基:20%马铃薯汁1 000 mL,葡萄糖20 g,MgSO₄·7H₂O 1.5 g,维生素0.1 g,KH₂PO₄ 3 g。

1.2 试验方法

1.2.1 固体培养 用无菌打孔器接种生长一致的、直径约7 mm的D菌菌种活化后的菌饼,接种到4种不同固体培养基上,(26±1)℃,黑暗培养7 d,每隔1 d十字划线测定菌落直径。培养结束后加热融化琼脂,并用蒸馏水冲洗3次,3 000 r/min离心20 min,收集菌丝体,置于60℃烘箱,烘至恒重,称取质量,每个处理均重复3次^[3]。

1.2.2 液体种子培养 用无菌打孔器将生长一致、直径约7 mm的D菌菌种活化后的菌饼,接种到4种不同液体培养基上,液体培养基均为100 mL,放置于容量为250 mL的三角瓶中,(26±1)℃,恒温振荡培养,摇床140 r/min,培养7 d,培养结束后,进行生物量测定,每个处理均重复3次。

1.2.3 液态发酵 以10%(V/V)的接种量把液体种子接入发酵培养基中,100 mL的PDMA培养基置于250 mL三角瓶中,共7瓶,(26±1)℃,恒温振荡培养,摇床140 r/min,培养7 d,每间隔24 h取1瓶,进行生物量测定,每个处理均重复3次。

1.2.4 菌丝体生物量测定 采用细胞干重法^[5-7]。取100 mL培养液,3 000 r/min离心20 min,收集菌丝体,并用蒸馏水洗涤3次后,将菌丝体置于60℃烘箱,烘至

第一作者简介:龚娜(1982-),女,硕士,助理研究员,现主要从事微生物工程及生物技术等研究工作。E-mail:doll52133@163.com。

责任作者:杨涛(1964-),男,博士,研究员,硕士生导师。现主要从事微生物工程及生物技术等研究工作。E-mail:smkxxz@sina.com。

基金项目:辽宁省科技攻关资助项目(2011215005)。

收稿日期:2012-05-21

恒重,称取质量。按以下公式计算生物量:生物量(g/100mL)=菌丝干重(g)/液体培养基体积(100 mL)。

2 结果与分析

2.1 固体培养基的筛选结果

由表1可知,通过该菌株在4种培养基上菌丝长势、菌落直径、菌丝长速、菌丝体干质量的对比,4种培养基处理均存在差异,在3号培养基PDMA的培养条件下,D菌在菌丝长势、菌落直径、菌丝长速、菌丝体干质量上,均显著高于其它处理,而2号培养基显著低于其它处理。由此得出,3号培养基最适合D菌菌丝体的生长,2号培养基最不适合D菌菌丝体的生长。D菌的生长情况见图1。

表1 不同固体培养基对菌种生长的影响

固体培养基	菌丝长势	菌落直径 /cm	菌丝长速 /cm·d ⁻¹	菌丝体干 质量/g
1号	菌丝生长较致密	4.52bB	0.64bAB	0.16bAB
2号	菌丝生长稀疏	2.21cC	0.32cC	0.09cC
3号	菌丝生长致密	5.86aA	0.83aA	0.26aA
4号	菌丝生长较致密	4.73bB	0.67bAB	0.19bAB

注:小写字母表示0.05水平差异显著性;大写字母表示0.01水平差异显著性。

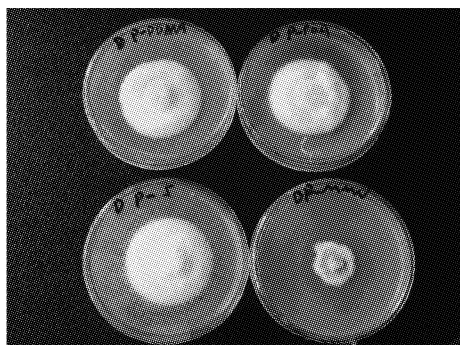


图1 不同固体培养基对菌种生长的影响

注:右上为1号培养基,右下为2号培养基,左上为3号培养基,左下为4号培养基。

2.2 液体种子培养基的筛选结果

最适液体培养基的筛选结果见表2。由表2可知,通过该菌株在4种培养基上菌丝体干质量的对比,3号培养基PDMA最适合该菌种的液体培养生长,其次是1号培养基PDA和4号综合马铃薯汁培养基,2号改良MMN最不适合D菌的液体培养。

表2 不同液体种子培养基对菌种生长的影响

液体培养基	菌丝干质量/g
1号	4.51cC
2号	2.47dD
3号	5.72Aa
4号	4.77bB

2.3 液体发酵培养生长曲线的测定

液体发酵培养菌丝干重随时间变化的情况见图2。菌株D菌在液态发酵培养阶段,其生长规律符合微生物

的生长规律,由于种子培养基和发酵培养基成分一样,D菌在被接种到发酵培养基上后,马上就进入对数增长期,D菌接种到培养基48h内,菌丝体数目增加迅速,48~96h曲线生长速率放缓,96h后重新快速增长,120h(5d)达到最高速率,3.45g/100mL,之后开始下降,细胞开始发生自溶现象,进入衰亡期,第7天时菌丝干重迅速降到2.84g/100mL。

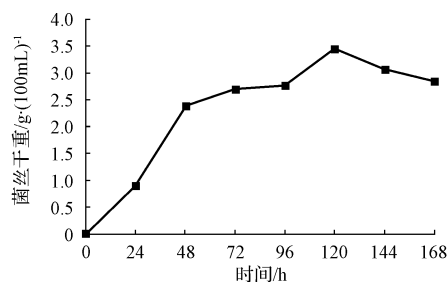


图2 菌丝干重随时间变化的曲线

3 讨论与结论

培养基是影响微生物生长和产物合成的重要因素,在微生物代谢产物的研究中,微生物培养基的优化工作有着举足轻重的作用。优良的培养基应该具备目标产物产率高、菌丝生长良好、发酵周期短等特点。不同培养类型的微生物对营养的需求差异很大,所以根据所培养菌种对营养要素的不同要求进行配置。该试验表明PDMA培养基非常适合D菌种子的培养。

适宜的种子生长条件对发酵的结果很重要,发酵必须用生长良好的种子进行接种。种子的浓度和质量对最终产物的产量有很大的影响。种子培养时间的长短也会明显影响发酵的进行。种龄过长或过短,不但会延长发酵周期,而且会降低产量,因此种龄必须严格掌握,以免耽误时机。在发酵过程中,微生物的生长通常经历延滞期、对数生长期、减数期、稳定期和衰亡期5个时期。延滞期又称停滞期、调整期或适应期。延滞期指微生物接种到新鲜的培养基中后一段时间内,菌体数目增加不明显的时期。延滞期是由于菌种初期菌丝体对生长环境有一个适应的过程,这个时期取决于种子质量、菌龄等因素。如果接种物处于对数生长期,延滞期就短^[4],说明菌丝的接种和培养的时间对种子的速率影响很大。该试验通过对D菌的生长曲线和发酵培养基进行的研究,结果发现,D菌发酵第3天处于对数生长期,为种子液转接的最佳时间,确定了D菌的发酵周期为5d,产量最高。

参考文献

- [1] 於虹. 蓝浆果栽培与采后处理技术[M]. 北京:金盾出版社,2003.
- [2] Stribley D P, Read D J. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. The relationship between mycorrhizal infection and the capacity to utilize simple and complex organic nitrogen source[J]. New Phytol, 1980, 86: 365-371.

矮化菊花试管苗生根研究

党云萍¹, 丁媛媛², 刘盼盼², 王晓东², 王延峰², 齐向英²

(1. 延安职业技术学院, 陕西 延安 716000; 2. 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000)

摘要:以矮化菊花试管苗为试材,研究了不同激素浓度、不同 pH 值和不同温度对菊花试管苗生根率、株高和植株粗度的影响。结果表明:温度对矮化菊花试管苗生根率、株高和植株粗度影响最大,IBA 浓度对生根影响大于 pH,但 pH 对植株高度和粗度影响大于 IBA 浓度;在 IBA 含量为 0.4 mg/L,pH 6.0 的培养基中接种的矮化菊花试管苗,在 24℃ 培养时最适合矮化菊花试管苗生根。

关键词:菊花;试管苗;生根

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)20-0112-03

菊花(*Chrysanthemum*)属菊科菊属多年生宿根草本植物,原产我国。菊花株高 20~200 cm,通常 30~90 cm。茎嫩绿色或褐色,直立分枝,基部半木质化;单叶互生,卵圆至长圆形,边缘有缺刻及锯齿;头状花序顶生或腋生,1 朵或数朵簇生^[1]。因其具有较高的观赏价值,该课题组从 2006 年起做了一系列的研究^[2-4],已经获得了菊花耐盐的试管苗和矮化试管苗。该试验对矮化试管苗生根做了研究,以期矮化菊花试管苗从实验室

转向大田提供实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用材料为侯仁浩等^[4]经过矮化获得的试管苗。将其在齐向英等^[2]筛选的 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+TDZ 0.01 mg/L 中培养 25 d 作为试验用材料。

1.2 试验方法

以 1/2MS 培养基为基本培养基,附加 52 g/L 琼脂和 20 g/L 蔗糖。以培养温度、培养基 pH 和外源激素浓度为 3 个考察因素。分别设置温度 20、22、24、26℃ 4 个处理;培养基 pH=5.5、6.0、6.5、7.0 4 个处理;IBA 浓度 0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L 4 个处理。共计 16 个处理

第一作者简介:党云萍(1968-),女,陕西延安人,本科,副教授,研究方向为园艺植物栽培技术。E-mail:dyp0801@126.com

基金项目:延安市科学技术研究发展农业攻关计划资助项目(2010kn-20)。

收稿日期:2012-05-16

[3] 李敏. 褐环乳牛肝菌(*Suillus luteus* (L.:Fr)Gray)发酵生物学的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2007.

[4] 段慧. 平菇汁对褐环粘盖牛肝菌生长的影响[J]. 内蒙古农业大学学报,2009,30(4):310.

[5] 杨海龙,活泼,肖彩霞,等. 药用真菌深层发酵生产技术[M]. 北京:化学工业出版社,2009.

[6] 乐超银,邵伟. 猴头菌液体发酵条件的研究[J]. 中国食用菌,1999(3):32-34.

[7] 蔺银鼎,马宏艳. 竹荪液体培养基基础优化配方筛选及培养基营养变化特性的研究[J]. 食用菌学报,2007(4):18-24.

(该文作者还有肇莹、王红,单位同第一作者。)

Screening on the Seed Medium of Mycorrhizal Fungi of Blueberry

GONG Na, YANG Zhen, WANG Na, CHEN Xun, XIAO Jun, ZHAO Ying, WANG Hong, YANG Tao

(Research Center of Microbial Engineering, Liaoning Provincial Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: Taking growth rate and dry weight of mycelium as measurement index, combined with the growth curve of liquid fermentation culture, PDMA medium was found suitable as basic medium for this strain after 4 kinds of medium were preliminarily screened. And the optimal liquid transfer time for culturing the seed of this strain was the 2~3 d of liquid fermentation; the best production time was the 5 d, where the yield was the highest as 3.45 g/100mL.

Key words: mycorrhizal fungi; medium; fermentation