

羊耳蒜菌根真菌培养条件的优化

张 艺 子^{1,2}, 张 群², 王 平 平², 李 海 燕³, 张 丽 杰², 曲 波²

(1. 内蒙古大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 100866;

3. 辽宁老秃顶子国家级自然保护区抚顺管理局, 辽宁 新宾 113208)

摘 要:以兰科羊耳蒜菌根为试材,通过分离、纯化、培养其菌根真菌,在单因素试验基础上利用正交实验方法筛选温度、碳源、氮源和培养基 pH 值等培养条件来建立羊耳蒜菌根真菌培养体系。结果表明:羊耳蒜菌根真菌菌落白色或浅黄色,呈均匀辐射状向外生长;生长面有稀疏或较丰富的气生菌丝,带有透明液滴。通过对菌落生长速率的测定与分析,4 种因素的最佳综合水平为碳源为葡萄糖,浓度为 2%;氮源为氯化铵,浓度为 0.5%;pH 为 7,温度为 25℃;菌落的生长速率随着天数的递增而以较快的速度下降,在第 10 天基本趋于一个恒定的值。

关键词:羊耳蒜;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(2014)07-0102-05

兰科植物是生物多样性保护中备受关注的物种,目前全世界范围内所有的野生兰科植物均被列入 1973 年制定的《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护范围,占该公约应保护植物的 90% 以上^[1]。因此,开展对兰科植物的研究和保育具有重要意义。作为一个特殊的植物种群,兰科植物具有复杂的生活史、与菌根真菌的共生性、与昆虫高度协同进化的传粉系统和对生态环境的高度敏感,因此要想制定有效的保育措施,就必须对其生态生物学特征、繁育特征、传粉系统及种群结构等有全面深刻的认识。

羊耳蒜(*Liparis japonica*)属兰科羊耳蒜属多年生草本植物,约 250 种,广泛分布于全球热带与亚热带地区,少数种类也见于北温带。我国有 45 种,主要分布于中国东北、河北、甘肃、四川、云南、台湾等地以及日本、朝鲜、俄罗斯远东地区。由于生态的破坏和过度的采掘,在全球现已处于濒危阶段,现已被国际贸易公约规定为保护野生兰科植物的一种。羊耳蒜生于柞树林与红松林下腐殖质厚的土壤中或林缘阴湿地^[2],是兰科的球根花卉,具有较高的观赏价值和药用价值,但由于其植株矮小,终生只具 2 片叶片,更由于其生长、繁殖特性和对生长环境的特殊要求以及近年来的人类干扰等原因,羊耳蒜野生资源丧失较为严重。羊耳蒜,以带根全草入药,夏秋采收,洗净晒干。别名鸡心七、珍珠七。生于溪

边、林下阴湿处,海拔在 1 400~2 000 m 之间。土家医药学认为全草有活血调经、止血、止痛、强心、镇静的功效,能治疗崩漏,白带,产后腹痛,外伤急救等病症^[3]。目前,国内外对羊耳蒜的研究主要集中在资源分布、组织培养、化学成分、抗逆生理^[4-9]等方面,但关于与其共生真菌培养尚鲜见报道。因此,对羊耳蒜菌根深入研究,有助于进一步研究共生长发育模式,为人工抚育羊耳蒜提供理论依据,同时,也为进一步探索兰科植物的适应机制提供参考^[10]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的羊耳蒜根段来自辽宁省铁岭市西丰县更刻乡(冰砬山)(N42°42'08.33", E124°44'11.63")。

供试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,加入碳源 20 g,氮源 5 g,琼脂 15 g。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝培养 取羊耳蒜根段 2 cm,75%酒精浸 1 min,0.1%升汞表面消毒 10 min,切成小段,直接放在 PDA 培养基上室温下培养。分离纯化后,挑取菌根真菌菌丝,ZESS 显微成像系统拍照。

1.2.2 单因素试验 确定以温度、2%的碳源、0.5%的氮源、酸碱度为主要影响因素,以菌根菌的生长速率,进行单因素试验。每处理 3 次重复,于接种后每天用游标卡尺采用十字交叉法测量菌落直径,并拍照记录。

1.2.3 正交实验 根据正交实验设计原理,综合单因素试验结果,选取碳源、氮源、酸碱度和温度 4 个对生长速率影响较为显著的因素,并在单因素试验基础上采用 4

第一作者简介:张艺子涵(1989-),女,硕士研究生,研究方向为农牧业生物工程。

责任作者:曲波(1972-),女,博士,副教授,研究方向为植物资源保护研究。E-mail:qubo@163.com。

收稿日期:2013-11-13

因素3水平的正交实验设计方法优化培养体系^[11-12]。因素及水平设计见表1。

表1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素与水平

水平	碳源	氮源	pH 值	温度/℃
1	葡萄糖	甘氨酸	5	15
2	蔗糖	硝酸铵	6	20
3	半乳糖	氯化铵	7	25

表2 正交实验方案

处理号	碳源	氮源	pH 值	温度/℃
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

1.3 数据分析

用 Microsoft Excel 和 SPSS 19.0 软件进行数据处理,统计分析菌株生长速率并比较差异显著性等。

2 结果与分析

2.1 羊耳蒜菌根真菌形态特征

羊耳蒜菌根菌接种后,菌落呈均匀辐射状向外生长,菌落先呈白色,第5天时菌落背面边缘逐渐变为橘黄色;生长面有稀松或较丰富的气生菌丝,带有透明液滴(图1A)。菌丝宽约2~4 μm ,有隔;分支略呈直角,分支处缢缩,距菌丝分枝点较近处形成隔膜,隔膜具桶孔(图1D)。

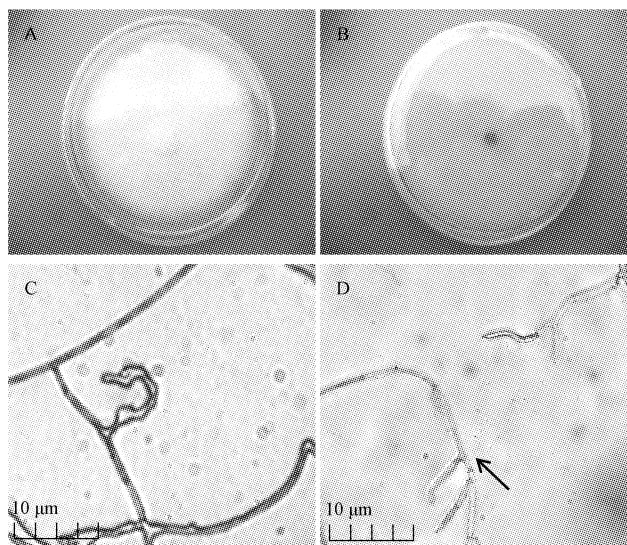


图1 羊耳蒜菌根真菌形态

注:A为菌落正面;B为菌落背面;C为菌丝;D为菌丝(箭头示隔膜及桶孔,bar=10 μm)。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 不同碳源对羊耳蒜菌根菌落生长的影响 由图2可知,在以蔗糖与半乳糖为碳源时,羊耳蒜菌根菌生长速度相当,在蔗糖培养基中第2天时菌落直径可达1.46 cm,生长速度为0.49 cm/d;在半乳糖培养基中,第2天时菌落直径可达1.41 cm,生长速度为0.47 cm/d。在葡萄糖培养基中生长最慢,第2天菌落直径为1.33 cm,生长速度为0.44 cm/d。第6天,3种条件下的生长速度都趋于0.61 cm/d,直至最后稳定在0.60 cm/d。对不同碳源处理的菌落直径做生长曲线图,可以得出3种处理的3项拟合的生长曲线公式为:蔗糖 $y = -0.0004x^3 + 0.0035x^2 + 0.6862x - 0.6226$, $R^2 = 0.9992$;半乳糖 $y = -0.001x^3 + 0.0199x^2 + 0.5675x - 0.4119$, $R^2 = 0.9992$;葡萄糖 $y = -0.0013x^3 + 0.0291x^2 + 0.4912x - 0.3349$, $R^2 = 0.9989$ 。从图3可以看出,3种处理的菌落直径都以较快的速度稳定增加,类似线性递增。

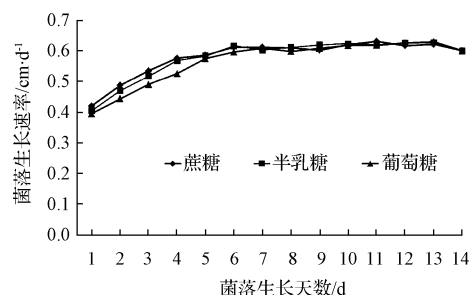


图2 不同碳源条件下羊耳蒜菌根真菌生长速率

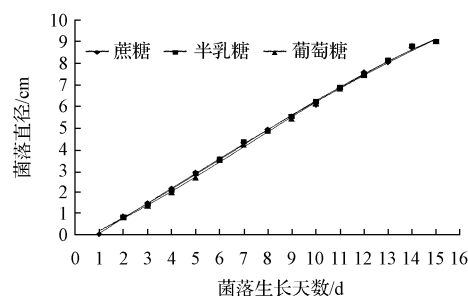


图3 不同碳源条件下羊耳蒜菌根真菌生长曲线

2.2.2 不同氮源对羊耳蒜菌根菌落生长的影响 由图4、5可知,羊耳蒜菌根菌在3种氮源条件下都可以生长。在甘氨酸培养基中长势最好,第2天菌落直径达到1.43 cm,生长速度为0.48 cm/d;在第14天时达到最大生长速度为0.60 cm/d。其次是氯化铵,第2天的菌落直径为1.34 cm,生长速度为0.45 cm/d;在第13天时达到最大速度为0.52 cm/d。在硝酸铵培养基中生长最慢,第2天的菌落直径仅为0.94 cm,生长速度为0.31 cm/d;而在第12~29天时仍以0.25 cm/d的速度缓慢增长。对不同氮源处理的菌落直径做生长曲线图,可以得出3种处理的3项拟合的生长曲线公式为:

甘氨酸 $y = -0.0004x^3 + 0.0057x^2 + 0.6109x - 0.5129$, $R^2 = 0.9987$; 氯化铵 $y = -0.0012x^3 + 0.0321x^2 + 0.2779x + 0.273$, $R^2 = 0.9997$; 硝酸铵 $y = 3E-05x^3 - 0.0009x^2 + 0.2423x + 0.2597$, $R^2 = 0.9995$ 。从图 5 可以看出, 3 种处理菌落直径都以较快的速度稳定增加, 类似线性递增。

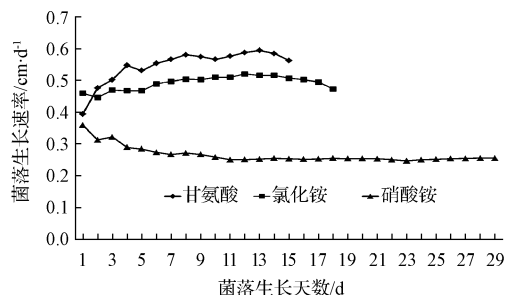


图 4 不同氮源条件下羊耳蒜根菌生长速率

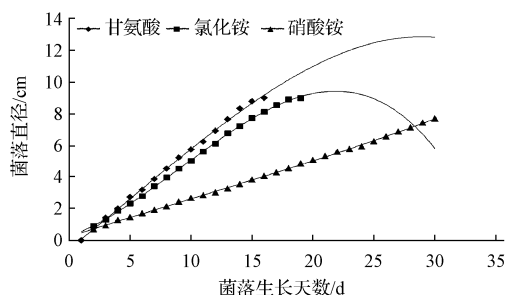


图 5 不同氮源条件下羊耳蒜根菌生长曲线

2.2.3 不同 pH 对羊耳蒜根菌生长的影响 由图 6、7 可知, 羊耳蒜根菌在 3 个 pH 下都可以生长。在 pH 为 6 时生长的最好, 第 2 天菌落直径为 1.43 cm, 生长速度为 0.48 cm/d; 在第 13 天时达到最大生长速度为 0.63 cm/d。pH 为 5 时, 第 2 天菌落直径为 1.36 cm, 生长速度为 0.45 cm/d; 在第 13 天达到最大生长速度为 0.58 cm/d。pH 7 与 pH 5 菌丝的生长速度相当, 第 2 天的菌落直径为 1.39 cm, 生长速度为 0.46 cm/d; 在第 15 天达到最大生长速度为 0.56 cm/d。对不同 pH 值处理的菌落直径做生长曲线图, 可以得出 3 种处理的 3 项拟合的生长曲线公式为: pH 5 $y = -0.0003x^3 + 0.0044x^2 + 0.6089x - 0.4932$, $R^2 = 0.9995$; pH 6 $y = -0.0012x^3 + 0.0244x^2 + 0.5172x - 0.2388$, $R^2 = 0.9991$; pH 7 $y = -0.0006x^3 + 0.0133x^2 + 0.4999x - 0.1666$, $R^2 = 0.9988$ 。从图 7 可以看出, 3 种处理的菌落直径都以较快的速度稳定增加, 类似线性递增。

2.2.4 不同温度对羊耳蒜根菌生长的影响 羊耳蒜根菌在不同温度下生长速率不同。25℃时菌落生长速度最快, 第 2 天菌落直径可达 1.47 cm, 生长速度为 0.49 cm/d; 在第 7 天生长速度达到最大, 为 0.54 cm/d。20℃时, 第 2 天菌落直径达到 1.36 cm, 生长速度为

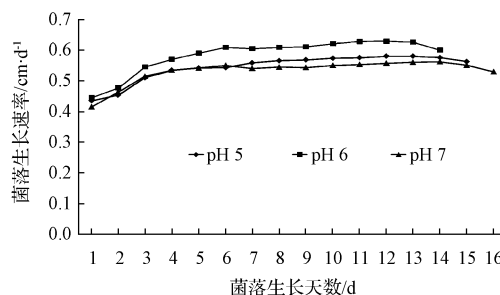


图 6 不同 pH 值条件下羊耳蒜根菌生长速率

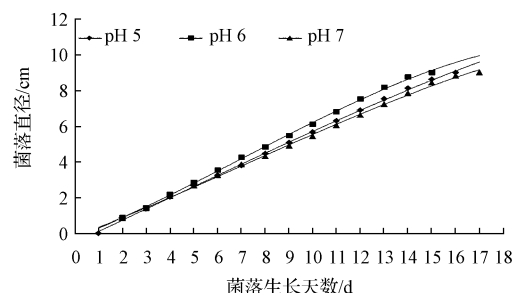


图 7 不同 pH 值条件下羊耳蒜根菌生长曲线

0.45 cm/d; 在第 17 天生长速度达到最大, 为 0.47 cm/d。15℃时, 第 2 天菌落直径为 1.31 cm, 生长速度达到最大, 为 0.44 cm/d; 之后以 0.41 cm/d 的平均生长速度稳定增长。对不同温度处理的菌落直径做生长曲线图, 可以得出 3 种处理的 3 项拟合的生长曲线公式为: 15℃ $y = 0.0005x^3 - 0.0156x^2 + 0.5692x - 0.3659$, $R^2 = 0.9993$; 20℃ $y = -0.0002x^3 + 0.0112x^2 + 0.3212x + 0.3215$, $R^2 = 0.9986$; 25℃ $y = 8E-05x^3 - 0.0045x^2 + 0.6015x - 0.2769$, $R^2 = 0.9999$ 。从图 9 可以看出 3 种处理的菌落直径都以较快的速度稳定增加, 类似线性递增。

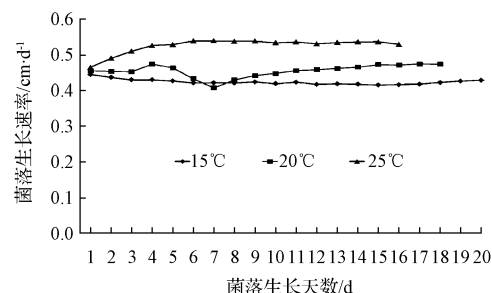


图 8 不同温度条件下羊耳蒜根菌生长速率

2.3 正交实验结果

2.3.1 正交实验数据分析结果 从表 3 来看, 处理 3 的生长速率明显高于其它处理; 处理 2、4、6、7 和处理 8 的生长速率处于平均水平; 而处理 1、5 和处理 9 生长速率则低于平均水平。从表 4 可知, 温度间的 $F = 48.692$, $P = 0.000 < 0.01$, 差异极显著; 碳源间的 $F = 1.704$, $P = 0.236 > 0.05$, 差异不显著; 氮源间的 $F = 0.864$, $P = 0.454 > 0.05$, 差异不显著; pH 值间的 $F = 0.588$, $P =$

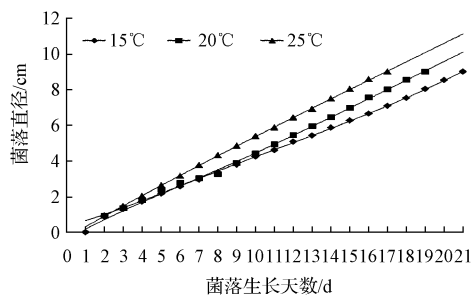


图9 不同温度条件下羊耳蒜菌根真菌生长曲线

0.575>0.05, 差异不显著。F 检验的结果表明, 不同温度对菌落生长速度有极显著的影响, 碳源、氮源和 pH 值的作用不显著, 故应考察不同温度的多重比较结果, 选出最优组合。由表 5 可知, 通过比较“均值”列, 可以发现葡萄糖>半乳糖>蔗糖, 碳源的最佳水平为葡萄糖; 氯化铵>硝酸铵>甘氨酸, 氮源的最佳水平为氯化铵; pH 7>pH 5>pH 6, pH 值的最佳水平为 7; 25℃>20℃>15℃, 温度的最佳水平为 25℃。

表 3 生长速率 mm/d

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9
生长速率 1	7.93	12.57	15.70	12.19	8.49	12.24	10.58	14.93	8.98
生长速率 2	9.41	11.51	15.06	13.76	7.62	11.74	12.59	12.74	7.29

表 4 不同处理羊耳蒜菌根菌落生长速率显著性分析

	碳源	氮源	pH 值	温度
F 值	1.704	0.864	0.588	48.692 **
P 值	0.236	0.454	0.575	0.000

注: $P<0.05$, 差异显著; $P<0.01$, 差异极显著 **。

表 5 不同处理羊耳蒜菌根菌落生长速率多重比较(Duncan)

因素	水平	标准差 ± 均值/mm · d ⁻¹
碳源	葡萄糖	2.848 ± 12.029a
	蔗糖	2.483 ± 11.008a
	半乳糖	2.313 ± 11.185a
	甘氨酸	2.550 ± 11.076a
氮源	硝酸铵	2.315 ± 11.310a
	氯化铵	2.804 ± 11.835a
	5	2.195 ± 11.499a
pH 值	6	2.367 ± 11.051a
	7	3.083 ± 11.672a
	15℃	0.941 ± 8.287a
温度	20℃	1.145 ± 11.872b
	25℃	1.774 ± 14.063c

注: 不同小写字母代表 0.05 水平下差异显著。

2.3.2 菌落生长情况 从图 10 可以看出, 前 4 d 内 9 种处理的菌落直径都以较快的速度稳定增加, 类似线性递增。在第 4~8 天内, 处理 2、3、4、7 和处理 8 的菌落直径在第 8 天左右达到最高峰, 之后便趋于恒定; 处理 1、5、6 和处理 9 的菌落直径增长的速度稍稍落后。在接下来第 8~12 天内, 处理 1、5、6 和处理 9 的菌落直径仍在缓步增长, 逐渐达到峰值。对 9 种处理的菌落直径做生

长曲线图, 可以得出 9 种处理的 3 项拟合的生长曲线公式为: 处理 1 $y = -0.075x^3 + 1.2637x^2 + 3.0202x - 4.6038$, $R^2 = 0.9905$; 处理 2 $y = -0.0755x^3 + 0.9687x^2 + 7.1035x - 6.625$, $R^2 = 0.9948$; 处理 3 $y = 0.0536x^3 - 2.268x^2 + 29.72x - 37.121$, $R^2 = 0.9942$; 处理 4 $y = 0.0516x^3 - 2.0972x^2 + 27.797x - 35.31$, $R^2 = 0.998$; 处理 5 $y = -0.0856x^3 + 1.6762x^2 - 1.3194x + 4.3301$, $R^2 = 0.9974$; 处理 6 $y = -0.0561x^3 + 0.6504x^2 + 8.0798x - 6.5174$, $R^2 = 0.9951$; 处理 7 $y = -0.0326x^3 - 0.1924x^2 + 16.052x - 20.919$, $R^2 = 0.9913$; 处理 8 $y = -0.0318x^3 - 0.2162x^2 + 16.024x - 18.086$, $R^2 = 0.9907$; 处理 9 $y = -0.0981x^3 + 2.0623x^2 - 4.4811x + 11.529$, $R^2 = 0.995$ 。综上所述, 生长曲线呈抛物线状, 生长公式的 R^2 越大, 曲线斜率越小; 生长曲线先进行线性增长, 达到顶峰再趋于恒定值, 最后再逐步减小; 生长公式符合真菌生长的规律。

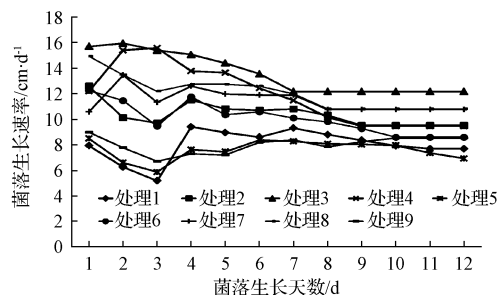


图 10 羊耳蒜菌根真菌生长速率比较

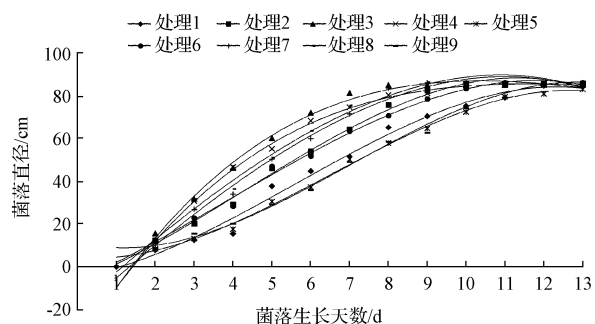


图 11 羊耳蒜菌根真菌生长曲线比较

3 讨论与结论

不同的兰科植物的菌根菌生长条件有着显著差异, 在自然环境下, 菌根菌的生长受环境因素影响较大。

大部分兰科植物的菌根菌在 25℃ 下生长速度较快^[11], 而该试验羊耳蒜菌根菌的最适生长温度恰好为 25℃。有其它研究表明, 华石斛的菌根菌最适生长温度也为 25℃, 生长温度范围为 5~40℃ 之间^[12]; 美花石斛的最适温度为 25℃ 或 28℃^[13]; 但也有例外, 美花兰的菌根菌在 25℃ 恒温培养下生长缓慢, 30℃ 是其最适的生长温度^[14]。这说明生活型的不同, 菌根菌的生长最适温度范围不同。

每种菌根菌对不同的碳源利用率不同,该试验中的羊耳蒜的菌根菌对葡萄糖利用率最高。有试验曾验证霍山石斛的菌根菌最适碳源为蔗糖^[15];而华石斛的菌根菌可利用的碳源范围较广,可利用单糖、双糖、多聚碳水化合物等多种碳源,对麦芽糖、可溶性淀粉、羧甲基纤维素、蔗糖利用效果较好^[12]。

大部分的菌根菌适合在酸性土壤中生长(pH 大致在 4~6 之间)。但是也有少数菌根真菌能在弱碱性或中性条件下生长,该试验最适 pH 为 7,正好验证了这种说法。有研究表明,美花兰的菌根菌在 pH 8 时能够快速生长^[14];美花石斛的优势菌根真菌均对碱性环境条件适应性较强^[13]。这表明与兰科植物共生的菌根菌对酸碱度的耐受性和兰科植物栖息的环境有直接关系。

不同菌根菌对相同氮源的吸收和利用率存在较大差异,同一菌根菌对不同氮源的吸收效果也不同。该试验中羊耳蒜的菌根菌对氯化铵利用率最高,而华石斛的菌根菌对酵母膏、蛋白胨、甘氨酸、硝酸钠利用效果较好,对氨态氮利用效果较差^[12]。徐超等^[16]研究表明,在对兰科植物铁皮石斛进行纯培养氮源的筛选过程中,发现无机氮源(硝酸铵)为适用于铁皮石斛菌根真菌生长的氮源。利用 SPSS 19.0 软件进行试验设计,通过正交实验优化培养条件,分析试验所选各因素对生长速率的影响。结果表明,试验误差小。说明该培养条件能有效地用于羊耳蒜菌根菌的培养体系的建立。综上所述,所得的羊耳蒜菌根真菌最优培养体系为碳源 2%葡萄糖,氮源 0.5%氯化铵,pH 7,温度 25℃。

参考文献

[1] 罗毅波,贾建生,王春玲.中国兰科植物保育的现状和展望[J].生物

多样性,2003,11(1):70-77.

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1992,18:62-64.

[3] 方志先,赵晖,赵敬华.土家族药物志[M].下册.北京:中国医药科技出版社,2006:796-797.

[4] 齐佳,岳桦,王莹.羊耳蒜对土壤自然干旱胁迫的响应[J].江西农业学报,2009,21(3):83-85.

[5] 纪春艳.北方羊耳蒜的组织培养与植株再生[J].植物生理学通讯,2008,44(2):288.

[6] 纪春艳,李强,秦玉芳.北方羊耳蒜形态解剖学研究[J].林业科技,2009,34(5):64-65.

[7] 张淑梅,王云锁,李东良,等.曲唇羊耳蒜在中国东北分布的真实性研究[J].植物研究,2009,29(1):118-119.

[8] McCormick M K, Whigham D F, O'Neill J. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids[J]. New Phytologist, 2004, 163, 425-438.

[9] 黄江华,杨媚,周而勋,等.丝核菌研究进展[J].仲恺农业技术学院学报,2002,15(1):61-67.

[10] 管俊杰,丁锐,李梦媛,等.羊耳蒜遗传多样性研究中 AFLP 反应体系的建立与初步应用[J].中国农学通报,2012,28(36):241-245.

[11] 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.

[12] 周玉杰.海南特有种华石斛共生真菌筛选及生物学特性研究[D].海口:海南大学,2010.

[13] 李瑛婕.美花石斛优势内生菌根真菌生物学特性及其分子鉴定[D].海口:海南大学,2010.

[14] 仲凯.美花兰(*Cymbidium insigne*)菌根化培养研究[D].北京:北京林业大学,2009.

[15] 王娣.霍山石斛内生真菌的分离及其促生作用的研究[D].合肥:安徽农业大学,2007.

[16] 徐超,席刚俊,范克胜,等.不同氮源对铁皮石斛菌根真菌生长的影响[J].江苏农业科学,2013,41(4):236-238.

Optimization of Culture Conditions on the *Liparis* Mycorrhizal Fungi

ZHANG Yi-zhan^{1,2}, ZHANG Qun², WANG Ping-ping², LI Hai-yan³, ZHANG Li-jie², QU Bo²

(1. College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010018; 2. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 100866; 3. Liaoning Fushun Laotudingzi National Nature Reserve Administrations, Xinbin, Liaoning 113208)

Abstract: Taking *Liparis arethusa* mycorrhizal fungi as material, through separation, purification and cultured, using orthogonal experimental method to set culture conditions that include temperature, carbon source, nitrogen source and medium pH value, the *Liparis* mycorrhizal fungi culture system which based on the single-factor test were established. The results showed that the white or pale yellow colonies of *Liparis* mycorrhizal fungi showed the uniform radial outward growth, growth surface of sloppy or rich aerial hyphae with transparent droplets. Through measurement and analysis of colony growth rate, four factors best level were set the carbon source was concentration of 2% glucose, the nitrogen source was concentration of 0.5% ammonium chloride, pH value of 7, temperature of 25℃. Colony growth rate decreased at faster speed, with the increase in the number of days, and finally tended to a constant value in the tenth.

Key words: *Liparis*; mycorrhizal fungi; culture conditions; growth rate