

春兰菌根真菌 CL-3 菌株的鉴定及 共生体系的构建

陈敏* 庞基良 杨洁琼 周月兰

(杭州师范大学生命与环境科学学院 浙江 杭州 310036)

摘要: 采用分离自野生春兰(*Cymbidium goeringii*)根部的真菌 CL-3 菌株,进行了春兰内生菌根真菌的人工接种、再分离及其共生培养研究。通过对 CL-3 菌株形态学观察和 ITS 序列同源性分析,发现该菌株 ITS 序列与 *Acremonium strictum* 的亲缘关系最为接近,序列同源性为 100%。用 CL-3 菌株接种春兰组培苗,接种后 2 个月可从组培苗中再分离获得该菌株,且 CL-3 菌株处理苗的鲜重增长率达 80.5%,经方差分析,与对照相比有显著差异。通过石蜡切片和染色,在已接种的组培苗的根部组织中可观察到 CL-3 菌株存在,表明 CL-3 菌株能与组培幼苗成功建立共生培养体系。
关键词: 春兰, 菌根真菌, ITS 序列, 共生培养

A mycorrhizal fungi CL-3 from *Cymbidium goeringii*: characterization and establishment of symbiotic associations

CHEN Min* PANG Ji-Liang YANG Jie-Qiong ZHOU Yue-Lan

(College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036, China)

Abstract: The fungal strain CL-3 was isolated from the root of wild *Cymbidium goeringii* with using conventional isolation method. The inoculum of strain CL-3 was used to study its interaction with its host plant. According to the morphological features examination and rDNA ITS sequence analysis, the closest relative of the strain was *Acremonium strictum*, with the similarity of 100%. After two months of symbioses culture, the fresh biomass of *C. goeringii* inoculated with CL-3 increased by 80.5%, and the endophytic CL-3 was re-isolated from the seedlings. The statistics showed that the difference between inoculation group and control group was significant. The presence of the fungus in the tissues was studied with paraffin-cut section. The results showed that the fungus was observed in inner tissues of roots, indicating that the symbiosis relationship between *Cymbidium goeringii* and fungi could be established.

基金项目: 浙江省教育厅重点科研项目(No. Z200701073)

*通讯作者: Tel: 86-571-28868325; ✉: mchen63@163.com

收稿日期: 2010-07-06; 接受日期: 2010-10-29

Keywords: *Cymbidium goeringii*, Mycorrhizal fungi, ITS sequence, Symbiosis culture

春兰 (*Cymbidium goeringii*) 属于兰科兰属 (*Cymbidium*), 是分布最广的一种国兰, 其叶、花形态多样, 香气居群芳之首。不仅如此, 春兰还具有药用性能, 据报道春兰全草有治神经衰弱、驱蛔虫和治痔疮等功能^[1], 因此春兰是集观赏、药用于一体的兰科植物, 具有很高的观赏、经济和文化价值。

随着市场对春兰需求量的日益增长, 天然春兰资源日渐匮乏, 许多春兰品种已成为珍稀濒危植物, 被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护范围^[2]。因此, 无论从经济利用的角度, 还是作为春兰研究和保育工作中的重要组成部分, 春兰的大规模扩繁(组织培养)已成为春兰产业发展的必然要求和途径。但是, 人工条件下进行春兰大规模扩繁时, 往往因缺少适宜的菌根真菌的共生, 移栽的无菌苗成活率低、生长缓慢、开花迟缓、花小甚至不开花^[3], 成为目前春兰产业发展的主要制约瓶颈之一。深入开展菌根真菌的研究, 尽早对组培苗进行高效菌根真菌的人工接种, 实现菌根化, 已成为春兰众多相关研究中极为重要的内容。但整体来看, 国内这方面的工作开展相对较晚, 研究成果报道较少。伍建榕等^[4]对春兰菌根真菌的筛选进行了报道, 筛选得到的春兰共生菌根真菌 CLB111、CLB113 和 MLX102 通过接菌处理后, 春兰苗的鲜重增长率分别为 70.6%、70.2%和 68.6%。吕梅等^[5]对春兰菌根的显微结构进行了观察, 通过光学显微镜和电子显微镜连续切片观察发现, 春兰菌根结构与普通营养根的结构基本相同, 但在菌根的皮肤组织细胞中有着色较深、形状不一的菌丝结。Richardson^[6]用电镜观察和 EDS (Energy-dispersive spectrometry)证实: 在胞内菌丝团进入液化和消解阶段时, 部分液化的菌丝里含有高浓度的磷脂聚合物, 而且可以检测到 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 等物质。

本研究报道分离自野生春兰根部的 CL-3 菌株, 经形态学观察和 ITS 序列同源性分析, 初步鉴定为紧密枝顶孢(*Acremonium strictum*), 在国内外未见同类报道。通过回接 CL-3 培养物的方式构建了春兰组培苗共生体系, 并证实了 CL-3 是侵染春兰根系的菌

根真菌。该研究成果对丰富兰花菌根真菌的研究及春兰的栽培应用具有一定价值。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

菌株: CL-3, 分离自野生春兰(*Cymbidium goeringii*)菌根, 本院微生物实验室保存。

春兰组培苗: 由本院植物组培室提供。

1.2 培养基

PDA 培养基: 去皮马铃薯 200 g 切成 1 cm³ 的小块, 加入适量水煮沸 30 min, 取其滤液加入葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 加水至 1 L, 加热融化, 分装, 于 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用, pH 自然。

生根培养基(1 L): 琼脂 10 g, 蔗糖 20 g, 活性炭 5 g, IBA 1.0 g, NAA 0.5 g, $100 \times$ 微量元素母液 10 mL, $100 \times$ 有机物母液 10 mL, $100 \times$ 铁盐母液 10 mL, 1 mol/L KNO_3 15 mL, 1 mol/L NH_4NO_3 8 mL, 1 mol/L $CaCl_2$ 2.0 mL, 1 mol/L KH_2PO_4 1.5 mL, 1 mol/L $MgSO_4$ 1.0 mL, pH 5.8, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

菌-苗共生培养基 I (1 L): 蔗糖 5 g, 琼脂 10 g, 活性炭 5 g, $100 \times$ 微量元素母液 10 mL, $100 \times$ 有机物母液 6.5 mL, $100 \times$ 铁盐母液 10 mL, 1 mol/L KNO_3 15 mL, 1 mol/L NH_4NO_3 8 mL, 1 mol/L $CaCl_2$ 2.0 mL, 1 mol/L KH_2PO_4 1.5 mL, 1 mol/L $MgSO_4$ 1.0 mL, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

菌-苗共生培养基 II (1 L): 蔗糖 10 g, 其余成分同上。

菌-苗共生培养基 III (1 L): 蔗糖 15 g, 其余成分同上。

1.3 试剂

引物、Taq 酶、PCR 产物纯化试剂盒等购自上海生物工程有限公司。

1.4 形态学观察及鉴定

参照真菌鉴定手册^[7]的分类标准和系统, 观察记录菌落特征, 并用数码显微镜观察和拍照微观产孢子结构并进行鉴定。

1.5 PCR 扩增和 DNA 测序

菌种在 PDA 培养基上 25 °C 培养 3-5 d, 取新

鲜培养物, 参照龙良鲲等^[8]的方法提取总 DNA。

引物为 ITS 序列通用引物(ITS1: 5'-TCCGTAG GTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3')。PCR 反应体系为(50 μ L): 5 μ L 10 \times Taq buffer, 4 μ L dNTPs 混合物(2.5 mmol/L), 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L), 5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 0.5 μ L 上游引物(10 μ mol/L), 0.5 μ L 下游引物(10 μ mol/L), 0.5 μ L 模板, 补水至 50 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

取 PCR 产物 5 μ L, 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 于 UVI 凝胶成像系统观察。

扩增产物送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.6 GenBank 比对

将得到的碱基序列通过因特网在 GenBank 等国际核酸序列数据库内进行同源序列搜索(BLAST), 找出该菌株与数据库中源性最高的模式菌株或在美国典型菌种保藏中心(ATCC)或国际菌种保藏中心(DSM)的保藏菌株。

1.7 兰花组培苗接种、培养和生物量的测定

选择植株大小比较一致的兰花组培苗编号, 然后将组培苗在无菌环境下取出, 用无菌水冲洗粘附在根上的培养基, 无菌吸水纸吸干水分, 称取鲜重后移入共生培养基中, 每培养瓶 3 株, 培养 1 周后, 确定无污染, 用于接菌。

从已长满 CL-3 菌丝的 PDA 平板上取圆形接种小块(直径约 0.5 cm), 接种在植株根附近, 每瓶接 1 块, 设置对照(不接菌), 每处理重复 5 瓶。兰花苗在 25 $^{\circ}$ C 恒温下培养, 光照强度 2 000 Lux, 每日光照 12-14 h。培养 3 个月后, 将苗取出, 按上述再次称取苗的鲜重, 同时取苗的根段, 进行菌根菌的重分离。

为减少试验因幼苗的个体大小差异引起的误差, 采用鲜重增长率(%)作为生物量增长指标, 即(处理后鲜重 - 处理前鲜重) \times 100/处理前鲜重^[9]。

1.8 菌根真菌的重分离

将幼苗的根切成约 2 mm 的小段, 然后将小段植于 PDA 培养基平板上, 25 $^{\circ}$ C 恒温黑暗培养 5-7 d,

至皮层细胞内长出菌丝, 形成菌落。挑取菌落边缘的菌丝移接到另一平板上, 待菌落长成后, 重复取菌落边缘部分进行转接纯化, 最后得到纯菌种进行鉴定。

1.9 菌根石蜡切片的制作

自新鲜营养根的根尖截取 4 cm 长根段, 流水洗净, 切成 5 mm 长的小段, FAA 固定, 系列脱水, 石蜡包埋, 旋转切片连续切片, 厚度 8 μ m, 番红固绿对染, 中性胶封片, 光学显微镜观察并照相^[10]。

2 结果

2.1 CL-3 菌株的形态鉴定

CL-3 菌株在 PDA 培养基上 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 菌落直径 4.5 cm, 粉红色, 边缘齐, 质地绒毛状至粉状, 背面棕色。菌丝匍匐生长, 分枝, 分隔。分生孢子梗散生, 直立, 不分枝。分生孢子顶生或侧生, 常在产孢细胞顶端聚集或集成孢子球。孢子椭圆形(图 1)。

根据以上形态观察结果, 通过检索《真菌鉴定手册》^[7], 其主要形态特征符合枝顶孢霉属(*Acremonium*)的形态特征。

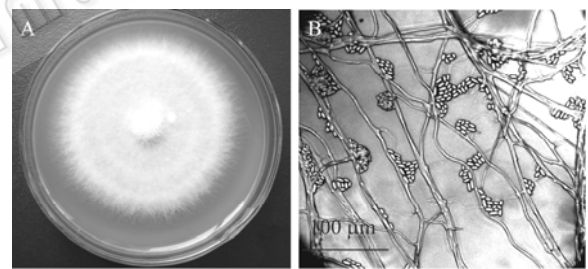


图 1 CL-3 菌株在 PDA 培养基的菌落形态(A)及菌体特征(B)

Fig. 1 Colony (A) and conidiophores (B) of CL-3 strain on PDA medium

2.2 CL-3 菌株的分子鉴定

以提取 CL-3 菌株 DNA 为模板进行 ITS 序列扩增, 并对此片段进行序列测定。将测得的序列在 GenBank (登录号为 AY083232)进行 BLAST 分析, 结果表明, 所测序列与 *Acremonium strictum* 的同源性达 100%。

综合同源性比对结果, 从 GenBank 中选择了 6

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

个菌株的 ITS 基因序列, 应用 Treedrawing 软件进行多重比较后构建系统发育树(图 2)。结果表明, CL-3 菌株与 *Acremonium strictum* 在一个分支中, 与此菌株的进化距离最近, 初步将菌株 CL-3 鉴定为紧密枝顶孢霉 *Acremonium strictum*。

2.3 CL-3 菌株和兰花组培苗共培养体系

将 CL-3 菌株接种春兰组培苗共生培养基。在 3 种含糖浓度不同的菌-苗共生培养基上, CL-3 菌株菌丝生长较慢且气生菌丝不发达, 在培养基表面有较薄的菌丝体形成。

如表 1 所示, 处理苗的植株成活率在 71%–100%, 叶色正常, 植株长势健壮, 新根多, 有的还长新叶。2 个月后, 3 种不同菌-苗共生培养基中处理苗的平均鲜重增长率分别为 40.2%、80.5%和 44.7%, 经方差分析, 与对照均已达到显著差异 ($P<0.05$), 其中菌-苗共生培养基 II 达到极显著差异 ($P<0.01$)。

将处理苗根段表面消毒后, 均能重分离到真菌菌株(表 1)。对重分离的菌株进行形态和 ITS 序列分子鉴定(同上), 结果表明, 重分离的菌株所测序列与 CL-3 菌株的同源性达 100%, 且形态特征与

CL-3 菌株一致(数据略), 说明重分离的菌株的确为 CL-3 菌株, 即 CL-3 菌株已与植株的根形成了菌根共生关系。

2.4 处理苗菌根结构显微观察

将 CL-3 接菌处理苗的菌根进行显微观察。在连续石蜡切片中观察到皮层细胞中有较明显的菌丝结结构(图 3A)。菌丝结常常分布在靠近细胞核的部位, 菌丝结在形态和着色反应上与细胞核有明显区别, 菌丝结大而不规则, 着色较深, 呈绿色; 而细胞核小而圆, 为红色(图 3B), 这与前人观察到的结果一致^[11]。

3 讨论

3.1 兰科菌根真菌的分离与鉴定

在兰科菌根真菌的应用中, 通过接种菌根真菌的方法, 促进兰科植物种子胚的萌发以及萌发后幼苗的生长发育, 是有效提高组培苗出瓶成活率的一条途径, 对兰花的栽培是一个很有发展前景的措施。因此, 对兰科菌根真菌的分离筛选及资源调查日益引起人们的重视, 成为研究热点。范黎和郭顺星^[12]从产于我国云南和福建的 19 种兰科植物根中

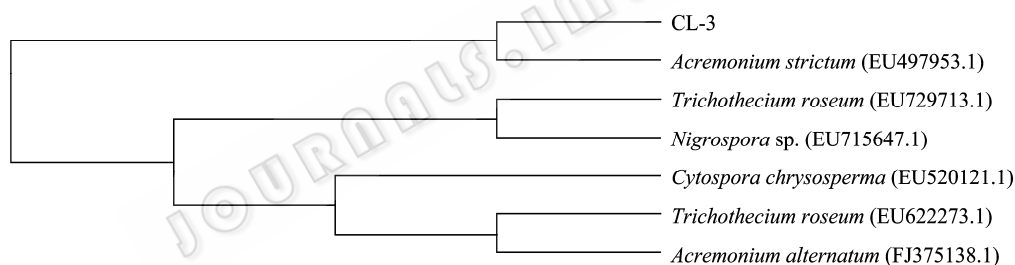


图 2 基于 rDNA ITS 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Acremonium* spp. based on the rDNA ITS sequence

表 1 CL-3 菌株和兰花组培苗在共生培养基上的共培养结果
Table 1 The co-culture result of seedlings and fungus on symbiotic culture medium

菌株编号 Strain	植株成活率 Survival rate (%)			平均鲜重增长率 Increment of fresh biomass (%)			重分离菌株 Re-isolated strains		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
CL-3	100	100	71	40.2*	80.5**	44.7*	+	+	+
CK	90	100	100	20.5	24.2	29.3	-	-	-

Note: * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

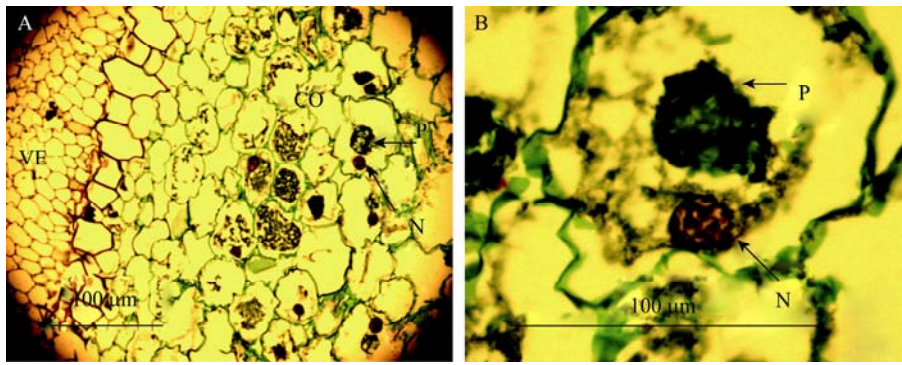


图3 组培苗菌根的显微结构

Fig. 3 Microstructure of the mycorrhizal root of tissue-cultured seedling

注: A: 染菌的皮层细胞; B: 染菌皮层细胞放大。VE: 根被; CO: 皮层; P: 菌丝结; N: 细胞核。

Note: A: Cortex with pelotons; B: Higher magnification of the cortical cells infected by fungi. VE: Velamen; CO: Cortex; P: Peloton; N: Nucleus.

分离到内生担子菌 26 个, 均为不育菌丝, 无锁状联合, 其特征类似于兰科丝核菌类, 将其确定为 *Ceratohiza*、*Epulorhiza* 和 *Moniliopsis* 的种。侯天文^[13]对云南地区兰花菌根真菌的多样性进行了调查, 共获得菌根真菌 41 种, 经系统发育树构建结果显示, 子囊菌为优势种类。段春芳^[14]首次从采自云南的大雪素和小雪素中分离到兰花菌根真菌, 并从墨兰中分离到格孢腔菌属(*Pleospora*)真菌, 在国内未见报道。胡陶等^[15]结合传统形态学特征和菌丝隔膜超微结构观察, 将分离自不同地理分布的 5 种中国兰属植物的共生菌根真菌鉴定为无性态的瘤菌根菌属真菌。鉴定结果表明, 瘤菌根菌是可与中国兰属植物形成菌根结构的最普遍的菌根真菌种类。到目前为止, 已分离的兰科菌根真菌主要有无孢目丝核菌属、担子菌纲以及子囊菌纲和半知菌类的一些腐生类群和不育菌丝群^[16]。本研究从野生春兰营养根中分离的 CL-3 菌株, 经鉴定为枝顶孢霉属(*Acremonium*)的紧密枝顶孢霉(*Acremonium strictum*), 在国内外还未见同类报道, 这对丰富兰花菌根真菌的研究具有一定的参考价值。

3.2 兰科植物与菌根真菌的共生关系

兰科植物和菌根真菌的共生关系主要在于菌根真菌有助于兰根吸收无机养分, 其作用类似于丛枝菌根。Cameron^[17]在研究兰科植物菌根时发现, 菌根能够促进植株生长和对 N、P 元素的吸收。近年

来, 采用 ^{14}C 试验也已证明, 即使某些兰科植物已经长出绿叶能独立制造养料, ^{14}C 仍是从菌根真菌向宿主方向移动。这说明此时的兰科植物依旧需要菌根真菌补充一部分的碳水化合物。此外, 兰科菌根形成后, 菌根真菌成为有益菌群, 能释放拮抗物质, 有效地阻止其它病原菌侵入兰根, 从而大大减轻了兰根遭受病害的危险, 间接提高幼苗的成活率, 促进植株的生长。丁晖等^[10]用 3 株分离自野生卡特兰的丝核菌菌株接种卡特兰组培苗, 结果处理苗鲜重增长率分别为 67.5%、67.3%和 62.4%。我们的研究表明, CL-3 菌株接种春兰组培幼苗, 经 2 个月的共生培养, 兰苗叶色正常, 根系生长良好。经春兰苗生长量测定, 鲜重增长率达 80.5%, 而不接菌的对照仅为 24.2%, 与对照差异达显著水平。这些结果都表明, 与兰科植物共生的菌根真菌对兰花生长有促进作用。

但是, 在人工培养条件下要建立兰科植物和真菌的共生关系, 培养基的选择至关重要。很多情况下, 如果选择的培养基使真菌生长过盛, 那么对植株健康生长乃至共生关系的形成都是不利的, 因为研究已经发现, 许多兰科菌根真菌其实是植物病原菌, 如立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、斑叶兰丝核菌(*Rhizoctonia goodyerae-repentis*)等, 这些真菌的过量生长不但不能形成共生关系, 反而导致兰科植株致病, 兰苗容易出现根腐现象。本试验所设计的 3

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

种共生培养基是减量碳源和氮源的改良 MS 培养基, 3 种培养基的主要差异是蔗糖浓度不同。一般来说, 培养基中糖浓度高, 易造成真菌生长旺盛, 严重侵染植株, 使植株的成活率低下, 菌苗共生体系难以建立, 而较低糖浓度的培养基中更有利于兰科植物与内生真菌共生^[18], 但也有例外, 类似 CL-3 菌丝不发达类型的真菌, 受培养基糖浓度的影响较小。从实验结果看, CL-3 菌株与春兰组培苗的最佳共生培养基是菌-苗共生培养基 II, 此时不仅菌和苗形成共生菌根, 且能极大促进组培苗的生长, 与对照相比, 植株的平均鲜重增长率达 80.5%, 效果显著。

参 考 文 献

- [1] 吴应祥. 中国兰花[M]. 第 2 版. 北京: 中国林业出版社, 1993: 116-117.
- [2] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录[M]. 第 1 卷. 北京: 高等教育出版社, 2004: 433.
- [3] Lee SS, Park SS, Kim TJ, et al. Effect of orchid habitat soil on growth of tissue cultured *Cymbidium konran* and *C. goeringii* and root infection of orchid mycorrhizal fungus[J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1997, 38(2): 176-182.
- [4] 伍建榕, 金辉, 韩素芬, 等. 春兰菌根真菌的筛选[J]. 福建林学院学报, 2007, 27(3): 267-271.
- [5] 吕梅, 伍建榕, 马焕成. 春兰菌根的显微结构观察[J]. 西南林学院学报, 2005, 25(2): 8-11.
- [6] Richardson KA, Peterson RL, Currah RS. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborean* (Orchidaceae)[J]. Canadian Journal of Botany, 2003, 70: 291-230.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 567.
- [8] 龙良鲲, 羊宋贞, 姚青, 等. AM 真菌 DNA 的提取与 PCR-DGGE 分析[J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 564-569.
- [9] 范黎, 郭顺星, 曹文琴, 等. 墨兰共生真菌一新种的分离、培养、鉴定及其生物活性[J]. 真菌学报, 1996, 15(4): 251-255.
- [10] 丁晖, 韩素芬, 王光萍, 等. 卡特兰与丝核菌共培养体系的建立及卡特兰菌根显微结构的研究[J]. 菌物系统, 2002, 21(3): 425-429.
- [11] Andersen TF. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensulato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods[J]. Mycological Research, 1996, 100(9): 1117-1128.
- [12] 范黎, 郭顺星, 肖培根. 十九种兰科植物根的内生担子菌[J]. 热带作物学报, 1998, 19(4): 76-82.
- [13] 侯天文, 金辉, 刘红霞, 等. 四川黄龙沟优势兰科植物菌根真菌多样性及其季节变化[J]. 生态学报, 2010, 30(13): 3424-3432.
- [14] 段春芳, 李枝林, 方飞, 等. 云南几种兰花菌根真菌的分离鉴定[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3): 756-759.
- [15] 胡陶, 李潞滨, 杨凯, 等. 中国兰属植物菌根真菌的分离与鉴定[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(3): 132-135.
- [16] 何炜, 杨晓红, 戴木兰, 等. 兰科菌根共生效应研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17): 7206-7207, 7226.
- [17] Cameron DD, Leake JR, Read DJ. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*[J]. New Phytologist, 2006, 171(2): 405-416.
- [18] Dijk E, Eck ND. Effects of mycorrhizal fungi on *in vitro* nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species[J]. Canadian Journal of Botany, 1995, 73: 1203-1211.