

与植物共生的难培养菌物及其培养特性 研究进展

史立君 徐丽娟 刘润进*

(青岛农业大学菌根生物技术研究所 山东 青岛 266109)

摘要: 与植物共生难培养菌物的分类地位与生活史复杂多样, 与植物共生程度各异。在其他一定种类生物(如植物、细菌等)存在的条件下, 大多与植物共生难培养菌物能完成生活史, 而且一些非专性非活体营养的共生菌物较专性活体营养的共生菌物更容易获得纯培养。在简要介绍与植物共生难培养菌物分类地位、生活史与共生类型的基础上, 重点探讨了与植物共生难培养菌物的培养特性和培养方法, 并讨论了该领域的研究动向与展望, 旨在为当前和今后开展难培养菌物纯培养研究提供思路、依据和工作基础。

关键词: 菌物, 分类, 生活史, 培养, 纯培养

Recent advances in the study of culture-difficult fungi associated with plants and their cultural characteristics

SHI Li-Jun XU Li-Juan LIU Run-Jin*

(Institute of Mycorrhizal Biotechnology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: The taxonomy position and life cycles of culture-difficult fungi which associated with plants at various symbiosis extent are very completed and diverse. Most of these fungi can finish their life cycles when the other living things (such as plant, bacteria etc.) present. The non-obligate with no-vivo nutrition culture-difficult fungi are easier to be pure cultured than that of obligate with vivo nutrition one. On the basis of introducing taxonomy position, life cycle and symbiosis type of culture-difficult fungi associated with plants, the present author summarized the cultural characteristics and method for these fungi, as well as discussing the research trend and prospects, in order to provide new idea and basis for further investigating the pure culture of the fungi.

Keywords: Fungi, Taxonomy, Life cycle, Culture, Pure culture

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30871737); 青岛市自然科学基金项目(No. 08-1-3-20-jch)

* 通讯作者: Tel: 86-532-88030113; ✉: liurj@qau.edu.cn

收稿日期: 2010-06-11; 接受日期: 2010-11-08

菌物种类繁多, 分布广泛, 在生态系统及人类生活生产中发挥着极为重要的作用。作为生态系统的分解者, 菌物参与物质转化、循环与能量流动过程, 从而确保生态系统的稳定和可持续生产力; 有的则直接或间接为人类生活提供所需的物质(如食用菌和菌根真菌等)作出了不可替代的贡献。自然界生态系统中几乎所有生物都不是独立生活的, 而是普遍存在着共生(Symbiosis)关系。从生态学角度出发, 共生是不同生物种类成员在不同生活周期中重要组成部分的联合, 包括各种不同程度的寄生[即寄生共生(Parasitic symbiosis)]、偏利共生、互惠共生和共栖等。我们将参与共生的菌物称作共生菌物。不同的菌物在与其他生物共生时, 其“共生程度(或深度)”也大不相同, 共生程度低的菌物容易培养, 而共生程度较高的就难以培养。所谓难培养菌物是指在常规的人工培养条件下由于未能满足该菌物的营养需要或/和生长发育条件而不能完成其生活史的菌物, 主要包括与植物共生、与藻类共生、与动物共生的部分菌物, 以及一些特殊和极端环境(如温泉和深海)下生长的菌物。由于这些菌物难以获得纯培养, 因此极大地限制了人类对它们的研究和应用, 也使得人们对它们的纯培养给予了极大的关注^[1]。基于研究的深入、方法的革新和人们坚持不懈的努力, 越来越多的与植物共生的难培养菌物已获得纯培养^[2-3], 为我们研究难培养菌物增加了信心、激发了灵感、提供了思路和技术。为加快当前和今后难培养菌物的培养研究工作, 本文重点探讨了与植物共生的难培养菌物及其培养特性。

1 难培养菌物的分类地位及其共生类型

与植物共生的难培养菌物主要属于根肿菌类、霜霉菌类、白粉菌类、锈菌类、外生菌根(Ectomycorrhizas, ECM)真菌和丛枝菌根(Arbuscular mycorrhizas, AM)真菌。具体分类地位如下:

1.1 根肿菌类

根肿菌的分类地位一直存有争议, 1973年 Ainsworth 等的《真菌字典》(第6版), 1983年 Ainsworth 和 Bisby 的《真菌字典》将该菌归属于真

菌界粘菌门根肿菌纲(Plasmodiophoromycetes)。Alexopoulos和 Mins 则将其划到真菌界, 鞭毛菌亚门(Mastigomycotina), 根肿菌纲(Plasmodiophoromycetes)。根肿菌纲真菌种类不多, 仅有1目——根肿菌目(Plasmodiophorales), 15属46种。根据该病原菌的生活史中存在变形虫体(即原生质团)阶段, Ainsworth 和 Bisby 的《真菌字典》(第8版)中将其归为原生动物界(Protozoa), 根肿菌门(Plasmodiophoromycota)。根肿菌为专性寄生共生类型菌物, 在没有寄主的条件下不能被培养^[4-5]。

1.2 霜霉菌类

在 Whittaker 五界系统中, 霜霉菌属于真菌界, 鞭毛菌亚门, 卵菌纲(Oomycetes), 霜霉目(Peronosporales)。根据霜霉菌营养体为二倍体等特点, 在 Cavalier-Smith 八界系统中被归为藻物界(Chromista), 卵菌门(Oomycota), 卵菌纲, 霜霉目, 霜霉科(Peronosporaceae), 含7个属: 霜霉属(*Peronospora*)、假霜霉属(*Pseudoperonospora*)、单轴霉属(*Plasmopara*)、盘梗霉属(*Bremia*)、指梗霉属(*Sclerospora*)、圆梗霉属(*Basidiophora*)和拟盘梗霉属(*Bremiella*), 均为高等植物寄生菌^[6], 属于寄生共生类型。

1.3 白粉菌类

白粉菌目(Erysiphales)真菌一般称作白粉菌, 有白粉菌科(Erysiphaceae)1科, 据《中国真菌志(第1卷)白粉菌目》记载, 我国白粉菌共有22属, 253种, 属于专性寄生共生类型。Hawksworth 等将白粉菌归于子囊菌亚门(Ascomycotina)核菌纲(Pyrenomycetes)^[7-8]。

1.4 锈菌类

锈菌属于担子菌亚门(Basidiomycotina)锈菌纲(Urediniomycetes)。锈菌纲因具有简单的隔膜孔而区别于担子菌亚门其他2个主要分支^[9-10]。锈菌有160多属7000多种^[11], 其中大多数锈菌属于寄生共生类型菌物, 很难获得纯培养^[12], 但目前已有少数锈菌如小麦禾柄锈菌(*Puccinia graminis tritic* f. sp. *Tritici*)^[13]、燕麦冠锈病菌(*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*)^[14]、苹果胶锈菌(*Gymnosporangium juni-*

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

peri-virginiana)^[15]、亚麻锈菌(*Melampsora lini*)^[16]、茶蔗子柱锈菌(*Cronartium ribicola*)^[17]、梭形疮锈菌(*Cronartium quercuum* f.sp. *fusiforme*)^[18]等可获得纯培养。

1.5 ECM 真菌

据估计,世界上有 7 000 到 10 000 种真菌能与多种植物根系共生形成 ECM^[19],我国已报道 ECM 真菌约 850 多种^[20],隶属于子囊菌亚门(Ascomycotina)和担子菌亚门(Basidiomycotina),属于互惠共生类型菌物。ECM 真菌中很多都是可食用真菌,若能在人工培养基上进行纯培养,即可带来具有巨大的经济效益。然而,由于部分 ECM 真菌生物学特性尚未清楚,在人工培养条件下很难形成担子果。迄今为止,只有部分 ECM 真菌能在寄主植物上形成担子果,如在欧洲、澳大利亚和北美洲,块菌(*Tuber* spp.)可在寄主植物上进行商业生产^[21],鸡油菌也可在实验室条件下与寄主植物树苗共同培养产生担子果;少数 ECM 能在补充无机营养的木屑和大麦粒混合培养基上形成担子果,如 *Lyophyllum shimeji* 和粘滑菇属;极少数 ECM 种类,可以进行纯培养获得子实体,如牛肝菌(*Boletus* sp.)^[2]。

1.6 AM 真菌

AM 真菌是一类起源、演化相对独立、古老、专性植物活体营养共生真菌^[22],属于专性互惠共生类型菌物。最早被归入 Link 建立的内囊霉属。百余年中,特别是近 20 年来其分类地位不断变化。20 世纪五六十年代,AM 真菌被归为接合菌亚门(Zygomycotina),毛霉目(Mucorales),内囊霉科(Endogonaceae)。20 世纪 90 年代, Morton 和 Benny 在探讨了 AM 真菌系统发育和演化的基础上,建立了球囊霉目(Glomales)^[23]。随后 Schüßler 等基于 SSUrRNA 基因序列研究,把 AM 真菌分类地位从球囊霉目提升到球囊菌门(Glomeromycota),包括 1 纲 4 目 7 科 9 属^[24-25]。目前该门包含 13 科 19 属 214 种^[26]。全部 AM 真菌在纯培养条件下不能完成其生活史,即目前均未获得纯培养,只有与活体植物根系共生后才能产孢,完成其生活史。可见,在难培

养菌物纯培养研究中探讨其生活史特点是十分必要的。

2 难培养菌物的生活史研究

2.1 根肿菌类

根肿菌以休眠孢子形式在土壤中存活,当条件适宜时,休眠孢子萌发释放出游动孢子。后者与寄主植物根毛表皮细胞接触,穿透细胞壁(侵染根毛阶段)并将原生质注入寄主细胞内,发育成原生质团。原生质团成熟后分裂形成薄壁的游动孢子囊,每个孢子囊产生 4-16 个游动孢子并释放到土壤中,这些游动孢子有配子的功能,质配后 2 个游动孢子配合形成合子,穿透根皮层组织(侵染皮层中柱阶段),并发育成与细胞肿大有关原生质团,稍后在被侵染的组织中形成根瘿。原生质团内细胞核发生核配后立即进行减数分裂形成次生游动孢子囊,最后形成新一代休眠孢子,病根腐烂后休眠孢子囊又随病残物遗落在土壤中完成生活史^[27]。

2.2 霜霉菌类

霜霉菌具有独特的生活史类型——二倍体型(Diploid)生活史,即营养体为二倍体且二倍体阶段占据生活史的大部分时期。无性阶段由菌丝开始,形成孢子囊,孢子囊直接萌发从气孔或直接穿过表皮侵入寄主叶片。菌丝在叶片内扩展时部分菌丝细胞分化为藏卵器和雄器。当不同交配型的菌丝接触时抑制无性孢子的形成。此时,细胞核在藏卵器和雄器内发生减数分裂,形成单倍体。随后藏卵器和雄器很快交配,单倍体配子从雄器转移至藏卵器,进行受精,恢复二倍体,产生一个卵孢子,卵孢子萌发形成菌丝。

2.3 白粉菌类

白粉菌的子囊孢子或分生孢子吸附在寄主植物表面,萌发产生芽管,顶端形成附着胞,产生侵入丝侵入寄主,之后病原菌发育出不同的侵入器官或从寄主某一部位直接取食养分^[28],同时形成菌丝体在叶片表面扩展成白色霉层,并产生分生孢子梗,上面着生分生孢子。侵染后期,霉层上产生闭囊壳,内部产生子囊孢子,完成其生活史。

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

2.4 锈菌

锈菌生活史是所有真菌中最复杂的^[29]。部分锈菌具有二态性, 隐蔽的子实体, 转主寄生现象或孢子多型现象, 这些复杂的特点妨碍了对锈菌生物学特性和生活史的研究^[30]。各种锈菌产生孢子的类型多少的不同, 构成了锈菌生活史的多样性。以全锈型转主寄生锈菌为例, 生活史以冬孢子在寄主植物(寄主 I)上萌发产生先菌丝开始, 先菌丝产生担孢子, 侵染另一种寄主(寄主 II)形成性孢子器产生大量性孢子。性孢子与受精丝异宗配合形成双核菌丝体, 扩展至叶片背面分化形成锈孢子器, 产生锈孢子。锈孢子侵染寄主 I 类植物上, 在体内形成发达的双核菌丝体, 不久在其叶片上分化形成夏孢子堆, 产生夏孢子。寄主 I 类植物生长后期, 双核菌丝顶端形成冬孢子, 完成其生活史。

2.5 ECM 真菌

ECM 真菌因种类繁多, 其生活史复杂多样。以松茸为例, 其生活史以子实体产生原担子开始, 原担子中的 2 个核融合成双倍核, 经不同过程形成不同类型的担孢子, 担孢子萌发, 侵染松树根系, 形成菌根, 产生松茸子实体, 完成其生活史。根据其担孢子的形成和萌发、子实体形成过程等形式不同, 松茸生活史分为 3 个不同类型: 四核担子和单核担孢子型, 八核担子和单核担孢子型, 四核担子和双核担孢子型^[22]。四核担子和单核担孢子型: 原担子中的双倍核经 2 次分裂形成 4 个单倍体子核, 子核穿过孢子梗并在小梗顶端形成 4 个单核的担孢子, 担孢子萌发形成单核的初生菌丝, 经异宗配合形成双倍体的双核菌丝, 侵染松树。八核担子和单核担孢子型: 原担子的双倍核经 3 次分裂成为具有 8 个单倍体的子核, 其中 4 个子核直接形成 4 个单核担孢子, 萌发形成单核菌丝, 异宗配合形成双核菌丝, 侵染松树根系。四核担子和双核担孢子型: 原担子的双倍核, 经两次分裂形成 4 个单倍体子核, 分别进入担孢子并在其中直接进行第 3 次减数分裂, 从而形成非异核的双核担孢子, 萌发后直接形成双核菌丝, 侵染松树根系。

2.6 AM 真菌

土壤中 AM 真菌厚垣孢子遇到适宜的温湿度等环境条件时萌发产生芽管菌丝, 菌丝与寄主植物根系接触, 经相互识别后侵入, 根内和根外菌丝扩展, 根内菌丝进一步发育形成丛枝、泡囊、根内孢子等; 根外菌丝发育到一定程度在其菌丝间或顶端膨大发育成厚垣孢子或/和孢子果。孢子从产孢菌丝上脱落进入土壤中, 完成生活史。目前尚未发现 AM 真菌有性孢子^[21,30]。AM 真菌还具有一定的腐生性和弱寄生性。例如, 部分 AM 真菌能在大豆胞囊线虫的胞囊内产孢^[32], 说明该真菌具有一定寄生性, 而寄生条件下 AM 真菌生活史有待研究。

上述难培养菌物都不能独立完成其生活史, 若要完成生活史均离不开植物。那么, 这些寄主植物在它们的生活史过程中产生了哪些必要作用? 这在难培养菌物培养过程中是值得关注的。

3 难培养菌物的培养特性研究

目前, 对难培养菌物的培养研究, 主要集中在营养物质(如选择碳源等)、基质、pH、温湿度等培养条件以及分子机制上。

3.1 共培养条件下的培养

3.1.1 共培养条件下的部分生长发育: 白粉菌的生长需要活体植物组织, 离体叶片培养白粉菌菌体是非常有效的途径^[8,33]。杨永锋建立了一套比较完善的适宜于葡萄白粉菌离体培养的方法: 以苯丙咪唑(30–50 mg/L)为保绿剂, 脱脂棉为衬垫物, 幼嫩的葡萄叶片为载体。当苯丙咪唑浓度为 50 mg/L, 第 15 天时叶片保绿面积仍然达到 90%以上。在 HB 培养基中, 添加 0.01 mg/L 的 IAA 可以有效地促进离体葡萄叶片生长, 其存活时间可达 2 个月^[33]。Marc^[8]用含有甘露醇(0.1 mol/L)、蔗糖(0.02 mol/L)和琼脂(8 g/L)的培养基培养子叶, 进行了多种白粉菌培养实验, 产孢量很高。实验还发现子叶上产孢量及其存活能力受子叶培养时间的影响。至此, 因白粉菌的培养仍需要严格依赖活体植物材料, 想要长期保存白粉菌仍然很难。

3.1.2 共培养条件下能完成生活史: 一些难培养菌

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

物在与其他生物共同培养下能完成其生活史。例如,芸薹根肿菌在与芜菁毛状根(Turnip hairy roots)共同培养下,能够完成生活史并成功获得继代培养。诱导芸薹根肿菌根瘤形成休眠孢子最好的方法是在 25 °C 条件下培养接种休眠孢子的芜菁毛状根至根瘤形成,然后转移到低温(20 °C)条件下培养。这是因为 25 °C 时芜菁毛状根生长旺盛,导致在分化成休眠孢子之前培养基中的营养快速损失、寄主细胞的变性和坏死,而低温条件下培养基中的养分消耗较慢,寄主细胞的生存和生长比较长久,利于芸薹根肿菌原生质团分化成休眠孢子^[5]。

采用离体双重培养法(AM 真菌与普通根双重培养、AM 真菌与 Ri T-DNA 转型根的双重单胞无菌培养法)可获得 AM 真菌孢子,但不能应用于 AM 真菌接种剂的大规模生产^[18]。除植物外,某些伴生细菌(Bacteria associated with AM fungal spores)与 AM 真菌共培养,AM 真菌可完成生活史并产生子代孢子,这说明在无寄主根系存在的条件下,AM 真菌同样可以完成其生活史^[34-35]。这是十分有意义的发现,在 AM 真菌纯培养研究中应加强 AM 真菌助手细菌等其他微生物的生理生化代谢特点对 AM 真菌生长发育的影响方面的探索。

3.2 纯培养条件下的培养

3.2.1 纯培养条件下的部分生长发育: AM 真菌于纯培养条件下可生长发育到一定程度,但不能产生孢子。培养基中适量的维生素、有机酸、蔗糖、可溶性盐类、土壤和植物根的抽提物能促进孢子萌发;葡萄糖、过量的可溶性盐有抑制作用;在 PDA、玉米粉培养基和麦芽汁培养基上不能生长;离体条件下的 O₂ 分压、温度和光照等能影响 AM 真菌的纯培养;一定程度的低温处理能提高孢子萌发率。例如,4 °C 贮藏 *Gigaspora margarita* 10-50 d 能显著提高孢子萌发率,处理 20 d 萌发效果最佳,萌发率为 30.34%^[36]。

3.2.2 纯培养条件下能完成生活史: Fasters 等^[3]报道了一种简单可行的液体培养基培养小麦禾柄锈菌的方法:在 15 μm 的尼龙过滤器上用 0.1% 的十二烷基硫酸钠冲洗夏孢子,并用无菌的重蒸馏水

离心 3 次(3 500×g 离心 3 min, 20 °C),可将培养物的被污染程度从 50%-100% 降到 10%-20%。在每个培养皿中倒入 5 mL 培养基(表 1),接种 0.1 g 夏孢子悬浮液,于 pH 6、23 °C、黑暗、轻微振荡条件下生长,且热处理(2 h, 30 °C)或添加 2 mol/L 丙烯醛能够加快侵染结构的萌发,营养液浓度降低至原浓度的 5% 或将 pH 降低至 5.25,可诱导夏孢子和冬孢子的形成。

小麦禾柄锈菌在含有糖、氨基酸、一定矿质营养并添加低浓度酵母膏^[13]或蛋白胨或维生素^[36]培养基上纯培养形成的子座中产生的夏孢子和冬孢子,与生于寄主上的在形态和着生方式上一致,但培养基中出现了几种在寄主上没有的孢子^[37]。锈菌在含 Evans 蛋白胨培养基上要比在含 Difco 蛋白胨培养基上生长时间长,分化程度高。Evan 蛋白胨在小麦禾柄锈菌纯培养中可能有着不可取代的作用^[38]。

ECM 真菌中牛肝菌(*Boletus* sp.)的菌丝在含有木屑和大麦粒的培养基中生长良好并能产生成熟的子实体,完成生活史^[2]。从落叶林的阔叶树上分离的 *Boletus* sp. 子实体在 500 mL 玻璃瓶培养中产生子实体。他们发现,当开始产生子实体时划伤培养基的表面结合供水、用多孔石在培养基上作保护性外套会明显提高子实体产量。可在含有大麦粒培养基上旺盛生长说明此菌利用淀粉能力强,这对在没有寄主的条件下形成子实体有益,具有这种能力的 ECM 真菌在纯培养中产生子实体的数量会增加。

Sanmee 等^[39]首次报道了在试管中培养暗褐网柄牛肝菌(*Phlebopus portentosus*),并产生担子果。但是,担子果并没有显示典型的挫伤反应,这可能是由于培养条件限制了一定的新陈代谢反应或缺乏某些寄主植物提供的化学物质。

随着 ECM 研究不断深入,人们发现不同 ECM 分离最适部位不同,如子实体菌褶部位易于分离到松茸菌丝^[40],而菌盖与菌柄连接处的菌肉组织分离美味牛肝菌成功率最高且不易污染^[41]。此外,ECM 真菌对基质有着特殊的营养要求,含维生素^[42]、酵母粉^[44]等的天然基质组成的培养基比人工合成的培养基更有利于它们的生长。在对 *Lactarius deliciosus*、

表 1 小麦禾柄锈菌纯培养的液体培养基配方
Table 1 Composition of the liquid medium for the pure liquid culture of *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici*

材料 Materials	浓度 Concentration (mg/L)	材料 Materials	浓度 Concentration (mg/L)	材料 Materials	浓度 Concentration (mg/L)
酪氨酸 Tyrosine	64	缬氨酸 Valine	84	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5
丙氨酸 Alanine	428	蛋氨酸 Methionine	50	KCl	250
色氨酸 Tryptophan	60	异亮氨酸 Isoleucine	60	葡萄糖 Dextrose	7 500
天冬氨酸 Aspartic acid	100	亮氨酸 Leucine	64	果糖 Fructose	7 500
天冬酰胺 Asparagine	200	苯丙氨酸 Phenylalanine	68	蔗糖 Sucrose	7 500
苏氨酸 Threonine	144	赖氨酸 Lysine	120	木糖 Xylose	100
丝氨酸 Serine	412	组氨酸 Histidine	12	甘露糖 Mannose	100
谷氨酸 Glutamic acid	548	精氨酸 Arginine	88	Nicotinic	2
谷氨酰胺 Glutamine	300	γ-氨基丁酸 γ-Aminobutyric acid	804	Thiamine-HCl	20
脯氨酸 Proline	60	NaNO ₃	1 000	Pyridoxine-HCl	2
甘氨酸 Glycine	148	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	656	Claforan	50
半胱氨酸 Cysteine	300	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	Difco	8 773

Boletus edulis 和 *Lactarius insulsus* 3 种菌的纯培养研究中发现, pH 影响较小; 水势有较明显影响, 3 种菌都在较低 PEG 浓度下生长良好; 高温导致菌死亡, 3 种菌最适温度为 25 °C–28 °C^[43]。目前, 部分牛肝菌^[2]、鸡油菌等难培养 ECM 真菌都有报导证实它们已经能在人工培养基上形成子实体, 但部分 ECM 真菌纯培养虽然得到子实体, 却在 1 年内失去形成子实体的能力, 如 *Tylopilus castaneiceps*^[44]。因此, ECM 应用于大规模的商业性生产还需更深入的研究。

此外, 有研究发现真菌培养过程中自我产生的诱变剂(如 *Aspergillus* 产生黄曲霉毒素)可能印制 DNA 酶的稳定性^[45], 因此体外培养真菌过程中诱变剂对核酸和细胞分裂的影响还需要进一步研究。

4 研究动向与展望

菌物纯培养研究在理论与生产实践上均具有重要价值。首先, 获得菌物的纯培养有利于其分类地

位的确定, 促进对其生活史、生理特性、系统发育、遗传特点等方面的研究; 其次, 获得菌物纯培养可减少对其野生菌物, 尤其是具有药用和食用价值的野生菌物资源的采挖, 保护野生资源; 菌根真菌是环境微生物, 更是功能微生物, 在修复被破坏的生态环境(如采矿区, 重金属污染区等)方面可发挥重要作用; 在农林牧业生产实践方面, 获得致病真菌(如白粉菌, 锈菌)的纯培养有利于研究其致病机制及生物防治方法, 可间接达到减少化学农药使用的目的; 获得可促进林木生长菌根菌物的纯培养可以大量生产菌剂, 应用于林业; 获得具有食用和药用价值菌物的纯培养可以大量生产其菌丝体和/或子实体, 提高人们的健康与生活水平。

事实上, 世界上共生菌物种类很多, 我们研究的只是其中很小的一部分, 也就是说, 有许多菌物人们还没有或来不及研究它们, 就将它们称之为“难培养”, 也有失公平。而且, 难培养菌物并不是不能培养, 尤其是那些与植物、藻类、动物共生的种

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

类; 很难培养的菌物往往是那些专性活体营养的共生菌物和深海高压下生长的菌物。后者是由常规培养达不到所需的环境条件, 而前者则是我们不了解其特殊的营养特性。而对于那些普通的共生菌物, 尤其是兼性共生的难培养菌物则相对比较容易获得纯培养。因此, 鉴于目前与植物共生的难培养菌物培养特点, 今后可加强以下几个方面研究: (1) 难培养菌物营养特性研究。首先要比较难培养菌物与已获得纯培养的难培养菌物的营养条件与生长发育特点; 其次在生理和分子水平上进一步研究菌物生长发育和遗传等生物学特性, 为掌握其各自不同的营养特性、获得其纯培养提供依据; (2) 助手细菌 (Helper bacteria) 与伴生细菌生理效应的研究。系统深入研究能够促进菌根真菌孢子萌发、菌丝生长和产孢等的伴生细菌和助手细菌等生长发育特点、生理生化代谢特点与次生代谢产物对难培养菌物生长发育, 尤其是对难培养菌物产孢的影响; (3) 寄主植物生理活性物质效应的研究。从寄主植物各发育期生理代谢 (如内源激素代谢与平衡等) 等特征规律入手, 系统探索确定这些寄主植物在难培养菌物生活史过程中的地位、作用和机制等, 为进一步获得纯培养提供技术和基础。可以预见, 随着技术的发展和研究的深入, 越来越多的难培养菌物将会培养成功。

参 考 文 献

- [1] 张英, 刘润进, 郭良栋. 目前 AM 真菌培养特性方面研究的基本概况[J]. 微生物学通报, 2002, 29(4): 86-90.
- [2] Ohta A, Fujiwara N. Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture[J]. Mycoscience, 2003, 44(4): 295-300.
- [3] Fasters MK, Daniels U, Moerschbacher BM. A simple and reliable method for growing the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, in liquid culture[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1993, 42(4): 259-265.
- [4] Neuhauser S, Bulman S, Kirchmair M. *Plasmodiophorids*: The challenge to understand soil-borne, obligate biotrophs with a multiphasic life cycle//Gherbawy Y, Voigt K, eds. Molecular identification of fungi[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 51-78.
- [5] Asano T, Kodama A, Kageyama K. Susceptibility of hairy root lines of *Brassica* species to *Plasmodiophora brassicae* and in an *in vitro* subculture system[J]. J Gen Plant Pathol, 2006, 72(2): 85-91.
- [6] 李晨光. 黄瓜、甜瓜霜霉病流行病学初步研究[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2008.
- [7] Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, et al. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi[M]. 8th ed. Wallingford, UK: CAB Int, 1995.
- [8] Bardin M, Suliman ME, Sage-palloix AM, et al. Inoculum production and long-term conservation methods for cucurbits and tomato powdery mildews[J]. Mycological Research, 2007, 111(6): 740-747.
- [9] Swann EC, Frieders EM, McLaughlin DJ. Urediniomycetes//McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA, eds. Systematics and evolution[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2001: 37-56.
- [10] Weiß M, Bauer R, Begerow D. Spotlights on heterobasidiomycetes//Agerer R, Piepenbring M, Blanz P, eds. Frontiers in Basidiomycote mycology[M]. Eching, Germany: IHW-Verlag, 2004: 7-48.
- [11] Sert H (B). Additions to rust and smut fungi of Turkey[J]. Phytoparasitica, 2009, 37(2): 189-192.
- [12] Virtudazo EV, Nakamura H, Kakishima M. Phylogenetic analysis of sugarcane rusts based on sequences of ITS, 5.8S rDNA and D1/D2 regions of LSU RdnA[J]. J Gen Plant Pathol, 2001, 67(1): 28-36.
- [13] Williams PG. Obligate parasitism and axenic culture//Bushnell WR, Roelfs AP, eds. The Cereal Rusts[M]. Orlando, FL: Academic Press, 1984: 399-430.
- [14] Jones DR. Axenic culture of *Puccinia coronata* var. *avenae* from urediospores[J]. Trans Br Mycol Soc, 1974(63): 593-694.
- [15] Hotson HH, Cutter VM. The isolation and culture of *Gymnosporangium juniperi-virgininae* Schw. upon artificial media[J]. Proc Natl Acad Sci, 1951, 37(7): 400-403.
- [16] Coffey MD, Bose A, Shaw M. *In vitro* culture of the flax rust, *Melampsora lini*[J]. Can J Bot, 1970, 48(4): 773-776.
- [17] Diner AM, Mott RL. *In vitro* inoculation of western white pine tissue culture propagules with vegetative hyphae of *Cronartium ribicola*[J]. Phytopathology, 1985, 75: 1130-1131.
- [18] Hu A, Amerson HV. Single genotype axenic cultures of *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme*[J]. Phytopathology, 1991, 81(10): 1294-1297.
- [19] Taylor AFS, Alexander I. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world[J]. Mycologist, 2005, 19(3): 102-112.

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

- [20] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000.
- [21] Lefevre CK, Hall IR. The status of truffle cultivation: a global perspective[C]//Mehlenbacher SA (ed) Proceedings Vth International Congress on Hazelnut. ISHS, Leuven, 2001: 513-520.
- [22] 刘润进, 陈应龙. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [23] Morton JB, Benny GL. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, Glomales, two new suborders, *Glominae* and *Gigasporinae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*[J]. *Mycotaxon*, 1990(37): 520-524.
- [24] Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution[J]. *Mycological Research*, 2001, 105(12): 1413-1421.
- [25] Schüßler A. Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon phyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Plant Soil*, 2002, 244(1/2): 75-83.
- [26] 刘润进, 焦惠, 李岩, 等. 丛枝菌根真菌物种多样性研究进展[J]. *应用生态学报*, 2009, 20(9): 2301-2307.
- [27] Kageyama K, Asano T. Life cycle of *Plasmiodiophora brassicae*[J]. *Plant Growth Regul*, 2009, 28(3): 203-211.
- [28] 杨丽丽. 小麦白粉菌生理小种的鉴定及耐低磷小麦新种质的筛选[D]. 南京农业大学硕士学位论文, 2006.
- [29] Cummins GB, Hiratsuka Y. Illustrated genera of rust fungi[M]. 3rd Ed. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 2003: 225.
- [30] Aime MC, Matheny PB, Henk DA, et al. An overview of the higher level classification of *Pucciniomycotina* based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences[J]. *Mycologia*, 2006, 98(6): 896-905.
- [31] 钟凯, 王淼焱, 刘润进. AM 真菌生活史、遗传特性与纯培养的生物学基础[J]. *菌物学报*, 2009, 28(2): 310-314.
- [32] 刘杏忠, 刘润进, 秦志林. VAM 真菌定殖于大豆胞囊线虫在我国的发现[J]. *土壤学报*, 1994, 31(增刊): 230-233.
- [33] 杨永锋. 中国主要酿酒葡萄产区白粉菌有性世代的调查与研究[D]. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2005.
- [34] Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H. Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1919-1924.
- [35] Hildebrandt U, Ouziad F, Marner FJ, et al. The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus up to the formation of fertile spores[J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2006, 254(2): 258-267.
- [36] 陈应龙, 弓明钦, 王凤珍, 等. VA 菌根菌剂的生产及其接种潜力的测定[J]. *热带亚热带土壤科学*, 1997, 6(2): 113-120.
- [37] William PG. A new perspective of the axenic culture of *Puccinia graminis* f. sp. *Triticici* from uredospore[J]. *Phytopath*, 1971, 61: 994-1001.
- [38] Staples RC. Research on the rust fungi during the twentieth century[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2000, 38: 49-69.
- [39] Sanmee R, Lumyong P, Dell B, et al. *In vitro* cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand[J]. *Mycoscience*, 2010, 51(1): 15-22.
- [40] 杨民和, 刘咏梅, 杨新美, 等. 松茸的菌丝分离及纯培养研究[J]. *华中农业大学学报*, 1997, 16(3): 272-276.
- [41] 刘琼波, 苏开美, 白永顺, 等. 美味牛肝菌的菌种分离培养试验初探[J]. *食用菌*, 2007, 29(4): 25-26.
- [42] 田春杰, 何兴元, 吴清风, 等. 几种外生菌根真菌培养特性的研究[J]. *微生物学杂志*, 2000, 20(3): 9-11.
- [43] Xu ML, Zhu JJ, Kang HZ, et al. Optimum conditions for pure culture of major ectomycorrhizal fungi obtained from *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantations in southeastern Keerqin sandy lands, China[J]. *Journal of Forestry Research*, 2008, 19(2): 113-118.
- [44] Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K. Fruit body formation of *Tylopilus castaneiceps* in pure culture[J]. *Mycoscience*, 2009, 50(4): 313-316.
- [45] Paterson RRM, Lima N. Mutagens manufactured in fungal culture may affect DNA/RNA of producing fungi[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(4): 1070-1080.