

徐超,张红岩,杨鹤同,等.铁皮石斛共生真菌对不同碳源的适应性[J].江苏农业科学,2017,45(21):147-148,192.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.040

铁皮石斛共生真菌对不同碳源的适应性

徐超¹,张红岩²,杨鹤同¹,席刚俊¹

(1.江苏农林职业技术学院,江苏句容 212400; 2.江苏省句容市农业委员会,江苏句容 212400)

摘要:以蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、淀粉作为培养基中的碳源,探索铁皮石斛共生真菌对不同碳源的适应性。结果发现,以蔗糖、葡萄糖作为碳源时,各种共生真菌的生长速度较快、菌丝干质量较高。蔗糖、葡萄糖为适用于铁皮石斛共生真菌的外源碳源,考虑到成本,使用蔗糖更为适宜。

关键词:铁皮石斛;共生真菌;碳源

中图分类号: S567.23⁺9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0147-02

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为兰科石斛属多年生附生草本植物^[1],具有很好的滋阴润肺、抗肿瘤等功效^[2],被誉为“中华九大仙草”之首^[3-4]。作为典型菌根共生植物,共生真菌主要寄生于铁皮石斛的种子及根系上^[5-6]。碳源是生物细胞骨架构建的主要物质,也是细胞生命活动所需能源的主要提供者,因此微生物的正常生长和代谢离不开碳源。由于不同菌种代谢能力不同,对碳源的利用存在差异,导致不同菌种对各种外源碳源的适应性可能有所区别^[7]。目前,关于铁皮石斛专用生物菌肥的相关报道较少。本研究通过探索铁皮石斛共生真菌对不同外源碳源的适应性,进而筛选出适宜的外源碳源,为制备铁皮石斛菌根菌剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试碳源:蔗糖、葡萄糖、淀粉、麦芽糖。

供试菌种:铁皮石斛共生真菌 001、002、003,保存于江苏农林职业技术学院生物工程技术中心。

1.2 培养基制备

1.2.1 固体培养基 固体基础培养基(PDA):马铃薯 200 g、琼脂 15 g,酸碱度自然,水 1 000 mL^[8]。将供试外源碳源蔗糖、葡萄糖、淀粉和麦芽糖分别加入基础培养基中,制成添加不同外源碳源的培养基。其中,每种碳源设 5 个浓度梯度:依次为 1%、2%、3%、4%、5%;同时,每个梯度各设 3 次重复^[9]。将制备好的培养基分装于 150 mL 三角瓶中,然后进行湿热灭菌(121 ℃,20 min)。

1.2.2 液体培养基 液体基础培养基(PD):马铃薯 200 g、酸碱度自然,水 1 000 mL^[8]。不同外源碳源的添加方式和浓度梯度设置与以上固体培养基的制备方法相同。

1.3 铁皮石斛共生真菌的人工接种及培养

将制备好的添加不同外源碳源的培养基倒在培养皿内(直径 90 mm),约 15 mL/皿;用灭菌的打孔器(直径 4 mm)将预先在 PDA 上培养好的菌种打成菌饼,接种到 PDA 平板中央和液体培养基中,黑暗培养 7 d(27 ℃,PRX-250A 智能人工气候箱)。

1.4 测量方法

1.4.1 菌落生长速度 根据“1.3”节的操作步骤,黑暗培养 7 d 后,测量共生真菌在固体培养基上的菌落直径,作为衡量菌落生长速度的参考指标。每种处理设 5 个重复。

1.4.2 菌丝体干质量 根据“1.3”节的操作步骤,黑暗培养 7 d 后,将液体培养基中的菌丝体取出,烘干后称质量,作为衡量菌丝干质量的参考指标(60 ℃,24 h,DGG-9240 型电热恒温鼓风干燥箱)。

2 结果与分析

2.1 不同外源碳源对铁皮石斛共生真菌菌落的影响

研究发现,在人工培养过程中,铁皮石斛共生真菌对 4 种供试外源碳源都可利用,但菌落的生长速度不同。其中,001 菌株在添加蔗糖、葡萄糖的培养基中,生长较好,菌落最大直径分别为 7.18、7.27 cm;在添加淀粉的培养基中生长最差,最大菌落直径仅为 5.71 cm;002 菌株在添加蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉的培养基中均生长较好,菌落最大直径均为 9.00 cm;003 菌株在添加蔗糖、葡萄糖和麦芽糖的培养基中生长较好,最大菌落直径均超过 8.80 cm,而在添加淀粉的培养基中生长稍差,最大菌落直径仅为 8.10 cm(表 1)。

综合以上结果,3 种铁皮石斛共生真菌在添加蔗糖、葡萄糖的培养基上生长状况均较好,菌落直径较大。因此,蔗糖、葡萄糖为适用于铁皮石斛共生真菌的外源碳源。

2.2 不同外源碳源对铁皮石斛共生真菌菌丝干质量的影响

研究发现,在液体振荡培养过程中,铁皮石斛共生真菌对 4 种供试碳源都可利用,但碳源差异对铁皮石斛共生真菌菌丝干质量的影响较大。在添加蔗糖、麦芽糖的培养基中进行人工培养时,3 种供试真菌的菌丝体干质量均有一定优势;而在添加葡萄糖、淀粉的培养基中进行人工培养时,各供试共生真菌的菌丝体干质量明显较低。其中,001 菌株在添加蔗糖、

收稿日期:2016-06-01

基金项目:江苏省科技支撑计划(编号:BE2014385);江苏农林职业技术学院科技创新团队项目(编号:2015kj036)。

作者简介:徐超(1979—),男,博士,副研究员,长期从事铁皮石斛等植物共生菌的相关研究。E-mail:cxu8888@126.com。

通信作者:席刚俊,男,助理研究员,主要从事铁皮石斛栽培技术研究。E-mail:xigangjun@163.com。

表 1 碳源对共生真菌菌落生长的影响

菌株号	碳源	菌落直径 (cm)				
		浓度 1%	浓度 2%	浓度 3%	浓度 4%	浓度 5%
001	蔗糖	3.25 ± 0.25f	4.82 ± 0.15d	6.20 ± 0.31b	7.12 ± 0.23a	7.18 ± 0.23a
	葡萄糖	4.15 ± 0.10e	5.64 ± 0.13c	5.70 ± 0.21c	7.01 ± 0.22a	7.27 ± 0.30a
	麦芽糖	4.19 ± 0.08e	4.78 ± 0.11d	4.90 ± 0.11d	5.71 ± 0.19c	6.55 ± 0.31b
	淀粉	3.72 ± 0.32f	4.77 ± 0.20d	5.10 ± 0.22d	5.57 ± 0.14c	5.71 ± 0.24c
002	蔗糖	8.81 ± 0.17a	9.00 ± 0.00a	9.00 ± 0.00a	9.00 ± 0.00a	9.00 ± 0.00a
	葡萄糖	8.31 ± 0.21b	8.86 ± 0.12a	9.00 ± 0.00a	9.00 ± 0.00a	9.00 ± 0.00a
	麦芽糖	8.13 ± 0.09b	8.38 ± 0.18b	8.56 ± 0.14b	8.94 ± 0.03a	9.00 ± 0.00a
	淀粉	7.38 ± 0.14c	8.50 ± 0.22b	8.69 ± 0.30b	8.81 ± 0.12a	9.00 ± 0.00a
003	蔗糖	7.63 ± 0.23d	7.75 ± 0.32	8.21 ± 0.32b	8.94 ± 0.06a	8.94 ± 0.04a
	葡萄糖	7.73 ± 0.24d	8.16 ± 0.23c	8.40 ± 0.21b	8.55 ± 0.31b	8.94 ± 0.02a
	麦芽糖	7.05 ± 0.30e	7.33 ± 0.24d	7.86 ± 0.18c	8.41 ± 0.24b	8.85 ± 0.10a
	淀粉	7.08 ± 0.26e	7.11 ± 0.50e	7.18 ± 0.25e	8.04 ± 0.31c	8.10 ± 0.32c

注:同列数值后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下表同。

麦芽糖的培养基中进行人工培养时,生长状况均较良好,菌丝体的最大干质量均在 0.50 g/皿左右,最适浓度为 5%,而在添加葡萄糖、淀粉的培养基中进行人工培养时,菌丝体的最大干质量均低于 0.40 g/皿;002 菌株在添加蔗糖、麦芽糖的培养基中进行人工培养时,菌丝体最大干质量均超过 0.25 g/皿,最适浓度为 1%。003 菌株在添加蔗糖、麦芽糖的

培养基中进行人工培养时,菌丝体的最大干质量均接近 0.7 g/皿,最适浓度为 4%,而在添加葡萄糖、淀粉的培养基中进行人工培养时,最大干质量均不足 0.5 g/皿(表 2)。 综上可见,3 种铁皮石斛共生真菌在添加蔗糖、葡萄糖的培养基中进行人工培养时,共生真菌的菌丝干质量均较大。因此,蔗糖、葡萄糖为适用于铁皮石斛共生真菌生长的碳源。

表 2 碳源对共生真菌菌丝体干质量的影响

菌株号	碳源	菌丝平均干质量 (g/皿)				
		浓度 1%	浓度 2%	浓度 3%	浓度 4%	浓度 5%
001	蔗糖	0.28 ± 0.020c	0.31 ± 0.011c	0.37 ± 0.012b	0.43 ± 0.015b	0.49 ± 0.013a
	葡萄糖	0.14 ± 0.015e	0.23 ± 0.012d	0.33 ± 0.010c	0.33 ± 0.009c	0.37 ± 0.014b
	麦芽糖	0.11 ± 0.008e	0.21 ± 0.010d	0.37 ± 0.012b	0.45 ± 0.012a	0.51 ± 0.012a
	淀粉	0.21 ± 0.010d	0.25 ± 0.008d	0.28 ± 0.011c	0.32 ± 0.008c	0.30 ± 0.008c
002	蔗糖	0.26 ± 0.013b	0.19 ± 0.011b	0.18 ± 0.010b	0.12 ± 0.013c	0.10 ± 0.008c
	葡萄糖	0.20 ± 0.015b	0.20 ± 0.013b	0.16 ± 0.011c	0.14 ± 0.009c	0.13 ± 0.004c
	麦芽糖	0.35 ± 0.021a	0.34 ± 0.020a	0.25 ± 0.013b	0.21 ± 0.008b	0.06 ± 0.002d
	淀粉	0.22 ± 0.012b	0.25 ± 0.015b	0.32 ± 0.018a	0.25 ± 0.006b	0.21 ± 0.010b
003	蔗糖	0.21 ± 0.006e	0.24 ± 0.009d	0.52 ± 0.010b	0.66 ± 0.008a	0.45 ± 0.016c
	葡萄糖	0.25 ± 0.013d	0.26 ± 0.008d	0.31 ± 0.007d	0.40 ± 0.008c	0.49 ± 0.005b
	麦芽糖	0.26 ± 0.012d	0.44 ± 0.009c	0.55 ± 0.008b	0.67 ± 0.009a	0.52 ± 0.006b
	淀粉	0.16 ± 0.009e	0.20 ± 0.006e	0.26 ± 0.006d	0.33 ± 0.004d	0.41 ± 0.003c

3 结论与讨论

通过对铁皮石斛共生真菌的菌落生长速度和菌丝体干质量进行测定,发现在以蔗糖作为碳源时,铁皮石斛共生真菌的生长速度和菌丝干质量均较优;当以葡萄糖作为碳源时,虽然菌落生长较快,但生长势较弱,菌丝干质量相对较低,这可能和菌种间的差异性有关。此外,与蔗糖相比,麦芽糖、葡萄糖的价格相对较高。综合以上因素,确定蔗糖为适用于铁皮石斛共生真菌的外源碳源。 目前,铁皮石斛的组培技术基本成熟,但其组培苗移栽成活率低、生长缓慢,可能与缺少共生真菌有关^[10-11]。在铁皮石斛人工栽培过程中,优良菌根菌剂的使用不仅对铁皮石斛存活率具有显著影响,对其产量的提高、抗旱性的增强也具有至关重要的作用^[12];同时,共生真菌形成优势菌群后,释放的拮抗物质可阻止其他病原菌侵入植物体内,大大减轻植物感

染病害的风险^[13]。陈海荣等研究发现,在紫云英根瘤菌培养基的选择与优化过程中,无机碳源中蔗糖和甘露醇为比较理想的碳源,表明不同真菌的培养条件既有共性,也有菌株个性,对相同碳源的吸收和利用率不尽相同,对不同碳源的吸收效果也存在较大差异^[14]。因此,在铁皮石斛的人工栽培过程中,使用优良的菌根菌剂是有益的;但在进行菌根真菌扩繁和菌剂制备时,为了提高菌剂生产效率,降低生产成本,预先进进行菌根真菌培养条件的筛选和优化^[10],逐步筛选经济、实用、高效的基质配方是十分必要的,也是必不可少的试验内容。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 19 卷[M]. 北京:科学出版社,1999:117.
[2] 崔 虹,宋希强. 菌根真菌对春石斛幼苗生长发育的影响[J]. (下转第 192 页)

3.3 温度对日本沼虾胁迫能力的影响

青虾适宜水温在 18 ℃ 以上,最适温度为 22 ~ 29 ℃^[18]。有研究表明,其日摄入能量主要受水温和体质量影响,对体质量为 0.647 ~ 5.128 g 的日本沼虾在 15、20、25、30 ℃ 下的能量收支研究表明,随着水温的提高,时摄食量占体质量的比例平均由 2.9% 升至 13.6%^[19]。也有研究表明,日本沼虾幼虾培养在高温的条件下个体较培养在低温的个体摄食强度高,28 ℃ 青虾幼体不但生长速度快而且成活率高^[20]。本研究发现,随着温度的升高,日本沼虾的成活率先保持 100% 后开始逐步下降,B7 组日本沼虾成活率与其他各组间存在明显差异,这主要是由于过高的温度不利于日本沼虾的生长存活。随着温度的升高,克氏原螯虾幼虾的存活率呈先降低再升高的趋势,说明早期随着温度的升高,日本沼虾摄食强度、活动范围进一步增大,对克氏原螯虾幼虾的胁迫进一步加大,在 B5 组条件下幼虾成活率最低,B5 组与 B6 组差异不明显,但与其他各组差异均明显,在 24 ℃ 日本沼虾对克氏原螯虾幼虾胁迫程度最大。从 B6 组开始克氏原螯虾幼虾成活率逐步上升,说明后期日本沼虾对克氏原螯虾幼虾的胁迫程度开始逐步下降。胁迫程度的下降主要是由于随着温度的不断升高,环境温度逐步超过日本沼虾最适生活温度,日本沼虾活动摄食强度以及成活率逐步下降,推测水族箱中的日本沼虾数量变少由两者共同影响造成。

由本试验可以看出,日本沼虾对克氏原螯虾幼虾,特别是没有母体保护的幼虾胁迫程度较大,在自然环境中克氏原螯虾抱幼虾可以在洞穴中躲避预防其他敌害的攻击,但由于试验中未设置克氏原螯虾抱幼虾有效的躲避空间,日本沼虾对克氏原螯虾抱幼虾躲避状态下的胁迫程度有待进一步研究。目前,许多地方正开展克氏原螯虾与日本沼虾轮养混养模式的探索,如何有效减少其相互间的胁迫程度,降低其种内及种间竞争行为是取得养殖成功的关键。

参考文献:

- [1] 夏爱军,唐建清. 克氏原螯虾现状分析与研究思路[J]. 水产养殖,2006,27(6):9-10.
- [2] Huner J V. Overview of international and domestic freshwater crawfish production[J]. Journal of Shellfish Research, 1989, 8(1):259-265.
- [3] 王卫民. 软壳克氏原螯虾在我国开发利用的前景[J]. 水生生物
- (上接第 148 页)
- 西南林业大学学报,2011,31(2):20-23,32.
- [3] 赵冬青. 铁皮石斛[J]. 农业知识,2008(19):1.
- [4] 杨一令,来平凡,蒋士鹏. 铁皮石斛的研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(1):82-85.
- [5] 金辉,许忠祥,陈金花,等. 铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养过程中的相互作用[J]. 植物生态学报,2009,33(3):433-441.
- [6] 唐凤. 铁皮石斛的种质保存及其与共生真菌关系的初探[D]. 南京:南京师范大学,2005.
- [7] 王美琴,陈俊美,李新风. 不同碳、氮源对番茄两种内生真菌菌丝生长的影响研究[J]. 山西农业科学,2008,36(11):75-77.
- [8] 李静,吴卫东. 紫铜色松乳菇栽培培养基配方筛选的研究[J].

- 学报,1999,23(4):375-381.
- [4] 郑友,胡火根,唐建清,等. 不同水域克氏原螯虾群体的形态差异分析[J]. 南昌大学学报(理科版),2014,38(1):96-102.
- [5] 彭刚,刘伟杰,李佳佳,等. 长江流域 3 个克氏原螯野生群体遗传结构的微卫星分析[J]. 江苏农业学报,2010,26(5):1115-1117.
- [6] 于宁,朱站英,冯文和,等. 克氏原螯虾饲料最适能量蛋白质比[J]. 动物营养学报,2014,26(4):1111-1119.
- [7] 丁正峰,薛晖,夏爱军,等. 白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行研究[J]. 南京农业大学学报,2008,31(4):129-133.
- [8] 朱凤兵,文执信,侯玉兰. 中华绒螯蟹、克氏原螯虾混养模式下饵料结构与养殖环境优化技术的研究[J]. 科学养鱼,2014(8):67-68.
- [9] 章文敏,周颖,李万祈. 克氏原螯虾与青虾池塘生态轮养技术模式[J]. 中国水产,2012(7):56-57.
- [10] 严维辉,蔡建忠,唐玉华. 利用克氏原螯虾的生活习性提高养殖效益[J]. 水产养殖,2009(7):3-4.
- [11] 陈婷,郭建英,唐建清,等. 克氏原螯虾在洞穴和角落生境下生长差异及生存策略分析[J]. 南京大学学报(自然科学版),2011,47(5):635-641.
- [12] 熊青海,陈婷,郭建英,等. 3 种生境下克氏原螯虾与中华绒螯蟹竞争的研究[J]. 2012,31(3):147-151.
- [13] Figler M H, Blank G S. Maternal territoriality as an offspring defense strategy in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) [J]. Aggressive Behavior, 2001, 27(5):391-403.
- [14] 方春林,邓勇辉,余智杰,等. 克氏原螯虾生物学特性的研究[J]. 江西水产科技,2010(3):18-20.
- [15] 周元军. 青虾生态养殖技术[J]. 中国动物保健,2002(1):30-31.
- [16] 宋长太. 青虾的捕捞、暂养和运输[J]. 内陆水产,1997(10):24.
- [17] 赵继民,余开,周燕侠. 青虾主养池种植高秆水稻增产增效[J]. 科学养鱼,2015(6):16-17.
- [18] 秦玉丽. 青虾的苗种繁育及增产技术[J]. 现代农业科技,2005(12):61-62.
- [19] 董双林,堵南山. 日本沼虾生理生态学研究:Ⅱ. 温度和体重对能量收支的影响[J]. 海洋与湖沼,1994,25(3):238-242.
- [20] 邢克智,王金华. 温度、盐度对青虾幼体生长发育的影响[J]. 南开大学学报(自然科学版),1997,30(3):88-93.
- 北方园艺,2009(12):233-235.
- [9] 李文艺,刘建成. 不同培养基对松乳菇菌丝生长的影响[J]. 食用菌,2004(4):10-11.
- [10] 徐超,范克胜,张红岩,等. 铁皮石斛菌根真菌离体培养条件初探[J]. 林业科技开发,2013,27(4):96-98.
- [11] 吴慧凤,宋希强,胡美姣. 铁皮石斛内生真菌的筛选与鉴定[J]. 西南林业大学学报,2011,31(5):48-52.
- [12] 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.
- [13] 陈瑞蕊,林先贵,施亚琴. 兰科菌根的研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2003,9(1):97-101.
- [14] 陈海荣,郭照辉,刘前刚,等. 紫云英根瘤菌培养基的选择与优化[J]. 湖南农业科学,2011(1):13-15.