

萝卜对土生空团菌菌丝生长的影响

曹凤娟¹ 姚庆智^{1*} 闫伟²

(1. 内蒙古农业大学 生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 内蒙古农业大学 林学院 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: 纯培养条件下, 测定了十字花科植物萝卜(*Raphanus sativus* L.)种子、幼苗、根系分泌物及幼苗提取物对土生空团菌[*Cenococcum geophilum* Fr. (Cg)]菌株 CgSO1、CgSB2、CgO5、SPOP2 和 Cg5#菌株生长的影响。结果表明供试 Cg 菌株与萝卜种子共培养, 或将萝卜根系分泌物和幼苗提取物加入到培养基中, 均促进了 Cg 菌丝生长。高温灭菌处理使萝卜根系分泌物和幼苗提取物对 Cg 菌株的促生作用更强, 而高温灭菌后的萝卜幼苗段对菌株生长影响不大。其中经高温灭菌处理的幼苗水提取物对 5 菌株的促生作用最大, CgSO1、CgSB2、CgO5、SPOP2 和 Cg5#每菌落的菌丝干重分别达到: 54.8、45.8、63.9、41.2 和 50.5 mg。

关键词: 土生空团菌, 菌丝, 萝卜, 促生作用

Influence of *Raphanus sativus* L. on the mycelium growth of *Cenococcum geophilum* Fr.

CAO Feng-Juan¹ YAO Qing-Zhi^{1*} YAN Wei²

(1. College of Life Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China)

(2. College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010019, China)

Abstract: The influence of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds, seedlings, root exudates, and seedling extracts on the mycelium growth of *Cenococcum geophilum* Fr. (Cg) was investigated *in vitro*. The mycelium growth of Cg strains (CgSO1, CgSB2, CgO5, SPOP2 and Cg5#) was promoted, when Cg strains were co-cultured with radish seedlings, or cultured with root exudates, and water extract of radish seedlings. However, Cg mycelium growth was significantly improved by the autoclaved (treated under high temperature) root exudates or autoclaved water extract of radish seedlings, while the autoclaved seedlings segments did not. Results showed that the maximum mycelium dry biomass of the 5 strains of Cg was given in the medium added the autoclaved water extract of the seedlings. The single colony dry maximum biomass of each Cg strain (CgSO1, CgSB2, CgO5, SPOP2 and Cg5#) was reached to 54.8, 45.8, 63.9, 41.2 and 50.5 mg respectively.

基金项目: 内蒙古教育厅基金项目(No. NJ09055)

* 通讯作者: Tel: 86-471-4304545; 信箱: yaoqingzhi@163.com

收稿日期: 2010-11-01; 接受日期: 2011-03-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Keywords: *Cenococcum geophilum* Fr., Mycelium, *Raphanus sativus* L., Growth-promoting

土生空团菌(*Cenococcum geophilum* Fr., Cg)属子囊菌亚门(Ascomycotina), 大团囊菌科(Elaphomycetaceae)、空团菌属(*Cenococcum*), 菌丝黑色, 主要以菌丝体和菌核结构存在, 极少形成有性结构^[1], 是自然界最为常见的外生菌根真菌之一。Cg 寄主范围非常广泛, 几乎与所有已知的外生菌根植物形成菌根, 还与许多内生菌根植物和草本植物形成菌根^[2-3]。Cg 具有突出的抗旱性和抗贫瘠能力, 在含水量低的土壤中及在各种恶劣生境条件下常成为优势种群^[4-6]。据报道本属在全球各地都有分布, 中国有着丰富的 Cg 资源, 在内蒙古及西部地区植被恢复中发挥着巨大作用, 为内蒙古地区具有开发应用潜力的菌根真菌^[7]。由于 Cg 存在很宽的生理变幅, 不同菌株的生长速度、最佳生长温度、pH 适应范围及耐旱能力差异极大。所以到目前为止 Cg 菌株的实验室扩繁条件仍未攻克^[8]。因此对 Cg 优良菌株的筛选和扩繁技术的深入研究, 对菌根生物应用技术的推广具有重要的科学意义。

十字花科植物(Brassicaceae)是重要的一类蔬菜作物, 在这一类植物中从未发现过功能性的菌根共生体^[9]。硫代葡萄糖甙(GLSs)是十字花科植物所特有的 β -D-硫葡萄糖苷类物质, 相对无毒。然而, 当十字花科植物受到机械损伤后, 这种化合物在芥子酶的催化下生成具有活性的水解产物异硫氰酸酯(ITCs)^[10]。长期以来, 人们都熟知异硫氰硫代葡萄糖酸盐类的存在使十字花科植物能够抵御菌根真菌的侵入^[11-12]。然而, 现已有报道, 在实验室纯培养中, 十字花科植物能促进外生菌根真菌卷伞菌 [*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.] 及彩色豆马勃 [*Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cooke et Couch] 菌丝的生长, 并且促进生长的主要物质是根分泌的吲哚硫代葡萄糖苷的水解产物^[13]。

那么, 为了验证十字花科植物根分泌物对外生菌根真菌 Cg 的生长是否有影响, 依据文献报道^[10], 选择卷心菜(*Brassica oleracea* L.)、芜菁甘蓝 [*Brassica napobrassica* (L.) Mill.]、芥菜 [*Brassica*

junceae (L.) Czern. et Coss.]、白菜 [*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.] 和萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 为试验材料进行了预试验, 结果显示只有萝卜对 Cg 菌丝具有促生作用。因此本研究选择萝卜为试验材料, 对萝卜根系分泌物对 Cg 菌丝的促生作用进行研究, 为 Cg 菌根生物应用技术的推广奠定理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

萝卜 *Raphanus sativus* L. 种子, 品种是奥春白萝卜, 购于种子站。土生空团菌 *Cenococcum geophilum* Fr. 菌株: CgSO1 分离于虎榛子 *Ostryopsis davidiana* Decaisne. 根围土中的 Cg 菌核; CgO5 分离于虎榛子菌根组织; CgSB2 分离于白桦 *Betula Platyphylla* Suk. 根围土中的 Cg 菌核; SPOP2 分离于山杨 *Populus davidiana* Dode. 根围土中的 Cg 菌核; Cg5# 从法国引进。

1.2 方法

1.2.1 种子表面消毒: 萝卜种子用温水浸泡 24 h 后, 超净台中用 30% H_2O_2 消毒 8 min, 无菌水冲洗 3 遍。

1.2.2 培养方法: 真菌培养方法: 采用 Pachlewski (简称 Pach) 培养基^[14]进行平板培养。选择生长 25 d 的固体菌种, 用无菌打孔器在菌落边缘截取菌种进行接种, 置 25 °C 恒温培养箱中培养 30 d。

无菌发芽种子培养方法: 配制水琼脂培养基, 灭菌后制作培养基平板, 将已表面消毒的种子置于平板中, 25 °C 恒温培养箱中催芽。

1.2.3 萝卜对 Cg 菌株菌丝生长的影响: (1) 萝卜和 Cg 菌株共培养对菌丝生长的影响。在培养基平板中接入真菌, 同时按照 3 粒种子/真菌菌落的方式放置生长 2 d 的萝卜种子, 对照不放种子。每个处理均为 3 个重复, 置 25 °C 恒温培养箱中培养 30 d 后测定每个平板中单菌落菌丝干重。

(2) 萝卜根系分泌物对 Cg 菌株菌丝生长的影

响。处理 1: 制作 Pach 培养基平板, 接入 6 粒无菌萝卜种子, 25 °C 恒温培养箱中培养 30 d 后无菌条件下取出萝卜幼苗, 平板直接用于接种 Cg 菌株; 处理 2: 制作 Pach 培养基平板, 接入 6 粒无菌萝卜种子, 25 °C 恒温培养箱中培养 30 d 后取出萝卜幼苗, 收集培养基, 1.0×10^5 Pa 灭菌 15 min, 制作培养基平板用于接种 Cg 菌株; 对照为未放置过种子的 Pach 培养基。在以上 3 种培养基中分别接入供试的 5 个 Cg 菌株, 每个处理均为 3 个重复, 置 25 °C 恒温培养箱中培养 30 d 后测定每个平板中单菌落菌丝干重。

(3) 萝卜幼苗提取物对 Cg 菌株菌丝生长的影响。称取培养 30 d 的萝卜幼苗 6 g, 加入 50 mL 水, 用研钵研磨 5 min 后低速离心 5 min, 上清液(即提取液)用蒸馏水定容到 100 mL。处理 1: 配制含 50 mL 提取液的 Pach 培养基 200 mL, 其中提取液需经过滤($0.45 \mu\text{m}$ 滤菌器)除菌后再加入已灭菌的培养基中, 制作培养基平板; 处理 2: 配制含 50 mL 提取液的 Pach 培养基 200 mL, 灭菌后制作培养基平板; 处理 3: 配制含 3 g 萝卜幼苗(剪成 1 cm 长的小段)的 Pach 培养基 200 mL, 灭菌后制作培养基平板; 对照

为 Pach 培养基。以上培养基中分别接入 5 株 Cg 菌株, 每个处理均为 3 个重复, 放于 25 °C 培养箱中培养 30 d 后测定每个平板中单菌落菌丝干重。

1.3 测量和分析方法

干重法测量菌丝生物量。将真菌单菌落从培养基中取出, 在沸水中将残留的培养基溶化、洗去, 蒸馏水冲洗数次后, 在 80 °C 恒温条件下烘干至恒重^[15]。

使用 Microsoft Excel 2003 及 SPSS 统计分析软件对数据进行分析。

2 结果

2.1 萝卜种子和 Cg 菌株共培养对菌丝生长的影响

萝卜种子和 Cg 菌株共培养使 Cg 菌株菌丝生长速率均明显大于对照(图 1)。萝卜种子发芽及生长过程明显促进了 Cg 菌株菌丝的生长, 菌丝干重与对照相比差异显著($P < 0.01$)。CgSO1、CgSB2、CgO5、SPOP2 和 Cg5# 的单菌落菌丝干重分别增加了 10.89%、13.62%、13.13%、17.83%和 30.03% (图 2)。

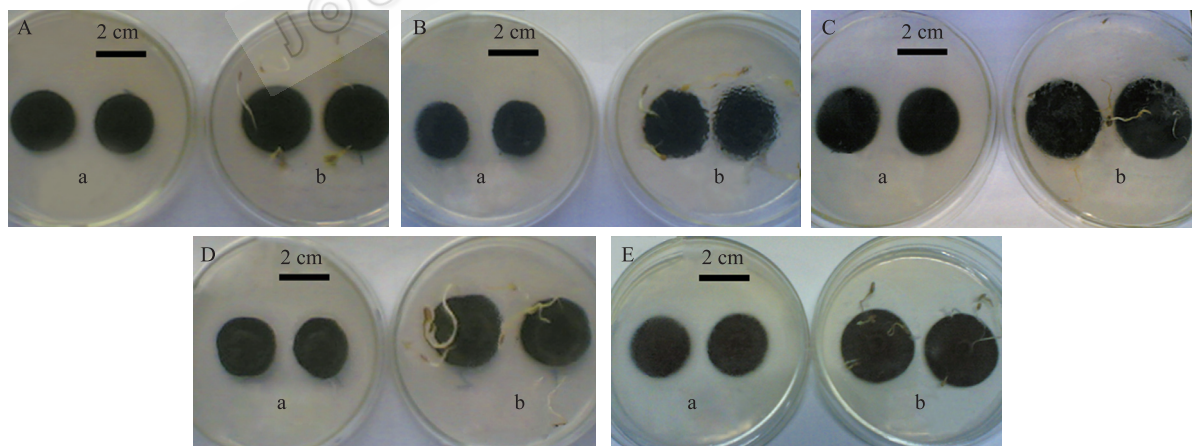


图 1 与萝卜共培养条件下 5 株土生空团菌菌落形态

Fig. 1 The colony of the 5 strains of *C. geophilum* Fr. under the conditions of *C. geophilum* Fr. co-culture with *R. sativus* L. 注: A: CgSO1; B: CgSB2; C: CgO5; D: SPOP2; E: Cg5#. a: CK; b: 试验组.

Note: A: CgSO1; B: CgSB2; C: CgO5; D: SPOP2; E: Cg5#. a: Control; b: Test groups.

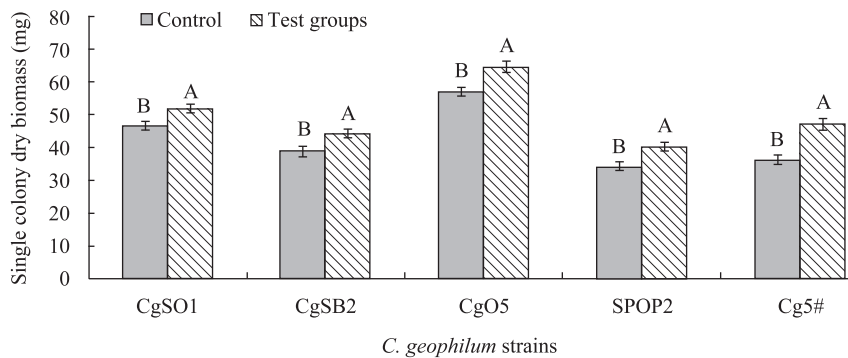


图 2 萝卜与土生空团菌菌株共培养对菌丝生长的影响

Fig. 2 Effects of co-culture with *R. sativus* L. on the mycelium growth of *C. geophilum* Fr.

注: 数据为平均值±标准误差(n=3), 柱形图上不同字母表示处理间差异显著(P<0.01).
Note: Values are mean±standard error (n=3), Significant difference (P<0.01) among treatments in each group are indicated by different letters above bars.

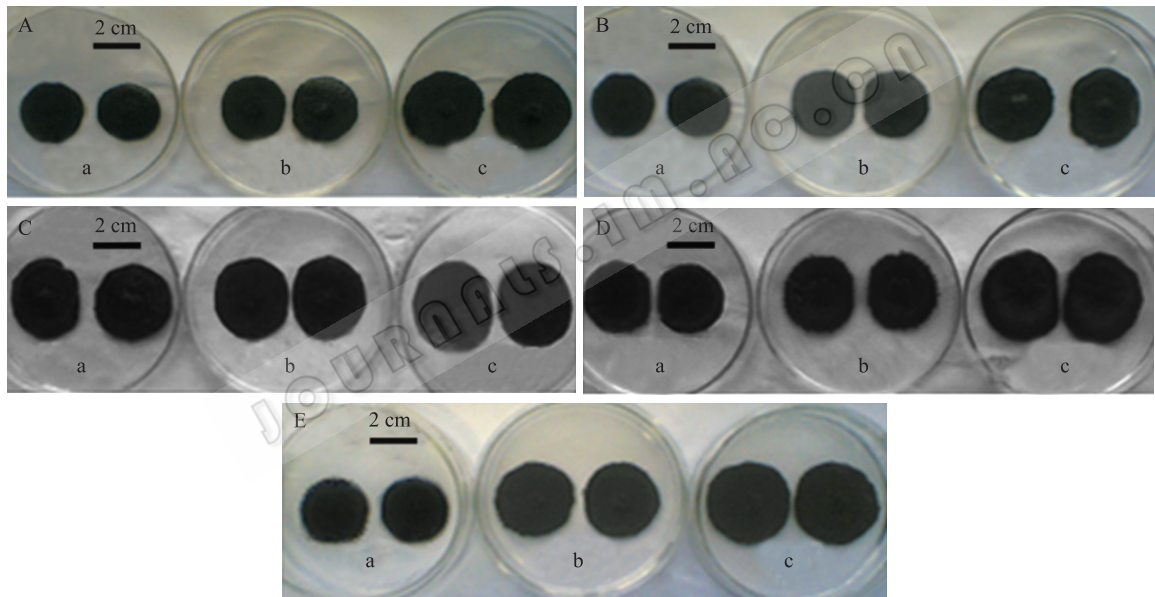


图 3 培养基中加入根系分泌物条件下 5 株土生空团菌菌落形态

Fig. 3 The colony of the 5 strains of *C. geophilum* Fr. under the conditions of the medium added the root exudates

注: A: CgSO1; B: CgSB2; C: CgO5; D: SPOP2; E: Cg5#. a: CK; b: 未高温灭菌根系分泌物; c: 高温灭菌根系分泌物.
Note: A: CgSO1; B: CgSB2; C: CgO5; D: SPOP2; E: Cg5#. a: Control; b: Non-autoclaved root exudates; c: Autoclaved root exudates.

2.2 萝卜根系分泌物对 Cg 菌株菌丝生长的影响

萝卜根系分泌物明显促进了 Cg 菌株菌丝生长, 而经高温灭菌的萝卜根系分泌物对菌株的促生作用更强(图 3)。与对照相比, 在加入未高温灭菌分泌物的培养基中, CgSO1、CgSB2、CgO5、SPOP2 和 Cg5# 的单菌落菌丝干重分别增加了 4.5%、5.31%、

3.94%、12.05%和 11.36%; 在加入高温灭菌分泌物的培养基中, 五菌株单菌落菌丝生物量分别增加了 13.41%、12.76%、8.05%、23.19%和 34.79% (图 4)。这些结果表明, 萝卜根系分泌物对 Cg 菌株菌丝的生长有促进作用, 而且将根系分泌物高温灭菌后, 增加了其促生长物质的活性。

2.3 萝卜幼苗提取物对 Cg 菌株菌丝生长的影响

萝卜幼苗提取物明显促进了 5 株 Cg 菌株菌丝的生长, 而且提取物高温灭菌后同样能够促进菌丝生长(图 5)。与对照相比, 在加入未经高温灭菌提取物的培养基中, CgSO1、CgSB2、CgO5、SPOP2 和 Cg5# 的单菌落菌丝干重分别增加了 17.6%、16.6%、

10.5%、21.88%和 31.55%, 与对照相比均差异显著 ($P<0.01$); 在加入高温灭菌提取物的培养基中, 5 菌株单菌落菌丝干重分别增加了 21.23%、18.96%、12.3%、25.22%和 35.02%, 与对照相比均差异显著 ($P<0.01$)。但高温灭菌后的萝卜幼苗对 Cg 菌株菌丝生长的影响不显著(图 6)。

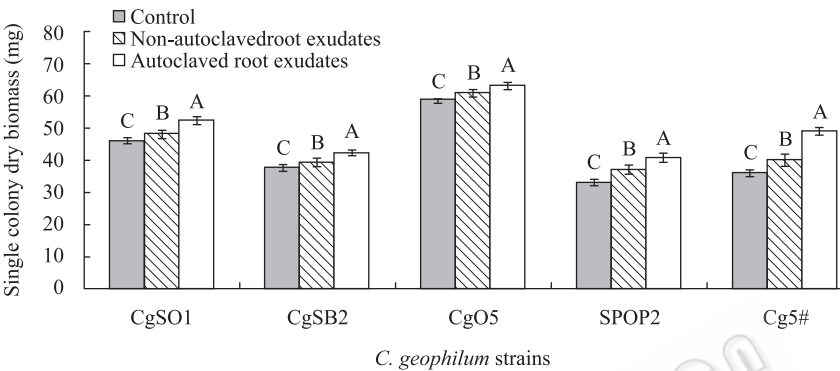


图 4 萝卜根系分泌物对土生空团菌菌丝生长的影响

Fig. 4 Effects of root exudates of *R. sativus* L. on the mycelium growth of *C. geophilum* Fr.

注: 数据为平均值±标准误差($n=3$), 柱形图上不同字母表示处理间差异显著($P<0.01$).
Note: Values are mean±standard error ($n=3$), significant difference ($P<0.01$) among treatments in each group are indicated by different letters above bars.

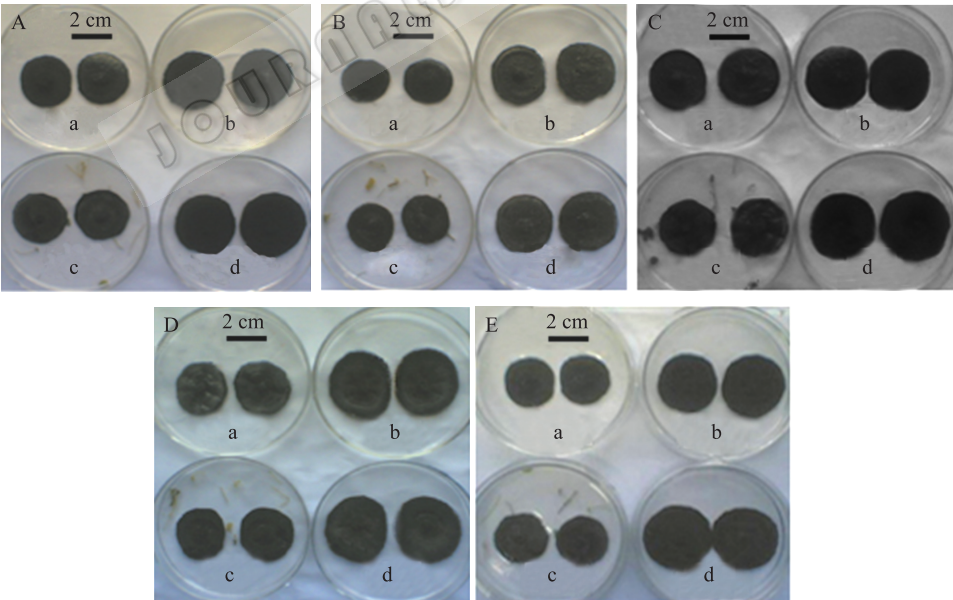


图 5 培养基中加入幼苗水提取物条件下 5 株土生空团菌菌落形态

Fig. 5 The colony of the 5 strains of *C. geophilum* Fr. under the conditions of the medium added the water extract of seedlings

注: A: CgSO1; B: CgSB2; C: CgO5; D: SPOP2; E: Cg5#. a: CK; b: 未高温灭菌幼苗水提取物; c: 高温灭菌的幼苗段; d: 高温灭菌幼苗水提取物.

Note: A: CgSO1; B: CgSB2; C: CgO5; D: SPOP2; E: Cg5#. a: Control; b: Non-autoclaved water extract of seedlings; c: Autoclaved segments of seedlings; d: Autoclaved water extract of seedlings.

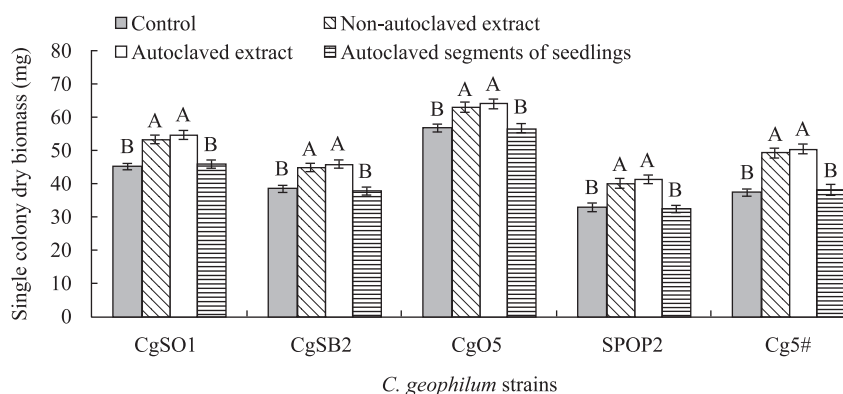


图6 萝卜幼苗水提取物和高温灭菌幼苗段对土生空团菌菌丝生长的影响

Fig. 6 Effects of the water extract of *R. sativus* L. seedlings and the autoclaved segments of seedlings on the mycelium growth of *C. geophilum* Fr.

注: 数值是平均值±标准误差($n=3$), 柱形图上不同字母表示处理间差异显著($P<0.01$).

Note: Values are mean±standard error ($n=3$), significant difference ($P<0.01$) among treatments in each group are indicated by different letters above bars.

3 结论与讨论

萝卜种子发芽及生长过程明显促进了 *Cg* 菌株菌丝的生长(图 1, 图 2), 据此可以推断萝卜种子发芽及生长过程能够分泌一种或几种物质刺激 *Cg* 菌丝的生长。已有研究证实十字花科植物所分泌的 β -D-硫葡萄糖苷类物质硫代葡萄糖甙(GLSs)的水解产物能够促进菌根真菌卷伞菌及彩色豆马勃菌丝的生长^[13], 那么, 促进 *Cg* 生长的物质可能也是 GLSs 的水解产物, 有待进一步研究证实。

萝卜根系分泌物在高温处理前后能够促进 *Cg* 的生长(图 3, 图 4), 而且高温处理后的分泌物对真菌的促生作用更大。这表明促生长物质耐高温, 而且在高温条件下分泌物能产生促生作用更强的物质, 其作用机理值得探索。

本试验结果还表明, 高温处理和未高温处理的幼苗水提取物都能够促进真菌生长, 而萝卜幼苗段不能促进真菌的生长。在完整的十字花科植物中, GLS 存在于细胞的液泡中, 黑芥子酶存在于细胞质中的各种膜上, 夜间 GLSs 常在芥子酶催化下形成具有活性的水解产物, 机械损伤也能使 GLSs 与芥子酶相遇而发生水解反应^[16]。而本试验幼苗生长过程中产生的分泌物已挥发, 因此幼苗只含有 GLSs, 而高温使芥子酶失活, 不能催化 GLSs 水解; 机械磨

碎萝卜幼苗后, GLSs 和芥子酶混合发生反应, GLSs 被水解。可见, 刺激真菌生长的是 GLSs 的水解产物, 而高压灭菌并不影响这些水解产物的活性。

部分植物分泌物能够促进菌根真菌的生长速率, 这些分泌物中有效的化合物被称为“M-factor”, 它的化学成分并不确定^[13]。近年来, 也有研究表明植物根系未知分泌物可以促进土壤真菌的繁殖^[17-18]。目前已经发现了一些 M-factor^[13], 这些化学物质可以应用于菌根真菌的大量扩繁。因此, 研究发现更多的 M-factor 对真菌的大量生产有重要意义。本研究表明十字花科植物萝卜在生长过程中能够产生明显促外生菌根真菌生长的 M-factor, 这些 M-factor 可能是 GLSs 的水解产物。因此, 在生产实践中可以将萝卜根系分泌物及其幼苗提取物作为促生长物质加入到培养基中, 为 *Cg* 的大量扩繁提供一种可行的途径。

参考文献

- [1] Fernandez-Toiran LM, Agueda B. Fruitbodies of *Cenococcum geophilum*[J]. Mycotaxon, 2007, 100: 109-114.
- [2] Allen MF. The Ecology of Mycorrhizae[M]. New York: Cambridge University Press, 1991: 1-8, 113-118.
- [3] Vohník M, Fendrych M, Albrechtová J, et al. Intracellular colonization of *Rhododendron* and *Vaccinium* roots by

- Cenococcum geophilum*, *Geomyces pannorum* and *Melinomyces variabilis*[J]. *Folia Microbiol*, 2007, 52(4): 407–414.
- [4] Wu BY, Nara K, Hogetsu T. Genetic structure of *Cenococcum geophilum* populations in primary successional volcanic deserts on Mount Fuji as revealed by microsatellite markers[J]. *New Phytologist*, 2005, 165(1): 285–293.
- [5] Matsuda Y, Hayakawa N, Ito S. Local and microscale distributions of *Cenococcum geophilum* in soils of coastal pine forests[J]. *Fungal Ecology*, 2009, 2(1): 31–35.
- [6] Goncalves SC, Martins-Loucao MA, Freitas H. Evidence of adaptive tolerance to nickel in isolates of *Cenococcum geophilum* from serpentine soils[J]. *Mycorrhiza*, 2009, 19(4): 221–230.
- [7] 陈立红, 闫伟, 徐燕. 土生空团菌 (*Cenococcum geophilum* Fr.) 的菌种鉴定及其遗传多样性的初步分析[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(10): 2214–2220.
- [8] 宝秋利, 闫伟, 梁显丽. 土生空团菌 (*Cenococcum geophilum* Fr.) 菌丝体纯培养条件的初步研究[J]. *内蒙古农业大学学报: 自然科学版*, 2005, 26(1): 33–36.
- [9] Vierheilig H, Bennett R, Kiddle G, et al. Difference in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate-containing plant species[J]. *New Phytol*, 2000, 146(2): 343–352.
- [10] 田云霞, 戴绍军, 陈思学, 等. 机械损伤对拟南芥莲座叶芥子油苷含量和组成的影响[J]. *生态学报*, 2009, 29(4): 1648–1654.
- [11] Jens KN, Tsuneatsu N, Hikaru O, et al. Resistance in the plant, *Barbarea vulgaris*, and counter-adaptations in flea beetles mediated by saponins[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2010, 36(3): 277–285.
- [12] 陈亚州, 阎秀峰. 芥子油苷在植物-生物环境关系中的作用[J]. *生态学报*, 2007, 27(6): 2584–2593.
- [13] Zeng RS, Mallik AU, Setliff E. Growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by root exudates of *Brassicaceae* plants: role of degraded compounds of indole glucosinolates[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2003, 29(6): 1337–1355.
- [14] 李敏, 闫伟. 褐环乳牛肝菌在液体摇瓶培养过程中菌丝体活力指标的筛选研究[J]. *华北农学报*, 2007, 22(5): 176–179.
- [15] 晁元卿, 黄艺, 费颖恒, 等. 外生菌根真菌 *Xerocomus chrysenteron* 对 DDT 胁迫的耐受性及酶响应研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(3): 288–293.
- [16] 程坤, 杨丽梅, 方智远, 等. 十字花科植物中主要硫代葡萄糖苷合成与调节基因的研究进展[J]. *中国蔬菜*, 2010(12): 1–6.
- [17] 潘凯, 姚友. 不同黄瓜品种根系分泌物对根际土壤微生物及土壤养分的影响[J]. *北方园艺*, 2008(8): 18–20.
- [18] 赵小亮, 刘新虎, 贺江舟, 等. 棉花根系分泌物对土壤速效养分和酶活性及微生物数量的影响[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(7): 1426–1431.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。