



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112592838 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 29

(21) 申请号 202011643369.6

A01G 7/06 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.31

C12R 1/645 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112592838 A

(56) 对比文件

CN 110408551 A, 2019.11.05

CN 105861330 A, 2016.08.17

(43) 申请公布日 2021.04.02

CN 101338290 A, 2009.01.07

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.21053 2020.11.13

CN 107746811 A, 2018.03.02

CN 105861332 A, 2016.08.17

(73) 专利权人 广西壮族自治区林业科学研究院

地址 530002 广西壮族自治区南宁市邕武路23号

CN 111793567 A, 2020.10.20

CN 105517557 A, 2016.04.20

WO 2015200902 A2, 2015.12.30

WO 2016040285 A1, 2016.03.17

(72) 发明人 陈宝玲 唐庆 杨开太 蒋林

周千淞 黄森 胡雪玲 李进华

刘世勇 孙开道 林茂 余玉珠

黄欣 桂雪萍 吴晓峰 孙利娜

陈宝玲等.有益菌根真菌及其互作对带叶兜兰试管苗生理生长的影响.《西南林业大学学报》.2022,第42卷

田佳妮.几种兰花根际土壤真菌及根内生真菌研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库》.2016,(第6期),

王美娜等.兰科植物菌根真菌研究新见解.《广西植物》.2019,第41卷(第4期),

(74) 专利代理机构 南宁市吉昌知识产权代理事务所(普通合伙) 45125

专利代理师 滕艺琼

审查员 杨凌云

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/30 (2020.01)

A01P 21/00 (2006.01)

A01G 22/63 (2018.01)

权利要求书1页 说明书9页

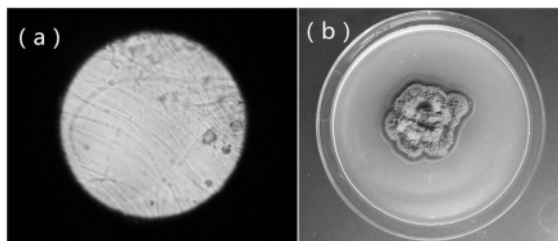
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一株兰花菌根真菌PF07及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株兰花菌根真菌PF07,所述兰花菌根真菌PF07为杯梗孢(Cyphellophora sp.)PF07,于2020年11月13日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京朝阳区北辰西路1号院3号,保藏号为CGMCC NO:21053.本发明首次从野生兰花中分离筛选到一株杯梗孢Cyphellophora sp.PF07,该菌能促进兰花的生长,应用于兰花菌根化育苗实践中,可促进兰花种苗的快速繁育,并缩短成苗周期,为珍稀濒危植物的保育提供理论基础,并为促进兜兰产业的规模化发展提供技术支撑。



CN 112592838 B

1. 一株兰花菌根真菌PF07, 其特征在于, 所述兰花菌根真菌PF07为杯梗孢(Cyphellophora sp.) PF07, 于2020年11月13日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 地址为北京朝阳区北辰西路1号院3号, 保藏号为CGMCC NO:21053。

2. 一种如权利要求1所述兰花菌根真菌PF07在促进带叶兜兰生长中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用, 其特征在于: 将所述兰花菌根真菌PF07制成液体菌剂或真菌诱导子后促进带叶兜兰生长。

4. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 将所述兰花菌根真菌PF07制成液体菌剂的方法: 将兰花菌根真菌PF07接种到PDA培养基平板上, 置入光照培养箱28℃恒温暗培养5~7d活化菌株, 然后于菌落边缘打孔做成菌饼, 将菌株制作的菌饼分别移入盛有150mL液体PDA培养基的瓶中, 接种2块菌饼, 置于28℃, 140r/min的摇床震荡培养10d, 破碎5min, 用无菌水稀释至40倍显微镜的视野内观察到平均20个菌体, 配制成液体菌剂。

5. 根据权利要求3或4所述的应用, 其特征在于: 所述的兰花菌根真菌PF07制成浓度为100~150mL/L的真菌诱导子后促进带叶兜兰生长。

6. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述真菌诱导子的配制: 将活化后的兰花菌根真菌PF07打成菌饼, 将菌饼接种到PDA液体培养基中, 250mL/瓶, 接种菌饼1块/瓶, 120r/min摇床震荡培养7d, 待菌丝体充分生长后收获, 将菌丝体打碎后与菌液混合, 121℃灭菌20min后即得到PF07真菌诱导子。

一株兰花菌根真菌PF07及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及的是一株兰花菌根真菌PF07及其应用。

背景技术

[0002] 几乎所有的兰科植物都与菌根真菌有着共生关系,已有的研究表明,菌根真菌对兰科植物具有独特的生态功能,如促进种子萌发和幼苗的形态建成,帮助兰科植物的生态入侵,影响生物群落组成及制备特定功效的生物诱导子,利于生态系统的保护、恢复或重建等方面。究其机理,近年来的研究发现,菌根真菌通过消化菌丝为胚细胞提供必需的营养,刺激植物产生赤霉素、IAA等激素,烟酸和烟酰胺等维生素。此外,菌根真菌可在植物体内合成植保素,进一步激发SOD、POD、CAT和PAL等酶活性,来增强宿主植物的抗性。同时,当菌根真菌定殖成功并成为有益的优势菌群后,释放的拮抗物质将有效增强兰科植物的抗病能力,对于提高幼苗的成活率和促进植株的生长具有重要意义。近年来,兰科菌根真菌成为新的研究热点,特别是在园艺学和植物保护学中的应用和功效引起了一些学者们的高度重视,利用兰科菌根真菌提高一些珍稀种类组培苗的移栽成活率、促进植株生长及保育等方面的研究已有广泛报道,如石斛属(*Dendrobium* sp.)、金线莲属(*Anoectochilus* sp.)、兜兰属、兰属(*Cymbidium* sp.)、五唇兰属(*Doriti* sp.)等,将菌根化育苗技术引入人工栽培后,显著提高了幼苗移栽成活率、鲜质量增长率、干物质积累及矿质元素吸收,部分菌根真菌的代谢产物可分泌赤霉素,IAA等植物生长调节剂。

发明内容

[0003] 本发明目的在于提供一株兰花菌根真菌PF07及其应用,该菌是一种能够促进兰花植物生长的菌株。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供的技术方案如下:

[0005] 一株兰花菌根真菌PF07,分类命名为杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07,于2020年11月13日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京朝阳区北辰西路1号院3号,保藏号为CGMCC NO:21053。

[0006] 如上所述兰花菌根真菌PF07在促进兰花生长中的应用。

[0007] 优选地,将所述兰花菌根真菌PF07制成液体菌剂或真菌诱导子后促进兰花生长。

[0008] 优选地,将所述兰花菌根真菌PF07制成液体菌剂的方法:将兰花菌根真菌PF07接种到PDA培养基平板上,置入光照培养箱28℃恒温暗培养5~7d活化菌株,然后于菌落边缘打孔做成菌饼,将菌株制作的菌饼分别移入盛有150mL液体PDA培养基的瓶中,接种2块菌饼(2块菌饼表示接种量),置于28℃,140r/min的摇床震荡培养10d,破碎5min,用无菌水稀释至40倍显微镜的视野内观察到平均20个菌体,配制成液体菌剂。

[0009] 优选地,所述的兰花菌根真菌PF07制成浓度为100~150mL/L的真菌诱导子后促进兰花生长。

[0010] 优选地,所述真菌诱导子的配制:将活化后的兰花菌根真菌PF07打成菌饼,将菌饼

接种到PDA液体培养基中,250mL/瓶,接种菌饼1块/瓶,120r/min摇床震荡培养7d,待菌丝体充分生长后收获,将菌丝体打碎后与菌液混合,121℃灭菌20min后即得到PF07真菌诱导子。

[0011] 与现有技术相比,本发明具有如下有益的技术效果:

[0012] 本发明首次从野生兰花中分离筛选到一株杯梗孢Cypheellophora sp.PF07,该菌能促进兰花的生长,应用于兰花菌根化育苗实践中,可促进兰花种苗的快速繁育,并缩短成苗周期,为珍稀濒危植物的保育提供理论基础,并为促进兜兰产业的规模化发展提供技术支撑。

[0013] 保藏信息说明

[0014] 杯梗孢Cypheellophora sp.PF07于2020年11月13日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,(简称CGMCC),保藏号为CGMCC NO:21053。

附图说明

[0015] 图1兰花菌根真菌PF07形貌特征图,其中(a)为40倍率下PF07菌丝图,(b)为PF07菌落图。

[0016] 图2兰花菌根真菌PF07对带叶兜兰试管苗生物量增长的影响。

[0017] 图3兰花菌根真菌PF07对带叶兜兰移栽杯苗生物量增长的影响。

[0018] 图4是不同浓度的兰花菌根真菌PF07真菌诱导子对带叶兜兰试管苗生长的影响。

[0019] 图5兰花菌根真菌PF07真菌诱导子对带叶兜兰试管苗生长的影响。

[0020] 图6兰花菌根真菌PF07对带叶兜移栽杯苗植株生长的影响。

具体实施方式

[0021] 下面结合附图具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。实施例中采用的原料、试剂若无特殊说明,皆为市售所得。下述实施例中所用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中的定量实验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0022] 实施例1

[0023] 兰花菌根真菌PF07的分离和鉴定

[0024] 1.1、兰花菌根真菌PF07的分离

[0025] 兰花菌根真菌PF07的分离包括取样、筛选,具体如下:

[0026] 从7批次野生兰花新鲜营养根中采用组织块分离法或组织液涂抹法分离出菌株,分离培养基为马铃薯葡萄糖培养基(PDA),共分离菌株154株,将这些菌根真菌采用尖端挑取法纯化,合并后共得到60个菌株;

[0027] 优良性状真菌菌株初筛与复筛:

[0028] (1) 固体菌种:选取已活化的不致死(初筛)或有益菌株(复筛)菌种,分别从菌落边缘打取直径0.5cm的菌饼作为接种材料;

[0029] (2) 接种方法:在超净工作台上,用无菌水冲洗干净粘附在组培苗根上的培养基,无菌吸水纸吸干水分,以瓶为单位称取鲜重后移入共生培养基,每瓶2株,挑取1个菌饼接入培养瓶中央,对照不接菌;每处理重复3次,放入培养室中进行共生培养,温度(23±1)℃,每天光照12~14h,光照强度为1 600~2 000Lux,隔两天观察菌及苗的生长状况;

[0030] (3) 兰花生长指标的测定:在接种当天和接种后90d分别测定组培苗的鲜重,统计植株接菌后的成活情况及长势;计算苗的鲜重增长率($\%$) = (末重-始重)/始重 \times 100;

[0031] (4) 菌根化检测:每处理随机抽取2~3株苗,每株苗剪取3~4条新鲜营养根,将根段在超净工作台中用75%的乙醇浸泡30s,无菌水冲洗2次,然后用0.1%升汞溶液消毒1~3min进行表面灭菌,以后操作及培养条件同1.1的真菌分离方法,7d后统计分离情况并计算分离率,与原菌株的菌落形态及生长特征对比后若分离到的是目标菌株则说明该菌株可以形成菌根,植株已经充分菌根化;

[0032] 采用共生(DE)培养基接种兰花组培苗与菌株,初筛培养60d后选取对幼苗不致死的菌株再进行下一步复筛,测量并记录,获得对幼苗生长有显著促进作用的有益共生菌株,命名为PF07。

[0033] 1.2、兰花菌根真菌PF07的鉴定

[0034] ①DNA提取菌丝体的获得:对于在固体培养基上生长旺盛的PF07菌株,将菌接种于固体PDA培养基上培养,待长出菌丝后,将菌丝小心刮下备用;一些在固体培养基上生长缓慢、菌丝不发达的菌株,将菌接种于PDA液体培养基内,摇床震荡培养3~5d,过滤获得菌丝体,烘干备用;

[0035] 有益菌株的培养性状观测:观察、记录各培养物菌落的特征:形状、大小、色泽及变化、质地,如图1所示;

[0036] ②基因组DNA提取:按SK8255(细菌)、SK8259(真菌)、SK8257(酵母)试剂盒操作;

[0037] ③PCR扩增:扩增引物为通用的ITS1和ITS4,正向引物ITS1:TCCGTAGGTGAACCTGCGG;反向引物ITS4:TCCTCCGCTTATTGATATGC;扩增序列为内转录间隔区1和2,PCR长度为600bp左右;

[0038] ④DNA浓度及纯度检测:得到的基因组DNA片段的大小与样品保存时间,操作中的剪切力等因素有关,回收得到的DNA片段需用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测浓度和纯度;

[0039] ⑤ITS测序及比对:将PCR反应结果回收纯化,采用DNA测序仪进行ITS片段序列测定,获得正向和反向两个ITS序列;16SrDNA序列在核糖体数据库<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>上比对;通过同源性分析对菌根真菌进行分子水平鉴定;按相似性高低,同时结合形态学观察结果,鉴定供试菌株种类;

[0040] PCR反应体系

[0041]

试剂	体积(μ L)
Template(基因组DNA 20-50ng/ μ l)	0.5
10 \times Buffer(with Mg^{2+})	2.5
dNTP(各2.5mM)	1
酶	0.2
F(10 μ M)	0.5
R(10 μ M)	0.5
加双蒸 H_2O	25

[0042] PCR循环条件:

[0043]	温度	时间	程序
	94℃	4 min	预变形
	94℃	45 sec	30cycle
	55℃	45 sec	

[0044]	72℃	1 min	
	72℃	10 min	修复延伸
	4℃	∞	终止反应

[0045] 16SrDNA序列在核糖体数据库<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>上比对；

[0046] 比对结果如下表所示：

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Cyphellophora</i> sp. strain P1113 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1055	1055	96%	0.0	100%	KT26843 1.1
<i>Cyphellophora</i> sp. strain P2492 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1050	1050	96%	0.0	99%	KT26972 1.1
<i>Cyphellophora</i> sp. strain P2420 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1050	1050	96%	0.0	99%	KT26965 3.1
<i>Cyphellophora</i> sp. strain P2935 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1044	1044	96%	0.0	99%	KT27013 2.1

[0047]

[0048] 兰花菌根真菌PF07与*Cyphellophora* sp.匹配度100%，因此，鉴定兰花菌根真菌PF07为*Cyphellophora* sp.，命名为杯梗孢(*Cyphellophora* sp.)PF07，将其保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，(简称CGMCC)，保藏号为CGMCC N0:21053，其序列如SEQ ID N0.1所示。

[0049] 实施例2

[0050] 兰花菌根真菌PF07对带叶兜兰生长和生理的作用

[0051] 2.1试验材料

[0052] 2.1.1供试植株:试管苗共生培养采用带叶兜兰壮苗阶段生长健壮的无菌组培苗,具有3~4条根,3~4片叶;营养杯内移栽苗采用生根阶段的组培苗,具有5~8条根,4~5片叶;

[0053] 2.1.2供试菌株:选取上述实施例1筛选后得到的兰花菌根真菌PF07;

[0054] 2.1.3培养基质:瓶内共生培养基为DE培养基;营养杯内移栽苗培养基质为松树皮:火山岩:木炭=4:2:1体积比混合所得。

[0055] 2.2试验方法

[0056] 2.2.1液体菌剂制备:将上述供试菌株接种到PDA培养基平板上,置入光照培养箱28℃恒温暗培养5~7d活化菌株,然后用直径5mm的打孔器于菌落边缘打孔做成一片片同样大小的小圆片,即为菌饼,将菌株制作的菌饼分别移入盛有150mL液体PDA培养基的300mL三角瓶中,三角瓶接种2块菌饼(2块菌饼表示接种量),置于28℃,140r/min的摇床震荡培养10d,然后用组织捣碎机破碎5min,用无菌水稀释至40倍显微镜的视野内观察到平均20个菌体,配制成液体菌剂备用;

[0057] 2.2.2组培苗处理:将2.1.1中的生根阶段的组培苗置于大棚内炼苗7~10d左右,洗去培养基,并用50%多菌灵可湿性粉剂1000倍水溶液浸泡10min,放在阴凉处晾干后移栽入50孔育苗穴盘中,每处理30丛,2株/丛种植,3次重复;

[0058] 2.3接种方法

[0059] (1) 试管苗接种菌株:将筛选到的兰花菌根真菌PF07活化(活化为将供试的菌株接种到PDA培养基平板上,置入光照培养箱28℃恒温暗培养5~7d活化菌株),选择生长良好的菌株,用直径5mm的打孔器于菌落边缘打孔做成菌饼,在无菌条件下接种到2.1.1的无菌组培苗中,在瓶周边接2株苗,10次重复;接种后置于25±2℃培养室中进行共生培养,每天光照12~14h,光照强度2000Lux;共生培养120d后以瓶为单位统计鲜重、叶长、叶宽、根系长度及生长势生长指标;

[0060] (2) 移栽苗接种菌株:于移栽当天给每丛苗浇施10ml的菌液2.2.1所得液体菌剂,以浇施等量液体PDA培养基为对照(CK),以后每隔20d浇施1次菌液,连续浇施3~4次,移栽后隔5~7d淋1次无菌水,期间视空气湿度情况适当进行叶面喷雾,保持温度(26±2)℃,湿度70%~85%,遮阴率70%~80%,期间不施肥或用药;共生培养120d后统计组培苗叶幅、叶长、叶宽、根系长度等生长指标。

[0061] 2.4生理指标测定

[0062] (1) POD、CAT、SOD酶活性测定采用微量法:根据苏州科铭生物技术有限公司的过氧化物酶(Peroxidase,POD)试剂盒说明书给出的方法、过氧化氢酶(Catalase,CAT)试剂盒说明书给出的方法、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)试剂盒说明书给出的方法分别测定2.3中移栽培养120d后所得幼苗的叶片中POD、CAT、SOD酶活性。

[0063] 2.5数据统计分析

[0064] 试验数据采用EXCEL表格进行数据统计,并利用DPS7.05软件进行Duncan's新极复差检验。鲜重增长率(%)=(末重-始重)/始重×100;叶面积=(叶长×叶宽)×叶形指数(0.8317)。

[0065] 结果与分析

[0066] 1、试管苗接种兰花菌根真菌PF07

[0067] 将兰花菌根真菌PF07与带叶兜兰组培苗进行共生培养,证实菌根化苗生物量平均鲜重明显高于对照(CK),结果发现接种兰花菌根真菌PF07处理具有较明显的促生效果。兰花菌根真菌PF07对组培苗鲜重增长和叶面积指标影响不明显,但鲜重增长量均较对照明显提高,添加了兰花菌根真菌PF07菌株处理分别较对照高出395%,说明接菌处理具有非常明显的促进兰花生生物量增长作用。兰花菌根真菌PF07菌株处理的组培苗叶面积和新根长度较对照差异不明显,较对照分别高出22.2%、25%(图2)。

[0068] 2、移栽杯苗接种菌根真菌

[0069] 在(松树皮:火山岩:木炭=4:2:1体积比)基质中,带叶兜兰接种3次2.2.1中所得液体菌剂(每次接种10ml)之后,植株生物量变化出现显著差异,兰花菌根真菌PF07整体促生效果较好。而在叶片长度、叶片宽度及根系长度方面,兰花菌根真菌PF07和对照差异均不明显(图3)。

[0070] 3、接种菌根真菌对带叶兜兰生理指标的影响

[0071] (1) 试管苗生理指标:试管苗由于培养基营养有限,接种活菌后,植株的水分含量、叶绿素含量呈显著提高,而接种兰花菌根真菌PF07的植株生物量增加较好,但培养120d后,这个接菌处理的植株POD、CAT及SOD酶活性较弱(表1);

[0072] 表1接种兰花菌根真菌PF07对带叶兜兰试管苗生理指标的影响

[0073]

菌株编号	POD (U/g)	CAT (nmol/g)	SOD (U/g)	叶绿素总量 (mg/g)
PF07	42.84	46.15	490.33	0.717
CK	36.72	120.65	1666.67	0.435

[0074] (2) 移栽杯苗生理指标:移栽后,接种杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07的植株生物量增加较好,但培养120d后,接菌处理的植株POD酶活性减弱、SOD酶活性增强;接种杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07的植株CAT酶活性差异不明显,但3种酶活性均是对照(CK)植株最强,各处理叶绿素总量差异不显著(表2)。

[0075] 表2接种兰花菌根真菌PF07对带叶兜兰试管苗生理指标的影响

[0076]

菌株编号	POD (U/g)	CAT (nmol/g)	SOD (U/g)	叶绿素总量 (mg/g)
PF07	333.33	36.72	94.94	0.473
CK	290.33	131.58	244.76	0.445

[0077] 实施例3

[0078] 真菌诱导子对带叶兜兰生长和生理的作用

[0079] 3.1材料与方法

[0080] 3.1.1供试植株:试管苗共生培养采用带叶兜兰壮苗阶段生长健壮的无菌苗,具有3~4条根,3~4片叶;营养杯苗共生培养采用生根阶段的试管苗,具有5~8条根,4~5片叶;

[0081] 3.1.2供试菌株:选取上述实施例1筛选后得到菌株PF07,PF07分离自广西天峨县野生带叶兜兰新鲜营养根中,为带叶兜兰幼苗的不致死菌株;

[0082] 3.1.3培养基质:试管苗共生培养基为DE培养基;营养杯苗共生培养基质为松树皮:火山岩:木炭=4:2:1体积比混合所得。

[0083] 3.2试验方法

[0084] 3.2.1菌株活化:用上述供试菌株接种到PDA培养基平板上,置入光照培养箱28℃恒温暗培养5~7d活化菌株;

[0085] 3.2.2真菌诱导子的配制:将3.2.1培养7d活化所得菌株用直径为0.5cm的打孔器打孔,打一片片同样大小的小圆片,即为菌饼,将菌饼接种到预先分装、灭菌好的PDA液体培养基中,250mL/瓶,接种菌饼1块/瓶,120r/min摇床震荡培养7d,待菌丝体充分生长后收获,用组织捣碎机将菌丝体打碎后与菌液混合,121℃灭菌20min后即得到兰花菌根真菌PF07真菌诱导子,备用;

[0086] 3.2.3组培苗处理:将3.1.1生根阶段的试管苗置于大棚内炼苗7~10d左右,洗去根部附着的培养基,并用50%多菌灵可湿性粉剂1000倍水溶液浸泡10min,沥干水分后放在阴凉处,摊开晾干植株表面的水分,移入口径为5cm的透明营养钵中,2株/丛,每处理30丛,3次重复;

[0087] 3.2.4试管苗真菌诱导子培养基的配制及接种

[0088] 以DE为基础培养基,将上述备用的兰花菌根真菌PF07真菌诱导子按50、100、150mL/L 3个梯度分别添加到基础培养基中,以不加真菌诱导子的DE培养基为对照(CK);接种前,在无菌条件下、超净工作台上称取3.2.3处理后所得组培苗的鲜重(精确至0.0001g),然后在组培瓶周边接种6株幼苗到含有真菌诱导子的培养基中,10次重复,即每瓶6株,共5瓶,每个处理接种30株,即为试管苗;置于2000Lux、12h/d的条件下培养,25℃、相对湿度70%~75%,培养120d后,以瓶为单位统计鲜重、叶长、叶宽、新根数、根长及生长势等生长指标;

[0089] 3.2.5移栽杯苗浇施真菌诱导子

[0090] 选取3.2.4中在含有真菌诱导子的培养基中培养一段时间的株高约叶5~6片,根3~4条的带叶兜兰组培苗,置于85%遮阴网下炼苗1周后,取出洗净,消毒并晾干植株表面的水分后,2株/丛移栽入口径4.5cm育苗杯中,基质采用3.1.3中营养杯苗共生培养基,注意要使根部舒展且勿伤根;

[0091] 浇施真菌诱导子前先把带叶兜兰组培苗根系周围的基质拨开,在距根系约1cm处,用10mL的注射器取稀释30倍后的真菌诱导子10mL浇灌在根系附近,然后覆盖好基质,对照浇入10mL无菌水;每日光照12~14h,光照强度为2500~3000Lux,温度 28 ± 1 ℃,湿度70~75%;每天适量喷雾保持植株和基质湿润,保持通风,隔10d补充浇施1次真菌诱导子,连续浇施3个月,继续培养120d,统计移栽成活率、鲜重叶长、叶宽、新根数及生长势等生长指标。

[0092] 3.3测定项目与方法

[0093] (1) 试管苗:上述培养120d后收获试管苗,清水洗净根部的培养基后自然风干,然后用电子天平称取组培苗的鲜重(精确至0.0001g),生理指标测定方法同上述2.4所述方法;

[0094] (2) 移栽杯苗:上述培养120d后统计杯苗鲜重增长生长指标;生理指标测定方法同上述2.4所述方法。

[0095] 3.4结果与分析

[0096] 3.4.1真菌诱导子对试管苗的生长效应

[0097] (1) 真菌诱导子浓度:在带叶兜兰试管苗中,接种兰花菌根真菌PF07的3个不同浓度(50mL/L、100mL/L、150mL/L)的真菌诱导子,发现真菌诱导子对带叶兜兰的生长有极其重

要的促进作用,但受浓度影响,添加菌株不同浓度的真菌诱导子对植株鲜重增长率有不同程度的提高;杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07则在3个浓度真菌诱导子中培养的植株鲜重增长率均显著或极显著高于对照(CK),尤其是150mL/L的杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07,鲜重增长率较对照提高了262.9%(图4);

[0098] (2) 真菌诱导子效果:以最佳浓度真菌诱导子的菌株为基础,添加真菌诱导子的促生效果优于对照(CK);其中,添加杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07的真菌诱导子处理的带叶兜兰植株的鲜重增长率极显著高于对照,较对照提高了262.9%(图5),是较好的带叶兜兰育苗真菌诱导子,浓度适宜控制在100-150mL/L。

[0099] 3.4.2 兰花菌根真菌PF07真菌诱导子对移栽杯苗生长效应

[0100] 在移栽杯苗试验中,杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07真菌诱导子对带叶兜兰促生效果最佳,植株鲜重增长率较对照(CK)差异非常明显,提高了377.8%(图6),真菌诱导子对植株生长的作用非常明显。在移栽后,植物赖以生存的生长环境发生变化,植株生长空间扩大,可主动接受环境中的养分、水分、光照,植株生长旺盛,新芽萌蘖较多,生物量迅速增长。而试管苗相对而言,随着培养时间的延长,培养基营养消耗减少,瓶内环境已经不利于植株的生长,因此,这时候真菌诱导子在植株生长中的作用强度有一定削减,但真菌诱导子在植株试管苗总体生长阶段依然较对照产生显著的正效应。

[0101] 3.5 添加真菌诱导子对带叶兜兰生理指标的影响

[0102] (1) 试管苗:随着添加的真菌诱导子浓度提高,杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07真菌诱导子处理的植株POD酶活性增强,叶绿素总量极显著提高,CAT酶与SOD酶2种酶活性则减弱,尤其是CAT酶,活性显著减弱(表3)。

[0103] 表3添加兰花菌根真菌PF07真菌诱导子对带叶兜兰试管苗生理指标的影响

[0104]	真菌诱导子处理	POD (U/g)	CAT(nmol/g)	SOD (U/g)	叶绿素总量 (mg/g)
	PF07(100mL/L)	2213.33	112.09	121.74	0.645
[0105]	PF07(150mL/L)	2360	58.87	91.03	0.716
	CK(0mL/L)	1672.67	36.43	121.60	0.706

[0106] (2) 移栽杯苗:在移栽苗浇施兰花菌根真菌PF07真菌诱导子后,真菌诱导子处理的植株POD与叶绿素总量与对照差异不明显,CAT与SOD酶活性低于对照(表4);说明植物体内的酶活性是呈动态变化的,需进一步探讨最佳的真菌诱导子浇施时机。

[0107] 表4添加兰花菌根真菌PF07真菌诱导子对带叶兜兰移栽杯苗生理指标的影响

[0108]	真菌诱导子处理	POD (U/g)	CAT (nmol/g)	SOD (U/g)	叶绿素总量 (mg/g)
	PF07	329.67	65.13	47.00	0.392
	CK	346.67	126.41	240.86	0.446

[0109] 3.6 结论

[0110] 在植株的不同生长阶段对带叶兜兰促生效果最佳的菌株PF07:

[0111] (1) 真菌诱导子对带叶兜兰试管苗的生长有极其重要的促进作用,但不同真菌诱导子活性有差异,添加相同菌株不同浓度的真菌诱导子对植株鲜重增长率有不同程度的提高。杯梗孢(*Cyphellophora* sp.) PF07真菌诱导子对带叶兜兰试管苗促生效果最佳,处理的

植株的鲜重增长率极显著高于对照(CK),是较好的带叶兜兰育苗真菌诱导子,浓度适宜控制在100~150mL/L;

[0112] (2) 杯梗孢(Cyphellophora sp.)PF07真菌诱导子对带叶兜兰移栽杯苗促生效果佳;移栽后真菌诱导子在植株生长中的作用强度有一定削减,但依然较对照产生显著的正效应;

[0113] (3) 随着添加的真菌诱导子浓度提高,杯梗孢(Cyphellophora sp.)PF07真菌诱导子处理的植株POD酶活性增强,叶绿素总量极显著提高,CAT酶与SOD酶2种酶活性则减弱。

[0114] 前述对本发明的具体示例性实施方案的描述是为了说明和例证的目的。这些描述并非想将本发明限定为所公开的精确形式,并且很显然,根据上述教导,可以进行很多改变和变化。对示例性实施例进行选择 and 描述的目的在于解释本发明的特定原理及其实际应用,从而使得本领域的技术人员能够实现并利用本发明的各种不同的示例性实施方案以及各种不同的选择和改变。本发明的范围意在由权利要求书及其等同形式所限定。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 广西壮族自治区林业科学研究院
- [0003] <120> 一株兰花菌根真菌PF07及其应用
- [0004] <130> JC
- [0005] <160> 1
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 590
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Cyphellophora sp.
- [0011] <400> 1
- [0012] cctgcggaag gatcattacc gagttagggt gcctcgtcgc gcccgacctc caaccctttg 60
- [0013] cttacttgac ctatcttggt gcttcggcag gcccgccgcc cggaaacggg tggccgccgg 120
- [0014] gggcgtttca cgcgcccggg cccgcgcctg tcgatggccc tattaaaact cttgtcaaaa 180
- [0015] cgtgtcgtct gagtttatct aaacaaataa aaaccaaacc tttcaacaac ggatctcttg 240
- [0016] gttctggcat cgatgaagaa cgcagcgaag tgcgataagt aatgcgaatt gcagaatccg 300
- [0017] tgagtcacgc aatctttgaa cgcacattgc gccctctggt attccggagg gcatgcctgt 360
- [0018] tcgagcgtca ttatcacccc tcaagcccgg cttgttggtg gatgcagcgc ttatcccgtc 420
- [0019] cctcccaaag ataatgacgg cgtctgcgac gactcctgta cactgagctt tcgggcacgt 480
- [0020] acacggctag aagtccagac ccggtcgccg tcccccccgc ggggacaccc attaccacaa 540
- [0021] ggttgacctc ggatcaggta ggaatacccg ctgaacttaa gcatatcaaa 590

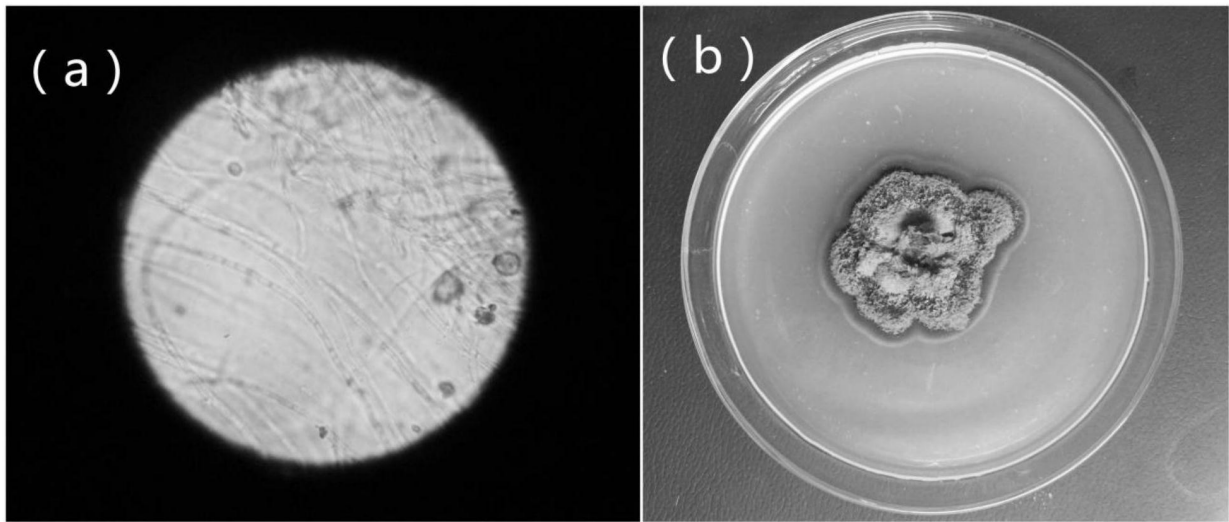


图1

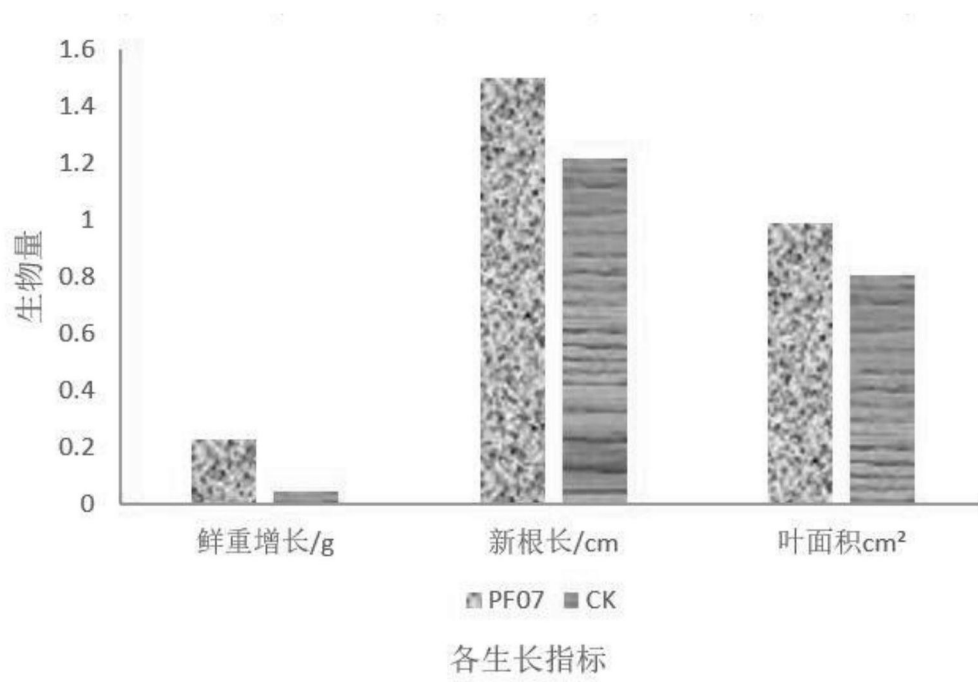


图2

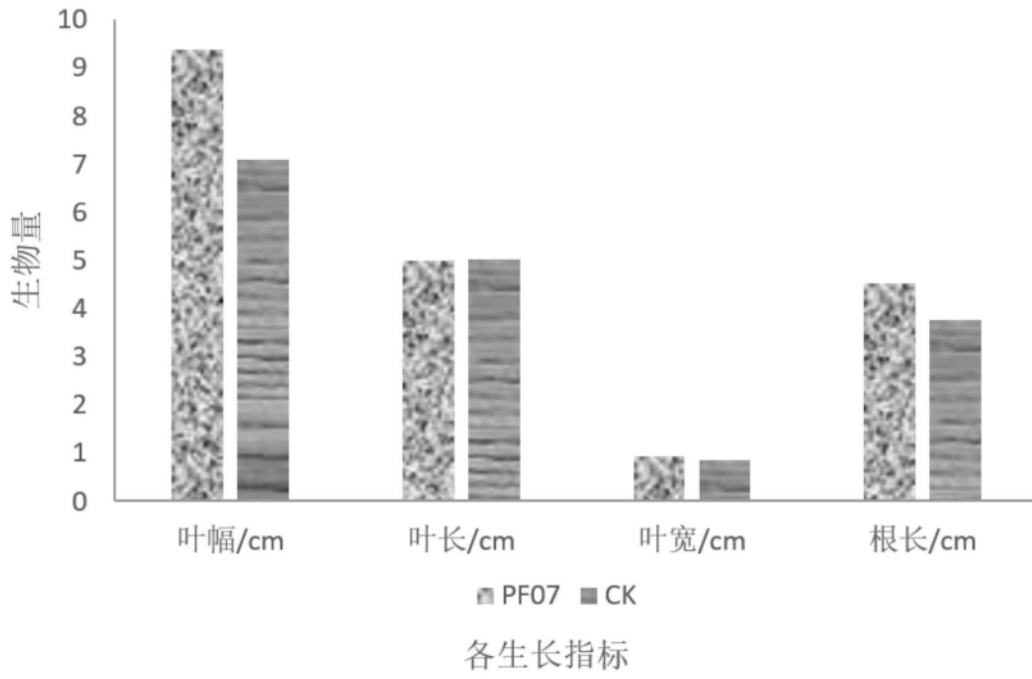


图3

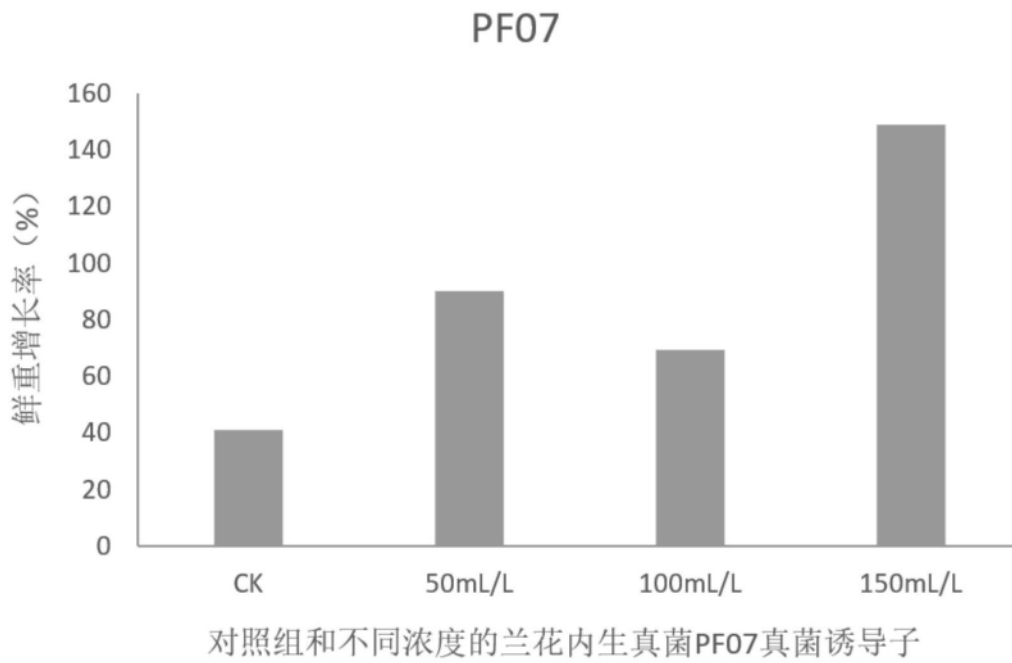


图4

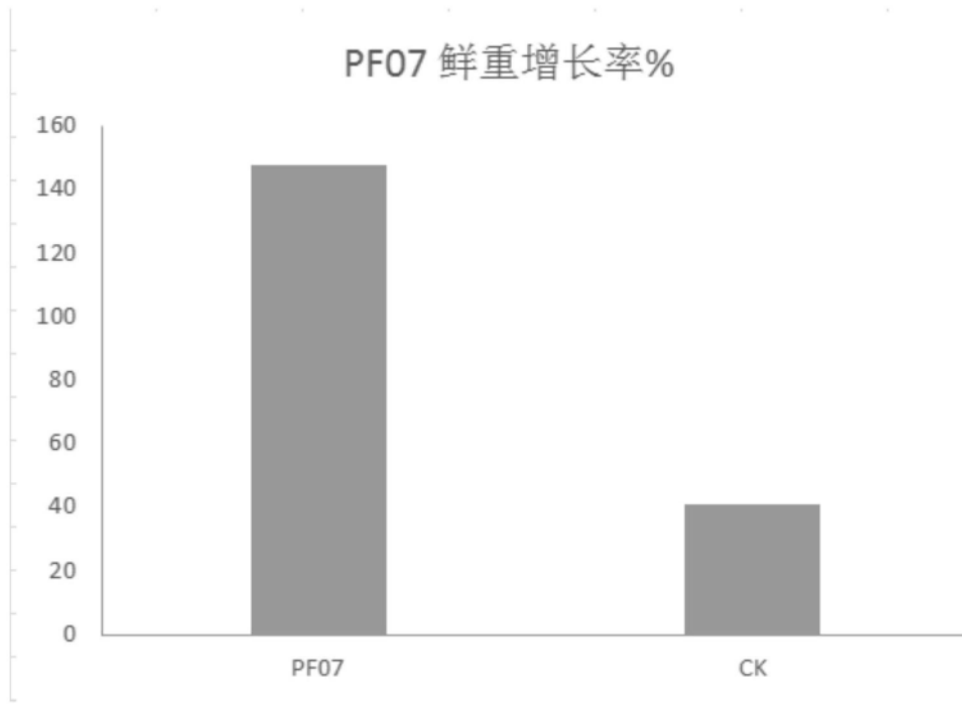


图5

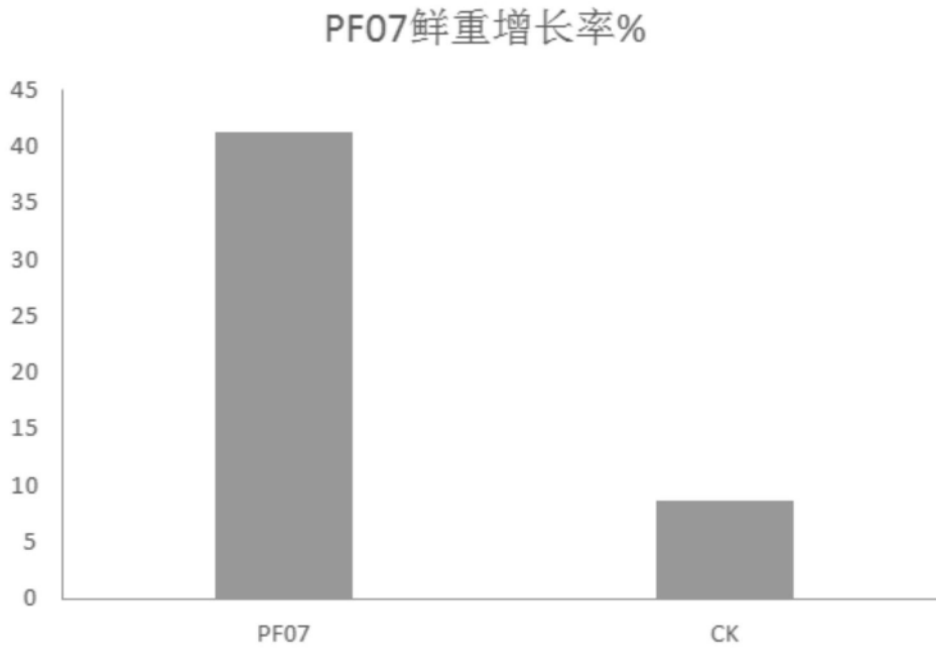


图6