

华石斛内生真菌诱导子对其组培苗生长的影响

吴智彪¹ 宋希强^{1,2*} 李绍鹏¹¹ 华南热带农业大学园艺学院 海南 儋州 571737² 中国科学院植物研究所系统与进化植物学重点实验室 北京 100093

摘 要 以 1/2 MS 为基本培养基, 加入华石斛内生菌根真菌的菌丝提取物, 对华石斛无根小苗进行诱导培养。结果表明: R5~R9 号真菌诱导子均可不同程度地促进华石斛的生长, 在 5 种真菌诱导子中, R6 的诱导效果最好; R3 和 R4 对华石斛生长和分化无明显的促进效果。7 种不同菌株对华石斛组培苗的促进作用依次为: R6>R8>R9>R7>R5>R3>R4。

关键词 真菌诱导子 华石斛 组织培养

中图分类号 S682.31 Q813.12

真菌诱导子(fungal elicitor)是一类在植物超敏反应中能引起植物细胞合成和积累次生产物(植保素)的活性物质。近年来的研究表明, 利用微生物作诱导子可胁迫植物细胞培养物生长与合成和积累刺激代谢物, 为研究植物细胞生长和次生代谢的调控提供了新手段^[1~6]。郭顺星等^[7]从野生细叶石斛种子发芽的原球茎中分离出真菌, 制成水提取液、醇提取液及其混合液; 结果发现真菌提取液均对原球茎的生长有促进作用, 其中水提取液显著优于醇提取液, 表明真菌提取液中含有促进细叶石斛原球茎生长的营养物质。高微微等^[8]的研究也得到类似的结果, 小菇属开唇兰小菇、石斛小菇和兰小菇 3 种真菌诱导子均能促进铁皮石斛幼苗生长, 促进金线莲侧芽及侧根的萌发。潘超美^[9]自野生建兰和墨兰根中分离得 4 号不同的菌株, 其真菌诱导子对铁皮石斛组织培养物的生长均有不同程度地促进。但关于由野生兰科植物根系中分离得到共生真菌, 其内生真菌诱导子对该种兰科植物组培苗的生长影响之研究鲜见报道。华石斛(*Dendrobium sinense*)为多年生附生兰科植物, 海南特有种, 自然繁殖率很低、生长缓慢。笔者根据在自然界中真菌与兰科植物共生及长期形成的营养平衡关系, 通过组织培养的方法, 利用真菌诱导子促进华石斛幼苗的生长和分化, 旨在探索一条简便可行的快速繁殖华石斛组培苗的新途径。

1 材料与方法

1.1 材 料

华石斛蒴果采于海南霸王岭自然保护区, 种子通过无菌培养诱导、分化形成无根小苗, 苗高 0.5 cm; 选择生长旺盛且长势基本一致者为外植体。7 种兰科内生菌根真菌均为从华石斛野生植株根系中分离, 经纯化培养后获得, 编号为 R3~R9。

1.2 真菌菌株的复壮及诱导子制备

菌株在改良的 PDA 培养基(土豆 200 g/L + 卡拉胶 10 g/L + 糖 20 g/L, pH 5.6)上活化复壮后, 将菌丝体转移到上述不含琼脂的液体培养基中; 自然光照条件, 25℃下, 摇床(100~120 r/min)振荡培养 2 周。待菌丝体充分生长后收获, 过滤菌丝体, 将菌丝体置研钵中充分研碎后与滤液合并, 菌液 120℃灭菌后备用。

1.3 培养基与培养方法

以 1/2 MS + 蛋白胨 1 g/L + 蔗糖 20 g/L + 卡拉胶 8.5 g/L 为基本培养基, 设置分别加入香蕉 70 g/L、R3~R9 菌液 50 mL/L 和不加菌液作对照 R1 等 9 个处理, 分别对应的培养基为 R2, R3, R4, R5, R6, R7,

华南热带农业大学院校科技基金(Rnd 0012)资助

吴智彪 男, 1969 年生, 讲师。研究方向: 观赏园艺。电话: 0898-23302130

* 通讯作者, E-mail: song.strong@163.com

收稿日期: 2005-08-30 修回日期: 2006-01-10

R8, R9, R1。选取继代培养, 生长旺盛和较一致的组培苗接种到上述各处理的培养基中, 每个处理接种 20 袋。在 25 ~ 28 °C, 每天光照 10 h, 光照强度为 1 600 ~ 2 000 lx 的环境下培养。8 个月后每个处理随机抽取 50 株组培苗(首先随机抽取 10 袋, 每袋再随机抽取 5 株), 测量其总重量(鲜重)、统计根数和总根长等指标。

2 结果与分析

2.1 真菌诱导子对华石斛组培苗鲜重的影响

培养过程中, 华石斛组培苗生长量一直缓慢地持续上升。从表 1 可以看出, 与对照组比较, 加入香蕉和含有诱导子培养基中的华石斛组培苗生长量(鲜重)明显高于对照组。不同真菌诱导子对华石斛组培苗生长的促进作用有所不同, 其作用强度依次为 R6>R7>R8>R9>R3>R5>R4。与对照组相比, R2 和 R6 达极显著水平, R7 和 R8 处理达显著水平(见表 1)。

表 1 不同真菌诱导子对华石斛组培苗(8 个月后)鲜重、根数量及总根长的影响

处 理	鲜 重			根数量			总根长		
	均值/g	5%显著水平	1%极显著水平	均值/条	5%显著水平	1%极显著水平	均值/cm	5%显著水平	1%极显著水平
R2	0.247 8	a	A	2.32	d	D	10.028	ab	AB
R6	0.219 2	ab	AB	3.74	ab	A	12.396	a	A
R7	0.193 7	b	BC	3.04	c	BC	9.882	b	ABC
R8	0.188 7	bc	BCD	3.84	a	A	11.098	ab	A
R9	0.155 9	cd	CDE	3.40	abc	AB	10.076	ab	A
R3	0.143 3	d	DE	2.22	d	D	6.890	c	BCD
R5	0.141 3	d	E	3.30	bc	AB	11.112	ab	A
R1(ck)	0.138 6	d	E	2.48	d	CD	6.772	c	CD
R4	0.132 3	d	E	2.14	d	D	6.350	c	D

说明: LSD 最小显著法方差检验, 不同字母代表显著差异。

2.2 真菌诱导子对华石斛根分化的影响

华石斛组织培养物在各种处理的培养基中先后都出现根的分化。到收获时(8 个月后), 都已形成了较完整的根系。以对照比较, R5 ~ R9 均达到极显著水平, 说明这几种真菌诱导子对华石斛根的分化都有明显的促进作用; 而 R2, R3, R4 则与对照在根分化的数量上不显著(见表 1)。

2.3 真菌诱导子对华石斛组培苗总根长的影响

从表 1 可以看出 R5 ~ R9 这几种真菌诱导子对华石斛组培苗总的根长与对照 R1 在 5 % 水平上达显著。结合表中根数量指标, 说明在根的总生长指标上 R5 ~ R9 号真菌诱导子对其有明显的促进作用, 而 R3, R4 与对照差异不显著。

3 讨 论

(1) 真菌诱导子通过酶和基因水平上对次生代谢产物的调节影响组培物的生长。组培物次生产物的合成受诱导子种类和浓度以及培养细胞的生理状况等许多因素的影响。不同种类诱导子所具有的诱导信息类型、强度不同, 诱导反应发生的类型、速度和强度也不同。从生物量的增长看, 真菌诱导子对华石斛生长有较明显的促进作用。但不同的诱导子所产生的效应稍有差异。综合所测的各项指标可以发现: R6 菌株对华石斛组织培养物生长促进作用最明显, 主要表现在生物量的增长以及根的分化方面; 另外 R5, R7, R8, R9 菌株对华石斛生长也有明显的促进作用; R2 虽然没有加入真菌诱导子, 但表明加入香蕉同样对华石斛组培苗生长同样有促进作用。R3, R4 菌株与对照 R1 对华石斛组织培养物生长的影响均无显著差异。

(2) 已有研究结果表明, 只有部分兰科菌根真菌诱导子能有效促进该种兰科植物组培苗组的生长, 主要是因为来自菌丝体部分的真菌诱导物中往往既含有诱导子的活性部分, 又含有拮抗成分, 两者的作用相互制约^[9]; 此外诱导子的浓度、添加的最佳时段以及培养物生理状况等, 也会产生不同程度的影响。比较华石斛种子萌发、原球茎分化、无根组培苗生长不同发育阶段的组培物受不同真菌诱导子水提取液、醇提取液及其混合提取液作用的影响, 较能全面的评价、筛选出适宜的真菌菌株, 这无疑对提高华石斛试管苗移栽成活率提供了新途径。

(3) 兰科植物在不同的生理阶段可能与不同的真菌共生, 从成年兰根中分离到的真菌并不总是能促进该种兰科植物的生长^[10]。如天麻种子萌发和原球茎阶段需与紫萁小菇等真菌共生, 而在块茎形成时期则与蜜环菌共生, 并且蜜环菌的存在抑制天麻种子的萌发。本研究所用的菌根真菌均来自野生华石斛植株, 根据其对华石斛组培苗生长的强度依次排序为 $R6 > R8 > R9 > R7 > R5 > R3 > R4$, 其中 $R5 \sim R9$ 号菌株对华石斛组培苗生长都有明显的促进作用, 尤以 $R6$ 菌株作用效果最为明显。这是否暗示着华石斛不同的生长发育阶段, 需要不同种类的真菌参与还有待进一步研究。

海南博大高科农业发展有限公司罗冠勇同志, 华南热带农业大学园艺专业 2001 级曾辉、曹开新同学参与部分工作, 特此感谢!

参考文献

- 1 刘长军, 侯篙生. 真菌诱导子对新疆紫草悬浮培养细胞的生长和紫草素合成的影响[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 6~10
- 2 陈永勤, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 几种真菌诱导子对云南红豆杉细胞产生紫杉醇的影响[J]. 生物工程学报, 1999, 15(4): 522~5249
- 3 赵鸿莲, 于荣敏. 诱导子在植物细胞培养中的应用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(2): 152~156
- 4 侯丕勇, 郭顺星. 真菌对植物的诱导作用及其在天然药物研究上的应用[J]. 中草药, 2002, 33(9): 558~561
- 5 仇燕, 贾宁, 王丽, 等. 诱导子在红豆杉细胞培养生产紫杉醇中的应用研究进展[J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 184~189
- 6 张向飞, 张荣涛, 王宁宁, 等. 真菌诱导子对长春花愈伤组织中吲哚生物碱积累的影响[J]. 中草药, 2004, 35(2): 201~204
- 7 郭顺星, 锦堂. 真菌在罗河石斛和铁皮石斛种子萌发中的作用[J]. 中国医学科学院学报, 1991, 13(1): 46~47
- 8 高微微, 郭顺星. 三种内生真菌对铁皮石斛、金线莲生长影响的研究[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(6): 556~558
- 9 潘超美, 贺红, 林群英, 等. 真菌诱导子对铁皮石斛组培物生长的影响[J]. 中医药学刊, 2004, 22(1): 54~55
- 10 范黎, 郭顺星. 兰科植物菌根真菌的研究进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 227~230

Effects of Fungal Elicitors from *Dendrobium sinense* on the Growth of Its Plantlets Cultured *in Vitro*

Wu Zhibiao¹ Song Xiqiang^{1,2} Li Shaopeng¹

1 College of Horticulture, SCUTA Danzhou Hainan 571737

2 Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, CAS Beijing 100093 China

Abstract The effects of fungal elicitors from *Dendrobium sinense* on its shoot growth *in vitro* were investigated. Plantlets were induced on the basal medium of 1/2 MS with the extraction of entophytic mycorrhizal fungi of *Dendrobium sinense*. The result shows that fungal elicitors of $R5 \sim R9$ considerably promoted the growth of the plantlets. $R6$ did the best. Both $R3$ and $R4$ had no significant effect on enhancing the growth and differentiation of *D. sinense*. The effects of 7 fungal elicitors on the growth of the plantlets were in the order of $R6 > R8 > R9 > R7 > R5 > R3 > R4$.

Key words fungal elicitor *Dendrobium sinense* culture *in vitro*