

美花石斛组培苗促生内生真菌分离及筛选

朱国胜^{1,2}, 刘作易¹, 黄永会^{1,2}, 金家兴³, 毛堂芬², 吴明开¹

(1. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵阳 550006; 2. 贵州省生物技术研究所, 贵阳 550006;
3. 吉仁堂药业公司, 贵州 兴义 562400)

摘要:本实验共分离获得 198 株内生真菌, 其中 57 株分离自根, 126 株分离自茎, 15 株分离自叶。筛选出显著促进美花石斛组培苗生长的共生真菌 8 株, 其中优势菌株为丝核菌; 结果表明: 促生真菌主要是提高了美花石斛组培苗根的成活率和幼芽的形成率, 这对促进组培苗的成活和生长起着至关重要的作用。

关键词: 美花石斛; 组织培养; 丝核菌

中图分类号: S682.31; Q939.96 文献标志码: A 文章编号: 1001-4705(2007)12-0017-04

Screening of Fungi Promoting the Growth of *Dendrobium loddigesii* Tissue Culture Seedlings

ZHU Guo-sheng^{1,2}, LIU Zuo-yi¹, HUANG Yong-hui^{1,2}, JIN Jia-xing³,
MAO Tang-fen², WU Ming-kai¹

(1. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang 550006, China;
2. Institute of Biotechnology, Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang 550006, China;
3. Jiren Tang Pharmaceutical Co. Xingyi, Guizhou 562400, China)

Abstract: 198 endophyte fungi strains were isolate from the roots, stems and leaves of *Dendrobium loddigesii*. Eight strains promoting the growth of the *Dendrobium loddigesii* tissue culture seedlings were selected out in this research. The superiority strains are *Rhizoctonias*. The reasons increasing survival rate and promoting the growth of the tissue seedlings are that the fungi raised the survival rate of the old roots and the forming rate of new buds.

Key words: *Dendrobium loddigesii* Rolfe; tissue culture; *Rhizoctonia*

美花石斛 (*Dendrobium loddigesii* Rolfe), 又名环草石斛、粉花石斛、小环草、小黄草等, 属于兰科 (Orchid) 植物。为常用中药石斛基源植物之一, 主要成份包括 4, 4-二羟基-3, -3, 5-三甲氧基二苄 (moscatilin), 2, 5-二甲基-4-甲氧基菲 (moscatin)、4', 5-二羟基-3, 3'-二甲氧基联苄 (gigantol)、十八碳二烯酸单甘油醚, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳的功效^[1]。美花石斛生长周期长, 自然状态下繁殖系数低, 近年来市场需求增加, 价格上涨, 野生美花石斛被大量采挖, 资源受到极大的破坏。组织快繁成为近年来研究的热点, 但

组培苗移栽成活率低, 生长慢, 人工栽培的石斛有效成份含量低, 这主要在于美花石斛与共生真菌的密切关系, 而国内外美花石斛内生真菌的研究未见报道。本研究通过从美花石斛根、茎、叶中分离筛选出促进组培苗移栽成活率和促进组培苗生长的菌株, 以期促进美花石斛工厂化生产。

1 材料方法

1.1 实验材料

组培苗: 贵州省农业生物技术重点实验室兰科植物组培快繁及其菌根菌研究与应用课题组培养。

内生真菌分离培养基: PDA 培养基^[2], 查氏培养基^[2]和麦麸糖培养基 (麦麸 50 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mg。麦麸用水煮 20 min, 双层纱布过滤, 滤液加琼脂和糖, 加温溶解后加水至 1 000 ml。)

复筛栽培基质: 底层为厚度 4 cm 碎石 (直径 2 ~ 3 cm), 碎石表面加 1 ~ 2 cm 厚的腐质土, 腐质土上覆盖一层苔藓。

收稿日期: 2007-08-26

基金项目: 贵州省中药现代化科技产业开发专项项目 (黔科合中药专字 [2003]45 号)。

作者简介: 朱国胜 (1971 -), 男, 安徽泾县人; 硕士, 助理研究员, 主要从事兰科植物共生真菌研究与开发、药用真菌育种及栽培工作。

通讯作者: 刘作易。

1.2 方法

1.2.1 植物材料消毒方法

自来水冲洗根、茎、叶表面灰层及杂质,用75%乙醇表面消毒3 s,再用0.1% HgCl₂表面消毒1、2、3、5、7、9 min,无菌水冲洗5次,洗净消毒液后,将根切成0.5~1 cm小段,两端不要。将根段接种于90 cm PDA平皿,每皿接3段根,每处理5个重复。以最后1次无菌水清洗液涂平板作空白对照,重复5个平板。25℃恒温培养,待从根内长出真菌菌丝后,挑取尖端菌丝纯化培养。

1.2.2 最适分离培养基筛选方法

利用筛选获得的最适消毒方法进行消毒,其他方法同上进行菌株分离纯化菌株,选择分离获得菌株种类多的作为目标培养基。

1.2.3 菌种活化、种子液及液体菌剂制备

菌种活化方法:分离菌株原种接种PDA试管斜面,25℃培养5 d,种子液制备:活化菌株接种于装20 ml液体PDA培养基的100 ml三角瓶,100 r/min,25℃培养至出现大量的菌丝或菌丝团。

液体菌剂制备:种子液过滤,收集菌丝,利用匀浆机打碎菌丝,加入无菌水,配制成菌丝浓度为2 g/L的菌剂。

1.2.4 初筛方法

选取3~4叶期的组培苗,利用0.5 cm打孔器打取1个菌片接种于组培苗根部附近,每个菌株接种两瓶,每瓶中3棵苗,共培养10~20 d,观察组培苗致死情况,筛选出未致死且组培苗生长势优化空白的菌株作为初筛的目标菌株。

1.2.5 复筛方法

向每个复筛栽培基质栽苗点的腐质土中施入液体菌剂1 ml,每个栽苗点栽3~4叶期的组培苗5棵,使根和菌剂接触,用苔藓覆盖固定组培苗根部,每个菌株栽种5个点。2个月后统计组培苗质量,老根成活数,新根产生数和新生芽数,筛选出生长势好,老根成活率高,新根和新芽产生数多于空白的菌株为目标菌株。各数据统计方法如下:

生物量增加百分率(%) =

$$\frac{\text{收获后组培苗总质量} - \text{移栽前组培苗总质量}}{\text{移栽前组培苗总质量}} \times 100\% ;$$

$$\text{单苗老根成活数} = \frac{\text{收获时总老根数}}{\text{移栽前总苗数}} ;$$

$$\text{新芽净增率} = \frac{\text{收获时总新芽数}}{\text{移栽前总苗数}} \times 100\% .$$

1.2.6 菌种鉴定方法

主要根据巴尼特等编著的《半知菌属图解》进行

各菌株鉴定^[3]。

2 结果分析

2.1 内生真菌的分离

2.1.1 最适消毒方法

结果如表1所示,除升汞1 min消毒外,其它消毒方式的空白对照都没有菌的生长,这表明升汞消毒剂量大于2 min就可以防止根外杂菌的生长。剂量过大,分离的菌株数减少,不利于最大限度分离出共生真菌。最适消毒方式为75%乙醇表面消毒3 s,再用0.1% HgCl₂表面消毒2 min。

表1 环草石斛共生真菌分离最适消毒方式筛选

培养天数	酒精消毒3 s					
	升汞 1 min	升汞 2 min	升汞 3 min	升汞 5 min	升汞 7 min	升汞 9 min
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	1	0	0	0	0
6	1	4	1	0	1	1
7	0	1	0	0	1	0
8	0	1	0	0	0	1
9	0	1	0	0	0	2
10	1	0	1	0	0	1
11	4	0	0	0	0	1
12	0	0	0	0	1	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
合计	7	8	2	0	3	6
空白	有菌	无菌	无菌	无菌	无菌	无菌

2.1.2 最适分离培养基

试验结果见表2。由表可知,查氏培养基上生长的菌落数最多为23株。PDA培养基和麦麸糖培养基长出的菌落相同,都为14株,比查氏培养基分离的菌株少。这可能是在PDA和麦麸糖培养基培养基上菌株生长的过快,使生长慢的菌株无法生长,而使总分离菌数减少。环草石斛共生真菌最适分离培养基为查氏培养基。

表2 环草石斛共生真菌分离最适培养基筛选

培养基	分离菌株数(株)
PDA培养基	14
查氏培养基	23
麦麸糖培养基	14

2.1.3 不同器官菌株分离情况

从根中分离出57个菌株,茎中分离出126株,叶中分离出15株。茎中内生真菌最为丰富,其次是根,而叶中内生真菌分离数最少,结果见表3。

表3 环草石斛根、茎、叶共生真菌分离

环草石斛组织	分离菌株数(株)
根	57
茎	126
叶	15

2.2 组培苗促生真菌筛选

2.2.1 初筛结果

初筛共获得不致死菌株 97 株,其中 19 株分离自根,占根中分离菌株的 33.3%;68 株分离自茎,占茎中分离菌株的 54.0%;10 株分离自叶,占叶中分离菌株的 66.7%。组培苗健壮,叶绿,无枯叶,生长势明显优于空白的菌株 34 株,其中 8 株分离自根,占根中分离菌株的 14.0%,22 株分离自茎,占茎中分离菌株的 17.5%,4 株分离自叶,占叶中分离菌株的 26.7%(图 1)。这表明根、茎、叶中分离的菌株都对美花石斛组培苗的生长有促进作用,这与美花石斛的生物学特性有关,美花石斛为附生兰,茎和叶肉质,根系不发达,这些特征决定了美花石斛较难通过根茎叶获得足够的水分和营养,内生真菌的存在,一方面提高了石斛的抗逆性,另一方面提高了石斛对水分和营养的吸收,从而促进组培苗的生长。

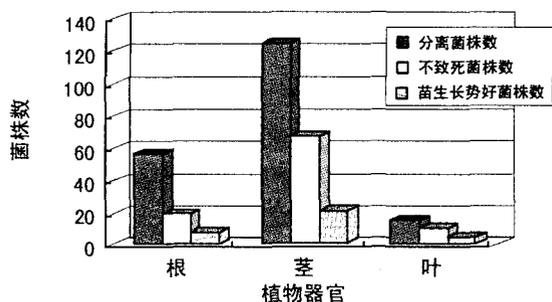


图1 美花石斛不同器官中分离菌株数及初筛菌株数

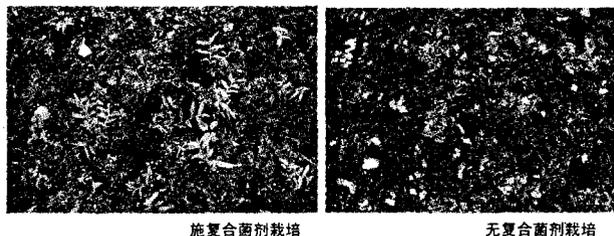


图2 美花石斛组培苗有无复合菌剂栽培

2.2.2 复筛结果

复筛共筛选出 8 株,结果见表 4。其中丝核菌 3 株,为优势菌株,毛茎点霉属、枝孢属、色疣节梗孢属、毛壳菌属和盘多毛孢属各 1 株;这些菌株都明显促进了组培苗的生长,其作用主要在于促进了新苗的形成和减少老根的死亡,少数菌株同时对新根的形成有促

进作用。将 8 个菌株相同比例混合应用于组培苗的栽培,结果表明:其促生效果明显高于空白(图 2)。

表4 环草石斛组培苗有效促生菌复筛的 8 个目标菌株

菌株号	生物量增加百分率	每苗平均存活老根数	每苗平均新根数	每苗平均总根数	新芽净增率(%)	鉴定结果
H 152	13.4%	2.28	0.44	2.72	5.56	毛茎点霉属
H 111	14.3%	1.42	0.75	2.17	5.66	枝孢属
H 64	16.7%	1.84	0.47	2.31	5.00	色疣节梗孢属
H 47	12.5%	1.00	0.90	1.90	6.90	丝核菌属
HY	25.3%	1.68	0.98	2.68	8.33	毛壳菌属
H 151	16.7%	1.96	0.73	2.69	16.42	丝核菌属
H 119	20.7%	1.12	0.93	2.05	22.04	盘多毛孢属
H 310	12.7%	1.24	0.73	1.97	26.98	丝核菌属
空白	6.4%	0.80	0.85	1.65	1.80	

3 讨论

3.1 美花石斛组培苗移栽成活率低、生长慢的原因及解决方法

组培苗由实验室移栽到基质中,存活率低的主要原因是烂根率高,这使得植物体无法进行营养物质的供应,短期内导致植物体生长慢,严重者死亡。这表明,解决移栽成活的关键在于减少老根的烂根率和解决新根产生问题,石斛为中药材,不适宜应用农药来防治腐根;而本研究所筛选的有效菌对这两方面都有一定的作用,同时还明显促进了生长,这对石斛的产业化具有重要意义,本研究只获得初步结果,还有待于进一步优化栽培条件,更大程度上发挥有效菌株的作用。

3.2 美花石斛内生真菌促生作用机理

近年来研究表明,植物内生真菌的促生作用表现在促进植物生长发育、提高植物抗虫抗病能力,并能提高药用植物有效成份的含量^[4-6]。本研究中筛选出的各菌都有助于提高老根存活率,这表明这些菌具有抗病作用,可以有效防止病原菌引起根腐烂,H 152、H 47、HY、H 151 抗病力都显著强于空白;除 HY 和 H 119 可明显促进新根形成外,其他菌株促进新根生成能力都不如空白,但总根数都优于空白,这可能是植物本身的生理特性决定的,植物有了满足生存需要的根时,就产生新根形成的抑制作用;本研究筛选出的各菌可不同程度促进分蘖,产生新苗,尤其是 H 151、H 119 和 H 310 显著促进分蘖,这表明这些菌可产生促进植株分蘖的物质,至于是何种物质,有待于进一步研究。

3.3 美花石斛内生真菌多菌协同促生作用

筛选出的各菌株除 H 151 既具有一定的抗病性,又具有一定的促进分蘖作用外,其他各菌所起的主要作用各不相同,H 152、H 47、HY 以抗病为主;H 119 和 H 310 以促进分蘖为主。将筛选获得的 8 个菌株按等比例混合的菌剂,可显著促进组培苗生长,(转下页)

ipt 基因表达及外源细胞分裂素对油菜幼苗侧根发育的影响

朱友银^{1,2}, 赵德刚^{1,2}

(1. 贵州大学生命科学学院贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025;

2. 贵州大学教育部绿色农药与农业生物工程重点实验室, 贵阳 550025)

摘要:通过对转 ipt 基因油菜 (*Brassica napus* L.) 及野生型油菜种子的发芽培养, 研究了 ipt 基因的表达及外源细胞分裂素对油菜种子幼苗侧根发育的影响。结果表明: ipt 基因表达和高浓度的外源细胞分裂素对油菜幼苗主根长度、侧根原基的起始及侧根的发生均表现出明显的抑制作用。当 KT 和 6-BA 浓度达到 1 mg/L 时, 侧根的发生被完全抑制, 外源生长素 IBA 可以缓解 ipt 基因过量表达对油菜种子侧根发育的抑制作用。

关键词: ipt 基因; 细胞分裂素; 侧根; 油菜幼苗

中图分类号: S565.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-4705(2007)12-0020-04

The Effects of ipt Gene Expression and Exogenous Cytokinins on Lateral Roots Development in Rape Seedling

ZHU You-yin^{1,2}, ZHAO De-gang^{1,2}

(1. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering,

College of life sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Guizhou Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guiyang 550025, China)

Abstract: We have observed the effect of ipt gene expression and exogenous cytokinins on various stages of LR formation using rape (*Brassica napus* L.), transgenic seeds and control seeds as the plant materials. Our results showed that ipt gene expression and exogenous cytokinins have an inhibitory effect on length of seminal root, initiation, emergence of lateral root primordium (LRP) and LR formation. Both KT and 6-BA at a concentration of 1 mg/L and above completely inhibited initiation, emergence of LRP. Exogenously auxin counteracted the inhibitory effect of ipt gene expression on LR initiation and suggesting that exogenously auxin could induce LR initiation.

Key word: ipt gene; cytokinin; lateral roots; rape seedling

收稿日期: 2007-09-06

基金项目: 科技部国际科技合作计划(专项经费)项目[2007 DFA 31260]。

作者简介: 朱友银(1980-), 男, 在读博士研究生, 研究方向: 转基因生物农药及生物技术制药。

通讯作者: 赵德刚, E-mail: dgzhao@gzu.edu.cn。

(接上页)

这表明美花石斛内生真菌所起的促生作用是多个菌的协同作用, 一些菌提高其抗病性, 另一部分菌促进其生长。本研究为进一步研制多菌复合菌剂, 应用于栽培, 对促进美花石斛产业化具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 秦海林, 张建新, 杨小生, 等. 环草石斛 I H-NMR 指纹图谱 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 919-923.
[2] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版 [M]. 北京:

高等教育出版社, 1999: 214-215.

- [3] H. L 巴尼特, B. B 亨特著. 沈崇尧译. 半知菌属图解 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 1-240.
[4] 官珊, 钟国华, 孙之潭, 等. 植物内生真菌的研究进展 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(1): 61-66.
[5] 陈利军, 陈月华, 史洪中, 等. 药用植物内生真菌研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(11): 2438-2440.
[6] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1505-1519.