

内生真菌和培养基对大戟组培苗生长和炼苗的影响

勇应辉, 戴传超, 杨启银*, 张波 (南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046)

摘要 [目的] 寻求提高大戟组培苗成活率的途径。[方法] 研究了 3 种内生真菌、不同浓度的琼脂和活性炭对药用植物大戟组培苗生长和炼苗成活率的影响。[结果] 接种大戟的内生真菌 E5(*Fusarium* sp.) 能显著促进大戟组培苗的生长, 使其炼苗后的成活率达 100%。大戟株高和平均生根数在琼脂为 14 g/L、活性炭为 0.05 g/L 的培养基中最高, 分别为 (4.56 ± 0.67) cm 和 (3.9 ± 0.6) 条, 炼苗成活率达 68%。当培养基琼脂为 8 g/L 和活性炭为 0 时, 大戟组培苗的生物量、主根根长和叶片数最高, 分别为 (0.267 ± 0.053) g、 (6.35 ± 0.68) cm 和 (13.8 ± 1.7) 片, 成活率达 70%。与培养基成分的变化相比, 添加内生真菌对组培苗的影响更显著。[结论] 植物自身的内生真菌有利于进一步提高组培苗的成活率, 这对于大戟大量繁殖具有积极意义。

关键词 大戟; 组织培养; 内生真菌; 成活率

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)02-00505-03

Effects of Endophytic Fungi and Different Mediums on Growth and Transplanting and Exercising of Tube Seedling in *Euphorbia pekinensis*

YONG Ying-hui et al (College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046)

Abstract [Objective] The study aimed to seek for approaches of increasing the survival rate of tissue culture seedlings in *Euphorbia pekinensis*. [Method] The effects of 3 kinds of endophytic fungi, the agar and activated carbon with different concentration on the growth of tissue culture seedling of *E. pekinensis* and their survival rates of transplanting and exercising were studied. [Result] The endophytic fungi E5 inoculated on *E. pekinensis* could promote growth of tissue culture seedlings of *E. pekinensis*, with the survival rate of exercising seedlings being up to 100%. When the medium was with agar and active carbon of 14 and 0.05 g/L, resp., the plant high and mean roots of *E. pekinensis* seedlings were highest, being (4.56 ± 0.67) cm and (3.9 ± 0.6) resp., and the survival rate of exercising seedlings reached 68%. When the medium was with 8 g/L agar and without active carbon, the biomass, main root length and leaf number in tissue culture seedling of *E. pekinensis* was (0.267 ± 0.053) g, (6.35 ± 0.68) cm and (13.8 ± 1.7) , with the survival rate of plantlet being 70%. Compared with the change of the mediums component, the effect adding endophytic fungi on growth of tissue culture seedling was more obvious. [Conclusion] The endophytic fungi in plant itself can favor to enhance the survival rates of tissue culture seedling further, which has active meaning for mass reproduction of *E. pekinensis*, and it has great value for widely culturing of *Euphorbia pekinensis*.

Key words *Euphorbia pekinensis*; Tissue culture; Endophytic fungi; Survival rates

大戟(*Euphorbia pekinensis*)俗称京大戟,是我国民间常用的大戟科大戟属药用植物,性苦、寒,有毒。其根茎用于治疗水肿、血吸虫病、肝硬化、结核性结膜炎引起的腹水和胸腔积液,外用于疮、疖肿等^[1]。其主要成分为二萜和三萜类化合物、鞣质、甾体、萜醌、黄酮等,具有抗肿瘤、抗白血病、抗菌、抗病毒等作用^[2]。

由于大戟是多年生宿根植物,生长慢,上市周期长,种子数量少,繁殖受限制的因素很多,难以满足人们对该药材的需求。南京师范大学生命科学学院实验室先前已开展大戟苗的扦插和组织培养研究^[3],扦插成活率较高,但季节性较强,并且缺乏足够的扦插材料。进一步研究发现,组培苗生根后炼苗是大戟苗大量繁殖最重要的一个环节,提高炼苗成活率是决定组培成败和降低组培成本的关键。分析原因,主要是由于大戟组培苗根系不够发达,含乳汁较多,出瓶后湿度过低,极易萎蔫枯死,若湿度过高,植株又极易腐烂。有文献报道,在植物组培生根培养基中添加适量活性炭可促进不定根的诱导并提高生根率^[4],提高琼脂浓度有利于促进组培苗的生根并提高其根系活力,防止组培苗玻璃化^[5]。前期研究和文献均表明,内生真菌能促进组培苗的生长和增殖^[6-7],同时促进宿主植物侧芽和侧根的萌发^[8-9]。而内生真菌能否提高大戟组培苗炼苗成活率尚未见报道。笔者尝试通过 2 种途径来提高组培苗的成活率:一是改变培养基的成分,提高根系活力;二是添加内生真菌,提高苗的适应能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。大戟原植物采自安徽省琅琊山森林公园,经江苏省植物研究所徐增荣同志鉴定后移栽于花盆中^[3]。通过组织培养得到其无菌试管苗,株高 2~3 cm。

1.1.2 内生真菌菌种。3 种内生真菌均由南京师范大学生命科学学院实验室分离、鉴定和保存, E4(*Fusarium* sp.) 和 E5(*Fusarium* sp.) 分离自大戟, B3(*Phomopsis* sp.) 分离自重阳木(*Bischofia polycarpam*)。使用前先接种在马铃薯葡萄糖培养基(PDA)上活化培养 7 d。

1.1.3 培养基。植物材料继代培养基为 1/2 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 8 g/L 的固体培养基,其他几种应用于试验的培养基见表 1,用 0.2 mol/L KOH 和 0.2 mol/L HCl 调 pH 值为 5.8,然后高压高温(121 ℃)灭菌 20 min^[10]。植物内生真菌菌种保存和活化培养基均用马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

1.2 方法

1.2.1 组织培养。剪取在 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 8 g/L 培养基上生长 2 个月左右、长势较一致、高约 2 cm 的大戟苗,分别移入继代培养基和其他几种处理培养基中,每个装有 50 ml 培养基的 100 ml 三角瓶中接入 2 株大戟苗,相距 1.5~2.0 cm,称量并记录每瓶的接种量。培养温度为白天(24±2)℃,夜间(18±2)℃,光照强度 1 500 lx,光照时间 12 h/d。

1.2.2 接菌培养。于转接后培养的第 3 周,将经马铃薯葡萄糖培养基活化培养 7 d 的 3 种内生真菌分别用打孔器(直径 9 mm)在菌落表面打取平板菌片,然后用接种针将菌片接种于 2 株苗中间的培养基上,每瓶接种 1 片,与大戟共生培养,提高了琼脂浓度和添加不同浓度活性炭的培养基中

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30500066)。

作者简介 勇应辉(1981-),女,江苏宜兴人,硕士研究生,研究方向:微生物与植物相互关系。* 通讯作者, E-mail: yangqiyin@njnu.edu.cn。

收稿日期 2007-09-17

不接菌。2 种处理的对照相同(即在继代培养基中只接种苗不接种真菌)^[11]。采用完全随机试验设计,每种处理重复 10 瓶。定期观察并记录苗和内生真菌的生长情况。

1.2.3 炼苗。所有处理组均于转接后培养的第 9 周开始炼苗,先在室温条件下打开封口膜,3~4 d 后把组培苗从培养瓶中取出,洗净根部的培养基,对生物量、根数、根长和株高等生物学性状进行测定。然后移栽入草炭:蛭石:珍珠岩=1:1:1 的基质中,适时喷水,并用塑料小拱棚保湿和遮阴。

1.2.4 统计方法。用 SPSS10.0 统计软件处理大戟的生物量、根数、主根长、株高,并分别与对照进行方差分析,如果 *F* 检验均数间存在显著或极显著差异,进一步进行 *q* 检验(Newman-Keuls 检验),找出主要影响因素和最佳处理方法,结果以“均值±标准差”的形式表示^[12]。

2 结果与分析

2.1 提高琼脂浓度和添加不同浓度活性炭对大戟组培苗生长的影响 转接到各处理培养基中的大戟组培苗生长比对照缓慢,生根时间也明显晚于对照组,根系不如对照发达,尤其在含 12~14 g/L 琼脂和浓度为 0.30~0.40 g/L 活性炭

的培养基中生长的大戟,大部分基部仅略膨大,不长根,1 周以后,基部叶片开始变黄,甚至出现了凋落现象。

2.2 提高琼脂浓度和添加不同浓度活性炭对大戟组培苗生长指标的影响 从表 1 可以看出,在培养基中添加活性炭和提高琼脂浓度后能明显影响大戟组培苗的生长,其中添加 0.05 g/L 活性炭和 14 g/L 琼脂的培养基中的大戟长势显著高于其他处理组,平均根数为 3.9,与对照相同,平均株高比对照提高了 1.8%,炼苗成活率达 68%。随着活性炭浓度的提高,大戟组培苗的生物量、主根根长和生根数量以及炼苗成活率都逐渐降低,且各指标均低于对照;在琼脂浓度呈上升趋势的培养基中,其他各组处理的变化没有规律。当培养基中琼脂和活性炭浓度分别达到 16 和 0.40 g/L 时,大部分大戟都不生根,对其他指标的影响也都达到了极显著水平。由此可见,提高琼脂浓度和添加活性炭对大戟组培苗的生长没有促进作用,反而在一定程度上降低了大戟植株的各生长指标,使植株矮小,根系生长时不能展开,长势较差,枯黄凋落的叶片也较多,30%的苗未长出根,炼苗后成活率都在 70%以下。

表 1 提高琼脂浓度和添加不同浓度活性炭对大戟组培苗生长指标的影响

Table 1 Effects of enhancing agar concentration and adding different concentrations active carbon on the growth index of tissue culture seedlings of *Euphorbia pekingensis*

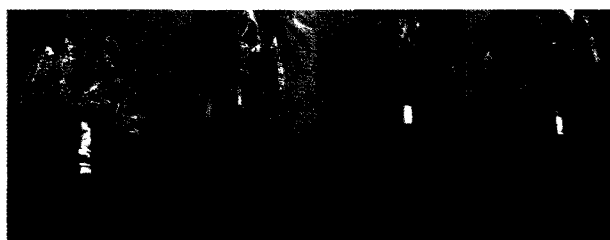
活性炭//g/L Active carbon	琼脂//g/L Agar	生物量//g Biomass	株高//cm Plant height	主根根长//cm Taproot length	叶片数//片 Number of leaves	生根数//条 Root number	成活率//% Survival ratio
0	8	0.267±0.053	4.48±0.80	6.35±0.68	13.8±1.7	3.9±0.7	70
0.05	8	0.236±0.037	4.40±0.82	5.14±0.63	10.8±1.7 ²⁾	3.6±0.7 ¹⁾	64
	10	0.219±0.041	4.09±0.78	5.84±0.72	11.8±1.9 ¹⁾	2.9±0.6 ²⁾	61
	12	0.223±0.032	4.11±0.80	4.70±0.67	12.2±1.7	3.2±0.5 ¹⁾	65
	14	0.259±0.028	4.56±0.67	4.24±0.69	13.6±1.9	3.9±0.6	68
0.10	16	0.238±0.035	5.03±0.55	4.55±0.78	10.1±0.9 ¹⁾	3.7±0.7	60
	8	0.206±0.023 ¹⁾	4.10±0.79	1.03±0.31 ²⁾	6.6±0.8 ²⁾	1.5±0.3 ²⁾	40
	10	0.205±0.022 ¹⁾	4.04±0.52	5.61±0.78	9.1±0.9 ²⁾	2.6±0.5 ²⁾	58
	12	0.208±0.045 ¹⁾	4.14±0.71	2.94±0.51 ²⁾	11.3±0.8	3.1±0.7 ²⁾	59
0.20	14	0.213±0.040	4.53±0.73	3.02±0.52 ²⁾	10.0±0.9	3.3±0.4	53
	16	0.210±0.034 ¹⁾	4.33±0.83	2.99±0.46 ²⁾	11.5±1.0	3.6±0.6	50
	8	0.205±0.036 ¹⁾	3.56±0.46 ²⁾	4.19±0.73	8.9±0.9 ²⁾	2.8±0.5 ¹⁾	47
	10	0.204±0.028 ¹⁾	3.55±0.58 ²⁾	2.09±0.47 ²⁾	9.7±0.8 ²⁾	2.8±0.4 ¹⁾	52
0.30	12	0.202±0.027 ¹⁾	3.57±0.42 ²⁾	3.58±0.55 ²⁾	7.1±0.9 ²⁾	2.6±0.5 ²⁾	50
	14	0.198±0.021 ²⁾	3.16±0.50 ²⁾	2.26±0.36 ²⁾	7.6±0.7 ²⁾	3.2±0.6 ²⁾	48
	16	0.206±0.031 ¹⁾	4.24±0.69	3.15±0.45 ²⁾	5.5±0.6 ²⁾	3.0±0.5 ¹⁾	53
	8	0.202±0.045 ¹⁾	3.84±0.42 ²⁾	1.58±0.19 ²⁾	8.0±0.5 ²⁾	2.6±0.5 ²⁾	45
0.40	10	0.182±0.032 ²⁾	3.09±0.38 ²⁾	1.27±0.22 ²⁾	8.1±0.7 ²⁾	2.1±0.4 ²⁾	32
	12	0.185±0.028 ²⁾	3.16±0.41 ²⁾	3.03±0.56 ²⁾	9.1±0.9 ²⁾	2.4±0.3 ²⁾	36
	14	0.174±0.025 ²⁾	2.88±0.31 ²⁾	1.71±0.20 ²⁾	9.2±0.8 ²⁾	1.5±0.1 ²⁾	20
	16	0.193±0.034 ²⁾	3.42±0.55 ²⁾	2.64±0.43 ²⁾	8.2±0.9 ²⁾	2.1±0.3 ²⁾	30
	8	0.184±0.039 ²⁾	3.19±0.45 ²⁾	1.99±0.37	6.4±0.9 ²⁾	1.4±0.2 ²⁾	20
	10	0.171±0.026 ²⁾	2.83±0.43 ²⁾	3.08±0.57	8.2±0.8 ²⁾	0.8±0.3 ²⁾	15
	12	0.169±0.029 ²⁾	3.74±0.65	0.48±0.08 ²⁾	8.3±0.9 ²⁾	0.5±0.5 ²⁾	10
	14	0.185±0.033 ²⁾	3.45±0.49 ¹⁾	1.49±0.18	8.7±0.9 ²⁾	2.2±0.2 ²⁾	30
	16	0.172±0.027 ²⁾	3.22±0.55 ²⁾	1.02±0.15 ¹⁾	7.6±0.8 ²⁾	1.3±0.4 ²⁾	25

注:培养基为 1/2 MS+蔗糖 30 g/L+活性炭+琼脂。与对照组比较,¹⁾表示 $P<0.05$,²⁾表示 $P<0.01$,下同。

Note: Culture medium is 1/2MS with sucrose 30 g/L, active carbon and agar. Compared with control, 1) means $P<0.05$, 2) means $P<0.01$. The same as follows.

2.3 内生真菌处理对大戟组培苗生长的影响 由图 1 可见,E5 菌生长速度较快,1 周后与植株接触,2 周后占满培养基,同时开始产生红色色素,颜色逐渐加深,并渗透到培养基内部,植株生长比对照更旺盛,叶片更大、更绿,黄叶少,根系发达。E4 菌在培养基上生长速度较慢,3 周后才长满培养基,并分泌浅红色色素,植株生长与对照差别不大。B3 菌生长速度中等,与其共生的大戟生长状态较差,苗细弱,新长出的叶片变小,基部黄叶较多,根茎部都发生萎蔫(图2)。

2.4 接种内生真菌对大戟生长指标的影响 由表 2 可以看出,与大戟本身内生真菌共生的组培苗的生物量明显比对



注:A 为对照,B 为 E5 菌处理,C 为 E4 菌处理,D 为 B3 菌处理。下同。
Note: A: Control; B: Treated by strain E5; C: Treated by strain E4; D: Treated by strain E3. The same as follows.

图 1 各处理大戟组培苗在培养基上的生长状况

Fig. 1 The growth status of *Euphorbia pekingensis* on different medium

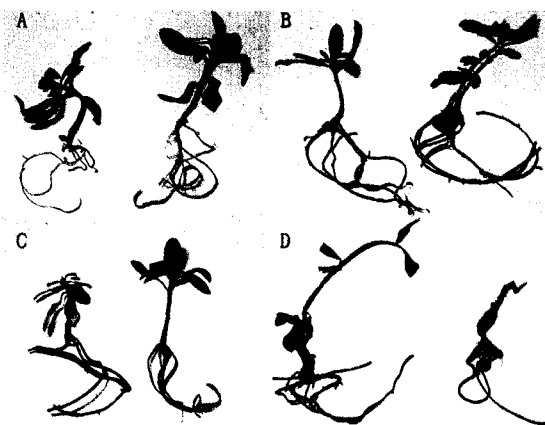


图 2 各处理大戟组培苗的形态

Fig. 2 Morphology of tissue culture seedling of *Euphorbia pekinensis* in each treatment

照高,其中 E5 处理的大戟平均生物量达 0.316 g,比对照提

表 2 3 种内生真菌对大戟生长指标的影响

Table 2 Effects of 3 endophytic fungi on the growth index of *Euphorbia pekinensis*

处理 Treatment	生物量//g Biomass	生根数//条 Rooting number	主根根长//cm Taproot length	叶片数//片 Number of leaves	株高//cm Plant height	成活率//% Survival ratio
对照 Control	0.267±0.053	3.9±0.7	6.35±0.68	13.8±1.7	4.48±0.80	70
E5 菌 Strain E5	0.316±0.072 ²⁾	6.0±0.8 ²⁾	5.99±0.98	13.5±1.8	5.64±0.62 ²⁾	100
E4 菌 Strain E4	0.293±0.045 ¹⁾	4.5±0.9	6.63±0.65	12.8±1.7	4.43±0.91	80
B3 菌 Strain B3	0.235±0.034 ¹⁾	4.8±0.8	6.90±0.68	9.8±0.8 ¹⁾	3.59±0.67 ¹⁾	0

3 讨论

郑成木等研究表明,琼脂浓度通过影响培养基通气性及材料与培养基的接触面积,进而影响组培苗的生根^[13]。该试验结果表明,随琼脂浓度的增加,根的发生和生长变慢,根变短、变粗,有的植株甚至不萌发根,从而降低了大戟组培苗的质量和炼苗后的成活率。这可能是由于琼脂浓度的增加减少了根系与培养基接触的面积,相对减小了根系吸收的表面积,同时增大了根伸长生长的阻力,降低了培养基的渗透势,因而降低了根系的生长量,这与李胜等对葡萄试管苗的研究结果一致^[14],而与王晓明等认为添加适量(100~400 mg/L)的活性炭能促进灰毡毛忍冬的生根和生长^[15]的结果相反。该研究发现,活性炭对大戟组培苗的生长并无促进作用,可能是活性炭吸附了培养基中的部分养分,影响了大戟的正常生长。由此可见,植物材料不同,活性炭起的作用也不相同。

接种 E5 菌后,极显著地提高了大戟组培苗的株高和生根数量,其生长状况较好,极大地增强了组培苗对环境的适应能力,显著提高了组培苗炼苗后的成活率。内生真菌 E4 对大戟组培苗的生长状态影响不显著,而由于 B3 菌是重阳木的内生真菌,其菌丝侵入大戟组培苗的根茎部后,可能不能与大戟建立良好的共生关系,对大戟苗生长有致死作用,不适合与大戟共培养。说明利用内生真菌促进组培苗的生长是有条件和相对的。

结合成本等因素考虑,在大戟组织培养中,可选择琼脂浓度为 8 g/L、不添加活性炭的生根培养基,同时可以利用大戟本身的内生真菌 E5 来促进大戟组培苗移栽成活。这也为大戟及其他药用植物的栽培提供了新途径。有文献报道,

高了 17.8 %($P<0.01$);接种 E4 菌的大戟生物量比对照提高了 9.7 %($P<0.05$)。而 B3 菌显著降低了大戟组培苗的生物量。接入内生真菌后的大戟根数都比对照高,其中接种 E5 菌的植株平均根数最多,为 6 根,比对照多了 54.64 %。各处理的主根根长差别不大,接种 B3 菌的大戟主根最长,平均主根根长达 6.90 cm,但比对照仅高 8.66 %。各处理间叶片数的差别不是很明显,接 E5 菌的植株叶片数最多,比对照高了 7.69 %。炼苗结果表明,由于移栽时组培苗根系受损,吸收水分和养分的能力不强,叶片越多,蒸腾作用越强,适应外界湿度较低的环境能力反而较差,叶片太少光合作用能力也不够强,故叶片数适中比较好。各处理对株高的影响很明显,其中 E5 菌极显著地促进了大戟的生长,其平均株高达 5.64 cm($P<0.01$),比对照高了 25.89 %。B3 菌处理的大戟最矮,平均株高仅为 3.59 cm($P<0.01$)。

内生真菌能提高金钗石斛多糖和总生物碱的含量^[6],而内生真菌 E5 侵染大戟组培苗后产生影响的作用原理以及是否可以同时提高大戟的有效药用成分,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药材公司. 药用植物资源志要 [M]. 北京: 科学出版社,1994: 618-641.
- [2] 江苏新医学院. 中药大词典 [M]. 上海: 上海人民出版社,1977: 108-109.
- [3] 戴传超,余伯阳,董晨,等. 药用植物大戟的快速繁殖研究 [J]. 广西植物,2005,25(2): 152-155.
- [4] 刘很林,梁珍海,朱军. 活性炭在植物组织培养中的作用概述 [J]. 江苏林业科技,2001,28(5): 46-47.
- [5] 冯丹丹,王红梅,张丽杰,等. 光照、琼脂和碳源对离体培养中水曲柳根尖生长的影响 [J]. 植物研究,2006,26(4): 424-426.
- [6] 戴传超,余伯阳,赵玉婷,等. 大戟内生菌的抑菌活性及其与宿主相关性研究 [J]. 应用生态学报,2005,16(7): 1290-1294.
- [7] 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]. 中草药,2002,33(6): 543-545.
- [8] 陈晓梅,郭顺星. 4 种内生真菌对金钗石斛无菌苗生长及其多糖和总生物碱含量的影响 [J]. 中国中药杂志,2005,30(4): 253-257.
- [9] 宋经元,郭顺星. 离体培养时真菌对铁皮石斛和金钗石斛生长的影响 [J]. 中国医学科学院学报,2001,23(6): 547-551.
- [10] MURASHIGE T,SKOOG F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. Physical Plant, 1962,15(4): 473-479.
- [11] 于雪梅,郭顺星. 金钗石斛与内生真菌共生培养体系的建立 [J]. 中国中药杂志,2000,25(2): 81-83.
- [12] 张勤,张启能. 生物统计学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社,2002: 94-130.
- [13] 郑成木,刘进平. 热带亚热带植物微繁殖 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社,2001: 25-31.
- [14] 李胜,张真,李婷,等. 培养基和培养条件对葡萄试管苗生根的影响 [J]. 甘肃农业大学学报,2006,41(1): 24-29.
- [15] 王晓明,李永欣,易霞琴,等. 灰毡毛忍冬新品种组培苗生根的研究 [J]. 河南林业科技,2006,26(4): 1-3.
- [6] 钟士传,王侠礼. 一品红茎段离体快速繁殖研究简报 [J]. 中国农学通报,1999(3): 74-75.

(上接第 504 页)

[5] 蒋小满,柏新富. 六种矮型一品红的离体组织培养技术研究 [J]. 北方园艺,2002(3): 62-63.