

真菌诱导子对象牙白原球茎生长的影响

赵建娜, 刘红霞*

北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083

【摘要】 在1/2MS基本培养基中, 分别加入由野生春兰和华石斛根部分离到的内生真菌所制成的4种菌丝提取物, 对象牙白种子萌发形成的原球茎进行诱导培养。结果表明: 4种菌株诱导子中3种可不同程度地促进象牙白的生长和分化。对象牙白原球茎的诱导作用依次为HF26>CF6>CF8, 与对照相比, HF26菌株显著提高了象牙白的鲜重 ($P<0.05$), 鲜重增长率分别为96.13%、86.86%和61.18%; 干物质重分别增加了130.70%、96.50%和124.30%, 均达到极显著水平 ($P<0.01$)。此外, CF8 菌株能促进根条数的增加; HF26菌株最有利于原球茎的增殖; CF6菌株在促进成苗和根原基的分化上效果显著。结论: 在象牙白原球茎生长的不同阶段, 能够促进其达到最佳生长状态的菌株是不同的。

关键词: 真菌诱导子; 象牙白; 原球茎; 组织培养

中图分类号: S682.31; S718.81

文献标识码: A

文章编号: 1008-8873(2008)03-134-04

Effects of fungal elicitors on the protocorm of *Cymbidium eburneum*

ZHAO Jian-na, LIU Hong-xia*

The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Growth of protocorm of *Cymbidium eburneum* induced on basal culture medium of 1/2 MS by four fungal elicitors, which were isolated from the roots of *Cymbidium goeringii* and *Dendrobium sinens* was examined in our study. The results showed that three fungal elicitors out of four considerably promoted the growth and differentiation of protocorm, and that the inducing effects were in the order of HF26>CF6>CF8. Compared with the control group, HF26 strain was found to increase the fresh weight of *C. eburneum* ($P<0.05$). The increased rates in fresh weight were 96.13%, 86.86% and 61.18%, while the increased rates in dry weight were 130.70%, 124.30% and 96.50%, respectively ($P<0.01$). In addition, CF8 strain could promote the number of roots; HF26 strain was beneficial to multiplication of protocorm; CF6 strain had a remarkable effect on seedling establishment and differentiation of root primordia. It can be concluded that different fungus have different effects on the growth of protocorm of *Cymbidium eburneum* in different growth stages.

Key words: fungal elicit; *Cymbidium eburneum*; protocorm; tissue culture

收稿日期: 2008-05-08 收稿, 2008-06-15接受

基金项目: 北京市教委科研基地共建项目; 长江学者和创新团队发展计划 (PCSIRT0607)

作者简介: 赵建娜 (1982—), 女, 北京林业大学在读硕士生, 研究方向为菌根真菌及其应用。E-mail: jiannazhao@yahoo.cn

*通讯作者: E-mail: hongxia@bjfu.edu.cn

1 前言 (Introduction)

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的活性物质, 能够引起植物代谢过程的一系列变化, 最终使植物产生防卫反应, 是一个连续的、信号逐级传导的过程^[1]。1968年, Cruickshank和Perrin将从丛梗孢科链核盘属链合盘菌 *Monilinia f. ructicola* (Winter) Honey 菌丝体中分离出的 monilicolin A (多肽链核盘素A) 加入培养基, 发现多肽链核盘素A 能够诱导菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 内果皮的发生和菜豆素 (phaseollin) 的积累, 这是最早有关诱导子促进植物次生代谢和防卫反应的报道^[2]。陈晓梅等将分离自铁皮石斛 (*Dendrobium candidum*) 根部的内生真菌, 经麦麸培养基液体发酵培养所得的小菇属真菌发酵液, 能够促进铁皮石斛原球茎的生长, 显著提高原球茎的折干率, 并且认为在铁皮石斛原球茎培养的后期加入诱导子, 能够改善培养基中的水分和营养条件, 影响原球茎的生长和代谢^[3]; 张长平等也发现在细胞指数生长末期加入真菌诱导子, 能够调控细胞次生代谢, 刺激并加强细胞特定基因的表达, 最终导致目的产物产量的明显提高^[4]。吴智彪等将华石斛 (*Dendrobium sinens*) 内生真菌制作为真菌诱导子, 其中5种可以不同程度地促进华石斛的生长^[5]。潘超美等研究表明不同真菌诱导子对铁皮石斛产生的效应稍有差异^[6]。兰科植物中, 该方面的研究主要集中在具有药用价值的石斛及金线莲 (*Anoectochilus roxburghii*) 上, 而关于内生真菌诱导子对象牙白生长影响的研究尚未见报道。

象牙白 (*Cymbidium eburneum* var. *album*) 是兰属植物独占春的一个变种, 是海南岛及云南特有的名贵花种之一^[7]。中国产象牙白是一种气生兰, 原球茎诱导比较容易, 是杂交育种的良好亲本^[8]。近年来, 已有利用象牙白种子播种^[7]和茎尖无性繁殖^[9]获得象牙白组培苗的报道, 本实验旨在通过组织培养的方法, 利用真菌诱导子促进象牙白原球茎细胞的生长和分化, 为提高象牙白组培苗大规模繁殖生产效率探索新途径。

2 材料与方法 (Materials and Methods)

2.1 材料

种子无菌播种由来的象牙白原球茎为海南博大

高科农业发展有限公司提供。本实验对该些原球茎继代培养45 d, 选择生长旺盛且生长较一致的组织培养物作为接种材料。

供试菌株: 保存于北京林业大学森林病理教研室 (表1)。

表1 供试菌株

Tab. 1 Fungal strains for test

菌株 Strains	分离材料 Separation materials	属 Genus	种 Species
CF3	春兰 <i>Cymbidium goeringii</i>	伞状霉属 <i>Umbelopsis</i>	未鉴定 Unidentified
CF6	春兰 <i>Cymbidium goeringii</i>	交链孢属 <i>Alternaria</i>	细交链孢霉 <i>Iternar iatenuis</i>
CF8	春兰 <i>Cymbidium goeringii</i>	毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	螺旋毛壳菌 <i>Chaetomium cochliodes</i>
HF26	华石斛 <i>Cymbidium goeringii</i>	镰孢属 <i>Fusarium</i>	未鉴定 Unidentified

2.2 真菌菌株的复壮及诱导子制备

菌株在改良的PDA培养基上活化复壮, 将菌丝体转移到上述不含琼脂的液体培养基中; 黑暗条件, 28℃下, 摇床(100~120 r·min⁻¹)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121℃灭菌30 min后备用。

2.3 培养基与培养方法

以1/2MS+3%蔗糖+0.6%琼脂 (pH 5.8) 为基本培养基, 分别加入CF3、CF6、CF8、HF26菌株制备物40 mL·L⁻¹和不加菌液的对照 (CK) 共5个处理, 将继代培养的培养物用电子天平称量鲜重 (天平精度0.0001 g), 转接到上述各处理的培养基中, 每个处理接种10瓶。置于25℃, 相对湿度70%~75%, 每天光照14 h, 光照强度为4 000 Lx的人工气候箱中培养, 80 d后收获原球茎。

2.4 原球茎生物量及分化程度的统计

每个处理随机取5瓶作相关指标的检测。逐瓶在

解剖镜下观察和测量拟原球茎的分化程度,以瓶为单位进行统计。对各处理组所增加的组培物鲜重、干重分别进行单因素方差分析,并进行多重比较,以确定最佳菌株的真菌诱导子。

3 结果与分析 (Results and Analysis)

3.1 真菌诱导子对象牙白生长量的影响

培养过程中,象牙白原球茎生长量一直缓慢持续上升(图 1),与对照组比较,加入诱导子 CF6、CF8、HF26 的培养基中的象牙白原球茎生长量(鲜重)明显高于对照组。而 CF3 在生长后期的促进效果与对照组差异不大。不同真菌诱导子对象牙白原球茎生长的促进作用有所不同,其作用强度依次为 HF26>CF6>CF8>CF3。与对照组相比,鲜重增加了 13.82%~96.13%,从鲜重增长量、干物质的积累及干鲜比来看,均以 HF26 菌株效果最佳(表 2)。

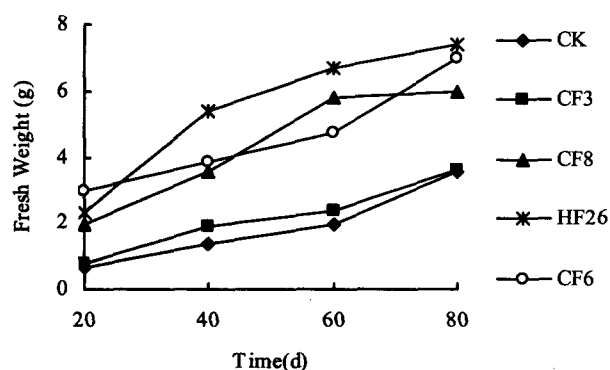


图 1 不同菌株诱导子对象牙白原球茎生长的影响

Fig. 1 The effects of various fungal elicitors on the growth of protocorm in *C. eburneum* var. *album*

3.2 真菌诱导子对象牙白原球茎分化的影响

培养 20 d 后,各处理培养基上开始产生紧密成团块状的原球茎,并部分形成顶端伸长的桃形原球茎。加了诱导子的处理中,原球茎增殖数目多,颜色翠绿,芽与根同时分化,整齐一致,对照培养中的芽颜色呈淡绿色。80 d 收获时,CF6、CF8、HF26 三种处理中,部分幼芽已长成小苗。4 个处理中原球茎形成数目及成苗植株的株高、茎粗均高于对照(表 2),表明 4 种真菌诱导物均可不同程度地促进原球茎的增殖和分化。

表 2 不同菌株诱导子对象牙白原球茎鲜重和干重的影响

Tab. 2 The effects of various fungal elicitors on the fresh weight and dry matter weight of protocorm in *C. eburneum* var. *album*

来源菌株	鲜重	Fresh weight	干重(mg)	干鲜比
株	增长量(mg)	增长率(%)	Dry weight	Dry/Fresh
Strains	Increment	Increase rate		
CK	1252.16	—	40.83	0.0216
CF3	1425.22	13.82	46.94	0.0217
CF6	2339.82	86.86	96.50**	0.0223
CF8	2018.24	61.18	124.31**	0.0229
HF26	2455.92*	96.13	130.72**	0.0281

注:与对照组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the control group * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 3 不同菌株诱导子对象牙白组织培养物生长及分化的影响

Tab. 3 The effects of various fungal elicitors on the growth and differentiation of the tissue culture in *C. eburneum* var. *album*

来源菌株	原球茎(个)	苗数(株)	株高(mm)	茎粗(mm)
Strains	Numbers of protocorm	Seedling number	Plant height	Stem thickness
CK	19	8.51	9.80	1.40
CF3	23	10.30	8.50	1.64
CF6	27	13.22	14.51	2.11
CF8	31	12.81	15.33	2.10
HF26	35	12.30	13.32	2.00

注(Note): 以瓶为单位进行统计。Taking the bottle as the unit of statistics

3.3 真菌诱导子对象牙白根分化的影响

象牙白原球茎在各处理的培养基中都能较快形成根的分化,80 d 收获时,各处理表面均有大量气生根存在,加入诱导子的 4 种培养基中根的数目及根原基的数目较对照高,但根的长度除 HF26 外均较对照低(见表 3)。CF6 和 CF8 能够明显地促进象牙白根的分化和形成,收获时,根的长度为 2~4.2 cm,颜色淡绿。不加诱导子的对照处理组,成苗植株较纤细,根细长瘦弱。

4 讨论 (Discussion)

在象牙白原球茎固体培养基中加入不同真菌诱导子,从鲜重的增长量看,真菌诱导子对象牙白有一

定的促进作用,在干物质积累方面则极显著的高于对照。表明,与真菌诱导子共生的象牙白植株组织结构紧密,有机物质积累多。不同的诱导子所产生的效应稍有差异。其中, HF26 菌株在鲜重的增加、干物质

表 4 不同菌株诱导子对象牙白根分化的影响

Tab. 4 The effects of various fungal elicitors on the root differentiation in *C. eburneum* var. *album*

来源菌株 Strains	根条 (条) Roots number	根总长(mm) Roots length	根原基数 (个) Numbers of root primordia
CK	9.00	30.50	1.25
CF3	10.52	27.81	1.75
CF6	12.81	29.50	4.50
CF8	14.30	25.00	3.30
HF26	12.20	35.00	3.00

积累和原球茎增殖方面效果显著, CF8 菌株能有效促进原球茎根条数的增加, 而 CF6 菌株在促进成苗和根原基的分化上高于其他诱导子, 表明这三种诱导子中含有一些有利于象牙白细胞生长的物质。CF3 在象牙白生长后期的作用不明显。

本实验结果表明, 在象牙白原球茎生长的不同阶段, 能够促进其达到最佳生长状态的菌株是不同的。所以, 将有效菌株进行组合, 寻找最佳组合方式可能能够更快、更有效的促进象牙白规模化生产的形成。有研究表明, 不同诱导子之间可能存在协同效应, 如苗志奇等通过 SA 和硝酸银的配伍诱导, 实现了诱导子之间的协同作用, 获得大量目的产物^[10]。但是目前这方面研究主要集中在具药用价值的植物次生代谢物上, 在兰科植物上还没有这方面文献的报道, 这可能成为今后研究方向之一。

参考文献(References)

- [1] 王 红, 叶和春, 李国凤. 1999. 诱导子的作用方式及其在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 16(1):11-18.
- [2] Cruickshand I A M, Perrin D R. 1968. The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollim inducing activity from *Monilinia fructicola*[J]. *Life Sci*, 7: 449-458.
- [3] 陈晓梅, 郭顺星, 孟志霞. 2006. 真菌诱导子对铁皮石斛原球茎的影响[J]. 中国药学杂志, 41(22):1692~1694.
- [4] 张长平, 李 春, 元英进. 2002. 真菌诱导子对悬浮培养南方红豆杉细胞次生代谢的影响[J]. 化工学报, 53(5):498-502.
- [5] 吴智彪, 宋希强, 李绍鹏. 2006. 华石斛内生真菌诱导子对其组培苗生长的影响[J]. 热带作物学报, 27(1):77-79.
- [6] 潘超美, 贺 红, 林群英, 等. 2004. 真菌诱导子对铁皮石斛组培物生长的影响[J]. 中医药学刊, 22(1):54-55.
- [7] 李任珠. 1995. 经组织培养快速繁殖象牙白的研究[J]. 海南大学学报自然科学版, 13(2):129-132.
- [8] 李子红, 贾 燕. 2006. 珍品兰花快速繁殖与养护[M]. 上海科学技术出版社.
- [9] 陈春满, 叶一枝, 凌绪柏. 2002. 象牙白花兰种子及茎尖培养与原球茎形态发生[J]. 园艺学报, 29(3):251-254.
- [10] Miao Z Q, Wei Z J, Yuan Y J. 2000. Studies on the acting point of methyl jasmonate in taxol biological synthesis pathway and its compatibility[J]. *Acta Biophy Sin*, 16(2):204~211.