

真菌诱导子对春兰组培物生长的影响

董 芳, 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 1/2 MS 基本培养基中, 分别加入不同种类、剂量的由野生春兰根部分离到的内生真菌所制成的干菌丝诱导子, 对由春兰种子萌发成的原球茎、根状茎等组培物进行诱导培养。结果表明, 4 种真菌诱导子均可不同程度的促进春兰组培物生长量的增加及不定芽的分化, 其诱导作用依次为: CF11>CF3>CF1>CF8>CK。加入 CF11、CF3 号诱导子的处理与对照相比, 鲜重分别增加了 74.38%、73.93%, 诱导效果最好。此外, 春兰组培物的鲜重随着 CF1 号诱导子加入量的增大而增加, 其诱导作用依次为 20 g/L>10 g/L>5 g/L>0 g/L, 加入量为 20 g/L 时, 其鲜重与对照相比达到了显著水平。

关键词: 春兰; 真菌诱导子; 组织培养

中图分类号: S 682.31; S 603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)05-0194-03

诱导子(elicitor)最初是指能诱导植物植保素(phytoalexin)合成的物质, 现在是指能诱导植物防卫反应的因素, 在植物与微生物的相互作用中, 能快速地、高度专一地和选择性地诱导特异基因的表达^[1-2]。目前主要的研究集中在诱导子的筛选、作用机制、作用效果以及对植物组织和细胞培养中次生代谢产物的影响等方面。真菌诱导子(fungal elicitor)是来源于真菌的一种确定的化学信号, 在植物与真菌的相互作用中, 能快速、高度专一和选择性的诱导植物特定基因的表达, 进而活化特定次生代谢途径, 积累特定目的的次生代谢产物^[3]。高微微等研究了开唇兰小菇(*Mycena anoetochila*)、石斛小菇(*M. dendrobii*)和兰小菇(*M. orchicola*)3 种内生真菌菌丝体及代谢物对铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)及金线莲(*Anoetochilus roxburghii*)生长的作用, 结果表明该 3 种菌丝体及代谢物均能显著提高铁皮石斛原球茎的增殖率, 而石斛小菇的菌丝体对金线莲的生长和侧芽增殖有显著的促进作用^[4]。潘超美等研究表明, 不同的真菌诱导子对铁皮石斛的促进生长作用不同^[5]。吴智彪等将分离自华石斛(*D. sinense*)根部的内生真菌, 发酵制成真菌诱导子, 对华石斛组培苗的生长和分化具有不同程度的促进作用^[6]。陈晓梅等研究得出, 在铁皮石斛原球茎培养后期, 加入其根部分离的内生真菌(*Mycena sp.*)

制成的液体诱导子, 可促进其原球茎的生长^[7]。这些利用真菌诱导子研究, 为植物细胞生长和次生代谢的调控研究提供了新手段。目前该方面的研究在兰科中, 主要集中在具有药用价值的石斛及金线莲上, 而关于内生真菌诱导子对春兰生长影响的研究尚未见报道。

春兰(*Cymbidium goeringii*)为兰科兰属地生兰类是我国兰花中栽培历史最为悠久的种类之一, 其中有不少的珍稀品种, 数量少且价格昂贵, 具有很高的经济价值。常规的分株繁殖速度慢且易伤母株, 不能满足市场的需求^[8]。对数量十分巨大的春兰种子进行组织培养技术繁殖, 可以达到春兰的产业化生产, 而组织培养技术到目前为止只能在有限的一些品种中得到应用, 在国兰中成功利用组培技术进行大规模生产的例子还没有^[9]。该试验旨在通过组织培养的方法, 利用真菌诱导子促进春兰原球茎细胞的生长和分化, 为春兰组培苗的大规模繁殖生产探索新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

春兰蒴果采于湖南省新宁县, 将种子进行无菌播种, 7 个月后萌发成原球茎及根状茎的混合物, 简称为春兰组培物。将该组培物转入 1/2 MS 培养基中进行继代培养, 1 个月后选择生长旺盛且体积较为一致的组培物作为接种材料。

试验接种用的 4 种内生真菌分离自采于湖南新宁县野生春兰的根部, 经纯化培养后获得的菌株分别记录为 CF1、CF3、CF8、CF11。

1.2 真菌诱导子的制备

将 4 种菌株在 PDA 培养基上活化 1~2 周, 分别转接于不含琼脂的液体 PDA 培养基中, 25℃下, 摇床

第一作者简介: 董芳(1982-), 女, 北京林业大学在读硕士, 研究方向为菌根菌及其应用。

通讯作者: 刘红霞。E-mail: hongxia@bjfu.edu.cn。

基金项目: 北京市教委资助项目; 长江学者与创新团队发展计划资助项目(PCSIRT0607)。

收稿日期: 2007-12-09

(120 r/min)暗培养 2 周后收获。将过滤得到的菌丝体自然风干,并用研钵进行粉碎,制成干菌丝诱导子^[10],于 4℃冰箱中保存待用。

1.3 培养基的制备及培养方法

以 1/2 MS+3%蔗糖+0.6%琼脂(pH 5.8)为基本培养基,设置分别加入 CF1、CF3、CF8、CF11 号干菌丝诱导子 10 g/L 以及不加诱导子作为对照等 6 个处理。此外,为了确定干菌丝诱导子的最佳加入量,在基本培养基中分别加入 5 g/L、20 g/L 的 CF1 干菌丝诱导子,与 0 g/L 及 10 g/L 的处理进行对照比较。

将继代培养的组培物用电子天平称量鲜重(天平精度 0.0001 g),转接到上述含有诱导子的培养基中,每瓶 4~7 个,每个处理接种 7 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 后收获组培物。

1.4 组培物生物量及分化程度的统计

在培养期间,每隔 20 d 对组培物的芽分化程度进行统计。收获后的组培物用电子天平称量鲜重后,将其置于 50℃的烘箱中干燥至恒重,称量其干物质重。对各个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,以确定最佳的真菌诱导子。

2 结果与分析

2.1 真菌诱导子对春兰组培物生长量的影响

在培养过程中,春兰组培物的生长量一直缓慢的持续上升,且含有真菌诱导子培养基中的组培物生长量明显高于对照组。见表 1,不同真菌诱导子对组培物的生长量作用也不同。与对照组相比,加入诱导子后,春兰组培物鲜重增加了 4.72%~74.38%,作用强度依次为 CF11>CF3>CF1>CF8>CK,其中 CF11 与 CF3 号诱导子的作用达到了极显著水平;虽然 CF1 号诱导子积累的春兰组培物干物质最多,但从干鲜比来看,CF11 与 CF3 号诱导子的作用效果较好。从培养物鲜重的增量和干鲜比值来看,菌株 CF11、CF3 作为诱导子,对春兰组培物生长量的促进效果最好。

表 1 不同真菌诱导子对春兰组培物鲜重及干重的影响

编号	鲜重			干重		干鲜比
	处理前 /mg	处理后 /mg	增长量 /mg	增加/%	处理后 /mg	
CF1	7.07	13.73	6.83	53.48	2.22	0.16
CF3	3.63	11.37	7.74 **	73.93	2.06	0.18
CF8	3.66	8.25	4.66	4.72	1.11	0.13
CF11	3.08	10.84	7.76 **	74.38	2.08	0.19
CK	2.84	7.32	4.45		1.08	0.14

注 **表示与对照 CK 组在 α=0.01 水平上差异极显著。

2.2 不同剂量诱导子对春兰组培物鲜重的影响

从表 2 中看出,随着 CF1 号真菌诱导子加入量的增大,春兰组培物的鲜重也持续增加。与对照组相比,加入不同剂量的诱导子,春兰组培物鲜重增加了 34.83%~

68.31%,其作用强度依次为 20 g/L>10 g/L>5 g/L>0 g/L。当诱导子加入量增加到 20 g/L 时,组培物的鲜重与对照相比达到了显著水平。

表 2 不同剂量 CF1 号真菌诱导子对春兰组培物鲜重的影响

加入量/g·L ⁻¹	处理前鲜重/mg	处理后鲜重/mg	增长量/mg	增加/%
0	2.84	7.32	4.45	
5	5.31	11.26	6.00	34.83
10	7.07	13.73	6.83	53.48
20	3.40	10.89	7.49 *	68.31

注: *表示与对照 CK 组在 α=0.05 水平上差异显著。

2.3 不同诱导子对春兰组培物芽分化的影响

培养过程中,各处理的原球茎、根状茎不断分化出不定芽。在加了诱导子的处理中,组培物翠绿色,分化出的不定芽数多且粗壮,生长快;对照中的组培物呈淡绿色,不定芽数较少,生长也较慢。从图 1 中可以看出,不同的真菌诱导子对组培物不定芽分化的影响程度不同。80 d 收获后,与对照相比 CF3、CF1、CF11 号诱导子促进了春兰组培物不定芽的分化,而 CF8 号诱导子的作用不明显。可见,CF3、CF1、CF11 号 3 种菌株,均能促进春兰组培物芽的分化,有利于春兰的增殖培养。

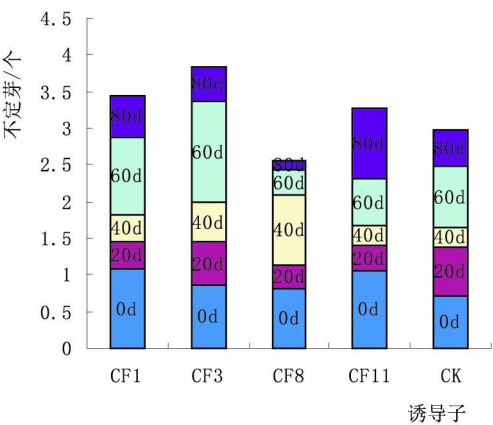


图 1 不同真菌诱导子对春兰组培物不定芽分化的影响

3 讨论

研究比较了不同种类的真菌诱导子对春兰组培物生长的影响。从生物量的增长来看,与对照相比,加入不同的真菌诱导子,能不同程度的提高春兰组培物的鲜重及干鲜比,其中 CF3 和 CF11 号诱导子的作用效果最好,其在鲜重增长方面达到了极显著水平,说明该真菌诱导子确实促进了春兰组培物的物质代谢和生长,提高了组培物的产量。从不定芽的分化及组培物的长势看,CF1、CF3、CF11 号诱导子的作用效果较好,说明了这些菌丝体中可能含有一些利于春兰细胞生长的物质。可见,CF3 与 CF11 号菌株制成的诱导子对春兰组培物的促进作用明显,可将此两种真菌作为春兰的有效内生菌

种进行开发利用。

真菌诱导物中既含有活性部分, 又含有拮抗成分, 两者的作用相互制约^[3], 所以除了选择适合的菌株外, 诱导子的添加量也会有影响。试验中, 春兰组培物的鲜重随着 CF1 号诱导子加入量的增加而增加, 当加入量增加到 20 g/L 时, 组培物的鲜重与对照相比达到了显著水平。说明低浓度的诱导子只能引起部分诱导, 只有适合的诱导子在适合的量时才能产生好的效果, 研究认为诱导子加入量的浓度为 20 g/L 时诱导效果好。

研究筛选出了对春兰组培物具有促进作用的诱导子菌种, 其它相关的研究正在进行中, 会另行文报道。此外, 许多研究结果表明, 诱导子之间存在着协同作用^[11], 而且两者协同可产生强烈的诱导作用, 可尝试将两种有效的诱导子复合后进行研究, 以寻求更有效的诱导方法。

与前人所报道的菌丝发酵成的液体诱导子相比, 试验所采用的干菌丝诱导子作用效果也很理想, 高微微等认为菌丝内含物提供了兰花生长所需的营养物质^[4], 可考虑将适合的真菌菌丝制成干粉诱导子, 为国兰大规模生产的实现提供便捷途径。

参考文献

[1] Dixon R A, Lamb C J. Molecular communication in interact between

plants and microbial pathogens[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 1990, 41: 339-367.

[2] 宁文, 曹日强. 真菌诱导物在植物次生代谢中的调节作用[J]. 植物生理学通讯, 1993 29(5): 321.

[3] Kutney J P, Samija M D, Hewitt G M, et al. Anti-inflammatory oleanane triterpenes from *Tripterygium wilfordii* cell suspension cultures by fungal elicitation[J]. Plant Cell Rep 1993, 12: 356-359.

[4] 高微微, 郭顺星. 内生真菌菌丝及代谢物对铁皮石斛及金线莲生长的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(6): 556-559.

[5] 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.

[6] 吴智彪, 宋希强, 李绍鹏. 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 2006 27(1): 77-79.

[7] 陈晓梅, 郭顺星, 孟志霞. 真菌诱导子对铁皮石斛原球茎的影响[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(22): 1692-1694.

[8] 吕梅, 伍建榕, 马焕成. 春兰菌根的显微结构观察[J]. 西南林学院学报, 2005, 25(2): 8-11.

[9] 罗毅波, 贾建生, 王春玲. 中国兰科植物保护的现状和展望[J]. 生物多样性, 2003, 11(1): 70-77.

[10] 侯丕勇, 郭顺星. 真菌对铁皮石斛原球茎酶活性和胞外 pH 的影响[J]. 微生物学通报 2004 31(2): 26-29.

[11] 王红, 叶和春, 李国凤. 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, 1999, 16(1): 11-18.

(致谢: 该研究得到四川省君荷兰苑陈泽君先生的资助 谨此致谢。)

Effects of Fungal Elicitors on the Growth of the Tissue Culture of *Cymbidium Goeringii*

DONG Fang, ZHAO Jian-na, LIU Hong-xia

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

Abstract: Four different fungus strains that were isolated from the roots of *Cymbidium goeringii* are made of dry mycelial elicitor. Tissue cultures of *Cymbidium goeringii* were induced on basal culture medium of 1/2 MS with the fungal elicitor. The result showed that different fungal elicitor promoted the growth and differentiation of adventitious bud of tissue culture in different degree, the inducing effects were in the order of CF11 > CF3 > CF1 > CF8 > CK. CF11 and CF3 did the best, and the fresh weight have increased by 74.38% and 73.93% compared to the control. In addition, the fresh weight of tissue culture increased with adding fungal elicitor of CF1, the inducing effects were in the order of 20 g/L > 10 g/L > 5 g/L > 0 g/L. The fresh weight had significant difference compared with those in control when the fungal elicitor added to 20g/L.

Key word: *Cymbidium goeringii*; Fungal elicitor; Tissue culture