

茅苍术内生真菌的分离鉴定及在组培苗中的回接

陈佳昕¹, 戴传超^{1*}, 李霞², 田林双¹, 谢慧¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046; 2. 江苏省农业科学院农业生物技术研究所, 南京 210014)

摘要: 从茅苍术的叶、茎和根中分离鉴定内生真菌, 并观测内生菌回接对茅苍术组培苗生长的影响。共获得茅苍术内生菌 16 株, 其中叶片中 14 株, 根茎中各获得一株。分别为交链孢霉、镰刀霉、小克银汉霉、青霉、茎点霉、小菌核菌、孔球孢霉和不产孢类。经内生菌和茅苍术快繁苗实验初筛, 得到两株对植物无害的内生菌: 小菌核菌和孔球孢霉, 将它们回接到茅苍术组培苗中, 可以从苗叶片中染色观察到菌丝。其中小菌核菌能提高茅苍术炼苗的存活率, 接入内生菌的茅苍术叶片超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性均高于未接菌的对照, 脂肪酸不饱和指数基本不变, 说明分离自茅苍术的内生菌回接后可以与宿主建立共生关系。

关键词: 茅苍术; 组织培养苗; 内生真菌; 炼苗; 抗逆

中图分类号: Q948.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)02-0256-05

Endophytic fungi screening from *Atractylanecea* and inoculating into the host plantlet

CHEN Jia-Xin¹, DAI Chuan-Chao^{1*}, LI Xia², TIAN Lin-Shuang¹, XIE Hui¹

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; 2. Institute of Agrobiological Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The endophytic fungi were screened and identified from *Atractylanecea*. Sixteen strains of endophytic fungi were screened totally, fourteen from leaves. One strain was from root and stem respectively. These strains including *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Cunninghamella* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Sclerotium* sp., *Gilmaniella* sp. and Myceliasterilia. One strain of *Sclerotium* and one strain of *Gilmaniella* which no harm to plant tested by culturing together with tissue rapid propagation plantlets were inoculated into propagation plantlets. The influence of the endophytic fungi on the growth, livability and physiology of *A. lancea* were studied. *Sclerotium* sp. can strongly increase the livability of *A. lancea*. The mycelium could be observed by dying the material. Superoxide dismutase and peroxidase activities of treated groups were both higher than that of control. Index of unsaturated fatty acid was the same as that of control. These were consistent with the result that endophytic fungi were symbiosis with the host.

Key words: *Atractylanecea*; tissue rapid propagation plantlets; endophytic fungi; domestication; adversity tolerance

茅苍术 (*Atractylanecea*) 为菊科苍术属多年生草本植物, 为江苏省著名地道药材。原产于宁镇山脉地区, 茅山曾是其分布中心。由于山地开垦, 野生茅苍术资源日趋枯竭, 已被列为省级保护的濒危植物, 近二十年已无商品性生产 (郭兰萍等, 2002)。尽管我国近年来在茅苍术研究领域取得了许多重要成

果 (陈敏等, 2006; 巢建国等, 2001), 但资源开发还存在以下难题: (1) 野生环境下茅苍术生长缓慢, 经济效益差; (2) 人工栽培有难度, 茅苍术喜阴凉, 不耐热, 不耐涝, 易生虫。这严重影响了茅苍术的开发和利用。

内生菌是存在于健康植物组织器官中、不形成

收稿日期: 2006-09-27 修回日期: 2007-02-06

基金项目: 国家自然科学基金(30500066)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500066)]

作者简介: 陈佳昕(1981-), 女, 江苏扬州人, 硕士研究生, 主要从事微生物与植物相互关系研究, E-mail: biojiaxin@hotmail.com

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: daichuanhao@njnu.edu.cn)

明显致病性的一类微生物。目前研究表明,多数植物中都有内生菌的存在(Berbee,2001),它们有促进植物生长(唐明娟等,2004)、提高抗逆性(任安芝等,2005)、促进活性成分积累(杨靖等,2004)等作用。茅苍术挥发油有强烈的抑菌作用(中国药典,2005),其体内是否有内生菌尚无人探讨。从前人研究结果看,药用植物体内也多有丰富的内生菌,它们可以协助宿主抵抗病原菌和促进苗期生长(戴传超等,2005,2006)。因此,我们尝试从茅苍术中分离内生菌,并接种到组培苗中,检测其对苗生长的影响,希望能缩短茅苍术的生长周期,加快苗期生长,为开发茅苍术道地药材提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

茅苍术 2004 年 5 月采自宁镇山脉(汤山),经南京师范大学生科院植物教研室杨启银副教授鉴定。分离用培养基:PDA 培养基。

1.2 方法

(1)内生菌分离及鉴定:参照 Strobel 等(1996)和 Schulthess & Faeth(1998)的方法,植物根、茎段、鲜嫩叶片经自来水冲洗 3 次后,在超净台上用 70%酒精消毒 1 min,0.1%的升汞消毒 10 min,无菌水冲洗多次,叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 的大小,根和茎每段 0.5 cm 长,置于 PDA 培养基上 27 °C 培养,待截断处菌丝长出,切取菌丝转入另一含 PDA 培养基的培养皿内,27 °C 恒温培养,之后转接到 PDA 培养基或含茅苍术组织浸汁的 PDA 培养基上观察培养性状,待菌丝长满皿后,根据生长及培养性状,部分需放入 4 °C 冰箱中诱导产孢,4~6 个月观察产孢结构。鉴定参照巴尼特等(1977)和魏景超(1979)的方法。

(2)快繁苗的获得:切取茅苍术嫩梢,自来水冲洗 3 次后,在超净台上用 70%的酒精消毒 1 min,0.1%的升汞消毒 7 min,无菌水冲洗多次,接种于 MS 培养基。将茅苍术嫩梢接入腋芽诱导培养基,待长出新嫩梢时切下,转移至芽增殖培养基。培养 1 个月后,将诱导得到的丛生芽分离后接入无激素的 MS 培养基中,嫩梢生长健壮。1 个月后可移入生根培养基(巢建国等,2001)。

(3)内生菌的初筛:将所得的内生菌回接茅苍术快繁苗,实验前先统计各棵苗的株高、根长、芽数,每

株菌回接三棵苗,在培养瓶中共培养。鉴于每株菌的生长速度不同,将实验分为两组,每组均设对照。第一组共培养 1 周后统计株高、根长、芽数,第二组共培养三周后统计株高、根长、芽数。比较接菌前后差异。

(4)茅苍术对宿主的生理效应:将在共培养试验中表现出促生长的两株内生菌(AL3,AL12)经 PDA 培养基活化后,用接种铲挑取一小块(直径 0.5 cm 左右)分别回接到已生根的茅苍术无菌苗,每瓶 1 株。共培养 3 周,待菌与苗长成一片后,取出炼苗。将苗移入小盆钵内,弱光照,置于室温下,每天浇一次水。观察和比较接入内生菌组和对照组苗的生长情况,记录第一片新叶出现天数,若无新叶产生不计。

(5)内生菌在茅苍术中的定殖:取上述回接内生菌的茅苍术叶片,在 50%NaOH 煮 5 min,显微镜观察,染色后菌丝呈现蓝色,观察菌丝在叶片中的分布情况。具体方法参考文献(俞大绂,1977)。

(6)超氧化物歧化酶(SOD),过氧化物酶(POD),过氧化氢酶(CAT)活性测定:分别取接种 AL3、AL12 和未接种内生菌的茅苍术叶片 0.5 g 于预冷的研钵中。酶液提取与测定参考邹琦(2000)的方法。

(7)脂肪酸测定:茅苍术脂肪酸测定及脂肪酸不饱和指数计算参照文献(戴传超等,2001)。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离与鉴定

试验结果表明,茅苍术叶片、茎、根中均有内生真菌,但不同器官含有内生真菌的数量是不一样的。在此实验中从 80 个叶片样本中分离到 14 株,分离率最高,为 17.5%;从 20 个茎段样和根样中各分离到 1 株;总计 16 株。将这些菌株编号为 AL1-16 号。根据菌株的形态特征和产孢情况(巴尼特等,1977;魏景超,1979)鉴定出 8 株,叶片 6 株,分别为 AL2,AL15 交链孢霉(*Alternaria* sp.),AL4 小克银汉霉(*Cunninghamella* sp.),AL6 青霉(*Penicillium* sp.),AL11 茎点霉(*Phoma* sp.),AL10 镰刀菌(*Fusarium* sp.),茎中 1 株(AL12)为孔球孢霉(*Gilmaniella* sp.),根中 1 株(AL3)为小菌核菌(*Sclerotium* sp.)。其余 8 株由于在培养过程不产生典型特征,无法鉴定。

2.2 茅苍术的快速繁殖

(1) 丛生芽诱导: 取茅苍术嫩梢为外植体, MS 基本培养基, 通过 5 种不同激素组合筛选腋芽诱导培养基(表 1)。当 6-BA 为 2 mg/L, NAA 为 0.3 mg/L 时, 植株健壮, 生长较快, 叶片壮实。因此, MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.3 mg/L 可用于腋芽诱导。将萌生的腋芽移入 3 种不同激素组合的芽增殖培养基中, 1 月后统计, 结果表明, 在 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.3~0.4 mg/L 培养基上芽增殖诱导频率高, 植株健壮, 生长快(表 2)。(2) 芽的生长与生根: 将茅苍术分株后移入生根培养基, 15~20 d 可见幼根。

表 1 不同激素组合对茅苍术腋芽诱导的影响

Table 1 Effect of different hormone compositions on induction of lateral buds of *A. lancea*

培养基编号 Media No.	6-BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	样本数 Samples No.	平均腋芽诱导数 Average induction of buds	植株生长情况 Condition of buds
1	0.5	0	15	0.13	慢
2	1	0.3	15	1.26	中等
3	2	0	15	3.20	中等
4	2	0.3	15	3.40	快
5	3	0	15	0.87	慢

2.3 内生菌对茅苍术快繁苗生长的影响

为了探讨本研究分离到的 16 株内生菌是否对茅苍术生长有促进作用, 将这些菌株分别接入茅苍术快繁苗。结果表明, 有 5 株菌(AL4, AL7, AL14,

AL12, AL3, AL11) 对茅苍术组培苗生长有促进作用, 除 AL2、AL13 和 AL15 使组培苗死亡外, 其余对组培苗的生长均无明显的抑制作用, 说明大部分内生菌对茅苍术生长是没有显著危害的(表 3)(AL8 在传代中停止生长, 未列入试验)。由于不同菌株生长速度有差异, 根据生长速度不同, 试验分两批进行, 两批均设对照。第一批菌株生长快, 1 周后测量; 第二批菌株生长较慢, 3 周后测量。

2.4 内生菌回接对茅苍术存活与生长的影响

由于 AL4, AL7, AL11, AL3, AL12, AL14 能促进茅苍术快繁苗的生长, 我们挑选了其中已鉴定到属的两株菌 AL3 和 AL12, 将其接入茅苍术快繁苗培养基中, 待长满后进行炼苗。15 d 后观察苗成活率。对照 15 个样本, 存活 11 个存活率达 73.3%。AL3, 18 个样本, 存活 16 个, 存活率达 88.8%, 回接 AL3 的试验组存活率比对照提高了 15.5%。AL12, 11 个样本, 存活 8 个, 存活率达 72.7%。观察生长状况表明, AL3 处理组, 新叶 4.18 d 出现。AL12 处理组 6.67 天出现。对照 5.44 d 出现(表 4)。炼苗 1 个半月后, 接菌组生长情况明显优于对照。我们用苯胺蓝染色的方法, 在接种内生菌的茅苍术叶片组织中找到了内生菌菌丝。说明内生菌菌丝已经侵入叶片组织, 并在其中定殖。苯胺蓝染色后叶片呈淡蓝色略透明, 菌丝蓝紫色(图 1)。说明 AL3 和 AL12 与茅苍术建立了良好的共生关系, 比未接菌的对照更能适应新环境。

表 2 不同激素组合对茅苍术芽增殖的影响

Table 2 Effect of different hormone compositions on proliferation of lateral buds of *A. lancea*

培养基编号 Media No.	6-BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	样本数 Samples No.	产生芽的个数 No. of proliferation buds	增殖系数 Proliferation quotiey	芽生长情况 Growth condition of buds
1	1	0.3	10	32	3.2	芽丛分化慢, 植株矮小, 生长缓慢
2	2	0.3	10	42	4.2	芽丛分化较快, 植株健壮, 生长较快
3	2	0.4	10	47	4.7	芽丛分化较快, 植株健壮, 生长较快

2.5 内生菌对茅苍术组培苗抗逆性的影响

2.5.1 对抗氧化酶系的影响 大量研究表明, SOD 和 POD 与植物抗性呈正相关。SOD, POD, CAT 协同作用防御活性氧或其它过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害。POD 参与木质素的合成, POD 活性提高能促进木质素合成, 使细胞壁加厚, 可有效防御病原菌的入侵, 提高了植物的抗逆性(袁志林等, 2004)。茅苍术幼苗喜阴凉、不耐热、抗逆性差, 为了考察接入内生菌是否能提高茅苍术幼苗的抗逆性, 帮助茅苍术抵御不良环境, 我们测量了 SOD, CAT, POD 酶活。结果表明接入内生菌组 SOD, POD,

CAT 活性均高于对照(表 5)。我们的试验结果说明, 茅苍术组培苗接入内生菌后, 适应环境的能力和抗御逆境的能力都得到提高。

2.5.2 对植物脂肪酸的影响 当植物受到逆境胁迫时, 植物脂肪酸会发生改变, 一般表现为不饱和脂肪酸含量会增加(戴传超等, 2001)。从植物 SOD 酶活力来看, 内生菌对植物造成了轻微的胁迫。接入 AL3 的茅苍术快繁苗脂肪酸不饱和指数为 154.57, AL12 处理组为 148.87, 而对照为 159.53, 说明脂肪酸不饱和指数基本没有改变, 内生菌的影响是轻微的。

表 3 不同菌株对快繁苗生长的影响
Table 3 Effect of endophytic fungi on the growth of tissue rapid propagation plantlets

菌株编号 Strains No.	接菌前 Before inoculation			接菌后 After inoculation			净重 Net weight
	平均株高 Plant height	平均根长 Root length	平均芽数 No. of Buds	平均株高 Plant height	平均根长 Root length	平均芽数 No. of Buds	
AL1	3.93	4.80	0.67	4.90	5.22	0.67	0.84
AL2	5.17	6.03	0	5.82	6.04	0	0.49
AL4	4.50	5.17	0.33	5.40	5.67	0.33	1.38
AL5	6.10	5.62	0	6.13	5.85	0	1.66
AL6	4.05	5.16	0	4.10	5.02	0	0.93
AL7	3.20	5.50	0	4.13	6.50	0.33	0.56
AL10	4.67	7.00	0	4.68	7.60	0	1.02
AL13	2.50	6.12	0	2.50	6.15	0	—
AL14	4.67	5.93	0	5.67	7.23	0	1.19
AL15	3.17	6.00	0	2.17	6.00	0	0.96
CK(1W)	6.50	6.50	0	7.12	7.50	0	0.80
AL11	3.63	4.60	0	5.25	5.75	0	1.26
AL3	3.50(n=5)	5.26	0	5.50	7.60	0	1.01
AL12	3.50	5.87	0	5.93	6.87	0	0.45
AL16	3.86	4.80	0	3.83	5.60	0	0.71
CK(3W)	3.33	5.50	0	4.67	7.16	0	0.85

N=3, AL3(N=5)株高,根长,芽数中有一指标高于对照,算做对生长有促进作用。芽数=除主茎外的嫩梢总数。

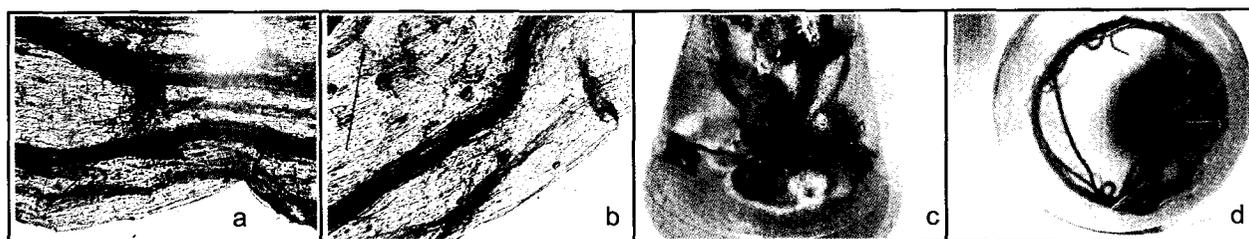


图 1 内生真菌菌丝在茅苍术中的定殖(10×10) 箭头:菌丝,a. AL3 接种,b. AL12 接种; 内生菌回接到组培苗 c. 显示接菌后植株生长正常,d. 表示接菌后根生长正常。

Fig. 1 Colonization of mycelium of endophytic fungi in the *A. lancea* Arrows show the mycelium in the leaf, a. inoculated by AL3, b. inoculated by AL12; The inoculation of endophytic fungi to the tissue rapid propagation plantlet c. shows the plantlet grew healthily after inoculation, d. shows the root grew healthily after inoculation.

表 4 内生菌对茅苍术生长及存活率影响

Table 4 Effects of the endophytic fungi on the growth and livability of *A. lancea*

处理 Treatment	样本数 Samples number	存活率(%) Percentage of livability	新叶产生天数 Day of emergence of new leaf
AL3	18	88.8	4.18
AL12	11	72.7	6.67
对照	15	73.3	5.44

表 5 内生菌对茅苍术组培苗的生理影响

Table 5 Effects of the endophytic fungi on the physiology of *A. lancea* in vitro

菌株编号 No.	SOD(U/g. fw)	CAT(U/mg. pro)	POD(U/g. min)
AL3	219.17±20.96	33.43±3.41	6460±689.98
AL12	173.00±79.19	56.89±13.03	7164±811.70
对照	124.46±17.73	31.52±4.47	5815±265.57

2.6 小结

本试验从茅苍术根、茎、叶中共分离得到 16 株内生真菌,经绿豆发芽实验初筛,得到五株对茅苍术生长无害的内生真菌,挑选其中已鉴定并生长良好的两菌株:AL3 和 AL12,回接茅苍术的组织快繁苗,观察内生菌的接入对茅苍术生长、炼苗成活率和抗逆性的影响。结果表明,内生菌与茅苍术建立了良好的共生关系,能提高炼苗成活率,适应环境的能力和抗御逆境的能力也提高了。

3 讨论

内生菌可以帮助宿主占据一定的生态位,提高宿主适应环境的能力,它们在基因、生理和生态各水

平影响着植物(Lucero等,2006)。用植物和微生物互作的方式解决濒危药用植物的生产问题,有一定的应用前景。我们实验室在京大戟中筛到一株能促进京大戟苗期生长的镰刀菌(*Fusarium* sp.)(戴传超等,2005)。而本次试验从茅苍术中得到一株小菌核菌(*Sclerotium* sp.)可以促进苗期生长。可见每种植物内生菌都有严格的宿主,不同的植物间内生菌群是有差异的。

内生菌可促进宿主植物的生长,提高抗逆性,如接种内生菌可以促进台湾金线莲生长(唐明娟等,2004),提高禾草的抗逆性(任安芝等,2005)等。本试验也证明了内生菌对茅苍术组织快繁苗的生长是有益无害的。两试验组茅苍术的成活率略高于对照组,尤其是接入AL3组的茅苍术不但成活率高,新叶出现也较快,说明内生菌能与宿主植物建立良好的共生关系,有效地促进植物生长,使植物更快更好地适应环境。在炼苗时也发现,茅苍术苗在7~9月,由于温度过高,炼苗存活的苗地上部分也会枯死,而只有接入内生菌AL3的还有部分存活。说明内生菌的接入提高了快繁苗的抗逆性。为了验证内生菌的接入是否能提高抗性,测定了SOD,POD,CAT三种酶。接菌的试验组三种酶活力高于对照,SOD活力分别比对照高出76.09%和39.00%。可能是由于两者刚建立共生关系时,宿主茅苍术产生某种应激反应。茅苍术濒临灭绝,以组织培养的方式获得大量的快繁苗可有效保护茅苍术的种质资源。试验证明,给茅苍术组培苗接种内生菌,通过提高炼苗存活率和抗逆性,有望给茅苍术野生转家种提供一些有益的技术措施。

参考文献:

- 巴尼特 HL,亨特 BB. 1977. 半知菌属图解[M]. 北京:科学出版社
- 国家药典委员会. 2005. 中国药典一部[M]. 北京:化学工业出版社
- 邹琦. 2000. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社:163-168
- 俞大维. 1977. 植物病理学和真菌技术汇编(2)[M]. 北京:人民教育出版社:502-503
- 魏景超. 1979. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社
- Berbee M L. 2001. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, **59**:165-187
- Chao JG(巢建国),Tan XH(谈献和),Zhang Y(张瑜), et al. 2001. Rapid propagation of *Atractylancea* (茅苍术快速繁殖)[J]. *J Chin Med Mat(中药材)*, **24**(7):473-474
- Chen M(陈敏),Shao AJ(邵爱娟),Lin SF(林淑芳). 2006. Initial research on the best harvest time of *Atractylancea* (人工种植茅苍术最佳采收期的初步研究)[J]. *China J Chin Mat Med(中国中药杂志)*, **31**(12):1 023-1 024
- Dai CC(戴传超),Yu BY(余伯阳),Dong C(董晨), et al. 2005. The rapid propagation of medicinal plant *Euphorbia pekinensis* (药用植物大戟的快速繁殖研究)[J]. *Guihaia(广西植物)*, **25**(2):152-155
- Dai CC(戴传超),Yu BY(余伯阳),Qu ZL(徐增莱), et al. 2001. Comparative studies on the fatty acids contained in four species of medicinal plants from family Euphorbiaceae and their endophytic fungi(大戟科4种植物及其内生真菌脂肪酸组分研究)[J]. *China J Chin Mat Med(中国中药杂志)*, **26**(9):592-595
- Dai CC(戴传超),Yu BY(余伯阳),Zhao YT(赵玉婷), et al. 2006. The screening and identification of endophytic fungi from four species of family Euphorbiaceae and strains' antibacterial activity(大戟科4种植物内生真菌分离与抑菌研究)[J]. *J Nanjing Fore Univ(南京林业大学学报·自然科学版)*, **30**(1):79-81
- Guo LP(郭兰萍),Liu JY(刘俊英),Ji L(吉力). 2002. The naphtha composing characteristics of geoh herbs of *Atractylodes lancea* (茅苍术道地药材的挥发油组成特征分析)[J]. *China J Chin Mat Med(中国中药杂志)*, **27**(11):814-819
- Lucero M E,Barrow J R,Osuna P, et al. 2006. Plant-fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale processes[J]. *J Arid Environments*, **65**:276-284
- Ren AZ(任安芝),Gao YB(高玉葆),Wang W(王巍), et al. 2005. Photosynthetic pigments and photosynthetic products of endophyte-infection and endophyte-free *Lolium perenne* under drought stress conditions(干旱胁迫下内生真菌感染对黑麦草光合色素和光合产物的影响)[J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, **25**(2):225-230
- Schulthess F M,Faeth S H. 1998. Distribution abundance and association of the endophytic fungal community of Arizona Fescue (*Festuca arizonica*)[J]. *Mycologia*, **90**(4):569-578
- Strobel G, Yang X, Sears J, et al. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachina*[J]. *Microrobiology*, **142**:435-440
- Tang MJ(唐明娟),Guo SX(郭顺星). 2004. Influences of endophytic fungi on the growth and enzyme activity of *Anoectochilus formosanus* Hayata(内生真菌对台湾金线莲栽培及酶活性的影响)[J]. *China J Chinese Mat Med(中国中药杂志)*, **29**(6):517-520
- Yang J(杨靖),Jiang DF(江东福),Ma P(马萍). 2004. Study on formation of Dragon's blood in *Dracaena cochinchinensis* inoculated with *Fusarium* 9568D(特异性真菌作用于龙血树材质形成血竭的研究)[J]. *Chin Trad Herbal Drugs(中草药)*, **5**(5):572-574
- Yuan ZL(袁志林),Dai CC(戴传超),Shi Y(史央), et al. 2004. The mechanism on the growth promotion of endophytic B3 to rice(内生真菌B3促进水稻生长的机理研究)[J]. *J Agric Sci(江苏农业科学)*, **2**(10):10-13