

· 药材 ·

野生麻黄根际有益微生物的研究

潘惠霞¹, 程争鸣¹, 齐晓玲¹, 尹林克^{2*}

(1. 中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院吐鲁番沙漠植物园, 新疆 吐鲁番 838008)

摘要: 目的 研究野生麻黄根际的有益微生物。方法 利用土壤微生物研究法分离纯化微生物菌种, 观察其个体形态和培养特征及主要生理特性。用菌液浸泡处理麻黄种子, 进行室内发芽试验及田间育苗。结果 野生麻黄根际土壤微生物以细菌为主, 其次是放线菌, 真菌最少。从新疆野生中麻黄和膜果麻黄根际土壤中分离纯化出 17 株细菌, 发芽试验及田间育苗结果表明, 其中 6 株可以提高麻黄种子的发芽率并能在高盐碱的条件下生长。结论 麻黄根际微生物可提高麻黄种子的发芽率。该类微生物具有很强的耐盐碱能力。

关键词: 麻黄根际; 细菌; 发芽率

中图分类号: R 282. 21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)11-1038-04

Studies on useful microorganism of rhizosphere of wild *Herba Ephedra*PAN Hui-xia¹, CHENG Zheng-ming¹, QI Xiao-ling¹, YIN Lin-ke²

(1. Xinjiang Institute of Ecology and Geography, CAS, Urumuqi 830011, China;

2. Turpan Botanical Garden of Desert, CAS, Turpan 838008, China)

Abstract: **Object** To study the useful microorganism of rhizosphere of wild *Herba Ephedra* (HE).

Methods Strains were isolated, purified and studied by the soil microbiological method. After the seeds of *E. intermedia* Schrenk ex Mey. were soaked, the germination test was carried out. **Results** Number of microorganism of rhizosphere of wild HE are: bacteria> actinomycetes> fungi. There are 17 strains which were isolated from *E. intermedia* Schrenk ex Mey. and *E. przewalskii* Stapf in Xinjiang. Results of the germination test indicate that six strains can make germination rate of *E. intermedia* seed increase and can make it grow under the high concentration of NaCl and NaCO₃. **Conclusion** The microorganism of rhizosphere of wild HE can make the germination rate of *E. intermedia* seed increase. They are all salt-tolerant and alkali-tolerant microorganism.

Key words: the rhizosphere of *Herba Ephedra*; bacteria; germination rate

麻黄为多年生草本小灌木, 中麻黄是新疆的主要药用麻黄资源之一, 是驰名中外的传统药材, 具有发汗、平喘、利尿、祛风的作用^[1]。从麻黄中提取的麻黄素, 用途广泛, 经济价值高。麻黄主要生长于干旱及半干旱地区, 具有极强的抗干旱、耐高温、抵御风沙能力, 冬季能活株越冬, 成年株的防风固沙效果明显, 对生态环境保护有积极作用^[2]。多年来由于人工盲目采伐, 造成生态环境恶化, 野生麻黄资源逐年减少。近年来, 人工种植麻黄悄然兴起, 目前人工种植麻黄多采用先育苗后移栽的方式进行, 大田直播由于出苗成活率低、用种量大和成本高等原因, 一般不被采用。

微生物与高等植物生长有密切的关系, 植物根际的土壤有微生物生长系列所需物质、水和空气等条件, 是微生物生长繁殖的良好环境, 土壤里的微生物有细菌、放线菌、霉菌、藻类等, 这类微生物与植物根系、土壤之间相互制约、互相影响, 对植物的生长发育起着重要的作用^[3~5]。为了解决目前人工种植麻黄种子发芽率较低、成本高的问题, 本实验开展了从野生麻黄根际土壤中分离能够促进麻黄种子发芽的有益微生物菌种的研究。

1 材料与方法

1.1 土壤样品: 采自新疆柴窝堡山前砾石带野生膜果麻黄 *Ephedra przewalskii* Stapf 和中麻黄 *E. in-*

* 收稿日期: 2003-03-31

基金项目: 国家攻关计划(2001BA 606A -10-2); 中国科学院知识创新工程项目(KZCX1-08-02); 国家自然科学基金重大计划(90202019)

作者简介: 潘惠霞(1957-), 女, 陕西人, 副研究员, 主要从事微生物资源研究。 E-mail: panhuixia@163.com

termedia Schrenk ex Mey. 根际。

1.2 菌种分离、培养和观察^[6]: 分离采用常规平板稀释分离法; 培养温度细菌为 35 ~ 37 , 真菌和放线菌为 22 ~ 25 ; 形态观察采用 H4180 光学显微镜(上海光学仪器厂)。

1.3 供试种子: 中麻黄 *E. intermedia* 由本所程学鸣教授鉴定。

1.4 种子发芽试验^[7]: 种子发芽试验在实验室进行, 采用砾石质土盆装, 每份 100 粒种子; 每个试验 3 个重复; 用菌液浸泡 8 h 播种, 不处理作为对照, 室内温度 18 ~ 26 , 播种后分别在 10, 15, 20 d 记录发芽结果。

1.5 田间育苗试验: 新疆克拉玛依建升公司育苗 0.067 hm²(1 亩), 菌液浸泡 12 h 后拌沙土播种。

1.6 耐盐碱试验: 耐盐试验在培养基中加入 1% ~ 10% NaCl; 耐碱试验在培养基中加入 0.5% ~ 5.0% NaCO₃ 培养, 观察菌种生长情况。

2 结果

2.1 微生物的种类和数量: 新疆中麻黄和膜果麻黄土壤根际微生物的种类和数量测定结果见图 1。

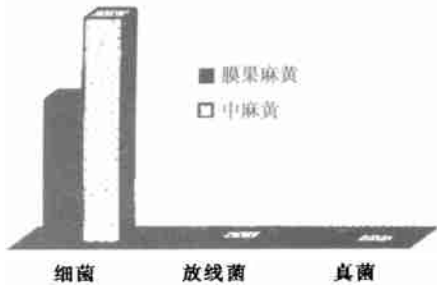


图 1 麻黄根际微生物的种类和数量

Fig.1 Variety and number of microorganism in HE rhizosphere

从图 1 可以看出, 在新疆野生中麻黄和膜果麻黄根际土壤中, 3 类主要微生物的数量从多到少的次序均为: 细菌> 放线菌> 真菌。中麻黄根际土壤中细菌、放线菌和真菌的总数量大于膜果麻黄。

2.2 发芽试验结果

2.2.1 初选: 从野生中麻黄和膜果麻黄根际土壤中分离纯化出 17 株细菌, 编号为: 膜果麻黄 1 ~ 10 号; 中麻黄 1 ~ 7 号。菌液处理种子后的发芽结果见表 1。

从表 1 可以看出, 17 株菌中膜果麻黄-5, 膜果麻黄-7, 膜果麻黄-9, 中麻黄-1, 中麻黄-4, 中麻黄-6 和中麻黄-7 处理麻黄种子后的发芽数高于对照。经单因子方差分析, 膜果麻黄-9, 中麻黄-1, 中麻黄-4, 中麻黄-6 和中麻黄-7 的 $P < 0.01$, 差异显著, 证明可提高麻黄种子发芽率(8% ~ 19%)。

表 1 麻黄根际微生物对麻黄种子发芽的影响($n=3$)

Table 1 Effect of microorganisms of HE rhizosphere on germination rate of HE seed ($n=3$)

菌种	开始发芽 时间/d	发芽数			发芽率/%
		10 d	15 d	20 d	
膜果麻黄-1	6	14	37	45	45
膜果麻黄-2	4	10	32	47	47
膜果麻黄-3	4	20	31	39	39
膜果麻黄-4	4	22	33	41	41
膜果麻黄-5	4	18	40	56	56
膜果麻黄-6	4	24	42	51	51
膜果麻黄-7	4	36	47	61	61
膜果麻黄-8	4	28	40	48	48
膜果麻黄-9	4	44	56	62	62
膜果麻黄-10	4	36	50	52	52
中麻黄-1	4	30	51	65	65
中麻黄-2	4	26	39	51	51
中麻黄-3	4	26	39	41	41
中麻黄-4	4	24	53	72	72
中麻黄-5	4	20	31	49	44
中麻黄-6	4	42	58	67	67
中麻黄-7	4	26	48	63	63
对 照	6	26	43	53	53

2.2.2 复合菌液与单株菌液处理麻黄种子后发芽试验比较: 用 6 株菌的单株菌与 6 株菌等量混合后分别处理种子的发芽试验结果见表 2。

表 2 单株菌与复合菌处理麻黄种子后的发芽结果

Table 2 Germination of HE seed soaked by mono- and complex bacterium respectively

菌 种	播种 10 d	播种 15 d	发芽率/%
	发芽数	发芽数	
中麻黄-1	50	70	70
中麻黄-4	45	75	75
中麻黄-6	23	66	66
中麻黄-7	19	64	64
膜果麻黄-7	27	63	63
膜果麻黄-9	30	65	65
5 种菌复合	27	60	60
对照(水浸泡)	23	54	57

从表 2 试验结果见, 6 株菌复合后和单菌株处理麻黄种子的发芽数均高于对照。经单因子方差分析, 中麻黄-1, 中麻黄-4 和中麻黄 6 株单菌处理麻黄种子, $P < 0.01$, 差异显著。可明显提高麻黄种子发芽率。中麻黄-1 和中麻黄-4 在播种后的 10 d 内出苗率达到了总出苗率的 50% 以上。

2.2.3 不同浸种时间对麻黄种子发芽的影响: 经反复试验证明, 中麻黄-4 可提高麻黄种子发芽率

18%。该菌不同时间浸种的发芽试验结果见表 3。表 3 试验结果表明,中麻黄-4 菌液浸种最高出苗率为 73%,处理 8 h 对照出苗率为 55%,试验比对照提高 15%。经单因子方差分析,处理 8 h ($P < 0.01$),差异显著。

表 3 不同浸种时间对麻黄种子发芽的影响
(播种后 15 d 发芽率) %

Table 3 Effect on germination rate of HE seed soaked in different times %

菌种	时间/h						
	4	8	12	16	20	24	48
中麻黄-4	53	70	73	73	72	73	69
对照(未处理)	55						

2.2.4 田间育苗试验:中麻黄-4 号菌液处理麻黄种子,在新疆克拉玛依田间育苗,播种后一个月试验地比对照地出苗率提高 15%。

2.3 个体形态和培养特征:6 株菌的个体形态和培养特征的观察结果见表 4。从表 4 可以看出该类微生物的形态为杆状和椭圆,菌落为奶油色、透明和黄色。

表 4 麻黄根际微生物的个体形态和培养特征

Table 4 Individual shape and cultural characteristics of microorganisms in HE rhizosphere

菌种	个体形态	培养特征
膜果麻黄-7	椭圆	菌落奶油色,不透明,直径 3~6 cm
膜果麻黄-9	杆状	菌落圆形,馒头状,皱褶突出,直径 3~13 cm
中麻黄-1	杆状	菌落圆形,肉色,直径 1~2 mm
中麻黄-4	短杆状	菌落圆形,透明,直径 2~3 mm
中麻黄-6	球形	菌落圆形,黄色,1~5 mm
中麻黄-7	椭圆	菌落圆形,奶油色,1~3 mm

2.4 耐盐碱试验:6 株微生物的耐 NaCl 和 NaCO₃ 的试验结果见表 5,6。

表 5 不同浓度的 NaCl 对麻黄根际微生物生长的影响

Table 5 Effect of different NaCl concentrations on growth of microorganisms of HE rhizosphere

菌种	NaCl/ %							
	0.5	1	2	3	4	5	10	
膜果麻黄-7	+++	+++	+++	+++	++	++	++	
膜果麻黄-9	+++	+++	+++	+++	++	++	-	
中麻黄-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
中麻黄-4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	
中麻黄-6	+++	+++	+++	+++	++	++	-	
中麻黄-7	+++	+++	+++	+++	++	++	-	

+++ 表示生长旺盛,++ 表示生长良好,+ 表示生长弱,- 表示不生长

+++ indicates strongest growth, ++ stronger, + less, and - no growth

在培养基中分别加入不同浓度的 NaCl,接种后

培养 48 h 表明,所有试验菌株在含有 3% 的 NaCl 浓度的条件下生长旺盛,5% 的 NaCl 条件下生长良好,其中 3 株可以在含有 10%NaCl 的条件下生长。

表 6 不同浓度的 NaCO₃ 对麻黄根际微生物的生长的影响

Table 6 Effect of different NaCO₃ concentrations on growth of microorganisms of HE rhizosphere

菌种	NaCO ₃ / %					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	5.0
膜果麻黄-7	+++	++	+	-	-	-
膜果麻黄-9	+++	++	-	-	-	-
中麻黄-1	+++	+++	+++	+++	++	++
中麻黄-4	+++	+++	+++	++	++	++
中麻黄-6	+++	+++	++	++	+	-
中麻黄-7	+++	++	+	-	-	-

同表 5
Same as Table 5

在培养基中加入不同浓度的 NaCO₃,接种后培养 48 h 表明,所有试验菌株在 0.5%NaCO₃ 条件下生长旺盛,其中 2 株可在 5% NaCO₃ 条件下生长良好。

3 结论

植物根际土壤微生物在国内 外已被广泛研究,也有相应的产品开发应用于农业生产中,但目前还未见有野生药用植物麻黄根际微生物的有关研究报道。

3.1 野生麻黄根际土壤微生物可以明显提高麻黄种子发芽率。

3.2 野生中麻黄根际土壤中的微生物数量大于膜果麻黄。

4 讨论

4.1 中麻黄的生物碱含量高于膜果麻黄^[1],如通过进一步研究证明与中麻黄土壤根际的微生物的数量大于膜果麻黄成正相关,该类耐盐碱微生物应用于人工种植麻黄,也将对提高其品质具有重要的科学意义和应用价值。

4.2 从膜果麻黄根际土壤中分离的微生物也能提高麻黄种子发芽率,但对人工种植麻黄中生物碱含量是否有影响尚需进一步研究。

4.3 在植物根际环境中,各种微生物以不同数量生长繁殖,对植物的生长发育起着重要的作用,本实验研究的微生物处理种子后能提高种子发芽率,并可能以优势种在植物根际生长繁殖,从而起到对植物生长的促进作用^[8]。

4.4 研究证明复合多种菌后菌液处理种子的效果不如单株菌好,可能是因为多种微生物在等量存在的情况互相影响、相互制约的结果。

References:

[1] Liu G J. *Ephedra* (麻黄) [M]. Beijing: Chinese T raditional Medicine Publishing House, 2001.

[2] Zhong L. Determination and analysis on fighting a drought of *Ephedra przewalskii* [J]. *Qinghai Oprataculture* (青海草业), 2000 (1): 20-21.

[3] Department of Biology in Nank ai University. *Basic Microbiology* (基础微生物学) [M]. Tianjin: Tianjin Educational Publishing House, 1975.

[4] Meng S D. Function of phytohormone from rhizosphere soil microorganisms on wheat growth [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1998 (6): 427.

[5] Al-Achi B. J et al. Competitive colonization between *Pseudomonas* species in sterile soil [J]. *Curr microbiology*, 1991, 23: 97-104.

[6] Nanjing Institute of Pedology. *Method of Study about Soil Microbiology* (土壤微生物研究法) [M]. Beijing: Science Press, 1985.

[7] Liu L S. Study on characteristic of *Gentiana macrophylla* seed germination [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 268.

[8] Bashan Y. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake [J]. *Appl Environ Microbio*, 1990: 769-775.

新疆紫草无性繁殖体系的建立

计巧灵*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 目的 为了促进新疆紫草大面积人工栽培, 缓解自然资源匮乏的现状, 通过组织培养技术建立了新疆紫草的无性繁殖体系。方法 诱导新疆紫草多种外植体脱分化均已成功, 胚状体扩增后萌发出大量的试管苗; 愈伤组织扩增后诱导出大量的不定芽, 不定芽经诱导生根后, 得大量的试管苗, 试管苗土栽成活。结果 外植体脱分化期间, 2, 4-D 不可缺少, KT 的作用优于 BA; 嫩芽切段脱分化最快, 愈伤组织质量最好; 降低 2, 4-D 浓度有利于愈伤组织扩增和再分化; 一定浓度 KT 或 BA 都可诱导出不定芽, 前者还有利于球形胚的形成; 球形胚培养初期, 培养基中加入适量激素能使球形胚大量增殖, 并很快发育; 适当的昼夜温差(10 ~ 28 ℃)和自然光照有利于壮苗的形成和移栽成活。在移栽的 236 株试管苗中, 31 株土培成活, 成活率达 13. 2%。结论 通过组织培养方法建立的新疆紫草无性繁殖体系稳定、可用。

关键词: 新疆紫草; 组织培养; 再生植株; 无性繁殖系

中图分类号: R 282. 21 文献标识码: A 文章编号: 0253 - 2670(2003) 11 - 1041 - 04

Establishment of asexual multiplication system of *Arnebia euchroma*

Ji Qiao-ling

(Institute of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumuqi 830046, China)

Abstract: **Object** In order to promote the artificial cultivation of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst., and save the wild herb from relieving the lack of resources, the asexual multiplication system of *A. euchroma* was established by tissue culture technique. **Methods** Dedifferentiation in many kinds of explants of *A. euchroma* by inducement succeeded. After the embryos were multiplied, there were a lot of germinated transplants in media. After callus were multiplied, many adventitious buds had formed in the media, then they were rooting; the transplants formed by inducement and the plants survived after being cultured in soil. **Results** During the dedifferentiation, 2, 4-D was essential, the effect of KT was better than BA. The shoot sections were dedifferentiated in the most rapid way among the explants. The callus from them were in very good quality. It is of benefit to the callus multiplication and redifferentiation after reducing the concentration of 2, 4-D. Both KT and BA can induce adventitious buds, KT was also suitable for the formation of globular-shaped embryos. In initial period of sphere embryos culture, it was necessary to add the plant growth regulators in media for multiplying sphere embryos and promoting their development.

* 收稿日期: 2003-01-13
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(38960025)
作者简介: 计巧灵(1956-), 女, 新疆乌什县人, 副教授, 理学士, 1982年毕业于新疆大学生物系, 至今一直在新疆大学生命科学与技术学院任教, 主要从事细胞生物学、细胞工程、电镜技术方面的教学与科研工作; 1993年主持完成了国家自然科学基金项目: 新疆紫草组织和细胞培养及其有效成分提取(项目号 38960025), 后主要参加完成了多项有关药用植物快繁、移植、有效成分分离提取等科研项目。 Tel: (0991) 8581529 E-mail: wangji@xj.cninfo.net