

· 药材 ·

三种内生真菌对铁皮石斛、金线莲生长影响的研究

高微微,郭顺星*

(中国医学科学院 协和医科大学药用植物研究所,北京 100094)

摘要:目的 研究开唇兰小菇、石斛小菇、兰小菇等 3 种小菇属内生真菌对兰科濒危药用植物铁皮石斛、金线莲生长的促进作用。方法 采用植物无菌原球茎及试管苗与真菌进行双重培养,观测原球茎增殖及苗的生长情况。结果 接种 3 种内生真菌后,铁皮石斛苗的生长量高于对照 3~5 倍,石斛小菇、兰小菇对铁皮石斛原球茎增殖也有明显促进作用 ($P < 0.05$);接种 3 种真菌的金线莲苗,侧芽及侧根数均显著高于对照。结论 3 种小菇属内生真菌能够促进铁皮石斛幼苗生长,促进金线莲侧芽及侧根的萌发,对铁皮石斛、金线莲的成功栽培具有实际应用价值。

关键词: 内生真菌;铁皮石斛;金线莲;生长

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)06-0543-03

Effect of three endophytic fungi on growth of *Dendrobium candidum* and *Anoectochilus roxburghii*

GAO Wei-wei, GUO Shun-xing

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and

Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract Object To study the promoting effects of *Mycena anoectochila*, *M. dendrobii* and *M. orchidicola* on growth of *Dendrobium candidum* Wall. ex Ldl. and *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Ldl.

Methods The protocorm and plantlet of *D. candidum* and *A. roxburghii* were grown in dual culture with endophytic fungi to observe the proliferation of protocorm and the growth of plantlet. **Results** The growth of plantlet of *D. candidum*, which was inoculated three endophytic fungi, increased markedly 3~5 times more than those of the control one. *M. dendrobii* and *M. orchidicola* also promoted multiplication on protocorm of *D. candidum* ($P < 0.05$). After inoculated three endophytic fungi, the proliferation of plantlet, new buds and lateral roots of *A. roxburghii* are getting more than those of the control one. **Conclusion** Three endophytic fungi, *M. anoectochila*, *M. dendrobii*, and *M. orchidicola*, could promote the platelet growth of *D. candidum* and increase the number of buds and roots of *A. roxburghii*. It has great value for culture of *D. candidum* and *A. roxburghii*.

Key words endophytic fungi; *Dendrobium candidum* Wall. ex Ldl.; *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Ldl.; growth

铁皮石斛 *Dendrobium candidum* Wall. ex Ldl. 和金线莲 *Anoectochilus roxburghii* Wall. Ldl. 均为我国珍贵的兰科药用植物,由于长期掠夺性采挖,野生资源遭到严重破坏,现已被列为国家重点保护的珍稀濒危物种。由于兰科植物种子细小,萌发困难,同时无性繁殖系数低,加上其生长发育需特殊的生态环境,给此类药材大面积栽培造成很大困难。我

国已陆续报道了铁皮石斛、金线莲人工试管繁殖方面的研究结果^[1~4],但试管苗出瓶问题一直没有得到很好解决。在自然界中,几乎所有的兰科植物均与真菌共生,依赖共生真菌为其提供营养。本文选择 3 种兰科植物的内生真菌,通过与无菌试管苗的双重培养,研究共生真菌对铁皮石斛和金线莲生长的促进作用,为开辟铁皮石斛、金线莲人工栽培的新途径奠

* 收稿日期: 2001-08-06

基金项目: 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金 (199950);国家自然科学基金 (39970018);高等学校博士点学科点专项科研基金资助项目 (1998002337)

作者简介: 高微微 (1963-),女,北京人,中国医学科学院协和医科大学药用植物研究所副研究员,硕士生导师,研究方向为中药新药研究与开发。

* 通讯作者

定基础。

1 材料与方法

- 1.1 植物材料: 铁皮石斛 *D. candidum* 金线莲 *A. roxburghii* 均为通过组织培养得到的原球茎及无菌试管苗。铁皮石斛苗株高 0.7~1 cm, 金线莲苗株高 2~3 cm。
- 1.2 实验用菌: 03号菌为开唇兰小菇 *Mycena anoectochila*, 05号菌为石斛小菇 *M. dendrobii*, 17号菌为兰小菇 *M. orchidicola*, 均为本实验室分离鉴定。使用之前先接种在平皿麦麸培养基上活化培养 7~10 d, 待长满后用于共生培养。
- 1.3 植物及真菌双重培养基: 1.0% 琼脂+ 1/4 MS+ 0.7% 蔗糖, 装入 100 mL 三角瓶, 每瓶 40 mL, 120℃ 灭菌。
- 1.4 内生真菌与植物的共生培养: 将铁皮石斛、金线莲的无菌试管苗垂直接种到双重培养基上, 铁皮石斛每瓶 2 丛苗, 每丛 5~10 棵聚集在一起, 苗丛基部有部分原球茎 (团块直径 0.5 cm), 金线莲每瓶 3 株苗, 同时, 将在平皿麦麸培养基上活化好的 3 种真菌, 用打孔器打成大小相同的菌片, 接种在距离苗 1.5 cm 处, 石斛每个处理重复 5 瓶, 金线莲每个处理重复 3 瓶, 25℃, 每日光照 12 h 条件下培养, 定期观察并记录苗和菌的生长情况, 数据进行统计分析。

2 结果

- 2.1 内生真菌对铁皮石斛生长的影响: 结果见表 1。双重培养基上的 3 种真菌以 17 号菌生长最快。在 7 d 时, 05 号菌和 17 号菌生长的菌丝已接触到苗, 这两个处理组的石斛苗生长量分别是对照的 3.13 和 5 倍, 其中, 接种 05 号菌的石斛原球茎增殖了 1.66 倍, 而对照原球茎无增殖; 03 号菌与苗之间尚有一段距离, 但接种 03 号菌的石斛原球茎明显增殖, 苗的生长高于对照 3 倍。至第 35 天时, 对照原球茎增殖明显, 植株开始生长, 而接种 3 种菌的未成苗的原球茎大部分被菌丝覆盖, 不能继续增殖, 细胞破裂死亡。此时, 03 号菌和 17 号菌明显促进已发育成苗的植株生长; 接种 05 号菌和 17 号菌新增苗数显著高于对照, 说明这两种菌对试管苗的分化有促进作用。
- 2.2 内生真菌对金线莲生长的影响: 3 种真菌对金线莲苗生长的影响结果见表 2。接种 03 号菌 (开唇兰小菇)、05 号菌 (石斛小菇) 的金线莲苗新芽、新根的萌发数均显著高于对照。接种内生菌的金线莲苗, 叶片大而伸展, 茎粗明显高于对照, 相比之下, 对照苗叶片小而卷曲, 茎纤细, 生长不如接菌苗健壮, 说明 3 种菌均有壮苗的作用。05 号菌促进侧芽增殖的同时仍有壮苗作用, 17 号菌使茎增粗的原因与植株生长量低是否有关尚待进一步研究。

表 1 3 种内生真菌对铁皮石斛原球茎增殖及苗生长的影响

菌 株	7 d			35 d		
	苗平均增高 (mm)	新增苗数	原球茎增殖 倍数	苗平均增高 (mm)	新增苗数	原球茎增殖 倍数
对照	0.40	0	0	1.00	5.00	1.00
03	1.20	0	0.86	3.20	3.33	0.00
05	1.25	0	1.66	1.25	13.33	0.00
17	2.00	0	0	2.22	10.00	0.00

与对照组比: * $P < 0.05$; 原球茎增殖倍数 = 现原球茎团块的直径 - 接种原球茎团块的直径 / 接种原球茎团块的直径

表 2 3 种内生真菌对金线莲茎芽增殖及生长的影响

菌 株	15 d			35 d			
	苗增高 / 株 (cm)	新增芽数 / 株	新根数 / 株	苗增高 / 株 (cm)	新增芽数 / 株	新根数 / 株	茎粗 (mm)
对 照	0.60	0	0	1.00	5.00	0	1.2
03	0.17	0	0.08	0.70	0.38	0.15	1.5
05	0.00	0	0.17	0.23	0.33	0.17	2.3
17	0.33	0	0	0.34	0.07	0	3.0

与对照组相比: * $P < 0.05$

3 讨论

- 3.1 双重培养: 实验所用的 3 种小菇属真菌分别分离自不同的兰科植物根, 开唇兰小菇 (03) 来自金线莲, 石斛小菇 (05) 来自铁皮石斛, 兰小菇 (17)

来自墨兰, 郭顺星等鉴定并命名^[5,6], 范黎等报道了兰小菇能够促进兰科植物种子萌发^[7]。有关内生真菌促进兰科植物种子萌发的研究较多^[8,9], 对抽出绿叶的兰苗的作用尚未见报道, 我们通过反复试验, 建

立了兰科植物无菌试管苗与内生真菌双重培养方法,使植物与有益真菌在一段时间内共同生长。实验证明,这是一个研究内生真菌与兰科植物苗之间相互作用的良好体系。

3.2 3种菌对铁皮石斛生长的作用:在实验室的双重培养条件下,3种内生真菌早期表现出对铁皮石斛有促生长作用,此时 03号菌尚未接触到石斛苗,已表现出对石斛原球茎增殖及苗的生长有明显促进作用,原因可能是菌的代谢产物对石斛有一定的作用。张集慧等^[10]从开唇兰小菇、石斛小菇和兰小菇发酵液的乙酸乙酯萃取部分中分离出了 5种植物激素,产生植物激素也是真菌促生长的机制之一。后期菌丝生长旺盛,侵入原球茎后造成原球茎死亡,促生长作用减弱,并有死苗现象,说明共生促生长是有条件和相对的。

3.3 3种菌对金线莲生长的作用:金线莲的接种材料为单株试管苗,在不接种菌时,没有侧芽和侧根萌出,接种 03或 05菌后,则明显有新侧芽和侧根萌出,我们认为与菌产生激素有关。接种菌的金线莲苗生长量均明显低于对照,原因可能是培养瓶中的营养有限,菌生长消耗了部分营养,从而影响了植株的生长。

大量研究已经证明,兰科植物与菌根真菌之间

的关系不是高度专一的,铁皮石斛和金线莲为两种不同属、不同生态型的植物,3种菌对两种植物均有促生长作用,说明它们对兰科植物的生物活性没有明显的种属专化性,对这些内生菌的利用,无疑为促进铁皮石斛及金线莲试管苗移栽成活,提供了更多的机会,也为其它兰科植物的栽培,提供了新途径。

参考文献:

- [1] 刘瑞驹,蒙爱东,邓锡青,等.铁皮石斛试管苗快速繁殖的研究[J].药学学报,1983,23(8):636-640.
- [2] 张治国,王黎,刘骅,等.铁皮石斛原球茎分化适宜培养基研究[J].中国中药杂志,1993,18(1):16-19.
- [3] 陈泽宇,江秉华,陈钢.金线莲快速繁殖研究[J].中草药,1992,23(2):108-109.
- [4] 王建勤,陈钢,林兰英.金线莲原球茎的组培诱导[J].中药材,1995,18(1):3-5.
- [5] Guo S X, Fan L, Cao W Q. *Mycena anoectochila* sp. nov. isolated from macorrhizal root of *Anoectochila roxburghii* from Xishuangbanna of China [J]. Mycologia, 1997, 89(6): 952.
- [6] Guo S X, Fan L, Cao W Q. *Mycena dendrobii*, a new mycorrhizal fungus [J]. Mycosystema, 1999, 18(2): 141.
- [7] 范黎,郭顺星,肖培根,等.墨兰共生真菌一新种的分离、培养、鉴定及其生活活性[J].真菌学报,1996,15(4):251.
- [8] 郭顺星,徐锦堂.促进石斛等兰科药用植物种子萌发的真菌分离与培养[J].中草药,1990,21(6):30.
- [9] 郭顺星,徐锦堂.真菌及其培养物提取液在细叶石斛种子萌发中的作用[J].中国中药杂志,1990,15(7):13-14.
- [10] 张集慧,王春兰,郭顺星,等.兰科药用植物的5种内生真菌产生的植物激素[J].中国医学科学院学报,1999,21(6):460-465.

厚朴的任意引物 PCR 指纹图谱分析

苏应娟¹,朱建明¹,王艇^{1*},李雪雁¹,曾庆文²,夏念和^{2*}

(1. 中山大学生命科学学院,广东 广州 510275; 2. 中国科学院华南植物研究所,广东 广州 510520)

摘要:目的 鉴别中药材厚朴、凹叶厚朴及其常见的伪品和混淆品。方法 采用任意引物 PCR (arbitrarily primed PCR, AP-PCR) 技术扩增植物基因组 DNA 样品。结果 AP-PCR 技术获得清晰可靠的 DNA 指纹图谱,根据琼脂糖凝胶上显示的 DNA 带型差异可迅捷地区分厚朴、凹叶厚朴及其伪品、混淆品。结论 为应用 AP-PCR 技术在分子水平上鉴别中药材厚朴,保证引种的准确性奠定了基础。

关键词: 中药材;厚朴;AP-PCR

中图分类号: R282.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)06-0545-04

Fingerprint of arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for *Magnolia officinalis*

SU Ying-juan¹, ZHU Jian-ming¹, WANG Ting¹, LI Xue-yan¹, ZENG Qing-wen², XIA Nian-he²

(1. School of Life Sciences, Sun yat-set University, Guangzhou Guangdong 510275, China; 2. South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou Guangdong 510520, China)

Abstract Object To identify *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. and *M. biloba* Rehd. et Wils. as well as their counterfeits and easily confusable substitutes. **Methods** Total genomic DNA samples of ten

* 收稿日期: 2001-08-06

* 通讯作者