

野生、退化、复壮蜜环菌对天麻产量及天麻素量的影响

孙士青*, 马耀宏, 孟庆军, 张利群, 杨 艳, 史建国*

(山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250014)

摘要:目的 通过复壮已退化的蜜环菌, 恢复其促进天麻生长及天麻素积累的作用。方法 将相同来源的蜜环菌 *Armillaria mellea* 野生菌种、该野生菌种连续无性繁殖退化的后代菌种以及退化后复壮的菌种接种到同一品种的天麻 *Gastrodia elata* 上进行栽培试验, 测定天麻的生物产量和天麻素质量分数。结果 野生菌种组与退化菌种组相比较、复壮菌种组与退化菌种组相比较在天麻产量、天麻素质量分数上有显著性差异 ($P < 0.01$)。结论 采用诱导子实体方法可以使退化的蜜环菌复壮, 其促进天麻生长、天麻素积累的作用也得以恢复。

关键词: 天麻; 天麻素; 蜜环菌; 退化; 复壮

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1300-03

Influences of wild, degradative, and rejuvenative *Armillaria mellea* on yield of *Gastrodia elata* and content of gastrodin

SUN Shi-qing, MA Yao-hong, MENG Qing-jun, ZHANG Li-qun, YANG Yan, SHI Jian-guo

(Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract: **Objective** By rejuvenation of degradative strain, the effects of *Armillaria mellea* to promote the growth of *Gastrodia elata* and to accumulate the gastrodin in *G. elata* could be recovered.

Methods *G. elata* was inoculated with same variety of *G. elata* with *A. mellea* of wild strain, degradative strain for continuously asexual reproduction and rejuvenative strain, and the yield of *G. elata* and the content of gastrodin of *G. elata* were determined.

Results The significant differences ($P < 0.01$) between wild strain and degradative strain, rejuvenative strain and degradative strain in the yield of *G. elata* and the content of gastrodin were discovered ($P < 0.01$). **Conclusion** Rejuvenation of degradative strain of *A. mellea* was made by artificial inducement of fruit body, and the effects of *A. mellea* to promote the growth of *G. elata* and to accumulate the gastrodin in *G. elata* could be recovered.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; gastrodin; *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Earst; degradation; rejuvenation

蜜环菌 *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Quel. 是天麻 *Gastrodia elata* Bl. 生长发育必不可少的共生菌, 栽培天麻时如无蜜环菌菌材伴栽, 天麻块茎就会因得不到营养而无法生长并逐渐消亡。天麻栽培所用的蜜环菌菌种经长期多次无性传代后都会逐渐退化, 如用已发生退化的菌种伴栽天麻则导致天麻产量与天麻素质量分数急剧下降^[1,2]。为了对退化的蜜环菌进行菌种复壮, 也为了获得蜜环菌单孢子和单倍体菌株用于鉴定蜜环菌的生物种系, 近年来成功进行了蜜环菌子实体的诱导^[3]和蜜环菌菌种复壮的研究^[4]。笔者将在天麻主产区采集到的野生蜜环菌菌株、该野生蜜环菌连续无性繁殖三代后的退化菌株以及退化后的复壮菌株分别接种到同一品种的天麻上进行栽培试验, 收获天麻后测定天

麻生物产量及其有效成分天麻素的量。

1 材料

1.1 蜜环菌的采集: 在我国主要天麻产区秦岭南侧、大巴山北侧的13个市县进行。用植物解剖刀剖取天麻菌材(多为青杠树段)的周皮以及缠绕在上面的蜜环菌菌索, 置保湿袋中。

1.2 培养基

1.2.1 液体培养基: 锯末 200 g 加水 100 mL 煮沸 20 min, 取滤液加入以下各物质: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 5 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g。溶解后加水至 1 000 mL, 常规灭菌。

1.2.2 固体培养基: 取锯末 300 g, 麸皮 100 g, 白糖 40 g 加水至含水量 65%~70%, 装入广口瓶中加棉塞后常规灭菌。

* 收稿日期: 2008-10-17

作者简介: 孙士青(1957—), 男, 上海人, 硕士, 副研究员。研究方向为蜜环菌、天麻生物学研究。

Tel: 82605742 (O) 15853123750 (M) E-mail: sundaiman77@yahoo.com.cn

1.2.3 诱导子实体培养基^[3]:每升麦芽汁(固形物 45 g/L)中加琼脂 15 g,自然 pH,采用 500 mL 三角瓶,培养基装置 300 mL/瓶,两层棉布和一层牛皮纸封口,121 °C 灭菌 30 min。

1.3 供试天麻麻种与天麻素

1.3.1 天麻麻种为天麻初生球茎(小白麻),由陕西省宁强天麻研究所提供,属乌天麻 *Gastrodia elata* Bl. f. *glauca* S. Show 变型,为我国天麻产区的主要栽培品种(由山东中医药大学药用植物教研室石俊英教授鉴定)。

1.3.2 天麻素对照品:由中国科学院昆明植物研究所提供。质量分数大于 98%。

1.4 仪器及色谱条件^[5]:日立 638—50 高效液相色谱仪,638 多波长检测器(选用 270 nm,0.16 AUFS,仪器自带数据处理机)。色谱柱为 Zorbax ODS (250 mm × 4.6 mm),流动相:0.025 mol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 - CH_3OH = 97 : 3,体积流量:1 mL/min,纸速:2.5 mm/min,天麻素峰保留时间 10.30 min。

2 方法与结果

2.1 蜜环菌纯培养及分型:将采到的菌索用自来水冲净泥沙,置 0.1% 升汞溶液中,表面消毒 25 min,取出后用无菌水冲去残余升汞液,用无菌剪刀剪成 1.5~2 cm 长的菌索小段,移入 PDA 平板培养基上,22~25 °C 培养 3~5 d,挑取萌发的菌丝转入 PDA 斜面培养基上,继续培养。

2.2 连续无性繁殖乙型蜜环菌菌种的采集:取上一年收获天麻后的蜜环菌菌材,按 2.1 方法得下一代无性繁殖蜜环菌纯培养,经 3 个生长季节连续传代得退化蜜环菌菌种。

2.3 菌种复壮(诱导子实体):挑取连续无性繁殖三代已退化蜜环菌菌索尖端,按 2.1 方法得纯培养,将纯培养菌丝接种在 1.2.3 诱导子实体培养基上,25 °C 暗培养 25 d 后转 18 °C、相对湿度 90%,每天 12 h 散射光周期条件下培养至产生子实体。从子实体上取单孢子按 2.1 方法得复壮蜜环菌纯培养。

2.4 接种物的制备:将蜜环菌纯系菌丝接种在 2% 水琼脂平板培养基上,25 °C 培养 30~35 d。

2.5 蜜环菌菌材制备

2.5.1 蜜环菌液体扩大培养(二级种):用 4 号灭菌打孔器在接种物上打取直径 0.5 cm 的蜜环菌水琼脂块,接入盛有液体培养基 100 mL 的摇瓶中,25 °C 震荡培养 7 d。

2.5.2 蜜环菌固体扩大培养(三级种):将培养好

的蜜环菌液体培养物转入固体培养基上,25 °C 培养 30 d。

2.5.3 蜜环菌菌材制备:选长短适宜、直径 3.5~4 cm 的苹果树木段,每隔 7 cm 砍鱼鳞口一个,深达木质部,将木段堆放后使充分吸水。将培养好的蜜环菌三级种 500 g 塞入已经处理过的鱼鳞口中,塞紧压实后排放在盆中加辅料(锯末-砂 3 : 1)掩埋,浇水保湿。

2.6 天麻栽种与管理

2.6.1 选种:选择无损伤、无病虫害、大小均匀的天麻初生球茎(小白麻)作麻种。

2.6.2 栽植:在直径 45 cm、高 25 cm 的大瓦盆中下种麻 50 g,先将辅料扒开,将麻种顺序平放在菌棒之间,种麻间距 7~8 cm,再覆辅料 5~7 cm,浇水保湿,每个菌号接种 3 盆天麻。

2.6.3 生长期管理:控制温度 22~25 °C,湿度在 40%~50%,浇水要勤浇少浇,保持料面湿润,8 个月后收获天麻。

2.7 天麻素测定

2.7.1 天麻样品的炮制:按《中国药典》2005 年版天麻炮制项下的要求进行,收获天麻后用毛刷刷去泥沙,称取鲜质量。将接有不同菌号蜜环菌的天麻分别置沸水浴上蒸至透心,转 70 °C 烘箱中烘干,称质量后用植物粉碎机粉碎、过筛,收集 18~22 目颗粒。

2.7.2 标准曲线的绘制:称取 105 °C 干燥至恒重的天麻素对照品 5.0 mg,置 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解定容,按进样量对峰面积作图,得回归方程 $Y = 0.832 X + 4$, $r = 0.999 2$ 。线性范围为 0.1~5 mg/mL。

2.7.3 样品液制备与测定:称取处理好的天麻颗粒 1.000 0 g 到入滤纸筒内,置索氏提取器中,加入甲醇(分析纯) 150 mL,浸渍过夜,于 80 °C 水浴回流提取 6 h,回收大部分甲醇后转移至 10 mL 量瓶中,以甲醇定容,摇匀过滤,即得样品液。进样量 10 μL ,以峰面积计算质量分数,并进行方差分析,结果见表 1。

3 讨论

将同一来源的蜜环菌野生菌种、连续无性繁殖三代退化的菌种以及退化后复壮的菌种接种在同一品种的天麻上进行栽培试验,对收获天麻的产量与天麻素的质量分数进行测定,并对数据进行方差分析,显示天麻生物产量(干质量)、天麻素的质量分数:野生菌种与退化菌种处理组之间差异极显著

表1 野生、退化、复壮蜜环菌对同一天麻生物产量、天麻素量的影响

Table 1 Effect of wild, degradative, and rejuvenative *A. melaleuca* on yield of *G. elata* and content of gasterodion

菌号	鲜质量/g	干质量/g	天麻素/%
野生菌种	A1-1 444.85	290.53	0.443 8 *
	A1-2 452.37	301.12 (297.51 ± 6.05) * *1	0.432 4 (0.437 6 ± 0.005 7) * *1
	A1-3 450.52	300.89	0.437 6
退化菌种	A2-1 212.04	110.64	0.155 8
	A2-2 224.38	103.27 (107.41 ± 3.77)	0.167 2 (0.162 0 ± 0.005 8)
	A2-3 219.56	108.33	0.163 0
复壮菌种	A3-1 438.42	287.26	0.431 2
	A3-2 445.55	292.32 (290.14 ± 2.60) * *2	0.438 2 (0.436 7 ± 0.004 9) * *2
	A3-3 440.31	291.85	0.440 7

* 3次测定结果的均值; * *1野生菌种组与退化菌种组之间比较差异极显著 ($P < 0.01$); * *2复壮菌种组与退化菌种组之间比较差异极显著 ($P < 0.01$)

* mean of three analyses; * *1 significant difference between wild and degradative strains ($P < 0.01$); * *2 significant differences between rejuvenative and degradative strains ($P < 0.01$)

($P < 0.01$);复壮菌种与退化菌种处理组间差异极显著 ($P < 0.01$);野生菌种与复壮菌种处理组间无显著性差异,在栽培试验中复壮的蜜环菌与野生的第一代蜜环菌菌材上的菌索(rhizomorph)颜色红亮、粗壮,生长态势旺盛;而无性繁殖第二代蜜环菌菌索色泽、生长态势均次于第一代菌索;第三代菌索则更差,这一现象符合微生物生长代谢的一般规律,表明栽培天麻的产量与质量不仅取决于麻种的质

量,而且与菌种的无性繁殖代数密切相关,蜜环菌连续无性繁殖代数越高其质量越差,药农所谓“菌棒只能用一年的说法”是有科学依据的。

目前实验室条件下采用诱导子实体方法能够使由于连续无性繁殖退化的蜜环菌菌种复壮,其促进天麻生长及天麻素积累的生物学效能相应得到恢复。但在天麻实际生产过程中药农需在每个栽培季节开始前,采集优良的野生蜜环菌菌种扩大培养作为当年的天麻栽培用菌种,而对于前一年收获天麻后剩余的蜜环菌菌材由于缺乏大生产条件下诱发子实体的适宜方法大多废弃造成浪费,今后应加强大生产条件下栽培天麻后剩余蜜环菌菌材诱导产生子实体的研究。一旦突破即可形成栽培天麻后剩余蜜环菌菌材成为美味食用菌榛蘑(即蜜环菌子实体)的栽培料,实现植物、微生物资源最大限度的利用。

参考文献:

- [1] 王秋颖,郭顺星,关凤斌.不同来源蜜环菌对天麻产量影响的研究[J].中草药,2001,32(9):839-841.
- [2] 孙士青,史建国,李雪梅,等.连续无性繁殖蜜环菌对天麻生物产量及天麻素含量的影响[J].山东科学,2008,21(4):10-12.
- [3] 程显好,郭顺星.蜜环菌子实体的诱导和发生条件[J].菌物学报,2006,25(2):302-307.
- [4] 王淑芬,杨金玲,朱平,等.蜜环菌菌种的复壮研究[J].中国中药杂志,2008,33(2):121-123.
- [5] 谢笑天,郑萍,李海燕,等.反相HPLC法测定天麻中药材中天麻素含量[J].云南化工,2004,31(4):23-25.

刺五加叶柄的体细胞胚胎发生研究

邢朝斌¹,劳凤云²,田春迎¹,王建石^{1*}

(1. 华北煤炭医学院 生物科学系,河北 唐山 063000; 2. 华北煤炭医学院 药理学系,河北 唐山 063000)

摘要:目的 以来源广泛、原植物药用成分可测定的刺五加叶柄为外植体,研究刺五加体细胞胚胎发生情况,为实现药用成分高产刺五加的快速繁殖奠定基础。方法 以3年生植株萌发15 d以内的刺五加复叶叶柄为外植体,考察2,4-D和BA对刺五加体细胞胚胎发生的影响。结果 28 d培养后,2,4-D 1.5 mg/L + BA 1.0 mg/L处理的叶柄外植体中71.4%直接产生或经由愈伤组织间接产生了8.5个体胚。两种产生方式均可在诱导培养基中进行,但间接发生比例较少。转入相同或降低2,4-D质量浓度的培养基后,体胚渐次发育成熟。同时新的体胚也在逐渐产生,经由间接途径产生的体胚所占比例也随之上升。结论 刺五加可以通过萌发15 d以内的复叶叶柄外植体实现体细胞胚胎发生,体胚诱导率取决于2,4-D和BA的质量浓度。

关键词:刺五加;叶柄;体细胞胚胎;2,4-D;BA

中图分类号:R282.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)08-1302-04

* 收稿日期:2008-10-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30701086)

作者简介:邢朝斌(1975—),男,河北省定州市人,讲师,硕士,主要从事药用植物细胞工程方面的研究。

Tel: (0315) 3726238 E-mail: xingzhaobin@yahoo.com.cn