

# 铁皮石斛菌根化研究

刘婷婷, 伍建榕, 合灿帆

(西南林学院 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室 云南 昆明 650224)

**摘要:**应用显微技术探讨铁皮石斛与菌根真菌之间的相互作用。从野生铁皮石斛根中分离出的 YSH101、YSH502、YSH131、YSH133 4 株菌株, 接种到铁皮石斛组培苗上进行接菌试验, 结果表明: 接菌处理组培苗与对照生长情况有明显差异, 并筛选出 YSH131 菌株为铁皮石斛的优良菌根真菌。因此, 铁皮石斛组培苗的菌根化是解决铁皮石斛人工大量繁殖栽培的有效措施。

**关键词:**铁皮石斛; 菌根真菌; 菌根化

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)09-0107-03

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et migo)属于兰科石斛属多年生附生草本植物, 因其表皮呈铁绿色而得名。铁皮石斛是《中华人民共和国药典》中收载的 5 种石斛属植物之一, 具有独特的药用价值。《本草纲目》中评价铁皮石斛“强阴益精, 厚肠胃, 补内绝不足, 平胃气, 长肌肉, 益智除惊, 轻身延年”。野生铁皮石斛自然繁殖率低, 仅在我国云、贵、川和广西等地海拔 600 ~ 2 500 m 的林下古树和水沟旁陡峭的岩壁上生长<sup>[1]</sup>。近些年来, 过度采挖和生境破坏, 其野生资源已濒临灭绝, 被国家列为重点保护药用植物之一。为了保护这一珍贵的野生兰科植物, 就需要大量的繁殖, 一般采用植物组培技术, 但兰科植物组培苗移栽的成活率较低, 而且生长比较缓慢。铁皮石斛组培苗本身没有药用价值, 必须移栽到大田里放养 2~3 a, 才会积累药效成分。目前, 报道了铁皮石斛种子繁殖、种植成功, 但尚未有介绍铁皮石斛组培苗大面积栽培的方法<sup>[2]</sup>。而且, 普遍认为组培苗到大田栽培的中间环节是制约铁皮石斛人工大量生产和发展的障碍<sup>[3]</sup>。在自然状态下, 兰科植物要与真菌共生形成菌根, 才能使兰科植物健壮的生长。该研究主要通过对铁皮石斛组培苗做接菌试验, 对人工栽培铁皮石斛技术进行一定的探讨, 为保护野生铁皮石斛和大量人工繁殖提供实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

铁皮石斛组培苗; 栽培基质: 灭菌的麻栎叶、树皮、苔藓(2 : 2 : 1); 供试菌株: YSH101、YSH502、YSH131、YSH133; 二级菌种培养材料: PDA 平板和新鲜麻栎叶。

第一作者简介: 刘婷婷(1983-), 女, 山东济阳人, 硕士, 研究方向为森林保护学。E-mail: tingtingliu2006@126.com。

通讯作者: 伍建榕。

收稿日期: 2008-04-07

### 1.2 方法

1.2.1 铁皮石斛组培苗的培育 铁皮石斛的种子播种于 1/2MS 基本培养基, 添加 NAA、活性炭、椰子汁等的培养基上。置于 25℃ 的光照培养箱中培养, 经过一段时间种子开始转绿并逐渐膨大, 产生原球茎。从种子转绿膨大到抽芽大约需要 40 d 左右。50 d 左右开始抽出嫩芽, 每瓶初代播种苗经 2~3 次继代培养, 分转为 40 瓶生根播种苗(每瓶 25 株)。培养 80 d 左右长成根茎叶整齐, 生长成健康的播种苗。

1.2.2 二级菌株的制备 将供试菌株接种在 PDA 平板上, 置于 25℃ 恒温培养, 待菌丝长满平板后作为一级菌种。二级菌种采用壳斗科麻栎叶片培养, 洗净麻栎叶, 晾干, 剪成小片(4 mm×4 mm), 装入组培瓶中, 置于 121℃ 的高压灭菌锅灭菌 30 min, 冷却, 再将一级菌种连同培养基接种在麻栎叶上, 25℃ 恒温培养至菌丝长满叶片, 用作铁皮石斛组培苗的接菌。

1.2.3 接菌试验 将铁皮石斛组培苗从光照培养箱中取出置于室温下 1 周, 练苗。取出幼苗, 冲洗掉附在根部的琼脂块, 用吸水纸吸干水分称取鲜重(0.0001 g)后种植到装有栽培基质的花盆中, 同时将染菌的麻栎叶放入根的周围, 与根相距 0.5 cm, 再用基质把根盖好, 置于室温下生长, 每日早、晚喷 1 次蒸馏水。同时设 2 组对照(不加麻栎叶为 CK1, 加不染菌麻栎叶为 CK2), 每组处理重复 5 次。接菌第 90 d 后, 取出幼苗再次称取鲜重, 计算鲜重增长率, 即(处理后鲜重-处理前鲜重)×100/处理前鲜重。

1.2.4 接种菌株的重分离 取接菌的组培苗的新鲜营养根的根段, 用水洗净, 放入超净台用 75% 的酒精 30 s, 0.1% 升汞溶液浸泡 8 min 左右, 对材料表面进行灭菌, 无菌水冲洗 4~5 遍, 在培养皿中横切成 3~5 mm 薄片, 置于 PDA 中(含有 100 mg/kg 氯霉素), 切面朝向培养基, 每皿放 4 片, 25℃ 恒温避光培养。经过 3~5 d 菌

丝从组织上长出并形成一定大小菌落时,从菌落的边缘挑取菌丝转移到另一 PDA 平板,重复至纯培养,进行鉴定,转入斜面,置于 4℃的冰箱内保存。

## 2 结果与讨论

在铁皮石斛组培苗的接菌处理中,大部分幼苗叶色正常,根生长正常,其中 YSH101、YSH502、YSH131、

YSH133 这 4 种菌株的处理鲜重增长率与对照有增长。结果证明,以上供试菌株均能与铁皮石斛形成菌根,特别是 YSH131 菌株的效果最好。在对处理苗的新鲜营养根重分离后,获得了原接种菌株。另外,处理苗与对照苗在生根数量、长度、长势均有差异(见表 1)。

表 1 铁皮石斛组培苗的接菌结果

处理号	处理菌株	植株成活率/ %	生长情况	平均鲜重增长率/ %	重分离原菌株
1	YSH502	100	浓绿	45.1	+
2	YSH101	100	浓绿	50.5	+
3	YSH131	100	浓绿	55.2	+
4	YSH133	80	正常	40.0	—
5	CK1 (不加桉叶)	100	正常	35.3	—
6	CK2(加桉叶)	100	正常	33.1	—

注“+”重分离结果为有,“—”重分离结果为无

自然状态下,兰科植物可以和真菌形成内生菌根并维持一定的共生关系,这些共生真菌广泛地分布于土壤中,而且各种真菌的生态分布与其栖息地有关,而不是由寄主决定的。确定分离的真菌是否为共生真菌,Warcup<sup>[4]</sup>认为应具备两个条件:一是该真菌必须是从植物细胞中分离的;二是将该真菌回接到植物上,能与植物共生。

兰科植物菌根真菌多为兼性寄生真菌,它们是多种植物的病原菌,对兰科植物则是共生的菌根真菌。在实验过程中,如果接菌量大或染菌的桉叶离根太近,石斛组培苗会出现根腐现象;而量少可以慢慢积累。因此,存在一个量和度的问题,YSH133 菌株可能就是由于接菌的量过多而造成死亡的。可以认为菌根中真菌同寄主之间的共生平衡关系是有条件的<sup>[5]</sup>,只有真菌与植株形成共生关系,才能互惠互利。另外,该试验在接菌的过程中,仅用了单一的菌株,自然环境是很复杂的,可以考虑几种菌株同时作用于植株,但是这样的话,菌株的混合、搭配、比例要进行大量试验。

不同菌株处理的铁皮石斛组培苗的影响有明显差异。在实验中,不同菌株处理的铁皮石斛组培苗的鲜重增长率高于对照的。其中,毛壳菌属的处理效果最好。在野外,铁皮石斛生长在高温高湿的环境,而毛壳菌对环境的要求也是如此。因此,可以认为毛壳菌是铁皮石斛的菌根真菌,对铁皮石斛生长有明显的促进作用。另外三种真菌对铁皮石斛的生长也有一定的促进作用。

1936 年 Burgeff<sup>[6]</sup>指出兰科植物与菌根真菌之间的关系不是高度专一的,但某种菌根真菌同哪种兰科植物更能有效地共生却有明显的倾向。Curtis 的研究结果表明:在相同生境下的不同兰花种之间有着相似的菌根真菌,而不同生境的同一兰花种有不同的菌根真菌,两者间的共生关系是非专一性的。范黎等<sup>[7]</sup>对兰花种子与

菌根真菌进行的共生萌发试验,表明不同的真菌可促进一种兰花的种子萌发,同一种真菌也可与一种以上的兰花的种子形成共生关系。说明兰科植物与菌根真菌之间的关系不是高度专一的,这种共生关系是有条件的,一旦条件改变可能会导致这种平衡关系发生变化<sup>[8]</sup>。所以,通过试验可以认为石斛类兰科植物与其菌根真菌之间并没有很严格的专一性要求。

## 3 总结

人工分离菌根真菌后,可以在 PDA 上大量培养并长期保存菌根真菌。铁皮石斛的组织培养技术已经十分成熟,接菌试验也已经基本成功。所以,人工大量繁殖铁皮石斛理论上已经可以实现。在适宜的条件下,通过对铁皮石斛组培苗的菌根化,实现人工大量繁殖和栽培铁皮石斛。这样就既能缓解铁皮石斛市场的压力,又能为保护濒危野生铁皮石斛资源起到一定的作用。

## 参考文献

- [1] Wang L. A. Expeditionary notes on habitat of *Dendrobium candidum* [J]. *Plants*, 1990(4): 29.
- [2] 付开聪,连守臣,冯德强,等.黑节草资源的应用与开发[J].*中草药*, 1999, 30(9): 708-711.
- [3] 徐红,王峰涛,丁家宜,等.药用石斛生物技术研究概况[J].*中国野生植物资源*, 2000(1): 1-4.
- [4] Warcup J H, Talbot P H B. Perfect states of rhizoctonias associated with orchids [J]. *New Phytol*, 1967, 66: 631-641.
- [5] 邢海福,王海霞,孟庆国.菌根化苗木造林的建议[J].*河北林业科技*, 2005(1): 44.
- [6] Harley J L. The Biology of mycorrhiza [M]. *Plant Science monographs* London. Leonard Hill. Limited Ede Street, N. W. L., 1959.
- [7] 范黎,郭顺星,曹文岑,等.墨兰共生真菌一新种的分离、培养、鉴定及其生物活性[J].*菌学报*, 1996, 15(4): 251-255.
- [8] 伍建榕,韩素芬,王光萍,等.兰科植物菌根研究进展[J].*西南林学院学报*, 2004, 24(3): 76-80.

# 求米草种子萌发特性研究

李 玓, 刘庆华, 王奎玲, 刘庆超, 许红印

(青岛农业大学 环境艺术学院 山东 青岛 266109)

**摘 要:** 对求米草种子萌发条件进行了研究, 结果表明: 求米草种子最佳的浸种时间是 12 ~ 24 h; 萌发最适的温度条件为 20 ~ 25 ℃; 光照对种子萌发的影响不大; 草炭+珍珠岩(1 : 1)及草炭最利于种子萌发。

**关键词:** 求米草; 种子; 萌发条件

中图分类号: S 688.4 文献标识码: A 文章编号: 1001—0009(2008)09—0109—03

求米草(*Oplismenus undulatifolius*)为禾本科求米草属多年生草本植物, 青岛崂山地区有自然分布。秆细弱, 基部倾斜, 节上生根, 高 20 ~ 50 cm; 叶扁披针形有横脉, 通常皱而不平, 分布于全国各省区<sup>[1]</sup>。求米草植株矮小, 姿态优雅, 小花玲珑秀丽, 极耐荫, 有很强的适应能力。如能将求米草配置于园林郁闭度较高的林下或建筑物的阴面, 这对于丰富园林植物种类具有重要的意义。

可作耐荫地被。在园林中应用时, 适宜配置在郁闭度较高的针叶或阔叶林下或栽植在建筑物的阴面, 能够形成半自然植物群落景观, 具有良好的景观效果。

有关求米草的研究报道甚少, 杨德奎<sup>[2]</sup>对求米草进行了细胞学研究, 发现了求米草的染色体数目为  $2n=12$ , 核型公式为  $K(2n)=12=8m+4sm$ , 核型“2A”型<sup>[2]</sup>。许多植物资源调查文献证实求米草是一种观赏价值高的野生耐荫地被植物<sup>[3-6]</sup>。

研究旨在通过探讨温度、光照和基质等因素对求米草种子萌发的影响, 确定种子的萌发适宜条件, 探讨其萌发特性, 从而为求米草的引种驯化提供理论依据。

## 1 材料与方法

该试验所用种子于 2006 年 11 月采于青岛崂山北九水风景区。将采集的野生求米草成熟小穗去杂、自然干燥后储藏在室内通风干燥处。种子发芽试验于 2007 年 3 月至 5 月进行。

**第一作者简介:** 李玓(1981-), 女, 河北石家庄人, 硕士, 研究方向为园林植物种质资源创新与利用。E-mail: dingding811110@163.com。

**通讯作者:** 刘庆华。E-mail: lqh6205@163.com。

**基金项目:** 山东省农业良种工程重大资助项目(鲁科字[2005]99号)。

**收稿日期:** 2008—03—31

# Study on Mycorrhization of Tissue Culture of *Dendrobium officinale* Kimura et migo

LIU Ting-ting WU Jian-rong HE Can-fan

(Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China State Forestry Administration, Southwest Forestry College, Kunming, Yunnan 650224 China)

**Abstract:** Using optical microscope to fund out the relationship between *Dendrobium officinale* Kimura et migo and fungi of mycorrhiza. The representative fungi of four were isolated from wilding *Dendrobium officinale* Kimura et migo. That includes YSH101, YSH502 YSH131 and YSH133. And that were inoculatef into the roots of plants of *Dendrobium officinale* Kimura et migo. The result showed that inoculated with plants were increased obviously while that of control. And YSH133 was proved to be a good endophytic fungi of *Dendrobium officinale* Kimura et migo. So mycorrhization in tissue culture was effective measure for the large quantity propagation of *Dendrobium officinale* Kimura et migo.

**Key words:** *Dendrobium officinale* Kimura et migo; Mycorrhiza fungi; Mycorrhization