

蜜环菌液对天麻试管快繁的影响

邹宁, 柏新富 (鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

摘要 试验以天麻种子萌发形成的小米麻为材料, 利用正交设计研究了天麻外植体消毒方法和激素、蜜环菌液在天麻组织培养中的作用。结果表明, 小米麻的最佳消毒程序为 75% 乙醇处理 20 s + 1% 氯化汞浸泡 5 min; 最有利于小米麻分化增殖的培养基是 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 蜜环菌液 100 g/L。试验发现, 蜜环菌液对天麻的组织培养具有良好的促进效果。

关键词 天麻; 蜜环菌; 组织培养

中图分类号 S567.23⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-661(2008)33-14456-03

Effect of *Armillaria mellea* Extraction on Growth of *Gastrodia elata* in Tissue Culture

ZOU Ning et al (School of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025)

Abstract The relationship between *Armillaria mellea* and *Gastrodia elata* is symbiotic. It was used in the tissue culturing of *Gastrodia elata*. Effect of *Armillaria mellea* extraction on the capacity of asexual reproduction of *Gastrodia elata* was studied in the work. The principle of the symbiotic relationship was discussed. The results showed that the best treatment process was to treat the plantlet of *Gastrodia elata* with 75% ethanol for 20 seconds and 1% hydrogryum chloride for 5 min. The optimal medium was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 100 g/L *A. mellea* extraction. The results showed that the extraction of *Armillaria mellea* could improve the development of the *Gastrodia elata* cells in tissue culture.

Key words *Gastrodia elata* Blume; *Armillaria mellea*; Tissue culture

天麻 (*Gastrodia elata* Blume) 为兰科 (Orehidaceae) 多年生异养草本植物^[1], 自然条件下不能独立生存, 主要靠消化外部侵入的蜜环菌菌丝体过异养生活^[2]。野生天麻为国家濒危三级保护植物, 现已野生变家种成功。1950 年以来, 我国学者对天麻的化学成分、药理及临床作用以及营养吸收进行了较系统的研究^[1,3], 但是天麻的人工繁育仍然十分困难, 是制约天麻生产和资源保护的关键。

自然条件下天麻完成一个生活史需要 3~4 年时间^[4], 但在人工控制下, 天麻完成一个生活史的时间可缩短到 2 年^[5]。天麻也可以以地下块茎、原球茎、白麻、米麻进行无性繁殖, 无性繁殖最大的特点是生长周期短、繁殖快, 但易退化^[4]。利用细胞工程进行天麻的快速繁殖不仅繁殖快, 而且组织培养过程中脱病毒处理可以避免种质的退化。但天麻的组织和细胞培养无性繁殖技术一直没有过关, 表现在培养基上为生长极慢, 转化率极低。

自然条件下, 天麻与蜜环菌 [*Armillariella mellea* (Vahl. ex Fr.) Karst] 是共生关系, 一方面, 蜜环菌从天麻块茎中吸收营养, 生长发育; 另一方面, 天麻也要依赖蜜环菌才能从周围环境中得到营养物质, 二者中任一生长不良都将影响另一方的生长^[6]。而蜜环菌在培养基上一旦生长即成为优势种, 会使天麻外植体培养受到污染死亡。笔者通过在培养基中添加蜜环菌液, 观察其对离体条件下天麻小块茎分化、增殖的影响, 以期为天麻的试管无性繁殖提供更有利的途径。

1 材料与与方法

1.1 材料 天麻 (*Gastrodia elata* Blume) 米麻由烟台市中医医院提供。蜜环菌 (*Armillaria mellea*) 菌种由鲁东大学微生物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 天麻外植体的消毒与培养。 将天麻外植体 (小米麻) 用自来水冲洗干净, 再分别用 75% 的酒精消毒 10、20、30 s, 然

后用 1% HgCl₂ 消毒 2.5 和 8 min, 无菌水清洗 6 次, 随后转接到 MS + 玉米素 (Zt) 0.5 mg/L + 萘乙酸 (NAA) 0.1 mg/L 的固体培养基中, 每种处理转接 30 个外植体, 置于 (25 ± 2) °C 室内暗培养。

1.2.2 蜜环菌液的制备。 将蜜环菌接种到含 2% 葡萄糖、0.6% 蛋白胨、1.0% 酵母膏的液体培养基上, 在 (25 ± 2) °C 的恒温摇床上以 150 r/min 的转速进行无光培养。7 d 后将培养好的蜜环菌自然沉淀后分离去上清液, 沉淀所得蜜环菌菌丝体经煮沸后作为蜜环菌液 (AE) 备用。

1.2.3 蜜环菌液及激素配比。 以 MS 培养基为基本培养基, 选择 6-卞基腺嘌呤 (6-BA)、萘乙酸 (NAA) 和蜜环菌液 (AE) 3 种处理因素, 采用 3 因素 3 水平正交试验, 正交表选用 L₉ (3³), 各因素水平见表 1。每种处理转接 15 瓶, 每瓶 2 个外植体, 培养 60 d 后统计结果。培养基含琼脂 7.5 g/L、蔗糖 30.0 g/L、pH 值 5.8, 培养温度 (25 ± 2) °C, 无光照。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	因素 Factor		
	(A)6-BA//mg/L	(B)NAA//mg/L	(C)AE//g/L
1	0.5	0.4	0
2	1.0	0.2	50
3	2.0	0.1	100

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对天麻外植体消毒效果的比较 从自然生长状态下获得的外植体, 其表面带有大量细菌和真菌。为了获得无菌培养物, 选择灭菌效果好、对试材杀伤力尽可能小的灭菌方法及处理时间尤为重要。用 75% 乙醇和氯化汞处理不同时间对天麻无菌材料获得的影响试验结果如表 2, 对表 2 结果的直观分析结果列于表 3。从表 2、表 3 可见, 乙醇处理不同时间对天麻外植体的污染率、死亡率和成活率有一定影响, 其中以 20 s 处理的成活率最高, 但 10、20 和 30 s 处理的差异并不明显。氯化汞不同浸泡时间, 杀菌效果明显不同, 处理时间越长、杀菌效果越好、污染率越低, 但死亡率则同步升高, 浸泡 2.5、8 min 的污染率和死亡率差异非常明显。

基金项目 山东省自然科学基金 (Y2006C107)。

作者简介 邹宁 (1963 -), 男, 山东烟台人, 博士, 教授, 从事植物生物技术研究。

收稿日期 2008-09-17

然而,外植体消毒的效果主要是考察成活率,在该试验中,以外植体消毒的最优组合为 75%乙醇 20 s + 1%氯化汞 5 min。乙醇处理 20 s 和氯化汞处理 5 min 的成活率最高,即天麻的

表 2 乙醇和 HgCl₂ 处理对无菌材料获得的影响Table 2 Effects of alcohol and HgCl₂ treatments on the acquisition of asepsis materials

乙醇处理时间//s Treatment time with ethanol	HgCl ₂ 处理时间//min Treatment time with HgCl ₂	外植体数 Number of explants	污染数 Contaminated number	死亡数 Death number	成活数 Survival number
10	2	30	26	1	3
10	5	30	15	8	7
10	8	30	8	20	2
20	2	30	26	3	1
20	5	30	9	9	12
20	8	30	5	17	8
30	2	30	23	5	2
30	5	30	11	10	9
30	8	30	6	19	5

注:表中数据为接种后 15 d 的观测结果。

Note: The data are the observation results on the 15th day after inoculation.

表 3 对表 2 结果的直观分析

Table 3 Intuitive analysis on the results of Table 2

处理 Treatment	污染数 Contaminated number	死亡数 Death number	成活数 Survival number
乙醇 Ethanol	10 s 20 s 30 s	16.3 13.3 13.3	9.7 9.7 11.3
氯化汞 HgCl ₂	2 min 5 min 8 min	25.0 11.7 6.3	3.0 9.0 18.7
极差 R	18.7	15.7	7.3

2.2 激素配比及蜜环菌液对天麻米麻增殖的影响 通过对天麻米麻在 MS + 玉米素 0.5 mg/L + 萘乙酸 0.1 mg/L 的培养基中生长分化情况的观察,发现绝大多数米麻生长、分化非常缓慢。在参考前人试验的基础上,考虑到蜜环菌在天麻生

长中的作用,笔者选用了不同激素配比和蜜环菌液组合,采用正交试验设计,以筛选适宜天麻米麻分化、生长的组培条件。各处理组合及 2 次试验的结果如表 4,对表 4 结果的直观分析列于表 5。

在正交试验结果的分析中,各因素不同水平间的极差越大,表明该因素越重要。从表 5 可见,6-BA、NAA 和蜜环菌液不同水平间的极差值差异并不大,说明 6-BA、NAA 及蜜环菌液对天麻小米麻的诱导均较为重要,其中又以蜜环菌液影响最大。由表 5 还可看出,绝大多数处理组合均能诱导出小米麻,但诱导数量差异较大。其中,6-BA 以水平 2,即 1.0 mg/L 效果最好;NAA 以水平 1,即 0.4 mg/L 效果最好;AE 以水平 3,即 100 g/L 效果最好。因此,可以认为该试验中诱导天麻小米麻的最佳处理组合为 A₂B₁C₃,即 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 蜜环菌液 100 g/L。

表 4 L₉(3⁴) 正交试验处理组合及试验结果Table 4 The treatment combinations and results of L₉(3⁴) orthogonal test

处理号 No. of treatments	因素及水平 Factors and levels				增殖米麻数//个/外植体 Number of proliferated <i>Gastrodia elata</i>	
	(A)6-BA	(B)NAA	(C)AE	空列 Blank line	试验 1 Test 1	试验 2 Test 2
	1	1	1	1	1	1.2
2	1	2	2	2	1.1	1.5
3	1	3	3	3	1.9	1.6
4	2	1	2	3	3.2	3.6
5	2	2	3	1	3.0	3.1
6	2	3	1	2	0.7	0.5
7	3	1	3	2	3.3	3.0
8	3	2	1	3	0	1.0
9	3	3	2	1	1.2	1.1

进一步对正交试验结果进行方差分析可知:蜜环菌液对天麻小米麻的诱导影响最大(与直观分析的结果一致),NAA 次之,6-BA 影响相对小一些,但三者都达到了极显著水平($P < 0.01$),即 6-卞基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)和蜜环菌液(AE)对小米麻的诱导均有极显著的影响,试验中应将三者均控制在最优水平上。同时,还得出,2 次试验之间差异不显

著,说明试验结果较为可靠。

另外,由于 A₂B₁C₃ 处理组合,即 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 蜜环菌液 100 g/L 在正交试验中并未出现过,为了验证其诱导效果,将正交试验中较优的处理组合 A₂B₁C₂ (6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 蜜环菌液 50 g/L)和 A₃B₁C₃ (6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 蜜环菌液 100 g/L)与该组

合进行对比试验,结果见表6。

表5 正交试验结果的直观分析

Table 5 Intuitive analysis on the results of orthogonal test

处理因素 Factors	各水平增殖米麻平均数			极差 R
	Average of proliferated <i>Gastrodia elata</i> at each level			
	1	2	3	
6-BA	1.33	2.35	1.60	1.05
NAA	2.50	1.62	1.17	1.33
AE	1.60	1.17	2.65	1.48
空列 Blank line	1.72	1.68	1.88	0.20

表6 3种处理组合对天麻原球茎增殖效果的比较

Table 6 Comparison of the proliferation effect of three treatment combinations on the protocorm of *G. elata*

处理组合 Treatment combinations	各因素水平 Levels and factors			米麻增殖数 个/外植体 Number of proliferated <i>G. elata</i>
	6-BA//mg/L	NAA//mg/L	AE//g/L	
A ₂ B ₁ C ₃	1.0	0.4	100	3.47 ± 1.02
A ₂ B ₁ C ₂	1.0	0.4	50	3.11 ± 1.04
A ₃ B ₁ C ₃	2.0	0.4	100	2.84 ± 1.30

由表6可见,处理组合 A₂B₁C₃ 对天麻小米麻增殖的效应优于 A₂B₁C₂ 和 A₃B₁C₃ 组合,虽然方差分析显示,3种处理组合间并无显著差异,但结合正交试验结果,仍可认为在该试验的设计范围内,A₂B₁C₃(6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 蜜环菌液 100 g/L)处理组合为最优组合。当然,如考虑到试验成本问题,也可选用 A₂B₁C₂(6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 蜜环菌液 50 g/L)组合。

3 结论与讨论

由于自然状态下,天麻依靠吸收蜜环菌中的养分来生长,而天麻块茎组织又不能与蜜环菌菌体在同一培养基中培养,该试验将蜜环菌液加入到培养基中,观察蜜环菌液对天麻块茎组织培养的影响。同时,由于植物生长调节物质对植

物组织和细胞的增殖、分化起着关键的作用^[7],在植物组织和细胞培养中,必须进行激素种类和浓度的配比试验。因此,该试验将激素浓度配比和蜜环菌液作为影响因素,采用正交设计以精简试验次数、克服在培养基配方设计上的盲目性、提高试验的可靠性。试验结果通过统计学分析,明确了影响天麻原球茎的诱导增殖的主要因素,同时优化筛选了最佳培养条件。

该试验结果表明,除了植物生长物质外,蜜环菌液对天麻原球茎的诱导也有极显著的影响,并且随浓度的增加而加强。但该试验设计的培养基中蜜环菌液浓度最高为 100 g/L,进一步增加其浓度是否会对天麻原球茎的诱导产生积极影响尚需进一步研究。同时,该试验中采用的蜜环菌液实际上是蜜环菌及其培养液的混合物,其中包括蛋白胨、酵母膏等成分,蜜环菌液对天麻原球茎的诱导的效应是否与这些成分的存在有关也需再做进一步的试验研究。

参考文献

- [1] 周铨,陈心启.国产天麻属植物的整理[J].云南植物研究,1983,5(4):361-368.
- [2] 蔡永萍,于力文,张鹤英,等.天麻的组织培养及快速繁殖[J].中草药,2001,32(5):445-446.
- [3] 吴沿友,刘能俊,龙青.天麻矿物质吸收及其营养机理探讨[J].广西植物,1999,19(4):377-380.
- [4] 周昌华,韦会平.天麻栽培技术[M].北京:金盾出版社,2004:11-12.
- [5] 王绍柏,袁国常,陈湘江,等.利用立体气候快速繁育杂交天麻[J].中草药,1997,28(4):229-232.
- [6] 邹容,康冀川.蜜环菌研究进展[J].山地农业生物学报,2005,24(3):260-264.
- [7] 朱至清.植物细胞工程[M].北京:化学工业出版社,2003:28-29.
- [8] CAO Y L, LUO Q, ZHANG X Y, et al. Effects of different culture conditions on vitrification of *Lycium barbarum* L. plantlets in tissue culture[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2):30-32, 115.
- [9] 孙士青,陈贯虹.不同蜜环菌对天麻生物产量及天麻素含量的影响[J].山东科学,2003,16(2):7-10.
- [10] GAO Y, ZHAO S Z, CHEN M, et al. Effects of sodium chloride stress on growth of sweet potato plantlets *in vitro* and ion content[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5):27-30.
- [11] MA M, HONG CH L, AN SH Q, et al. Seasonal, spatial, and inter-specific variation in quercetin in *Apocynum venetum* and *Pocynum hendersonii*, Chinese traditional herbal teas[J]. Agri Food Chem, 2003, 51:2390-2393.
- [12] 郭静谊,马淼.不同产地大叶白麻叶片槲皮素与总黄酮含量的比较[J].石河子大学学报:自然科学版,2007,25(1):9-11.
- [13] ZHAO J F, ZHANG W M, PENG X M. Genetic diversity in wild populations of *Pocynum hendersonii* from In Cand Arid Regions of Northwest China[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4):39-43.
- [14] 张吉宇.胡枝子属 14 个野生居群遗传多样性研究[D].兰州:甘肃农业大学,2003.
- [15] XU H X, ZHANG X, WANG S M, et al. Genetic diversity of *Achnatherum splendens*[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1):21-23, 28.

(上接第 14447 页)

更特殊的遗传信息,更重要的是该地区气候恶劣,生态脆弱,既存麻田系多年演变形成,一旦破坏,就不易恢复^[13]。近几年罗布麻资源考察时发现,此地的大叶白麻目前已退化较为严重,株高仅 0.2~0.5 m,株距达 0.8~3.0 m。如果再不加重点保护,该资源将会逐渐减少甚至消失,且格尔木的生境将会更加恶化。

参考文献

- [1] 刘娟,张春晖. RAPD 技术在中药领域的应用及其发展前景[J]. 黑龙江医药科学, 2006, 29(6):92-93.
- [2] 张卫明,王曼丽,彭雪梅,等. 三种“罗布麻”干燥叶片基因组 DNA 提取方法[J]. 南京师大学报:自然科学版, 2007, 30(1):102-105.
- [3] 绍武,胡瑞林,钱学射. 我国罗布麻分布区的地理区划[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(4):20-22.
- [4] 李巧明,赵建立. 云南干热河谷地区余甘子居群的遗传多样性研究[J]. 生物多样性, 2007, 15(1):84-91.
- [5] GRANT V. The evolutionary process: a critical study of evolutionary theory[M]. 2nd. ed. New York: Columbia University Press, 1991.
- [6] RICARDO T C, O'CONNELL M A. Genetic diversity of drought-responsive