

铁皮石斛根系促生内生真菌的筛选

李昆华, 杨丹, 苏娟, 李锋, 岳健* (云南山里红生物科技有限公司, 云南昆明 650206)

摘要 [目的]开展铁皮石斛根系促生内生真菌的筛选,为铁皮石斛的批量化生产提供生物防治基础。[方法]采用组织分离法对铁皮石斛根系内生真菌进行分离纯化,再通过单一回接试验将已分离内生真菌回接到铁皮石斛组培苗中,40 d后观察铁皮石斛根系生长情况,60 d后统计成活率。通过铁皮石斛根系生长指标,筛选出对根系促生作用最显著的内生真菌。[结果]从铁皮石斛根系中共分离得到21株内生真菌,筛选出8株优势促生根系内生真菌,其中回接菌株F₅的铁皮石斛组培苗生根率最高,达99.00%,回接菌株F₁₄的铁皮石斛苗成活率达100.00%,为对照组的395%。[结论]该研究成功解决了铁皮石斛移栽成活率低的难题。

关键词 铁皮石斛;内生真菌;筛选;根系生长;成活率

中图分类号 S567.23*9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)01-0128-02

Selection of Growth Promoting Endophytic Fungi for *Dendrobium candidum*

LI Kun-hua, YANG Dan, SU Juan, YUE Jian* et al (Yunnan Shanlihong Biological Technology Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650206)

Abstract [Objective] The aim was to screen out growth promoting endophytic fungi for *Dendrobium candidum*, to provide the basis for biological control of batch production of *Dendrobium candidum*. [Method] Endophytic fungi were isolated and purified from *Dendrobium candidum* roots by tissue isolation method. Through single inoculation experiment, the isolated endophytic fungi were inoculated to tissue culture seedlings. After 40 d, roots growth was observed, the survival rate was calculated after 60 d. By observing root growth index, endophytic fungi with most significant growth promoting effect were screened out. [Result] 21 strains of endophytic fungi were isolated from *Dendrobium candidum* roots, among which, 8 dominant endophytic fungi were screened out. The rooting rate of tissue culture seedling of strain F₅ was the highest, reaching 99.00%, the survival rate of F₁₄ was up to 100.00%, which is 395% of the control group. [Conclusion] The low survival rate of transplanting of *Dendrobium candidum* was successfully solved.

Key words *Dendrobium candidum*; Endophytic fungi; Screening; Root growth; Survival rate

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)是兰科石斛属多年生附生植物,在医药领域的研究与开发方面应用广泛,具有润肺清热、滋阴养胃、清肝明目、抵抗癌症、降低血糖等药用价值^[1-5],集中分布于福建、浙江、安徽、广西、云南等地^[6-7]。但由于铁皮石斛的自然繁殖率低,对环境条件要求较严格,产区药农长期采挖等因素导致自然资源已濒临灭绝。而铁皮石斛又因为种子微小,没有胚乳,因此自然条件下不利于获得大批量铁皮石斛幼苗^[8]。当前,石斛组织培养体系已成功建立,可大量繁殖石斛无性苗,但无性苗移栽成活率低、生长缓慢、生长周期长等问题,成为石斛无性苗人工栽培瓶颈^[9-10]。内生真菌的研究及应用可成为解决这一难题的突破口^[11-12]。植物内生真菌能够增强寄主植物抗病性、抗逆性等^[13-15]。目前,国内外关于铁皮石斛内生真菌的研究主要集中在铁皮石斛叶片内生真菌种属地位^[16]、内生真菌的形成特点和共生机制、内生真菌对铁皮石斛组培苗的促生作用^[17-18]、内生真菌的分离和鉴定方法方面^[19-20]。应用方面研究仅停留在内生真菌与铁皮石斛组培苗的共生培养阶段,而制约着铁皮石斛规模化生产的关键阶段——移栽阶段的内生真菌应用领域的研究尚属空白。该研究通过对铁皮石斛组培苗接种不同真菌菌株,筛选出能与铁皮石斛建立共生关系并能明显增加其移栽成活率的优良内生真菌,为铁皮石斛的工厂化繁殖提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试铁皮石斛根系采自于云南文山州广南

基金项目 昆明市官渡区科技计划项目(官科计字 2015-04)。

作者简介 李昆华(1982—),男,云南昆明人,从事石斛栽培与种植研究。*通讯作者,研究员,硕士,从事铁皮石斛种苗生产研究。

收稿日期 2016-10-12

县境内的野生铁皮石斛,将根样连同根际土壤装入牛皮纸袋中,带回实验室冷藏备用。

1.2 试验方法

1.2.1 内生真菌的分离。将野生铁皮石斛的根样用流水冲洗干净,用无菌水浸泡1 h,切成1 cm左右小段,用75%酒精消毒5 s,置于无菌水中浸泡1 min,再用0.1%升汞消毒1 min,无菌水冲洗6次,用已灭菌滤纸吸干根段水分,接种于PDA培养基内,每个培养基放置4个根段。并设置空白对照试验,即将已灭菌根样置于PDA培养基中滚动数次,若无菌落长出,则证明根段表面消毒合格。置于28℃恒温培养箱中培养,待菌丝从根组织上长出后,挑出尖端菌丝转移到另一PDA平板上纯化培养。然后转入PDA斜面培养基,最后将得到纯化培养的菌株接种到试管中,置于4℃冰箱保存。

1.2.2 内生真菌与铁皮石斛的共生培养。将铁皮石斛组培苗转接至50%MS培养基+0.75%蔗糖+0.80%琼脂培养基中进行生根培养。10 d后,每处理选取10瓶无污染的苗,用打孔器(直径0.5 cm)打取在PDA平板培养基上活化的菌株琼脂块,每瓶接入一个染菌的琼脂小块,置于瓶子中心,使染菌琼脂块离幼苗的距离相同,另取10瓶无污染苗在相同位置接入同等量的无菌琼脂块作为对照,3次重复。所有接菌处理苗和对照苗均置于温度25℃、湿度75%~80%、光照强度1 000~1 500 lx、光照时间10 h/d的组培室内培养,共同培养40 d后观察铁皮石斛和菌株的生长状况并统计生根率、平均根长和平均生根数。

1.2.3 炼苗与移栽。将组培苗和共生真菌一起移入温室大棚闭瓶炼苗7 d,再开瓶炼苗2 d,最后移栽到甘蔗渣+树皮的基质中(基质提前用多菌灵800倍液消毒),浇透水,覆盖薄膜,双层遮阴。60 d后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的分离 采集并截取铁皮石斛根段 152 个,在其中 74 段里分离出内生真菌,通过纯化培养和初步形态特征归类,得到 21 株内生真菌,编号为 F₁ ~ F₂₁。

2.2 内生真菌与铁皮石斛的共生培养 铁皮石斛与内生真菌共培养 14 d 后,其中 9 个处理菌株(F₁、F₂、F₆、F₇、F₁₁、F₁₆、F₁₉、F₂₀、F₂₁)生长旺盛,而铁皮石斛幼苗则生长缓慢、叶片发黄。共培养 40 d 后,上述 9 个处理中的幼苗全部死亡;将剩

下 12 组处理中的幼苗根部做切片用显微镜进行观察,发现其中 8 组菌株成功侵入铁皮石斛幼苗根部,形成共生关系,且其生根率、根长及根数均明显高于对照组,幼苗叶片深绿,生长健壮,其中接入编号为 F₅ 的铁皮石斛组培苗生根率最高,达 99.00%,在根的整齐度和生根数量上也优于其他组合;其他 4 组并未观察到菌丝侵染,幼苗生根率、根长及根数与对照组无明显差异,幼苗纤弱,偶有叶片发黄现象(表 1)。

表 1 内生真菌对铁皮石斛幼苗生根的影响
Table 1 Effect of endophytic fungi on rooting of *Dendrobium candidum* seedlings

菌株编号 Strain No.	生根率 Rooting rate//%	根长 Root length cm	生根数 Root number//个	对铁皮石斛幼苗的影响 Effect on <i>Dendrobium candidum</i> seedlings
F ₁	—	—	—	幼苗死亡
F ₂	—	—	—	幼苗死亡
F ₃	96.67	2.1 ~ 6.2	3 ~ 6	形成共生关系,幼苗生长良好
F ₄	88.00	1.1 ~ 4.3	2 ~ 3	无共生关系,幼苗叶片发黄
F ₅	99.00	3.8 ~ 5.5	3 ~ 7	形成共生关系,幼苗健壮
F ₆	—	—	—	幼苗死亡
F ₇	—	—	—	幼苗死亡
F ₈	97.67	4.2 ~ 5.8	2 ~ 5	形成共生关系,幼苗健壮
F ₉	95.00	3.5 ~ 6.0	2 ~ 5	形成共生关系,幼苗生长良好
F ₁₀	89.00	0.8 ~ 4.5	1 ~ 4	无共生关系,幼苗健康
F ₁₁	—	—	—	幼苗死亡
F ₁₂	89.33	0.5 ~ 6.2	2 ~ 5	无共生关系,幼苗叶片发黄
F ₁₃	96.00	3.5 ~ 5.8	3 ~ 6	形成共生关系,幼苗生长良好
F ₁₄	92.00	3.8 ~ 6.0	2 ~ 5	形成共生关系,幼苗生长良好
F ₁₅	97.33	4.2 ~ 5.8	2 ~ 6	形成共生关系,幼苗生长良好
F ₁₆	—	—	—	幼苗死亡
F ₁₇	92.33	2.5 ~ 4.5	2 ~ 5	无共生关系,幼苗健康
F ₁₈	98.33	4.0 ~ 5.8	3 ~ 5	形成共生关系,幼苗生长良好
F ₁₉	—	—	—	幼苗死亡
F ₂₀	—	—	—	幼苗死亡
F ₂₁	—	—	—	幼苗死亡
CK	93.33	2.8 ~ 5.0	3 ~ 4	幼苗健康

2.3 炼苗与移栽 在铁皮石斛与内生真菌共培养 60 d 后,将铁皮石斛菌根化幼苗移栽到温室大棚。移栽后 15 d 内,部分幼苗相继出现死亡,20 d 后不再发现死亡幼苗,60 d 后统计成活率,结果发现,菌株 F₃、F₅、F₈、F₉、F₁₃、F₁₄、F₁₅、F₁₈、CK 的成活率分别为 80.67%、90.00%、76.67%、90.67%、92.67%、100.00%、78.67%、68.00%、25.32%,可见接入菌株 F₁₄ 的铁皮石斛苗全部成活,幼苗健壮,成活率为对照组的 395%,对照组幼苗不仅成活率低,且存活幼苗纤弱发黄,其他 7 组的成活率较之对照组也达 269% ~ 366%,菌根化苗成活率远高于非菌根化苗,可见筛选出的内生真菌与铁皮石斛组培苗共培养后能大幅提高移栽成活率。

3 结论与讨论

该研究对从铁皮石斛根系中共分离得到的 21 株内生真菌,通过单一回接试验,分析铁皮石斛根系生长指标,最终筛选出促进铁皮石斛组培苗根系生长的内生真菌 8 株,最优促铁皮石斛移栽成活率的是菌株 F₁₄。

在共生培养时,有 9 个处理中的内生真菌接入后生长尤为旺盛,初期表现为幼苗不生长,到了后期,这 9 组接菌苗全部死亡,导致幼苗死亡的原因尚不明确,可能这 9 种真菌是导致幼苗死亡的直接原因,也可能这 9 种真菌本身不对幼苗产生致死影响甚至可能促进幼苗生长,但由于接入对其生长有利的培养基导致其过分旺盛生长,从而抑制了铁皮石斛幼苗的生长,最终使幼苗全部死亡。其他 12 个处理中的真菌生长虽不过分旺盛,但菌丝生长量也参差不齐。因此,在筛选铁皮石斛内生真菌的同时,对共生培养基进行筛选也十分必要。

编号为 F₅ 的内生真菌在生根培养中具有最佳促生根效果,在移栽后,接入 F₅ 的菌根化苗成活率仅达 90.00%,而接入 F₁₄ 的菌根化苗移栽成活率达 100.00%,可见在铁皮石斛的不同生长阶段,可能需要与不同的内生真菌共生。这与郭顺星等^[21]的研究结果一致。

表1 山苍子挥发油中挥发性成分

Table 1 Volatile components in *Listea cubeba* essential oil

编号 No.	保留时间 Retention time min	峰面积百分比 Peak area percentage// %	分子质量 Molecular mass	化合物 Compound
1	6.957	2.20	136.1	α-蒎烯
2	7.428	0.69	136.1	桉烯
3	8.283	0.42	136.1	β-蒎烯
4	8.387	1.59	136.1	6-甲基-5-庚烯-2-酮
5	8.770	1.60	126.1	β-月桂烯
6	8.940	2.91	136.1	
7	9.619	0.37		
8	10.473	11.63	136.1	D-柠檬烯
9	12.801	0.29	136.1	萜品油烯
10	13.350	2.56	154.1	芳樟醇
11	13.983	0.54		
12	15.286	1.35		
13	15.663	2.18	154.1	香茅醛
14	16.195	3.14		
15	17.032	4.66		
16	17.295	0.63		
17	17.794	0.39		
18	18.073	0.31		
19	18.638	0.47		
20	19.301	1.83		
21	19.978	26.22	138.1	β-柠檬醛
22	20.235	0.32		
23	20.554	1.78	154.1	香叶醇
24	21.415	28.10	178.1	α-柠檬醛
25	24.740	0.32		
26	25.308	0.36		
27	26.018	0.42		
28	27.131	2.40	136.1	石竹烯
29	33.568	0.31	152.1	石竹烯氧化物

(上接第129页)

目前关于铁皮石斛的组培快繁技术方面的研究十分成熟,已建立了较为完整的铁皮石斛组培快繁体系,该试验在借鉴前人研究成果的基础上,不断探索更好的生根培养基配方,使铁皮石斛组培苗生根率达到了较高水平,然而生根率和移栽成活率并不对等,该研究筛选出的8株内生真菌对铁皮石斛组培苗生根有一定的正向作用,同时解决了组培苗移栽成活率低的问题,在铁皮石斛工厂化育苗中有良好的应用前景。

对该研究中筛选出的最优促铁皮石斛根系生长及组培苗移栽成活率的一株内生真菌F₁₄,未进行种属地位的鉴定。下一步应通过菌落形态及显微结构观察,并结合ITS序列PCR扩增技术,确定促生作用最显著的菌株F₁₄的种属地位。

参考文献

[1] 朱艳,秦民坚.铁皮石斛茎段诱导丛生芽的研究[J].中国野生植物资源,2003,22(2):56-57.
[2] 李满飞,徐国钧,徐璐珊,等.商品石斛的调查及鉴定(Ⅱ)[J].中草药,1991,22(4):173-176,180.
[3] 丁鸽,丁小余,沈洁,等.铁皮石斛野生居群遗传多样性的RAPD分析与鉴定[J].药学报,2005,40(11):1028-1032.
[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:化学工业出版社,2010:265-266.
[5] 吴昊妹,徐建华,陈立钻,等.铁皮石斛降血糖作用及其机制的研究[J].中国中药杂志,2004,29(2):160-163.
[6] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第19卷[M].北京:

的化学组成及其含量随采收期、产地和气候等不同而产生差异^[10],因此在山苍子资源利用上应充分了解当地植物资源,并结合挥发油中组成成分的具体情况进行药用和香料配方等用途的安排。

参考文献

[1] 彭宏.特种经济植物栽培技术[M].北京:化学工业出版社,2010:182-185.
[2] CAJA M M,PRESTON C,KEMPF M,et al. Flavor authentication studies of α-lonone,β-lonone,and α-lonol from various sources[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2007,55(16):6700-6704.
[3] 孙青,舒学军,陈茹冰,等.香料紫罗兰酮的合成研究[J].浙江大学学报(理学版),2012,39(1):56-59.
[4] JIANG Z L,AKHTAR Y,BRADBURY R,et al. Comparative toxicity of essential oils of *Listea pungens* and *Listea cubeba* and blends of their major constituents against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2009,57(11):4833-4837.
[5] 王旭,杨关锋.我国山苍子开发利用中存在的问题研究与发展对策[C]//第二届中国林业学术大会:S9 木本粮油产业化论文集.南宁:[出版者不详],2009.
[6] 张立,李涛,王立新,等.湖南省怀化市山苍子野生资源调查[J].北京农业,2015(11):29.
[7] SI L L,CHEN Y C, HAN X J,et al. Chemical composition of essential oils of *Listea cubeba* harvested from its distribution areas in China[J]. Molecules,2012,17(6):7057-7066.
[8] 田胜平,汪阳东,陈益存,等.不同居群山苍子果实精油和柠檬醛含量及其与地理-气候因子的相关性[J].植物资源与环境学报,2012,21(3):57-62.
[9] 张艳,胡金波,李金凤,等.山苍子油GC-MS指纹图谱研究[J].中成药,2013,35(11):2452-2456.
[10] 赵欧,班大明.贵州不同地区山苍子果实挥发油化学成分的差异[J].贵州农业科学,2015,43(1):126-128,131.

科学出版社,1999.
[7] 柳连芳.铁皮石斛的最新研究进展[J].安徽农业科学,2012,40(11):6426-6428.
[8] 黄勇.铁皮石斛组织培养技术研究进展[J].文山学院学报,2013,26(6):14-19.
[9] 金辉,亢志华,陈晖,等.菌根真菌对铁皮石斛生长和矿质元素的影响[J].福建林学院学报,2007,27(1):80-83.
[10] 赵昕梅,远凌威,张苏锋,等.铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其促宿主生长作用[J].河南农业科学,2012,41(6):101-105.
[11] 金辉,许忠祥,陈金花,等.铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养过程中的相互作用[J].植物生态学报,2009,33(3):433-441.
[12] 陈晓梅,郭顺星,孟志霞.真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响[J].中草药,2008,39(3):423-426.
[13] 何劲,雷帮星,宋贞富,等.石斛内生细菌DEB-2对5种辣椒病原真菌的抑制作用[J].植物保护学报,2014,41(2):157-162.
[14] 杨绍周,吴毅歆,邵德林,等.鼓槌石斛内生细菌分离、鉴定及功能分析[J].中国农学通报,2014,30(25):171-176.
[15] 徐文婷,张雅琼,董文汉,等.石斛内生真菌固体菌剂对铁皮石斛组培苗促生作用研究[J].西南农业学报,2014,27(1):317-324.
[16] 陈泽斌,李冰,王定康,等.铁皮石斛叶片内生真菌多样性的研究[J].福建农业学报,2015,30(10):978-983.
[17] 徐文婷,张雅琼,董文汉,等.石斛内生真菌固体菌剂对铁皮石斛组培苗促生作用研究[J].西南农业学报,2014,27(1):317-324.
[18] 毛益婷,代晓宇,马荣.不同生境下野生铁皮石斛内生真菌多样性的初步研究[J].新疆农业大学学报,2011,34(3):234-238.
[19] 陈玉栋,李文锦,雷玲,等.铁皮石斛内生真菌的分离与鉴定[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2009,22(2):236-238.
[20] 侯晓强,郭顺星.铁皮石斛促生长内生真菌的筛选与鉴定[J].中国中药杂志,2014,39(17):3232-3237.
[21] 郭顺星,曹文琴,高微微.铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定[J].中国中药杂志,2000,25(6):338-341.