

独蒜兰种子共生萌发研究

杨友联^{1,2} 刘作易^{1*} 朱国胜¹

(1. 贵州省农业生物技术重点实验室 花溪 550006)
(2. 六盘水师范高等专科学校生物与地理科学系 水城 553004)

摘要: 采用从独蒜兰分离的菌根真菌与其种子在燕麦培养基上共生萌发。结果表明 GN21、GN23 和 GN24 的作用效果较好, 其中 GN21 萌发率 84.6%, 高于对照 7 个百分点, 达到显著性。同时也表明, 从同一兰科植物分离到的属于同一属的不同菌根真菌种, 有的能明显促进种子萌发, 有的却不能促进萌发, 甚至产生病斑, 引起原球茎死亡。

关键词: 独蒜兰, 共生萌发, 菌根真菌

Study on Symbiotic Seed Germination of *Pleione bulbocodioides* (Franch) Rolfe

YANG You-Lian^{1,2} LIU Zuo-Yi^{1*} ZHU Guo-Sheng¹

(1. Key Lab of Agricultural Biotechnology of Guizhou Province, Guizhou Academy of Agricultural Science, Huaxi 550006)
(2. Department of Biology and Geography, Liupanshui Teachers' College, Shuicheng 553004)

Abstract: The symbiotic seed germination of *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe, a traditional Chinese medicine, was investigated. The results showed that the mycorrhizal fungi isolated from *pleione bulbocodioides*, GN21, GN23 and GN24 promoted the seed germination evidently, and the germination rate of GN21 was up to 84.6%, much better than the others and control. However, the fungal species isolated from the same species of orchid, even if belonging to the same genus, could not be always to stimulate the seed germination, some species even became pathogens under the circumstances of poor nutrition.

Keywords: *Pleione bulbocodioides*, Symbiotic seed germination, Mycorrhizal fungus

独蒜兰(*Pleione bulbocodioides*(Franch.)Rolfe)属兰科独蒜兰属植物, 其球茎入药, 在中药中称作冰球子, 与杜鹃兰(*Cremastra appendiculata*)(毛慈姑)合称山慈姑^[1]。始载于《本草拾遗》, 具有清热解毒, 化痰散结的功效, 用于治疗痈肿疔毒、瘰癧痰核、淋巴结结核和蛇虫咬伤等, 近年因抗癌作用而引起更多的关注^[2]。同时, 独蒜兰花大而艳丽, 具有较高

的观赏价值, 美、日、欧等地区将其作为观赏植物进行盆栽, 并且已少量进入商业性栽培^[3]。目前, 主要靠野外采挖后利用球茎分株繁殖来满足市场的需要。兰科植物的种子十分细小, 一颗蒴果就含有上万粒轻如尘埃的种子, 绝大多数兰科植物的种子需要其菌根真菌提供一定的营养物质才能很好的萌发。因此, 采用独蒜兰的种子与其菌根真菌共生萌

发,以筛选能促进种子萌发的菌株,并取得了初步成功。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 种子的采集及处理: 种子采集于贵州省水城县,东经 104°33' 57", 北纬 26°02' 26", 海拔 2100 m~2200 m。十月中旬种子变黄未开裂时采种。采种后暂时保存于无菌试管,带回实验室后 0.1% 的升汞表面消毒 10 min, 无菌水冲洗 6 次,干燥后放入无菌试管中,暂存于 4℃ 冰箱中备用。

1.1.2 播种培养基: 燕麦培养基(OMA): 2.5 g/L 燕麦粉, 7.0 g/L 琼脂, pH 5.8, 灭菌备用。对照培养基采用不接菌的燕麦培养基。

1.1.3 供试菌株及活化: GN09、GN10、GN21、GN22、GN23、GN24、GN30、GN31 和 GN32 共 9 株分离自独蒜兰的菌根真菌,经 PDA 培养基, 25℃ 下暗培养活化后备用。

1.2 实验方法

1.2.1 播种及培养条件: 播种参考 Dixon 的方法^[4], 将已表面消毒的蒴果一端剪开一个小孔, 轻挤蒴果, 将 100~200 粒种子播种在一张 1 cm~4 cm 大小置于播种培养基表面的无菌滤纸上。培养基接种量约 2 mm³ 含有单一菌根真菌纯培养物的琼脂块。对照处理不接菌, 每处理 4 个重复。用封口膜密封后置人工气候箱中培养, 培养条件: 光照周期为 14 h/10 h L/D, 光照强度为 2000 Lx~3000 Lx, 温度 23 ± 1℃。每周观察 1 次, 播种培养 5 周时镜检计数。

1.2.2 萌发阶段的划分: 参考 Zettler 的方法^[5], 将萌发状态划分为 4 个阶段。0、种子没有萌发, 未膨大, 较小; 1、分化形成胚根(rhizoids), 已萌发; 2、种衣被膨大的胚撑裂; 3、出现原分生组织(如图 1)。

1.2.3 数据的处理: 低倍镜下计数, DPSv5.02 Duncan 新复极差法统计分析。

2 结果

2.1 共生萌发形态观察

显微镜下, 与真菌共培养的绝大多数种子表面有稀疏菌丝缠绕, 萌发种子呈绿色, 较大, 种衣被膨大的胚撑裂, 且长出胚根; 没有萌发的种子

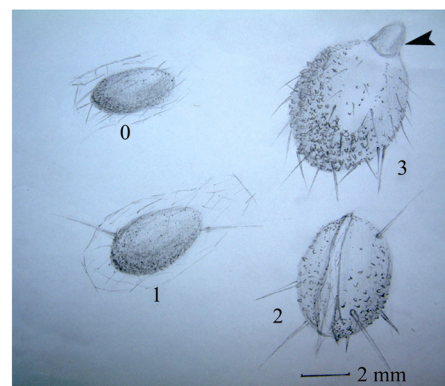


图 1 种子萌发阶段

Fig. 1 Germination stages of *Pleione bulbocodioides* in vitro

注: 0: 种子没有萌发; 1: 分化胚根(已萌发); 2: 种衣被膨大的胚撑裂, 胚根增多; 3: 出现原分生组织, 如箭头所示

Note: 0: No germination; 1: Production of rhizoids (germination); 2: rupture of the testa by enlarged embryo; 3: Appearance of promeristem, denoted by arrow

浅黄色或土黄色, 较小, 没有长出胚根(图 2A)。GN21 经鉴定隶属于木霉属, 在营养贫瘠的共生培养基中产生不规则颗粒状的黑色孢子团(Pustule), 由分生孢子及分生孢子梗聚集形成, 部分孢子团将种子几乎包裹了起来, 但种子仍然正常萌发(图 2B); GN24 在共培养培养基上大量产孢, 甚至在种子表面的菌丝也产孢, 但种子也仍然正常萌发(图 2C); 同时, 尽管在 GN31 共培养的种子出现厚垣孢子, 种子也健康萌发(图 2D)。此外, 在与 GN30 和 GN31 共培养的种子形成黑色病斑, 引起种子死亡。

2.2 共生萌发率

播种约 2 周后种子开始逐渐膨大, 颜色由土黄色开始变绿。第 5 周时镜检计数, 结果如表 1。由表可知, 独蒜兰种子较容易萌发, 在无菌不添加任何激素的情况下, 总萌发率就已达到 77.6%, 但以 GN09、GN21、GN23、GN24 和 GN31 共 5 株菌株共生萌发时总萌发率高于无菌萌发, 其中 GN21 萌发率 84.6%, 高于对照 7.0 个百分点, 达到显著性 ($P < 0.05$)。种子与 GN10、GN22、GN30 和 GN32 共 4 株菌株共生萌发时总萌发率低于对照。从萌发阶段来看, 与 GN23 等 3 株菌株共生萌发的种子没有萌发到阶段 3, 其余的都达到阶段 3, 且高于对照。

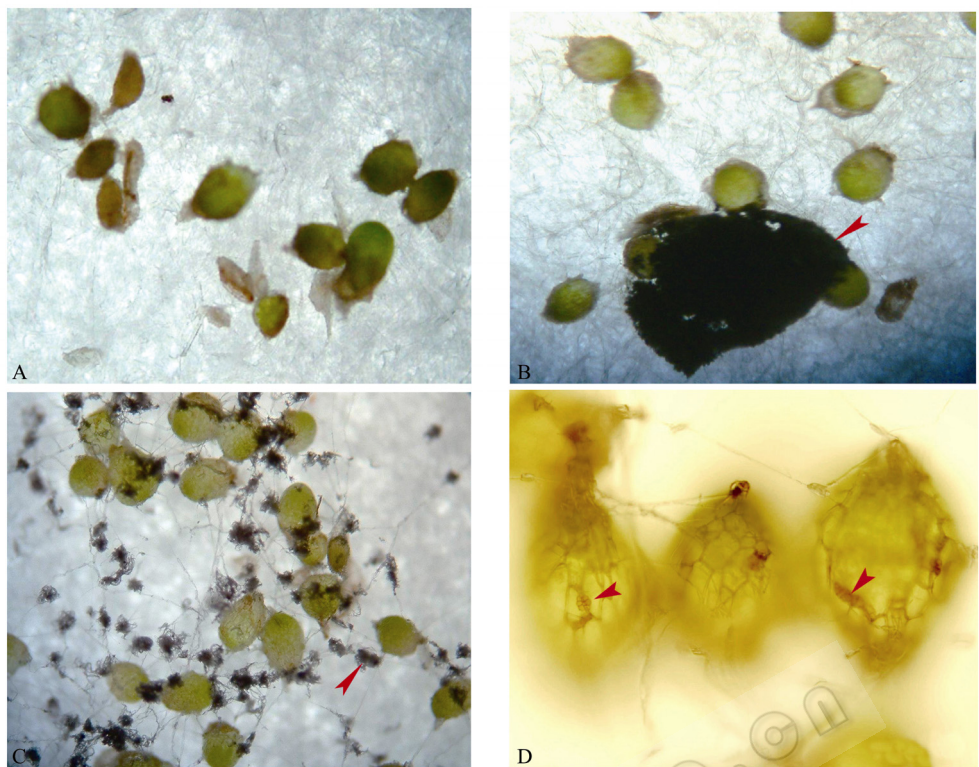


图 2 菌根真菌与独蒜兰种子共生培养

Fig. 2 Symbiotic seed germination of *Pleione bulbocodioides* in vitro

注：A：对照(×100)；B：种子与 GN21 共生萌发，孢子团将种子包裹(如箭头所示，×100)；C：种子与 GN24 共生萌发，大量产孢(如箭头所示，×100)；D：种子与 GN31 共生萌发，种子上有厚垣孢子(如箭头所示，×200)

Note: A: Control (×100); B: Germination with GN21, germinating seed is wrapped by pustules (×100), denoted by arrow; C: Germination with GN24, GN24 produce many conidia (×100), denoted by arrow; D: Germination with GN31, GN31 produce many chlamydospores on seeds (×200), denoted by arrow

表 1 独蒜兰菌根真菌与种子共生萌发率					
Table 1 Symbiotic seed germination rates of <i>Pleione bulbocodioides</i> on OMA medium					
菌株 Strains	各萌发阶段百分率 Germination percentage of stages (%)				总萌发率 Total (%)
	0	1	2	3	
CK	22.4	55.2	21.3	0.1	77.6
GN09	24.3	37.6	37.0	3.1	77.7
GN10	22.8	31.2	42.9	3.1	77.2
GN21	15.4	42.1	41.2	1.3	84.6 a
GN22	24.3	43.8	29.9	2.0	75.7
GN23	22.1	50.2	27.7	0.0	77.9
GN24	17.4	46.4	35.2	1.0	82.6
GN30	40.5	45.1	13.7	0.0	58.8
GN31	18.9	43.6	36.4	1.2	81.2
GN32	78.1	14.8	7.1	0.0	21.9

注：a：显著促进种子萌发($P<0.05$)

Note：a：Promotes the seed germination significantly($P<0.05$)

3 分析与讨论

独蒜兰种子无菌萌发时，萌发率较高，为兰科

种子中较容易萌发的种子类型。但独蒜兰种子与菌根真菌共生萌发时，部分菌根真菌能提高种子的萌发率，效果较好的菌株有GN21、GN24 和GN31，其中GN21 达到显著性。3 株菌株分别隶属于木霉属、拟青霉属和镰孢菌属，该 3 个属的真菌种曾多次被不同研究者从不同的兰科植物的根中分离到^[6-8]。GN24 属拟青霉属，比对照高出 5 个百分点，明显促进种子萌发。有趣的是，GN22 和GN23 也隶属于拟青霉属，但对种子萌发影响较小。与此类似，GN30、GN31 和GN32 都为镰孢菌属真菌，但仅有GN31 能促进种子萌发，而GN30 和GN32 不能促进种子萌发。这与郭顺星等的研究结果相似，如同为从铁皮石斛中分离到的 3 株瘤菌根菌属的真菌中，仅有 1 株能促进铁皮石斛的种子萌发^[9]。这表明，即便是从同一兰科植物中分离到的同一真菌属菌根真菌，不同的种会有不同的效果，有的能明显促进种子萌发，有的却不能。就镰孢菌属真菌而言，早在 19 世纪初，就有报道认为其能够促进兰科植物的种子萌发，但

随后遭到否定,近年来,又有证据对其作用给予肯定^[10]。在本研究中,镰孢菌属中的3株菌株的效果表现出差异性,这说明,此前的争论可能是因为各研究者采用该属中的不同的种或菌株进行试验所导致的。

Johnson等在研究兰科植物*Eulophia alta*种子共生萌发时,曾观察到部分菌株导致种子产生病斑,并认为是由于共生萌发时的营养紧张导致菌根真菌转变为病原菌或由于缺少光照使原球茎不能进行菌根异养(Heteromycotrophic)而引起的^[11]。Beyrle等认为,菌根真菌与寄生真菌的界定部分地由菌根真菌的营养的可获得性确定^[12]。即当营养缺乏时,菌根真菌有可能成为病原菌并引起组织坏死。本实验中,采用了营养含量较低的OMA培养基,光照周期为14 h/10 h L/D,在与GN30和GN32共培养的已萌发的种子上出现了病斑,这表明营养的缺乏可能是导致菌根真菌转变为寄生菌的主要原因之一。

利用种子无菌繁殖被认为是兰科植物的最有效的繁殖方式,而共生萌发被认为是十分繁琐的^[13]。应当指出的是,在共生萌发中,种子萌发得更快,如GN09, GN10和GN21等菌株能使种子更快地到达阶段2和阶段3,比对照更早出现分生组织。Johnson等在研究*Eulophia alta*共生萌发时,培养28周后观察到共生萌发的种子分化出极长的真叶,而无菌萌发的种子仅出现大量假根,只有极少的个体分化出可见的真叶^[11]。更为重要的是,当菌根化的幼苗移植到野外时比无菌培育的幼苗有更高的存活率,生长速度也更快,这对于濒危兰科植物的保护,尤其是对具有较高经济价值的药用和观赏用兰科植物的保护与开发利用具有重要的意义。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国

国药典. 一部. 北京: 化学工业出版社, 1995, p.23.

- [2] 白莉. 生药山慈姑成分研究(2). 国外医学中医中药分册. 1997, **19**(6): 49-50.
- [3] 李洪林, 附志惠, 杨波. 独蒜兰的离体快速繁殖. 植物生理学通讯, 2005, **41**(5): 632.
- [4] Dixon K. Raising terrestrial orchids from seed. In: Harris, WK(Ed.). Modern orchid Growing for Pleasure and Profit. Australia: Orchid Club of S Australia, Adelaide S, 1987, pp.47-100.
- [5] Zettler LW, Hofer CJ. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*, 1998, **39**: 189-195.
- [6] 范黎, 郭顺星, 徐锦堂. 我国部分兰科植物菌根的内生真菌种类研究. 山西大学学报, 1998, **21**(2): 169-177.
- [7] 伍建榕, 韩素芬, 朱有勇, 等. 云南兰科植物菌根内生真菌种类研究. 西南林学院学报, 2006, **26**(3): 5-10.
- [8] 颜容, 刘红霞, 蔡怀远, 等. 独花兰菌根的初步研究. 北京林业大学学报, 2006, **28**(2): 112-117.
- [9] 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. 中国中药杂志, 2000, **25**(6): 338-341.
- [10] Vujanovic V, Arnaud MS, Barabe D, et al. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and gemination. *Annals of Botany*, 2000, **86**: 79-86.
- [11] Johnson TR, Stewart SL, Dutra D, et al. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) -preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, **90**: 313-323.
- [12] Beyrle H, Penningsfeld F, Hock B. The role of nitrogen concentration in determining the outcome of the interaction between *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Soó and *Rhizoctonia* sp.. *New Phytol*, 1991, **117**: 665-672.
- [13] Stewart SL, Kane ME. Asymbiotic germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratits* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2006, **86**: 147-158.