

# 海拔对乌红杂交天麻产量与品质的影响 及其酶学作用机制

杨 婧<sup>1,3</sup>, 王传华<sup>1,2,3\*</sup>, 曾春函<sup>2</sup>, 王洋洋<sup>2</sup>, 侯云波<sup>2</sup>, 杨 林<sup>4</sup>

(1 三峡库区生态环境教育部工程研究中心, 湖北宜昌 443002; 2 湖北省三峡地区生态保护与治理国际联合研究中心, 湖北宜昌 443002; 3 三峡大学生物与制药学院, 湖北宜昌 443002; 4 贵州健康职业学院, 贵州铜仁 554300)

**摘 要:** 蜜环菌生物种和天麻的共生关系是二者侵染-消化系统相互作用的结果, 受到温度等环境因子的调节。为揭示海拔对天麻产量及品质的影响, 以及温度升高影响蜜环菌生物种-天麻共生关系的作用机制。该研究通过测定不同海拔栽培天麻的产量、主要药用成分天麻素和对羟基苯甲醇的含量; 在室内对天麻共生体进行升温处理, 测定天麻组织液几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶、苯丙氨酸解氨酶与多酚氧化酶的活性变化, 及天麻组织提取液对蜜环菌菌丝体的抑制效应。结果显示: (1) 海拔对乌红杂交天麻的产量和有效药用成分存在显著影响, 在 1 600 m 产量最高, 且杂交天麻在海拔 1 600 m 有效成分含量最高。 (2) 温度显著影响天麻组织的抑菌系统, 且天麻的消化酶及防御酶系统对其的响应应具有差异性, 具体表现为低温状况下天麻的消化酶系统活性增强, 高温时防御酶系统活性提升。 (3) 温度升高导致天麻组织液对蜜环菌菌丝体的抑制效果显著下降, 天麻活体中可能存在促进蜜环菌生长的热失活因子。研究表明, 天麻种植区海拔下降引起的温度升高可能削弱天麻消化和抑制蜜环菌的能力, 从而破坏天麻-蜜环菌的共生平衡。该研究对于揭示蜜环菌-天麻的共生机制具有重要科学价值, 并对天麻栽培的区划具有实际指导意义。

**关键词:** 天麻; 蜜环菌; 消化酶; 防御酶; 天麻抗真菌蛋白

**中图分类号:** Q945.79

**文献标志码:** A

## Effects of Altitude on the Yield and Medicinal Quality of Tubers of *Gastrodia elata* and the Enzymic Mechanism Concerning Variation of Temperature

YANG Jing<sup>1,3</sup>, WANG Chuanhua<sup>1,2,3\*</sup>, ZENG Chunhan<sup>2</sup>,  
WANG Yangyang<sup>2</sup>, HOU Yunbo<sup>2</sup>, YANG Lin<sup>4</sup>

(1 Hubei International Scientific and Technological Cooperation Center of Ecological Conservation and Management in Three Gorges Area, Yichang, Hubei 443002, China; 2 Engineering Research Center of Eco-Environment in the Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China; 3 College of Life Science and Pharmacy, Three Gorges University of China, Yichang, Hubei 443002, China; 4 Guizhou Health Vocational College, Tongren, Guizhou 554300, China)

**Abstract:** The symbiosis of *Armillaria* spp. and *Gastrodia elata* is an interaction consequence of the infection system of *Armillaria* spp. and the digestive and/or anti-fungi system of *G. elata*, and this may be

收稿日期: 2020-09-30; 修改稿收到日期: 2021-02-05

基金项目: 国家自然科学基金(31570543); 三峡库区生态环境教育部工程研究中心开放基金(KF2019-06); 铜仁市科技局项目(2017TRS60223)

作者简介: 杨 婧(1995-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物生理生态学。E-mail: 970321139@qq.com

\* 通信作者: 王传华, 教授, 硕士生导师, 主要从事恢复生态学、植物生理生态学研究工作。E-mail: wang740301@ctgu.edu.cn

regulated by temperature. In order to reveal the influence of altitude on the yield and quality of *Gastrodia* spp., and the mechanism how increased temperature damage the symbiosis of *Armillaria* biological species and *G. elata*, this study determined the yield of *G. elata* cultivated at different altitudes, and the contents of the main medicinal components gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol. The symbionts of *G. elata* were heated up in the room, then activity of chitinase,  $\beta$ -1, 3-glucanase, phenylalanine ammonia enzyme and polyphenol oxidase were determined, as well as the inhibition effects of homogenate of the *G. elata* tube on *Armillaria* mycelial growth. Results showed that: (1) altitude had a significant effect on the yield and effective medicinal components of hybrid of *G. elata* Bl. f. *elata*  $\times$  *G. elata* Bl. f. *glauca*, with the highest yield at 1 600 m and the highest content of effective components at 1 600 m. (2) Temperature significantly affected the antifungal system of *G. elata*, and the response of *G. elata* digestive enzymes and defense enzyme systems to temperature is different. The specific manifestation is that the digestive enzyme system activity of *G. elata* increases under low temperature conditions and the activity of defense enzyme system at high temperature. (3) The increase in temperature leads to a significant decrease in the inhibitory effect of *G. elata* tissue fluid on the mycelium of *Armillaria*. There may be heat-inactivating factors in living *G. elata* that promote the growth of *Armillaria*. Studies have shown that the increase in temperature caused by the decrease in altitude in *Gastrodia* planting areas may weaken the ability of *G. elata* to digest and inhibit *Armillaria*, thereby destroy the symbiosis balance between *G. elata* and *Armillaria*. This research has important scientific value for revealing the symbiosis mechanism of *Armillaria-Gastrodia elata*, and has practical significance for the zoning of *G. elata* cultivation.

**Key words:** *Gastrodia elata*; *Armillaria* spp.; digestive enzyme; defensive enzyme; gastordianin, GFP

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)是一种具有很高药用价值的异养型兰科植物<sup>[1]</sup>,需要与萌发菌、蜜环菌共生才能完成生活史<sup>[2]</sup>。蜜环菌隶属于担子菌门(Basidiomycota)伞菌目(Agaricales)小皮伞科(Marasmiaceae)蜜环菌属 [*Armillaria* (Vahl) P. Kumm.]<sup>[3]</sup>,广泛分布于欧洲、亚洲、非洲、北美洲等地。蜜环菌具有兼性寄生特性,需从朽木或活树根汲取营养<sup>[4-5]</sup>,目前世界上已知有近40个生物种<sup>[6]</sup>,部分种是重要的食药真菌<sup>[7]</sup>。天麻与蜜环菌具有特殊的共生关系,天麻球茎一方面依赖于真菌的侵染而获得营养,另一方面又具有强有力的阻止或限制真菌侵染的防卫机制以避免自身感病<sup>[8]</sup>。

海拔(温度)是影响天麻生产的重要因素。天麻适宜在夏季凉爽且冬季温和的环境中生长<sup>[9]</sup>,其自然分布具有明显的海拔地带性,垂直分布的高度由南到北逐渐下降<sup>[10]</sup>,适宜温度为 $-4\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[11]</sup>。外界温度为 $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时,天麻开始生长;升高到 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,天麻进入迅速生长期;但达到 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,温度会抑制天麻的生长,因此,天麻的最适生长温度是 $15\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。另一方面,当温度低于 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或高于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,天麻将停止生长,进入休眠状态<sup>[10,12-14]</sup>。生产实践中,在低海拔地区栽培天麻常因蜜环菌过量繁殖导致其腐烂<sup>[15]</sup>,同时海拔不同也导致药用化学物质含量不同<sup>[16]</sup>。因此,深入研究温度对天麻-蜜环菌共生关系的影响并揭示其作用机制,对提高天麻产量、

改善天麻品质具有重要意义。

天麻抵御蜜环菌的入侵机制中,多种消化酶和抗真菌蛋白扮演着重要角色。研究表明,天麻皮层的抗真菌蛋白(GAFP)是抵御蜜环菌入侵的主要物质<sup>[17-20]</sup>,而皮层细胞与消化细胞溶酶体细胞释放的消化酶及几丁质酶(EC3.2.1.14)在消化入侵菌丝过程中发挥关键作用<sup>[10,21-22]</sup>。研究还发现,几丁质酶作为一种糖苷水解酶,在蜜环菌的生长发育及其与天麻的共生过程中发挥重要作用<sup>[23-25]</sup>,而 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(EC3.2.1.39)在天麻初生球茎消化蜜环菌菌丝的过程中起重要作用<sup>[13]</sup>。同时,植物病理学的研究表明,一些酶类如多酚氧化酶(PPO, EC1.10.3.1)、苯丙氨酸解氨酶(PAL, EC4.3.1.5),也参与植物的抗病过程。王曼玲等认为,PPO在水稻、烟草、棉苗及苹果抵御各种病菌的过程中起重要作用<sup>[26]</sup>,而植株感染真菌后PPO活性明显增强,且其活性沿着感染部位到未感染的边缘有明显的梯度变化<sup>[27]</sup>。另外,当植物受到病原菌的侵染时,PAL活性也有明显的变化,因此,PAL活性的变化与植物的抗病性也密切相关<sup>[28]</sup>。迄今,温度变化对天麻抗侵染及消化酶系统影响的研究仍未见报道,有关植物抗病酶类是否在天麻-蜜环菌的共生机制中扮演角色尚不清楚。

那么,天麻的产量及品质随海拔升高呈现何种变化趋势?温度升高对天麻体内消化酶、防御酶及

组织液抑制菌丝体生长的活性有何影响? 进而对天麻-蜜环菌共生关系有何影响? 为了回答以上问题, 本研究以在中国广泛种植的乌红杂交天麻作为实验材料, 在不同海拔开展天麻栽培实验, 以考察海拔影响天麻生物量与药用品质(天麻素、对羟基苯甲醇含量)的效应; 同时, 在室内控制条件下测定温度变化对天麻消化酶、防御酶活性, 以及天麻组织液抗蜜环菌菌丝体生长效果的影响, 揭示温度对天麻-蜜环菌共生体的生长与存活的作用机制。本研究结果对于揭示蜜环菌-天麻的共生机制具有重要科学价值, 并对天麻栽培的区划具有重要实际指导意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究区域概况

本研究选择湖北宜昌市五峰县五峰镇和牛庄乡开展天麻田间栽培实验。近 30 年来, 该地区已经形成了成熟的天麻栽培管理技术体系, 是中国著名的天麻主产区之一。试验场地处鄂西南的武陵山余脉, 境内山地资源丰富, 最高海拔达到 2 320.3 m, 年均日照 1 533 h, 年均气温 13~17 °C, 无霜期 240 d, 年均降水量 1 600 mm, 部分地区拥有独特的沙性壤土。

### 1.2 试验材料

供试的天麻种质为乌红杂交天麻。父本乌天麻(*G. elata* Bl. f. *glauca*)和母本红天麻(*G. elata* Bl. f. *elata*)种源均为野生天麻的自交系。根据前期实验结果, 选择 CBS F 二倍体菌株用于培养天麻

栽培用蜜环菌材; 选择 CBS A、CBS B、CBS D、CBS F、CBS H、CBS J、CBS M 和 CBS N 的单倍体菌丝作为天麻组织液抑菌效果的蜜环菌株(表 1)。

### 1.3 海拔对天麻生物量与品质的影响试验

**1.3.1 实验设计** 本试验采用单因素 3 水平设计, 以海拔为固定因子。由于中国杂交天麻适生海拔为 800~1 900 m<sup>[27]</sup>, 故在研究区域内五峰县五峰镇、牛庄乡选择 850 m、1 600 m 和 1 900 m 三个海拔梯度, 地势较为平坦、坡向一致的撂荒农地(5 年以上)设置试验场。

**1.3.2 大田栽培** 2018 年元月, 采用熟料段木法准备蜜环菌材。具体方法为: 选择长 20 cm、直径约 15 cm、鲜重约 2 500 g(±50 g)的白栎(*Quercus fabri* Hance)段木, 装入聚氯乙烯袋常压灭菌 8 h, 接种 CBS F 后在 25 °C 下培养 60 d 备用。乌红杂交天麻种麻的质量约 10 g/头, 用种量每段木为  $m_0$ (约 50 g)。2018 年 4 月初, 参考徐锦堂的方法<sup>[10]</sup>, 采用单棒法栽培天麻。行宽 30 cm, 每根菌材作为一个处理单位, 处理间距离 30 cm, 每个处理 20 个重复。

**1.3.3 生物量测定** 2018 年 10 月收获栽培的天麻。以菌棒为单位, 测定天麻的鲜重( $m_1$ )和个体数, 计算增殖率 $[G = (m_1 - m_0) / m_0 \times 100\%]$ 。带回实验室后, 分拣个体鲜重大于 50 g 的所有个体, 用天平(精度 0.01g)测定总鲜重( $W_1$ ), 然后在常压下将天麻样品蒸制 20 min, 在 60 °C 的烘箱内烘干至恒重<sup>[28]</sup>, 用天平(精度 0.01 g)测定干重( $W_2$ ), 计算折干率( $D = W_2 / W_1 \times 100\%$ )。将每一菌棒产生

表 1 参试天麻组织液抑制蜜环菌菌丝体生长试验的蜜环菌生物种

Table 1 Biological strains of *Armillaria* tested for mycelial growth inhibition by *Gastrodia elata* tissue solution

生物种 Biological species	种名 Species name	国内分布 The distribution area in China
CBS A	芥黄蜜环菌 <i>A. sinapina</i> Berube & Dessureault	长白山, 大、小兴安岭 Changbai Mountains, Greater Khingan Mountains, Xiao Hinggan Mountains
CBS B	高卢蜜环菌 <i>A. gallica</i> Marxm. & Romagn	长白山, 大、小兴安岭 Changbai Mountains, Greater Khingan Mountains, Xiao Hinggan Mountains
CBS D	奥氏蜜环菌 <i>A. ostoyae</i> (Romagn.) Herink	长白山, 大、小兴安岭 Changbai Mountains, Greater Khingan Mountains, Xiao Hinggan Mountains
CBS F	未命名 Unnamed	东北地区的东部和南部, 太白山 East and south of Northeastern China, Taibai Mountains
CBS H	未命名 Unnamed	云南西北部 Northwestern Yunnan
CBS J	未命名 Unnamed	西藏东部, 云南北部, 新疆天山西部, 峨眉山, 神农架, 太白山 Eastern Tibet, Northern Yunnan, Western Tianshan of Xinjiang, Mount Emei, Shennongjia, Taibai Mountains
CBS M	北方蜜环菌 <i>A. borealis</i> Marxm. & Korhinen	神农架, 太白山 Shennongjia, Taibai Mountains
CBS N	未命名 Unnamed	峨眉山, 太白山 Mount Emei, Taibai Mountains

的天麻烘干后,粉碎过 60 目筛,烘干后低温保存,用于天麻素和对羟基苯甲醇的含量测定。

**1.3.4 天麻有效药用成分的测定** 取样品粉末,准确称定 1.0 g,置于具塞锥形瓶中,用移液管加入稀乙醇 25 mL,超声处理 30 min,放至室温,5 000 r/min 离心 20 min;取上清液 5 mL,在 50 °C 旋蒸浓缩至近干无醇味,残渣加乙腈-0.05%磷酸溶液(5:95)混合溶解,定容至 10 mL 容量瓶,用 1 mL 一次性无菌注射器吸入,从 0.22 μm 的微孔滤膜滤头过滤至 EP 管。从 EP 管中吸取 15 μL 样品液,注入色谱仪进样器中,检测波长为 220 nm,测定峰面积<sup>[29]</sup>。

精密量取对照品天麻素和对羟基苯甲醇原溶液适量,加乙腈-0.05%磷酸溶液(5:95)溶液制成质量浓度梯度的溶液,依次测定出峰面积,建立峰面积(y)与质量浓度(x)间的标准曲线及其方程(表 2)。根据样品的出峰面积按标准曲线计算样品的天麻素和对羟基苯甲醇含量。根据每棒的天麻总鲜重(m<sub>1</sub>)、增值率(G)和天麻样品药用成分含量 C(%) 计算每菌棒所产天麻含有的天麻素总量、对羟基苯甲醇总量及二者含量。

#### 1.4 温度对天麻抗蜜环菌侵染及消化系统的影响试验

##### 1.4.1 天麻消化酶和防御酶活性对温度的响应

1)天麻样品的采集 2018 年 10 月,从海拔 1 900 m、1 600 m 和 800 m 三处野外种植的乌红杂交天麻中随机选取 5 窝,每窝取 100 g 同一规格(长约 2~3 cm 大小)的白麻放入自封袋,置 -80 °C 保存<sup>[30]</sup>,用于背景值测定;另在海拔 1 600 m 处(3 个

海拔点表现最好)的每窝取 100 g 规格一致的白麻用于温度胁迫实验。2)温度处理 将天麻样品置于 15 °C、25 °C 和 30 °C 的湿润河沙中暗培养 7 d<sup>[31-32]</sup>。3)粗酶液的制备 分别参考 Boller T<sup>[33]</sup>、史益敏<sup>[34]</sup>、张温典<sup>[35]</sup> 及胡月<sup>[36]</sup> 的研究方法制备 β-1,3-葡聚糖酶、几丁质酶、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)的粗酶液。4)酶活性测定 采用酶免 ELISA 试剂盒测定 4 种酶的活性(江苏酶免实业有限公司,批号 LOT NO.:1909P)。将试剂盒标准品稀释成浓度梯度为 12.5、25、50、100、200 U/L 的标准品稀释液,根据说明书步骤进行实验测定,以标准物浓度为横坐标(x),其吸光度值(OD)为纵坐标(y),绘制标准曲线(表 3)。然后,测定样品的 OD 值,计算各酶的活性。

##### 1.4.2 不同培养温度天麻粗提物对蜜环菌生长的抑制作用

1)天麻材料收集与处理 2018 年 10 月选取野外海拔 1 600 m 处栽培(3 个海拔点表现最好)的乌红杂交天麻 3 窝,每窝选取长度约 2~3 cm 的白麻 1~1.5 kg,4 °C 保存备用。2)温度处理 设 15 °C、25 °C 和 30 °C 三个温度梯度<sup>[39]</sup>。每个处理约 700 g 鲜天麻,装入透气的泡沫盒中,处理时湿沙覆盖<sup>[38]</sup>,处理时间 1 周。每处理 3 个重复。3)天麻组织粗提液制备 参考胡忠等的方法提取天麻具有抗真菌蛋白活性的组织粗提液<sup>[18,39]</sup>。将提取液分为两部分,2/3 体积提取液用于实验组,1/3 的提取液 121 °C 高温高压灭菌 20 min,作为对照组;试验和对照组均采用 0.22 μm 微孔滤膜抽滤制备无菌滤液,得到抗真菌蛋白(GAFP)粗提液。4)抑菌效果测定 在无菌环境下将抗真菌蛋白粗提液添加到

表 2 天麻素和对羟基苯甲醇标准曲线

Table 2 Equation used for determining the contents of gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol

标准品 Standard/(U/L)	标准曲线方程 Standard curve equation	R <sup>2</sup>	RSD 值 RSD value/%	平均回收率 Average recovery rate/%
天麻素 Gastrodin	$y = 29.25384x - 0.13362$	0.9999	0.63	98.71
对羟基苯甲醇 p-hydroxybenzyl alcohol	$y = 50.89353x + 0.07999$	0.9999	1.25	95.82

表 3 4 种酶的标准曲线方程与活性计算公式

Table 3 Equation and activity calculation formula of 4 enzymes

浓度 Concentration/(U/L)	β-1,3-葡聚糖酶 β-1,3-glucanase	几丁质酶 Chitinase	多酚氧化酶 PPO	苯丙氨酸解氨酶 PAL
标准曲线方程 Standard curve equation	$y = 0.3145 \ln x - 0.3516$	$y = 0.5051 \ln x - 0.3466$	$y = 0.0171x + 0.0735$	$y = 0.364 \ln x - 0.625$
R <sup>2</sup>	0.9914	0.996	0.999	0.9943
酶活性计算公式 Activity calculation formula	$\text{EXP}[(\text{OD} + 0.3516) / 0.3145] \times 5$	$\text{EXP}[(\text{OD} + 0.3466) / 0.5051] \times 5$	$(\text{OD} - 0.0735) / 0.0171 \times 5$	$\text{EXP}[(\text{OD} + 0.625) / 0.364] \times 5$

PDA 培养基中<sup>[20,40]</sup>,并接入 8 个种的蜜环菌生物种单倍菌丝体(表 1),放入恒温培养箱 24~25 °C 恒温培养 20 d。然后用扫描仪(EPSON PERFECTION 4870 PHOTO)扫描并用根系分析系统 WinRHIZO 测定菌落面积,计算菌落面积变化比率( $H_C$ ), $H_C = (S_i - S_a) / S_a \times 100$ ,其中  $S_i$  和  $S_a$  分别为试验组和对照组各蜜环菌生物种的菌落面积。将长有蜜环菌单倍体的培养基放入沸水中煮至培养基融化,然后将菌索 65 °C 烘干至恒重,称重。计算生物量变化比率( $H_B$ ), $H_B = (B_i - B_a) / B_a \times 100$ ,其中  $B_i$  和  $B_a$  分别为试验组和对照组的菌索生物量。

### 1.5 数据分析

以海拔为固定因子,采用 SPSS20.0 软件对增长率( $G$ )、折干率( $D$ )、天麻素含量、对羟基苯甲醇含量和总药用成分含量( $S$ ,天麻素含量+对羟基苯甲醇含量)进行单因素方差分析;采用 Duncan 进行多重比较,显著性水平设置为 0.05。另外,对  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶、PPO、PAL 活性、蜜环菌菌落面积、生物量及抑菌效果,以温度为固定因子,采用 SPSS22.0 进行单因素 ANOVA 分析,然后采用邓肯法进行处理间显著性差异检验( $P < 0.01$ );采用 Origin2018 作图。

## 2 结果与分析

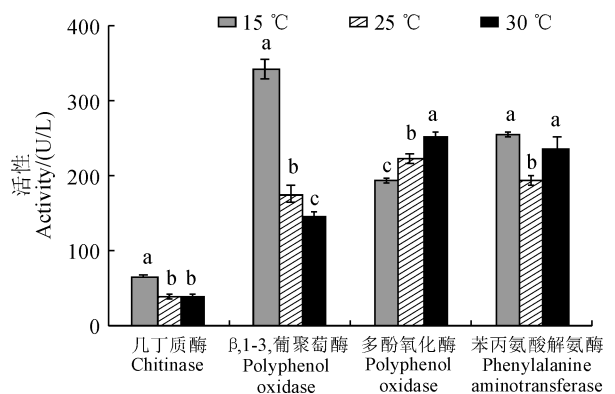
### 2.1 海拔对乌红杂交天麻生长及药用品质的影响

实际栽培结果表明,海拔乌红杂交天麻的增长率、天麻素含量及总对羟基苯甲醇含量存在显著影响,而对折干率无显著影响(表 4)。其中,乌红杂交天麻增长率在海拔 1 600 m 最高,并显著高于其他海拔,分别比海拔 850 m 和 1 900 m 显著提高 64.06%和 98.93%;天麻素含量却在 1 900 m 海拔处最高,并显著高于其他海拔,分别比海拔 850 m 和 1 600 m 显著提高 20.1%和 25.13%;总对羟基

苯甲醇含量在 1 600 m 处最高,分别比海拔 850 m 和 1 900 m 显著提高 46.15%和 40.74%。综合而言,乌红杂交天麻有效成分总量在海拔 1 600 m 处最高,分别比海拔 850 m 和 1 900 m 提高 31.10%和 8.39%,但差异均未达到显著水平。可见,海拔 1 600 m 环境最有利于乌红杂交天麻的生长和药用有效成分的积累。

### 2.2 培养温度对乌红杂交天麻体内消化酶与防御酶活性的影响

图 1 显示,乌红杂交天麻体内消化酶(几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶)活性随温度而降低,表现为 15 °C 处理显著高于 25 °C 和 30 °C 处理,这表明高温显著破坏了杂交天麻的消化酶活性。同时, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性对温度的反应更敏感,受温度的影响更



每种酶内不同小写字母表明温度处理间在 0.05 水平上存在显著性差异(Duncan,  $P < 0.05$ )

图 1 乌红杂交天麻体内消化酶和防御酶活性对温度升高的响应

The different normal letters within same enzyme indicate significant difference among temperature treatments at the 0.05 level (Duncan,  $P < 0.05$ )

Fig.1 Response of digestive and defensive enzyme activities in hybrid of *G. elata* Bl. f. *elata* × *G. elata* Bl. f. *glauca* to temperature rise

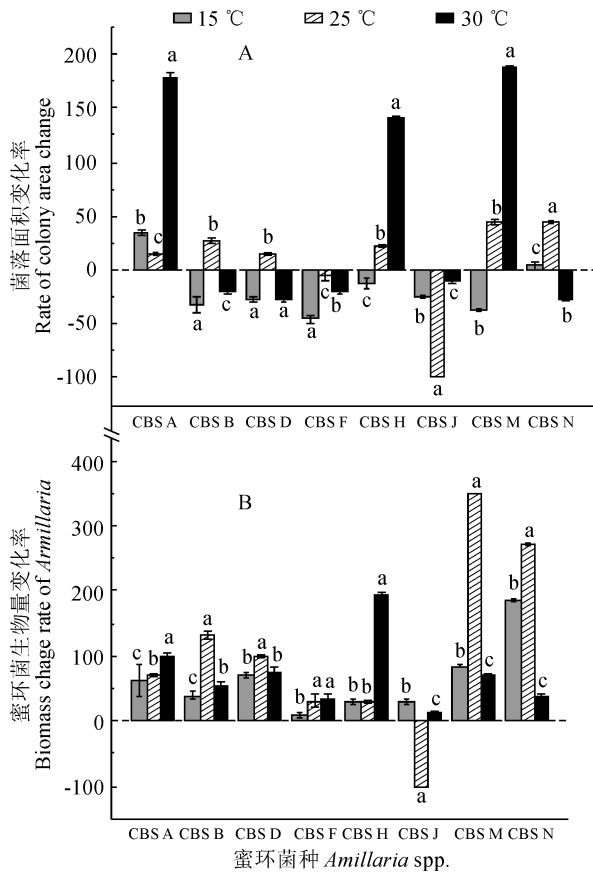
表 4 不同海拔下杂交天麻生长与药用品质的变化

Table 4 The growth and medicinal quality of hybrid of *G. elata* Bl. f. *elata* × *G. elata* Bl. f. *glauca* at different altitudes

海拔 Altitude /m	折干率 Drying rate	增长倍数 Growth rate	天麻素含量 Gastrodin content /(mg/g)	对羟基苯甲醇含量 P-hydroxybenzyl alcohol content /(mg/g)	总天麻素含量 Total gastrodin content /(mg/g)	总对羟基苯甲醇量 Total p-hydroxybenzyl alcohol content /(mg/g)	有效成分总量 Total active ingredient /(mg/g)
850	0.18±0.06a	9.07±1.21b	1.99±0.13b	0.24±0.02a	4.11±0.53a	0.52±0.07b	4.63±0.59a
1600	0.18±0.05a	14.88±1.49a	1.91±0.17b	0.27±0.04a	5.31±0.56a	0.76±0.12a	6.07±0.64a
1900	0.19±0.05a	7.48±1.10b	2.39±0.14a	0.23±0.02a	5.05±0.42a	0.54±0.07b	5.60±0.48a

注:同列不同字母表明海拔间在 0.05 水平上有显著差异

Notes: Data in a column marked with different normal letters mean they were different significantly among different altitudes at 0.05 level



正值代表促进生长, 负值代表抑制生长; 同一菌种内不同小写字母代表温度处理间在 0.05 水平存在显著性差异 (Duncan,  $P < 0.05$ )

图 2 不同温度培养天麻提取物处理下各蜜环菌菌种单倍体菌丝菌落面积和生物量的变化率

Positive values promote growth and negative values inhibit growth. The lowercase letters within same species represent the significant difference among temperature treatments at 0.05 level (Duncan,  $P < 0.05$ )

Fig. 2 Change rate of colony area and biomass of haploid mycelia of *Armillaria* spp. treated by extract from hybrid *G. elata* cultured in different temperature conditions

大,且在各温度处理间具有显著性差异(图 1)。杂交天麻体内多酚氧化酶(PPO)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性在不同温度下也差异显著。PPO活性随着温度的上升而逐渐增强,且各温度处理间均存在显著性差异;PAL活性随着温度的升高先下降然后上升,且 25 °C 处理显著低于 15 °C 和 30 °C 处理(图 1)。以上结果表明乌红杂交天麻各防御酶活性在温度升高时变化趋势不尽相同,PPO活性具有增强趋势,而 PAL活性却有降低趋势。

### 2.3 培养温度对天麻组织粗提液抑制蜜环菌生长的影响

图 2,A 显示,在不同培养温度天麻提取物(抗

真菌蛋白,GAFP)处理下,各蜜环菌菌种单倍体菌丝菌落面积变化率表现复杂多样,且温度处理间均存在显著性差异;菌落面积变化率不仅有上升和下降差异,更有正值和负值之别。其中,在各温度提取液处理下,菌种 CBSA 菌落面积变化率均为正值,菌落生长得到促进;而菌种 CBSF 和 CBSG 菌落面积变化率均为负值,菌落生长均受到抑制;其余菌种的菌落面积变化率既有正值,也有负值,说明菌落生长有些情况下得到促进,有些情况受到抑制。在 15 °C 培养天麻提取物处理下,菌落面积变化率仅菌种 CBSA 和 CBSN 为正值,其余菌种菌落面积变化率为负值,即多为抑制作用且大多较大;在 25 °C 培养天麻提取物处理下,菌落面积变化率除菌种 CBSF 和 CBSJ 外均为正值,即多为促进作用;30 °C 培养天麻提取物处理下,菌落面积变化率仅菌种 CBSA、CBSH 和 CBSM 为正值但促进作用很明显,其余菌种均为负值但抑制作用相对较小。可见,大多数蜜环菌菌种菌落生长的抑制效果均以 15 °C 培养天麻提取物处理最显著,随着培养天麻温度的上升,抑菌效果有显著降低的趋势,但其抑制效应在 8 个生物种间存在显著差异。

同时,与试验预期相反,菌落生物量的变化率除 CBSJ 外均为正值,即未灭活天麻组织液(天麻抗真菌蛋白)均明显促进各蜜环菌菌种的生长,但不同培养温度组织液的促进效应有显著差异,在低温时促进效应较弱,而在中温时促进效应相对较强(图 2, B)。其中,除菌种 CBSJ 以外,随着培养温度的升高,大部分蜜环菌生物量先增加后降低,也就是天麻提取物对生物量增加的相对抑制能力先降低后升高,在 25 °C 达到最低值,大多数在 15 °C 达到最高值。上述结果表明,尽管天麻组织液中存在具有抑菌活性的抗真菌蛋白(GAFP),但天麻组织粗提液中可能同时存在对高温敏感的未知活性物质,二者综合作用呈现出对蜜环菌生长具有促进作用。

### 3 讨论

经过实验地栽培研究,发现在海拔 1 900 m 处由 CBSF 伴栽的红天麻有效成分含量最高,杂交天麻适合种植在 1 600 m 海拔范围。也有学者发现,无论在原位还是模拟条件下,植物与真菌共生体双方的海拔来源及海拔梯度上的环境(或温度)变化均显著影响其生长<sup>[41]</sup>。结合彭华胜的研究结果<sup>[11]</sup>,天麻的分布有一定海拔要求,其中西南地区以 1 200 ~ 1 800 m 较多,东北地区多分布在海拔 300 ~

1 000 m。而在邻近纬度,低海拔地区温度较高,高温抑制了天麻中消化酶的活性,但是蜜环菌胞外酶活性随温度的升高先增加后降低,这就可能使天麻-蜜环菌的共生关系遭到破坏。

本研究的结果表明,天麻体内消化酶和防御酶系统对于温度升高的响应具有差异。低温下天麻消化酶活性升高,而高温下天麻的保护酶活性则增加。早在 20 世纪 80 年代研究发现,天麻皮层细胞具有消化功能,菌丝的细胞壁就是在其中被消化的,发挥作用的主要是天麻皮层分泌的几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶<sup>[42-43]</sup>。因此,这些消化酶活性的变化直接影响天麻的营养供给,也与天麻免受蜜环菌侵染密切相关。同时,本研究发现,高温下天麻体内防御酶活性增强,这与戴明凯等以马铃薯为研究对象,发现高温胁迫下马铃薯体内保护酶活性随时间推移增加的结果相似<sup>[44]</sup>。因此,天麻响应蜜环菌侵染的策略随着温度的升高发生变化,由低温的消化蜜环菌菌丝体供自生需要,转向高温下保护自身免受侵害为主。

与此同时,我们还研究了温度变化对天麻体内组织粗提液抑制蜜环菌单倍体菌丝生长的影响,发现温度升高削弱了天麻对蜜环菌菌丝体的抑制能力。本研究中采用的是天麻组织的粗提液,包含各种酶类和抗真菌蛋白以及其他成分不明的物质<sup>[45-47]</sup>。抗真菌蛋白(GAFP)是一类对真菌具有抑制作用的蛋白质,在芝麻菜种子和天麻的块茎中均有发现<sup>[48-49]</sup>曾从新生麻块茎中检测并纯化出一种抗真菌蛋白,并对其进行了免疫荧光定位,发现抗真菌蛋白定位于新生麻表皮及皮层细胞的外缘,是新生麻避免被蜜环菌侵入的物质基础。而且 GAFP 是越冬前新生麻阻止蜜环菌侵入的化学防御物质<sup>[50]</sup>,说明低温对于 GAFP 的抑菌效果显著,可能是高温抑制 GAFP 的表达,或者活性。这与本试验

所发现的天麻组织粗提液在低温下抑菌效果明显较为一致。由于几丁质酶和葡聚糖本身不具有抑菌活性<sup>[48]</sup>,我们推断本研究中发挥抑菌作用的主要物质是 GAFP。本研究还发现,天麻组织粗提液中存在促进蜜环菌生长的活性物质,这种活性物质可能存在于天麻皮层中 GAFP 的外侧,以诱导和促进蜜环菌趋向天麻组织的生长。这也说明天麻与蜜环菌在长期的协同进化过程中具有十分复杂的关系。

温度还可能对天麻伴生蜜环菌的侵染特性产生影响。蜜环菌菌丝体最适宜的生长温度为 20~25 °C,超过 30 °C 停止生长<sup>[51]</sup>,施汉钰等也认为最佳的蜜环菌培养温度为恒温 25 °C<sup>[37]</sup>。也有学者研究发现,蜜环菌的生长量在高温条件下显著高于低温条件下,其差异主要是菌丝生长,而菌索生长的差异并不大<sup>[52]</sup>。另外,温度还影响蜜环菌胞外酶分泌。如曾春函等在研究中发现,温度对蜜环菌胞外漆酶和果胶酶活性大小有影响,对产酶时间没有影响;对纤维素酶活性达到峰值的时间和活性大小都有影响<sup>[53]</sup>。

## 4 结 论

温度是影响蜜环菌-天麻共生关系的重要环境因子。随着温度升高,天麻抵御蜜环菌入侵的策略发生变化,天麻的消化酶活性和粗提液的抑菌活性下降,但是保护酶活性上升。而且不同海拔下栽培的天麻产量及有效成分也有明显差异,这种适应策略的转变,可能是温度升高导致蜜环菌病理性侵染天麻的重要机制。同时,天麻体内含有某种促进蜜环菌生长的活性物质,说明天麻体内同时存在促进蜜环菌生长和抑制蜜环菌侵染的复杂系统。而且经过研究发现,在海拔 1 900 m 处,由 CBS F 伴栽的红天麻产量及有效成分含量均最高。

## 参考文献:

- [1] 张宏杰,周建军,李新生. 天麻研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2003, **25**(1): 17-20.  
ZHANG H J, ZHOU J J, LI X S. Study advance of *Gastrodia elata* Bl. [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2003, **25**(1): 17-20.
- [2] 何海艳,王玉川,丁培超,等. 天麻种植生态气候条件及增产技术[J]. 南方农业, 2018, **12**(36): 5-7.  
HE H Y, WANG Y C, DING P C, et al. Ecological and climatic conditions of *Gastrodia elata* planting and its yield-increasing technology[J]. *South China Agriculture*, 2018, **12**(36): 5-7.
- [3] 邵力平,沈瑞祥,张素轩,等. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林

业出版社, 1984: 1-262.

- [4] SINCLAIR W A, LYON H H, JOHNSON W T. Diseases of Trees and Shrubs [M]. Ithaca, USA: Cornell University Press, 1987: 1-574.
- [5] 戴玉成. 中国木本植物病原木材腐朽菌研究[J]. 菌物学报, 2012, **31**(4): 493-509.  
DAI Y C. Pathogenic wood-decaying fungi on woody plants in China[J]. *Mycosystema*, 2012, **31**(4): 493-509.
- [6] 门金鑫,邢晓科,郭顺星. 蜜环菌物种及鉴定方法研究进展[J]. 菌物学报, 2016, **35**(11): 1 281-1 302.  
MEN J X, XING X K, GUO S X. Biological species and identification methods of the genus *Armillaria* (Agaricales, Basidiomycota): A review[J]. *Mycosystema*, 2016, **35**(11): 1 281-

- 1 302.
- [7] DAI Y C, YANG Z L, CUI B K, *et al.* Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review) [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2009, **11**(3): 287-302.
- [8] 吴连举. 天麻标准化生产与加工利用一学就会[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- [9] 郭耀辉, 范中菡, 李 晓, 等. 天麻的研究进展[J]. 食用菌, 2014, **22**(3): 137-139.  
GUO Y H, FAN Z H, LI X, *et al.* Research progress of *Gastrodia* [J]. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 2014, **22**(3): 137-139.
- [10] 徐锦堂, 冉砚珠. 中国天麻栽培学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993.
- [11] 彭华胜, 王德群. 生态因子与古今天麻产区的关系[J]. 现代中药研究与实践, 2007, **21**(2): 6-9.  
PENG H S, WANG D Q. Affecting ecological factor on location of *Gastrodia elata* Bl. [J]. *Research and Practice on Chinese Medicines*, 2007, **21**(2): 6-9.
- [12] 余昌俊, 王绍柏, 曹 斌. 利用海拔温差调控种植天麻的研究[J]. 中国农学通报, 2008, **24**(9): 48-53.  
YU C J, WANG S B, CAO B. The study on cultivating rhizoma *gastrodiae* through regulating temperature difference of altitude[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, **24**(9): 48-53.
- [13] 黄庆林. 汉中市天麻高效设施栽培及管理技术探讨[J]. 安徽农业科学, 2018, **46**(21): 78-80.  
HUANG Q L. Efficient plant cultivation and management technology of *Gastrodia elata* in Hanzhong City[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, **46**(21): 78-80.
- [14] 杨 岗. 莱经野生天麻的生态气候环境研究[J]. 安徽农业科学, 2016, **44**(26): 170-172.  
YANG G. Study on ecological and climatic environment of wild *Gastrodia elata* in Yingjing County[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, **44**(26): 170-172.
- [15] 何建舟. 天麻软腐烂窝浅析[J]. 食用菌, 1983, **5**(5): 29-30.  
HE J Z. Analysis of rotting *Gastrodia elata* [J]. *Edible Fungi*, 1983, **5**(5): 29-30.
- [16] 曾 勇, 蔡传涛, 刘贵周, 等. 不同海拔两种天麻仿野生栽培下产量和品质变化[J]. 植物科学学报, 2011, **29**(5): 637-643.  
ZENG Y, CAI C T, LIU G Z, *et al.* Yield and quality variation in two varieties of *Gastrodia elata* Blume in bionic wild cultivation at different altitudes[J]. *Plant Science Journal*, 2011, **29**(5): 637-643.
- [17] 张维经. 天麻与其真菌营养[J]. 西北植物学报, 1987, **7**(3): 215-221.  
ZHANG W J. *Gastrodia elata* and its fungal nutrition[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 1987, **7**(3): 215-221.
- [18] 胡 忠, 杨增明, 王 钧. 天麻球茎中一种抗真菌蛋白的分离和部分特性[J]. 云南植物研究, 1988, **10**(4): 373-380.  
HU Z, YANG Z M, WANG J. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from *Gastrodia elata* corm [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1988, **10**(4): 373-380.
- [19] 王浩鑫, 杨 涛, 曾 英, 等. 乌天麻 *Gastrodianin* 基因的鉴定及其在天麻发育进程中的表达[J]. 云南植物研究, 2007, (3): 345-350.  
WANG H X, YANG T, ZENG Y, *et al.* Identification of *Gastrodianin* gene and its expression in the development of *Gastrodia elata* [J]. *Yunnan Plant Research*, 2007, (3): 345-350.
- [20] WANG H X, YANG T, ZENG Y, *et al.* Expression analysis of the *gastrodianin* gene *ga4B* in an achlorophyllous plant *Gastrodia elata* Bl [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, **26**(3): 253-259.
- [21] 杨增明, 胡 忠. 天麻球茎几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的初步研究[J]. 云南植物研究, 1990, **12**(4): 421-426.  
YANG Z M, HU Z. A preliminary study on the chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in corms of *Gastrodia elata* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1990, **12**(4): 421-426.
- [22] 郭顺星, 徐锦堂. 蜜环菌侵染猪苓菌核的细胞学研究[J]. 植物学报, 1993, **35**(1): 44-50.  
GUO S X, XU J T. Cytological studies on the process of *Armillaria mellea* infection through the *Sclerotia* of *Grifola umbellata* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1993, **35**(1): 44-50.
- [23] 黄靖雯, 刘 娟, 周骏辉, 等. 高卢蜜环菌几丁质酶基因的生物信息学分析与表达[J]. 中国中药杂志, 2019, **44**(6): 1151-1155.  
HUANG J W, LIU J, ZHOU J H, *et al.* Bioinformatics analysis and expression of chitinase genes in *Armillaria gallica* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, **44**(6): 1151-1155.
- [24] 王曼玲, 胡中立, 周成全, 等. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学通报, 2005, **40**(2): 215-222.  
WANG M L, HU Z L, ZHOU M Q, *et al.* Advances in research of polyphenol oxidase in plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, **40**(2): 215-222.
- [25] THYGESEN P W, DRY I B, ROBINSON S P. Polyphenol oxidase in potato [J]. *Plant Physiology*, 1995, **109**: 525-531.
- [26] 杜欣谊. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 现代化农业, 2016, (7): 24-26.  
DU X Y. Research progress of phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Modernizing Agriculture*, 2016, (7): 24-26.
- [27] 余昌俊, 王绍柏. 乌红杂交天麻良种工厂化快繁工艺流程研究[J]. 中国食用菌, 2007, **26**(6): 21-23.  
YU C J, WANG S B. Research on industrial quickly breeding technique of hybrid variety on rhizoma *gastrodiae* [J]. *Edible Fungi of China*, 2007, **26**(6): 21-23.
- [28] 季 德, 宁子璇, 张雪荣, 等. 不同干燥加工方法对天麻药材质量的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, **41**(14): 2587-2590.  
JI D, NING Z W, ZHANG X R, *et al.* Effects of different drying methods on quality of *Gastrodiae* Rhizoma [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, **41**(14): 2587-2590.
- [29] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [30] 岳文波, 邹军锐, 张 涛, 等. 3种不同类型口器的昆虫取食对菜豆叶片 PPO 和 PAL 活性的影响[J]. 生态学杂志, 2018, **37**(11): 3342-3350.  
YUE W B, ZHI J R, ZHANG T, *et al.* Effects of feeding of insects with three types of mouthparts on the activities of polyphenols oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in leaves of kidney bean plant [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, **37**(11): 3342-3350.
- [31] 白 路, 包海鹰. 长白山乌杆天麻的林下仿生栽培技术研究[J]. 人参研究, 2011, **23**(4): 37-40.



- BAI L, BAO H Y. Research on *Gastrodia elata* f. *glauca* of Changbai Mountains bionic cultivation techniques under woods[J]. *Ginseng Research*, 2011, **23**(4): 37-40.
- [32] 杨先义, 施金谷, 余刚国, 等. 天麻种植技术[J]. 农业与技术, 2016, **36**(23): 112-114.
- YANG X Y, SHI J G, YU G G, *et al.* *Gastrodia elata* planting technique[J]. *Agriculture & Technology*, 2016, **36**(23): 112-114.
- [33] BOLLER T, GEHRI A, MAUCH F, *et al.* Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties, and possible function[J]. *Planta*, 1983, **157**(1): 22-31.
- [34] 史益敏. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 128-130.
- [35] 张温典, 田 兰, 张晓玉, 等. 不同毒性玉米大斑病菌感染对感病玉米叶片 PPO 活性的影响[J]. 华北农学报, 2014, **29**(2): 89-93.
- ZHANG W D, TIAN L, ZHANG X Y, *et al.* Effects of different virulent isolates of *Exserohilum turcicum* on host PPO activity[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2014, **29**(2): 89-93.
- [36] 胡 月, 王鸿飞, 董栓泉, 等. 蔗糖处理对费菜黄酮含量及其抗氧化性的影响[J]. 现代食品科技, 2016, **32**(1): 250-255.
- HU Y, WANG H F, DONG S Q, *et al.* Effect of sucrose treatment on flavonoid content and antioxidant activity of *Sedum aizoon* leaves[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, **32**(1): 250-255.
- [37] 施汉钰, 崔 巍, 郑焕春, 等. 蜜环菌菌索生物学特性的研究[J]. 菌物研究, 2014, **12**(4): 229-232.
- SHI H Y, CUI W, ZHENG H C, *et al.* Research on biological characteristics of *Armillariella mellea* [J]. *Journal of Fungal Research*, 2014, **12**(4): 229-232.
- [38] 许兴林. 天麻人工栽培技术[J]. 现代农业科技, 2012, (5): 169-171.
- XU X L. Artificial cultivation techniques of *Gastrodia elata* [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2012, (5): 169-171.
- [39] 胡 忠, 黄清藻. 天麻中抗真菌蛋白质的诱导和积累[J]. 云南植物研究, 1994, **16**(2): 169-177.
- HU Z, HUANG Q Z. Induction and accumulation of the antifungal protein in *Gastrodia elata* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1994, **16**(2): 169-177.
- [40] 徐 静. 大豆蛋白分离工艺研究[J]. 金山油化纤, 2006, (3): 14-17.
- XU J. Study on separation process of soybean protein[J]. *Petrochemical Technology in Jinshan*, 2006, (3): 14-17.
- [41] 杨 榕. 植物-AM 真菌的共生适应性对青藏高原海拔环境梯度的响应[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [42] DONG Z B, ZHANG W J. Studies on the characteristic of the structures in the cortical cells of *Gastrodia elata* after infection of *Armillaria mellea* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1986, **28**(4): 349-354.
- [43] 朱立成, 罗 辉, 曾 铂, 等. 慈菇中抗真菌蛋白分离纯化初步研究[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2013, **34**(4): 33-36.
- ZHU L C, LUO H, ZENG B, *et al.* Preliminary study on isolation and purification of antifungal protein from *Sagittaria sagittifolia* [J]. *Journal of Jinggangshan University* (Natural Science), 2013, **34**(4): 33-36.
- [44] 戴鸣凯, 张志忠, 刘 爽, 等. 高温胁迫对马铃薯幼苗生长和部分生理指标的影响[J]. 农学学报, 2018, **8**(9): 9-14.
- DAI M K, ZHANG Z Z, LIU S, *et al.* Effects of high temperature stress on growth and some physiological indices of potato seedlings[J]. *Journal of Agriculture*, 2018, **8**(9): 9-14.
- [45] 陶云海. 天麻药理研究新进展[J]. 中国中药杂志, 2008, **33**(1): 108-110.
- TAO Y H. Recent progress on pharmacological effects of *Gastrodia elata* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, **33**(1): 108-110.
- [46] 岑信钊. 天麻的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材, 2005, **28**(10): 99-103.
- CEN X Z. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of *Gastrodia elata* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2005, **28**(10): 99-103.
- [47] 芦红云, 吴天祥, 钟 敏, 等. 天麻提取物及其 3 种主要成分对灰树花产胞外漆酶和菌丝体的影响[J]. 食品科学, 2018, **39**(6): 101-106.
- LU H Y, WU T X, ZHONG M, *et al.* Effect of rhizoma *gastrodiae* extract and its three main components on production of laccase and mycelial biomass by submerged fermentation of *Grifola frondosa* [J]. *Food Science*, 2018, **39**(6): 101-106.
- [48] 张 耀, 王财成, 袁素素, 等. 芝麻菜种子抗菌蛋白的纯化及其抗菌活性[J]. 食品工业科技, 2018, **39**(20): 92-97.
- ZHANG Y, WANG C C, YUAN S S, *et al.* Purification of antibacterial protein from arugula (*Eruca sativa* Mill.) seeds and its antifungal activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, **39**(20): 92-97.
- [49] JIANG L, XU J T, WANG H, *et al.* Detection and immunofluorescence localization of antifungal protein of *Gastrodia elata* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1993, **35**(8): 593-599.
- [50] 徐锦堂, 兰 进. 天麻的营养繁殖茎及其抑菌功能[J]. 植物学报, 2001, **43**(4): 348-353.
- XU J T, LAN J. The structure and antifungal functions of vegetative propagation corm of *Gastrodia elata* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, **43**(4): 348-353.
- [51] 赵春娜, 胡亚平, 张 鹏, 等. 蜜环菌的特性及其对天麻生长的影响[J]. 中国果菜, 2016, **36**(6): 57-59.
- ZHAO X N, HU Y P, ZHANG P, *et al.* Advances in studies on *Armillaria mellea* in companion planting *Gastrodia elata* [J]. *China Fruit and Vegetable*, 2016, **36**(6): 57-59.
- [52] 江本利, 苏香峰, 储甲松, 等. 蜜环菌培养影响因子的多因素分析[J]. 安徽农业科学, 2016, **44**(29): 1-2.
- JIANG B L, SU X F, CHU J S, *et al.* Multi-factor analysis of influencing factors on *Armillaria mellea* culture[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, **44**(29): 1-2.
- [53] 曾春函, 王传华. 我国主要蜜环菌生物种胞外酶活性对温度的种特异性响应[J]. 菌物学报, 2019, **38**(2): 195-209.
- ZENG C H, WANG C H. Specificity response of extracellular enzyme activities to temperature of eight *Armillaria* species in China[J]. *Mycosystema*, 2019, **38**(2): 195-209.