

菌根真菌对铁皮石斛生长和矿质元素的影响

金辉, 亢志华, 陈晖, 韩素芬*

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏南京 210037)

摘要: 铁皮石斛组培苗接种6个真菌菌株, 培养60 d后, 接菌苗的平均鲜重增长率均高于对照, 其中接种GS222、GDB162、GDB254、MLX102菌株的苗平均鲜重增长率均达到极显著差异($\alpha=0.01$), 接种CLN103、CLX104的苗达到显著差异($\alpha=0.05$); 接菌苗的各矿质元素(除Zn外)含量也均高于对照。接菌苗的营养根重分离获得原接种菌株。显微观察到在皮层和中柱组织形成菌丝结等典型的共生结构, 表明接种菌株已与铁皮石斛根共生形成了菌根, 对铁皮石斛的生长和矿质元素的吸收有较明显促进作用。由此可认为GS222、GDB162、GDB254、MLX102、CLN103、CLX104是铁皮石斛优良的菌根菌株。

关键词: 铁皮石斛; 组培苗; 菌根真菌; 共生; 菌丝结

中图分类号: Q948.12*2.3; S682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-389X(2007)01-0080-04

Effects of mycorrhizal fungi on the growth and mineral nutrition absorption of *Dendrobium candidum*

JIN Hui, KANG Zhi-hua, CHEN Hui, HAN Su-fen

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Six strains were inoculated into the tissue culture seedlings of *Dendrobium candidum*. After 60 days, the average fresh weights of seedlings had been higher than those of the control. In detail: The average fresh weight of seedlings, inoculated with GS222, GDB162, GDB254, MLX102, had been extremely significantly increased ($\alpha=0.01$), and inoculated with CLN103, CLX104, had been significantly increased ($\alpha=0.05$). The mineral elements contents of the seedlings had also been higher than those of the control (except Zn). And the fungal strains had already been reisolated from the mycorrhiza. It was found that there were pelotons in cortical and vascular tissue by the observation of the microstructure of mycorrhiza. Therefore it was confirmed that the relationship of symbiosis had been formed, the growth and mineral nutrition absorption of *D. candidum* had been promoted by the mycorrhizal fungi. So it was proved that GS222, GDB162, GDB254, MLX102, CLN103, CLX104 were good mycorrhizal strains of *D. candidum*.

Key words: *Dendrobium candidum*; tissue culture seedling; mycorrhizal fungi; symbiosis; peloton

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)为兰科(Orchidaceae)石斛属植物, 既是名优花卉又是濒临灭绝的珍贵中药材^[1]。由于铁皮石斛种子自然繁殖系数低, 野生资源稀少, 加上人们常年无节制的采挖, 致使其处于濒临灭绝的边缘^[2]。随着组织培养技术的发展和运用, 铁皮石斛的组培技术已基本成熟, 但是组培苗移栽成活率低, 这和缺少与之共生的菌根真菌有关^[3]。本研究通过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促进其生长的优良菌根真菌, 为铁皮石斛组培苗移栽时提供优良的接种菌株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

铁皮石斛无菌苗由来自云南的野生铁皮石斛蒴果通过组织培养获得。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371190)。

作者简介: 金辉(1978-), 男, 甘肃静宁人, 硕士研究生, 从事兰科菌根研究。

* **通讯作者:** 韩素芬(1943-), 女, 浙江湖州人, 教授, 博士生导师, 从事微生物学研究。

收稿日期: 2006-06-03; **修回日期:** 2006-09-05。

接种菌株: GS222 分离自安徽金寨蕙兰 (*Cymbidium faberi*), GDB162、GDB254 分离自安徽岳西蕙兰 (*C. faberi*), MLX102 分离自云南西双版纳墨兰 (*Cymbidium sinense*), CLN103 分离自云南怒江贡山春兰 (*Cymbidium goeringii*), CLX104 分离自云南下关春兰 (*C. goeringii*)。经初步鉴定 CLX104 和 GDB162 属于丝孢纲 (*Menispora* sp.), GS222、GDB254、MLX102、CLN103 属于兰科丝核菌类 (*Orchidaceous rhizoctonias*)^[4]。

共生培养基: 采用 Dijk et al^[5] 略作改进的兰花真菌共培养培养基。

1.2 方法

1.2.1 铁皮石斛组培苗的接种 将生根的铁皮石斛组培苗在无菌条件下称重(精确至 0.001 g), 然后移入共生培养基中, 每瓶 4-5 株; 5 d 后, 无污染的苗分别接入适量的不同菌株, 每个处理重复 6 次, 以不接菌的为对照; (25 ± 1) °C 恒温培养, 每天光照 12 h。

1.2.2 接菌苗生物量的测定 培养 60 d 后, 取苗洗净晾干后再次称重(精确至 0.001 g), 计算净增长量, 用 SPSS 软件比较程序进行不同处理对铁皮石斛苗鲜重增长率(%)影响的分析。

1.2.3 接种菌的重分离 培养 60 d 的接菌铁皮石斛营养根采用常规分离方法。

1.2.4 接菌苗矿质元素含量测定 采用 HNO₃: HClO₄ 为 5:1 的混合酸消煮法^[6] 提取铁皮石斛苗内的矿质元素, 用 ICP(电感耦合等离子体发射光谱仪)测定各元素含量。

1.2.5 石蜡切片的制备 从接菌苗截取 2-3 mm 新生的营养根段, 于 FAA 液(70% 乙醇)中固定, 采用常规石蜡切片法^[7], 番红固绿对染, 显微镜观察并拍照。

2 结果

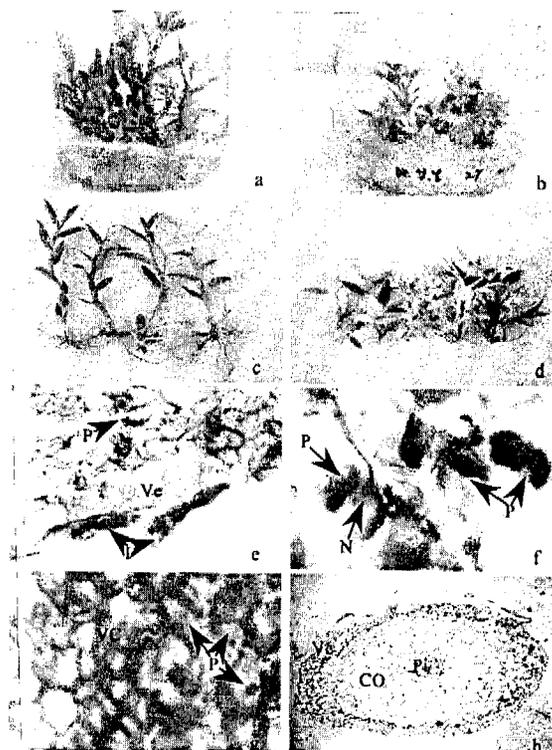
2.1 铁皮石斛组培苗接种各菌株后的生长状况

铁皮石斛苗培养 25 d 后, 凡接菌苗的生长势都明显比对照苗旺盛, 色泽翠绿, 叶宽而健壮, 高生长迅速, 开始长新根(图 1a、b); 随着时间的推移, 接菌苗和对照苗的差异更为显著。60 d 后, 接菌苗叶色浓绿, 茎粗壮红紫色, 高生长明显, 新生根发达(图 1c); 而对照苗基部已出现枯死叶片, 几乎没有新生根, 原来的根也已枯黄(图 1d)。对苗生物量及重分离的结果见表 1。

从图 1a-d 和表 1 可知, 接菌苗的长势、平均鲜重增长率均高于对照, 且分别比对照高 51.36%、43.23%、48.23%、38.52%、35.56% 和 26.86%; 其中接种 GS222、GDB162、GDB254、MLX102 菌株的苗平均鲜重增长率经检验达到了极显著差异($\alpha = 0.01$), 接种 CLN103、CLX104 的苗也已达显著差异($\alpha = 0.05$); 最高的 GS222 菌株接种的苗平均鲜重增长率是对照的 2 倍以上。接菌苗的营养根中通过重分离均获得了原接种菌株。

2.2 接菌苗根的显微结构变化

在接菌苗营养根的连接石蜡切片中, 显微观察到菌根真菌先侵入根被组织, 并破坏根被组织进入皮层组织, 入侵和破坏根被组织的部位是随机的(图 1e); 菌丝从根被组织进入皮层



注: Ve. 根被; CO. 皮层; F. 真菌; P. 菌丝结; VC. 中柱组织; N. 细胞核; Pi. 髓; a, b. 铁皮石斛苗接种 GDB254 菌株 25 d 后长势(b 为对照); c, d. 铁皮石斛苗接种 GS222 菌株 60 d 后长势(d 为对照); e. 根被外菌丝及皮层细胞内的菌丝结($\times 200$); f. 皮层组织菌丝结($\times 500$); g. 中柱组织菌丝结($\times 400$); h. 根横切面对照($\times 100$)。

图 1 菌铁皮石斛苗的生长状况及菌根中结构变化

Figure 1 The growth status of *D. candidum* seedlings and change of the structure of mycorrhizae

组织后,不断延伸向内扩展,直达中柱组织;在皮层和中柱组织形成分布不均匀形状不规则的菌丝结(图1f-g)。表明真菌已侵入兰苗根部并已形成共生菌根。而在对照苗根的根被及皮层细胞中均未发现入侵菌丝及菌丝结等结构(图1h)。

2.3 接菌苗内矿质元素含量

经 ICP 测定苗内各矿质元素含量,结果见表2。

由表2可知,铁皮石斛接菌苗内各矿质元素(除Zn外)的含量均高于对照未接菌苗,微量元素的增加尤为突出。但各菌株接菌苗各种元素含量之间存在差异。对照苗B元素含量极微,ICP未检测到,而接菌苗都已检出,其中GS222和CLX104接菌苗B元素含量最高;各菌株接菌苗P元素的含量比对照高出了至少7%,其中MLX102和

CLN103最高,分别较对照高92%和71%;接菌苗S元素含量比对照高出了至少9%,其中MLX102最高为30%;接菌苗K元素含量比对照高出了至少5%,其中GDB162最高为61%;接菌苗Ca元素含量比对照高出了至少17%,其中GDB254最高为38%;接菌苗Na元素含量比对照高出了至少39%,其中GDB162最高为71%;接菌苗Mg元素含量也比对照高出了至少17%,其中MLX102最高为39%;接菌苗Fe元素含量比对照高出了至少10%,其中GS222最高竟为185%;接菌苗Cu元素含量比对照高出了至少11%,其中GDB254最高,含量居然高出对照356%;接菌苗Mn元素含量也比对照高出了至少17%,其中CLN103最高竟为158%;对照苗Zn元素最高,GDB162接菌苗最低。

表2 接种不同菌株铁皮石斛组培苗的矿质元素含量

Table 2 Mineral elements content in the tissue culture seedling of *D. candidum* inoculated with different strains

处理菌株	$w_{\text{矿质元素}} / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$											
	B	P	S	Si	K	Ca	Na	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn
对照	0.00*	1.99	3.06	0.00*	12.82	5.04	4.90	2.24	0.20	0.18	0.12	2.29
GS222	0.04	2.13	3.45	0.02	19.49	6.18	7.11	2.82	0.57	0.52	0.26	0.95
GDB162	0.01	3.11	3.87	0.01	20.58	5.90	8.38	2.95	0.25	0.20	0.23	0.69
MLX102	0.02	3.82	3.98	0.02	20.12	6.38	7.13	3.12	0.25	0.22	0.26	0.44
CLX104	0.04	3.54	3.33	0.02	13.48	5.99	6.81	2.83	0.22	0.29	0.18	0.93
GDB254	0.03	2.39	3.59	0.01	17.36	6.96	7.33	3.11	0.39	0.82	0.25	1.66
CLN103	0.03	3.41	3.98	0.01	15.34	6.56	6.92	2.61	0.38	0.63	0.31	0.71

注:“*”表示含量低于检测线未检出。

3 结论与讨论

1)GS222、GDB162、GDB254、MLX102、CLN103、CLX104这6个真菌菌株接种后的铁皮石斛苗不仅生长势旺盛,苗色泽翠绿,茎粗壮红紫色,新生根多,根系发达,而且在生物量和各矿质元素含量上也有明显提高。重分离获得原接菌菌株,显微和超微结构观察在皮层和中柱组织有菌丝结典型结构,这些都表明这6个菌株已与铁皮石斛组培苗有效共生并形成了菌根。这些菌根真菌为铁皮石斛的生长发育提供各种营养,因此它们是铁皮石斛优良的共生菌株,可供铁皮石斛组培苗移栽接菌试用。

2)接菌苗的大量和微量元素含量都有不同程度的增加,微量元素(除Zn外)的增加更加明显。Fe、Cu和Mn元素的增加量尤为惊人,均超过了100%。大量元素P和K含量有较明显的升高,这与赵杨景等^[8]用从开唇兰(*Anoectochiuro xburghii*)、墨兰中分离的3个内生真菌菌株接种盆栽大花蕙兰(*Cymbidium* sp.)组培苗,能促进植株吸收P和K养分的结论相同;而各微量元素的增加更明显,与陈连庆等^[9]研究野生石斛菌根微量元素(除Zn外)含量高于组培苗的结论一致。认为入侵兰苗根组织中的菌根真菌可从外界环境中吸收各种矿质元素提供给铁皮石斛,因而矿质元素含量明显增加。为什么Zn元素含量

表1 铁皮石斛组培苗接种真菌菌株后的生长状况

Table 1 Growth of the tissue culture seedlings of *D. candidum* inoculated with the fungal strains

接种菌株	平均鲜重 增长率/%	重分离
对照	22.22	-
GS222	73.58**	+
GDB162	65.45**	+
GDB254	70.45**	+
MLX102	60.74**	+
CLN103	57.78*	+
CLX104	49.08*	+

注:“*”表示差异达0.05显著水平;“**”表示差异达0.01极显著水平;“+”表示分离到原接种菌株;“-”表示未分离到菌株。

反而比对照还低, 今后还需作进一步的研究和探讨。

3) 接菌苗可产生大量的新生营养根, 菌根真菌正是侵染新生根并与其共生形成菌根, 为铁皮石斛提供必要的各种营养进行正常的生长发育; 而贮藏根则由于产生兰酚, 抵制真菌的侵染^[10]。认为菌根真菌可诱导铁皮石斛产生大量新根, 这样不仅有利于真菌的大量入侵, 而且铁皮石斛也能吸收到更多菌提供的营养, 从而形成互惠互利的共生关系。

4) 本研究是在实验室条件下完成的, 但在自然条件下, 与铁皮石斛共生并能促进铁皮石斛生长发育的菌根真菌可能不止一种, 而且环境条件相当复杂, 铁皮石斛形成菌根的过程受多方面的影响。因此, 今后应考虑将铁皮石斛组培苗移栽到野外, 并通过接种优良菌株或混和菌株试验, 为野外推广使用菌根菌剂提供依据。

参 考 文 献:

- [1] 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003: 14.
- [2] 高薇薇, 郭顺星. 三种内生真菌对铁皮石斛、金线莲生长影响的研究[J]. 中草药, 2002, 33(6): 543.
- [3] 赵贵林, 郑平, 何穗华, 等. 小型卡特利亚兰的组织快繁研究初报[J]. 广东农业科学, 2002(3): 24-26.
- [4] 范黎, 郭顺星, 肖培根. 十九种兰科植物根的内生担子菌[J]. 热带作物学报, 1998, 19(4): 77-81.
- [5] Dijk E, Eck N D. Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species[J]. Can J Bot, 1995, 73: 1 203-1 211.
- [6] 中国科学院南京土壤研究所微量元素组. 土壤和植物中微量元素分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 37-65.
- [7] 方中达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 91-108.
- [8] 赵杨景, 郭顺星, 高薇薇, 等. 三种内生真菌与大花蕙兰共生对矿质营养吸收的影响[J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 110-115.
- [9] 陈连庆, 裴致达, 韩宁林, 等. 三种石斛菌根形态结构及元素构成的研究[J]. 林业科学研究, 2002, 15(1): 96-100.
- [10] 范黎, 郭顺星, 肖培根. 墨兰菌根的结构及酸性磷酸酶定位研究[J]. 云南植物研究, 1999, 21(2): 197-201.

(责任编辑: 江 英)