

兰科菌根真菌对石斛组培苗的接种效应

陈瑞蕊¹ 施亚琴¹ 林先贵¹ 张 宁² 汤卫国²

(中国科学院南京土壤研究所 南京 210008; 2 云南金陵植物药业股份有限公司 云南思茅 665000)

摘 要 从野生球花石斛 (*Dendrobium thyrsiflorum*) 根系中分离到 Dt1、Dt2、Dt5、Dt6、Dt7、Dt8 共 6 株真菌, 将其接种到铁皮石斛 (*Dendrobium candidum*) 和球花石斛组培苗的根系上, 定期测定石斛苗的株数、株高、叶数、新芽数等指标, 并与不接种的石斛苗进行比较。试验结果表明, Dt5 号和 Dt8 号真菌的接种效果最好, 地上植株和地下根系生长均良好, 株数增多、株高增加、落叶减少, 新芽和新根萌发, 因此它们对于石斛组培苗的成功栽培具有实际应用价值。

关键词 石斛; 兰科菌根; 组培苗; 接种

中图分类号 S154.39; Q949.32

兰科菌根是菌根真菌与兰科植物形成的共生体, 真菌的菌丝可以侵入到兰科植物根系细胞内, 形成螺旋状扭曲的菌丝团^[1], 与丛枝菌根真菌^[2, 3]相同, 兰科菌根真菌的菌丝可以向根外生长, 延伸到植物根系不能到达的基质 (如枯枝落叶、腐木及其他有机物等) 中, 从这些地方获取大量的碳水化合物和 N、P 等营养物质, 提供给兰科植物^[4, 5], 促进植物的生长; 同时兰科植物为这些真菌提供了良好的生活空间, 两者息息相关。所以兰科菌根具有重要的生态功能, 在兰科植物的生活史中扮演着重要的角色。

石斛是兰科植物第二大属, 多数品种既是名优花卉又是名贵药材, 是一类重要的植物资源。石斛繁殖能力弱, 生长缓慢, 再加上不合理的采伐和野生生境的破坏等, 导致野生石斛资源严重匮乏, 濒临灭绝。为了保护这一珍稀植物资源, 同时开发利用石斛的药用价值, 云南金陵植物药业股份有限公司开展了石斛组培苗规模化生产和栽培技术的研究。但是石斛组培苗在人工栽培条件下生长缓慢^[6], 尤其是球花石斛生长更慢。考虑到石斛与兰科植物根系的共生性, 我们从野生石斛根系中分离获得菌根真菌, 并进行对石斛组培苗接种的有益尝试, 观察其对石斛组培苗生长的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种分离和菌剂制备

1.1.1 分离标本来源 供分离菌根真菌的石斛

为野生球花石斛 (*Dendrobium thyrsiflorum*), 采自云南金陵植物药业股份有限公司的石斛品种园。

1.1.2 菌种分离方法 根据文献^[7, 8], 确定分离方法如下: 挑取饱满, 表面较光滑、无凹陷的新鲜根, 去除表面附着物质, 用沾有肥皂粉的软毛刷刷洗根面, 流水中冲洗 4 h 后擦干。在无菌室内用 1g/L 升汞溶液消毒根段 8~10 min, 灭菌水冲洗 3~4 次, 再用 750 ml/L 的酒精溶液消毒 30 秒, 灭菌水冲洗 2 次, 把消毒好的根剪成 0.3 cm 左右的小段, 分别垂直放置 PDA 平板上, 每皿 4~5 个根段, 平板置于 20℃ 保温箱中培养, 待长出菌丝后, 挑入 PDA 斜面培养基中培养。

采用以上方法对野生球花石斛根系中的菌根真菌进行分离, 获得的菌种经筛选和归并, 共得到真菌菌种 6 株, 编号为 Dt1、Dt2、Dt5、Dt6、Dt7、Dt8。

1.1.3 接种菌剂的制备 将 Dt1、Dt2、Dt5、Dt6、Dt7、Dt8 号真菌分别接种在 PDA 液体培养基中^[9], 20~28℃ 振荡培养 4~6 天, 得到液体菌剂。

1.2 石斛组培苗接种真菌的试验

1.2.1 供试植物 供试植物由云南金陵药业股份有限公司提供, 分别为炼苗 3 个月以上的铁皮石斛组培苗和未炼苗的球花石斛组培苗两种。根据试验要求, 将这些组培苗大、小搭配, 分成较均匀的若干份, 分别种植在 6.8 cm × 8 cm 的塑料杯中, 铁皮石斛的基质为碎红砖, 球花石斛的基质为锯木屑, 种植 15 天后待用。

1.2.2 试验处理 铁皮石斛接种试验 :试验设不接种 (CK), 接种 Dt1、 Dt2、 Dt5、 Dt6、 Dt7 和 Dt8 共 7 种处理 , 每一处理重复 3 次。

球花石斛接种试验 : 试验设不接种 (CK), 接种 Dt5、 Dt6 和 Dt8 共 4 种处理 , 每一处理重复 3 次。

1.2.3 接种方法和接种量 每一处理分别接入相对应的真菌菌剂 , 接种前先把石斛组培苗根系周围的基质挖开让根系暴露 , 取 10ml 菌液直接浇在根系上 , 再将基质覆盖好 , 对照每杯接入 10ml 水。选择阴天或傍晚接种 , 如覆盖的基质较干 , 可适量喷水。

1.2.4 栽培条件 由于铁皮石斛接种试验在冬季进行 , 因此接种后放入恒温光照室培养 , 白天 26 , 晚上 20 , 接种第 1 天为暗培养 , 以后每天光照 12~14 h , 光照强度为 1500~2000 Lux , 每天适量浇水保持湿润 , 每 10 天浇施兰科营养液 1 次。

球花石斛接种后 , 放入网室大棚自然条件下培养 , 每天适量浇水保持湿润 , 每 10 天浇施兰科营养

液 1 次。

1.2.5 测定 铁皮石斛接种试验 :在接种当天和接种后 20、 40、 90 天分别测定组培苗的株数、株高、叶片数和新芽数 , 并在 90 天时观察记录地上植株和地下根系的生长情况。

球花石斛接种试验 : 在接种当天和接种后 30、 60、 90 天分别测定组培苗的株数、叶片数和新芽数。

2 结果与讨论

2.1 铁皮石斛的接种效果

2.1.1 组培苗株数、株高、叶和芽的比较 表 1 记录了不同处理的铁皮石斛组培苗在接种当天以及接种后 20、 40、 90 天的株数、株高、叶片数和新芽数 , 并且通过计算得到 20、 40 和 90 天各生长指标与接种当天相比的变化量。从表 1 可以看出 : 20 天时 , 对照的石斛苗株数减少 13 % , 而接种真菌的石斛苗 , 除 Dt1、 Dt5、 Dt7 株数没有变化外 , 接种 Dt2、 Dt6、 Dt8 株数增加 11.1%~35.3% , 其中接种 Dt2 增

表 1 铁皮石斛苗的接种效果

Table 1 Effects of inoculation of orchid mycorrhizal fungi on growth of *Dendrobium candidum* seedlings

时间(天)	处理	CK	Dt1	Dt2	Dt5	Dt6	Dt7	Dt8
0	株数	2.3	3.7	1.7	2.0	2.0	2.3	2.7
	株高 (cm)	2.34	1.50	2.35	2.68	2.67	1.90	2.74
	叶数	6.0	12.0	5.7	8.0	6.7	6.7	9.7
	芽	0	0	0	0	0	0	0
20	株数	数量	2.0	3.7	2.3	2.0	2.3	3.0
		增加 (%)	-13.0	0	35.3	0	15.0	11.1
	株高	高度 (cm)	2.38	1.56	2.48	2.92	2.78	2.88
		增加 (%)	1.7	4.0	5.5	9.0	4.1	5.1
	叶数	数量	4.7	11.0	5.3	6.7	6.3	8.7
		增加 (%)	-21.7	-8.3	-7.0	-16.2	-6.0	-10.3
	芽	数量	0	0.3	0.7	0	0.3	0.3
	株数	数量	2.3	3.3	1.7	2.0	2.3	1.7
40		增加 (%)	0	-10.8	0	0	15.0	-26.1
	株高	高度(cm)	2.50	1.65	2.38	2.95	2.77	2.13
		增加 (%)	6.8	10.0	1.3	10.1	3.7	12.1
	叶数	数量	4.0	10.0	4.7	6.0	6.7	3.3
		增加 (%)	-33.3	-16.7	-17.5	-25.0	0	-50.7
	芽	数量	0.7	0	0.3	0	0	0
	株数	数量	1.7	4.3	1.7	1.7	3.3	0.7
		增加 (%)	-26.1	16.2	0	-15.0	65.0	-69.6
90	株高	高度(cm)	2.48	1.69	2.10	3.33	2.83	/
		增加 (%)	6.0	12.7	2.1	24.3	6.0	/
	叶数	数量	3.3	9.7	3.7	5.3	5.0	0.7
		增加 (%)	-45.0	-19.2	-35.1	-33.7	-25.4	-89.6
	芽	数量	0.7	1.0	0.7	0.7	1.7	0
	株数	数量	1.7	4.3	1.7	1.7	3.3	0.7
		增加 (%)	-26.1	16.2	0	-15.0	65.0	-69.6
	株高	高度(cm)	2.48	1.69	2.10	3.33	2.83	/

加的最多;40 天时,对照和接 Dt2、Dt5 的株数相比变化很小,接种 Dt1、Dt7 的株数减少 10%~26%,而接种 Dt6、Dt8 的株数增加 15%~22%;接菌 90 天时,株数增加最明显的仍为接种 Dt6 和 Dt8 的石斛苗,增加 48%~65%,而对照减少 26.1%。从株数的变化来看,铁皮石斛接种 Dt6 和 Dt8 效果最明显。

从表 1 中株高的变化来看,接种 20 天时株高增加较明显的是接种 Dt5 和 Dt7,增加 9 %左右,对照仅增加 1.7%;40 天时,株高增加较明显的是 Dt1、Dt5、Dt7、Dt8,增加 9.1%~12.1%,对照增加 6.8%;接菌 90 天时,株高增加最多的是接种 Dt5 的石斛苗,增加 24.3%,其次是 Dt1 和 Dt8,分别增加 12.7%和 10.6%,而对照增加 6.0%。

铁皮石斛接种试验是从 11 月中旬开始,虽然放置于白天 26 、晚上 20 的恒温光照室内培养,但由于已进入冬季,石斛苗存在落叶现象。20 天时石斛苗就开始落叶,逐步加剧,到 90 天时落叶情况比较严重,其中落叶最多的是接种 Dt7 的处理,90 天时的叶数与试验开始时相比减少 89.6%;落叶最少的是接种 Dt8 的处理,减少 10.3%;对照减少 45%。

对于芽数,增加最多的是接种 Dt6、Dt8 和 Dt1,而接种 Dt7 最差,无新芽生长。

2.1.2 铁皮石斛地上、地下生长状况的比较 石斛接种 90 天时,我们还对石斛苗地上植株和地下根系的生长状况分 3 级进行比较,1 级生长最差,2 级生长中等,3 级生长最好,分级标准如表 2 所示。每个处理的 3 杯苗按以上标准进行分级,根据分级结果之和绘制成图 1。

表 2 铁皮石斛苗生长状况分级表

Table 2 Classification of the growth of *Dendrobium candidum* seedlings

地上植株	地下根系
1 级 落叶明显,叶少,鳞茎生长正常	部分根系空瘪,无新根
2 级 落叶较少,叶色绿,鳞茎有膨大	老根生长正常,有少量新根
3 级 生长茂盛,叶色绿,鳞茎明显膨大	根系生长良好,新根多

从图 1 可以看出,石斛接种 Dt8、Dt6 和 Dt5,90 天时地上植株和地下根系生长状况都明显好于对照和接种其他真菌,接种 Dt7 的石斛苗地上、地下部分生长状况比对照和接种其他真菌差。

以上的结果表明,铁皮石斛接种不同的真菌后,植株生长情况存在较大的差异,其中接种 Dt5、Dt6、Dt8 能明显促进石斛的生长,地上植株和地下根系生长均良好,株数增多、株高增加、落叶减少,新芽萌发。

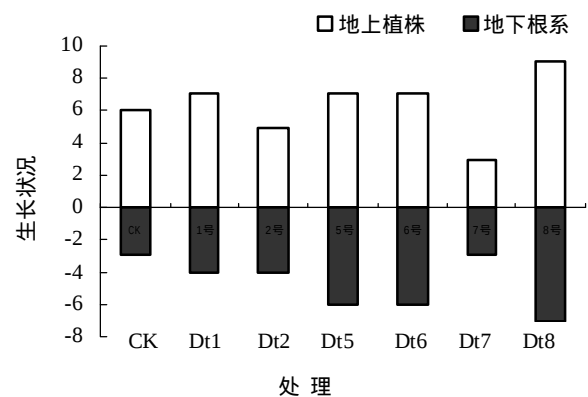


图 1 铁皮石斛接种真菌后地上和地下部分的生长状况(90 天)

Fig. 1 Growth of *Dendrobium candidum* seedlings at 90 days after inoculation

2.2 球花石斛的接种效果

球花石斛接种试验,各处理的石斛组培苗在接种当天和接种 20、60、90 天时的株数、叶数和芽数(球花石斛的株高不易测量)如表 3 所示,与表 1 相同,表 3 也列出了各生长指标与接种当天相比的变化量。30 天时,只有接种 Dt8 真菌的株数略高于对照,接种 Dt5、Dt6 的株数都低于对照;60 天时,

表 3 球花石斛的接种效果

Table 3 Effects of inoculation of orchid mycorrhizal fungi on growth of *Dendrobium thyrsiflorum* seedlings

时间(天)	处理	对照	Dt5	Dt6	Dt8
0	株数	6.0	6.3	5.7	5.3
	株高(cm)	12.7	15.3	11.3	12.0
	叶数	0.3	0	0	1.0
30	株数 数量	7.0	6.7	6.0	6.3
	增加(%)	16.7	6.3	5.3	18.9
	叶数 数量	14.3	15.7	12.0	14.0
	增加(%)	12.6	2.6	6.2	16.7
	芽 数量	0.3	1.7	0.3	0.3
	株数 数量	8.0	9.3	7.0	8.7
60	增加(%)	33.3	47.6	22.8	64.2
	叶数 数量	17.7	19.3	14.7	15.3
	增加(%)	39.4	26.1	30.1	27.5
	芽 数量	0	1.3	0.3	0.7
	株数 数量	8.3	10.3	8.0	9.3
	增加(%)	38.3	63.5	40.4	75.5
90	叶数 数量	16.7	23.0	15.3	19.3
	增加(%)	31.5	50.3	35.4	60.8
	芽 数量	0.3	1.3	0.3	0.7

除接种 Dt6 的低于对照外,接种 Dt5 和 Dt8 的石斛苗株数的增加都高于对照,分别为 47.6 %和 64.2 %;90 天时,接种 Dt8 和 Dt5 株数的增加明显高于对照,分别为 63.5 %和 75.5 %,Dt6 略高于对照为 40.4 %,

而对照仅为 38.3 %。从表 3 中叶数的变化来看, 球花石斛接菌 30 天时, 只有接种 Dt8 的石斛苗叶数的增加高于对照; 60 天时, 接种真菌的石斛苗叶数的增加都低于对照; 但 90 天时, 3 种接菌处理的苗叶数的增加都超过对照, 其中 Dt8 增加的最多, 为 60.8 %, Dt5 其次为 50.3 %, Dt6 为 35.4 %, 对照为 31.5 %。此外, 接种 Dt5 和 Dt8 真菌的石斛苗新芽萌发也多于对照。

3 小 结

通过以上两组石斛组培苗的接种试验可以发现, 在石斛组培苗上接种某些兰科菌根真菌能够在一定程度上促进石斛组培苗的生长, 就目前的结果而言对铁皮石斛和球花石斛接菌效果最好的真菌为 Dt5 和 Dt8。

本试验也存在一些问题, 在今后的工作中有待进一步改进和提高: 试验采用的组培苗由云南空运过来, 数量有限, 质量差异较大。组培苗本身的质量会影响接菌的效果, 导致试验结果的差异较大, 重复性较低, 不利于结果的判断, 需要增加重复的数量以克服试验用苗本身的差异。组培苗弱小娇嫩, 对于它的栽培和管理存在相当的难度, 气候、温度、湿度、病虫害等都会影响苗的生长, 栽培设施的改良和程序化将有助于试验结果的稳定性和可靠性。由于石斛组培苗生长缓慢, 栽种后如何评价其生长状况和质量, 目前还欠缺较好的指标, 测量手段落后, 对于现有表观指标的测定存在较大的人为差异。这些问题的解决将大大提高接种试验的

可重复性和稳定性, 更易于优良兰科菌根真菌的筛选, 促进石斛的生长。

参考文献

- 1 Richardson KA, Peterson RL, Currah RS. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae). *Can. J. Bot.*, 1992, 70 (2): 291 ~ 230
- 2 Song YC, Li XL, Christie P. Uptake of organic phosphorus by arbuscular mycorrhizal red clover. *Pedosphere*, 2002, 12 (2): 103 ~ 110
- 3 葛均青, 于贤昌, 王竹红. VAM 对植物矿质营养的效应. *土壤*, 2002, 34 (6): 337 ~ 343
- 4 郭秀珍, 毕国昌. 林木菌根及应用技术. 北京: 中国林业出版社, 1989
- 5 Beyrle H, Penningsfeld F, Hock B. The role of nitrogen concentration in determining the outcome of the interaction between *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó *Rhizoctonia* sp.. *New phytol.*, 1991, 117(4): 665 ~ 672
- 6 郭顺星, 徐锦堂. 真菌在罗河石斛和铁皮石斛种子萌发中的作用. *中国医学科学院学报*, 1991, 13(1): 46 ~ 49
- 7 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 ~ 340
- 8 范黎, 郭顺星, 曹文琴, 肖培根, 徐锦堂. 墨兰共生真菌一新种的分离、培养、鉴定及其生物活性. *真菌学报*, 1996, 15 (4): 251 ~ 255
- 9 弓明钦. 菌根研究及应用. 北京: 中国林业出版社, 1997

EFFECT OF INOCULATION OF ORCHID MYCORRHIZAL FUNGI ON GROWTH OF TISSUE-CULTURED *DENDROBIUM* SEEDLINGS

CHEN Rui-rui¹ SHI Ya-qin¹ LIN Xian-gui¹ ZHANG Ning² TANG Wei-guo²

(1 Institute of Soil Sciences, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008;

2 Yunnan Jinling Phyto-Medicine Co. Ltd., Simao, Yunnan 665000)

Abstract From the roots of wild *Dendrobium thyrsiflorum*, six strains of orchid mycorrhizal fungi (Dt1, Dt2, Dt5, Dt6, Dt7, and Dt8) were obtained and inoculated onto the roots of tissue-cultured *Dendrobium thyrsiflorum* and *Dendrobium candidum* seedlings. The growth of the seedlings inoculated with fungi was compared with that of those not inoculated. The results showed that inoculation improved growth of tissue-cultured *Dendrobium* seedlings and increased the number of buds and roots. And the effects of fungi Dt5 and Dt8 were better than that of the other fungi. It is of a potential value, that these two fungi are applied to *Dendrobium* cultivation.

Key words *Dendrobium*, Orchid mycorrhizal fungi, Tissue-cultured seedlings, Inoculation