

# 兰科石斛属植物菌根真菌研究进展

王亚妮, 王丽琨, 苗宗保, 刘红霞\*

(北京林业大学森林保育重点实验室, 北京 100083)

**摘要:** 石斛属(*Dendrobium*)隶属于兰科(Orchidaceae)树兰亚科(Epidendroideae)石斛兰族(Dendrobiinae),是兰科最大的属之一,终生附生于树上或岩石上。石斛属很多种类具有很高的药用价值与观赏价值。由于人为过度采挖和野生生境的破坏,使得野生石斛资源濒临灭绝。石斛属植物为典型的兰科菌根植物,在自然条件下需要与真菌共生,才能完成生活史。菌根真菌对于石斛属植物的种子萌发和植株生长具有重要的作用。对石斛属植物菌根的形成、菌根真菌的作用、菌根真菌多样性及菌根技术在石斛属植物中的应用做了评述,并对今后的研究内容和重点提出了一些思路。

**关键词:** 石斛; 菌根真菌; 多样性; 应用

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.03.015

## Research Advances in Mycorrhizal Fungi of *Dendrobium* (Orchidaceae)

WANG Ya-ni, WANG Li-kun, MIAO Zong-bao, LIU Hong-xia\*

(Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** *Dendrobium*, epiphytically growing on tree or rock, is one of the largest genus in orchid family, belonging to Dendrobiinae of Epidendroideae. Most of species in this genus have high medicinal and ornamental values. However, the wild species of *Dendrobium* has been threatened because of over-collection and habitat deterioration in recent years. *Dendrobium* is one of typical orchid mycorrhizal plants, it needs symbiosis with mycorrhizal fungi to complete its life cycle under natural conditions. Mycorrhizal fungus have important roles in *Dendrobium* seed germination and plant growth. the conformation of *Dendrobium* mycorrhizae, effects and diversity of mycorrhizal fungi in *Dendrobium* were reviewed, as well as the mycorrhizal technology utilization in *Dendrobium*. In addition, some ideas based on the current researches are proposed for future studies.

**Key words:** *Dendrobium*; Mycorrhizal fungi; Diversity; Application

石斛属(*Dendrobium*)植物是世界上最大的附生兰类群,多附生于树上或岩石上,生长缓慢,自身繁殖力低<sup>[1]</sup>。全球约有该属原生种 1500 种<sup>[2]</sup>,以热带东南亚为中心向亚热带性气候条件发展<sup>[3]</sup>,主要分布于北纬 15° 31' 至南纬 25° 21' 之间的亚洲热带、亚热带地区及大洋洲。中国共有原生种 81 种(含变种),仅占世界种类的 5% 左右,但很多种是

世界著名的药用植物和观赏花卉<sup>[3]</sup>,如铁皮石斛(*D. officinale*)和金钗石斛(*D. nobile*),均为石斛兰杂交育种的重要亲本植物,其茎段加工品“枫斗”被列为上等药材,每年出口量在  $1.0 \times 10^6$  kg 以上<sup>[4]</sup>。巨大的经济价值和市场需求,加之生长繁殖力低,致使野生资源被大肆采挖,濒临灭绝<sup>[3]</sup>。虽然组织培养技术实现了少数石斛种类的大量繁殖,但组培苗移

收稿日期: 2012-11-26

接受日期: 2013-03-06

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAC01B05-3)资助

作者简介: 王亚妮(1986~),硕士研究生,研究方向为兰科植物菌根真菌研究及应用。E-mail: abengdan@gmail.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hongxia@bjfu.edu.cn

栽成活率低、药用成分含量低、人工培养成本高<sup>[5]</sup>。与其他兰科植物一样,自然条件下石斛属植物需与菌根真菌共生才能完成生活史<sup>[6]</sup>。因此,深入研究石斛属植物与菌根真菌的关系,筛选出优良菌剂,将其用于石斛的栽培中,不仅有望提高人工栽培石斛的品质、缩短生长周期、降低生产成本,还能恢复野外种群数量,有效保育野生濒危石斛属植物资源<sup>[5]</sup>。目前,关于石斛属植物菌根真菌的分离鉴定和菌根化育苗的研究已有报道。本文从石斛属植物菌根的形成、菌根真菌的作用和多样性及在石斛属植物栽培保育中的应用等方面介绍石斛属植物菌根真菌的研究进展,以期为该领域的深入研究提供参考。

## 1 石斛属植物菌根的形成及作用

自然条件下,菌根真菌侵染石斛属植物的种子或成长新根形成石斛菌根。种子吸水膨胀后真菌随机侵入种胚并在一定范围内形成菌丝团,此时种子开始萌发。随着种子的萌发,胚细胞水解酶将菌丝细胞壁降解,露出原生质体被进一步分解吸收<sup>[7]</sup>。成年石斛附生于岩石表面或树干上,根多暴露于空气中,保护层和储水层发达,根被木质化程度高,真菌通过外皮层通道细胞进入皮层,并穿透细胞壁在周围细胞中定殖扩散,直达中柱层<sup>[8]</sup>。随着菌丝的入侵,寄主细胞新陈代谢异常旺盛,细胞核膨大,信使 RNA 大量积累,指导合成多种代谢酶以溶解菌丝并吸收养分和水分。这时,新的菌丝不断入侵,同一细胞可被多次侵染<sup>[9]</sup>,营养物质源源输入,保证了石斛属植物的生长繁殖。

菌根真菌对石斛属植物的作用表现在多方面。首先,菌根真菌能够促进石斛属植物的种子萌发和幼苗生长。郭顺星等<sup>[7]</sup>利用叶片伴菌播种方法,使铁皮石斛和罗河石斛(*D. lohohense*)的种子萌发率分别提高了 64% 和 20%。吴慧凤等<sup>[5]</sup>报道在室内燕麦培养基上菌株 C20 和 L12 对铁皮石斛原球茎的发育和幼苗的生长有明显促进作用。周玉杰等<sup>[10]</sup>对华石斛(*D. sinense*)幼苗接种菌根真菌,显示真菌能不同程度地提高华石斛的幼苗成活率、生物量,促进幼苗根系生长,并能提高幼苗叶绿素含量、净光合速率和气孔导度,进而提高幼苗的光合性能。金辉等<sup>[9]</sup>对铁皮石斛组培苗人工接种 *Epulorhiza* sp. GDB181 菌株,培养 60 d 后接种苗平均鲜重增长率

比对照苗高出 84.8%, B、Si、Fe、Cu 和 Mn 等营养元素含量的净增长率均在 100% 以上。其次,菌根真菌能够提高石斛属植物抗旱、抗盐和抗病的能力。有研究表明<sup>[11]</sup>,当基质中水分含量低时,石斛菌根的结构明显增多,菌丝团在细胞中的定殖时间也随之加长,大大增强了石斛的抗旱性。随着 NaCl 浓度升高,接菌铁皮石斛的萎蔫系数、丙二醛含量均高于不接菌的,对致病菌 TS1 镰刀菌(*Fusarium* sp.)、TS2 镰刀菌(*Fusarium* sp.)和 *Trichoderma* sp. TS3 的抑制作用与对照苗相比达到显著性差异<sup>[12]</sup>。这可能是因为兰科植物受真菌侵染后能主动释放白杨素(chrysin)等抗毒素类物质<sup>[13]</sup>,从而阻止了病原菌入侵,保证了植物和种子良好的生长环境。此外,菌根真菌还能影响成年石斛的开花指数和代谢产物积累量。成年春石斛(*D. loddigesii*)用一定浓度的菌剂处理后,平均花朵数高出对照 49.91%,始花期提早,春节期间开花率平缓,便于节前销售和观赏<sup>[14]</sup>。陈晓梅<sup>[15]</sup>等研究了离体培养 4 株菌根真菌对金钗石斛化学成分含量的影响,认为菌株 MF15、18、23、24 可使金钗石斛的多糖含量分别提高 153.4%、52.1%、18.6%、76.7%, MF23 可使总生物碱含量提高 18.3%。菌根真菌促进石斛生长的作用机理可能是:菌根真菌与兰科植物共生时能主动分泌赤霉素(GA<sub>3</sub>)、吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、玉米素(Z)、玉米素核苷(ZR)<sup>[15]</sup>、维生素 B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>、叶酸<sup>[16]</sup>和乙烯<sup>[17]</sup>等多种植物激素和生长调节类物质,从而打破细胞休眠,刺激细胞分裂分化,促进石斛属植物的种子萌发和植株生长,尤其是地下根系的膨大<sup>[18]</sup>,加速养分和水分的吸收,促进了新菌根的形成,保证了植株地上部分的全面生长<sup>[9]</sup>。

## 2 石斛属植物菌根真菌的多样性研究

### 2.1 菌根真菌的分离方法

菌根真菌一般定殖于兰科植物根的外皮层细胞内,并形成典型的菌丝团结构,目前菌根真菌的分离方法均围绕这一特点进行设计。现有的兰科菌根真菌分离方法可归为 3 类:组织块表面消毒分离法(以下简称组织分离法)、单菌丝团分离法<sup>[23-24]</sup>和 DNA 提取分离法<sup>[25-26]</sup>。组织分离法<sup>[19-20]</sup>是将洁净的兰科植物组织块在消毒剂中浸泡以杀死表生杂菌,然后用无菌水洗去消毒剂,切片培养,得到内生真菌。该方法操作简便,不需要复杂的仪器和设

备,运用广泛,但不足之处是得到的杂菌多,真正的菌根真菌因生长速度慢而分离率低,同时消毒剂对菌丝团活力也有一定的抑制性<sup>[21]</sup>。单菌丝团分离法最早由 Warcup 等<sup>[22]</sup>于 1967 年建立并推广,相比组织分离法,分离准确性大大提高。具体操作步骤<sup>[21]</sup>为:将兰花根段用无菌水反复清洗除去表生杂菌,在显微镜下用无菌针释放菌丝团,然后将菌丝团单独培养获得菌根真菌。该方法不使用任何消毒剂,能将菌丝团充分释放出来单独培养,不仅成功避免了杂菌干扰的问题,准确性高,还省去了后续繁杂的筛选工作,被认为是更适合兰科菌根真菌的分离方法,但缺点是部分菌根真菌还无法实现纯培养<sup>[21]</sup>。DNA 提取分离法被认为是目前最精确的兰科菌根真菌的分离方法,由 Taylor 等<sup>[23]</sup>提出, Kristiansenetal 等<sup>[24]</sup>在其基础上进行了改进。具体操作步骤是:先按单菌丝团分离法获得兰科植物菌根中的单菌丝团后,直接提取单菌丝团的 DNA 进行 PCR,从而获得菌根真菌的分子信息。该方法在单菌丝团分离法准确性高的基础上,绕过了真菌的培养环节,获得了不可培养和可培养的所有菌根真菌信息,而且对样品的要求降低,即不只局限于新鲜根段,干燥保存的也同样适合<sup>[24]</sup>。但缺点是得不到实际菌株,因此无法在生产中实际应用<sup>[25]</sup>。

目前,石斛属植物菌根真菌的分离方法仅见组织分离法。有关学者<sup>[19,26]</sup>指出,虽然菌丝团分离法更适合于菌根真菌的分离,但由于附生兰根部缺乏大量菌丝团,单菌丝团分离法的效果差,这可能是后两种方法未在石斛属植物菌根真菌研究中运用的原因之一。

## 2.2 菌根真菌的种类

由于组织分离法得到的真菌包含很多内生菌,无法确定是否为菌根真菌,因此还需进一步回接验证,从而确定石斛的有效共生菌。Warcup<sup>[27]</sup>认为要确定真菌是否为兰科植物的菌根真菌,应具备两个条件:第一,该菌必须是从兰科植物细胞中分离得到,第二,将该菌回接于兰科植物两者能够共生。Liu 等<sup>[28]</sup>认为兰科植物菌根真菌至少应满足以下条件之一:一是能促进种子萌发;二是能促进原球茎发育和幼苗分化;三是能有利于成年植株的营养生长和生殖生长。因此,综合以上原则,根据资料报道,石斛属植物的菌根真菌共有 69 种,其中已明确分类地位的有 58 种,隶属于子囊菌门(Ascomycota)

和担子菌门(Basidiomycota)的 5 纲 17 目 28 科 49 属,其中子囊菌门以粪壳菌纲(Sordariomycetes)和座囊菌纲(Dothideomycetes)为主,担子菌门以伞菌纲(Agaricomycetes)的鸡油菌目(Cantharellales)和伞菌目(Agaricales)为主(表 1)。

## 2.3 菌根真菌的专一性

兰科植物菌根真菌的专一性是指能够与特定兰花种类形成共生关系的真菌系统发育群丛<sup>[25]</sup>。专一性是共生体系重要的生态及进化属性,兰科植物菌根真菌的专一性对于定向筛选促种子萌发和促进幼苗生长的菌株具有重要的指导作用。研究表明,菌根真菌的专一性程度与兰科植物的营养模式密切相关,无叶绿素的兰花需要依赖多种真菌为其提供全部的养分和水分从而显示出高的专一性,而光合自养型兰花只需真菌为其提供某些自身无法合成的特殊物质从而显示出较低的专一性<sup>[42]</sup>。

石斛属植物种子萌发阶段以菌根异养型营养模式为主,叶片长出后营养模式以光合自养型为主,不同阶段的菌根真菌专一性关系随之变化。吴慧凤等<sup>[5]</sup>将分离自成年铁皮石斛的真菌 C20 和梅花石斛的 L12、L24b、L28 与铁皮石斛种子进行共生萌发,结果表明, L24b 和 L28 能显著促进铁皮石斛的种子萌发但不形成幼苗,而 C20 和 L12 对原球茎的发育和幼苗生长具有明显的促进作用但并不能显著提高种子萌发率。郭顺星等<sup>[33]</sup>对我国云南、四川等地的野生铁皮石斛和石斛菌根真菌分离并进行回接,结果表明,对铁皮石斛种子萌发有促进作用的 5 种菌根真菌对两种石斛的幼苗促进作用不同。Chen 等<sup>[26]</sup>将种子萌发期的菌根真菌与成年植株的菌根真菌进行比较,石斛种子萌发和成年植株根内的菌根真菌分别为 Tulasnellales 和 Sebaciniales,石斛和束花石斛(*D. chrysanthum*)种子萌发阶段的菌根真菌均为 Sebaciniales。此外,亢志华等<sup>[34]</sup>用分离自野生蕙兰(*Cymbidium faberi*)、墨兰(*C. sinensis*)和春兰(*C. goeringii*)的菌根真菌接种铁皮石斛组培苗,证实 3 株菌均能与铁皮石斛形成菌根结构,且对寄主的生长有明显的促进作用。由此可以看出,石斛属植物与其菌根真菌在科、属、种的水平上专一性较低,但不同的生长阶段与哪种真菌共生,却有明显的倾向,种子萌发阶段专一性较成年期的专一性低。

表 1 石斛属植物菌根真菌的种类及作用

Table 1 Mycorrhizal fungi and their effects on *Dendrobium*

真菌 Fungus	作用 Effect					石斛 <i>Dendrobium</i>	真菌 Fungus	作用 Effect					石斛 <i>Dendrobium</i>
	SG	PG	SDLG	VG	MC			SG	PG	SDLG	VG	MC	
<i>Acremonium alternatum</i>			+	+		Dc <sup>[29]</sup>	<i>Melanconium elaeidis</i>				+	Dn <sup>[32]</sup>	
<i>Acremonium</i> sp.					+	Dd <sup>[30]</sup> , Dhu <sup>[31]</sup>	<i>Microascus</i> sp.	+				Dc, Dlh <sup>[7]</sup> , Dh <sup>[10]</sup>	
<i>Alternaria</i> sp.	+		+			Dc <sup>[5]</sup> , Dn <sup>[32]</sup>	<i>Mycena anoectochila</i>	+	+			Ddn, Dp, Db, Dco <sup>[28]</sup> , Dc <sup>[38]</sup>	
<i>Apiospora</i> sp.	+					Dca <sup>[26]</sup>	<i>M. dendrobii</i>	+	+	+		Ddn, Db <sup>[28]</sup> , Dc, Dn <sup>[38]</sup>	
<i>Arthrinium euphorbiae</i>	+					Dn <sup>[26]</sup>	<i>M. orchidicola</i>	+	+			Db, Dco, Ddn, Dp <sup>[28]</sup> , Dc <sup>[38]</sup>	
<i>Cephalosporium atrum</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>M. osmundieola</i>	+			+	Dn, Dlh <sup>[7]</sup> , Dh <sup>[10]</sup> , Dn <sup>[15]</sup>	
<i>Cephalosporium</i> sp.	+		+			Db <sup>[28]</sup> , Dn <sup>[33]</sup>	<i>Mycena</i> sp.				+	Dc <sup>[18]</sup>	
<i>Ceratorhiza</i> sp.			+			Dc <sup>[34]</sup>	<i>Mycleptodiscus</i> sp.	+				Dn <sup>[26]</sup>	
<i>Cercophora</i> sp.			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Mycosphaerella</i> sp.			+	+	Dc <sup>[29]</sup>	
<i>Chaetomium globosum</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Oidium bixae</i>			+		Dn <sup>[32]</sup>	
<i>Chaetomium</i> sp.	+		+	+		Dc, Dlh <sup>[7]</sup> , Dh <sup>[10]</sup> , Dd <sup>[30]</sup> , Dl <sup>[35]</sup>	<i>O. longipes</i>			+		Dn <sup>[32]</sup>	
<i>Chaetophoma</i> sp.				+		Dl <sup>[35]</sup>	<i>Penicillium funiculosum</i>	+				Dca <sup>[26]</sup>	
<i>Chloridium virescens</i> var. <i>chlamydosporum</i>	+					Dca <sup>[26]</sup>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+		+	+	Dn, Dca <sup>[26]</sup> , Dm <sup>[39]</sup> , Dl <sup>[35]</sup>	
<i>C. arthoniae</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Phaeosphaeria</i> sp.			+	+	Dc <sup>[37]</sup>	
<i>C. cladosporioides</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Phoma</i> sp.			+	+	Dn <sup>[32]</sup> , Dl <sup>[14]</sup>	
<i>Cladosporium</i> sp.				+		Dl <sup>[35]</sup>	<i>Phomopsis</i> sp.			+		Dn <sup>[32]</sup>	
<i>Colletotrichum caudatum</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Pochonia bulbillosa</i>	+				Dca <sup>[26]</sup>	
<i>C. gloeosporioides</i>	+					Dca, Dn <sup>[26]</sup>	<i>Pseudocercospora schizolobii</i>			+	+	Dn <sup>[29]</sup>	
<i>Cylindrosporium</i> sp.			+			Dhu <sup>[31]</sup>	<i>Pseudocercospora</i> sp.				+	Dnt <sup>[14]</sup>	
<i>Didymaria centaureae</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Pyrenochaeta</i> sp.				+	Dl <sup>[29]</sup>	
<i>Epicoccum nigrum</i>	+		+			Dn <sup>[26,32]</sup> , Dca <sup>[32]</sup>	<i>Ramularia actinidiae</i>			+		Dn <sup>[32]</sup>	
<i>Epulorhiza albertaensis</i>	+					Db, Dco <sup>[28]</sup>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	+			+	Dc <sup>[33]</sup> , Dl <sup>[35]</sup> , Dn <sup>[26]</sup> , Dd <sup>[30]</sup>	
<i>E. anaticula</i>	+					Dp <sup>[28]</sup>	<i>Sebacina</i> sp.	+				Dn, Dc <sup>[40]</sup>	
<i>Epulorhiza</i> sp.	+	+	+		+	Db, Dco, Ds <sup>[28]</sup> , Dn <sup>[15,26]</sup> , Dc <sup>[9,13,33]</sup> , Dl <sup>[36]</sup>	<i>Sebacina vermifera</i>		+	+		Dm <sup>[39]</sup>	
<i>Eurotium repens</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Stachyldium cubense</i>				+	Dn <sup>[32]</sup>	
<i>Evlachovaea</i> sp.	+					Dca <sup>[26]</sup>	<i>S. sceptrum</i>				+	Dn <sup>[32]</sup>	
<i>Fusarium oxysporum</i>	+					Dca <sup>[26]</sup>	<i>Trichoderma</i> sp.	+				Dn, Dca <sup>[26]</sup>	
<i>F. proliferatum</i>	+		+		+	Dca <sup>[26]</sup> , Dc <sup>[37]</sup>	<i>Tulasnella calospora</i>			+		Dm <sup>[39]</sup>	
<i>Fusarium</i> sp.			+	+	+	Ddn <sup>[16]</sup> , Dc <sup>[33,34]</sup> , Dl <sup>[29]</sup> , Dd <sup>[33]</sup> , Dm <sup>[10]</sup>	<i>T. irregularis</i>					Ddi <sup>[41]</sup>	
<i>Gliocladium</i> sp.	+		+			Db <sup>[28]</sup> , Dc <sup>[33]</sup>	<i>Tulasnella</i> sp.		+	+	+	Dm <sup>[39]</sup> , Dc <sup>[37]</sup>	
<i>Glomerella truncata</i>	+					Dca <sup>[26]</sup>	<i>Verticillium leptobactrum</i>	+				Dca <sup>[26]</sup>	
<i>Gonatobotryum</i> sp.			+	+		Dl <sup>[35]</sup>	<i>Verticillium</i> sp.	+				Dn <sup>[26]</sup>	
<i>Haplotrichum croceum</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Xylaria</i> sp.			+	+	Dc <sup>[29,37]</sup>	
<i>Humicola grisea</i>			+			Dn <sup>[32]</sup>	<i>Zopfiella</i> sp.			+		Dn <sup>[32]</sup>	
<i>Leptodontidium</i> sp.			+			Dn <sup>[7]</sup>							

SG: 种子萌发; PG: 原球茎生长; SDLG: 幼苗生长; VG: 移栽生长; MC: 次生代谢产物含量; +: 有促进作用; Db: 长苏石斛; Dc: 铁皮石斛; Dca: 束花石斛; Dco: 鼓槌石斛; Dd: 齿瓣石斛; Ddn: 密花石斛; Ddi: *Dendrobium dicuphum*; Dh: 细叶石斛; Dhu: 霍山石斛; Dl: 美花石斛; Dlh: 罗河石斛; Dm: 细茎石斛; Dn: 石斛; Dp: 报春石斛; Ds: 华石斛。

SG: Seed germination; PG: Protocorms growth; SDLG: Seedling growth; VG: Transplant growth; MC: Metabolism content; +: Positive effect; Db: *Dendrobium brymerianum*; Dc: *D. officinale*; Dca: *D. chrysanthum*; Dco: *D. chrysotoxum*; Dd: *D. devonianum*; Ddn: *D. densiflorum*; Ddi: *D. dicuphum*; Dh: *D. hancockii*; Dhu: *D. huoshanense*; Dl: *D. loddigesii*; Dlh: *D. lohohense*; Dm: *D. moniliforme*; Dn: *D. nobile*; Dp: *D. primulinum*; Ds: *D. sinense*.

## 3 菌根技术在石斛属植物中的应用

### 3.1 兰科植物种子原地共生萌发技术

兰科植物种子原地共生萌发技术是指在兰科植物生长季将兰花种子装于特制的袋子中并埋入原生境,定期回收检测种子萌发情况,从而获得菌根真菌的技术<sup>[43]</sup>。该技术直接从原生境诱捕菌根真菌,避免了从成年植物根部分离的真菌不能有效促进种子萌发的问题,便于获得自然条件下种子萌发的生态学数据,实现了菌根真菌大规模、多样点、微水平研究的需求,使得筛选工作更加简单高效,是一项收集菌根真菌、研究互作机制、进行多样性保育的有效技术。该技术在石斛属植物的菌根真菌研究中具有很大的潜力,Chen等<sup>[26]</sup>首次将此技术用于石斛属植物菌根真菌的研究,并从原地萌发的金钗石斛和束花石斛原球茎中分离得到大量共生菌,经鉴定其中11株菌根真菌均属于丝核菌类真菌。Wang等<sup>[40]</sup>研究了铁皮石斛和石斛种子的原地萌发,认为埋藏种子袋的腐殖质及兰花根系对石斛属植物原地萌发至关重要,因此选择合适的微环境埋放种子袋并定期回收,可能有助于提高种子袋回收率和幼苗成活率。这为今后石斛属植物种子原地萌发的应用提供了一定的技术支持。

### 3.2 菌根化育苗及再引入技术

随着20世纪30年代全球生态环境急剧恶化,荒漠化程度加重,许多国家开始大规模引种造林,菌根化育苗技术应运而生。根据植物的生长阶段,现有兰花菌根化育苗技术可分为播种菌根化育苗、瓶内菌根化育苗和移栽菌根化育苗3种<sup>[44]</sup>,这些育苗技术在石斛属植物栽培和保育中均有报道。菌根化育苗不仅可以增强苗木抗逆性,提高苗木成活率,促进植物更好地生长,还能间接减少育苗成本<sup>[44]</sup>。兰科植物由于人为大规模采集,野生资源极度濒危,尤其是一些观赏、药用价值高的种类,野外几乎难寻踪迹。菌根真菌不仅能提高兰科植物种子萌发率,菌根化的兰科植物野外移栽所建立的种群要比直接播种或组培苗移栽的种群更具优越性<sup>[45]</sup>。因此,利用菌根化育苗技术获得优质兰苗再引入原生境,有望能更好地实现兰科植物规模化栽培和野生保育。周玉杰<sup>[10]</sup>比较了华石斛(*D. sinense*)组培苗瓶内菌根化和移栽菌根化的效果,认为两种方式均能显著提高石斛组培苗移栽成活率和鲜重

增长,但瓶内条件可控性强,获得的石斛品质高,更有利于移栽后的生长。陈瑞蕊等<sup>[46]</sup>对杯鞘石斛(*D. gratosissimum*)进行移栽菌根化处理,药用成分含量显著提高。可见,瓶内菌根化和移栽菌根化育苗具有良好的商业应用潜力。兰科植物菌根化育苗为濒危物种的再引入提供了强大的技术保障。研究表明,影响兰科植物再引入的因素主要有原生境的选择、兰科植物种类和覆盖物<sup>[47]</sup>,而原生境光照、温度和水分是决定铁皮石斛再引入成功与否的关键因素<sup>[12]</sup>。明确再引入石斛属植物的菌根真菌种类,通过菌根化育苗获得优质种苗,了解其野外生物学特性和生态学需求,选择合适的再引入生境,获得可大面积使用的菌剂,从而保证再引入的石斛属植物在原生境中能迅速定殖繁衍,建立优势的种群结构<sup>[29]</sup>,是进行野生石斛资源保育的重要途径。

### 3.3 菌根菌剂

菌根菌剂是将菌根真菌的繁殖体(如孢子、菌丝)经过人工繁殖,加工配制形成具有一定形状和特性的商业产品<sup>[48]</sup>。但目前兰科菌根菌剂尚无成型的商品销售<sup>[49]</sup>。目前对于石斛属菌根真菌的应用主要是盆栽和小面积田间试验,无法解决大量苗木的接种需求,急需研制出适合规模化生长的菌根制剂。朱国胜等<sup>[35]</sup>将8株美花石斛(*D. loddigesii*)菌根菌等比例混合制成浓度为2 g L<sup>-1</sup>的液体混合菌剂,结果表明,其有利于幼苗成活和生物量积累。张霞<sup>[12]</sup>比较了液体菌根菌剂不同接种方式对铁皮石斛移栽的影响,认为注射、蘸根和菌块接种处理3者间没有显著差异。陈瑞蕊等<sup>[46]</sup>证明兰科菌根菌肥比混合细菌肥的促进效果更显著,持续时间更长。应奇才<sup>[50]</sup>首次研发了颗粒型石斛菌根复合菌剂并确定了使用量和保质期,接种金钗石斛后能明显促进组培苗的干重、多糖和总生物碱含量的积累,具有良好的应用潜力。总之,研发的石斛菌根菌剂以复合菌剂为主,剂型多样。但如何保证菌剂的野外施用效果和保质期,构建抗性强、品质高、方便使用的高效菌剂,仍需深入研究。

## 4 展望

### 4.1 共生体系不成熟

试验证明,离体培养时石斛属植物与菌根真菌的共生是有条件的,当培养基和接种量不适时,真

菌会快速生长致石斛死亡<sup>[51-53]</sup>。可见,共生体系对于菌根的研究至关重要,适宜的体系不仅能符合两者共生,还能提高石斛的生物量和代谢水平,便于产业化研究。因此,从真菌的营养需求和石斛的生物学特性等方面入手,选择适宜的培养基和培养条件,建立良好的共培养体系,是进行研究菌根互作的前提。

#### 4.2 筛选促生菌效率低

促生菌的筛选是一个非常耗时的工作,国内外主要从成年兰科植物根部分离筛选有益共生菌,工作量大,效率低<sup>[28]</sup>,需要一种快捷简便的方式取而代之。从遗传进化的角度看,植物与内生菌在长期进化中形成了共生关系,石斛属植物与其专一的菌根菌两者的 DNA 序列极可能存在相关性<sup>[6]</sup>。因此,可以考虑通过 DNA 序列相关性分析快捷地筛选促生菌。此外,还可考虑建立石斛属植物与菌根菌的 cDNA 文库<sup>[52]</sup>,直观地提供各种石斛不同生长期的菌根真菌数据,为后续工作提供方便。

#### 4.3 鉴定结果的不准确性

准确鉴定菌根真菌对于研究和应用来说非常关键。部分菌根真菌在人工纯培养条件下很难获得有性态,且可供参考的资料少,给分类鉴定工作带来了很大困扰<sup>[54]</sup>。随着分子技术的迅速发展,利用分子生物学手段进行菌株鉴定已成趋势。因此,在采用传统分类方法的同时,结合分子生物学、超微结构和生理生化及菌株融合等多种技术,以求对菌根真菌进行准确分类。

#### 4.4 局限于室内表观研究

环境条件对共生真菌与寄主植物的相互作用有着重要的影响。我国石斛属植物菌根研究多局限于少数经济价值高的种类,对其他种涉及很少,且互作机理的研究很少<sup>[9]</sup>,远远落后于丛枝泡囊菌根互作的研究<sup>[42]</sup>。因此,大胆借鉴国外丛枝菌根菌的研究方法,运用同位素示踪分室培养和聚合酶链定量反转录等技术,定位石斛与菌根真菌互作的关键基因和功能蛋白,从本质上认识两者的互作关系,为更好地运用菌根菌打下良好的基础。此外,扩大对具有潜在经济价值的石斛属植物菌根真菌的研究,及石斛不同生长阶段菌根真菌的动态变化,理解石斛生理特性对互作关系的影响,有利于

更好地为生产服务。这是今后应重点研究的方向。

#### 参考文献

- [1] Harris W, Lavarack B, Stocker G. *Dendrobium* and Its Relatives [M]. Bloomington: Kangaroo Press, 2000: 8-15.
- [2] Chen X Q, Ji Z H. Chinese *Cymbidium* Encyclopedia [M]. 2nd ed. Beijing: China Forestry Publishing House, 2003: 10-14.  
陈心启,吉占和. 中国兰花全书 [M]. 第二版. 北京: 中国林业出版社, 2003: 10-14.
- [3] Flowers Research and Development Center of Chinese Academy of Forestry. *Dendrobium: Resources, Production and Application* [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2007: 11-35.  
中国林业科学院研究院花卉研究与开发中心. 石斛兰: 资源生产应用 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2007: 11-35.
- [4] Yao N C. Status quo of *Dendrobium* sp. resource in Yunnan and utilization skills [J]. For Inv Plan, 2004, 29(4): 80-82.  
姚能昌. 浅述云南石斛资源现状及开发利用技术 [J]. 林业调查规划, 2004, 29(4): 80-82.
- [5] Wu H F, Song X Q, Liu H X. *Ex-situ* symbiotic seed germination of *Dendrobium catenatum* [J]. Acta Ecol Sin, 2012, 32(8): 2491-2497.  
吴慧凤, 宋希强, 刘红霞. 铁皮石斛种子的室内共生萌发 [J]. 生态学报, 2012, 32(8): 2491-2497.
- [6] Zheng W, Zhang Y W, Chen L Q. Research advances of mycorrhiza in *Dendrobium* [J]. Hubei Agri Sci, 2010, 49(9): 2269-2282.  
郑伟, 张云伟, 陈龙清. 石斛属植物的菌根研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(9): 2269-2282.
- [7] Guo S X, Xu J T. Studies on the effects fungi on the course of seed germination of *Dendrobium lohohens* and *Dendrobium candidum* [J]. Acta Acad Med Sin, 1991, 13(1): 46-49.  
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 [J]. 中国医学科学院学报, 1991, 13(1): 46-49.
- [8] Hou X Q, Guo S X. Interaction between a dark septate endophytic isolate from *Dendrobium* sp. and roots of *D. nobile* seedlings [J]. J Integr Plant Biol, 2009, 51(4): 374-381.
- [9] Jin H, Xu Z X, Chen J H, et al. Interaction between tissue-cultured seedlings of *Dendrobium officinale* and mycorrhizal fungus (*Epulorhiza* sp.) during symbiotic culture [J]. Chin J Plant Ecol, 2009, 33(3): 433-441.  
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.
- [10] Zhou Y J, Yang F S, Song X Q, et al. Effects of mycorrhizal fungi on seedling's growth and photosynthetic capability of *Dendrobium sinense*, endemic to Hainan [J]. North Hort, 2009(12): 11-15.  
周玉杰, 杨福孙, 宋希强, 等. 菌根真菌对华石斛幼苗生长及光合性能的影响 [J]. 北方园艺, 2009(12): 11-15.
- [11] Chen L Q, Wang X M, Pei Z D. Tissue structure of aerial

- orchidaceous mycorrhiza and its effect on drought resistance of *Dendrobium* [J]. *Ecol Environ Sci*, 2010, 19(1): 160–164.
- 陈连庆, 王小明, 裴致达. 石斛气生的兰科菌根组织结构及其对御旱研究 [J]. *生态环境学报*, 2010, 19(1): 160–164.
- [12] Zhang X. Studied on the resistance of endophytic *Rhizoctonia* spp. to *Dendrobium caudidum* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2011: 30–41.
- 张霞. 兰花内生菌对铁皮石斛抗逆性的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2011: 30–41.
- [13] Shimura H, Matsuura M, Takada N, et al. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(10): 1442–1447.
- [14] Cui H. Effects of orchid mycorrhizal fungi and plant growth regulators on the growth and flowering of *Dendrobium nobile* type (Orchidaceae) [D]. Haikou: Hainan University, 2011: 1–2.
- 崔虹. 兰菌和植物生长调节剂对春石斛生长与开花的影响 [D]. 海口: 海南大学, 2011: 1–2.
- [15] Chen X M, Guo S X. Effects of four species of endophytic fungi on the growth and polysaccharide and alkaloid contents of *Dendrobium nobile* [J]. *China J Chin Mat Med*, 2005: 30(4): 253–257.
- 陈晓梅, 郭顺星. 4种内生真菌对金钗石斛无菌苗生长及其多糖和总生物碱含量的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2005: 30(4): 253–257.
- [16] Wu J P, Qian J, Zheng S Z. A preliminary study on ingredient of secretion from orchid mycorrhiza [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2002, 13(7): 845–848.
- 吴静萍, 钱吉, 郑师章. 兰花菌根分泌物成分的初步分析 [J]. *应用生态学报*, 2002, 13(7): 845–848.
- [17] Rasmussen H N, Rasmussen F N. Orchid mycorrhiza: Implications of a mycophagous life style [J]. *Oikos*, 2009, 118(3): 334–345.
- [18] Zhang L C, Chen J, Lü Y L, et al. *Mycena* sp.: A mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale* [J]. *Mycol Prog*, 2012, 11(2): 395–401.
- [19] Otero J T, Ackerman J D, Bayman P. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids [J]. *Amer J Bot*, 2002, 89(11): 1852–1858.
- [20] Shan X C, Liew E C Y, Weatherhead M A, et al. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots [J]. *Mycologia*, 2002, 94(2): 230–239.
- [21] Zhu G S. Establishment of a rice enhancer trap mutant library by T-DNA insertion [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009: 1–43.
- 朱国胜. 贵州特色药用兰科植物杜鹃兰和独蒜兰共生真菌研究与应用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009: 1–43.
- [22] Warcup J H, Talbot P H B. Perfect states of rhizoctonias associated with orchids [J]. *New Phyt*, 1967, 66(4): 631–641.
- [23] Taylor D L, Bruns T D. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(9): 4510–4515.
- [24] Kristiansen K A, Taylor D L, Kjølner R, et al. Identification of mycorrhizal fungi from single pelotons of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences [J]. *Mol Ecol*, 2001, 10(8): 2089–2093.
- [25] Hou T W. Mycorrhizal fungi diversity of the dominant orchids in the Huanglong Valley, Sichuan [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2010: 3–4.
- 侯天文. 四川黄龙沟优势兰科植物菌根真菌多样性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2010: 3–4.
- [26] Chen J, Wang H, Guo S X. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *Mycorrhiza*, 2012, 22(4): 297–307.
- [27] Warcup J H. The mycorrhizal relationships of Australian orchids [J]. *New Phyt*, 1981, 87(2): 371–381.
- [28] Liu H X, Luo Y B, Liu H. Studies of mycorrhizal fungi of Chinese orchids and their role in orchid conservation in China: A review [J]. *Bot Rev*, 2010, 76(2): 241–262.
- [29] Li L M. Seedling cultivation and reintroduction of *Dendrobium candidum* (Orchidaceae) with mycorrhizal fungi [D]. Haikou: Hainan University, 2011: 32–40.
- 李霖明. 铁皮石斛菌根化育苗及重引入技术研究 [D]. 海口: 海南大学, 2011: 32–40.
- [30] Wu J R. Studies on endangered wild orchids and its relationship with mycorrhizal fungi in Yunnan Province [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2005: 26–57.
- 伍建榕. 云南濒危野生兰花与菌根真菌的相互关系 [D]. 南京: 南京林业大学, 2005: 26–57.
- [31] Wang D. Isolation and culture of endophytic fungi associated with *Dendrobium huoshanense* and its effects on the growth of plantlets [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2007: 18–31.
- 王娣. 霍山石斛内生真菌的分离及其促生作用的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007: 18–31.
- [32] Hou X Q. Studies on mycorrhizal biology of *Dendrobium* [D]. Beijing: Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, 2007: 143–216.
- 侯晓强. 石斛属植物菌根生物学研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007: 143–216.
- [33] Guo S X, Cao W Q, Gao W W. Isolation and biological activity of mycorrhizal fungi from *Dendrobium candidum* and *D. nobile* [J]. *China J Chin Mat Med*, 2000, 25(6): 18–21.
- 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): 18–21.
- [34] Kang Z H, Han S F, Han Z M. Effects of orchidaceous rhizoctonias on the growth of *Dendrobium catenatum* [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*, 2007, 31(5): 49–52.

- 亢志华, 韩素芬, 韩正敏. 兰科丝核菌类真菌对铁皮石斛生长的影响 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(5): 49–52.
- [35] Zhu G S, Liu Z Y, Huang Y H, et al. Screening of fungi promoting the growth of *Dendrobium loddigesii* tissue culture seedlings [J]. Seed, 2007, 26(12): 17–20.  
朱国胜, 刘作易, 黄永会, 等. 美花石斛组培苗促生内生真菌分离及筛选 [J]. 种子, 2007, 26(12): 17–20.
- [36] Chen B L, Song X Q, Hu M J, et al. Inoculation methods and effects of beneficial symbiotic fungi of *Dendrobium loddigesii* Rolfe. (Orchidaceae) [J]. Bull Bot Res, 2011, 31(1): 79–84.  
陈宝玲, 宋希强, 胡美姣, 等. 美花石斛菌根真菌接菌方式与接种效应初步研究 [J]. 植物研究, 2011, 31(1): 79–84.
- [37] Shuai H Y. Studies on isolation, identification and bioactivity of endophytic fungi from *Dendrobium candidum* grew in Huanjiang of Guangxi [D]. Nanning: Guangxi University, 2008: 62–99.  
帅红艳. 广西环江产铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其生物活性的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2008: 62–99.
- [38] Gao W W, Guo S X. Effects of endophytic fungi hyphae and their metabolites on the growth of *Dendrobium catenatum* and *Anoetochilus roxburghii* [J]. Acta Acad Med Sin, 2001, 23(6): 556–559.  
高微微, 郭顺星. 内生真菌菌丝及代谢物对铁皮石斛及金线莲生长的影响 [J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(6): 556–559.
- [39] Mao Y T. Endophytic fungus from the *Dendrobium* Plants and effects on seed germination and seeding growth [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011: 30–38.  
毛益婷. 兰科石斛属根部内生真菌及其对种子萌发和苗木生长的效应 [D]. 北京: 北京林业大学, 2011: 30–38.
- [40] Wang H, Fang H Y, Wang Y Q, et al. *In situ* seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: The endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. World J Microbiol Biotechn, 2011, 26(9): 2051–2059.
- [41] Nontachaiyapoom S, Sasirat S, Manoch L. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand [J]. Mycorrhiza, 2010, 20(7): 459–471.
- [42] Dearnaley J D W. Further advances in orchid mycorrhizal research [J]. Mycorrhiza, 2007, 17(6): 475–486.
- [43] Batty A L, Dixon K W, Brundett M, et al. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a *Mediterranean bushland* [J]. New Phyt, 2001, 152(3): 511–520.
- [44] Hua X M. Mycorrhizal biotechnology of forest trees [J]. World For Res, 2001, 14(1): 22–29.  
花晓梅. 林木菌根生物工程 [J]. 世界林业研究, 2001, 14(1): 22–29.
- [45] Johnson T R, Stewart S L, Dutra D, et al. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae): Preliminary evidence for the symbiotic culture advantage [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2007, 90(3): 313–323.
- [46] Chen R R, Shi Y Q, Lin X G, et al. Studies on mycorrhizal fungi and bacterial fertilizer effect to *Dendrobium gratiosissimum* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2005, 36(11): 1718–1720.  
陈瑞蕊, 施亚琴, 林先贵, 等. 杯鞘石斛组培苗接种菌根真菌和细菌肥的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1718–1720.
- [47] Scade A, Brundrett M C, Batty A L, et al. Survival of transplanted terrestrial orchid seedlings in urban bushland habitats with high or low weed cover [J]. Aust J Bot, 2006, 54(4): 383–389.
- [48] Li M, Zhang S, Peng Y H. Research and application of Orchidaceae mycorrhiza [J]. Yunnan Agri Sci, 2000(6): 42–44.  
李明, 张灼, 彭彦华. 兰科菌根研究与应用 [J]. 云南农业科技, 2000(6): 42–44.
- [49] Ke H L. Technology of cultivating seedling of *Doritis pulcherrima* Lindl. with mycorrhizal fungi [D]. Haikou: Soth China University of Tropical Agriculture, 2007: 9–10.  
柯海丽. 五唇兰菌根化育苗技术研究 [D]. 海口: 华南热带农业大学, 2007: 9–10.
- [50] Ying Q C, Xu X B, Wang H Z. Studies on the development and application on *Dendrobium* mycorrhizal fungus compound inoculant [J]. J Zhejiang Agri Sci, 2012(8): 1119–1120.  
应奇才, 徐祥彬, 王慧中. 石斛菌根复合菌剂的研制及应用 [J]. 浙江农业科学, 2012(8): 1119–1120.
- [51] Liu T T, Wu J R, He C F. Study on mycorrhization of tissue culture of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [J]. North Hort, 2008(9): 107–109.  
刘婷婷, 伍建榕, 合灿帆. 铁皮石斛菌根化研究 [J]. 北方园艺, 2008(9): 107–109.
- [52] Chen B L, Zhou Q S, Song X Q. Optimization of mycorrhizal inoculation with seedlings from *Dendrobium loddigesii* in flask [J]. Chin Hort Abs, 2010, 26(8): 1–4.  
陈宝玲, 周千淞, 宋希强. 美花石斛组培苗菌根化中共生条件优化研究 [J]. 中国园艺文摘, 2010, 26(8): 1–4.
- [53] Meng Z X, Shu Y, Wang C L, et al. Fluid suspension co-culture of *Dendrobium officinale* protocorm and living fungus [J]. China J Chin Mat Med, 2012, 37(12): 1710–1714.  
孟志霞, 舒莹, 王春兰, 等. 铁皮石斛原球茎与活体真菌液体悬浮共培养研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1710–1714.
- [54] Zhu G S, Liu Z Y, Mao T F. Research advances of orchid mycorrhizal fungi [J]. Guizhou Agri Sci, 2004, 32(4): 79–81.  
朱国胜, 刘作易, 毛堂芬. 兰科植物菌根真菌的研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2004, 32(4): 79–81.