



野生兜兰菌根真菌对带叶兜兰生长和生理指标的效应

陈宝玲, 杨开太, 龚建英, 唐庆, 苏莉花, 汪小玉, 龙定建

引用本文:

陈宝玲, 杨开太, 龚建英, 等. 野生兜兰菌根真菌对带叶兜兰生长和生理指标的效应[J]. 热带亚热带植物学报, 2022, 30(1): 88–96.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4411>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

珍稀濒危植物紫纹兜兰的种群结构和数量动态

Population Structure and Quantitative Dynamics of Rare and Endangered Plant *Paphiopedilum purpuratum*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(4): 375–384 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4180>

印度梨形孢对铁皮石斛种子萌发和原球茎生长的影响

Effects of *Piriformospora indica* on Seed Germination and Protocorm Growth of *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(1): 59–66 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4231>

瘤菌根菌对铁皮石斛根系形态的影响及其共生关系的研究

Effect of *Epulorhiza* sp. on Root Morphology of *Dendrobium officinale* and Their Symbiotic Relationship

热带亚热带植物学报. 2020, 28(2): 124–130 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4093>

哀牢山兜兰, 中国兰科一新天然杂种

Paphiopedilum × *ailaoshanense*, A New Natural Hybrid Species of Orchidaceae from China

热带亚热带植物学报. 2019, 27(6): 721–725 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4055>

内生真菌和内生细菌接种对雷公藤生长和次生代谢产物积累的影响

Effects of Inoculation with Endophytic Fungi and Endophytic Bacteria on Growth and Accumulation of Secondary Metabolites in *Tripterygium wilfordii*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(4): 347–355 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4176>

向下翻页, 浏览PDF全文

野生兜兰菌根真菌对带叶兜兰生长和生理指标的效应

陈宝玲, 杨开太*, 龚建英, 唐庆, 苏莉花, 汪小玉, 龙定建

(广西壮族自治区林业科学研究院, 南宁 530002)

摘要: 为探究兰科菌根真菌对带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)生长的影响, 用4个分离自广西野生兜兰根部的兰科菌根真菌(*Cladosporium perangustum*、*Kirschsteiniothelia tectonae*、*Phialophora* sp.和*Cyphellophora* sp.)与带叶兜兰试管苗和营养钵苗进行菌-苗共生试验, 对其生长和生理指标的变化进行了研究。结果表明, 接菌处理具有明显的促进生长作用和生理效应, *Cladosporium perangustum*和*Phialophora* sp.对试管苗的接种效果最佳, 鲜质量增量、3种保护酶活性和叶绿素总量均与对照存在显著或极显著差异, 鲜质量增加了360%~380%。*Kirschsteiniothelia tectonae*、*Phialophora* sp.对营养钵苗的接种效果最佳, 鲜质量增量、叶面积及3种保护酶活性均与对照存在显著或极显著差异, 鲜质量增加了261%~330%。因此, 实际生产中可在带叶兜兰不同生长阶段接种适当菌株, *Phialophora* sp.对带叶兜兰表现出较好的促生效应, 可研发为带叶兜兰育苗期通用型有益菌剂。

关键词: 带叶兜兰; 兰科菌根真菌; 生理特性; 保护酶

doi: 10.11926/jtsb.4411

Effects of Wild *Paphiopedilum* Mycorrhizal Fungi on Growth and Physiological Indexes of *Paphiopedilum hirsutissimum* Seedlings

CHEN Baoling, YANG Kaitai*, GONG Jianying, TANG Qing, SU Lihua, WANG Xiaoyu, LONG Dingjian

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Forestry Research Institute, Nanning 530002, China)

Abstract: To investigate the effects of mycorrhizal fungi on the growth of *Paphiopedilum hirsutissimum*, four strains, such as *Cladosporium perangustum*, *Kirschsteiniothelia tectonae*, *Phialophora* sp. and *Cyphellophora* sp., isolated from roots of wild *Paphiopedilum*, were inoculated to tissue-cultured and potting seedlings of *P. hirsutissimum* for 120 days, and then the changes in growth and physiological characters were studied. The results showed that the biomass and physiological indexes of tissue-cultured seedlings increase inoculated with *Cladosporium perangustum* and *Phialophora* sp., the fresh weight, activities of three protective enzymes, and total chlorophyll content had significant differences compared with the control. Especially the fresh weight was more than control for 360%–380%. Two strains, *Kirschsteiniothelia tectonae* and *Phialophora* sp. had the best effect for the potting seedlings, which the fresh weight, leaf area, and activities of three protective enzymes had significant difference compared with the control, and the fresh weight increased 261%–330% than control. Therefore, appropriate strains could be inoculated to *P. hirsutissimum* at different growth stages in actual production. *Phialophora* sp., which showed a good promoting effect on *P. hirsutissimum*, could be developed as a

收稿日期: 2021-03-12

接受日期: 2021-06-03

基金项目: 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA259028); 广西重点研发计划项目(桂科 AB18221003)资助

This work was supported by the Project for Natural Science in Guangxi (Grant No.2020GXNSFAA259028); and the Project for Key Research & Development in Guangxi (Grant No. AB18221003).

作者简介: 陈宝玲(1981~), 高级工程师, 硕士, 主要从事兰科植物的保育与繁育研究工作。E-mail: cbl_033@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 459306606@qq.com

universal beneficial bacterial agent in seedling stage.

Key words: *Paphiopedilum hirsutissimum*; Mycorrhizal fungi; Physiological index; Protective enzyme

兜兰属(*Paphiopedilum*)是兰科(Orchidaceae)植物中濒危程度最高的类群,野生种群小、个体数量少、分布区域有限,兜兰属所有种均被列入野生动植物濒危物种国际贸易公约(CITES)附录 I 的保护范围^[1-2]。由于兜兰的自然繁殖力极低,成苗缓慢,导致兜兰产业发展进程迟缓。几乎所有的兰科植物都与菌根真菌有着共生关系。已有的研究表明,菌根真菌对兰科植物具有独特的生态功能,如促进种子萌发和幼苗的形态建成,帮助兰科植物的生态入侵,影响生物群落组成及制备特定功效的生物诱导子,利于生态系统的保护、恢复或重建等方面^[3]。究其机理,近年来的研究发现,菌根真菌通过消化菌丝为胚细胞提供必需的营养,刺激植物产生赤霉素、IAA 等激素,烟酸和烟酰胺等维生素,此外,菌根真菌可在植物体内合成植保素,进一步激发 SOD、POD、CAT 和 PAL 等的活性^[4],增强宿主植物的抗性^[5-6],同时,当菌根真菌定殖成功并成为有益的优势菌群后,释放的拮抗物质将有效增强兰科植物的抗病能力,对于提高幼苗的成活率和促进植株的生长具有重要意义。近年来,兰科菌根真菌成为新的研究热点,特别是在园艺学和植物保护学中的应用和功效引起高度重视^[7-9],利用兰科菌根真菌提高珍稀种类组培苗的移栽成活率、促进植株生长及保育等方面已有研究报道^[10-14],如石斛属(*Dendrobium*)、金线莲属(*Anoectochillus*)、兜兰属、兰属(*Cymbidium*)、五唇兰属(*Doriti*)等,将菌根化育苗技术引入人工栽培后,显著提高了幼苗移栽成活率、鲜质量增长率、干物质积累和矿质元素吸收^[7,15-16],部分菌根真菌的代谢产物可分泌赤霉素、IAA 等植物生长调节剂^[17]。目前,兜兰属植物有关菌根真菌的研究主要在内生真菌的分离、鉴定^[18-24]、共生萌发^[25]、专一性和多样性^[26]等方面,而兰科菌根真菌与兜兰属植物共生的生长和生理效应等研究鲜有报道。本研究将分离筛选到的兰科菌根真菌与带叶兜兰试管苗及营养钵苗分别进行共生培养,探讨菌根真菌对带叶兜兰各生长阶段生长和生理指标的影响,明确兰科菌根真菌的促生机理,应用于菌根化育苗实践中,促进兜兰种苗的快速繁育,并缩短成苗周期,为珍稀濒危植物的保育提供理论基础,并为促进兜兰产业的规模化发展提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

试管苗共生培养采用带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)壮苗期生长健壮在 DE 培养基^[10]中培养的无菌组培苗,具有 3~4 条根和 3~4 片叶。营养钵苗共生培养采用生根期的试管苗,具有 5~6 条根和 4~5 片叶,营养钵苗移栽基质为松树皮:火山岩:木炭(体积比)=4:2:1。

菌株 PF01、PF02、PF06 和 PF07,其中 PF01、PF06 和 PF07 分离自广西天峨县野生带叶兜兰新鲜营养根中,PF02 分离自广西那坡县野生紫纹兜兰(*P. purpuratum*)新鲜营养根中,经筛选均为带叶兜兰幼苗的益生菌株,经根部重分离验证为菌根真菌。经 16S rDNA 序列测定和分析,PF01 为 *Cladosporium perangustum*、PF02 为 *Kirschsteiniotelia tectonae*、PF06 为 *Phialophora* sp.、PF07 为 *Cyphellophora* sp.。

1.2 方法

菌株活化 将 4 个菌株接种到 PDA 培养基平板上,置入光照培养箱 28 °C 暗培养 5~7 d 活化菌株。

液体菌剂制备 用直径 5 mm 的打孔器于活化的 4 个菌株菌落边缘打孔制作成菌饼,将菌饼移入到盛有 150 mL PDA 液体培养基的三角瓶中,每瓶接种菌饼 2~3 块,置于 28 °C 140 r/min 的摇床上培养 10 d,然后过滤菌丝体,无菌水冲洗 3~5 次后,添加无菌水定容至 300 mL,用组织捣碎机破碎 5 min,最后用无菌水稀释 5 倍,即制成菌悬液。

营养钵苗处理 将生根 60 d 的试管苗置于大棚内炼苗 7~10 d 后,洗去根部附着的培养基,并用稀释 1 000 倍的 50% 多菌灵可湿性粉剂水溶液浸泡 10 min,置于阴凉处摊开晾干表面的水分,移栽入 1.5 寸塑料透明软杯(口径×高×底径=5 cm×5 cm×3.5 cm)。

试管苗接种菌株 将活化菌株用直径 5 mm 的打孔器于菌落边缘打孔取菌饼,无菌条件下将菌饼接种到 HT-220 组培瓶(220 mL,口径×胸径×高 5.6 cm×6.9 cm×9.1 cm)中心,在周边接种幼苗。培养室温度为(25±2) °C,光照强度为 25 μmol/(m² s),

光照时间为 12 h/d。2 株/瓶，每处理 30 瓶，3 次重复。共生培养 120 d 后，以瓶为单位统计鲜质量、叶长、叶宽和平均根长等生长指标。

营养钵苗接种菌株 于试管苗移栽当天浇施第 1 次菌液 10 mL/杯，以浇施等量无菌水为对照，以后每隔 20 d 浇施 1 次菌液，共浇施 3~4 次，期间停止施肥及用农药。移栽后隔 5~7 d 淋 1 次无菌水，期间视空气湿度情况适当进行叶面喷雾，保持温度(26±2) °C，相对湿度 70%~85%，遮阴率 70%~80%。2 株/杯，每处理 30 杯，3 次重复。共生培养 120 d 后，统计幼苗移栽成活率、鲜质量、叶长、叶宽和新根数等生长指标。

生理指标的测定 共生培养 120 d 后，采集新鲜叶片测定保护酶活性。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的测定采用李合生^[26]的方法；叶绿素含量用丙酮提取法^[26]测定。均设 3 次重复。

兰科菌根真菌的重分离 分别取接种菌株和不接种的带叶兜兰试管苗和营养钵苗若干，挑选新生根系，用 0.1% 的 HgCl₂ 溶液表面消毒 1 min 后，用无菌水清洗 4 次，然后采用组织块分离法进行菌根真菌的重分离，置于含 1 μL/mL 庆大霉素的 PDA 培养基上，28 °C 暗培养 7~10 d，观察根段的菌落生长情况。

1.3 数据的统计分析

采用 Excel 对数据进行统计，并采用 DPS 7.05 软件对数据进行 Duncan's 新极复差检验。

单叶叶面积(cm²)采用长宽系数法测定，校正系数采用复印称重法^[27]测定，叶面积=叶长×叶宽×校正系数(0.8317)。

2 结果和分析

2.1 共生关系的建立

共培养 120 d 后，从接种菌株的试管苗根部重分离出相应的 4 个原接种菌株，分离率为 83.0%~92.5%，且未分离出其他菌株，而试管苗对照则未分离出任何菌株。从接种菌株的营养钵苗根部也重分离出相应的原接种菌株，分离率为 50.0%~65.0%，接种 PF02 菌株的营养钵苗中还分离出少量的镰刀菌菌株(5.5%)，而在对照植株中主要分离到镰刀菌菌株(*Fusarium*)，分离率达 37.5%。说明原接种菌株

与带叶兜兰幼苗形成了共生关系，确定为带叶兜兰的兰科菌根真菌。

2.2 对生长的影响

共生培养 120 d 后，不同处理的带叶兜兰试管苗长势、叶片和根系的表现明显不同，且接种菌株试管苗显示出明显优势，但不同菌株间的鲜质量增加不存在显著差异(图 1)，然而接种菌株试管苗鲜质量与对照的差异极显著($P<0.01$)，提高了 320.0%~380.0%。植株长势表现出明显差异，接种菌株的试管苗生长旺盛，而对照植株矮小(图 2)。接种菌株试管苗的根系明显发达，长且粗壮，黄褐色，接种不同菌株的根系长度存在显著或极显著差异(图 3)。其中，接种 PF07 试管苗根系最长，达 2.8 cm，其次是 PF01 和 PF06，分别为 2.3 和 2.2 cm，与对照的差异极显著，比对照分别提高了 129.5%、88.5% 和 80.3%，对照的根系短细，黄绿色。接种菌株试管苗的叶面积差异不显著(图 4)，但接种 PF01 的叶面积增长量最大，叶片油绿且舒展，达 1.11 cm²，其次是 PF06 和 PF02，分别比对照提高了 37.0%、22.2% 和 12.3%，叶片油绿，略下垂，而 CK 处理的叶片黄绿色。接种菌株后，试管苗快速生长，鲜质量、新根长度和叶面积增长极显著，接种 PF01、PF07 和 PF06 对带叶兜兰试管苗生长促进效果最佳，其中，PF01 极大提高了试管苗对培养基中水分的吸收，PF07 显著促进了新根的生长，PF06 促进了试管苗叶片和新根的生长。

试管苗移栽与菌株共培养 120 d 后，带叶兜兰营养钵苗的生长表现显著差异。接种 PF06 的鲜质量增长最多，达到 1.90 g，比对照提高了 360.3%，差

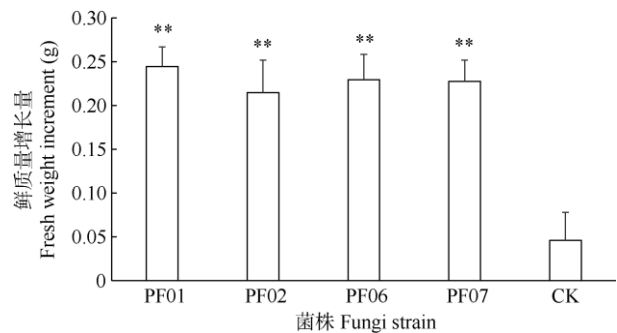


图 1 野生兜兰有益真菌对带叶兜兰试管苗鲜质量增长量的影响。**: $P<0.01$; *: $P<0.05$ 。

Fig. 1 Effects of mycorrhizal fungi on fresh weight increment of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings in vitro. **: $P<0.01$; *: $P<0.05$.

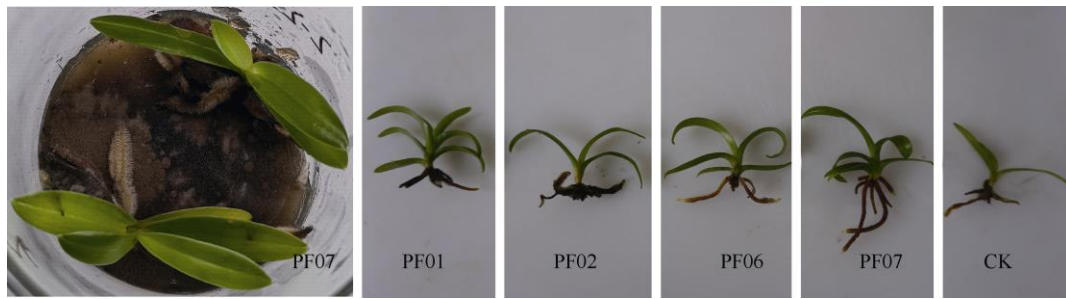
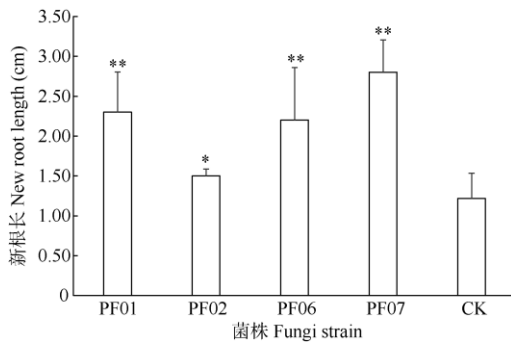


图 2 带叶兜兰试管菌根苗和非菌根苗(CK)

Fig. 2 *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings *in vitro* with and without (CK) mycorrhizal fungi图 3 野生兜兰有益真菌对带叶兜兰试管苗新根长度的影响。**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.Fig. 3 Effects of mycorrhizal fungi on new root length of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings *in vitro*. **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

异极显著, 比接种 PF01 的提高了 66.4%, 差异显著 ($P < 0.05$), 植株生长旺盛, 根系粗壮, 叶片深绿色、斜立且舒展; 而接种 PF02、PF07 间的鲜质量增长差异不显著, 但与对照的差异极显著, 分别提高了 330.1% 和 261.6%。对照植株弱小, 部分叶片出现黑斑病和软腐病, 根系短, 叶片黄绿色、略翻卷且细长(图 5)。接种菌株的营养钵苗根系长度差异较大, 接种 PF02 菌株的营养钵苗根系最长, 达 6.47 cm, 比 PF01 和对照分别提高了 102.8% 和 71.6%, 差异极显著, 且根系粗壮, 分支较多; 接种 PF06 和 PF07 的根系长度与接种 PF01 和对照的差异不显著, 每株 3~5 条根, 根较细, 分支较少(图 6)。接种菌株的营养钵苗叶面积差异显著, 以接种 PF06 的叶片最大, 深绿色且舒展, 达 5.72 cm², 比 CK 提高了 52.1%, 差异极显著, 比接种 PF07 的提高了 37.2%, 差异显著; 其次是接种 PF07 菌株的叶面积为 5.41 cm², 比对照提高了 43.9%, 差异显著, 叶片略外弯, 细长(图 7)。由此可见, 生根试管苗移栽后, 通过多次浇施菌株可较好的建立菌-苗共生关系, 营养钵苗快速生长(图 8), 鲜质量显著增加, 抵抗力增

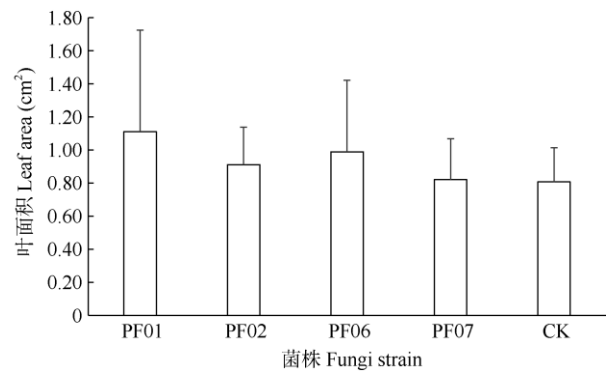


图 4 野生兜兰有益真菌对带叶兜兰试管苗叶面积的影响

Fig. 4 Effects of mycorrhizal fungi on leaf area of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings *in vitro*

强。PF02 和 PF06 对带叶兜兰营养钵苗生长的促进效果最佳, PF02 可促进新根的伸长生长, PF06 菌株的菌丝有利于扩大根系对水分的吸收范围, 促进生物量积累。

2.3 对生理指标的影响

带叶兜兰试管苗与菌株共生培养 120 d 后, 叶片 POD、CAT、SOD 活性和叶绿素总量均显著提高, 与对照有差异显著或极显著(表 1)。接种 PF06 植株叶片的 POD、CAT、SOD 活性和叶绿素总量增长较大, 分别为 116.40 U/g、263.07 nmol/g、1748.70 U/g 和 0.76 mg/g, 分别比对照提高 344.1%、472.8%、256.4% 和 68.9%; 接种 PF01 植株叶片的 POD、CAT、SOD 活性和叶绿素总量分别为 60.36 U/g、512.98 nmol/g、1452.91 U/g 和 0.73 mg/g, 比对照分别提高 130.3%、1016.9%、196.1% 和 62.2%, 说明接种菌株有利于提高植株叶片的保护酶活性和叶绿素含量。可见, 带叶兜兰试管苗接种菌株后形成菌根, 保护酶活性呈动态变化, 植株的免疫效应和光合效率提高, PF01 与 PF06 对带叶兜兰试管苗生理指标的促进效

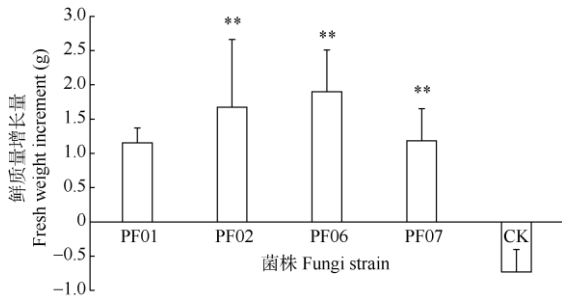


图 5 野生兜兰有益真菌对带叶兜兰营养钵苗鲜质量增长量的影响。

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Fig. 5 Effects of mycorrhizal fungi on fresh weight increment of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings in pot. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

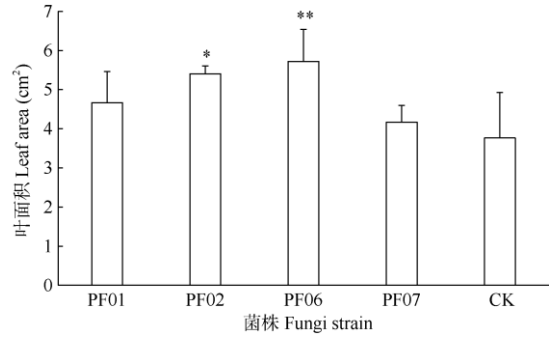


图 7 野生兜兰有益真菌对带叶兜兰营养钵苗叶面积的影响。 ** $P < 0.01$;

* $P < 0.05$.

Fig. 7 Effects of mycorrhizal fungi on leaf area of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings in pot. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

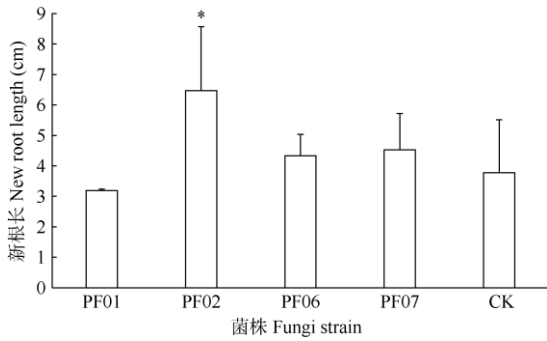


图 6 野生兜兰有益真菌对带叶兜兰营养钵苗新根长度的影响。* $P < 0.05$.

Fig. 6 Effects of mycorrhizal fungi on new root length of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings in pot. * $P < 0.05$.

应最佳, PF01 提高了 CAT 和 SOD 活性, PF06 菌株提高了 POD 和 SOD 活性, 且在显著促进植株鲜质量增加时, 光合效率也提高, 保证了植株基本代谢进程的的稳定。

带叶兜兰营养钵苗与菌株共生培养 120 d 后, 各生理指标也不同程度的提高, 说明菌株处理营养钵苗可显著或极显著增强 3 种保护酶活性, 尤其是 POD 活性, 但叶绿素总量的差异不显著(表 2)。接种 PF06 菌株的营养钵苗叶片 POD、CAT 和 SOD 活性大幅提高, 分别为 365.04 U/g、132.63 nmol/g

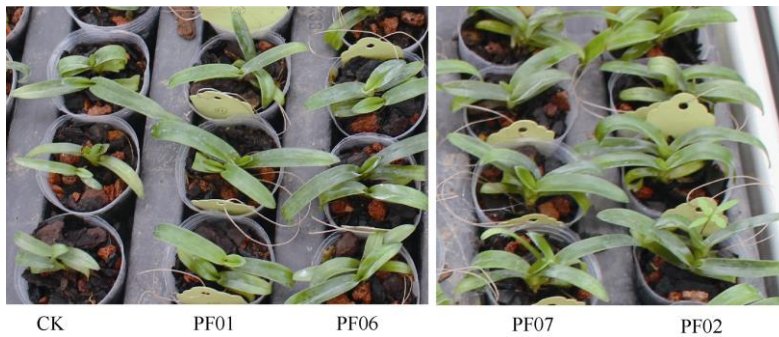


图 8 带叶兜兰营养钵菌根苗与非菌根苗(CK)

Fig. 8 *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings in pot with and without (CK) mycorrhizal fungi

表 1 接种兜兰有益真菌对带叶兜兰试管苗生理指标的影响

Table 1 Effect of mycorrhizal fungi on physiological indexes of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings in vitro

编号 No.	POD (U/g)	CAT (nmol/g)	SOD (U/g)	Chl (mg/g)
PF01	60.36 ±9.97	512.98 ±89.18**	1452.91 ±61.59**	0.73 ±0.00**
PF02	39.63 ±9.19	103.06 ±1.62	685.33 ±23.79**	0.52 ±0.01**
PF06	116.40 ±13.83**	263.07 ±97.85*	1748.70 ±80.20**	0.76 ±0.04**
PF07	43.02 ±13.73	132.04 ±7.20	889.94 ±6.81**	0.48 ±0.01
CK	26.21 ±11.57	45.93 ±4.01	490.65 ±40.74	0.45 ±0.01

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

表 2 接种兜兰有益真菌对带叶兜兰营养钵苗生理指标的影响

Table 2 Effect of mycorrhizal fungi on physiological indexes of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings in pot

编号 No.	POD (U/g)	CAT (nmol/g)	SOD (U/g)	Chl (mg/g)
PF01	313.57 ±47.48**	69.74 ±23.93	94.52 ±12.45	0.43 ±0.01
PF02	349.52 ±20.46**	71.25 ±15.29	172.81 ±40.83*	0.44 ±0.02
PF06	365.04 ±64.34**	132.63 ±14.60**	252.34 ±44.06**	0.49 ±0.02
PF07	320.17 ±52.51**	63.05 ±21.70	135.64 ±16.79	0.47 ±0.14
CK	100.41 ±64.85	38.74 ±9.90	93.31 ±3.13	0.38 ±0.01

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

和 252.34 U/g, 分别比对照提高了 263.5%、242.4% 和 170.4%, 差异极显著; 接种 PF02 的叶片 POD、CAT、SOD 活性分别为 349.52 U/g、71.25 nmol/g 和 172.81U/g, 比对照分别提高了 248.1%、83.9% 和 85.2%, 差异显著或极显著。这表明, 带叶兜兰营养钵苗在与菌根形成共生过程中, 营养钵苗叶片保护酶活性激发, 提高了植株的免疫效应, PF02 与 PF06 对带叶兜兰营养钵苗生理指标的促进效应最佳, PF06 优于 PF02。然而在自然遮阴条件下, 活菌对营养钵苗叶绿素含量的促进作用不显著。

3 结论和讨论

在长期的协同进化过程中, 兰科植物与兰科菌根真菌形成特异的菌物体系, 许多真菌能够与植物形成菌根, 相互共生, 彼此依赖。菌根真菌从兰科植物根部获取所需的碳水化合物和其他营养元素, 同时也为兰科植物的生长发育提供必需的营养物质、酶等。菌根的有益作用能否充分发挥, 决定于菌根真菌能否对宿主植物进行有效侵染、定殖, 以及菌根真菌的作用效果^[5]。研究表明, 庞大的菌丝网络增加了植物根系的吸收面积, 菌根的代谢活动提高了兰科植物对难溶不易被作物吸收矿物元素的吸收, 产生的植物激素、维生素、氨基酸等代谢产物既能促进植株生长, 又可作为诱导因子激活并增强植株体内保护酶活性及抗性^[27-34]。SOD、POD 和 CAT 是植物体膜系统的 3 大保护酶, 其活性是鉴定植物抗逆性强弱的主要指标^[5-6]。

在本试验中, DE 培养基作为试管苗共生培养基, 碳氮含量低, 营养相对贫瘠, 带叶兜兰试管苗接种菌株后, 生长加快, 尤其是提高了试管苗的水分吸收能力, 鲜质量增长极显著, 说明保持真菌和幼苗适当的营养平衡是兜兰属植物适应自然生境的关键。PF01 与 PF06 对带叶兜兰试管苗生长和生

理指标的促进效应最佳, PF01 极大提高了试管苗对于培养基中水分的吸收, 激发了叶片 CAT 和 SOD 活性; PF06 菌株促进了试管苗叶片和新根的生长, 激发了叶片 POD 和 SOD 活性, 且提高了试管苗叶绿素总量。

而试管苗出瓶移栽后, PF02 与 PF06 对带叶兜兰营养钵苗的生长和生理指标的促进效应最佳, PF02 促进营养钵苗新根的伸长生长, PF06 扩大了根系对水分的吸收范围, 促进生物量的积累, 且提高了 POD、CAT 和 SOD 活性。这说明不同菌根真菌虽然对带叶兜兰不同生长阶段幼苗的生长和生理指标的促进作用存在差异, 但均有效提高了幼苗的生物量增长, 同时激发了叶片保护酶活性, 并也提高了植株的光合作用。这与前人^[7,14,35-37]的研究结果一致, 即不同菌根真菌对兰科植物的促生效果不同, 基质水分含量和光照强度也会影响植株的生长与生理代谢^[34,36]。

此外, 本研究结果表明, 4 个菌株对带叶兜兰均不致病, 但不同菌株对其生长的影响存在差异, PF06 为瓶霉属菌株, 在 2 个苗期均表现出较稳定的促生效果, 大部分生长指标显著高于对照, 说明该菌株的促生作用较为稳定。PF01 对营养钵苗的促生效果不明显, 但对试管苗的促生效果显著, 说明各菌株有最适宜的生长环境, PF01 更适宜干扰较少的瓶内菌苗共生条件。此外, PF06 对营养钵苗生长指标的促进效应比试管苗的大, 这可能与营养钵苗植株较大, 正处于旺盛生长期, 再加上受户外环境影响, 可更多地吸收空气中的水分和养分。这与谢玲等^[11]对铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)共生研究的结果一致, 深色有隔内生真菌 24L-4 对组培苗和盆栽苗均表现出显著的促生作用, 但盆栽苗表现更好。因此, 生产中可优选在试管苗移栽后接种兰科菌根真菌, 此阶段开展规模化菌根育苗, 不仅可高效建立共生关系, 而且可操作强, 生产效率高。

在本研究中,对植株促生效果最佳的菌株也有较好的生理效应,保护酶活性和光合色素含量均提高,呈正相关效应,可能是共生关系的建立促进了带叶兜兰根系对养分和水分的吸收,兰科菌根真菌分泌的淀粉酶能够提高带叶兜兰的碳水化合物利用水平,加快营养吸收,生物量增长迅速,进一步提高叶片的光合作用和光合产物的同化能力,从而提高了兜兰幼苗的光合性能,同时,兰科菌根真菌的合成功能促使菌丝团产生多种植物生长调节剂、酶前体等有利于兜兰生长发育的活性物质^[38],这些又极大的促进了植株的茁壮生长。

带叶兜兰对生长环境要求严格,今后应进一步深入研究了解兜兰菌根特点,筛选优良的兜兰菌根真菌资源,尤其是 PF06 有望开发为兜兰幼苗生长的通用菌株,进一步研究其生物学特性,开展微生物互作、抗性和不同生长阶段的保护酶活性研究,以及探明活菌与菌株发酵液活性成分对兜兰生长的促生机理,研发兜兰的微生物菌肥,可提高带叶兜兰的种苗质量,增强环境适应性,扩大生产和栽培区域,开展高效种植,将极大促进兜兰产业的规模化发展,同时,可为兜兰的保育研究提供技术支撑。

参考文献

- [1] LUO Y B, JIA J S, WANG C L. Conservation strategy and potential advantages of the Chinese *Paphiopedilum* [J]. Biodiv Sci, 2003, 11(6): 491–498. doi: 10.3321/j.issn:1005-0094.2003.06.009.
罗毅波, 贾建生, 王春玲. 初论中国兜兰属植物的保护策略及其潜在资源优势 [J]. 生物多样性, 2003, 11(6): 491–498. doi: 10.3321/j.issn:1005-0094.2003.06.009.
- [2] LIU Z J, CHEN X Q, CHEN L J, et al. The Genus *Paphiopedilum* in China [M]. Beijing: Science Press, 2009: 1–10.
刘仲健, 陈心启, 陈利君, 等. 中国兜兰属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 1–10.
- [3] GAI X G, XING X K, GUO S X. Ecological research of orchid mycorrhizae: A review [J]. Mycosystema, 2014, 33(4): 753–767. doi: 10.13346/j.mycosystema.140024.
盖雪鸽, 邢晓科, 郭顺星. 兰科菌根的生态学研究进展 [J]. 菌物学报, 2014, 33(4): 753–767. doi: 10.13346/j.mycosystema.140024.
- [4] HOU P Y, GUO S X. Influences of fungus *Mycena* sp. on activities of some enzymes and extracellular pH of protocorms of *Dendrobium candidum* [J]. Microbiol China, 2004, 31(2): 26–29.
侯丕勇, 郭顺星. 真菌对铁皮石斛原球茎酶活性和胞外 pH 的影响 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 26–29.
- [5] XU C, WU X Q. Drought resistance of *Pinus massoniana* seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi [J]. J W China For Sci, 2004, 41(6): 43–47. doi: 10.3969/j.issn.1672-8246.2012.06.008.
徐超, 吴小芹. 菌根化马尾松植株抗旱性研究 [J]. 西部林业科学, 2012, 41(6): 47–51. doi: 10.3969/j.issn.1672-8246.2012.06.008.
- [6] DENG Y, CHANG M S, ZHU Y Z, et al. Protective enzyme activity in leaves of different *Camellia oleifera* cultivars [J]. J S Agric, 2016, 47(5): 686–689. doi: 10.3969/j.issn.2095-1191.2016.05.686.
邓艳, 常明山, 朱英芝, 等. 不同油茶品种叶片 3 种保护酶活性分析 [J]. 南方农业学报, 2016, 47(5): 686–689. doi: 10.3969/j.issn.2095-1191.2016.05.686.
- [7] ZHU X M, HU H, LI S Y, et al. Interaction between endophytic fungi and seedlings of two species of *Paphiopedilum* during symbiotic culture [J]. Plant Div Resour, 2012, 34(2): 171–178. doi: 10.3724/SP.J.1143.2012.11144.
朱鑫敏, 胡虹, 李树云, 等. 内生真菌与两种兜兰共培养过程中的相互作用 [J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(2): 171–178. doi: 10.3724/SP.J.1143.2012.11144.
- [8] RASMUSSEN H N, RASMUSSEN F N. Trophic relationships in orchid mycorrhiza: Diversity and implications for conservation [J]. Lankesteriana, 2007, 7(1/2): 334–341. doi: 10.15517/LANK.V7I1-2.19560.
- [9] ZETTLER L W, POULTER S B, MCDONALD K I, et al. Conservation: Driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus [J]. HortScience, 2007, 42(1): 135–136. doi: 10.21273/HORTSCI.42.1.135.
- [10] CHEN B L. Re-introduction technology based on mycorrhizal fungi in the conservation of an endangered orchid: *Dendrobium loddigesii* [D]. Haikou: Hainan University, 2010: 20–56.
陈宝玲. 濒危植物美花石斛基于菌根真菌的再引入技术初步研究 [D]. 海口: 海南大学, 2010: 20–56.
- [11] XIE L, ZHANG W L, QIN L P, et al. Inoculation effects of dark septate endophytes (DSE) on the growth of *Dendrobium candidum* seedling [J]. J S Agric, 2014, 45(6): 1010–1014. doi: 10.3969/j.issn.2095-1191.2014.6.1010.
谢玲, 张雯龙, 覃丽萍, 等. 深色有隔内生真菌(DSE)引进菌株对铁皮石斛的接种效应 [J]. 南方农业学报, 2014, 45(6): 1010–1014. doi: 10.3969/j.issn.2095-1191.2014.6.1010.
- [12] HOU T W, JIN H, LIU H X, et al. Mycorrhizal specificity of *Doritis pulcherrima* in *in-vitro* research [J]. Acta Phytoecol Sin, 2010, 34(12): 1433–1438. doi: 10.3773/j.issn.1005-264x.2010.12.009.
侯天文, 金辉, 刘红霞, 等. 实验室条件下五唇兰菌根真菌专一性

- 研究 [J]. 植物生态学报, 2010, 34(12): 1433-1438. doi: 10.3773/j.issn.1005-264x.2010.12.009.
- [13] WU H F, SONG X Q, YANG F S, et al. Effects of symbiotic fungi on the physiological characteristics of *Dendrobium catenatum* Lindley (Orchidaceae) [J]. Plant Sci J, 2011, 29(6): 738-742. doi: 10.3724/SP.J.1142.2011.60738.
- 吴慧凤, 宋希强, 杨福孙, 等. 共生真菌对铁皮石斛幼苗生理特性的影响 [J]. 植物科学学报, 2011, 29(6): 738-742. doi: 10.3724/SP.J.1142.2011.60738.
- [14] LIU S, CHEN C L, LIU M, et al. Comparing the symbiotic effects of two endophytes on growth of *Cymbidium hybridum* [J]. J Huazhong Agric Univ, 2016, 35(1): 43-49.
- 刘舒, 陈春黎, 刘敏, 等. 两种内生真菌对大花蕙兰的共生效应比较 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(1): 43-49.
- [15] 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. doi: 10.3773/j.issn.1005-264x.2009.03.002.
- 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. doi: 10.3773/j.issn.1005-264x.2009.03.002.
- [16] ZHAO Y J, GUO S X, GAO W W, et al. The symbiosis of three endophytic fungi with *Cymbidium* sp. and its effects on the mineral nutrition absorption [J]. Acta Hort Sin, 1999, 26(2): 110-115. doi: 10.3321/j.issn:0513-353X.1999.02.009.
- 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物质营养吸收的影响 [J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 110-115. doi: 10.3321/j.issn:0513-353X.1999.02.009.
- [17] 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. doi: 10.1007/s00572-010-0297-3.
- [18] WANG X G, LU J S, ZHOU Z G, et al. Isolation and preliminary identification of mycorrhizal fungi from *Paphiopedilum hirsutissimum* (Orchidaceae) [J]. SW China J Agric Sci, 2016, 29(2): 316-320. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2016.02.020.
- 王晓国, 卢家仕, 周主贵, 等. 带叶兜兰菌根真菌分离和初步鉴定 [J]. 西南农业学报, 2016, 29(2): 316-320. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2016.02.020.
- [19] YI J, CHENG J, ZHANG Q X. Composition and diversity analysis on mycorrhizal fungi from four *Paphiopedilum* species in Xingyi, Guizhou [C]// Advances in Ornamental Horticulture of China. Chengdu: Chinese Society of Horticultural Science, 2017: 84-89.
- 裔景, 程瑾, 张启翔. 贵州兴义四种兜兰属植物菌根真菌的组成与多样性分析 [C]// 中国观赏园艺研究进展. 成都: 中国园艺学会, 2017: 84-89.
- [20] TIAN F, ZHU G S, GUI Y, et al. Study on isolation and culture characteristics of *Paphiopedilum micranthum* mycorrhizal fungi [J]. N Hort, 2012(7): 61-64.
- 田凡, 朱国胜, 桂阳, 等. 硬叶兜兰菌根真菌的分离及培养特性研究 [J]. 北方园艺, 2012(7): 61-64.
- [21] TIAN F, LIAO X F, YAN F X, et al. Structure and spatial distribution of mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum rigida* [J]. Jiangsu Agric Sci, 2019, 47(2): 105-108. doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.024.
- 田凡, 廖小锋, 颜凤霞, 等. 硬叶兜兰菌根结构及菌根真菌空间分布特征 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(2): 105-108. doi: 10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.024.
- [22] TIAN F, LIAO X F, WANG L H, et al. Classification and identification of mycorrhizal fungi of *Paphiopedilum micranthum* [J]. N Hort, 2017(24): 116-122. doi: 10.11937/bfy.20171417.
- 田凡, 廖小锋, 王莲辉, 等. 硬叶兜兰菌根真菌的分类鉴定 [J]. 北方园艺, 2017(24): 116-122. doi: 10.11937/bfy.20171417.
- [23] YANG J, REN J F, JIANG D Q, et al. Morphological characteristics and identification of mycorrhizal fungi from *Paphiopedilum convolutum* in Hainan [J]. Agric Inf China, 2015(22): 30-32. doi: 10.3969/j.issn.1672-0423.2015.11.010.
- 杨珺, 任军方, 姜殿强, 等. 海南卷萼兜兰菌根真菌形态学特征与鉴定 [J]. 中国农业信息, 2015(22): 30-32. doi: 10.3969/j.issn.1672-0423.2015.11.010.
- [24] SUN X Y, ZHANG W F, LIU H X. *In situ* symbiotic seed germination, isolation and identification of effective mycorrhizal fungus in *Paphiopedilum hirsutissimum* (Orchidaceae) [J]. J Trop Subtrop Bot, 2015, 23(1): 59-64. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.01.009.
- 孙晓颖, 张武凡, 刘红霞. 带叶兜兰种子原地共生萌发及有效菌根真菌的分离与鉴定 [J]. 热带亚热带植物学报, 2015, 23(1): 59-64. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.01.009.
- [25] SUN X Y. Diversity of mycorrhizal fungi Isolated from five species of the genus *Paphiopedilum* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014: 10-38.
- 孙晓颖. 五种野生兜兰植物菌根真菌多样性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2014: 10-38.
- [26] YUAN L, YANG Z L, LI S Y, et al. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China [J]. Mycorrhiza, 2010, 20(8): 559-568. doi: 10.1007/s00572-010-0307-5.

- [27] HU J F, GUO Y, LI M, et al. Research on correction coefficient from leaf area for different soybean leaf forms [J]. *J Beijing Univ Agri*, 2012, 27(1): 9–11. doi: 10.3969/j.issn.1002-3186.2012.01.003.
胡家峰, 郭远, 李梦, 等. 大豆不同叶形叶面积校正系数的研究 [J]. *北京农学院学报*, 2012, 27(1): 9–11. doi: 10.3969/j.issn.1002-3186.2012.01.003.
- [28] LI H S. *Modern Plant Physiology* [M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2012: 330–340.
李合生. *现代植物生理学* [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2012: 330–340.
- [29] HUANG Q L, YUAN Z S, LIU Y L, et al. Effect of combined inducing bacteria inoculation on the growth of *Cinnamomum camphora* var. *inaloolifera* seedlings [J]. *J SW For Univ*, 2020, 40(5): 40–47. doi: 10.11929/j.swfu.201908024.
黄秋良, 袁宗胜, 刘西琳, 等. 促生菌组合接种对芳樟苗生长的影响 [J]. *西南林业大学学报*, 2020, 40(5): 40–47. doi: 10.11929/j.swfu.201908024.
- [30] CHEN M M, CHEN B D, WANG X J, et al. Influences of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the growth and ecological stoichiometry of clover and ryegrass grown in monoculture or in mixture at different phosphorus (P) levels [J]. *Acta Ecol Sin*, 2009, 29(4): 1980–1986. doi: 10.3321/j.issn:1000-0933.2009.04.043.
陈梅梅, 陈保冬, 王新军, 等. 不同磷水平土壤接种丛枝菌根真菌对植物生长和养分吸收的影响 [J]. *生态学报*, 2009, 29(4): 1980–1986. doi: 10.3321/j.issn:1000-0933.2009.04.043.
- [31] RANIERI A, CASTAGNA A, BALDAN B, et al. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52(354): 25–35. doi: 10.1093/jexbot/52.354.25.
- [32] CHEN H J. Application and functional species and effect evaluation in microbial fertilizers [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013: 12–46.
陈慧君. *微生物肥料菌种应用与效果分析* [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013: 12–46.
- [33] VESSEY J K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers [J]. *Plant Soil*, 2003, 255(2): 571–586. doi: 10.1023/A:1026037216893.
- [34] DING C Y, QIAO H Y, SHEN Q R, et al. Control effect and action mechanism research of bio-organic fertilizer on eggplant bacterial wilt [J]. *Sci Agric Sin*, 2012, 45(2): 239–245. doi: 10.1023/A:1026037216893.
丁传雨, 乔焕英, 沈其荣, 等. 生物有机肥对茄子青枯病的防治及其机理探讨 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(2): 239–245. doi: 10.1023/A:1026037216893.
- [35] 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]. *N 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.
- [36] CHEN J H, WANG C, HUANG S R, et al. Effects of three kinds of mycorrhizal fungi on growth of *Rhynchosstylis gigantea* seedling [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2017, 44(4): 46–52. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2017.04.008.
陈金花, 王存, 黄素荣, 等. 3 株菌根真菌对海南钻喙兰幼苗生长的影响 [J]. *广东农业科学*, 2017, 44(4): 46–52. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2017.04.008.
- [37] LI J L, ZHAO Z, LUO C L, et al. Comprehensive evaluation of the effects of different light intensity and water content on the growth and physiology of *Dendrobium nobile* [J]. *J Chin Med Mat*, 2017, 40(10): 2262–2265. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2017.04.008.
李金玲, 赵致, 罗春丽, 等. 不同光照强度和水分对金钗石斛生长与生理影响的综合评价 [J]. *中药材*, 2017, 40(10): 2262–2265. doi: 10.16768/j.issn.1004-874X.2017.04.008.
- [38] WU Y D, DU C M, SHEN J, et al. Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and seedling growth of orchids [J]. *S China Agric*, 2017, 11(30): 97. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2017.10.005.
吴玉德, 杜春梅, 申健, 等. 兰科植物菌根真菌对种子萌发苗木生长的影响研究 [J]. *南方农业*, 2017, 11(30): 97. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2017.10.005.