植物生态学报 2009, **33** (3) 433~441
Chinese Journal of Plant Ecology

铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养过程中的相互作用

金 辉[1, 2, 5] 许忠祥[3] 陈金花[1, 4] 韩素芬[2] 葛 颂[1] 罗毅波[1*]

(1 中国科学院植物研究所系统与分子进化植物学国家重点实验室,北京 100093)
(2 南京林业大学森林资源与环境学院,南京 210037) (3 南京出入境检验检疫局,南京 210001)
(4 海南大学园艺园林学院,海南儋州 571737) (5 中国科学院研究生院,北京 100049)

摘 要 由于人为的滥采滥挖和野外生境的退化, 使得铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)这种名贵的中药材一直处于极度濒危的状态。为了从菌根真菌的角度给人工保育铁皮石斛提供理论指导, 对铁皮石斛的组织培养苗人工接种'GDB181'菌株(*Epulorhiza* sp.)。培养60 d后, 接菌苗平均鲜重增长率比对照苗高出了84.8%。在营养元素含量方面, 接菌苗的B、Si、Fe、Cu和Mn元素含量的净增率分别为780%、533%、192%、191%和128%, 均在100%以上; 其他元素含量也有不同程度的增加(除Zn外), 结果证明两者有效地建立了共生关系。在显微和超微结构的观察中发现: 真菌菌丝随机破坏铁皮石斛的根被入侵到外皮层, 并从外皮层细胞不断扩展延伸到皮层的大型细胞, 最后在大型细胞中被分解消化。在真菌侵染过程中, 被侵染的皮层细胞的细胞壁严重扭曲变形, 菌丝在皮层细胞形成菌丝结, 菌丝结常位于细胞核附近或包围细胞核。在皮层的大型细胞中, 菌丝细胞被植物的溶酶体包围, 部分或全部被消解, 出现脱壁或失去细胞质甚至成为空腔等变化, 最终形成衰败的菌丝残骸, 溶酶体也随之消失。溶酶体分布越多的部位, 菌丝细胞消解变形越严重。含有菌丝残骸的皮层细胞可被新侵染的菌丝重新定殖, 这一菌丝侵染被消化再侵染的过程在铁皮石斛生长发育过程中可不断重复发生。

关键词 相互作用 共生 显微结构 铁皮石斛 瘤菌根菌属

INTERACTION BETWEEN TISSUE-CULTURED SEEDLINGS OF *DENDROBIUM OFFICINALE* AND MYCORRHIZAL FUNGUS (*EPULORHIZA* SP.) DURING SYMBIOTIC CULTURE

JIN Hui[1,2,5], XU Zhong-Xiang[3] , CHEN Jin-Hua[1, 4], HAN Su-Fen[2], GE Song[1], and LUO Yi-Bo[1*]

[1]State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China, [2]College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China, [3]Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing, 210001, [4]College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China, and [5]Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract ***Aims*** *Dendrobium officinale* is an invaluable Chinese medicinal herb in China that has been threatened by over-collection and habitat deterioration. Understanding the relationship between orchids and mycorrhizae is important for the conservation of orchids. Our aim is to examine the relationship between seedling of *D. officinale* and mycorrhizae.

Methods The strain of GDB181 was identified by internal transcribed spacer (ITS) sequencing. We inoculated tissue culture seedlings of *D. officinale* with GDB181 (*Epulorhiza* sp.) and used ICP-AES to measure the mineral element content of the seedlings. We observed slices of the orchid mycorrhizae under light and electron microscopes.

Important findings Seedlings of *D. officinale* and the inoculation strain formed symbiosis effectively. The growth of seedlings was promoted by the mycorrhizal fungus. As compared with the control, inoculated seedlings had 84.8% greater average rate of increase of fresh weight. The mineral contents were elevated except Zn; the contents of B, Si, Fe, Cu and Mn in inoculated seedlings were increased by

收稿日期: 2008-08-15 接受日期: 2009-01-13
基金项目: 国家科技支撑项目珍稀濒危鸟类和植物繁育技术与示范(2008BAC39B05)和国家自然科学基金(30371190)
* 通讯作者 Author for correspondence E-mail: luoyb@ ibcas. ac. cn
E-mail of the first author: comefine@ ibcas. ac. cn

780%, 533%, 192%, 191% and 128%, respectively. Fungal hyphae entered the exodermis by breaking the velamen randomly and infected other cells continuously by means of penetrating the cell wall. Lastly, the hyphae inhabited the large cells of the cortex and were digested. The cell wall of the cortical cells were distorted and deformed by infection by the hyphae, and many pelotons formed in exodermis and cortex. Pelotons were often found near or encircling the nucleus. The invaded fungal hyphae were surrounded and dissolved by lysosomes partly or completely. With changes of the hyphae from losing cell wall or cytoplasm to remaining cavum, the lysosomes disappeared gradually. More hyphae were dissolved and deformed if there were more lysosomes near them. The cortex cells containing degenerated hyphae were frequently recolonized by hyphae, and the hyphal digestion and the reinfection of cortex cells occurred repeatedly throughout all growing stage of *D. officinale*.

Key words interaction, symbiosis, microstructure, *Dendrobium officinale*, *Epulorhiza* sp.

DOI: 10.3773/j.issn.1005-264x.2009.03.002

兰科植物是典型的内生菌根植物。目前发现，几乎所有的兰科植物在生长发育的过程中，都能与相应的菌根真菌建立共生关系。甚至有超过100种的兰科植物完全没有叶绿体(Leake, 2005)，它们的整个生长发育都依靠与其共生的菌根真菌提供营养。真菌以菌丝结(Pelotons)的形式存在于兰科植物的皮层细胞内(Burgeff, 1936)。现在普遍认为，兰科植物通过消解皮层细胞中的真菌菌丝来获得营养(Burgeff, 1936; Rasmussen, 1995)。Smith (1966)发现*Rhizoc- tonia solani* 能为兰科植物幼苗的生长提供充足的营养。许多公认的兰科植物菌根真菌属于*Rhizoctonia*类，其中包括*Thanaephorus*、*Ceratob- asidium*、*Serendipita*、*Tulasnella*和*Oliveonia* (Roberts, 1999; Moore, 1987)。

铁皮石斛(*Dendrobium officianle*)为兰科石斛属植物，不仅是中国的特有种，也是传统的名贵中药材(吉占和等, 1999)。铁皮石斛种子自然繁殖系数低，野生资源稀少。近几十年来，人们在高额利润的驱动下，常年毫无节制地采挖，不仅使野生状态的铁皮石斛数量急剧减少，而且严重破坏了铁皮石斛的野外生境，致使其处于濒临灭绝的边缘。因此，在采用法律手段，加强管理的同时，发展有效的铁皮石斛扩繁和保育技术刻不容缓。随着组织培养技术的发展和应用，铁皮石斛的组培技术已基本成熟；但是，组培苗移栽后，成活率低、生长缓慢，这些都和缺少与之共生的菌根真菌有关。目前，国内对于石斛属菌根的研究还处于形态和结构的描述(范黎等, 2000; 陈连庆等, 2002b)，以及对菌根真菌的常规分离、形态鉴定和代谢产物的简单测定等方面(高微微和郭顺星, 2001; 宋经元和郭顺星, 2001; 吴静萍和郑师章, 1994; 范黎等, 1998; Guo *et al.*, 1999; 王春兰等, 2001; 郭顺星等, 2000; 陈连庆等, 2002a; 陈瑞蕊等, 2004)。本研究拟通过对铁皮石斛组培苗接种菌根真菌，通过苗的生长情况及菌根解剖结构，探讨铁皮石斛幼苗生长过程中与菌根真菌之间的相互作用，为铁皮石斛无菌苗人工接种菌根真菌，提高移栽成活率，促进其快速生长发育提供技术基础。

1 材料和方法

1.1 材 料

2003年在浙江富阳采集野生铁皮石斛蒴果样品，实验室内利用种子无菌萌发获得幼苗。供接种的菌株由安徽岳西野生蕙兰(*Cymbidium faberi*)新鲜营养根中分离纯化得到，编号为GDB181(现保存于中国科学院植物研究所系统与分子进化植物学国家重点实验室)。铁皮石斛与菌根真菌共培养于DE培养基，配方为：1.0 mmol·L^{-1} $CaCl_2$, 0.5 mmol·L^{-1} $MgSO_4$, 1.0 mmol·L^{-1} K_2SO_4, 0.4 mmol·L^{-1} KH_2PO_4, 100 μmol·L^{-1} $FeSO_4$, 25 μmol·L^{-1} H_3BO_4, 33 μmol·L^{-1} $MnCl_2$, 2.8 μmol·L^{-1} $ZnSO_4$, 1.0 μmol·L^{-1} $NaMoO_4$, 140 μmol·L^{-1} Na_2EDTA, 1.0 g ·L^{-1} 酵母汁, 8.0 g ·L^{-1} 琼脂(Dijk & Eck, 1995)。

1.2 方 法

1.2.1 GDB181菌株鉴定

DNA提取：在PDA平板培养基上活化菌株后，取菌块置于PDA液体培养基中，25 ℃，180 r ·min^{-1}振荡培养。待有大量菌球产生时，无菌条件下，挑取4~5个直径约为5 mm的菌球于1.5 ml

的离心管中。采用天根生化科技(北京)有限公司提供的新型植物基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)提取菌根真菌的DNA。

DNA扩增: 利用引物ITS1/ITS4和ITS4/ITS5分别通过PCR(Polymerase chain reaction)对核糖体DNA上的ITS区域进行扩增(White *et al*., 1990)。PCR的反应体系(20 μl)包括: 2 μl 10×PCR buffer, 2 μl (5 mmol·L^{-1})的各种引物, 2 μl (2.5 mmol·L^{-1}) dNTP, 0.15 μl *Taq* polymerase, 0.5 μl DNA, 11.35 μl ddH_2O。PCR的反应条件依据Gardes和Bruns (1993)。

序列测定: PCR产物利用北京赛百盛基因技术有限公司提供的硅胶膜型^{TM}PCR产物(DNA片段)纯化试剂盒进行纯化回收。DNA用50 μl无菌ddH_2O 洗提。用引物ITS1/ITS4和ITS4/ITS5分别进行测序。测序反应体系为10 μl, 内含0.5 μl BigDye, 1.75 μl BigDye buffer, 0.64 μl (5 mmol·L^{-1})引物, 60~120 ng DNA。在MegaBACE-1000 (Amershanm Pharmacia Biotech) DNA测序仪上进行序列测定。

序列分析: 得到的序列文件用软件ContigExpress(Informax Inc., North Bethesda, MD)进行校对, 然后通过BLAST搜索在GenBank中进行ITS序列比对(NCBI网址: http:// www.ncbi.nlm.nih.gov)。

1.2.2　铁皮石斛组培苗的接种

铁皮石斛组培苗经生根培养后, 选择根长在1.0~1.5 cm左右的健壮幼苗, 在无菌环境中准确称重(精确到0.01 g)后, 以“品字形”接入圆形玻璃组培瓶(容积500 ml,瓶口内径6 cm)中的定量(125 ml/瓶)共生培养基中, 每瓶3株幼苗。5 d后, 选取10瓶无污染的苗, 用打孔器(直径0.5 cm)打取在PDA平板培养基上活化的‘GDB181’菌株琼脂块, 每瓶接入一个染菌的琼脂小块, 置于“品字形”的中心, 使染菌琼脂块离3株幼苗的距离相同; 另取10瓶无污染苗在相同位置接入同等量的无菌琼脂块做为对照。所有接菌处理苗和对照苗均置于温度为(25±1) ℃, 湿度保持在75%~80%, 光照强度为1 000~1 500 lx,每天的光照时间比为16:8 (h:h)的组培室内培养。

1.2.3　平均鲜重增长率的计算

与菌根真菌共培养60 d后, 取出接菌苗和对照苗, 洗净根部残留的琼脂, 用滤纸吸干水分, 分别准确称取接菌苗与对照苗的重量, 结合处理前的重量, 计算平均鲜重增长率。计算公式为:

$$\text{平均鲜重增长率}(\%)^{*}=\frac{\text{接菌60 d后的重量}-\text{接菌前的重量}}{\text{接菌前的重量}}\times 100\%$$

*: 计算公式中苗的重量均为30株苗的总重量

1.2.4　接菌苗矿质元素含量测定

随机抽取铁皮石斛菌根苗和对照苗各15株置于80 ℃的烘箱中烘干, 粉碎后过60目筛。将粉末在105 ℃下烘至恒重, 准确称取0.500 0 g (精确至0.000 1)样品, 采用混合酸(HNO_3:$HClO_4$=5:1)消煮法提取苗内的矿质元素, 用ICP-AES(电感耦合等离子体原子发射光谱仪)测定苗内各元素含量。

1.2.5　石蜡切片的制备与观察

在铁皮石斛菌根苗和对照苗中随机选取5株, 每株截取2~3 mm长的新生营养根2段, 迅速固定于FAA固定液中, 常规石蜡切片法, 包埋, 切片, 厚度8 μm, 番红固绿对染, 加拿大树胶封片。选取完整的、染色效果理想的切片于光学显微镜下观察并拍照。

1.2.6　超薄切片的制备与观察

在与制备石蜡切片相同的铁皮石斛根的部位, 切取约1 mm^3的根块, 在0.1 mol·L^{-1}磷酸缓冲液配置的3.5%戊二醛中固定2~8 h, 经缓冲液清洗后于1%锇酸溶液中后固定2 h, 清洗后, 丙酮系列脱水, 环氧丙烷过渡, 环氧树脂Epon 812渗透、包埋, LKB-V型超薄切片机切片, 厚度50 nm , 醋酸铀柠檬酸铅双重染色, H-600型透射电镜观察拍照。

2　结　果

2.1　菌株鉴定结果

两对引物ITS1/ITS4和ITS4/ITS5均能对GDB181菌株核糖体DNA上的ITS区域扩增出690 bp左右的特异条带, 根据1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测结果粗略估计, 扩增产物的DNA浓度约为17 ng·μl^{-1}, 所用Marker为天根生化科技(北京)有限公司提供的D2000(图1A)。测序结果校对后, 在Genbank中BLAST结果为*Epulorhiza* sp.(瘤菌根菌属的一种), 最大相似度(Max identical rate)达到100%, 目录号(Accession no.)为: EF393626。

2.2　铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养结果

铁皮石斛组培苗接菌20 d后, 生长势比对照

旺盛，已开始长新根；随着时间的推移，接菌苗和对照苗的差异更显著。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1B)；而对照苗基部已出现发黄叶片，基本无新根产生，生长势较差(图1C)。接菌苗的平均鲜重净增率高达107.02%，而对照苗只有22.22%，比对照苗高出了84.8%。在营养元素含量方面，接菌苗的B、Si、Fe、Cu和Mn元素含量的净增率分别为780%、533%、192%、191%和128%，均在100%以上；其他元素含量也有不同程度的增加，P元素含量的净增率最低的为7.36%；只有Zn元素含量净增率为负值，说明接种菌根真菌之后，铁皮石斛苗Zn元素的含量降低了(表1)；对接菌苗的根进行重分离获得了原接种菌株‘GDB181’。由此可见，铁皮石斛组培苗与菌根真菌‘GDB181’之间建立了共生关系，菌根真菌对铁皮石斛幼苗的生长和营养元素的吸收，特别是B、Si、Fe、Cu和Mn等微量元素的吸收起到了极大的促进作用。

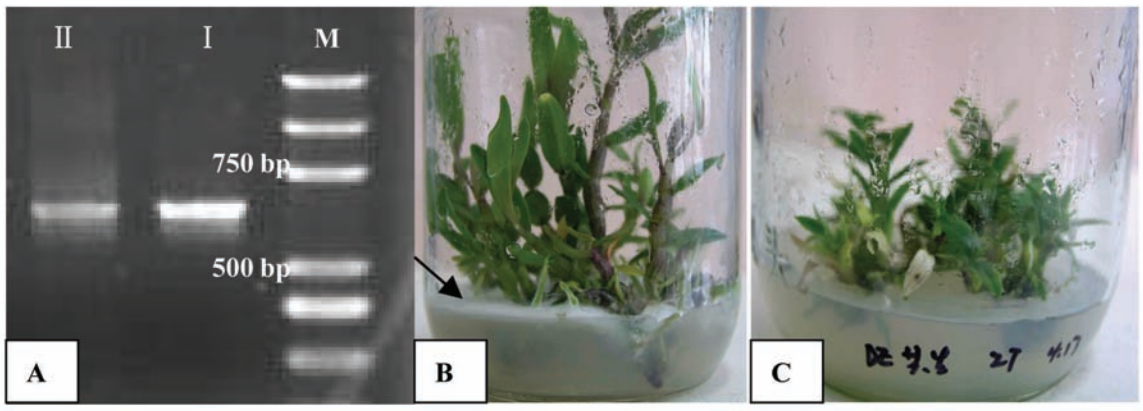

图1 GDB181菌株的DNA ITS PCR扩增图谱及培养60 d后的接菌苗和对照苗

Fig. 1 The electrophoretic picture of ITS PCR and seedlings of *Dendrobium officianle*

A:示接种菌株DNA上的ITS区域的大小 The length of ITS reigon of the mycorrhizal fungus M: Marker I: 引物ITS1/ITS4扩增的片段 Amplified by ITS1/ITS4 II: 引物ITS4/ITS5扩增的片段 Amplified by ITS4/ITS5 B: 示接菌60 d后的菌根苗(黑色箭头示接种菌) Seedlings of *Dendrobium officinale* cultured symbiotically on DE with mycobionts ‘GDB181’ after 60 d (black arrow shows the mycorrhizal fugus) C: 培养60 d后未接菌的对照苗 The control seedlings

表1 与菌根真菌共培养60 d后铁皮石斛苗营养元素含量

Table 1 Nutrition elements content of the inoculated seedlings

	营养元素种类与含量 Nutrition elements types and contents ($mg \cdot g^{-1}$)											
	B	Si	Mn	Cu	Fe	P	Zn	Mg	S	Na	Ca	K
CK	0.005	0.003	0.115	0.178	0.196	1.985	2.293	2.606	3.060	4.898	5.037	12.82
GDB181	0.044	0.019	0.262	0.518	0.572	2.131	0.946	3.12	3.705	7.130	6.381	20.10
净增率 Net increasing rate (%)	780	533	128	191	192	7.36	-58.7	19.7	21.1	45.6	26.7	56.8

2.3 菌根真菌侵染铁皮石斛的过程

铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养的过程中，菌根真菌由接种点向铁皮石斛根系生长蔓延，菌丝首先接触到铁皮石斛的根被，并在根被外积聚(图2A、2B)。菌丝通过破坏根被进入外皮层细胞(图2B)。在外皮层细胞内，有一部分真菌以一条或多条菌丝弯曲聚集，形成环状或簇状的成股菌丝，也叫菌丝结，菌丝结占据了细胞的大部分空间，有的甚至充满整个细胞(图2B、2D)；另一部分真菌由外皮层细胞向皮层细胞扩展，可见到菌丝由一个细胞进入相邻细胞(图2C、2D)，皮层细胞是菌根真菌栖息的主要场所。被真菌侵染的皮层细胞的细胞壁严重扭曲变形，细胞内含物，如质体、多糖颗粒等分解消失，细胞核异常膨大，菌丝常位于细胞核附近(图2E、2F)，细胞核异常膨大可能与调控皮层细胞对菌丝的消解有关。菌丝结与细胞核在光学显微镜下极易区分，前者大，形状不规则，根据活力的不同呈墨绿色、深紫到

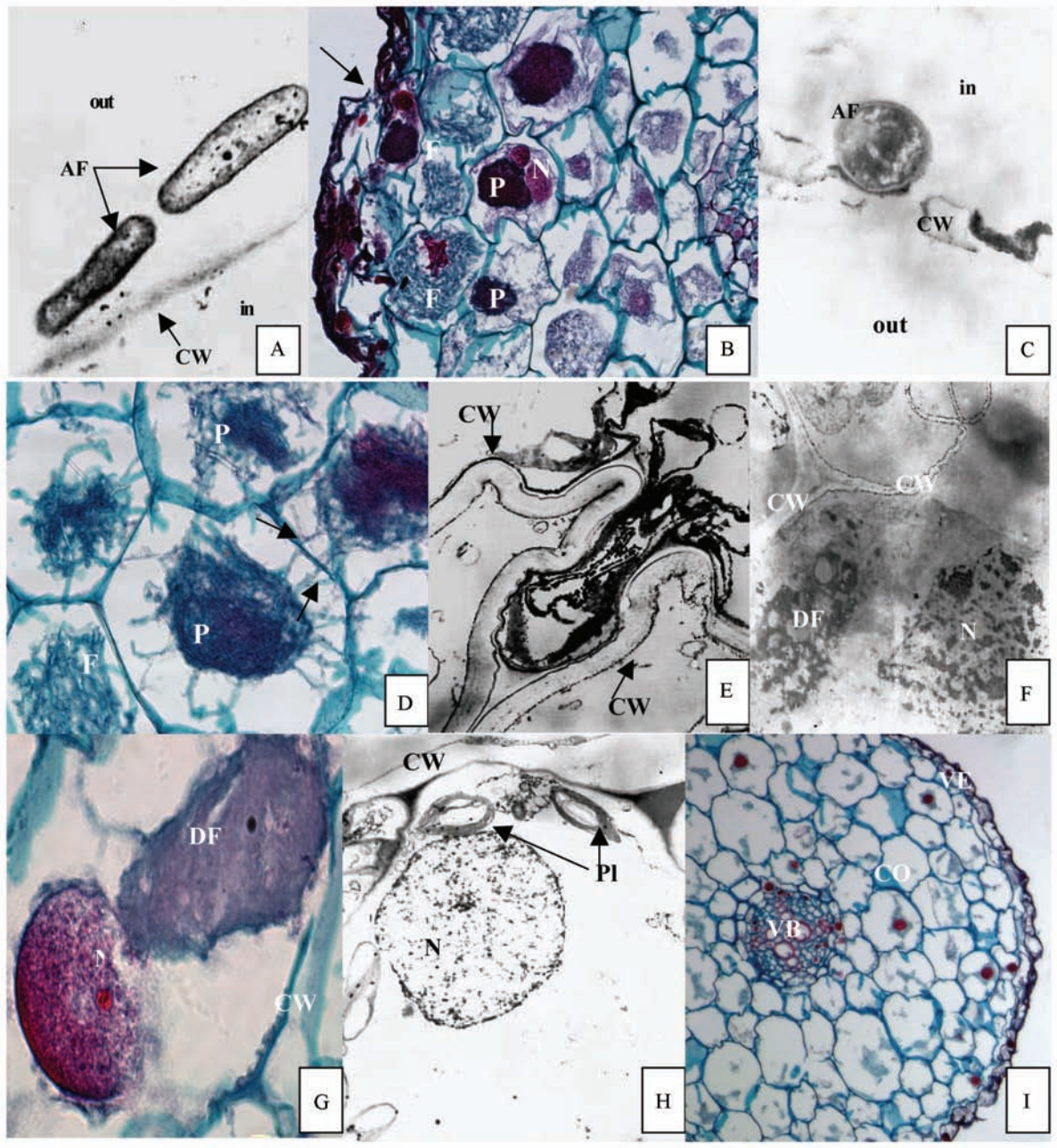

图2　菌根真菌侵染铁皮石斛的过程

Fig. 2　The course of mycorrhizal fungus infect *Dendrobium officinale*

AF: 有活力的菌丝 Active fungus　CW: 细胞壁 Cell wall　P: 菌丝结 Peloton　F: 真菌菌丝 Fungus　N: 细胞核 Nucleus　DF: 消解衰败菌丝 Degenerate fungus　Pl: 质体 Plastid　VE: 根被 Velamina　CO: 皮层 Cortex　VB: 髓 Vascular Bundle

A: 根被外的菌丝细胞 The fungi lie in the out of velamina, ×20 000　B: 菌丝随机破坏根被入侵并在皮层中形成菌丝结(箭头示破损的根被) Shows the hyphae infected randomly and formed pelotons in the cortex cells (black arrow shows the destructed cell wall), ×200　C: 菌丝破坏皮层细胞的细胞壁从一个细胞进入另一个细胞 The hyphae infected by breaking the cell wall, ×10 000　D: 皮层细胞菌丝结及具菌丝由一个细胞进入另一个细胞(箭头示菌丝穿壁) The pelotons (black arrows show the penetrating hyphae), ×400　E: 染菌细胞的细胞壁严重扭曲变形 The deformed and distorted cell wall, ×4 000　F: 菌丝细胞在细胞核附近被消解, 细胞核变形膨大 The degenerated fungus and deformed nucleus, ×6 000　G: 边缘松散并开始消解的菌丝结及部分消解的细胞核 The degenerated hyphae and nucleus, ×1 000　H: 未染菌的皮层细胞, 示正常完整的细胞核及其他细胞器 The normal root cell, shows the intact nucleus and other cell organelle, ×3 500　I: 未染菌的根 The normal root slice, ×100

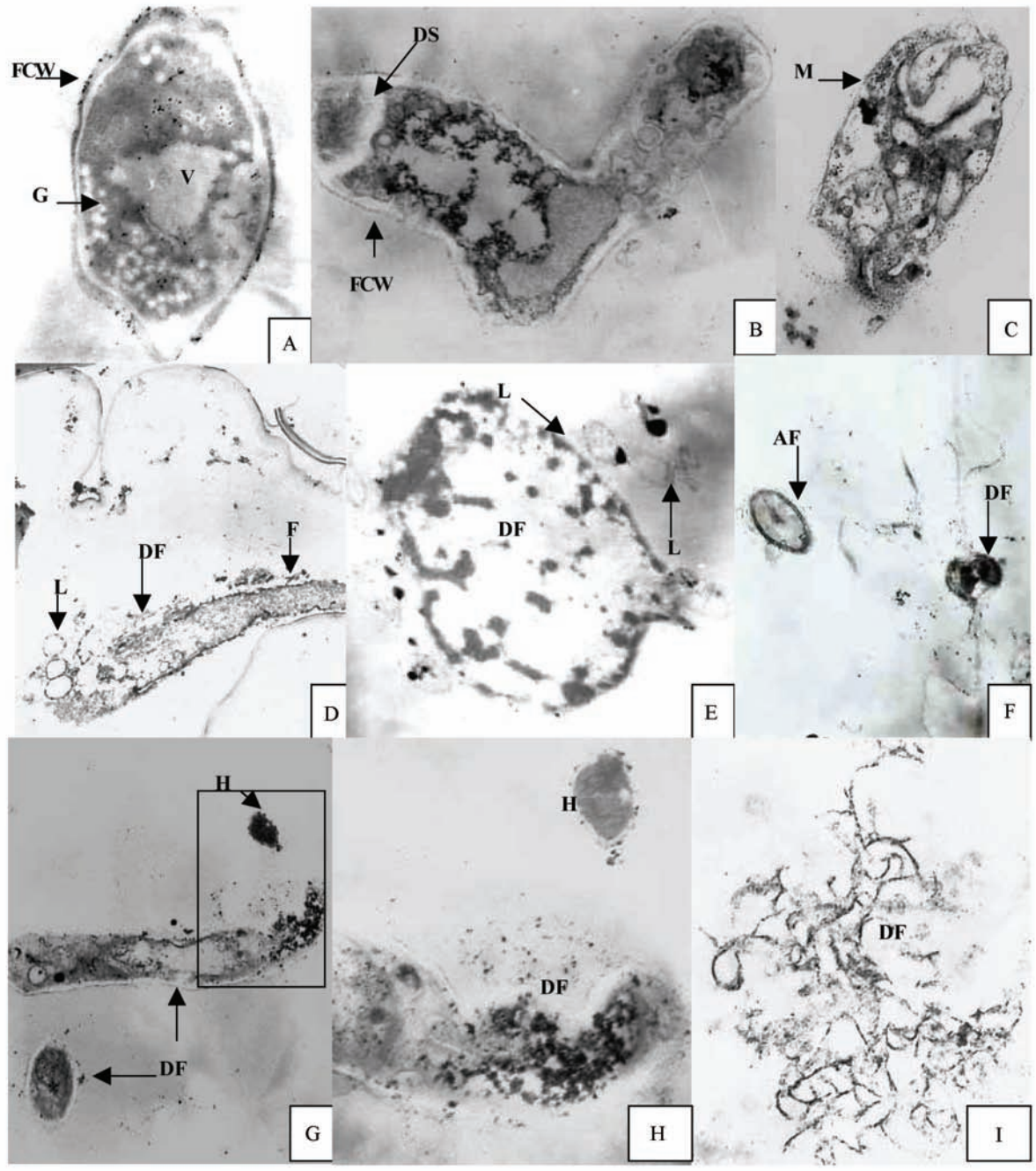

图3 菌根真菌的消解过程

Fig. 3 The ultrastructure of mycorrhizal fungi in the course of being digestd

FCW: 菌丝细胞壁 Fungal cell wall G: 菌丝细胞的淀粉粒 Granulose V: 液泡 Vacuole DS: 桶孔隔膜 Dolipore septum M: 细胞膜 Membrane L: 溶酶体 Lysosome H: 菌丝 Hypha

A: 结构完整, 有活力的菌丝细胞 Active fungus, ×25 000 B: 逐渐开始消解的菌丝细胞 Degenerating hypha cell, ×20 000 C: 细胞壁及质膜已消失, 原生质体开始释放的菌丝细胞 Degenerated hypha cell, ×35 000 D: 有溶酶体积聚的菌丝细胞(纵切) The hypha cell was encircled with lysosomes,×6 000 E: 菌丝细胞崩解, 溶酶体包围并进入内部空腔中 The lysosomes encircled and entered the degenerated fungus, ×10 000 F: 新入侵菌丝细胞及开始消解的菌丝细胞 Active and degenerate hypha in one cortex cell, ×15 000 G: 处于不同消解阶段的菌丝细胞 Active and degenerate hypha in one cortex cell, ×15 000 H: 上张方框区域的放大 Active and degenerate hypha in one cortex cell, ×40 000 I: 菌丝细胞消解后留下的残骸 The degenerated fungus, ×15 000

浅紫色等染色反应; 后者相对小, 一般近圆形, 边缘光滑, 染色反应呈红色(图2G)。真菌菌丝入侵是随机的, 菌丝和菌丝结在皮层组织中分布也是不均匀的, 并定位在一定的皮层细胞群中(图2B)。失去活力的菌丝结着色较浅, 边缘较松散, 已开始被分解消化成衰败的菌丝(图2B, 2G); 也有一些处于分解阶段的菌丝结呈现凝胶状(图2B, 2G), 可能是寄主细胞限制真菌菌丝继续扩展的一种反应或者是真菌自身的酶系进行酶解自溶的过程。

在未接菌的对照铁皮石斛根中, 均未见到上述染菌结构, 切片反映出正常的根结构, 可以观察到皮层细胞壁完整且未扭曲变形, 细胞内有大量的细胞器, 细胞核正常(图2H); 对照苗的根被完整, 在皮层细胞中未出现菌丝结(图2I)。

2.4　菌根真菌消解过程中超微结构的变化

刚侵入皮层细胞的真菌菌丝, 细胞壁和质膜完整, 内含物丰富, 细胞器清晰可见(图3A), 具有进一步再侵染的能力。随后, 有些菌丝细胞壁部分或全部消解, 仅剩质膜包围的原生质体; 或者甚至部分质膜也消失, 这时菌丝的细胞物质也被降解, 出现部分中空, 但仍可见部分内含物和明显的桶孔隔膜(图3B, 3C)。另有部分菌丝细胞周围积聚了大量溶酶体, 其中部分溶酶体已进入菌丝细胞中, 菌丝细胞内含物消失, 仅保留菌丝外形或已被消解成残败的碎片(图3D, 3E)。中空的菌丝细胞和溶酶体在外观上极易区分, 前者保留菌丝细胞的大小, 壁较厚而色深, 有的腔内仍保留核的残迹及少量的原生质体; 后者大小差别较大, 仅有一层膜, 为中空的囊状结构(图3D, 3E)。溶酶体分布越多的部位, 菌丝消解变形越严重(图3D, 3E)。最终菌丝被消解吸收, 只留残骸, 溶酶体也随之消失(图3I)。

在铁皮石斛皮层细胞中, 可同时出现有活力的完整菌丝细胞、刚开始脱壁消解的菌丝细胞和已被消解出现中空的菌丝细胞(图3F, 3G, 3H), 含有衰败菌丝的细胞中可被新的菌丝重新定殖, 然后新的菌丝又被细胞消化吸收, 菌丝被消化及菌丝的重新定殖在铁皮石斛整个生长发育过程中可不断重复, 从而源源不断地为铁皮石斛提供营养。

3　讨　论

菌根真菌(*Epulorhiza* sp.)能促进铁皮石斛幼苗的生长, 接菌的铁皮石斛苗生长势旺盛, 苗色浓绿, 茎粗壮呈红紫色, 产生新根多, 根系发达, 在生物量和各营养元素含量上也明显比未接菌的苗高; 营养根中重分离获得原接菌菌株。这些都表明*Epulorhiza* sp.菌株已与铁皮石斛组培苗有效共生并形成了菌根。接菌苗的各营养元素含量都有不同程度的增加(除Zn外), 其中大量元素K的含量升高明显; 微量元素中B、Si、Fe、Cu和Mn元素的净增率尤为惊人。这与赵杨景等(1999)用从开唇兰(*Anoectochiuro xburghit*)、墨兰(*Cymbidium sinense*)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(陈连庆等, 2002b)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。另外, Richardson等(1992)在处于消解阶段的菌丝结中发现了高浓度的磷脂聚合物, 并检测到Mg^{2+}、K^{+}和Ca^{2+}等离子, 也进一步证实了菌根真菌对兰科植物吸收营养元素的促进作用。在本实验中, 还观察到接菌苗新生根的数目远远多于对照苗, 故认为菌根真菌的入侵刺激铁皮石斛产生大量新根, 产生的新根可供菌根真菌入侵形成菌根, 源源不断地提供营养, 从而大大促进了铁皮石斛幼苗生长。

根据我们的观察, 位于大型消化细胞中的菌根真菌菌丝结的消解主要有两种方式: 一种是菌丝细胞自身的酶系进行酶解, 使细胞壁和质膜消解破损, 原生质从细胞中扩散并被消化; 另一种是被铁皮石斛细胞内的溶酶体消解, 溶酶体通过膜的内陷把菌丝细胞的物质吞噬消化; 或者溶酶体膜破损后, 释放各种水解酶消解菌丝组织。这两种方式可以同时进行, 达到消解入侵菌丝的共同目的, 但是后者是消解入侵菌丝并转化成营养物质的主要形式。Hadly和Pegg (1989)认为, 当处于消解过程的菌丝空腔内出现酸性磷酸酶时, 意味着在衰败菌丝中产生了自我分解的物质, 但也有可能是植物细胞分泌的酶进入了衰败菌丝的空腔, 因此可以看出, 两种消解方式是密不可分的。同样, 郭顺星和徐锦堂(1990)推测在天麻(*Gastrodia elata*)胚细胞中的紫萁小菇(*Mycena osmundicola*)菌丝细胞的细胞质消失, 也是上述两种消化方式导致, 但他认为前者更合理。同一个细胞可被菌根真菌重复侵染、定殖并被消解多

次，这一过程贯穿于铁皮石斛幼苗生长的始终，在天麻种子萌发成原球茎的过程中，范黎等(1999)也发现含有衰败菌丝的原球茎细胞会被新入侵菌丝重新定殖的现象。

入侵的菌根真菌在皮层细胞的细胞核附近形成菌丝结，有的甚至包围细胞核；并且在菌丝结消解过程中，同时伴随着细胞核异常膨大变形直到分解消失的过程，这些都说明了入侵的菌丝与植物细胞核间存在着紧密的联系，并且也反映了植物细胞旺盛的新陈代谢活性。植物细胞消解菌丝的过程中需要多种酶的参与，而酶的合成需要细胞核产生的大量RNA，因此细胞核的异常膨大可能是信使RNA在核内的暂时积累，而后随着核的破裂变形，信使RNA也被释放到细胞质中，来参与酶的合成(Barroso & Pais, 1990)。

在铁皮石斛的皮层细胞中，并不是所有的细胞都能被菌根真菌侵染并定殖，未被侵染的细胞是通过何种方式阻止菌丝入侵的，或者菌根真菌是如何选择侵入的目标细胞的，二者之间是否存在信号物质的引导和交流？另外，菌丝在消解过程中产生的营养物质是通过何种方式和途径输出到输导组织的，消解产生的菌丝残渣的成分及去向？以上疑问的解开有待进一步的深入研究。

参 考 文 献

Barroso J, Pais MS (1990). Nuclear features in infected roots of *Ophrys lutea* Cav. (Orchidaceae). *New Phytologist*, 115, 93–98.

Burgeff H (1936). *Samenkeimung der Orchideen*. Gustav Fischer, Jena.

Chen LQ (陈连庆), Pei ZD (裴致达), Han NL (韩宁林), Zhang SY (张守英) (2002a). Investigation on growth characteristics of *Dendrobium*'s mycorrhizal fungi in liquid-culture. *Forest Research* (林业科学研究), 15, 207–211. (in Chinese with English abstract)

Chen LQ (陈连庆), Pei ZD (裴致达), Han NL (韩宁林), Zhang SY (张守英) (2002b). The form, structure and element component of mycorrhizas in *Dendrobium spp*. *Forest Research* (林业科学研究), 15, 96–100. (in Chinese with English abstract)

Chen RR (陈瑞蕊), Shi YQ (施亚琴), Lin XG (林先贵), Zhang N (张宁), Tang WG (汤卫国) (2004). Effect of inoculation of orchid mycorrhizal fungi on growth of tissue-cultured *Dendrobium* seedlings. *Soil* (土壤), 36, 658–661. (in Chinese with English abstract)

Dijk E, Eck ND (1995). Effects of mycorrhizal fungi on *in vitro* nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species. *Canadian Journal of Botany*, 73, 1203–1211.

Fan L (范黎), Guo SX (郭顺星), Xiao PG (肖培根) (2000). A study on the mycorrhizal microstructure of six orchids. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学通报), 17, 73–79. (in Chinese with English abstract)

Fan L (范黎), Guo SX (郭顺星), Xiao PG (肖培根) (1998). Basidiomycetous endophytes from the roots of nineteen orchids. *Chinese Journal of Tropical Crops* (热带作物学报), 19, 78–82. (in Chinese with English abstract)

Fan L (范黎), Guo SX (郭顺星), Xu JT (徐锦堂) (1999). Ineteraction between protocorms of *Gastrodia elata* (Orchidaceae) and *Mycena dendrobii* in symbiotic germination. *Mycosysterna* (菌物系统), 18, 219–225. (in Chinese with English abstract)

Gao WW (高微微), Guo SX (郭顺星) (2001). Effects of endophytic fungal hyphae and their metabolites on the growth of *Dendrobium officinale* and *Anoectochilus roxburghii*. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* (中国医学科学院学报), 23, 556–559. (in Chinese with English abstract)

Gardes M, Bruns TD (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118.

Guo SX (郭顺星), Cao WQ (曹文芩), Gao WW (高微微) (2000). Isolation and biological activity of mycorrhizal fungi from *Dendrobium officinale* and *D. nobile*. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 25, 338–341. (in Chinese with English abstract)

Guo SX, Fan L, Cao WQ, Chen XM (1999). *Mycena dendrobii*, a new mycorrhizal fungus. *Mycosystema* (菌物系统), 18, 141–144.

Guo SX (郭顺星), Xu JT (徐锦堂) (1990). Studies on the cell ultrastructure in the course of *Gastrodia elata* digesting *Mycena osmundicola* Lange and *Armillaria mellea* FR. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), 9, 218–225. (in Chinese with English abstract)

Hadly G, Pegg GF (1989). Host-fungus relationships in orchid mycorrhizal systems. In: Pritchard HW ed. *Modern Methods in Orchid Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, 51–71.

Leake JR (2005). Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the "saprophytic" plant myth. *Mycologist*, 19, 113–122.

Moore RT (1987). The genera of Rhizoctonia-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza*, gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*,

29, 91−99.

Rasmussen HN (1995). *Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge.

Richardson KA, Peterson RL, Currah RS (1992). Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Plantanthera hyperborean* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany*, 70, 291−300.

Roberts P (1999). *Rhizoctonia-forming Fungi*: *A Taxonomic Guide*. Royal Botanic Gardens, Kew.

Smith SE (1966). Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist*, 65, 488−499.

Song JY (宋经元), Guo SX (郭顺星) (2001). Effects of fungus on the growth of *Dendrobium officinale* and *D. nobile in vitro* culture. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* (中国医学科学院学报), 23, 547−551. (in Chinese with English abstract)

Tsi ZH (吉占和), Chen SC (陈心启), Luo YB (罗毅波), Zhu GH (朱光华) (1999). *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志). Science Press, Beijing. (in Chinese)

Wang CL (王春兰), Chen XM (陈晓梅), Guo SX (郭顺星), Liu XM (刘新民), Sun SM (孙绍美), Wang SP (王圣平), Shang WF (尚伟芬) (2001). Studies on pharmacological activity of *Mycena dendrobii*. *Microbiology* (微生物学通报), 28,73−76. (in Chinese with English abstract)

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Snisnsky JJ, White TJ eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA. 315−322.

Wu JP (吴静萍), Zheng SZ (郑师章) (1994). Isolation and identification of *Fusarium* sp. From mycorrhiza fungus in *Dendrobium densiflorum* and analyses of its metabolites. *Journal of Fudan University (Natural Science Edition)* (复旦学报(自然科学版)), 33, 547−552. (in Chinese with English abstract)

Zhao YJ (赵杨景), Guo SX (郭顺星), Gao WW (高薇薇), Du S Y (杜淑燕) (1999). The symbiosis of three endophytic fungi with *Cymbidium* sp. and its effects on the mineral nutrition absorption. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 26, 110−115. (in Chinese with English abstract)

责任编委: 李晓林　责任编辑: 李　敏