

## 石斛菌根化组培苗对 N 素的吸收利用

陈连庆 王小明 裴致达

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 富阳 311400)

**摘 要:** 石斛组培苗吸收利用 N 素营养的研究结果表明:不同 N 源对菌根化石斛组培苗生长(苗高、茎粗和生物量)的促进效应,以 N 源酒石酸铵为最好。酒石酸铵 N 源对石斛菌根真菌 F9903 菌株菌丝体增殖量也为最大值,所以酒石酸铵堪称两者增殖生长的最佳 N 源。同时,显示它们之间存在着密切的互动关系。浓度不同的酒石酸铵影响着菌根化石斛苗的生长和 N、P、C 元素的吸收与积累。方差分析结果表明,2.72 mol·L<sup>-1</sup> 的酒石酸铵是培育菌根化石斛苗的最适宜浓度。

**关键词:** 石斛; 菌根化; N 营养

**中图分类号:** S723.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7488(2007)增 1-0048-05

### Absorption of N-element in *Dendrobium* Plants Cultivated from Tissues and Mycorrhized

Chen Lianqing Wang Xiaoming Pei Zhida

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF Fuyang 311400)

**Abstract:** The results of the study on the absorption of N nutrition in the plants of *Dendrobium* cultured from tissues show that (NH)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> as N source is the best for promoting the growth (height, diameter of stem and biomass) of the plants which have mycorrhizae. Also, (NH)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> can promote growth of mycelium of F9903 which is a strain of mycorrhiza of *Dendrobium*. So, (NH)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> is a best N source for the propagations of both the plants and the mycorrhiza mycelium. There is a strong interaction between the plants and their mycorrhizae. Different concentrations of (NH)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> can effect the growth of *Dendrobium* plants and absorptions of the mycorrhizae to N, P and C. Through a variance analysis, it has shown that the 2.72 mol·L<sup>-1</sup> of (NH)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> is the most suitable concentration for culturing plants of *Dendrobium*.

**Key words:** *Dendrobium*; mycorrhized; nitrogen nutrition

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)是兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)的草本植物,是我国传统名贵的中药材,是石斛药材中的上品。久经长期拔采药用,野生资源已濒临枯竭。1992 年被我国“红皮书”列为濒危植物,受国家一级重点保护(傅立国等,1992)。为了保护与发展石斛资源,同时满足人类的需求药用,人工栽培石斛是唯一出路。研究菌根化石斛组培苗吸收、积累 N 素营养规律,对揭示石斛人工栽培营养机理具有重要意义。

铁皮石斛气生根与真菌共生形成内生型的“兰科菌根”,它依赖其菌根吸收水分和营养,供其正常生长与发育。石斛的菌根与其他内生型菌根(AM 菌根、杜鹃类菌根)比较,不仅侵染的真菌种类与结构不同,而且石斛菌根是附生于疏水岩石和树皮上,属于菌根气生型。它既有吸收、固定和保护的功能,又含有叶绿素进行光合作用而自养,与地生植物菌根比较,其菌根功能更优越和独特(弓明钦等,2000;陈连庆等,2002a;2002b)。石斛气生菌根除从空气雾水和降雨中,能获得少量的营养外,主要通过菌根根外菌丝对周边的枯木或残存有机物,进行分解与吸收,并通过菌丝桥网络与根细胞构建通道,传递各种营养和水分,供石斛生长与发育之所需。N 素是体细胞、活性物质和酶类等有机物质的基础组成成分,是所有植物生长的必需营养元素(弓明钦等,2000;陈连庆等,2002a;2002b)。有关外生菌根和 AM 菌根对 N 素利用的机理研究,已取得了许多进展,但对于石斛气生菌根与 N 素关系的基础理论研究鲜有涉及(Kramer *et al.*, 1985; Simard, 1997; Wright *et al.*, 1998; 张美庆等, 1998; 陈连庆等, 2005)。本试验以附生石斛为材料,应用生物技术克隆菌根,进行 N 源及其不同浓度的试验,揭示石斛菌根对 N 营养吸收利用的效果,现报道如下。

收稿日期:2006-04-25。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170767)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验采用浙江省富阳市高山峭壁生长的铁皮石斛,经组织培养以及接种优良菌根真菌(菌根真菌编号为 F9903 菌株),人工合成石斛菌根。选生长一致的石斛菌根化组培苗(苗高 0.6 cm、茎粗 0.79 mm、烘干质量 0.006 5 g)为原始试验材料,用于不同试验处理。

### 1.2 方法

**1.2.1 石斛菌根苗不同 N 源试验** 在无 N 源的基础培养基(KC 培养基去除 N 化合物)中,加入不同的无机和有机 N 化合物(各 N 化合物同含纯 N  $360.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ):①硝酸钙、②硫酸铵、③硝酸钾、④磷酸二氢铵、⑤尿素、⑥甘氨酸、⑦酒石酸铵、⑧谷氨酸、⑨CK,共 9 个处理,每处理 10 次重复(瓶内培养基体积 50 mL)。灭菌后,植入菌根化的石斛组培苗(每瓶 3 株),容器为高分子 PC 塑料瓶,置于 LRH-250-G 光照培养箱 [ $(25 \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、光照 1 500 lx、90 d)]无干扰培养。

**1.2.2 共生菌根真菌(F9903)不同 N 源试验** 在无 N 源的基础培养基中(同上),加入不同 N 源(同上):①硝酸钙、②硫酸铵、③硝酸钾、④磷酸二氢铵、⑤尿素、⑥甘氨酸、⑦酒石酸铵、⑧谷氨酸、⑨CK,9 个处理。在 250 mL 三角瓶内放入 50 mL 不同 N 源培养液,每处理重复 3 次。灭菌后每瓶接种等量、活力旺盛的菌根真菌菌丝体(菌丝体烘干质量 1 mg),培养液 pH 值为 7,在温度  $(30 \pm 0.5) \text{ } ^\circ\text{C}$  条件下,进行振荡与间歇增殖培养(培养周期 8 d)。

**1.2.3 石斛菌根苗不同浓度 N 素试验** 取无 N 源的基础培养液(同上),分别加入酒石酸铵(最佳 N 源),处理浓度是 0(CK)、2.72、5.43、10.86、16.29、21.72、32.58、43.44、54.3  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  共 9 个处理,每处理重复 10 次。每瓶移入菌根化组培苗 3 株(瓶内培养基体积 50 mL),培养条件同石斛菌根苗不同 N 源试验。

**1.2.4 菌丝体生物量测定** 从各处理三角瓶内,取出含菌丝的培养液,经抽提→过滤→无菌水冲洗→ $105 \text{ } ^\circ\text{C}$  烘干至恒质量,获得菌丝体生物量。

**1.2.5 测定方法** 全 N 分析应用开氏定氮法,全 P 测定采用钼锑抗比色法,有机 C 用重铬酸钾法进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌根化石斛组培苗吸收利用 N 源的效应

**2.1.1 不同 N 源促进菌根化石斛组培苗生长的效果** 菌根化石斛组培苗在生长过程中,因不同 N 源所提供可溶性 N 素营养的差异,使石斛生长显现不同结果。图 1 表明:N 源酒石酸铵(处理 7)对石斛菌根化组培苗的高生长和茎粗促进作用最明显,均为最大值(苗高 2.12 cm、茎粗 1.83 mm)。与对照(处理 9,苗高 0.68 cm、茎粗 1.0 mm)相比较,分别提高 211.76% 和 83.0%。与处理 4(效果差的磷酸二氢铵,苗高 1.33 cm、茎粗 1.15 mm)相比较,分别提高 59.4%、59.13%。

**2.1.2 不同 N 源对菌根化石斛组培苗鲜、干质量的效应** 图 2 表明:N 源酒石酸铵(处理 7)对石斛菌根化组培苗的鲜质量和干质量的积累也为最大值(0.297 g、0.046 9 g),与对照(处理 9:鲜 = 0.098 g、干 = 0.009 3 g)相比较,分别提高 203.1% 和 404.3%。处理 7 苗高与其他处理相比较差异明显,所以综合以上效果,确定酒石酸铵为菌根化石斛组培苗增殖培养的最佳 N 源。

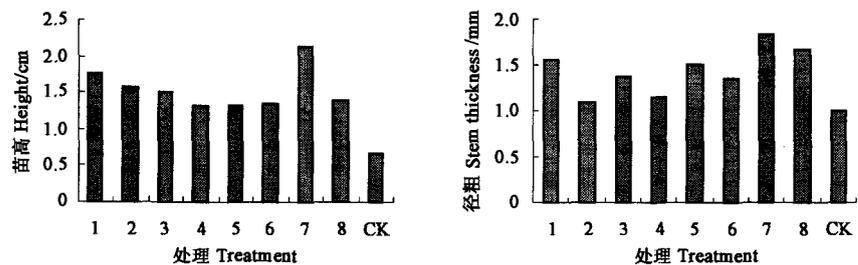


图 1 不同 N 源对石斛苗生长的影响

Fig.1 The effect of different N sources on *Dendrobium* seedlings growth

### 2.2 共生菌根真菌(F9903)增殖培养与不同 N 源的关系

F9903 菌株对提供的 8 种不同 N 源,吸收利用的程度不同。从图 3 看出,F9903 菌株对有机 N 源利用效果较好,尤以酒石酸铵 N 源利用效果最佳,菌丝体增殖的干质量为  $1.531 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,与接种量  $(0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1})$

菌丝体干质量相比较提高了 153.1 倍。对不同 N 源利用效果(干质量)进行排序:酒石酸铵 > 甘氨酸 > 尿素 > 硫酸铵 > 谷氨酸 > 磷酸二氢铵 > 硝酸钾 > 硝酸钙 > CK (处理 9)。对照(处理 9)无 N 源, F9903 菌株菌丝体几乎没有增殖生长,无 N 素营养来源,氨基酸、蛋白质和核酸等都不能合成,致使菌丝体细胞停止分裂生长。F9903 菌株对无机 N 源利用效果相对较差,尤其对硝态 N 源的利用率更差,使菌丝体增殖量偏小。

将菌根化石斛组培苗的干质量柱状图与 F9903 菌根真菌菌丝体干质量柱状图相比较(图 4),表现出效果图形相似,最佳 N 源基本重合在处理 7(酒石酸铵)上,增殖干质量均为最大值;无 N 源的 CK(处理 9),显示出干质量增殖最小。这进一步说明,石斛菌根与菌根真菌密切共生的互动关系,并耦合于酒石酸铵提供的最适宜 N 源。但有无 N 素营养又是决定石斛能否正常生长发育的必要因素之一。

2.3 酒石酸铵不同浓度对石斛菌根化组培苗的作用

2.3.1 酒石酸铵不同浓度促进菌根化石斛组培苗生长的反应 在不同浓度下,菌根化石斛组培苗生长反应显示出明显的差异。生物统计分析结果表明(表 1):酒石酸铵不同浓度生长效应的显著性概率均达到 0.01 水平,这说明苗高、茎粗、蘖数、根数、根长、叶数、鲜质量、干质量等指标的差异均显示为极显著。

通过 LSD 法多重比较以及图 5、6 结果表明:不同酒石酸铵浓度处理对石斛苗高、茎粗、蘖数、根数、根长、叶数、鲜质量和干质量产生不同影响,处理 2(酒石酸铵 2.72 mmol·L<sup>-1</sup>)增长效果均显示最高水平,如:每株平均苗高为 3.27 cm,干质量为 0.039 g,分别是处理 1(CK 苗高 = 2.06 cm、干质量 = 0.014 g)的 1.59 和 2.79 倍。处理 2(苗高)与处理 1、4、5、6、7、8、9 差异极显著,与处理 3 差异显著;处理 2(干质量)与处理 1、3、4、5、6、7、8、9 差异极显著。这说明不同浓度的酒石酸铵,对促进菌根化石斛组培苗生长的效果存有不同差异。图 5、6 还清楚地显示,处理 2 以后随着酒石酸铵浓度的成倍递加,石斛苗生长和鲜、干质量的累积呈现不断下降的趋势,浓度越高增长量越小。

2.3.2 酒石酸铵不同浓度处理的菌根化石斛苗对 C、N、P 营养元素的吸收与积累 图 7 表

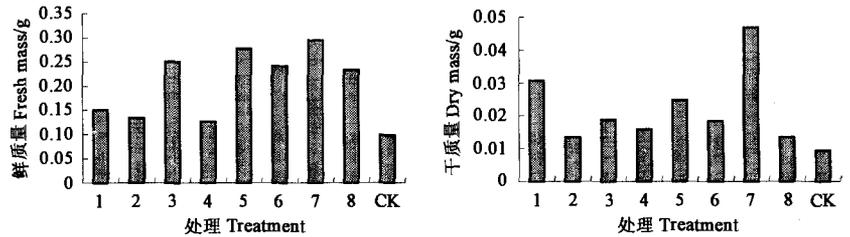


图 2 不同 N 源对菌根化石斛组培苗鲜、干质量的效应

Fig. 2 The effect of different N sources on fresh and dry mass of *Dendrobium* seedlings

将菌根化石斛组培苗的干质量柱状图与 F9903 菌根真菌菌丝体干质量柱状图相比较(图 4),表现出效果图形相似,最佳 N 源基本重合在处理 7(酒石酸铵)上,增殖干质量均为最大值;无 N 源的 CK(处理 9),显示出干质量增殖最小。这进一步说明,石斛菌根与菌根真菌密切共生的互动关系,并耦合于酒石酸铵提供的最适宜 N 源。但有无 N 素营养又是决定石斛能否正常生长发育的必要因素之一。

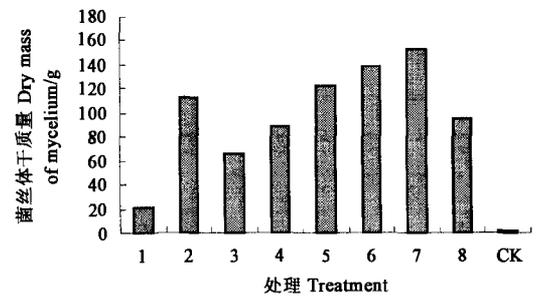


图 3 不同 N 源对石斛共生菌增殖的效应

Fig. 3 The effect of different N sources on the fungi multiplication of *Dendrobium*

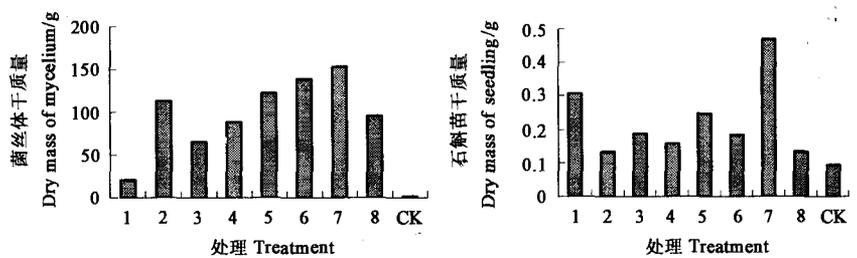


图 4 不同 N 源对菌丝体干质量和石斛苗干质量效应的比较

Fig. 4 Comparisons of the effect of different N sources on the dry mass between mycelium and *Dendrobium* seedlings

表 1 酒石酸铵不同浓度促进菌根化石斛组培苗生长的方差分析<sup>①</sup>

Tab. 1 Variance analysis of growth of *Dendrobium* seedlings with different concentration of ammonium tartrate

| 因变量 Item          | 自由度 DF | 均方 Mean square | F        |
|-------------------|--------|----------------|----------|
| 苗高 Height         | 8      | 3.401          | 6.994**  |
| 茎粗 Stem thickness | 8      | .623           | 5.889**  |
| 蘖数 Bud number     | 8      | 2.794          | 5.192**  |
| 根数 Root number    | 8      | 10.003         | 9.990**  |
| 根长 Root length    | 8      | 2.381          | 2.756**  |
| 叶数 Leaf number    | 8      | 17.775         | 20.165** |
| 鲜质量 Fresh mass    | 8      | 7.974E-02      | 68.882** |
| 干质量 Dry mass      | 8      | 1.344E-03      | 76.539** |

① n = 30, n 为样本数 n is the sample number. \*\*, 显著性概率为 0.01 Significant at 0.01 level.

明：在相同培养周期内，处理 2(2.72 mmol·L<sup>-1</sup> 酒石酸铵)对菌根化石斛组培苗吸收、积累 C 素营养的水平最高，达 667.7 g·kg<sup>-1</sup>，是处理 1(CK 336.8 g·kg<sup>-1</sup>)的 1.98 倍；处理 2(2.72 mmol·L<sup>-1</sup> 酒石酸铵)的菌根化石斛对 N 素营养吸收、积累水平也是最高，达 60.5 g·kg<sup>-1</sup>，是处理 1(CK 21.2 g·kg<sup>-1</sup>)的 2.85 倍；对 P 素营养吸收、积累水平还是处理 2(2.72 mmol·L<sup>-1</sup> 酒石酸铵)最高，达 5.756 g·kg<sup>-1</sup>，是处理 1(CK 2.346 g·kg<sup>-1</sup>)的 2.46 倍。图 7 还显示：从无酒石酸铵 N 源(处理 1)开始，随着培养基含 N 浓度的增加，石斛吸收、积累 C、N、P 营养元素的数量会相应增加，直至达到最大值(处理 2)。但处理 3 以后，不断加倍提高酒石酸铵浓度，虽然提供了充足的 N 素营养，反而影响了石斛对 C、N、P 营养元素的吸收与积累。这可能是因为石斛菌根对不同浓度的酒石酸铵利用效率和培养基渗透压的大小以及营养比例失调相关，其机理有待进一步深入研究。同时，还显示出无 N 营养条件下，石斛会因 N 饥饿胁迫而停止生长或自耗衰败。这充分说明 N 元素是石斛生长发育必不可少的重要营养元素。浓度筛选试验结果：菌根化石斛组培苗对 C、N、P 营养元素吸收、积累最适宜浓度为酒石酸铵 2.72 mmol·L<sup>-1</sup>(处理 2)。综上所述，在酒石酸铵最佳 N 浓度下，石斛菌根不仅促进了石斛组培苗的生长和干质量的累积，而且对 C、N、P 的吸收、积累水平也是最高。

### 3 结论与讨论

1) 濒危珍贵的铁皮石斛，属于“兰科菌根”类型，是依赖“菌根”从环境中吸收利用多种养分与水分，维持其正常生长和发育的典型物种。本研究揭示菌根化石斛对 N 素营养的生理反应，进一步阐明不同 N 源与浓度对其生长和 C、N、P 元素吸收、积累的关系。

2) N 源试验显示出，菌根化石斛组培苗对有机酒石酸铵提供的 N 源效果最敏感，在促进生长、鲜、干质量等增殖多项指标上，都显示出最高水平，是培育菌根化石斛组培苗的理想 N 源。

3) 不同 N 源对石斛菌根真菌(F9903 菌株)增殖效果的图示表明，F9903 菌株对酒石酸铵 N 源利用效果最佳，菌丝体增殖量最高，

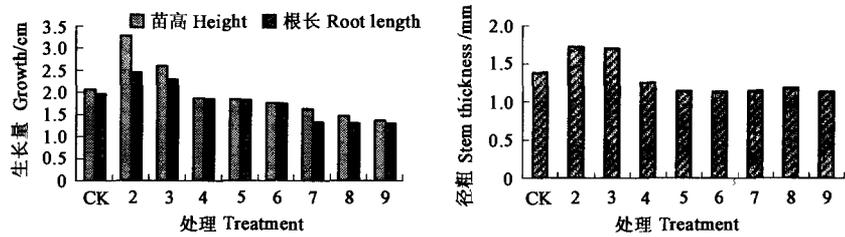


图 5 酒石酸铵不同浓度对菌根化石斛组培苗生长的影响  
Fig.5 The effect of different concentration of ammonium tartrate on the growth of *Dendrobium* seedlings

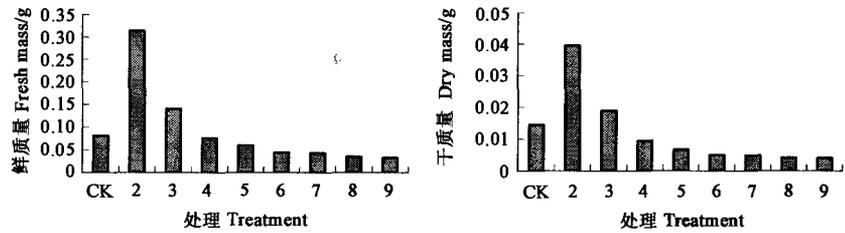


图 6 酒石酸铵不同浓度对石斛苗鲜、干质量的影响  
Fig.6 The effect of different concentration of ammonium tartrate on fresh and dry mass of *Dendrobium* seedlings

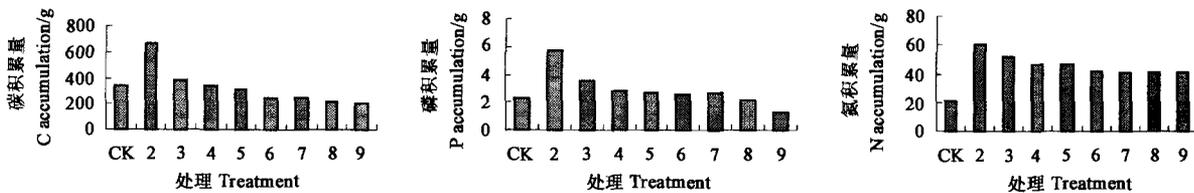


图 7 不同浓度酒石酸铵对石斛苗 C、N、P 吸收、积累的效果  
Fig.7 The effect of different concentration of ammonium tartrate on the assimilation of C, N and P of *Dendrobium* seedlings

与菌根化石斛组培苗对酒石酸铵提供的 N 源试验相比较，其效果相同。菌根化石斛组培苗的干质量积累柱状图与共生菌 F9903 菌根真菌菌丝体干质量增殖柱状图相比较，表现出图形趋势相似，具有良好的相叠性。这进一步证明石斛对 N 素的吸收、积累与共生菌根真菌互动关系密切，也显示出石斛菌根的高效功能。这对保护、扩繁与人工栽培濒危石斛具有重要意义。

4)最佳 N 源酒石酸铵不同浓度对石斛菌根化组培苗的效应表明,不同浓度处理对石斛苗高、茎粗、蘖数、根数、根长、叶数、鲜质量和干质量都产生明显的影响,处理 2( $2.72 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  酒石酸铵)各增长效果均显示极显著性差异;菌根化石斛对吸收利用与积累 N、C、P 元素能力也产生明显影响,处理 2( $2.72 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )效果最佳,这充分说明处理 2( $2.72 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )是最适宜石斛菌根化组培苗生长的浓度。同时反映出,石斛在无 N 营养条件下,虽有适量 C、P 等营养,而 N 饥饿胁迫使其停止生长至自耗而衰败,所以 N 是必不可少的重要营养元素。

### 参 考 文 献

- 陈连庆,裴致达.2002a.三种石斛菌根形态结构及元素构成的研究.林业科学研究,15(1):96-100
- 陈连庆,裴致达.2002b.石斛菌根真菌液培生长特性的研究.林业科学研究,15(2):207-211
- 陈连庆,王小明,裴致达.2005.石斛菌根化组培苗对碳素吸收利用的研究.生态环境,14(3):410-414
- 傅立国,金鉴明.1992.中国植物红皮书:稀有濒危植物.北京:科学出版社
- 弓明钦,徐大平,仲崇录,等.2000.菌根生物多样性及其应用研究.北京:中国林业出版社
- 张美庆,王幼珊.1998.我国东、南沿海地区 AM 真菌群落生态分布研究.菌物系统,17(3):274-277
- Kramer P T, Kozlowski T T.1985.木本植物生理学,汪振儒,等译.北京:中国林业出版社
- Simard S W.1997.Net transfer carbon between ectomycorrhizal tree species in field.Nature,388:579-582
- Wright S F, Upadhyaya A.1998.A survey of soils for aggregate stability and glomalin, aglyco protein produced by hyphae of arbuscular mycorrhiza fungi. Plant and Soil, 198:97-107

(责任编辑 郭广荣)