

文章编号:1001-1498(2005)02-0163-06

石斛菌根化组培苗对 P 素吸收利用的研究

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, 浙江 富阳 311400)

摘要:濒危石斛菌根化吸收、积累 P 营养的研究结果表明:可溶性和难溶性不同 P 源,对菌根化石斛组培苗生长的效应不同,试验处理 3(KH_2PO_4)和处理 6(FePO_4)的干质量分别为 0.018、0.019 g,是处理 1(K_2HPO_4)的 2.62 倍和 2.78 倍,差异达到极显著水平。可溶性 P(KH_2PO_4)不同浓度对菌根化石斛组培苗的综合效应,表现在苗高、径粗和干质量等主要指标上,处理 3 为最适宜质量浓度(0.25 g L^{-1}),与处理 9(CK)相对比,苗高是 2.64 倍、径粗是 2.16 倍和干物质是 3.87 倍。对苗木 N、C、P 营养元素的吸收、积累分析,处理 3 是 CK 的 1.72、1.40 和 11.53 倍;不同有效 P 含量对石斛菌根真菌 F9903 菌株增殖生长的试验表明:当培养液浓度为含纯 P 为 $1 \text{ mg} \times 22.76\%$ 时,其菌丝体增殖效果最佳,干质量高达 1.256 mg mL^{-1} ,是接种量的 114.2 倍。不同 P 浓度对菌根化石斛组培苗干质量的影响及其对共生菌根真菌菌丝体干质量的影响两个柱型图的重叠性好,其图形近似,效果趋势一致。

关键词:石斛;菌根化;P 营养

中图分类号:S722.3⁺7 文献标识码:A

Study on Absorbtion and Exploitation to P Nourishment in the Mycorrhiza of *Dendrobium candidum*

CHEN Lian-qing, WANG Xiaoming, PEI Zhi-da

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: The paper dealt with the absorbtion and accumulation P nourishment in mycorrhiza of *Dendrobium candidum*. The results showed that the effect of P with different origin to the seedling growth was different. The dry weights of treatment 3 (KH_2PO_4) and treatment 6 (FePO_4) were 0.018 and 0.019 g respectively, which were 2.62 and 2.78 times than that of treatment 1. The difference was significant. The effect of different concentration of dissoluble P (KH_2PO_4) to the mycorrhiza tissue culture seedling of *Dendrobium candidum*, primarily expressed in seedling height, stem and dry weight etc. Treatment 3 was the most suitable and proper density was $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Compared with treatment 9 (CONTROL), the seedling height, stem and dry weight of treatment 3 were 2.64, 2.16 and 3.87 times respectively. Through the analysis to the N, C, P nutrient absorption and accumulation, treatment 3 was 1.72, 1.40 and 11.53 times than that of CONTROL. The result of test on the effect of different available P to propagational growth of *Dendrobium candidum* mycorrhiza fungi F9903 showed that, when the culture solution contained 1 mg of P content was 22.76% in KH_2PO_4 , the effect of mycelium multiplication was the best, the dry weight was up to 1.256 mg mL^{-1} , 114.2 times that of its inoculum size. In the pillar type diagram of the dry weight of the symbiosis mycorrhiza fungi hypha and the tissue culture seedling with mycorrhiza of *Dendrobium candidum* in the different density of P nourishment, the shape of diagram and the trend were similar.

Key words: *Dendrobium candidum*; mycorrhizae; phosphorus nutrition

收稿日期:2004-06-09

基金项目:国家自然科学基金项目:“石斛菌根营养生理的研究”(30170767)部分内容

作者简介:陈连庆(1943—),男,河北唐山人,研究员。

铁皮石斛 (*Dendrobium candidum* Wall. ex Lell.) 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 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。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^[1]。

铁皮石斛又是内生型的“兰科菌根”植物, 依赖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 (丛枝菌根、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流水岩石和树皮上, 属于菌根气生型。它既有吸收、固定和保护的功能, 又含有叶绿素能进行光合作用; 与地生植物菌根比较, 其菌根功能更优越和独特^[2~4]。石斛气生根除从空气雾水和降雨中获得少量的营养外, 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, 传递各种营养元素至石斛根内细胞, 供其生长与发育。P 素是所有植物生长的必需营养元素, 是细胞核、细胞质、核苷酸和酶类的组成成分, 也是植物体内能量的主要组分和主要提供者^[2~5]。有关外生菌根和丛枝菌根对无机 P 利用机理的研究, 已取得了许多进展, 但对于石斛气生菌根与 P 的关系及其 P 的活化与吸收的基础研究鲜有涉及^[2,5~8]。本试验以附生石斛为材料, 应用生物技术克隆菌根, 进行 P 源及其不同浓度的试验, 并与共生菌根真菌的 P 营养生理研究相比较, 揭示石斛菌根对 P 营养吸收利用的效应。

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、干质量 0.006 5 g) 为原始试验材料, 用于不同试验处理。

F9903 菌根真菌液体培养, 应用改良的菌根真菌培养基配方, 按不同有效 P 含量进行试验处理, 其培养条件相同。

1.2 方法

1.2.1 石斛菌根苗不同 P 源试验 在无 P 源的基础培养基配方中, 加入一定量的磷化合物 (以 KH_2PO_4 含纯 P 1 mg \times 22.76% \times 0.5 为基准分别进行折算): 处理 1 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4); 处理 2 磷酸

二氢铵 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$); 处理 3 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4); 处理 4 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4); 难溶性磷化合物有: 处理 5 磷酸钙 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$); 处理 6 磷酸铁 (FePO_4); 处理 7 磷酸二氢钙 ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$); 处理 8 磷酸氢钙 (CaHPO_4); 处理 9 有机 P (骨粉), 共 9 个处理, 每处理 10 次重复 (培养基体积 50 mL 瓶⁻¹)。灭菌后, 植入菌根化的石斛组培苗 (3 株 瓶⁻¹), 容器为高分子 PC 塑料瓶, 置于 25 \pm 0.5 $^\circ\text{C}$ 、光照 1 500 lx 条件下进行 90 d 无人干扰培养。

1.2.2 石斛菌根苗不同浓度 P 素试验 取无 P 源的基础培养液, 分别加入 (可溶性) 磷酸二氢钾, 处理质量浓度是 0.063、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg \cdot mL⁻¹ 和 CK (0 mg \cdot mL⁻¹) 9 个处理, 依次为处理 1~9, 每处理重复 10 次。每瓶移入菌根化组培苗 3 株 (培养基体积 50 mL 瓶⁻¹), 培养条件如上。

1.2.3 共生菌根真菌 (F9903) P 素不同浓度试验 在无 P 的基础培养液 (50 mL 瓶⁻¹) 中, 加入化学纯 KH_2PO_4 , 处理所含纯 P 为 1 mg \times 22.76%, 处理 1 为 0, 处理 2 为 0.5 mg \cdot mL⁻¹, 处理 3 为 1 mg \cdot mL⁻¹, 处理 4 为 2 mg \cdot mL⁻¹, 处理 5 为 4 mg \cdot mL⁻¹, 处理 6 为 8 mg \cdot mL⁻¹, 每处理重复 3 次。灭菌后, 每瓶接种等量、活力旺盛的菌丝体 (折合干菌丝 1.1 mg), 培养液 pH 值为 7, 在温度 30 \pm 0.5 $^\circ\text{C}$ 条件下, 进行振荡与间歇增殖培养 (培养周期 8 d)。

1.2.4 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 $^\circ\text{C}$ 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 含量采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 P 源的效应

2.1.1 不同 P 源促进菌根化石斛组培苗生长的效果 经方差分析 (表 1) 说明: 菌根化石斛组培苗在生长过程中, 因不同 P 源所提供可溶性 P 素营养的差异, 使石斛生长的反应出现不同结果。统计分析结果表明: 不同 P 源处理对组培苗的高生长和鲜、干质量的影响, 均达到极显著差异水平, 叶片数达到显著差异水平, 其它 4 项指标差异不显著。

LSD 法多重比较以及图 1 结果进一步表明: 不同 P 源处理对石斛苗鲜质量和干质量产生不同影响, 处理 3 (KH_2PO_4) 和处理 6 (FePO_4) 的鲜、干质量

均为最高,分别为每株 0.157 (鲜)、0.018 g(干)和 0.142 (鲜)、0.019 g (干),两者干质量又是处理 1 (K_2HPO_4)的 2.62 倍和 2.78 倍。处理 1 苗木的干质量与处理 2、3、6 差异极显著,与处理 4 差异显著,与其它处理差异不显著;处理 3 苗木的干质量与处理

1、4、5、7、8、9 差异极显著,与 2、6 处理不显著。不同 P 源的化合物促进菌根化石斛组培苗生长的效果差异,来自石斛菌根对 3 种形态 P 源的利用效率不同以及 P 源化合物中分子组成和离子间互作的影响,其机理有待深入研究。

表 1 不同 P 源促进菌根化石斛组培苗生长的方差分析

方差来源	因变量	偏差平均	自由度	均方	F 值	F 值显著性概率
P 源效应	苗高	15.352	8	1.919	4.767	0.000 **
	茎粗	1.940	8	0.242	1.928	0.067
	蘖数	2.356	8	0.294	0.546	0.819
	根数	15.089	8	1.886	1.951	0.063
	根长	23.650	8	2.956	2.046	0.052
	叶数	16.622	8	2.078	2.091	0.046 *
	鲜质量	9.671×10^{-2}	8	1.209×10^{-2}	8.500	0.000 **
	干质量	1.280×10^{-3}	8	1.600×10^{-4}	7.087	0.000 **

注: ** ——极显著差异 $P=0.01$; * ——显著差异 $P=0.05$

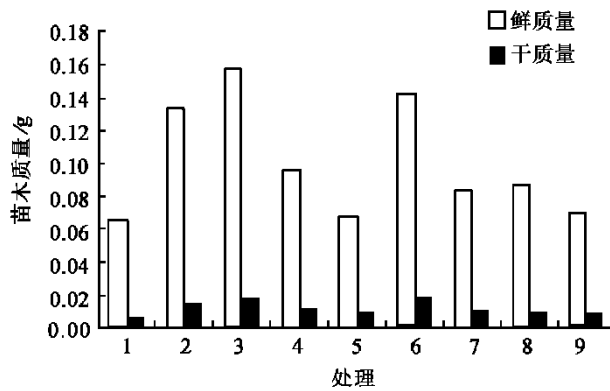


图 1 不同 P 源石斛鲜、干质量比较

2.1.2 不同 P 源处理菌根化石斛苗 C、N 营养元素的积累 图 2 表明:在相同培养周期内,处理 3(可溶性 P 源 KH_2PO_4)苗木吸收、积累 C 素营养水平最高,达 $620.18 g \cdot kg^{-1}$;处理 6(难溶性 P 源 $FePO_4$)吸收、积累 C 素营养最大值是 $604.87 g \cdot kg^{-1}$;可溶性 P 源的处理 1,对 C 素积累最低。有机难溶性 P 源骨粉(处理 9),对 C 素几乎没有积累变化,其含量反而比

试验前原始苗下降了 4.5%。这可能是骨粉沉淀于培养基底部与石斛菌根难接触,故而因缺 P 影响其对 C 素营养的吸收与积累。

图 3 显示:不同 P 源处理的菌根化石斛组培苗吸收、积累 N 元素效果存有差异。以处理 3 和处理 6 效果最好,分别积累 N 素为 $69.35 g \cdot kg^{-1}$ 和 64.80

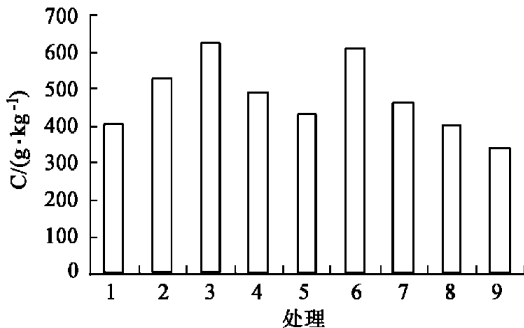


图 2 不同 P 源对石斛菌根苗 C 元素积累的效果

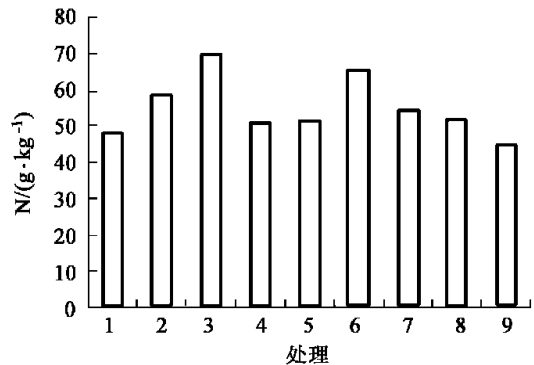


图 3 不同 P 源对石斛菌根苗 N 元素积累的效果

$g \cdot kg^{-1}$;在可溶性 P 源 4 个处理中,处理 3 比处理 1 的 N 含量高出 45.4%;处理 6(无机难溶性 P 源)与其它难溶性 P 源处理相比效果最佳,处理 6 与效果最差的处理 9(骨粉)比较,在 N 元素吸收、积累上,增加 47.2%。

2.1.3 不同 P 源处理的菌根化石斛苗与 P 元素吸收、积累的相关性 图 4 表明:在可溶性 P 源试验中,处理 3 的效果最佳,表现在吸收、积累 P 营养元素的数量为最高($P = 5.08 g \cdot kg^{-1}$);与处理 1 相比增加 27.2%;在难溶性 P 源试验中,处理 6 吸收、积累 P 素营养最好,高达 $6.12 g \cdot kg^{-1}$,与处理 9(骨粉) ($P = 3.18 g \cdot kg^{-1}$)相比增加 92.5%;处理 6 与处理 3 相比较,苗内 P 素的积累量要多 20.5%。通过培养基剩余 P 素营养含量的分析,发现石斛菌根化组培苗,从磷酸铁(难溶性 P 源)中吸收 P 元素的利用率高达 21.1%。以上结果说明:菌根化的石斛苗吸收、利用和积累 P 素营养效果显著,尤其是石斛利用难溶性 P 的效果表明,石斛菌根与其它植物菌根一样因分泌酸性磷酸酶,起到活化难溶性 P 的作用,不断释放可溶性 P 为石斛生长提供 P 营养。这进一步验证了“气生型”石斛菌根对 P 营养吸收利用的功能。

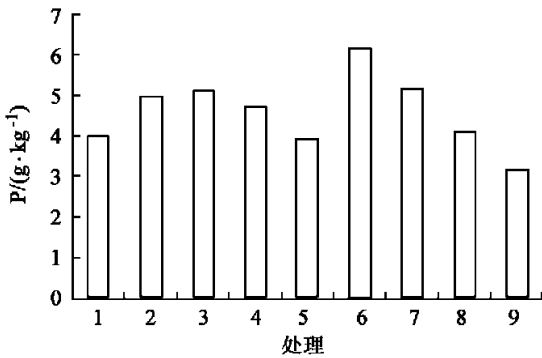


图 4 不同 P 源对石斛菌根苗 P 元素积累的效果

2.2 可溶性 P 不同浓度对菌根化石斛组培苗的综合效应

在可溶性 P 源 (KH_2PO_4) 不同浓度的处理试验中,据石斛菌根化组培苗的苗高、茎粗和干质量主要生长指标表明(图 5、6):最适宜 P 浓度为处理 3 ($0.25 g \cdot L^{-1}$),其高(高 = 1.85 cm)生长是 CK(处理 9、高 = 0.7 cm)的 2.64 倍;茎粗(地径 = 1.94 mm)是 CK(地径 = 0.9 mm)的 2.16 倍,干质量(0.020 1 g)是 CK(0.005 2 g)的 3.87 倍。按干质量效果排序是处理 3 > 4 > 5 > 6 > 7 > 8 > 2 > 1 > 9。处理 9 为 CK,经 3 个月的培育,其干质量没有增加,这说明在没有 P 源提供可溶性 P 素营养条件下,石斛苗的高、径粗生长

虽略有增长,但影响了干质量的积累,这是营养元素(C、N、P等)自耗的必然反应。

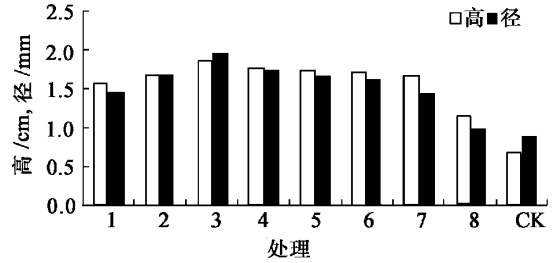


图 5 不同浓度 P 素营养对石斛菌根化组培苗生长的影响

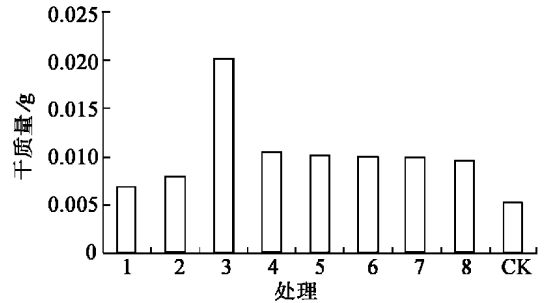


图 6 不同浓度 P 素营养对石斛菌根化组培苗干质量的影响

图 7~9 表明:菌根化石斛组培苗,从不同 P 浓度的培养基中吸收、积累 N 元素最高水平为处理 3 ($N = 45.03 g \cdot kg^{-1}$),是处理 9(CK, $N = 26.17 g \cdot kg^{-1}$)

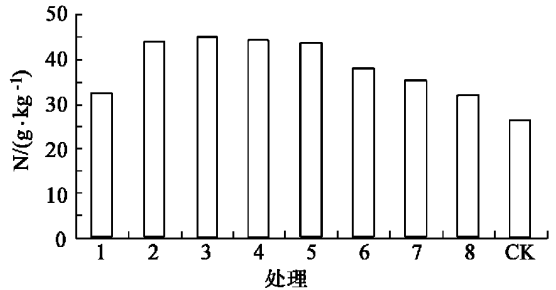


图 7 不同 P 浓度对石斛菌根化组培苗吸收、积累 N 元素的效应

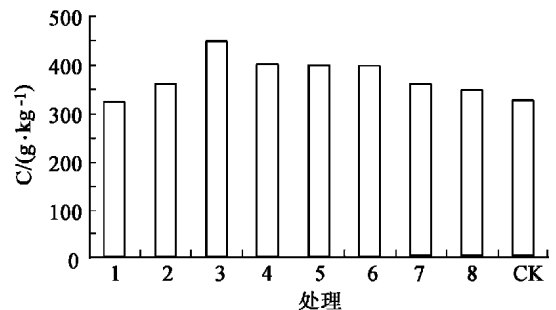


图 8 不同 P 浓度对石斛菌根化组培苗吸收、积累 C 元素的效应

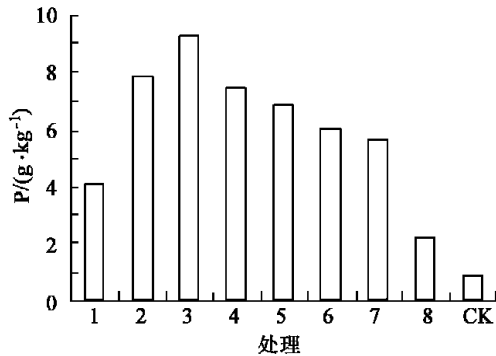


图 9 不同 P 浓度处理对石斛菌根化组培苗吸收、积累 P 元素的效应

的 1.72 倍;其苗吸收、积累 C 素营养最佳水平的处理 3($C = 448.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)是处理 9(CK, $C = 320.91 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的 1.4 倍;其吸收、积累 P 素营养的最佳浓度处理 3($P = 9.22 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),比处理 9(CK, $P = 0.80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的 P 积累量增加 11.5 倍;经过石斛苗培养后的培养基剩余 P 素分析,其苗吸收 P 素效率最高者是处理 3,利用率达 13.6%。通过以上 N、C、P 元素的吸收、积累效果测定,处理 3($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)是可溶性 P 素效应的最佳浓度。当处理(处理 1、2)浓度低于处理 3 时,吸收、积累 N、C、P 元素呈下降趋势,其中吸收 N、C 下降趋势较缓慢,而吸 P 下降明显。随着成倍加大可溶性 P 的浓度(处理 4~9),石斛苗吸收与积累 N、C、P 元素又呈下降趋势,尤其是处理 8、9 下降趋势较快,但总的趋势没有出现极端的高浓度 P 的毒害现象。

2.3 不同有效 P 含量对石斛菌根菌 F9903 菌株增殖生长的效应

图 10 显示:各处理由于有效 P 含量的不同,对 F9903 菌株的液体培养,其菌丝体的增殖效果产生不同的影响。当处理 3 每毫升溶液中含 KH_2PO_4 1 mg 时,该菌株菌丝体增殖生长效果最好,菌丝体干质量达 $1.256 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,增殖量为原接种量的 114.2 倍。对照处理(无 P 源)的菌丝体干质量增长量为最小,只比接种量增加 11.0%。这说明培养液中,虽有可利用与适宜浓度的 C、N 等营养元素,由于缺 P 的胁迫,严重影响了菌丝体的新陈代谢及菌丝体的合成,所以,在相同培养条件下,无 P 源成为主要限制增殖生长的重要因素。

该图还表明:随着培养液中含 P 量的成倍增加,当含量高达 8 倍(处理 6)时,该菌丝体增殖倍数为 94.2 倍,虽呈现下降的趋势,但其影响相当缓慢。高浓度 P 的毒害现象,还未表现出来,其临界浓度及机

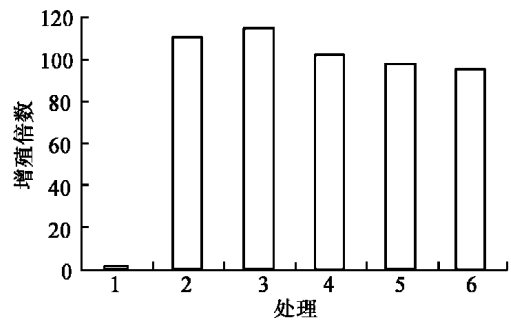


图 10 不同有效 P 含量对菌丝增殖倍数的影响

理有待进一步研究。

将菌根化石斛组培苗的干质量积累柱状图(图 6)与共生 F9903 菌根真菌菌丝体干质量增殖的柱状图重叠比较,表现出图形相似,趋势一致(图 11)。最适 P 浓度相吻合于处理 3,增殖干质量均为最大值;无 P 的 CK 处理,都显示出干质量增殖的最小值;从处理 1 开始,随着 P 浓度的递增,其增长效果明显,直至最大值(处理 3),然后随着 P 浓度的成倍增加,其增殖速度趋缓而慢慢下降,但均表现在高浓度 P 条件下,未出现毒害致死现象。这可以进一步说明,石斛菌根与菌根真菌共生的互动作用,使石斛适应 P 浓度的范围更广并保持较高效率,但有无 P 素营养又是决定石斛能否正常生长发育的必要因素之一。

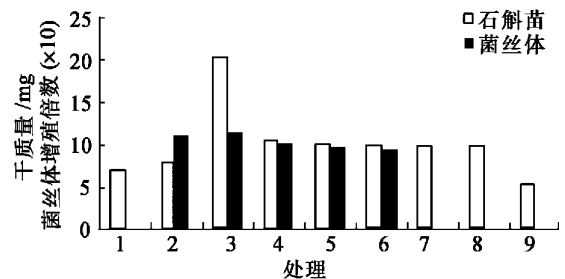


图 11 不同 P 浓度对石斛苗干质量和菌丝体干质量增殖的影响

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”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 P 素营养的生理反应,进一步阐明不同 P 源与浓度对其生长和 C、N、P 元素吸收、积累的关系。

(2) P 源试验显示,菌根化石斛组培苗对可溶性 KH_2PO_4 和难溶性 FePO_4 提供的 P 源效果最敏感,在促进生长、干质量增殖和 N、C、P 元素吸收、积累等

方面,都显示出最佳水平,尤以吸收 P 元素效应最明显,同时发现石斛菌根活化难溶性 P,提供 P 营养促进石斛生长,是突破 P 胁迫的关键。

(3)最佳可溶性 P 源的不同浓度效应,使菌根化石斛吸收利用与积累 N、C、P 元素及促进生长和干物质增殖产生显著变化,最适宜浓度是处理 3 (KH_2PO_4 0.25 mg ml^{-1})效果最佳。无 P 造成饥饿胁迫,使石斛停止生长并自耗而衰败。菌根强化了石斛的抗逆性,提高了适应 P 浓度范围,甚至高倍 P 浓度未显示毒害现象。

(4)不同 P 浓度对菌根化石斛培养和石斛菌根真菌(F9903 菌株)增殖效果的图示表明,两图重叠性好,趋势基本一致。这进一步证明石斛对 P 素的吸收、积累与共生菌根真菌关系十分密切,起到主导作用,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。

参考文献:

- [1] 付立国,金鉴明. 中国植物红皮书—稀有濒危植物[M]. 北京: 科学出版社, 1992
- [2] 弓明钦,徐大平,仲崇禄,等. 菌根生物多样性及其应用研究[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000
- [3] 陈连庆,裴致达. 三种石斛菌根形态结构及元素构成的研究[J]. 林业科学研究, 2002, 15(1): 96 ~ 100
- [4] 陈连庆,裴致达. 石斛菌根真菌液培生长特性的研究[J]. 林业科学研究, 2002, 15(2): 207 ~ 211
- [5] Kramer P T, Kozłowski T T. 木本植物生理学[M]. 汪振儒等译. 北京: 中国林业出版社, 1985
- [6] 郝文英,林先贵,顾希贤,等. 几种土壤 VA 菌根效应及其应用前景[J]. 土壤学报, 1991, 28(2): 124 ~ 131
- [7] Wright S F, Upadhyaya A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, aglyco protein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi [J]. Plant and Soil, 1998, 198: 97 ~ 107
- [8] Simard S W. Net transfer carbon between ectomycorrhizal tree species in field[J]. Nature, 1997, 388: 579 ~ 582