

· 资源与鉴定 ·

不同内生真菌对齿瓣石斛幼苗生长的效应

黄晖^{1,2}, 邵士成¹, 高江云^{1*}

(1. 中国科学院 西双版纳热带植物园 综合保护中心, 云南 勐腊 666303;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

[摘要] 石斛属植物根部存在大量功能未知的内生真菌,从中筛选获得生长阶段有效共生真菌是药用石斛仿生态栽培深入开展的关键。本研究利用单菌丝团分离法从齿瓣石斛植株根部分离得到的6株内生真菌,与齿瓣石斛无菌播种幼苗进行共生培养实验。培养90 d以后,与对照组相比,FDdS-1,FDdS-2,FDdS-4菌株处理对幼苗产生明显致死或致病作用,而接种FDdS-5,FDdS-9,FDdS-12菌株处理的齿瓣石斛幼苗则健康生长,并表现出不同的生长效应,其中,FDdS-5菌株对幼苗的株高、鲜重、干重、茎粗和根数都有显著的促进作用,FDdS-9菌株仅对幼苗的株高有显著促进作用,而FDdS-12菌株则对齿瓣石斛幼苗的生长产生抑制作用。显微观察发现FDdS-5菌株处理的幼苗根部皮层形成菌丝团共生结构,可以判定FDdS-5为齿瓣石斛的菌根真菌。经分子鉴定,菌株FDdS-5和FDdS-9分别和蜡壳菌属 *Sebacina* 的2种真菌相似度最高。将FDdS-5菌株应用于齿瓣石斛的仿生态栽培,可望能有效的促进齿瓣石斛幼苗生长和缩短幼苗生长周期,研究结果为齿瓣石斛的野外回归和人工栽培提供了技术支撑。

[关键词] 齿瓣石斛; 内生真菌; 幼苗生长; 药用兰科植物; 仿生态栽培

Effects of different endophytic fungi on seedling growth of *Dendrobium devonianum*

HUANG Hui^{1,2}, SHAO Shi-cheng¹, GAO Jiang-yun^{1*}

(1. Center for Integrative Conservation, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

[Abstract] To obtain seedling growth-promoting fungi is a key step in restoration-friendly cultivation of medicinal *Dendrobium* species, since there are a large number of functionally-unknown endophytic fungi in the roots of *Dendrobium* plants. In this study, six functionally-unknown endophytic fungal strains were isolated from roots of *D. devonianum* using single peleton isolation technology, and used in inoculation experiments to test their effectiveness for seedling growth in *D. devonianum*. After 90 days of inoculation, comparing with the control treatment, FDdS-1, FDdS-2 and FDdS-4 showed strong pathogenic or fatal effects on seedlings; while, FDdS-12, FDdS-9 and FDdS-5 had different effects on seedling growth. FDdS-5 had significant promoting effects on height, fresh and dry weight, stem diameter and root numbers, while FDdS-9 only had significant promoting effect on seedling height, and FDdS-12 had a negative effect on seedling growth. According to the anatomical features of the inoculated roots, FDdS-5 fungi could infect the velamina of seedlings and the existence of symbiosis pelotons in the cortex cells, suggesting that FDdS-5 is a mycorrhiza fungi of *D. devonianum*. FDdS-5 and FDdS-9 were identified as *Sebacina vermifera* and *Sebacina* sp. by molecular technologies. By using FDdS-5 in the restoration-friendly cultivation of *D. devonianum*, it could effectively promote seedling growth and shorten the seedling growth periods. The results will aid in reintroduction and cultivation of *D. devonianum*.

[Key words] *Dendrobium devonianum*; endophytic fungus; seedling growth; medicinal orchid; restoration-friendly cultivation

doi:10.4268/cjcm20161108

[收稿日期] 2016-01-12

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31470450);国家自然科学基金青年基金项目(31400021)

[通信作者] *高江云,研究员,主要从事濒危植物迁地保护与再引种研究,Tel:(0691)8716757,E-mail:gjy@xtbg.org.cn

[作者简介] 黄晖,硕士研究生,研究方向为兰科植物综合保护,E-mail:huanghui@xtbg.ac.cn

兰科石斛属 *Dendrobium* 的很多种类作为传统的药材和保健品在我国利用历史悠久,素有“中华仙草”之美称。西双版纳是我国石斛的主产区之一,有野生石斛 48 种^[1],其中有 30 种被加工成石斛商品^[2]。齿瓣石斛 *D. devonianum* 在业界被叫做“紫草”,制成的成品称作“紫皮枫斗”,市场价值很高。齿瓣石斛是目前人工集约化栽培规模仅次于铁皮石斛的种类,其在西双版纳地区花期为 4—5 月,附生于林中树干上,其主要海拔分布范围为 1 100 ~ 1 600 m,和茶叶的最佳种植海拔重叠,在很多茶园茶树上都有自然生长的齿瓣石斛。在人工自然或半自然条件下,开展石斛的仿生态栽培,相对于目前开展的人工集约化栽培,省去了昂贵的棚架、苗床、喷灌系统等基础设施的投入和昂贵的日常管理成本,从而可以满足贫困地区当地居民由于经济条件的限制无法承受的高成本和投入,能在增加居民收入、减贫致富的同时,减少对野生资源的采集强度,以达到保护的目的,这也是石斛产业长期可持续发展的新途径^[3]。

目前,作者所在研究团队通过原地共生萌发技术(*in situ* seed baiting technique)成功的分离得到的齿瓣石斛种子萌发阶段的有效真菌,并利用真菌和种子混合播种,在西双版纳地区开展基于真菌和种子共生萌发基础上的齿瓣石斛仿生态栽培试验示范,成功的解决了种子萌发和大规模种苗产生的问题^[3]。然而,在自然条件下,由于兰科植物在种子萌发后的生长发育过程中需要依赖与之共生的真菌,只有当真菌与幼苗的根形成共生菌根后,改善了水分和矿质营养的吸收利用,植株才能正常地生长发育^[4-6]。有证据表明共生真菌的种类会随兰科植物的生长阶段而发生变化,种子萌发阶段有效共生真菌并不能够支持幼苗后续生长发育^[7]。

在药用石斛的仿生态栽培中,开展石斛幼苗生长阶段有效共生真菌的分离和研究,将对幼苗生长具有促进作用的真菌应用到实际栽培中,能加快幼苗生长,缩短药用石斛的生长周期,具有极大的应用价值。本研究在前期工作的基础上,利用单菌丝团分离法分离获得齿瓣石斛的内生真菌,通过和齿瓣石斛无菌播种幼苗进行共生培养,以期筛选出能促进齿瓣石斛幼苗生长的有效共生真菌,为仿生态栽培提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌根真菌的分离和纯化 于西双版纳基诺乡龙帕村古茶园茶树采集自然生长的齿瓣石斛成年植株根段,在尽量不移动植株的情况下每个植株收集 3 ~ 5 个 2 cm 左右长短的根段,用茶树树干上自然生长的湿润苔藓包裹好后放入冰盒带回实验室。将野外获得的根段用流水清洗表面杂质,随后转移至超净工作台用质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 次氯酸钠 (NaClO) 溶液浸泡 3 min 杀死根段表面细菌及真菌,用大量蒸馏水清洗 3 次备用。

菌根真菌分离方法参照单菌丝团分离法^[8],具体操作步骤为将清洗后的根段放入有无菌水的培养皿中,在 10×20 放大倍数显微镜下利用解剖针轻轻刮根的表面,将近外皮层、皮层和内皮层分 3 个层次分别刮至 3 个培养皿中。在显微镜下找到单个菌丝团,用 $5 \mu\text{L}$ 移液枪将单个菌丝团转移至 PDA 平板培养基,于 25°C 恒温培养箱中黑暗培养 10 ~ 15 d,待 PDA 平板中长出菌丝时挑取边缘菌丝进行纯化,纯化 3 ~ 4 次得到纯菌落后即可转移试管斜面于 4°C 冰箱保存。

1.2 菌根真菌的分子鉴定 取出保存的真菌菌株,在超净工作台上用无菌接种针挑取菌丝接入灭菌后的液体马铃薯葡萄糖 (PDA) 培养基中。放入振荡摇床内 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 振荡培养。培养时间视真菌的生长速度而定,一般为 3 ~ 6 d。抽滤的菌丝体,用试剂盒 (DNeasy plant mini kit, Qiagen 69104) 提取 DNA,选择 ITS4 和 ITS5 为引物进行 PCR 扩增和测序,其 ITS 片段序列在美国国立生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 比对分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

1.3 接菌处理和共生培养 取分离得到并保存的不同种菌株,于 9 cm 培养皿,采用 PDA 培养基,在 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 黑暗条件培养约 1 周,待菌丝长满培养皿,用灭菌解剖刀将长有菌丝的 PDA 培养基切成 $0.5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 的小块,作为接菌材料。接菌苗采用同一个齿瓣石斛果实无菌播种的同一批苗,随机选取具有 2 ~ 3 条根、3 ~ 5 片叶,长势一致的齿瓣石斛幼苗,移至含有 40 mL MS 培养基的旋口瓶中,每瓶 5 棵苗。将不同真菌的菌块接种至培养瓶与幼苗等距离中央,另一组用空白 PDA 培养基作为对照,每处理重复 6 瓶。共计 6 种接菌处理和 1 个

空白对照,计 42 个培养瓶。将培养瓶用封口膜封口后置于人工培养箱中培养,培养温度 25 ℃、光照周期 12/12 h、光照强度 1 600 lx。

1.4 内生真菌对齿瓣石斛幼苗侵染检测 不同接菌处理共生培养 90 d 后的齿瓣石斛幼苗,取根以流水冲洗干净,切成 0.5 cm 小段,用 FAA 溶液固定,石蜡包埋,切片,番红染色,加拿大树胶封片后在光学显微镜下观察真菌侵染情况。

1.5 幼苗生长情况检测和数据统计分析 培养过程中对每个处理的幼苗生长情况进行观察记录,共生培养 90 d 时,将幼苗从培养瓶中取出,清水洗净,晾干,分别统计和测量不同处理幼苗的株高、鲜重、干重、茎粗(茎干直径)、根数、叶数、分蘖数和最长根长。不同处理的各组幼苗生长数据在 R 软件(version 3.2.2)中采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计分析。

同时,按以下公式计算各处理的株高增长率(H)、鲜重增长率(F)、干重增长率(D)、茎粗增长率(S)和根增长率(R),综合分析不同真菌对幼苗生长的促进作用。

$$H = [(\text{不同接菌处理株高} - \text{对照株高}) / \text{对照株高}] \times 100\%$$

$$D = [(\text{不同接菌处理干重} - \text{对照干重}) / \text{对照干重}] \times 100\%$$

$$F = [(\text{不同接菌处理鲜重} - \text{对照鲜重}) / \text{对照鲜重}] \times 100\%$$

$$S = [(\text{不同接菌处理茎粗} - \text{对照茎粗}) / \text{对照茎粗}] \times 100\%$$

$$R = [(\text{不同接菌处理根数} - \text{对照根数}) / \text{对照根数}] \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 分离得到的菌根真菌和分子鉴定结果 作者利用单菌丝团分离方法共分离并成功培养和纯化得到了 6 株齿瓣石斛的内生真菌,菌株编号分别为 FDdS-1, FDdS-2, FDdS-4, FDdS-5, FDdS-9, FDdS-12, 菌株采用试管斜面法保存于中国科学院西双版纳热带植物园濒危植物迁地保护与再引种研究组实验室。对各菌株扩增测序所得 ITS 片段序列于 NCBI 进行 BLAST 比对分析,获得相似性最大的已知真菌。

菌株 FDdS-5 和 FDdS-9 分别和蜡壳菌属 *Sebacina* 的 *S. vermifera* 和 *S. sp.* 真菌相似度最高,而菌株 FDdS-1, FDdS-2, FDdS-4, FDdS-12 则分别和大伏革菌属 *Phlebiopsis* 的 *P. crassa*、革菌属 *Phanerochaete* 的 *P. australis*、多孔菌目 Polyporales 的 1 种真菌和酵母菌属 *Meyerozyma* 的 1 种真菌相似度最高(表 1)。

表 1 所获得的与内生真菌进行 BLAST 比对分析

Table 1 Endophytic fungi and their closet relatives in NCBI through BLAST

菌株	序列长度/bp	BLAST 比对	序列号	相似度/%
FDdS-1	620	<i>Phlebiopsis crassa</i> (MAFF 420737)	AB809163.1	100
FDdS-2	614	<i>Phanerochaete australis</i> (FP-102907-sp)	KP135078.1	99
FDdS-4	625	<i>Polyporales</i> (7-SU-3-A-15 (M)-A.1)	KJ654607.1	98
FDdS-5	624	<i>Sebacina vermifera</i> (AFTOL-ID 1877)	DQ520096.1	97
FDdS-9	613	<i>Sebacina sp.</i> (6914)	FJ792846.1	98
FDdS-12	608	<i>Meyerozyma sp.</i> (AL-V-61)	JN255506.1	99

2.2 不同接菌处理对齿瓣石斛幼苗生长的效应

接菌培养 90 d 后,6 个接菌处理中,FDdS-1, FDdS-2 和 FDdS-4 菌株对齿瓣石斛幼苗产生明显的致死或致病效应,而接种 FDdS-5, FDdS-9 和 FDdS-12 菌株处理的齿瓣石斛幼苗则健康生长,并表现出不同的生长效应(图 1)。

与对照组相比,FDdS-5 菌株对齿瓣石斛幼苗的株高,鲜重,干重,茎粗和根数都有显著的促进作用,增长率达到 42.85% ($P < 0.01$), 23.74% ($P < 0.05$), 32.14% ($P < 0.05$), 42.21% ($P < 0.01$)和 53.21% ($P < 0.01$)。FDdS-9 菌株仅对齿瓣石斛幼苗的株高有显著促进作用,增长率达到 52.60% ($P < 0.01$),而 FDdS-12 菌株则对

齿瓣石斛幼苗的生长产生抑制作用,幼苗的鲜重,干重,根数,叶数和最长根长都显著低于对照组幼苗(表 2)。

2.3 内生真菌对齿瓣石斛幼苗的侵染情况 不同接菌处理培养 90 d 后,石蜡切片观察真菌对石斛幼苗根的侵染情况,结果发现仅与 FDdS-5 菌株培养齿瓣幼苗的根系被真菌菌丝包被,解剖观察表明,内生真菌侵入齿瓣石斛苗的根被组织并在皮层细胞中扩展或定殖(图 2)。

3 讨论

从兰科植物根中分离和筛选对幼苗阶段生长有促进作用的共生真菌,应用于兰科植物的人工栽培或濒危兰科植物的野外回归,能提高幼苗的生长

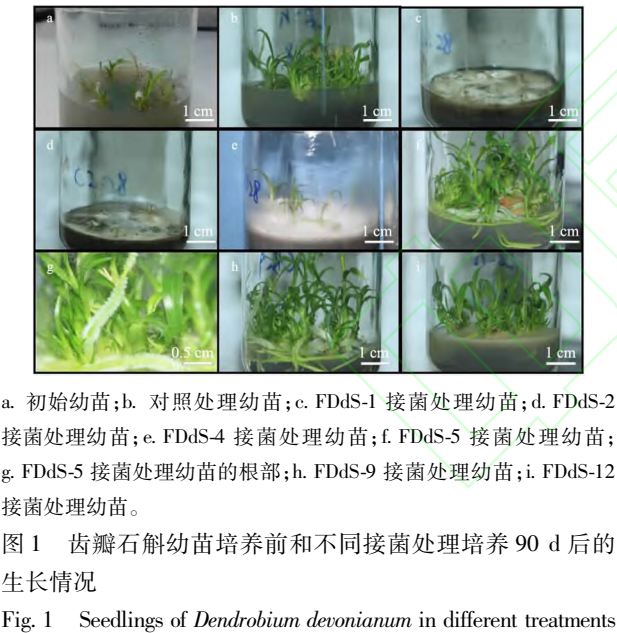
表2 不同接菌处理培养90 d后齿瓣石斛幼苗的生长参数($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 2 Growth parameters of seedlings in different fungal inoculation treatments($\bar{x} \pm s, n=30$)

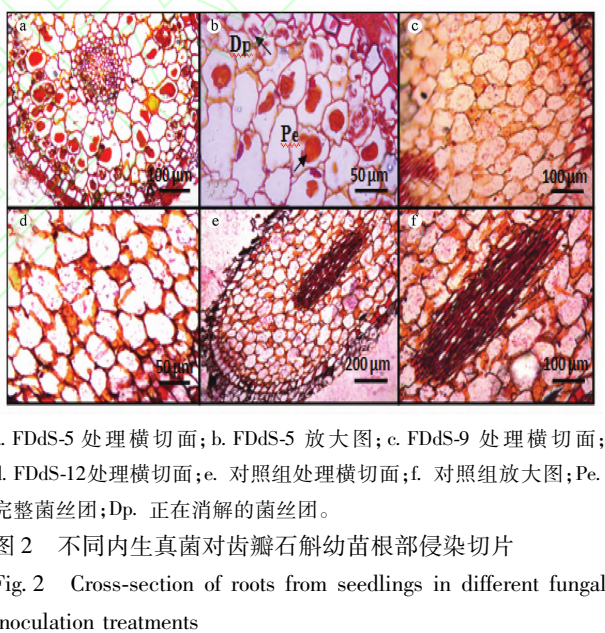
处理	株高/mm		鲜重/mg		干重/mg		茎粗/mm	
	平均值	增长率/%	平均值	增长率/%	平均值	增长率/%	平均值	增长率/%
接菌 FDdS-5	23.00 ± 0.00 ²⁾	42.85	886.00 ± 0.50 ¹⁾	23.74	74.00 ± 0.00 ¹⁾	32.14	4.22 ± 0.00 ²⁾	42.11
接菌 FDdS-9	24.57 ± 0.00 ²⁾	52.60	646.00 ± 0.50	-9.77	54.00 ± 0.00	-3.57	3.42 ± 0.00	15.34
接菌 FDdS-12	17.30 ± 0.00	7.45	301.00 ± 0.20 ²⁾	-57.96	16.00 ± 0.00 ²⁾	-71.42	3.31 ± 0.00	11.73
对照 ck	16.10 ± 0.00		716.00 ± 0.00		56.00 ± 0.00		2.97 ± 0.00	

处理	根数		叶数		分蘖数		最长根长/mm	
	平均值	增长率/%	平均值	增长率/%	平均值	增长率/%	平均值	增长率/%
接菌 FDdS-5	15.26 ± 0.00 ²⁾	53.21	21.16 ± 0.00	11.01	5.14 ± 0.00	4.25	48.36 ± 0.00	30.56
接菌 FDdS-9	11.46 ± 0.00	15.06	19.40 ± 0.00	1.78	4.32 ± 0.00	-12.37	46.07 ± 0.00	24.37
接菌 FDdS-12	6.56 ± 0.00 ¹⁾	-34.13	13.43 ± 0.00 ¹⁾	-29.53	3.69 ± 0.00	-25.15	28.56 ± 0.00 ²⁾	-22.89
对照 ck	9.96 ± 0.00		19.06 ± 0.00		4.93 ± 0.00		37.04 ± 0.00	

注: ¹⁾ 差异显著, $P < 0.05$; ²⁾ 差异极显著, $P < 0.01$ 。



速度和成活率,具有重要的应用价值。在作者开展的药用石斛仿生态栽培中,虽然已经成功解决了齿瓣石斛种子共生萌发的问题^[3],但幼苗在自然条件下表现出生长较缓慢,本研究针对这一问题,开展齿瓣石斛有效菌根真菌的分离和筛选工作。长期以来,兰科植物的内生真菌均是采用组织分离法获得,即对植物组织(根)进行表面消毒,在真菌培养基上培养植物组织,继而进行内生真菌的分离和纯化^[9]。采用这一方法成功从10余种药用石斛中分离获得了3 000余株100多种内生真菌,包括11株



菌根真菌^[10-12],但由于根部大量功能未知的内生真菌的存在,使得此方法面临着极为复杂而繁琐的筛选过程。

而单菌丝团分离法则有效解决了杂菌干扰这一问题,针对在根里面已经形成菌丝团的菌根真菌,能高效、准确分离有效共生真菌,同时省去了大量的后期筛选工作。如采用单菌丝团分离法从鹅毛玉凤花 *Habenaria dentata* 分离得到了186株内生真菌^[13],从硬叶兜兰 *Paphiopedilum wardii* 根部分离得到8株

内生真菌^[14]。本研究中,利用单菌丝团法,在较短的时间内就从齿瓣石斛根部分离得到6株内生真菌,通过实验检测,菌株FDdS-5,FDdS-9对幼苗生长有显著的促进作用。FDdS-5,FDdS-9同为蜡壳菌属,FDdS-5能形成典型的共生结构说明FDdS-5为蜡壳菌属里的菌根真菌,而FDdS-9不能与幼苗形成共生结构,可能的原因是相对于FDdS-5所代表的*Sebacina vermifera*菌株而言,FDdS-9菌株侵染力较弱,无法在有限的时间里与幼苗形成共生关系,另一个可能的原因是FDdS-9属于偶然进入成年齿瓣石斛植株根部的机会菌,而机会菌通常都无法与植株形成稳定的共生关系^[15]。

兰科植物根部具有大量种类的内生真菌,根据已有文献报道,多以半知菌门 Deuteromyeota、担子菌门 Basidiomycota 和子囊菌门 Ascomycota 为主。石斛属植物根中的内生真菌主要为子囊菌门类群约占80%,子囊菌门中的炭角菌属 *Xylaria*、镰刀菌属 *Fusarium*、交链孢属 *Alternaria*、刺盘孢属 *Colletotrichum* 及柱孢属 *Cylindrocarpon* 等真菌被发现是其优势菌群^[16]。对于齿瓣石斛,先前有研究从根部分离得到镰刀菌属及炭角菌属真菌^[17],本研究分子鉴定的结果表明从齿瓣石斛根部分离得到的FDdS-5和FDdS-9菌株分别和蜡壳菌属 *Sebacina* 的真菌同源性较高,而菌株FDdS-1,FDdS-2,FDdS-4,FDdS-12则分别为大伏革菌属 *Phlebiopsis*、革菌属 *Phanerochaete*、多孔菌目 *Polyporales* 和酵母菌属 *Meyerozyma* 的真菌同源性较高。齿瓣石斛根部定植多种内生真菌,开展石斛属药用植物内生真菌多样性研究,是兰科菌根生态学及利用菌根技术解决药用石斛资源再生等诸多研究领域的基础,现有的对该属内生真菌资源的发掘远远不够,且多涉及可培养真菌,对不可培养的内生真菌很少涉及,目前仅见有限的报道^[18]。

一般认为,确定分离的真菌是否为兰科植物菌根真菌应具备2个条件,一是该菌必须是从兰科植物根部分离得到,二是将该菌回接兰科植物形成共生关系^[19]。本研究中FDdS-5能显著促进齿瓣石斛幼苗生长,显微结构显示FDdS-5处理的幼苗根部形成菌丝团典型共生结构,可以判定FDdS-5为齿瓣石斛菌根真菌。FDdS-9对株高有极显著促进作用($P < 0.01$),解剖结构并未发现FDdS-9处理的幼苗根部形成菌丝团共生结构,有可能是FDdS-9真菌可

以分泌促进植株茎干伸长的激素,如赤霉素促进幼苗株高增长,其促生机制尚待进一步研究。另外,内生真菌功能复杂,对寄主不仅具有促生,也可能具有抑制和无明显作用等多种效果。FDdS-1,FDdS-2,FDdS-4菌株显著抑制幼苗生长或对幼苗形成致死效果,经分子鉴定分别属于大伏革菌属 *Phlebiopsis*、革菌属 *Phanerochaete* 及多孔菌目 *Polyporales* 的真菌,这些类群的真菌中有很一部分属于植物致病菌^[20],FDdS-1,FDdS-2,FDdS-4可能是齿瓣石斛的致病菌,FDdS-12可显著抑制幼苗鲜重、干重的增长,对幼苗的茎粗、株高作用不显著,FDdS-12所对应的酵母菌属 *Meyerozyma* 为环境中广泛存在的真菌^[21],有可能属于分离过程中带来的污染杂菌。

Kristiansen 等认为一个菌丝团里面可以有好几种真菌,不同真菌起不同作用^[22],如在对铁皮石斛促生长内生真菌的筛选过程中得到了类似的结果,不同内生真菌对铁皮石斛幼苗生长有着不同的促进作用^[23]。本研究中,不同菌株对苗的促生长作用体现在不同生长指标上,其促生程度亦存在差异,如FDdS-9菌株虽然显著促进幼苗株高增长,但对鲜重、干重等生长指标促进效果不显著,而FDdS-5显著促进幼苗株高、干重、鲜重、茎粗、根数增长,但对叶片数、分蘖数、最长根影响不显著。究竟是一种菌对兰科植物有促生作用还是几种菌共同作用,哪些真菌复合在一起对兰科植物可能有协同作用或者拮抗作用,这些共生机制方面的研究尚待开展^[11,24]。利用优势菌种与非优势菌种的协同作用,将具有不同促生作用的真菌进行组合回接,并探索出合适的接菌方式,对于优化兰科植物菌根化育苗技术,在濒危兰科植物的保护以及园艺化栽培等方面都具有重要的实际应用价值。

[参考文献]

- [1] 高江云,刘强,余东莉. 西双版纳的兰科植物多样性和保护[M]. 北京:中国林业出版社,2014:122
- [2] 管艳红,马洁,张丽霞,等. 西双版纳石斛属药用植物资源[J]. 中国野生植物资源,2004,23(6):38.
- [3] 字肖萌,高江云. 不同真菌对2种药用石斛种子共生萌发的效应[J]. 中国中药杂志,2014,39(17):3238.
- [4] Rasmussen H N, Whigham D F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids[J]. Am J Bot, 1993, 80(12):1374.
- [5] Bidartondo M I, Bruns T D. On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development

- [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(5):1549.
- [6] Mckendrick S L, Leake J R, Read D J. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections [J]. *New Phytol*, 2000, 145(3):539.
- [7] Dearnaley J D. Further advances in orchid mycorrhizal research [J]. *Mycorrhiza*, 2007, 17(6):475.
- [8] Zhu G S, Yu Z N, Gui Y, et al. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi [J]. *Fungal Divers*, 2008, 33(12):123.
- [9] Hyde K D, Soyong K. The fungal endophyte dilemma [J]. *Fungal Divers*, 2008, 33(33):163.
- [10] Chen J, Hu K X, Hou X Q, et al. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae) [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(5):1009.
- [11] 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.
- [12] Chen J, Zhang L C, Xing Y M, et al. Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3):e58268.
- [13] 陈娅娅, 杨琳, 朱国胜, 等. 鹅毛玉凤花菌根真菌的分离与鉴定[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(8):84.
- [14] 田凡, 白新祥, 王莲辉, 等. 硬叶兜兰菌根真菌的形态学特征与鉴定[J]. *贵州林业科技*, 2014, 42(2):11.
- [15] Selosse M A, Dubois M P, Alvarez N. Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes [J]. *Mycol Res*, 2009, 113(10):1062.
- [16] 陈娟, 谭小明, 邢咏梅, 等. 石斛属植物内生真菌及菌根真菌物种多样性研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2013(19):1649.
- [17] 侯晓强. 石斛属植物菌根生物学研究[D]. 北京:北京协和医学院, 2007:126.
- [18] Xing Y M, Chen J, Cui J L, et al. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietnam [J]. *Curr Microbiol*, 2011, 62(4):1218.
- [19] Warcup J H. The *Rhizoctonia* endophytes of *Rhizanthella* (Orchidaceae) [J]. *Mycol Res*, 1991, 95(6):656.
- [20] Karimi M, Hassanshahian M. Isolation and characterization of phenol degrading yeasts from wastewater in the coking plant of Zarand, Kerman [J]. *Bmc Biotechnol*, 1998, 33(7):1927.
- [21] Martinez D, Larrondo L F, Putnam N, et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78 [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(6):695.
- [22] Kristiansen K A, Taylor D L, Kjoller 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.
- [23] 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.
- [24] 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(1):79.

[责任编辑 吕冬梅]