

## 兜兰属植物菌根真菌研究进展

黎艺璇<sup>1,2</sup>, 房林<sup>1</sup>, 陈红<sup>1</sup>, 李琳<sup>1</sup>, 吴坤林<sup>1</sup>, 曾宋君<sup>1,3\*</sup>

1. 中国科学院华南植物园华南农业植物分子分析和遗传改良重点实验室, 广东广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院华南植物园广东省应用植物学重点实验室, 广东广州 510650

**摘要:** 兰科兜兰属植物因其奇特的外观, 观赏价值极高, 具有良好的市场前景。但兜兰生长慢, 生长环境要求高, 又遭到人们持续采集, 野生兜兰数量稀少, 现已成为世界上最濒危的物种之一。通过人工繁殖出的大量种苗能应用于迁地保护、自然回归和商品化生产。但兜兰的人工繁殖难度大, 存在种子萌发率低、生长速度慢、回归自然的种苗适应性差等问题。菌根是植物长期在自然界生存中与真菌形成的一种共生关系。内生真菌在兜兰的生活史中扮演着重要的角色, 对种子萌发、植株生长和环境适应性均有极大帮助。研究内生真菌有助于兜兰的人工繁殖、商品化育苗及产业化推广, 也有利于兜兰属植物的自然回归和保护。本文对兜兰内生真菌特点、分离鉴定方法、内生真菌种类和作用等研究进行综述, 提出了内生真菌在兜兰属中的应用前景和未来研究方向等, 以期对兜兰属植物内生真菌的研究、兜兰种子共生萌发和商品化育苗及野生兜兰的保护提供参考。

**关键词:** 兜兰; 内生真菌; 研究进展

中图分类号: S682.31 文献标识码: B

## Research Advance in Mycorrhiza of *Paphiopedilum*

LI Yixuan<sup>1,2</sup>, FANG Lin<sup>1</sup>, CHEN Hong<sup>1</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, WU Kunlin<sup>1</sup>, ZENG Songjun<sup>1,3\*</sup>

1. Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Gene Improvement, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China

**Abstract:** In the Orchidaceae family, *Paphiopedilum* exhibits extraordinary ornamental value and promising market prospects due to its unique appearance. However, *Paphiopedilum* is at risk of extinction worldwide due to slow growth rate, high environmental demands, and continuous collection by humans. Artificial seedlings can serve as a potential solution for *ex situ* conservation, reintroduction and commercial production. Unfortunately, artificial propagation is challenged due to low seed germination rate, slow growth rate, and limited resistance to ecological environments. Mycorrhizal symbiosis between plants and fungi has played a crucial role in the natural development of *Paphiopedilum*, particularly endophytic fungi, which significantly contribute to seed germination and plant growth. This article presents an analysis of features of endophytic fungi of *Paphiopedilum*, methods of endophytic fungi separation, types and functions of research, and the application prospects, while also outlining future research direction for the conservation of wild *Paphiopedilum*, seed germination and commercialization. This study aims to provide a comprehensive reference for future research on *Paphiopedilum* conservation, seed germination and commercialization.

**Keywords:** *Paphiopedilum*; endophytic fungi; research advance

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.003

收稿日期 2023-04-10; 修回日期 2023-04-23

基金项目 广东省重点领域研发计划项目 (No. 2022B1111040003, No. 2022B1111230001); 广东省现代农业产业技术体系花卉创新团队项目 (No. 2022KJ121)。

作者简介 黎艺璇(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 兰花共生菌。\*通信作者 (Corresponding author): 曾宋君 (ZENG Songjun), E-mail: zengsongjun@scib.ac.cn。

兜兰属 (*Paphiopedilum*) 属于兰科, 全球共有 109 种, 主要分布在亚洲热带至太平洋岛屿<sup>[1]</sup>。我国约有 34 种, 主要分布在西南和华南地区的云南、贵州、广西、广东和海南等地。兜兰的唇瓣特化成兜状, 颇似拖鞋, 故又称为“拖鞋兰”或者“仙履兰”等, 其花型奇特, 观赏价值极高, 是兰科植物中的珍品, 具有良好的市场前景。随着花卉市场对兜兰的需求量不断增加, 近十几年人们对野生兜兰持续采集, 加上生境破坏, 导致野生兜兰数量急剧减少, 兜兰属植物均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 I 而被禁止交易<sup>[2]</sup>, 在中国除带叶兜兰和硬叶兜兰为国家二级保护植物外, 其他种类均为一级保护植物 (2021)。而兜兰的繁殖难度大, 传统繁殖主要依靠分株来进行, 繁殖系数低; 目前兜兰的组培快繁技术尚未完全成熟, 大部分种类与品种均不能利用其进行规模化生产; 种子的无菌播种和共生萌发是目前兜兰规模化繁殖的主要手段。兰科植物种子细小且无胚乳, 储藏的养分很少, 自然条件下不能自主萌发, 只有通过真菌共生获得养分才能萌发<sup>[3]</sup>。真菌还有促进植物生长发育的作用, 在兜兰植物整个生活史中, 共生真菌均扮演着重要的角色。对兜兰共生菌的了解, 可以应用于种子萌发并促进植株生长发育, 有助于解决兜兰人工有性繁殖的难题, 并改善根际环境而促进其健康生长, 对兜兰的保护和利用均具有重要的意义。因此, 越来越多专家学者开始着手于兜兰内生真菌的研究, 但由于兜兰材料珍稀, 总体研究报告还较少<sup>[2]</sup>。本文从兜兰内生真菌的特点、分离鉴定方法、菌根真菌种类、兜兰与真菌互动方式及应用前景等方面进行综述, 对兜兰内生真菌未来的研究方向提出建议, 以期对兜兰属植物的就地和迁地保护、种子共生萌发和商品化生产提供参考。

## 1 兜兰菌根的特点

在自然界, 共生菌广泛存在于动植物中, 几乎所有的兰科植物均与真菌共生形成菌根。植物的菌根分为外生菌根和内生菌根。外生菌根一般是指真菌在兰科植物体外生存, 不侵害植物体组织, 菌丝体紧密包裹着幼嫩的根, 代替根毛的作用, 扩大根系吸收面积。而内生菌根的菌丝体侵入细胞内部, 主要存在于根的皮肤区域。内生菌根又可以分为菌丝圈型和丛枝泡囊型。研究发现,

兰科菌根通常是内生菌根菌丝圈型, 在植株根内形成共生结构即菌丝团, 这使兰科菌根比其他类型的菌根有更高的菌根专一性<sup>[4]</sup>。兰科菌根形成的标志就是皮层薄壁细胞中胞内菌丝团的出现。菌丝团是共生结构, 用于储存菌根真菌的菌丝卷, 在代谢和营养化合物的交换中起着至关重要的作用<sup>[5]</sup>。菌丝团可以在共生体之间交换营养, 通常被植物细胞消化和吸收, 提供碳、矿物质营养和水。因此, 菌丝团是菌根异养器官, 对兰科植物生长中的营养供给起着关键作用<sup>[6]</sup>。

虽然兰科菌根比其他类型的菌根有更高的菌根专一性, 但其专一性也并不绝对<sup>[7]</sup>, 很多因素均会影响其专一性。兰科与菌根真菌的专一性广义上指宿主植物可以与多种特定真菌类群共生, 宿主植物对共生真菌具有一定偏好性; 狭义上指植物具有排他性, 只与一种真菌共生<sup>[8]</sup>。兰科植物的营养类型、生态类型和地理环境分布等因素均会影响其与共生真菌的专一性。兰科植物营养类型分为光合自养型、完全真菌异养型和部分真菌异养型。光合自养型往往专一性较低。菌根异养型兰比光合自养型兰对菌根真菌专一性更高, 具有更少种类的共生菌<sup>[4, 8]</sup>。地理分布上, 大陆菌根真菌专一性较低。热带地区由于真菌种类丰富, 该地区兰科植物菌根真菌专一性也较低。而岛屿的菌根菌专一性较高<sup>[9]</sup>。兜兰属植物生长在大陆偏热带的地方, 因此推测, 兜兰属的菌根真菌专一性较低, 可以与多种真菌共生。兜兰在其原球茎阶段专一性程度最高, 在植物成年阶段时, 营养需求增加, 共生真菌种类也有所增加。这与红门兰属植物相同<sup>[10]</sup>, 与羊耳蒜属植物 *Liparis loeselii* 情况相反<sup>[11]</sup>。

兰科的生态类型分为地生、附生和腐生三大类。有研究表明大部分地生兰根被较薄, 外皮层无通道细胞, 兰科菌根真菌菌丝通过破坏根被或外皮层进入兰科植物皮层细胞, 如建兰、墨兰和虎头兰; 而附生兰根被较厚, 外皮层具有通道细胞, 兰科菌根真菌菌丝通过通道细胞进入兰科植物皮层细胞, 如卡特兰、长莲羊耳、蒜万代兰以及石斛等<sup>[12-13]</sup>。兜兰属植物有地生型和附生型, 属于地生兰的紫纹兜兰、硬叶兜兰和麻栗坡兜兰 3 种兜兰的外皮层均不具通道细胞, 属于石上附生型的长瓣兜兰具有通道细胞。半附生型的带叶兜兰也不具有通道细胞<sup>[14]</sup>。

对于兜兰菌根真菌的空间分布特征研究发

现,在多种兜兰的根部,共生菌菌丝团通常在靠近外皮层 3~5 层的皮层细胞中,而红旗兜兰中菌丝团在 6~7 层细胞中<sup>[4]</sup>。菌丝在菌根中的分布不是平均分布于整个根的横截面,而是集中在某一区域。菌丝团有多种不同形态,新生菌丝较为疏松,成熟的菌丝团紧密至不能辨别出菌丝,相邻皮层细胞中的菌丝团通过菌丝相连进行营养与信息交流。当菌丝团衰老消解时,会在皮层细胞观察到大量淀粉粒,这些淀粉粒为植株提供养分<sup>[15-16]</sup>。衰老的菌丝会被植物的根细胞慢慢消化和吸收,在衰老菌丝被吸收后又形成新的菌丝团。在植株整个生长发育过程中,菌丝不断被消化吸收又重新形成,这也是兰科植物和内生真菌相互作用的证据之一。

通过对硬叶兜兰菌根切片进行观察分析,发现菌丝随着根毛进入根被。横向上,菌丝团数量在皮层细胞中最多,逐渐向外皮层和内皮层减少,内皮层和中柱无菌丝。菌丝团在细胞中多存在于细胞核附近<sup>[14]</sup>。外皮层细胞中的菌丝团活力最高,向内逐渐降低。纵向上,硬叶兜兰根的上中下部分均有分布真菌,真菌从根中部入侵向两头蔓延,根尖和根中部共生菌种类最多,根中部的共生菌数量最多。菌根真菌的种类和数量也会随着根龄变化,在 1~3 年的根中,真菌数量和种类在 2 年生根中最多,1 年生根中最少。菌丝团的活力随着根龄的增加反而降低<sup>[17]</sup>。

## 2 兜兰共生真菌分离鉴定

### 2.1 共生菌分离技术

进行内生菌分离培养时,选择的消毒试剂和消毒时间应根据具体的种、生长环境和材料的幼嫩等情况而定。消毒时间太短不能将表面污染杂菌消灭干净,消毒时间太长可能对根组织及内生真菌产生伤害。田凡等<sup>[18]</sup>通过单菌丝团分离法对硬叶兜兰菌根真菌进行分离,发现菌丝团恒温培养 12 h 后萌发率高且污染少,此时是进行镜检的最佳时间;经升汞处理 2~3 min 后根段的污染最小,但还是存在 26.7% 的污染率。王晓国等<sup>[19]</sup>通过 75% 酒精和 10% 次氯酸钠设定不同的消毒时间,发现分离出的真菌数量和种类也不完全相同,75% 酒精消毒 4 min,10% 次氯酸钠消毒 2 min 时分离得到的菌株数目最多,但只有 1 个属;当 75% 酒精消毒 8 min,10% 次氯酸钠消毒 8 min 后可分离得到 3 个属的真菌,比较适合带叶兜兰的真菌

分离。

菌根真菌的分离方法主要有原生地共生萌发法、组织切片分离法、菌丝团分离法、倾注混匀法和单菌丝团分离法等<sup>[20]</sup>。兰科植物的菌根真菌与其他植物菌根真菌最大不同在于除了与成年植株根共生外,兰科植物种子萌发必须依靠相关共生真菌才能完成。对兰科植物种子萌发阶段的共生真菌分离多采用原地共生萌发技术,即原生境种子诱捕法(*ex situ seed baiting technique*)。该方法将兰科植物的种子套袋后埋在其原来生境中进行萌发试验,待其萌发后从原球茎中定向分离菌根真菌<sup>[21]</sup>,利用此方法分离到的真菌一般只对种子萌发起作用且专一性强。在此基础上改造而来的实验室种子诱捕法是指将原生境的枯枝落叶、土壤等基质取回实验室,在实验室内进行种子播种诱捕<sup>[22]</sup>,此方法比原生境种子诱捕法更为方便。

对兰科植物菌根真菌的分离,传统的组织切片分离法是最早使用的方法,即将洗净消毒后的根段切成薄片置于培养基上,用菌丝尖端挑取法将根皮层细胞中长出的菌株分离,不断纯化。利用这种方法常因分离到的真菌不能确定是否为菌根真菌,需通过回接实验或共生萌发实验才能验证。另外,在真菌分离过程中常由于表面消毒不彻底、易污染而混入表面微生物,分离效率也较低<sup>[7]</sup>。

目前,兰科菌根的分离大多依靠单菌丝团分离法,该方法是根据兰科菌根真菌在原球茎细胞内或根部皮层细胞中形成的特殊菌丝团结构而设计出的方法,通过该方法能够得到真正的菌根真菌。首先将根段进行表面消毒,刮取细胞内部菌丝团,配制成菌丝团悬液,将悬液转入离心管孵育 4~24 h,然后在显微镜下用移液枪吸取 50  $\mu$ L 包含萌发的菌丝团悬液至培养皿。这种方法可以尽量避免根部表面真菌以及根内真菌的污染,但需要严格的无菌条件和熟练的挑取菌丝的技术和合适的工具,孵育时菌丝团容易结合到一起而很难分开。针对这些缺点,孙晓颖<sup>[14]</sup>利用带叶兜兰对该方法进行了改良,无需菌丝团孵育和显微镜下操作,同时减少了菌丝团悬液滴加量,控制了细菌生长。研究结果显示用菌丝团分离法比单菌丝团分离法简单,无需恒温培养并减少了污染,效果较好,分离得到较多的纯菌株数和较少的伴有细菌的菌株数。孙晓颖<sup>[14]</sup>用 1/5 PDA 培养基、FIM 培养基、POA 培养基培养带叶兜兰菌根真菌

时,发现在相对贫瘠的 1/5 PDA 培养基上菌根真菌分离效果最好。

由于单菌丝团分离法操作复杂,目前兜兰属植物菌根真菌的分离多使用组织切片法。另外,并非所有菌根真菌均能在体外条件下生长<sup>[23]</sup>,在无菌条件下鉴定兜兰菌根真菌菌根生态具有限制性。因此,兜兰菌根相互作用的研究还需要通过非培养依赖性方法鉴定菌根真菌<sup>[7]</sup>。

## 2.2 共生真菌鉴定技术

共生真菌鉴定的传统方法是形态学方法,根据培养出来的菌落特征和显微形态,结合文献资料,综合对比真菌特征,进行初步地分析、分类和鉴定,但此方法大多只能鉴定到属,而不能鉴定到种,虽已被普遍认同但存在较大局限性。另外,兜兰菌根真菌多数是胶膜菌科,人工培养下难以生长出孢子,使鉴定更加困难。目前,共生真菌的鉴定除形态学方法外,分子生物学技术的应用也成为真菌分类鉴定的主要发展方向。目前 rDNA-ITS 序列分析与传统形态学相结合的方法已成为主流,并成功鉴定出多种兜兰的菌根真菌。即通过提取菌根真菌的 DNA,采用 ITS 引物,PCR 扩增后测序,测序结果在 GenBank 中利用 BLAST 与已知序列比对,从而鉴定出真菌<sup>[14, 24-25]</sup>。但 rDNA-ITS 序列分析方法也存在一定局限性,其结果只能将大部分的菌株鉴定到属也不能鉴定出种,其原因是因为 GenBank 中兰科菌根真菌的已知序列少,比对时相似序列较多。但随着数据库的不断丰富,将来相似的序列会越来越多,结合其他序列进行比对鉴定是将来的发展趋势<sup>[26]</sup>。另外,其他一些分子生物学技术也应用于兰科植物共生菌的分类鉴定上,如 DNA 分析、同工酶图谱分析、核酸杂交和杂交瘤等技术<sup>[27]</sup>,未来也可以应用于兜兰植物菌根鉴定分类研究上。另外,宏基因组学已成为目前国际上微生物研究的前沿和热点领域<sup>[28]</sup>,但这项技术在兰科植物菌根真菌的研究上尚未报道。

## 3 兜兰共生真菌的主要类群

已报道与兰科植物形成菌根的共生真菌有 50 多个属,绝大多数已报道的兰科菌根真菌属于半知菌亚门、丝核菌类 (Rhizoctonia) 和担子菌类 (Basidiomycetes),包括胶膜菌科 (Tulasnellaceae)、角担菌科 (Ceratobasidiaceae)、腊壳耳科 (Sebacinaceae)、红菇科 (Russulaceae)

等<sup>[8]</sup>,主要的属有伏革菌属 (*Corticium*)、干菌属 (*Xerotus*)、杯菌属 (*Clitocybe*)、亡革菌属 (*Thanatephorus*)、胶膜菌属 (*Tulasnella*)、皮伞菌属 (*Marasmius*)、角担菌属 (*Ceratobasidium*)、密环菌属 (*Armillaria*)、假密环菌属 (*Armillariella*)、层孔菌属 (*Fomes*)、蜡壳菌属 (*Sebacina*) 和丝核菌属 (*Rhizoctonia*) 等<sup>[1, 29-31]</sup>。根据生态类型,不同种类其优势共生菌群也不完全相同,地生兰主要以胶膜菌科和角担菌科真菌占优势。大多数的附生绿色兰科植物的共生真菌属于角担菌科、胶膜菌科和蜡壳耳目。腐生兰共生菌类群具有高度专一性,且与地生兰和附生兰共生菌种类不同,其中珊瑚兰属植物仅与革菌属真菌共生<sup>[4]</sup>。

目前,已从兜兰属植物中分离出 20 多个属的共生真菌。菌根组合的特异性受环境条件、相邻植物物种以及土壤中菌根真菌的丰度和分布的影响<sup>[32]</sup>,所以同种兜兰在不同地区的菌根真菌组成也可能不完全一致。其中 YUAN 等<sup>[33]</sup>等利用分子系统学方法,发现兜兰属菌根真菌均属于胶膜菌科真菌,该研究得出,胶膜菌科菌种为硬叶兜兰的优势菌种。孙晓颖等<sup>[34]</sup>为了获得种子萌发阶段的共生真菌,利用原地共生萌发技术从带叶兜兰中分离出瘤菌根菌 (*Epulorhiza* sp.),并且验证了分离得到的瘤菌根菌能促进带叶兜兰的种子萌发;还从 5 种野生成年兜兰根部分离得到 16 株类丝核菌,均属于胶膜菌属<sup>[14]</sup>。田凡等<sup>[35]</sup>利用形态学特征从硬叶兜兰分离出 6 株菌根真菌,已鉴定出的 5 株属于胶膜菌属、瘤菌根菌属和镰刀菌属 (*Fusarium*),1 种未鉴定。田凡等<sup>[17]</sup>利用传统形态学结合 rDNA-ITS 序列分析从硬叶兜兰中分离出 29 株菌根真菌,共鉴定出 23 株,属于 15 个属,有 6 株未鉴定出属,鉴定出的 14 个属为胶膜菌属、瘤菌根菌属、镰刀菌属、丝核菌属、栓菌属 (*Trametes*)、附毛菌属 (*Trichaptum*)、拟迷孔菌属 (*Daedaleopsis*)、小脆柄菇属 (*Psathyrella*)、拟层孔菌属 (*Fomitopsis*)、毛壳属 (*Chaetomium*)、侧耳属 (*Pleurotus*)、轮枝菌属 (*Lecanicillium*)、弯孢聚壳属 (*Eutypella*) 和 *Peniophorella*; 分离到的优势菌株中,有 11 株是胶膜菌科 (Tulasnellaceae) 的瘤菌根菌属和胶膜菌属,1 株为无孢科 (Agonomycetaceae) 的丝核菌属。李明等<sup>[36]</sup>从杏黄兜兰根内分离到 13 株真菌,经鉴

定为镰刀菌属、组丝核菌属 (*Phacodium*)、青霉属 (*Penicillium*)、木霉属 (*Trichoderma*) 和接台菌纲毛霉属 (*Mucor*)，其中镰刀菌和组丝核菌为优势菌。ATHIPUNYAKOM 等<sup>[37]</sup>从同色兜兰、边远兜兰、古德兜兰和紫毛兜兰中分离得到 6 株瘤菌根菌，包括瘤菌根菌属中的 *E. repens* 和 *E. calendulina*，丝核菌属中的 *Rhizoctonia* sp. 和角菌根菌属中的 *Ceratorhiza ramicola*，以及从白花兜兰中还分离到 *Trichosporiella* sp. 和 *Waitea circinata*，其中同色兜兰、边远兜兰和紫毛兜兰中均分离到瘤菌根菌属中的 *E. repens*。NONTACHAIYAPOOM 等<sup>[38]</sup>从兜兰属中的边远兜兰、紫毛兜兰、胼胝兜兰、红旗兜兰和苏氏兜兰中分离得到 14 株类丝核菌属 (*Rhizoctonia-like*) 菌株；在 3 个种中均分离到瘤菌根菌属的 *E. repens*，*E. calendulina* 只在兜兰中分离到；胶膜菌属的 *Tulasnella irregularis* 和另外 4 个菌种也在兜兰中分离到。YUAN 等<sup>[33]</sup>证明硬叶兜兰、杏黄兜兰和长瓣兜兰的菌根真菌为胶膜菌科。王晓国等<sup>[19]</sup>从广西乐业县的野生从带叶兜兰中分离到 63 株真菌，未鉴定出种类的有 8 株，其余属于镰刀菌属、胶膜菌属、轮层菌属 (*Daldinia*)、碳团菌属 (*Hypoxyton*)、毛壳菌属，得到的优势菌群为镰刀菌属和轮层菌属，其中分离到的轮层菌是在兜兰中首次报道，可能是共生菌，也有可能是潜伏的致病菌。

从上述研究中可以看出，在多种兜兰中经常

分离到胶膜菌属、镰刀菌属、瘤菌根菌属和丝核菌属，常见优势菌种有胶膜菌属和镰刀菌属，部分兜兰的优势菌种还有瘤菌根菌属、丝核菌属、组丝核菌属、轮层菌属，这说明胶膜菌属和其对应的无性态瘤菌根菌属、镰刀菌属、丝核菌属很可能都是兜兰植物的共生菌根真菌，有些已接回兜兰中试验证明了其与兜兰的共生互作关系。其中镰刀菌在多种兜兰属植物中分离到，甚至成为优势菌株，说明镰刀菌与兜兰植物的生长有着密切关系。镰刀菌在大多植物中是致病菌，但有研究表明，从兰科分离到的镰刀菌可以促进铁皮石斛种子的萌发和生长，RASMUSSEN<sup>[39]</sup>也认为镰刀菌是兰科的菌根真菌。从表 1 可以看出，同种兜兰在不同生长时期(种子萌发阶段和成年阶段)和不同地区的菌根真菌不一定相同，杏黄兜兰在种子萌发阶段只分离到瘤菌根菌属真菌，一般认为，促进兰花种子早期萌发的共生真菌只有一种，具有严格的专一性<sup>[34]</sup>；成年阶段时，采自广西乐业县的兰花可以分离出胶膜菌属、镰刀菌属、轮层菌属、碳团菌属、毛壳菌属<sup>[19]</sup>，但采自贵州省兴义市的兰花只分离出胶膜菌属真菌<sup>[14]</sup>。

真菌的分类鉴定困难，还存在很多问题有待解决。有些子囊菌门和担子菌门真菌在人工培养下难以形成孢子，选择合适的诱导孢子形成的培养基是菌种鉴定的一个难点。还有许多无性型丝核菌属真菌的有性种未被鉴定。

表 1 兜兰菌根真菌种类  
Tab. 1 Mycorrhizal fungi of *Paphiopedilum*

兜兰种类 Species of <i>Paphiopedilum</i>	菌根真菌属 Mycorrhizal fungi	优势菌群 Preponderant fungus	参考文献 Reference
硬叶兜兰	胶膜菌属、瘤菌根菌属、镰刀菌属、丝核菌属、栓菌属、附毛菌属、拟迷孔菌属、小脆柄菇属、拟层孔菌属、毛壳属、侧耳属、轮枝菌属、弯孢聚壳属、 <i>Peniophorella</i>	瘤菌根菌属、胶膜菌属、丝核菌属	[17]
杏黄兜兰	镰刀菌属、组丝核菌属、青霉属、木霉属、接台菌纲毛霉属	镰刀菌、组丝核菌属	[36]
带叶兜兰	胶膜菌属、镰刀菌属、轮层菌属、碳团菌属、毛壳菌属	镰刀菌属、轮层菌属	[25]
带叶兜兰(种子萌发阶段)	瘤菌根菌属	专一种	
紫纹兜兰、带叶兜兰、硬叶兜兰、长瓣兜兰、麻栗兜兰(野生成年)	胶膜菌属	胶膜菌属	[34]
同色兜兰、边远兜兰、古德兜兰、紫毛兜兰	瘤菌根菌属、丝核菌属、角菌根菌属		[37]
边远兜兰、紫毛兜兰、胼胝兜兰、红旗兜兰、苏氏兜兰	类丝核菌属、瘤菌根菌属、胶膜菌属		[38]
硬叶兜兰、杏黄兜兰、长瓣兜兰	胶膜菌科	胶膜菌科	[33]
白旗兜兰(种子萌发阶段)	胶膜菌科	专一种	[40]

#### 4 兜兰和共生真菌互作

菌根共生关系几乎伴随着兜兰属植物的整个生活史。兰科植物的种子是所有开花植物中最小的种子之一,其特征是一个小而未发育的胚胎,未被胚乳包围。兜兰种子在野外生境下萌发率极低,紫纹兜兰在自然条件下的萌发率为  $1.06 \times 10^{-4}$ ,带叶兜兰的自然萌发率为  $3.8 \times 10^{-5}$  [15],红旗兜兰萌发率为 0.139% [15]。在自然条件下,兰花种子需要被兼容的菌根真菌定殖才能使其种子发芽 [41]。在这个发育阶段属于完全真菌异养,兰花直接从定殖菌丝获得水分和矿物质营养来促进胚胎发育和植物形态建成 [40],因此,菌根真菌对兰花至关重要,尤其是在实验室和田间条件下实现种子萌发时。一般认为,兰花种子萌发时,前期的共生菌是专一的,即在早期的兰花原球茎中只能分离到一种共生菌,尽管同一种类在不同环境下所获得的促进萌发的共生真菌可能不同。但是随着原球茎的发育,共生的真菌会越来越多,有关兰花种子萌发共生菌专一性的机制尚不清楚,需进一步研究。孙晓颖等 [34] 在带叶兜兰幼苗中分离筛选出共生菌瘤菌根菌,利用该菌与带叶兜兰种子在实验室内进行共生萌发试验发现,接菌的种子胚明显膨大,平均萌发率近 60%,而对照组无种子萌发。YANG 等 [40] 利用原生地的土壤作萌发基质,在实验室利用非原地共生萌发技术,从白旗兜兰中分离到能促进种子萌发的 2 株胶膜菌科 (Tulasnellaceae) 共生真菌 GYBQ01 和 GYBQ02,利用这 2 株真菌和白旗兜兰进行共生培养时,萌发率分别为 34.9% 和 50.8%,而对照及采用从竹叶兰中分离的共生菌则不能促进白旗兜兰的种子萌发。一些兰花物种中能够促进种子萌发的菌根真菌可能在进一步的发育阶段中不起作用,这表明兰科植物生命周期中存在真菌转变 [42-43]。在室内共生萌发试验中,登录号为 FJ7866676 的胶膜菌科真菌能促进红旗兜兰和同色兜兰萌发至第 2 阶段,接下来可能还需要其他真菌参与 [15]。

共生菌也促进兰科植物的生长,菌根中菌丝团用于储存兰科菌根真菌的菌丝,在代谢和营养化合物的交换中起着至关重要的作用。菌丝团可以在共生体之间交换营养,通常被植物细胞消化和吸收,提供碳、矿物质营养和水。完整和降解的菌丝团都是兰科植物的营养来源。YODER 等 [44] 认为植物鲜重的增加是因为富含水分的菌丝团被

消化,即直接利用水分,或者是菌丝与土壤接触起水分运输管道的作用而增加植物对水分的吸收。CAMERON 等 [45-46] 利用同位素证实兰菌能分解植物体外碳、氮、磷源,并由菌丝运输至小叶斑兰 (*Goodyera repens*) 根部及植株。丝核菌 (*R. solani*) 能将色氨酸 (tryptophan) 分解形成大量的 IAA 及 IAA 前驱物 tryptophol [47],有报道指出与丝核菌 (*Rhizoctonia*) 共同培养的原球体内具有较高浓度的 IAA [48]。吴静萍等 [49-50] 从采自福建的密花石斛 (*Dendrobium densiflorum*) 根中的镰孢菌内发现含有赤霉素,赤霉素能促进根的生长;还发现菌丝内含有 B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub>,分泌物中含有 B<sub>2</sub>、B<sub>6</sub> 和 Bc (叶酸),这些 B 族维生素有利于兰花种子的发芽和苗的正常生长。

兜兰生长速度缓慢,成苗慢,严重限制了兜兰产业的发展。利用菌根真菌与兜兰共生,促进兜兰生长具有重要意义。朱鑫敏等 [16] 用菌株 PM-1 对 2 种兜兰进行共同培养,接菌苗的生物量以及 Ca、Mn 元素含量比对照组显著增加;菌株 PA-1 也对杏黄兜兰干物重增长有一定的促进作用;培养基养分水平能显著影响内生真菌与兜兰的共生关系,在营养贫瘠的培养基上真菌能促进杏黄兜兰生长,而在营养丰富的培养基上,兜兰生长缓慢,菌丝生长速度快至缠绕植物,导致真菌对兜兰有毒害作用,保持真菌和兜兰适当的营养平衡对于二者的共生十分重要。王才义等 [51] 从 7 种兜兰根部分离出 8 株菌,侵染 2 种兜兰幼苗,观察到 8 株菌中 Pwar-1 和 Ppri-1 对德氏兜兰白花变种 (*Paph. delenatii* fma. *Album*) 的根数与鲜重均有促进效果;Ppri-1 对兜兰杂交种 [*Paph. In-Charm* Rainbow × *Paph. (Green Heron* × *Makuli*)] 的叶宽、根数、鲜重与干重有促进效果,且叶色较浓绿,可能是由于共生菌促进叶绿素含量提高导致叶色较深,其余菌株对 2 种兜兰的生长无显著影响。陈宝玲等 [52] 用从野生兜兰根中分离出的 4 种真菌与带叶兜兰共生,筛选出 *Cladosporium perangustum* 和 *Phialophora* sp. 对带叶兜兰的促进生长作用和生理效应最佳,鲜重增量、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 3 种保护酶活性及叶绿素总量增长显著。

共生菌还能降低兰科发病率,增强对其他病菌和不利生存环境的抵抗能力,间接提高幼苗的成活率。菌根形成后,菌根真菌会释放拮抗物质,能够有效阻止其他病原菌侵入兰根。菌根相互作用

用是动态的, 所有变化均指向基因组和共生水平的复杂代谢调节<sup>[53]</sup>。目前在兰科与菌根真菌互作的内在机制方面的研究还较少。FAVRE-GODAL 等<sup>[54]</sup>推测它们互作的可能机制是: 真菌通过分泌效应物(如小抑制蛋白)来克服植物的防御机制, 真菌还分泌多种细胞壁降解酶, 有助于其在兰科植物皮层细胞内定殖<sup>[55]</sup>。兰科植物通过分泌多种植物激素, 帮助真菌定殖。兰科植物还会分泌植物信号分子, 如独脚金内酯和类黄酮等; 作为回应菌根真菌会分泌菌根因子(mycorrhizal factors), 来激活植物的共同共生基因(common symbiosis genes)。以上推测内容为在分子水平研究共生机制提供了思路。

## 5 兜兰共生真菌的应用前景

在自然条件下兰科植物种子只有通过与相应真菌共生, 从真菌中获取营养才可使种子萌发; 而菌根化育苗有利于改善根际环境, 加快兰科植物生长速度, 增加植株的抗病能力, 对野生兜兰种群保护与恢复也具有重要意义。

兰花菌剂是利用兰科植物菌根的真菌孢子、菌丝等经过人工繁殖, 加工配制而成, 可以直接用于植株接种。李明等<sup>[36]</sup>初步探究了兜兰菌根真菌菌剂的应用, 将 3 种组丝核菌制成菌剂, 施入杏黄兜兰根部, 对杏黄兜兰产生了一定的促生长效果, 植株的重量得到了提高; 特别是从萌发的原球茎中分离出共生萌发真菌制成真菌菌剂直接拌种, 能加快兜兰繁殖速度并降低无菌播种的成本。

另外, 在其他兰科植物种子萌发和幼苗发育的原位调查中, 通过将种子“包”埋在离成体植物相邻或不同距离的地方, 对研究兰科植物菌根真菌接种量和微生境特异性非常有效<sup>[56]</sup>。WANG 等<sup>[57]</sup>建立了一种对铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)和金钗石斛(*D. nobile*)进行原位种子诱捕的新方法, 利用种子包来评估兰花种子在土壤中的发芽情况, 可定位、收集, 并确定在野生环境中与兰花生命周期有关的特定真菌, 研究它们在自然野外条件下与兰花的关系。这些信息将对未来兰科植物生产和重新引入至关重要, 应用此类技术对兜兰野生种群的保护与恢复具有重要意义。

目前关于兜兰菌根真菌的研究还处于初级阶段, 对兜兰的共生真菌研究主要集中在分离与鉴

定, 而对共生萌发体系的建立研究与菌根育苗研究还较少, 还有很多问题有待解决, 如兜兰菌根真菌多为人工培养下难以生长出孢子的胶膜菌属, 对于菌根真菌有效的分离方法、分离出的真菌的准确鉴定方法还需进一步优化。另外, 真菌入侵机制、真菌种子共生萌发真菌的高度专一性机制、兜兰共生菌的特异性以及兜兰的共生萌发比大部分兰科植物难度更大的原因等, 这些均还需专家学者不断地深入研究。

## 参考文献

- [1] 陈心启, 吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998.  
CHEN X Q, JI Z H. The orchids of China[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1998. (in Chinese)
- [2] ZENG S J, HUANG W C, WU K L, ZHANG J X, TEIXEIRA D A, SILVA J A, DUAN J. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(3): 521-534.
- [3] KAUTH P J, DUTRA ELLIOTT D, JOHNSON T R, KANE M, STEWART S L, VENDRAME W. Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination[M]//TEIXEIRA DA SILVA JA (Ed.), Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. Isleworth: Global Science Books, Ltd., 2008.
- [4] 唐燕静, 郭顺星, 陈娟. 兰科植物与菌根真菌专一性研究进展[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2021, 42(3): 63-74.  
TANG Y J, GUO S X, CHEN J. Advances in the specificity of orchid-mycorrhizal fungi[J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition), 2021, 42(3): 63-74. (in Chinese)
- [5] DEARNALEY J, PEROTTO S, SELOSSE M A. Structure and development of orchid mycorrhizas[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2016: 63-86.
- [6] KUGA Y, SAKAMOTO N, YURIMOTO H. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms[J]. New Phytologist, 2014, 202: 594-605.
- [7] 伍建榕, 韩素芬, 王光辉, 吕梅, 郭文林. 兰科植物菌根研究进展[J]. 西南林学院学报, 2004, 24(3): 76-80.  
WU J R, HAN S F, WANG G H, LYU M, GUO W L. Advance in studies of Orchidaceae mycorrhiza[J]. Journal of Southwest Forestry College, 2004, 24(3): 76-80. (in Chinese)
- [8] PÖLME S, BAHRAM M, JACQUEMYN H, KENNEDY P, KOHOUR P, MOORA M, OJA J, OPIK M, PECORARO L, TEDERSOO L. Host preference and network properties in

- biotrophic plant-fungal associations[J]. *New Phytologist*, 2018, 217(3): 1230-1239.
- [9] MERCKX V S, MENNES C B, PEAY K G, GEML J. Evolution and diversification[M]//Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi. New York: Springer Science, Business Media, 2013: 215-244.
- [10] JACQUEMYN H, MERCKX V, BRYS R, TYTECA D, CAMMUE B P A, HONNAY O, LIEVENS B. Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis* (Orchidaceae)[J]. *New Phytologist*, 2011, 192(2): 518-528.
- [11] WAUD M, BRYS R, VAN LANDUYT W, LIEVENS B, JACQUEMYN H. Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species[J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26: 1687-1701.
- [12] 范黎, 郭顺足, 肖培根. 密花石斛等六种兰科植物菌根的显微结构研究[J]. *植物学通报*, 2000(1): 73-79.  
FAN L, GUO S Z, XIAO P G. Study on the microstructure of mycorrhizal fungi in six orchid plants including *Dendrobium officinale*[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2000(1): 73-79. (in Chinese)
- [13] 伍建榕, 吕梅, 刘婷婷, 刘丽, 马焕成. 6 种兰科植物菌根的显微及超微结构研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2009, 37(7): 199-207.  
WU J R, LYU M, LIU T T, LIU L, MA H C. Microscopic and ultrastructural studies on mycorrhizal fungi of six orchid plants[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2009, 37(7): 199-207. (in Chinese)
- [14] 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.  
SUN X Y. Diversity of mycorrhizal fungi isolated from five species of the genus *Paphiopedilum*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014. (in Chinese)
- [15] 裔景. 四种兜兰的菌根真菌及共生萌发研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2017.  
YI J. Mycorrhizal fungi and symbiotic seed germination of four *Paphiopedilum* species[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2017. (in Chinese)
- [16] 朱鑫敏, 胡虹, 李树云, 严宁. 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.  
ZHU X M, HU H, LI S Y, YAN N. Interaction between endophytic fungi and seedlings of two species of *Paphiopedilum* during symbiotic culture[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2012, 34(2): 171-178. (in Chinese)
- [17] 田凡, 廖小锋, 王莲辉, 朱国胜, 桂阳, 白新祥. 硬叶兜兰菌根真菌的分类鉴定[J]. *北方园艺*, 2017(24): 116-122.  
TIAN F, LIAO X F, WANG L H, ZHU G S, GUI Y, BAI X X. Classification and identification of mycorrhizal fungi of *Paphiopedilum micranthum*[J]. *Northern Horticulture*, 2017(24): 116-122. (in Chinese)
- [18] 田凡, 朱国胜, 桂阳, 白新祥. 硬叶兜兰菌根真菌的分离及培养特性的研究[J]. *北方园艺*, 2012(7): 61-64.  
TIAN F, ZHU G S, GUI Y, BAI X X. Study on isolation and culture characteristics of *Paphiopedilum micranthum* mycorrhizal fungi[J]. *Northern Horticulture*, 2012(7): 61-64. (in Chinese)
- [19] 王晓国, 卢家仕, 周主贵, 李秀玲, 陈廷速, 卜朝阳. 带叶兜兰菌根真菌分离和初步鉴定[J]. *西南农业学报*, 2016, 29(1): 316-320.  
WANG X G, LU J S, ZHOU Z G, LI X L, CHEN T S, BU C Y. Isolation and preliminary identification of mycorrhizal fungi from *Paphiopedilum hirsutissimum*[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 29(1): 316-320. (in Chinese)
- [20] 王晓国, 周主贵, 李冬萍, 李秀玲, 张金莲, 陈廷速. 同色兜兰菌根真菌染色方法比较[J]. *亚热带农业研究*, 2015, 11(4): 267-270.  
WANG X G, ZHOU Z G, LI D P, LI X L, ZHANG J L, CHEN T S. Comparison of five staining methods for orchid mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum concolor* roots[J]. *Subtropical Agriculture Research*, 2015, 11(4): 267-270. (in Chinese)
- [21] RASMUSSEN H N, WHIGHAM D F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids[J]. *American Journal of Botany*, 1993, 80(12): 1374-1378.
- [22] BRUNDRETT M C, SCADE A, BATTY A L, DIXON K W, SIVASITHAMPARAM K. Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats[J]. *Mycological Research*, 2003, 107(10): 1210-1220.
- [23] EGIDI E, MAY T W, FRANKS A E. Seeking the needle in the haystack: undetectability of mycorrhizal fungi outside of the plant rhizosphere associated with an endangered Australian orchid[J]. *Fungal Ecology*, 2018, 33: 13-23.
- [24] 田凡, 廖小锋, 颜凤霞, 王莲辉, 白新祥. 硬叶兜兰菌根结构及菌根真菌空间分布特征特征[J]. *江苏农业科学*, 2018, 47(2): 105-108.  
TIAN F, LIAO X F, YAN F X, WANG L H, BAI X X. Study on mycorrhizal structure and spatial distribution characteristic of mycorrhizal fungi in roots of *Paphiopedilum micranthum*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 47(2): 105-108. (in Chinese)
- [25] 王晓国, 闫海霞, 李秀玲, 何荆洲, 周主贵. 带叶兜兰菌根真菌的鉴定及其促生作用[J]. *西南农业学报*, 2021,

- 34(1): 119-125.  
WANG X G, YAN H X, LI X L, HE J Z, ZHOU Z G. Identification and growth promoting analysis of mycorrhizal fungi from *Paphiopedilum hirsutissimum*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(1): 119-125. (in Chinese)
- [26] 燕用, 李卫平, 高雯洁. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 58-61.  
YAN Y, LI W P, GAO W J. Application of rDNA-ITS sequence analysis in fungus identification[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(10): 58-61. (in Chinese)
- [27] 李明, 张灼, 彭彦华. 兰科菌根研究与应用[J]. 云南农业科技, 2000(6): 42-44.  
LI M, ZHANG Z, PENG Y H. Research and application of Orchidaceae mycorrhiza[J]. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2000(6): 42-44. (in Chinese)
- [28] HANDELSMAN J, RONDON M R, BRADY S F, CLARIDY J, GOODMAN R M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chemistry and Biology, 1998, 5(10): 245-249.
- [29] 陈瑞蕊, 林先贵, 施亚琴. 兰科菌根的研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(1): 97-101.  
CHEN R R, LIN X G, SHI Y Q. Research advances of orchid mycorrhizae[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2003, 9(1): 97-101. (in Chinese)
- [30] 朱国胜, 刘伟易, 毛堂芬. 兰科植物菌根真菌的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2004, 32(4): 79-81.  
ZHU G S, LIU W Y, MAO T F. Research advances of orchid mycorrhizal fungi[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2004, 32(4): 79-81. (in Chinese)
- [31] 景袭俊, 胡凤荣. 兰科植物研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(15): 5080-5092.  
JING X J, HU F R. Research progress of Orchidaceae[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(15): 5080-5092. (in Chinese)
- [32] WATERMAN R J, BIDARTONDO M I. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59: 1085-1096.
- [33] YUAN L, YANG Z L, LI S Y, HU H, HUANG J L. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China[J]. Mycorrhiza, 2010(20): 559-568.
- [34] 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.  
SUN X Y, ZHANG W F, LIU H X. *In situ* symbiotic seed germination, isolation and identification of effective mycorrhizal fungus in *Paphiopedilum hirsutissimum*[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2015, 23(1): 59-64. (in Chinese)
- [35] 田凡, 白新祥, 王莲辉, 姜运力, 罗在柒. 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): 5-16.  
TIAN F, BAI X X, WANG L H, JIANG Y L, LUO Z Q. Morphological features and identification of the mycorrhizal fungi of *Paphiopedilum micranthum*[J]. Guizhou Forestry Science and Technology, 2014, 42(2): 5-16. (in Chinese)
- [36] 李明, 张灼. 杏黄兜兰菌根研究与应用[J]. 生物学杂志, 2001, 18(6): 17-18.  
LI M, ZHANG Z. Studies and applications on mycorrhiza of *Paphiopedilum armeniacum*[J]. Journal of Biology, 2001, 18(6): 17-18. (in Chinese)
- [37] ATHIPUNYAKOM P, MANOCH L, PILUCK C. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchid[J]. Kasetsart Journal (Natural Science), 2004, 38: 216-228.
- [38] 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: 459-471.
- [39] RASMUSSEN H N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza[J]. Plant and Soil, 2002, 244(12): 149-163.
- [40] YANG W K, LI T Q, WU S M, FINNEGAN P M, GAO J Y. *Ex situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for assisted colonization in *Paphiopedilum spicerianum*, a critically endangered orchid in China[J]. Global Ecology and Conservation, 2020, 23: e01147.
- [41] DEARNALEY J D. Further advances in orchid mycorrhizal research[J]. Mycorrhiza, 2007, 17: 475-486.
- [42] HERRERA H, VALADARES R, CONTRERAS D, BASHAN Y, ARRIAGADA C. Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile[J]. Mycorrhiza, 2017, 27: 175-188.
- [43] XU X B, MA X Y, LEI H H, SONG H M, YING Q C, XU M J, LIU S B, WANG H Z. Proteomic analysis reveals the mechanisms of *Mycena dendrobii* promoting transplantation survival and growth of tissue culture seedlings of *Dendrobium officinale*[J]. Journal Applied Microbiology, 2015, 118: 1444-1455.
- [44] YODER J A, ZETTLER L W, STEWART S L. Water requirement of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedling, and evidence for water uptake by means of

- mycotrophy[J]. *Plant Science*, 2000, 156: 145-150.
- [45] CAMERON D D, LEAKE J R, READ D J. Mutualistic mycorrhiza in orchids evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*[J]. *New Phytologist*, 2006, 171: 405-416.
- [46] CAMERON D D, JOHNSON I, LEAKE J R, READ D J. Mycorrhizal acquisition inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*[J]. *Annals of Botany*, 2007, 99: 831-834.
- [47] DODMAN R L, BARKER K R, WALKER J C. Auxin production by *Rhizoctonia solani*[J]. *Phytopathology*, 1966, 56: 875.
- [48] BEYRLE H, PENNINGSFELD F, HOCKF B. The role of nitrogen concentration in determining the outcome of the interaction between *Dactylorhiza incarnate* (L.) Soó and *Rhizoctonia* sp.[J]. *New Phytologist*, 1991, 117: 665-672.
- [49] 吴静萍, 郑师章. 密花石斛菌根菌分离鉴定及其代谢产物的测定[J]. 复旦学报(自然科学版), 1994(5): 547-552.  
WU J P, ZHENG S Z. Isolation and identification of *Dendrobium densiflora* mycorrhizal fungi and determination of their metabolites[J]. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 1994(5): 547-552. (in Chinese)
- [50] 吴静萍, 钱吉, 郑师章. 兰花菌根菌分泌物成分的初步分析[J]. 应用生态学报, 2002(7): 845-848.  
WU J P, QIAN J, ZHENG S Z. A preliminary study on ingredient of secretion from fungi of orchid mycorrhiza[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002(7): 845-848. (in Chinese)
- [51] 王才义, 陈珈桦. 施用兰菌对芭菲尔鞋兰出瓶苗生长之影响[J]. 植物种苗, 2008, 10(3): 28-38.  
WANG C Y, CHEN J H. Effect of orchid mycorrhizal fungi on the growth of *Paphiopedilum*[J]. *Seed & Nursery*, 2008, 10(3): 28-38. (in Chinese)
- [52] 陈宝玲, 杨开太, 龚建英, 唐庆, 苏莉花, 汪小玉, 龙定建. 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.  
CHEN B L, YANG K T, GONG J Y, TANG Q, SU L H, WANG X Y, LONG D J. Effects of wild *Paphiopedilum* mycorrhizal fungi on growth and physiological indexes of *Paphiopedilum hirsutissimum* seedlings[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2022, 30(1): 88-96. (in Chinese)
- [53] FOCHI V, CHITARRA W, KOHLER A, VOYRON S, SINGAN V R, LINDQUIST E A, BARRY K W, GIRLANDA M, GRIGORIEV I V, MARTIN F. Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora*-*Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas[J]. *New Phytologist*, 2017, 213: 365-379.
- [54] FAVRE-GODAL Q, GOURGUILION L, LORDEL-MAD-ELEINE S, GINDRO K, CHOISY P. Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship[J]. *Mycorrhiza*, 2020, 30(1): 5-22.
- [55] FLOUDAS D, BINDER M, RILEY R, BARRY K, BLANCHETTE R A, HENRISSAT B, MARTÍNEZ A T, OTILLAR R, SPATAFORA J W, YADAV J S, AERTS A, BENOIT I, BOYD A, CARLSON A, COPELAND A, COUTINHO P M, DE VRIES R P, FERREIRA P, FINDLEY K, FOSTER B, GASKELL J, GLOTZER D, GÓRECKI P, HEITMAN J, HESSE C, HORI C, IGARASHI K, JURGENS J A, KALLEN N, KERSTEN P, KOHLER A, KÜES U, KUMAR T K A, KUO A, LABUTTI K, LARRONDO L F, LINDQUIST E, LING A, LOMBARD V, LUCAS S, LUNDELL T, MARTIN R, MCLAUGHLIN D J, MORGENSTERN I, MORIN E, MURAT C, NAGY L G, NOLAN M, OHM R A, PATYSHAKULIYEVA A, ROKAS A, RUIZ-DUEÑAS F J, SABAT G, SALAMOV A, SAMEJIMA M, SCHMUTZ J, SLOT J C, ST JOHN F, STENLID J, SUN H, SUN S, SYED K, TSANG A, WIEBENGA A, YOUNG D, PISABARRO A, EASTWOOD D C, MARTIN F, CULLEN D, GRIGORIEV I V, HIBBETT D S. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes[J]. *Science*, 2012, 336(6089): 1715-1719.
- [56] HOSSAIN M M, KANT R, VAN P T, WINARTO B, ZENG S J, TEIXEIRA DA SILVA J A. The application of biotechnology to orchids[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2013, 32: 69-139.
- [57] WANG H, FANG H Y, WANG Y Q, DUAN L S, GUO S X. *In situ* seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimuraet Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae)[J]. *World Journal Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27: 2051-2059.