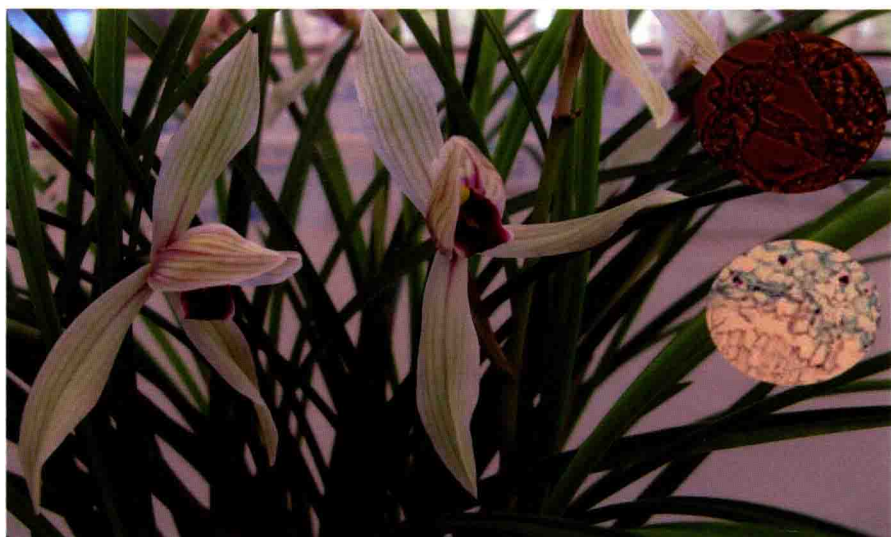




现代生物农业·园艺

地生兰与菌根真菌 共生关系研究

伍建榕 马焕成 著



科学出版社

地生兰与菌根真菌共生关系研究

伍建榕 马焕成 著

科学出版社

内 容 简 介

本书阐述了地生兰菌根的形态解剖特征、菌根真菌的多样性,以及兰科植物与菌根真菌共生培养的方法和技术。通过接种和未接种实验与生长、生理生化和同位素示踪测定,分析了菌根真菌与地生兰的专一性、营养关系、生长变化和生理生化响应机制,揭示了菌根真菌和地生兰的共生系统与共生体的形成机理,为地生兰组织扩繁、栖息地保护和种群恢复提供了理论依据。

本书适用于从事兰科植物栽培和育种的科研和生产人员,也可作为植物学、培育学、园林园艺学和资源微生物学利用及相关专业高等院校师生的教学参考书。

图书在版编目(CIP)数据

地生兰与菌根真菌共生关系研究/伍建榕,马焕成著. —北京:科学出版社, 2016.6

ISBN 978-7-03-048563-2

I. ①地… II. ①伍… ②马… III. ①兰科—菌根菌—共生—研究IV. ①Q949.710.2②Q949.320.8

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第123342号

责任编辑:张会格 韩学哲 郝晨扬 / 责任校对:郑金红

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚德则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2017年3月第三次印刷 印张:9

字数:200 000

定价:88.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

资 助 项 目

国家自然科学基金项目：地生兰菌根菌共生机制研究（30671717）。

国家自然科学基金项目：地生兰-菌根真菌-松三联共生关系研究（31360198）。

国家“十一五”科技支撑计划重点项目“中国重要生物物种资源监测和保育关键技术与应用示范”课题：珍稀濒危鸟类和植物繁育技术与示范(2008BAC39B05)。

云南省教育厅科学研究基金项目(06Z057B)。

西南林业大学重点科研基金项目“兰花种子萌发诱导和菌根化育苗体系的建立”。

云南省高等学校森林病虫害综合治理教学团队。

云南省重点学科森林保护学(XKZ200905)及云南省林学一流学科建设项目。

云南省高校森林灾害与预警控制重点实验室。

西南地区生物多样性保育重点实验室。

云南省“云岭教学名师”项目。

云南省教育厅科学研究基金产业化培育项目 V2016。

前 言

兰花是指整个兰科 (Orchidaceae) 植物的总称。兰科植物种类繁多、形态多样、多姿多彩, 全世界约有 800 属 25 000 种, 分布遍及全球。据不完全统计, 中国兰科植物种类多达 1 500 种, 仅云南就 1 000 多种。云南多样的地形、多变的气候和丰富的生物多样性, 为兰花的多样性奠定了物质基础。传统概念上, “中国兰花” (或称国兰) 仅指兰科兰属 (*Cymbidium*) 植物中原产于我国的地生兰。本书主要研究分布于云南的地生兰与菌根真菌的共生关系。

兰花是中国十大名花之一。在中华文化影响的区域内, 兰花由于具有高贵的姿态和淡雅的花香, 被人们作为一个品位和兴趣的象征而高价追捧与收藏。而个别人的扭曲审美和疯狂盗采行为在一定程度上造成了对地生兰资源的无序开发和过度利用, 从而使得我国许多地生兰栖息地遭受严重破坏, 品种处于极度濒危的状况。由于能开花结实的成熟兰花种苗被过度盗采, 栖息地内没有形成足够的兰花土壤种子库。如果现存种子萌发出的小苗或盗采成年株后残存的“龙根”(地生兰能进行根蘖繁殖的主根) 萌出的小苗继续遭受盗采, 那么栖息地的兰花种子库将进一步消失殆尽, 这将导致地生兰资源的灭绝。

为了探讨地生兰资源的保护和栖息地兰花种子库的恢复, 有必要了解兰花的繁殖策略, 从而为地生兰资源的保育提供科学依据。兰花的繁殖主要有分株、扦插、组织培养和种子无菌播种等, 但这些方法都没有解决兰花大量繁殖的问题, 兰花种子非常细小, 通常在一个蒴果中就含有成千上万轻如尘埃的微粒种子, 最大的种子平均千粒重不到 10mg, 最小的种子千粒重还不到 1mg。这么小的种子中, 除了发育不全的原胚, 无胚乳, 能储藏养分的细胞组织非常小。种子发芽率低或根本不发芽。目前国内不少单位和研究工作者试图通过组织培养的方法培养试管苗进行繁殖, 但移栽无菌苗成活率低, 生长缓慢, 开花迟缓, 花小甚至不开花。这些都是缺少与之共生的菌根真菌, 不能形成有效的菌根造成的。菌根真菌可为兰科植物提供生长所必需的营养物质。因此, 组培苗菌根化是促进地生兰快速繁殖的重要技术, 也是解决濒危兰花资源人工栽培的关键。要想通过组培苗菌根化技术大规模繁殖地生兰种苗, 必须了解地生兰与菌根真菌的专一性, 地生兰与菌根真菌的营养关系和养分传输规律。而目前除在地生兰菌根真菌多样性、品种鉴定和接种技术方面有一些零散的报道外, 还没有专门阐述地生兰与菌根真菌共生体形成机理的专著。

作者从事地生兰与菌根真菌共生关系的研究已经有 15 年的时间, 期间主持了多个国家自然科学基金和云南省教育厅科学研究基金项目, 并参与了国家“十一五”科技支撑计划重点项目, 深感地生兰与菌根真菌的共生关系对地生兰保育的重要性。因此结集出版作者和研究生的科研成果。本书在兰花菌根真菌的寄生和共生关系转化、地生兰不

同层次的根系具有不同的养分吸收功能、菌根真菌侵染过程的激素影响规律等方面的研究具有较高的创新性。兰花栽培过程中的水分管理一直困扰着广大兰花爱好者和地生兰企业。地生兰对基质水分状况十分敏感,水分过少会影响生长,水分过多又会导致根腐病、茎腐病的发生。通过对兰花根系内菌根真菌的分离、纯化和鉴定,除发现了丝核菌(*Rhizoctonia* sp.)等传统意义的菌根真菌外,还鉴定到镰刀菌属(*Fusarium* sp.)的真菌大量存在。镰刀菌属的许多种是根腐病、茎腐病等的致病菌,因此,我们推测可能是镰刀菌属在好氧环境下与兰花形成互利的共生关系,而在厌氧环境下变成有害的寄生关系或致病关系。这就是地生兰对水分敏感的微生物机理。在野外地生兰的根系主要是水平分布,只有少数根系和具有萌蘖能力的“龙根”呈垂直分布。在实验室通过 ^{15}N 同位素示踪发现位于土壤较低层次的根系具有吸收有机养分的能力,而上层的根系主要吸收无机态 NH_4^+ 和 NO_3^- 。根系有区别地吸收养分与地生兰根系的分蘖是否存在关联值需作进一步研究。此外,研究还发现接种菌根真菌后,兰花根部的激素含量和不同激素的比例出现变化,这种激素对菌根真菌侵染的响应是否属于植物对外来真菌侵入的防御反应也是值得深究的科学问题。

本书共9章,分别为兰科植物菌根概述,地生兰菌根形态解剖特征,地生兰菌根真菌的分离鉴定,地生兰菌根真菌的分离、培养及筛选,菌根真菌对地生兰生长、发育的影响,地生兰的菌根化,地生兰与菌根真菌的营养关系,地生兰与菌根共生过程中激素变化,地生兰组织培养及不同基质对其生长发育的影响。本书在编著过程中得到北京林业大学王沙生教授、蒋湘宁教授,南京林业大学韩素芬教授,中国科学院地理科学与资源研究所徐兴良研究员,西南林业大学刘丽高级实验师、张东华、洪英娣及王芳博士的帮助。硕士研究生吕梅、孙会林、刘婷婷、郭仕坛、刘芳、高瑾、陆露、杨宏光、韩慕萍、自昱蓉、金辉、陈雨薇、段雪甜、李婷婷等参与部分研究工作。西南林业大学国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室及云南省高校森林灾害与预警控制重点实验室在试验设备和测试技术方面给予了大力支持,在此表示感谢!

作者希望本书的出版能为致力于地生兰保育工作的科研人员和生产单位提供技术借鉴。也希望有更多的个人和单位投入兰花资源保护和栖息地恢复的工作中。

由于作者知识水平有限,书中难免有不妥之处,敬请读者批评指正。

著 者

2015年8月8日

目 录

1 兰科植物菌根概述	1
1.1 地生兰的概述	1
1.1.1 我国兰花栽培历史、现状及发展前景	1
1.1.2 兰花繁育技术研究进展	2
1.1.3 分子生物学研究	4
1.2 地生兰菌根的概述	4
1.2.1 菌根菌的种类及分类	4
1.2.2 地生兰菌根的研究意义	6
1.2.3 兰科植物与菌根真菌之间的专一性	6
1.2.4 菌根真菌在兰科植物生长中的作用及相互关系	7
1.2.5 地生兰菌根学研究方法	8
2 地生兰菌根形态解剖特征	9
2.1 春兰菌根的显微结构观察	9
2.1.1 材料与方法	9
2.1.2 结果	9
2.1.3 讨论	13
2.2 4种地生兰菌根的显微结构研究	13
2.2.1 材料和方法	14
2.2.2 结果与分析	15
2.2.3 4种地生兰菌根皮层中菌丝形态的变化	19
2.2.4 结论与讨论	21
2.3 6种兰科植物菌根的显微及超微结构研究	22
2.3.1 材料和方法	22
2.3.2 结果与分析	23
3 地生兰菌根真菌的分离鉴定	31
3.1 云南兰科植物菌根内生真菌种类研究	31
3.1.1 试验材料	31

3.1.2	试验方法	31
3.1.3	结果与分析	32
3.1.4	结论与讨论	35
4	地生兰菌根真菌的分离、培养及筛选	39
4.1	地生兰内生菌根真菌的分离、培养及鉴定	39
4.1.1	材料和方法	39
4.1.2	结果与分析	40
4.1.3	结论与讨论	40
4.2	春兰菌根真菌的筛选	41
4.2.1	材料和方法	41
4.2.2	结果与分析	44
4.2.3	结论与讨论	46
5	菌根真菌对地生兰生长、发育的影响	47
5.1	大雪兰种子的共生培养研究	47
5.1.1	材料和方法	47
5.1.2	结果与分析	49
5.1.3	结论与讨论	51
5.2	菌根真菌对春兰生长和矿质元素吸收的影响	54
5.2.1	材料和方法	54
5.2.2	结果与分析	55
5.2.3	结论与讨论	58
5.3	菌根真菌对大雪兰吸收磷元素的促进作用	59
5.3.1	材料和方法	59
5.3.2	结果与分析	61
5.3.3	结论与讨论	66
6	地生兰的菌根化	67
6.1	春兰与丝核菌共生菌根及结构研究	67
6.1.1	材料和方法	67
6.1.2	结果与分析	68
6.1.3	结论与讨论	69
6.2	墨兰消化丝核菌过程中细胞超微结构变化研究	70
6.2.1	材料和方法	70

6.2.2 结果与分析	71
6.2.3 结论与讨论	81
7 地生兰与菌根真菌的营养关系	83
7.1 丝核菌属真菌增强濒危兰科植物春兰生长	83
7.1.1 材料和方法	84
7.1.2 结果	87
7.1.3 讨论	91
7.1.4 结论与展望	93
7.2 菌根改变地生兰春兰的氮素吸收形式	93
7.2.1 材料和方法	94
7.2.2 结果	97
7.2.3 讨论	99
8 地生兰与菌根共生过程中激素变化	101
8.1 4种春兰菌根真菌产生植物激素的研究	101
8.1.1 材料和方法	101
8.1.2 结果	103
8.1.3 讨论	105
9 地生兰组织培养及不同基质对其生长发育的影响	106
9.1 地生兰组培快繁技术研究	106
9.1.1 材料和方法	106
9.1.2 结果与分析	107
9.1.3 结论与讨论	110
9.2 大雪兰快速繁殖技术的研究	110
9.2.1 材料和方法	111
9.2.2 结果与分析	111
9.2.3 讨论	113
9.3 几种兰花的离体繁殖研究	114
9.3.1 生物学特性	114
9.3.2 材料和方法	115
9.3.3 结果与观察	115
9.3.4 栽培与管理	116

9.3.5 讨论.....	117
9.4 不同栽培基质对大雪兰生长发育的影响	117
9.4.1 材料和方法.....	117
9.4.2 结果与分析.....	117
9.4.3 结论与讨论.....	121
参考文献.....	122

1 兰科植物菌根概述

1.1 地生兰的概述

1.1.1 我国兰花栽培历史、现状及发展前景

“竹有节而啬花，梅有花而啬叶，松有叶而啬香，惟兰独并而有之”，这是王贵学在《王氏兰谱》中对兰花的评价。兰花融叶美、芳香、花艳于一体，自古以来深受人们喜爱，是我国古老的名花之一，每当花开之时，幽香清远，馥郁袭人，因此我国许多地方称其为“香祖”、“国香”或“第一春”（程建国等，2002）。可见，兰花的观赏价值极高。

从广义上说，兰花是指整个兰科（Orchidaceae）植物的总称。兰科植物是高等植物中十分庞大的家庭，全世界大约有 800 属，25 000 种，其中我国产 1 000 余种，至于变种和品种更是不计其数。从我国传统的“兰花”概念上说，中国兰花又称国兰，一般指原产中国的兰科兰属（*Cymbidium*）植物（吴应祥和吴汉珠，1998），而且主要指其中的地生兰，而春兰[*Cymbidium goeringii* (Rchb. f.) Rchb. f.]、蕙兰（*C. faberi* Rolfe）、建兰（*C. ensifolium* Sw.）、墨兰[*C. sinense* (Jack. ex Andr.) Willd.]和寒兰（*C. kanran* Makino）等，栽培历史悠久，文化源远流长，是世界上最早栽培的兰花品种，也是观赏价值最高的兰花。地生兰具有花小而少、味幽香、色清雅的特点，深受东方人特别是中国人的喜爱，这与我国特有的兰文化现象是密不可分的。我国栽培兰花虽有悠久的历史，但一直延续传统的家庭方式种植，大规模进入商品化生产，比欧洲要晚近一个世纪。近 10 年来，我国兰花市场上，每隔几年就会有一种新奇品种，价格被“炒”得扶摇直上，造成“炒兰”，是我国兰花缺乏规模化生产的集中表现，只有发展规模生产，降低兰价，让国兰走进千家万户，才有产业化发展的出路。

兰花的繁殖主要有分株、扦插、组织培养和种子无菌播种等。但这些方法都没有解决兰花大量繁殖的问题。我国兰花野生资源在近几十年来遭到了前所未有的严重破坏，以惊人的速度日益减少，主要原因是目前我国兰花开发与利用仍处于初级阶段。由于供需矛盾突出，在经济利益的驱动下，农民上山大量采挖野生兰花，造成野生兰花资源大量减少；森林面积的大幅度减少，造成兰花生存环境的改变，使许多种类在一些地区消失，如云南西双版纳的热带雨林，每年以 1.46 万 hm^2 的速度遭到破坏，依靠森林提供生存环境的兰花，随着森林的破坏而消失；国外兰花经营企业抢占种质资源，使我国野生资源遭到破坏。近年来我国只要有新的兰花品种在刊物上发表，就会招来许多外商到国内收购该品种。例如，1986 年麻栗坡兜兰和硬叶兜兰被发现后，因外商收购麻栗坡兜兰，当地群众几乎把文山地区所有兜兰全部挖完，仅经由中国香港

走私到日本的兜兰就有 6 万株, 在香港每株 3~5 港元, 而到日本每株售价数千美元。对较名贵的墨兰、建兰、寒兰、春剑 (*C. longibracteatum*) 和连瓣兰 (*C. lianpan*) 的破坏更为严重; 许多地区兰花的生活环境遭到破坏, 也对野生兰花种群的延续形成威胁; 此外科研及生产严重滞后于市场。近年来, 我国加强了野生植物资源的保护工作, 我国第一部专门保护野生植物的行政法规《中华人民共和国野生植物保护条例》自 1997 年 1 月 1 日实施, 根据该条例的规定, 拟定并经审议通过了《国家重点保护野生植物名录》, 兰科所有种在第二批名录中全部列入。为了促进兰花生产, 保护野生兰花资源, 在采用法律手段、加强管理的同时, 发展一项有效的大量繁殖技术已刻不容缓, 通过研究兰花与菌根共生关系解决繁殖问题是一条有待探索的途径, 在理论和生产上均有重大意义。

1.1.2 兰花繁育技术研究进展

地生兰的传统繁殖方式为分株繁殖, 繁殖速度慢, 周期长, 为加速繁殖周期, 国内外进行了有关地生兰试管苗培育方面的研究。1922 年, 美国康奈尔大学最早使用人工培养基进行兰花种子的无菌发芽研究, 并取得成功。此后开展了一系列新型培养基的研究, 使得许多名贵品种的兰花种子通过组织培养能够发芽 (陈心启和吉占和, 1998)。许多人对兰花种子的萌发、发育及影响因素进行研究。Henrich 等 (1981) 在某一特定培养基上离体培养地生兰种子, 并研究了影响兰花种子萌发的因素。Zettler 等 (2001) 研究不同光照对一种濒危兰花 *Platanthera integrilabia* 种子萌发的影响, 发现光可促进温带陆生兰种子的萌发和发育。Rasmussen (2002) 研究了兰花种子休眠机制对种子萌发的影响, 并采用一种新的方法——原位培养来研究兰花, 即在自然条件下, 田间播种后一直到地生兰开花再产生种子。何炎明等 (1996) 对安诺兰的种子采用无菌发芽的方法, 成功培养出组培苗, 并选出合适的培养基。不同成熟期的种子在无菌培养基中发芽力不同。在培养基中添加适量的天然提取物有利于兰花种子的萌发和生长, 通常在培养基中添加的天然提取物有椰子汁、番茄汁、香蕉汁等。将兰花种子均匀散播于培养基内, 置于 20~25℃ 培养室, 10~14 天后种子膨大; 5~6 周后, 种子变绿, 发育成原球茎并长出须根; 2~3 个月后, 原球茎长出第一片叶; 9~10 个月后, 球茎延长, 长成具有 2 或 3 条根和 2 或 3 片叶的试管苗时, 便可移入花盆。

20 世纪 80 年代以后, 生物技术的应用促进了兰花组织培养的研究, 研究人员在育种、胚培养、基因工程等方面进行了不少研究。兰花离体快繁通常选择新芽、休眠芽、隐芽、花梗腋芽、叶尖和根茎等。不同种属的兰花, 适宜取芽的部位也不同: 单茎性兰花 [蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 和万代兰 (*Vanda*)] , 由于茎尖深存于叶片夹缝中, 分离较困难, 若直接从开花植株取得茎尖和茎段, 易毁掉原来植株, 因此, 此类兰花应取花枝侧芽培养; 而对节生花型石斛 (*Dendrobium nobile*, 春石斛系) 和碟花型石斛 (*D. phalaenopsis*, 秋石斛系), 可采用节生蘖芽或正常生长的茎尖繁殖, 也可取其开花植株叶片繁殖, 诱导原球茎产生, 而不影响原植株继续生长。另外也可用试管苗的叶片、茎尖和根尖等进行外植体再培养。例如, 用文心兰 (*Oncidium*) 根诱导的愈

伤组织体细胞胚胎植株的再生率比以茎和叶诱导率都高（杨玉珍等，2004）。取材的季节也直接影响兰花离体培养的成活率。由于兰花酚类物质的含量与生长季节有关，在生长旺盛的季节，兰花新芽上的酚类物质含量显著提高；而在生长较弱的季节，酚类物质则明显减少。谭文澄认为取芽的时间是克服褐变问题的关键，对于许多品种，如卡特兰属（*Cattleya*）和石斛属（*Dendrobium*）品种，应在生长停止的季节取芽，7~8月取芽进行组培 *Cattleya* sp.，成活率低于 30%；而在 1 月组培成活率高达 92%。此外，不同大小的兰花新茎中酚类物质含量也有差别，也能影响兰花离体培养的成活率。培养基种类和激素浓度及比率也影响兰花原球茎诱导、增殖和分化。毛碧增等（1998）研究了建兰原球茎的增殖和分化的影响因素，发现在每升 MS（Murashige and Skoog, 1962）培养基中加入 30g 的蔗糖，并在液体培养基中添加活性炭、苹果汁、香蕉汁和椰子汁进行悬浮培养，建兰原球茎的生长和发育状态可达到最佳。1/2 MS 的液体培养基可大大促进建兰原球茎的生长。20 世纪 70 年代，中国科学院上海植物生理研究所用中国兰属中的建兰茎尖作为外植体，经根状茎途径建立了无性系，最终成功获得兰花试管苗。秘彩莉等对大花蕙兰快速繁殖技术进行了初步研究。徐宏英等分析了影响大花蕙兰组培快繁的因素。植物生长物质在外植体原球茎的诱导、增殖与分化全过程起着重要作用。适当剂量的紫外线照射对兰花原球茎的增殖和分化有促进作用，过高剂量的紫外线照射则抑制原球茎的增殖和分化。

兰花原生质体培养为兰花体细胞杂交奠定了基础。可从根尖、茎尖、原球茎、花瓣、愈伤组织、悬浮细胞分离获得兰花原生质体，但不同的外植体分离难度不同。兰花原生质体的融合比较困难，仅得到 3%~5% 的融合原生质体。

由于兰科植物对根癌农杆菌或发根农杆菌不敏感，并且一些直接转移的方法如聚乙二醇（PEG）介导和电击法成功率低，因此兰花基因工程的研究进展缓慢。

获得兰花无菌实生苗或试管苗后，如何诱导组培苗开花是兰花培养的核心问题，植物生长调节剂可调节兰花开花，日照长短和低温刺激也是诱导兰花开花的关键因素。例如，地生兰在 1000m 以上的高山（温度比平地低 5℃ 以上）栽培，花期可提前 1~2 个月。

兰花育种已从杂交育种的胚培养、离体培养诱变育种、兰花的基因转化等方面进行研究，并获得一定成功。

近年来，人工种子的研究逐渐受到人们的重视，人工种子生产的材料主要是组织培养产生的原球茎（protocorm-like body），用褐藻酸钠盐或藻酸钙与氯化钙、MS 培养基，以及 2mg/L BA、1mg/L NAA 等激素制成胶体状，作为包衣材料。例如，贝母兰（*Coelogyne cristata* Lindle）原球茎用褐藻酸钠盐制成的人工种子已表现出很好的效果。将人工种子置于 4~25℃ 的条件下，储藏 8 周，均可发芽长成小苗。但据调查，不管用哪一种方法，兰科植物中的许多药用植物和珍贵花卉在扩大栽培中，将试管苗移入自然界时，成活率低，且生长缓慢，难以大面积推广，其主要原因在于兰花在短期内无法与相关的真菌形成菌根。

1.1.3 分子生物学研究

兰科植物作为一种重要的资源备受关注,但研究人员对兰科植物的菌根分子水平的研究远远落后于其他方面,特别是地生兰类。种子与菌根真菌的共生也基于生物量测定及显微结构观察。随着分子生物学及其研究技术迅速向生物学科各个领域渗透,遗传标记技术得到迅猛的发展,使人们对植物的研究从外部形态学(包括形态学特征、解剖学特征等)和细胞学性状(如染色体分析),一直深入到对事物的本质,即蛋白质及 DNA 序列的研究。因此将分子标记技术应用于兰科植物菌根的分析中,将为兰科植物与菌根真菌形成菌根的协同进化研究和菌根真菌的筛选提供精确的分子证据。

1.2 地生兰菌根的概述

自 20 世纪初法国的 Bernard 和德国的 Burgeff 真正揭开兰科菌根之谜后,人们对有关菌根的种类、专一性及相互作用开展了研究。目的是解决兰花快速繁殖过程中,从试管苗到人工栽培,幼苗生长缓慢、成年株不易开花等问题,本节从以下几个方面进行论述。

1.2.1 菌根菌的种类及分类

自然界中,几乎所有的兰科植物都与真菌共生形成菌根,在其生活史中——种子萌发阶段或不能进行光合自养的时期和以后的生长发育必须部分或全部依靠菌根真菌为其提供营养才能生存。目前已知有关菌根真菌的种类主要隶属于担子菌亚门(Basidiomycotina)和半知菌亚门(Deuteromycotina),部分为子囊菌亚门(Ascomycotina)。半知菌丝核菌属(*Rhizoctonia*)包括 3 个种:*R. repens*(匍匐丝核菌)、*R. goodyerae-repentis*(斑叶兰丝核菌)和 *R. solani*(立枯丝核菌)。范黎等(1998a)从 19 种兰科植物根中分离出内生担子菌:角菌根菌属(*Ceratorhiza*)、瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)和念珠菌根菌属(*Moniliopsis*) 3 个属。徐锦堂和郭顺星(1989)从天麻根分离到紫萁小菇(*Mycena osmundicola*)和蜜环菌(*Armillaria mellea*)。郭顺星等(2000)从细叶石斛(*Dendrobium hancockii*)和见血清(*Liparis nervosa*)原球茎中分别分离出微囊菌属(*Microascus*)和毛壳菌属(*Chaetomium*)的 2 个未定种菌株。紫萁小菇、微囊菌属和毛壳菌属的 2 个未定种菌株均能促进其寄主植物种子萌发。1994 年,范黎和郭顺星对我国云南、福建地区 45 种兰科植物的内生真菌进行了分离和鉴定,3 个菌株为小菇属(*Mycena*),26 个菌株属于兰科丝核菌类,102 个菌株为丝孢纲,其中 7 个菌株已证明可与某些兰花植物共生,促进植物发芽形成原球茎。据陈心启及吉占和的研究,感染兰花根部并与之共生的真菌包括:伏革菌属、干菌属、皮伞菌属、蜜环菌属、杯菌属、层孔菌、角担菌属、欧立菌属、亡革菌属、胶膜菌属,以

及半知菌亚门无孢目中的丝核菌属(范黎等, 1998b)。李明和张灼(2001)从建兰和杏黄兜兰根部分别分离到 13 株真菌, 其中镰刀菌和组丝核菌为优势菌种, 并将组丝核菌 JF74、JF75、JF80 制成菌剂, 施入杏黄兜兰根部, 对杏黄兜兰产生了一定的促进生长的效果。作者从云南 4 个最集中的分布中心, 即滇东南的文山壮族苗族自治州(文山州)、滇西北迪庆藏族自治州(迪庆州)及怒江傈僳族自治州(怒江州), 滇东北昭通地区及滇中曲靖、昆明、大理一带, 不同种源地野生兰根中分离菌根真菌, 从 100 多种兰科植物中分离到菌根真菌, 经初步鉴定其中大部分与范黎等的研究结果基本相同, 有丝核菌属的种、半知菌类的镰刀菌、毛壳菌及担子菌亚门的伏革菌属等。有关兰科菌根真菌的分离和分类较为困难, 特别是兰科丝核菌类, 本身缺乏稳定的形态学和培养特征, 产孢结构和有性世代的产生必须在特定的环境下才能诱导成功, 一些菌根必须接种在特定的天然培养基如壳斗科的栎树叶上才能产生子实体, 另一些必须在低温及紫外线的交替处理下诱导产生产孢结构。魏勤等(1999)对云南西双版纳几种热带兰根际真菌进行调查, 基质中共出现真菌 5 目 8 科 18 属, 其中从梗孢目(Moniliales)占总数的 62.5%, 为绝对优势菌类群; 无孢目(Agonomycetales)占总数的 28.1%, 西双版纳基质中无孢群占无孢群菌数的 85%, 基质中无孢菌群的多少, 可影响热带兰的生长发育, 这与兰科植物菌根真菌主要为担子菌和无孢群菌中的某些属是一致的。国外学者对此也作了很多研究: Vujanovic 等(2000)报道了镰刀菌诱导兰花种子着色和萌发的能力; Cotoni 从 *Cypripedium* sp. 的根中分离到的一个丝核菌菌株产生了有性世代 *Cortinarius cotoneus*, 还发现 *Xerotus javanicus* (干菌属种) 可与 *Gastrodia* spp. 形成菌根, *Marasmius coniatu*s (小皮伞菌属种) 与 *Didmoplexis*、*Armillaria mellea*、*Galeola septentrionalis* 及 *Gastrodia elata* 形成菌根。Masuhara 等研究了共生真菌 *Rhizoctonia repens* 在一兰花 *Galeola septentrionalis* 种子中的形成。Warcup(1991)从澳大利亚兰花的菌根中分离到大量属于丝核菌属的菌株, 并设计了一套诱导其产生有性世代的方法, 获得部分分离物的有性世代, 发现均为担子菌, 隶属于 *Thanatephorus*、*Ceratobasidium*、*Ypsilonidium*、*Sebacina* 和 *Tulasnella*。有些无丝核菌阶段的担子菌也从兰科菌根中被分离出并用实验证实可与兰花种子共生而使种子萌发形成原球茎, 如 *Coriolus versicolor* (彩绒革盖菌)、*Hymenochaete* sp. (刺革菌属的 1 种) 和 *Fomes* sp. (层孔菌属的 1 种) 等(Warcup, 1991)。由此可见, 从兰科植物菌根分离出的大部分真菌, 除少数是非丝核菌阶段的担子菌外(有性阶段), 多数都是丝核菌菌株或至少部分特征是属于丝核菌菌株在不同兰花或同种兰花根中的再次发现。1985 年, 加拿大学者 Currah 及其研究小组从北温带陆生兰花菌根中分离出 15 种, 其中 5 个新种, 一个新组合, 隶属于 12 个属, 首次对兰根内非丝核菌类丝孢纲(Hyphomycetes)的不育菌丝群(*Mycelium radices atrovirens*)的真菌作了研究(Currah and Sherburne, 1992), 并成功诱导这些菌株形成产孢结构, 对每个种的菌落培养特征和形态特征作了详细描述。Moore 和 Currah 等都作了依据菌丝隔膜与细胞内核的数目为分类特征划分的类群与利用菌落培养特征和菌丝显微结构为分类依据划分的类群是一致的, 首次列出兰科菌根真菌的检索表, 记载了迄今已发现的兰科菌根真菌

15 属 29 种和 2 个腐生类型, 附有培养特征和形态特征描述, 为后人提供了兰科植物菌根真菌的分类依据 (Currah and Sherburne, 1992; Moore, 1987)。有关镰刀菌属 (*Fusarium*), 作者在严格的菌根分离过程中, 也分离到了镰刀菌, 至于是否是兰科植物的内生真菌有一定争论。吴静萍等 (2002) 对福建密花石斛 (*Dendrobium densiflorum*) 菌根进行分离、纯化并回接, 鉴定得到镰刀菌属一菌株。但从西双版纳基质中分离共获得 7 株镰刀菌, 而昆明庆成花卉有限公司栽培基质中未发现有镰刀菌, 认为镰刀菌是自然界中热带兰的常见病菌。

1.2.2 地生兰菌根的研究意义

原产于我国的珍贵地生兰资源日趋匮乏, 已被列为野生濒危植物。除了人为破坏以外, 地生兰繁殖系数低也是重要原因。地生兰不论种子萌发还是生长发育过程都必须依赖与之共生的菌根真菌, 从真菌中获得所需的营养物质。国内对于地生兰菌根研究的侧重点多集中于共生真菌的类型、形态及兰科种子萌发与真菌的关系, 而对兰花菌根形成中真菌与兰花的相互作用、共生机制, 以及兰花与真菌的协同进化等方面的研究报道甚少, 有些方面几乎是空白。为了拯救国兰, 国内不少单位正在开展国兰的组培, 但国兰组培苗的培育比洋兰更为困难, 且组培苗在无菌环境中生长移栽的成活率低, 生长发育缓慢, 开花迟。因而组培苗的菌根化是促进国兰快速生长的重要技术, 也是解决珍贵兰花栽培的关键。伍建榕等 (2007) 从不同自然环境野生地生兰菌根中分离共生真菌, 通过人工接种组培苗, 筛选出能够促进组培苗生长发育的优良菌株, 研究菌根真菌的入侵途径及兰花与菌根之间的营养物质交流, 探讨它们之间的他感效应和相互关系。为建立菌根真菌和兰花的共生体系, 为提高兰苗菌根化程度和繁殖系数提供理论依据, 填补国内这方面的空白, 这不仅对揭示菌根真菌与兰花共生机理具有重要的理论意义, 而且有巨大的潜在应用价值。

1.2.3 兰科植物与菌根真菌之间的专一性

有关兰科植物与菌根真菌之间的专一性问题一直是个争论的焦点。McKendrick 等 (2002) 研究了兰花 *Neottia nidus-avis* 的共生萌发和发育, 只有专一的真菌方能促进这种兰花萌发。范黎等 (1996) 对兰花种子与菌根真菌进行的共生萌发试验表明, 不同的真菌种可促进一种兰花的种子萌发, 同一真菌种也可与多于一种以上的兰花的种子形成共生关系。天麻种子可与紫萁小菇 (*Mycena osmundicola*)、兰小菇 (*Mycena orchidicola*) 等一类小菇属真菌共生萌发形成原球茎 (徐锦堂等, 2001)。大量研究证明, 真菌与兰花之间的专一性并不十分严格。Burgeff 等 (1936) 指出兰科植物与菌根真菌之间的关系不是高度专一的, 但某种菌根真菌与哪种兰科植物能更有效地共生有明显的倾向。Curtis 的研究结果表明: 在相同生境下的不同兰花种有着相似的菌根真菌, 而不同生境的同一兰花种有不同的菌根真菌, 两者间的共生关系是非专一性的。Warcup (1991) 在研究澳大利亚陆生兰花菌根分离的丝核菌株时表明: 至少在属的水平上, 兰科植物与其菌根真菌之间存在着专一性。Clement 等 (1988) 对 5 种兰花和

3 种真菌之间的共生关系研究却表明, 兰花与菌根之间的专一性在种、属、族等各个不同的水平上是高度专一的。不同的实验得出不同的结论。值得注意的是: 兰科植物与菌根真菌共生关系的专一性应该是指在自然环境条件下, 两者之间能否形成相对稳定的共生关系的可能性(范黎等, 1998b)。以上研究采用两种方法确定两者之间的专一性: 一是自成年兰花根皮层细胞中分离菌根真菌, 探讨成年兰科植物与菌根真菌之间的关系; 二是在体外实验条件下, 利用兰花种子与各种菌根真菌进行共生萌发试验, 探讨实验室条件下种子和原球茎与菌根真菌之间的关系, 这两种情况都是在实验室无菌条件下进行的, 它们之间存在着形成共生关系的可能性, 但并未真正形成。只有在自然环境条件下, 真菌对种子萌发的诱导作用才能证实并阐明两者间的专一性。Masuhara 等(1989)对 *Spiranthes sinensis* var. *amoena* 与 *Rhizoctonia repens* 所进行的种子共生萌发试验表明: 两者在自然条件下和实验室条件下表现出不同的专一性, 前者表现为高度专一, *Spiranthes sinensis* var. *amoena* 仅与 *Rhizoctonia repens* 共生而萌发, 后者则可与 *R. repens* (匍匐丝核菌)、*R. solani* (立枯丝核菌) 及其他双核的丝核菌菌株共生萌发。对成年 *Spiranthes sinensis* var. *amoena* 的根内分离物的研究表明其菌根真菌均为 *R. repens*, 由此, 专一性的确定可以成年植株菌根上分离的真菌为依据。不同的兰科植物种子萌发及成株所形成的菌根的真菌种类是不相同的。有关专一性的问题 Masuhara 提出了生态专一性(ecological specificity)和潜在专一性(potential specificity)的概念, 前者指在自然环境条件下可与同一个特定兰花种形成菌根的真菌范围, 后者指在实验室条件下, 可与同一兰花种形成菌根的真菌范围。由此得出, 兰科植物与菌根真菌之间的关系不是高度专一的, 这种共生平衡的关系是有条件的, 环境条件的改变可能会导致这种平衡关系发生变化。有关兰科菌根真菌生态专一性报道认为: 已经被一种真菌感染的根部, 甚至已经有胞内菌丝团的细胞可能又被另一种菌根真菌的菌丝侵入。并发现有些兰科植物的菌根真菌并不一定对寄主植物起到良好的刺激作用, 形成兰科菌根的几种主要真菌(如丝核菌、假蜜环菌等)本身有很大的变异性, 它们可能存在着许多不同的生态型, 所以同一种真菌的不同菌株对寄主植物形成菌根的效果也不相同, 如立枯丝核菌中生长缓慢的类型和对营养要求严格的类型, 比生长快的类型能形成更稳定的菌根。

1.2.4 菌根真菌在兰科植物生长中的作用及相互关系

19 世纪以来, 兰花研究者对真菌在兰科植物发育过程中的各种营养作用进行研究, 并取得很好的研究进展, 为研制兰花基质提供了科学依据和思路。Curtis 等(1939)提出兰花和菌根关系是寄主和寄生的关系, 即兰花为寄主, 菌根菌是寄生菌, 菌根菌寄生在兰花根上, 兰花从菌根菌上得不到任何益处, 但实验证明并非如此。Vujanovic 等(2000)报道了镰刀菌诱导兰花种子胚的着色和萌发能力。Zettler 等用从陆生兰(*Platanthera clavellata*)根分离出来的真菌与该兰花种子做共生萌发试验, 可极大地促进种子发育。Masuhara 等研究了内生真菌 *Rhizoctonia repens* 在一兰花(*Galeola septentrionalis*)种子中的形成过程, 还研究了菌根菌在 3 种日本兰花种子萌发中的作用。这些实验表明, 发育不全的微小的兰花种子是需要菌根真菌提供营养物质的。赵