

春兰菌根的显微结构及菌根真菌的分离

余知和*, 曾昭清, 张明涛

(长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025)

摘要: 以盆栽春兰和野生春兰的根为材料, 通过切片观察菌根真菌的分布特点和菌根的显微结构。同时采用组织分离方法从盆栽和野生春兰根分别分离得到 6 个和 15 个真菌菌株, 分离菌株的出现频率分别为 16.7% ~ 50% 和 6.7% ~ 73.3%, 并由此判断 CGP-3 为盆栽春兰菌根的优势菌种, CGW-3 为野生春兰菌根的优势菌种。经形态学观察将其初步分为 6 个分类单元, 其中 CGP-2 和 CGW-2 分别具有拟日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*-like) 和拟木霉属 (*Trichoderma* sp.-like) 的形态特征。此外, 对兰科植物与内生真菌间的专一性进行了讨论。

关键词: 春兰; 菌根真菌; 分离; 菌根显微结构

中图分类号: Q944.54

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)03-0332-04

Mycorrhizal Microstructure of *Cymbidium georingii* and Its Mycorrhizal Fungi Isolation and Identification

YU Zhi-He*, ZENG Zhao-Qing, ZHANG Ming-Tao

(College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract: The distribution patterns of mycorrhizal fungi and the microstructure of mycorrhizae in pot cultured and wild *Cymbidium georingii* were investigated and observed. Six strains of mycorrhizal fungi were isolated and obtained from the mycorrhizae in pot cultured *C. georingii* and fifteen from the wild ones, which their frequency was 16.7% - 50% and 6.7% - 73.3%, respectively. According to this data of frequency, the strain CGP-3 would be dominant one of pot cultured and CGW-3 would be predominance in wild *C. georingii*. On the basis of morphological observation all of 21 strains isolated were identified into six taxa, two of them were similar morphological appearances as *Aspergillus japonicus*-like and *Trichoderma* sp.-like. By the way, the specificity between the endomycorrhizal fungi and arethusa was also discussed briefly.

Key words: *Cymbidium georingii*; Mycorrhizal fungi; Isolation; Mycorrhizal microstructure

兰科植物是多年生草本, 全世界约有 500 属近 17000 种以及大量变种和园艺种, 主要分布于热带、亚热带和温带地区。中国约有 150 属 1000 种左右, 主要分布于长江流域和华南、西南、台湾等省^[1]。在自然条件下, 兰科植物种子的萌发和植物随后的生长发育往往需依赖与之共生的真菌, 因此人工栽培较为困难。在成熟的兰科植物中, 菌根真菌的菌丝扩大了兰科植物的根际范围, 有助于吸收无机养分和水分; 同时兰科植物进行光合作用、生产有机养分供真菌生长, 两者形成和谐依存的共生关系。另外, 还有一些兰科植物没有叶绿素, 无法进行光合作用,

整个生命过程中都需要依靠菌根真菌提供养分。因此, 了解与兰根共生的真菌种类, 进一步探讨兰科植物与真菌间的相互作用机制, 将为自然条件下兰科植物的栽培提供有价值的理论依据^[2]。

国内对兰科植物菌根的研究材料多是选取云南、贵州或福建的兰科植物品种。据文献记载, 兰科植物菌根真菌种类涉及 4 个门 50 余属, 其中主要以担子菌 (Basidiomycota) 和半知菌 (Imperfect fungi) 为主, 子囊菌 (Ascomycota) 和接合菌 (Zygomycota) 也有少量报道^[3-5]。

春兰是集观赏、药用、食用于一体的植物, 具有

收稿日期: 2008-06-25, 修回日期: 2009-03-20。

基金项目: 湖北省教育厅青年项目 (2004Q002) 部分资助。

作者简介: 余知和 (1966 -), 男, 教授, 博士, 从事真菌学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: zhiheyu@hotmail.com)。

很高的观赏、经济和文化价值,长期以来受到人们的普遍关注。我们以湖北春兰为试验材料,利用组织分离方法对菌根真菌类群进行初步的研究,同时,通过根组织切片,观察了菌根结构以及菌根真菌在兰根中的分布情况,以为兰科植物菌根的研究提供背景资料,达到保护兰科植物种质资源的目的。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验所用材料为盆栽和野生春兰(*Cymbidium georingii*),其中盆栽春兰取自长江大学植物园,野生春兰采自于湖北宜昌市远安县山林中。材料鉴定参照中国高等植物图鉴(第5册)^[6],凭证材料存放于长江大学植物园,分离的菌根真菌保藏在长江大学生命科学学院微生物学实验室。

1.2 菌根显微结构观察

选取健康的兰根,从根的基部剪下,将外部的泥沙用清水冲洗干净,浸泡在75%的乳酸溶液中,使组织透明。然后进行显微切片,经乳酸石炭酸棉蓝染色,在显微镜下观察菌根的结构及真菌的感染特征,并用摄影显微镜拍照(尼康 COOLPIX 5400 数码相机)。

1.3 菌根真菌分离与纯化

取健康的兰根,在流水下冲洗,去除兰根外部的泥沙,在超净工作台上将其切成1 cm左右的小段,先用70%的医用酒精处理1 min,再用0.1%的升汞(HgCl_2)表面消毒处理4~6 min,无菌水冲洗3次,切取根段中间部分1~2 mm的小段接种于马铃薯蔗糖培养基(PDA)平板上,每皿接4个,然后置于28℃的恒温培养箱中暗培养。为抑制细菌及放线菌生长,配制PDA时于灭菌前每升培养基中加2 mL 氯霉素^[7]。

当培养基表面长出真菌菌丝时,切取小块带菌丝的培养基转至新的PDA平板上于28℃下黑暗培养72 h,重复上述操作3次以达到纯化菌种的目的。将纯化的菌种置于4℃的冰箱保存备用。根据不同菌株在所有分离菌株中所占的比例来计算其出现频率。

2 研究结果

2.1 菌根结构

春兰根较粗壮,直径为0.3~0.6 cm。一年和多年生的根为乳白色,新生根为白色,根表皮上有少数棕褐色的凹陷小孔。结构从外到内依次是根被(velamen)、皮层(cortex)及皮层细胞内的菌丝团(myceli-

al agglomerates)、维管柱(vascular cylinder)。维管柱最外一层为中柱鞘,木质部(xylem)与韧皮部(phloem)交替分布,中间的是髓部(pith)(见图1:1,2)。

2.2 菌根真菌的分布特点

根据组织切片观察,春兰的根有典型的兰科植物菌根结构,菌根真菌菌丝团主要分布在兰根中部的皮层细胞中,而根基和根尖中的皮层细胞中没有发现菌丝团,但在根尖的根被中观察到有少量菌丝存在,在白色的新生根中没有发现菌丝。在兰根的横切片中,菌丝团多集中于外侧几层皮层细胞中,在靠近维管柱的皮层细胞中相对较少。在外皮层中只有通道细胞中可观察到菌丝团的存在,而且在靠近通道细胞的皮层细胞中有大量菌丝存在(见图1:3,4)。

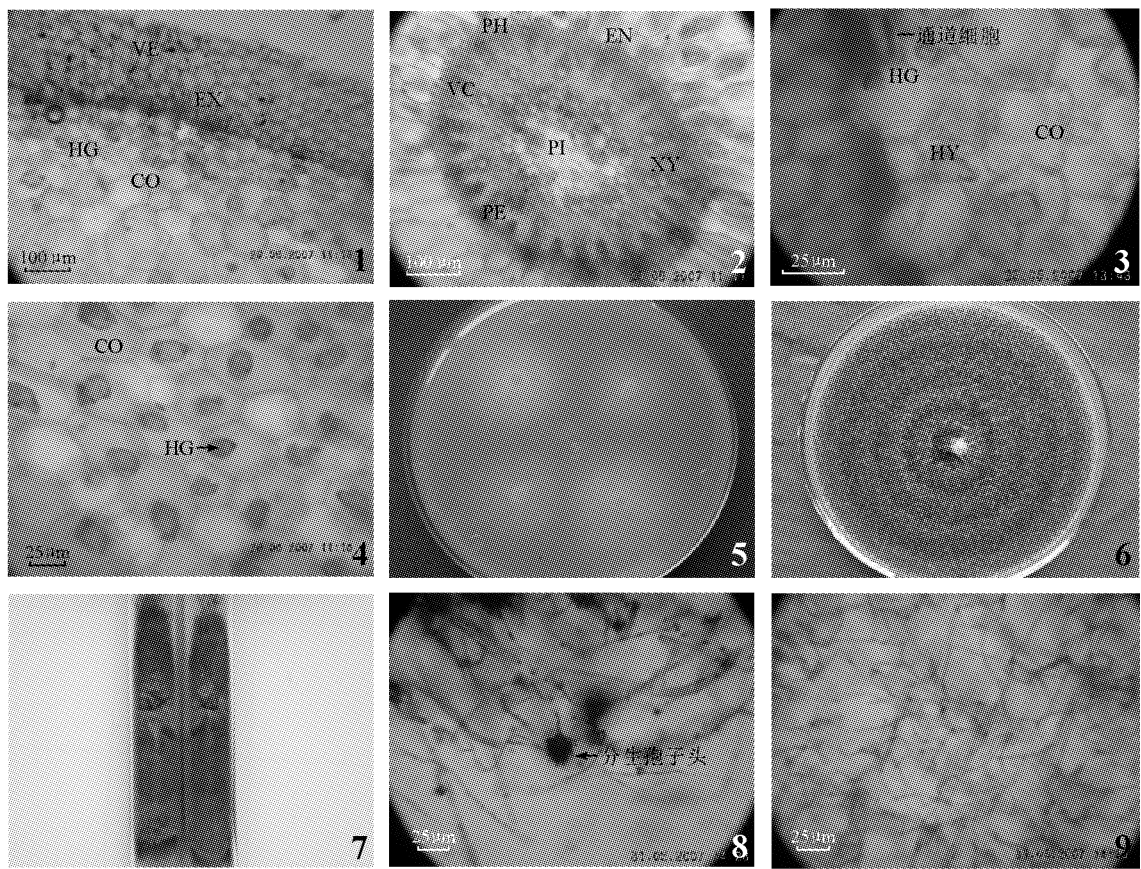
2.3 菌根真菌的分离与初步鉴定

从盆栽春兰中共分离得到6个菌株,从野生兰科植物中共分离得到15个菌株,经对各菌株的菌落形态及菌丝显微结构的观察(见图1:5~9),将其分为6个分类单元,分别编号为CGP-1、CGP-2、CGP-3、CGW-1、CGW-2和CGW-3(见表1)。

由表1可以看出,从盆栽春兰分离的菌根真菌出现频率为16.7%~50%,CGP-3为盆栽春兰菌根的优势菌种。从野生春兰分离的菌根真菌出现频率为6.7%~73.3%,CGW-3为野生春兰菌根的优势菌种。经过对分离真菌的菌落形态及菌丝结构的观察分析对比,其中CGP-2和CGW-2分别具有拟日本曲霉(*Aspergillus japonicus*-like)和拟木霉属(*Trichoderma* sp.-like)的形态特征;其余4个真菌分类单元由于没有产孢结构,没有有性繁殖,缺乏鉴定所必需的形态特征,难以对其进行鉴定。

3 讨论

本试验通过对春兰根组织切片,观察了根的结构以及菌根真菌在兰根中的分布情况。在兰根横切片的观察中发现了通道细胞,且在通道细胞内以及周围的皮层细胞中存在着大量的菌丝团;这些菌丝团的分布与水分及矿物营养的吸收和输送有关。由此可推测,真菌可能是由兰根根被细胞间隙进入根被组织,再由通道细胞或破坏的外皮层细胞侵染到皮层细胞内部的。该观察结果与伍建榕等^[8]报道的丝核菌与春兰组培苗共培养所形成的菌根结构中,根被组织被破坏,外皮层没有通道细胞的结果不一致,而与桂阳等^[9]的研究观察相近。菌根真菌在兰根中的分布主要集中在根的中部,根基和根尖的皮层内没有菌根真菌的分布,白色的新生根中也没



VE. 根被;HG. 菌丝团;EX. 外皮层;CO. 皮层;PH. 韧皮部;EN. 内皮层;PI. 髓;XY. 木质部;PE. 中柱鞘;VC. 维管柱;HY. 菌丝。
1,2. 春兰菌根的显微结构;3. 春兰菌根外皮层中的通道细胞;4. 皮层细胞内的菌丝团;5. 菌根真菌的分离纯化;6. CGP-2 菌落特征;7. CGW-2 菌落特征;8. CGP-2 菌丝及分生孢子头;9. CGW-2 菌丝体
VE. Velamen; HG. Hyphal group; EX. Exodermis; CO. Cortex; PH. Phloem; EN. Endodermis; PI. Pith; XY. Xylem; PE. Pericycle; VC. Vascular cylinder; HY. Hypha.
1,2. Microstructure of *Cymbidium georingii* roots; 3. Passage cells in exodermis of *C. georingii* roots; 4. Hypha group of cortex cell; 5. Isolation of mycorrhizal fungi; 6. Colony of CGP-2; 7. Colony of CGW-2; 8. Hyphal structure and conidial head of CGP-2; 9. Mycelia of CGW-2

图 1 春兰菌根显微结构及菌根真菌特征
Fig. 1 Mycorrhizal microstructure of *Cymbidium georingii* and the characteristics of mycorrhizal fungi

表 1 春兰菌根真菌类群组成

Table 1 The composition of fungi in mycorrhizal of *Cymbidium georingii*

盆栽春兰 Pot cultured <i>C. georingii</i>			野生春兰 Wild <i>C. georingii</i>		
菌株分类 Taxonomy of the strains	菌株编号 No. of the strains	出现频率(%) Appearance frequency	菌株分类 Taxonomy of the strains	菌株编号 No. of the strains	出现频率(%) Appearance frequency
CGP-1	PZ01	16.7	CGW-1	YS01	6.7
CGP-2	PZ02、PZ05	33.3	CGW-2	YS02、YS06、YS07	20
CGP-3	PZ03、PZ04、PZ06	50	CGW-3	YS03、YS04、YS05、YS08 ~ YS15	73.3

有菌根真菌感染^[9,10],但在根被中有菌丝,这可能是在根尖的分生组织中含有某些抑制真菌菌丝入侵的物质(如兰酚)^[11]。
对于兰科植物菌根真菌的鉴定主要采用传统的形态学方法,存在的问题是兰科植物菌根菌多数缺乏稳定的形态学和培养特征,很难产生孢子,产孢的诱导又往往不易成功,鉴定十分困难。本研究从兰根

中分离出 6 种内生真菌,并对各内生真菌的菌落形态和菌丝的结构进行了观察,并将其中的 2 种暂定为拟日本曲霉(*Aspergillus japonicon-like*)和拟木霉属(*Trichoderma* sp. -like),其余 4 个分类单元由于缺乏必要的组织形态特征,难以将其分类。本研究分离的真菌菌株有待利用分子生物学手段来进行分子鉴定。
关于兰草菌根真菌与植株之间是否存在专一性

的关系一直是学者所关心和探讨的问题。McKendrick 等研究兰草与 *Neottia nidusavis* 的共生萌发和发育,认为只有专一的真菌方能促进这种兰草萌发^[12]。Warcup 在研究澳大利亚陆生兰草菌根分离的丝核菌菌株时指出,至少在属的水平上,兰草与其菌根真菌之间存在着专一性^[13]。Curtis 的研究表明,在相同生境下的不同兰草种有着相似的菌根真菌,而不同生境的同一兰草种有不同的菌根真菌,两者间的共生关系是非专一性的^[14]。本研究通过对盆栽春兰和野生春兰菌根真菌的分离结果可以看出,从盆栽春兰菌根中分离出的真菌和从野生春兰菌根中分离出的真菌有所不同,优势菌种也不同,可推测菌根真菌与植株之间并不是专一对应的。选择何种真菌应用于某一兰科植物的大规模生产还需进一步做大量的研究工作。

本研究还参照李明、张灼^[15]的方法确定了优势菌种,但是该菌种对兰科植物种子萌发及幼苗生长的具体促进效果还需进一步试验。

致谢:感谢中国科学院微生物研究所王龙博士在分离菌株鉴定方面的帮助。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 范黎,郭顺星,徐锦堂. 我国部分兰科植物菌根的内生真菌种类研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 1998, 21(2): 169-177.
- [3] 朱国胜,刘作易,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.
- [4] 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.
- [5] 伍建榕,韩素芬,王光萍,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.
- [6] 黄慧鸣. 中国高等植物图鉴(第5册)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1979.
- [8] 伍建榕,韩素芬,朱有勇,吕梅,王光萍,郭文林. 春兰与丝核菌共生菌根及结构研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学), 2005, 29(4): 105-108.
- [9] 桂阳,刘作易. 春兰菌根结构的研究[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(2): 18-19.
- [10] 潘超美,陈汝民,叶庆生. 菌根真菌在墨兰和建兰根中的感染特征及生理特性[J]. 土壤与环境, 1999, 8(4): 287-289.
- [11] 潘超美,陈汝民,叶庆生. 野生建兰菌根的显微结构特征[J]. 广州中医药大学学报, 2002, 19(1): 60-62.
- [12] McKendrick S L, Leake J R, Taylor D L, Read D J. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidusavis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. [J]. *New Phytol*, 2002, 154: 233-247.
- [13] Warcup J H. The mycorrhizal relationships of Australian orchids [J]. *New Phytol*, 1981, 87: 371-381.
- [14] Curtis J T. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis[J]. *Am J Bot*, 1939, 26: 390-399.
- [15] 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.