

两种内生真菌对大花蕙兰的共生效应比较

刘 舒¹ 陈春黎^{1,2} 刘 敏¹ 廖庆刚¹ 赵小兰¹

1. 华南农业大学林学与风景园林学院/广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广州 510642;

2. 陕西省西安紫薇地产开发有限公司, 西安 710119

摘要 为探讨益生真菌对大花蕙兰组培苗生长的促进效应, 从野生兰科植物根系分离的内生真菌中筛选出 2 株真菌菌株 C2y1 和 S1g1, 对其进行形态特征和 ITS 序列鉴定, 分析 2 株真菌共生对大花蕙兰幼苗营养生长、矿质元素吸收以及叶绿素含量的影响, 并检测了真菌在兰花根系中的定殖特点。结果表明: 2 株真菌能促进大花蕙兰植株根系生长、总生物量增长和叶绿素含量增加; C2y1 相比于对照能显著促进大花蕙兰幼苗对 N、P、K、Fe 等矿质元素的吸收, 尤其是菌根化苗 Fe 元素含量高出于对照 163.24%; 菌株 S1g1 则显著促进植株对 Ca、Mn、Zn 的吸收, 处理植株的 Ca 和 Zn 含量高出对照 62.00% 和 68.09%; 形态结构和 ITS 序列分析鉴定表明 C2y1 为兰科丝核菌类瘤菌根菌属 (*Epulorhiza* sp.) 真菌, S1g1 为黄丝菌科 *Cephalotheca* 属真菌。显微结构分析表明, C2y1 菌丝可侵入兰根皮层细胞, 并形成典型的菌丝结, 而 S1g1 仅在兰根的根被组织聚集。菌根化可有效促进大花蕙兰组培苗的营养生长和矿质元素吸收, 而不同种类的真菌对其促进效应表现出一定程度的互补性。

关键词 大花蕙兰; 菌根真菌; 内生真菌; 菌根化; ITS 序列; 共生结构; 矿质元素

中图分类号 S 682.31 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0043-07

兰科植物是被子植物中高度进化的一个大家族。在自然条件下, 所有兰科植物的种子萌发和原球茎生长阶段均依赖于菌根真菌的作用^[1]。近年来的研究表明, 一些绿色兰科植物在其成株期仍然依赖于菌根真菌为其提供不可或缺的营养物质^[2-3], 利用菌根真菌提高兰科植物组培苗移栽成活率和促进幼苗生长已有广泛报道^[4]。相关研究在药用价值较高的石斛属 (*Dendrobium* spp.) 以及金线莲属 (*Anoectochilus* spp.) 植物中报道较多, 人工菌根化效应主要体现在接菌后的组培苗移栽成活率高, 盆栽苗根系生长明显、根粗壮、根系发达, 苗的鲜质量增长率和干质量比对照均有显著增加^[5-7]。此外, 有益真菌也广泛应用于特色野生兰花的保育研究方面, 如柯海丽^[8]通过离体共培养方式筛选得到五唇兰 (*Doritis pulcherrima*) 的 5 个益生菌株, 人工菌根化的五唇兰组培苗出瓶移栽成活率均达到 100%; 侯天文等^[9]则筛选到 11 个菌株可以促进五唇兰组培苗生长, 处理苗的平均鲜质量增长率高于对照组 (156.25%)。而在观赏价值较高的兰属 (*Cymbidium* spp.) 植物有益真菌筛选与应用方面,

伍建榕^[10]、仲恺^[11]进行了系统研究, 并获得了促进春兰 (*C. goeringii*)、虎头兰 (*C. hookerianum*) 以及美花兰 (*C. insigne*) 组培苗生长的益生菌株。

大花蕙兰 (*C. hybridum*) 是兰科兰属中的大花附生种、小花垂生种以及一些地生兰经过多代人工杂交而形成的品种群, 是一种重要的切花和盆栽花卉。其杂交亲本包含兰属 20 多个原生种, 如虎头兰、美花兰、多花兰 (*C. floribundum*) 以及常见的国兰种类如春兰、蕙兰 (*C. faberi*)、建兰 (*C. ensifolium*)、墨兰 (*C. sinense*)、春剑 (*C. longibracteatun*) 等^[12-14]。虽然其快速繁殖技术较为成熟, 但由于出瓶后其营养生长期较长而且花期不整齐影响了生产效益。利用从其他野生兰科植物根系中分离的菌根真菌和其他有益真菌促进大花蕙兰组培苗早期生长已有报道^[15], 但这些研究表明, 不同菌株对大花蕙兰不同品种组培苗生长的促进效应有差异。

本研究从野生兰科植株根系中分离出内生真菌, 通过瓶内共培养方式筛选出 2 株大花蕙兰的有益菌株, 对其进行形态特征和 ITS 序列鉴定, 并进

收稿日期: 2015-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170654); 广东省农业攻关项目 (2007A020200004-7)

刘 舒, 博士研究生。研究方向: 生物多样性。E-mail: wendaosheyu@126.com

通信作者: 赵小兰, 博士, 副教授。研究方向: 观赏植物栽培生理。E-mail: xiaolanpeng@scau.edu.cn

一步对比分析了 2 种真菌共生对大花蕙兰幼苗营养生长、矿质元素吸收以及叶绿素含量的影响;检测了真菌在兰花根系中的定殖特点,旨在为有效利用菌根化技术促进大花蕙兰组培苗幼苗生长奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

植物材料:野生春兰(*C. goerigii*)及莎叶兰(*C. cyperifolium*)根系和具有 4~5 片叶、苗高 5 cm 左右、根长 2~3 cm、根数 3~5 且长势一致的大花蕙兰‘Golden Boy’组培生根苗。

1.2 培养基

内生真菌分离采用添加有 150 mg/mL 的硫酸链霉素和 150 mg/mL 盐酸四环素的双抗 PDA 培养基。

大花蕙兰组培苗增殖采用 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L+椰子汁 200 ml/L;生根采用 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+活性炭 0.5 mg/L+香蕉泥 100 g/L。所有培养基中均附加 3%蔗糖,0.6%倍力凝,pH 5.8。

共生培养基为 DE 培养基^[16]。

1.3 试验方法

1)内生真菌的分离与纯化。取野生兰株新鲜根段,流水冲洗后,分去皮与不去皮处理。去皮根段消毒采用 75%乙醇 1 min+0.1%氯化汞 4 min,未去皮根段消毒采用 75%乙醇 2 min+0.1%氯化汞 8 min;之后无菌水漂洗 4~5 次。薄片法分离兰根内生真菌,并纯化培养 2~3 次,转入 PDA 斜面低温保存。

2)供试菌株的活化。将供试菌株接种于 PDA 培养基上,28℃恒温黑暗培养,待菌丝长满平板(约 7 d 左右)后作为菌种。用打孔器在 PDA 平板培养基真菌菌落边缘打取直径为 0.5 cm 菌饼,备用。

3)有益真菌筛选。将分离的所有内生真菌与大花蕙兰苗在共生培养基(DE)中共培养,在 25℃恒温条件下培养 20 d,每天光照 12~14 h,光照强度 25 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。定期观察兰苗有无新根长出、根伸长以及植株总体生长状况,并同时观察菌株的生长速度与形态。对处理 20 d 的根系进行染色处理以判断真菌是否入侵根系,菌根染色方法参照文献^[17],主要步骤为:10% KOH 30 min 90℃水浴 4 h 透明—10%的 H_2O_2 漂白 30 min—5%乙酸酸化 90 min—0.05%苔盼兰:乙酸甘油(1:6),室温染

色 3 h—乙酸甘油分色等,宿主根中侵染的真菌被染成蓝色。

4)有益真菌的鉴定。形态方面主要观察各真菌种类在 PDA 培养基中生长的菌落和菌丝特征、是否产生繁殖体结构。同时以真菌 DNA 为模板,通用引物对 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3')/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3')^[18]或真菌通用引物 ITS1F(5'-TC-CTCCGCTTATTGATATGC-3')/ITS4^[19]扩增待鉴定菌株的 ITS 片段,并对其 PCR 产物进行测序。将获得的 DNA 序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对。收集相关菌种的 ITS 序列,以 MEGA4.0 软件构建系统发育树以分析其亲缘进化关系。

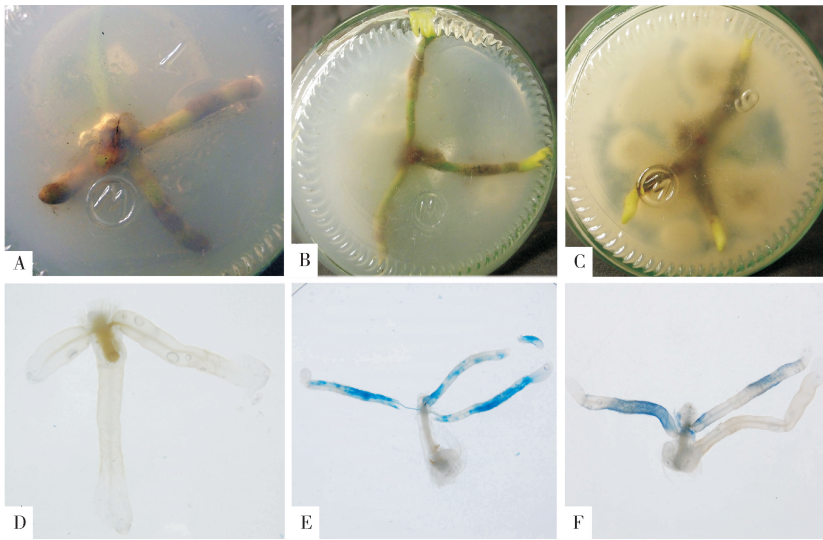
5)益生真菌对大花蕙兰幼苗共生效应分析。将大花蕙兰生根组培苗单株称质量并记载其根数、根长后转入共生培养基。1 周后对确定无污染兰苗进行接菌处理^[20],从 PDA 平板培养基真菌菌落边缘取出菌饼(直径约 0.5 cm),将菌饼放入培养瓶中距大花蕙兰苗约 1.0 cm 处,每瓶 2 枚菌饼,用无菌的琼脂块作对照,每处理 20 株,设 3 个生物重复,共培养 45 d 后,再次称取其植株鲜质量并记录根数和根长。计算新根发生率(新增根数/总根数 $\times 100\%$)和根系伸长百分率(伸长根数/总根数 $\times 100\%$)等。各处理的兰苗经 60℃烘干至恒质量后测得其总干质量、茎叶干质量和根干质量等。叶绿素含量参照陈建勋等^[21]的测量方法。N 元素含量采用硫酸双氧水蒸馏法消煮后用自动定氮仪检测(上海华检 KDN-F),其他矿质元素含量用 ICP(电感耦合等离子体发射光 ICPE-9000)测定。用 SPSS 软件对各处理进行显著性差异分析。

6)共生结构显微观察。共培养 45 d 后,取不同处理的大花蕙兰根段采用石蜡切片方法进行横切面结构分析,参照李和平^[22]关于植物显微技术的方法,并根据植株特点作了改进,在植物固定后添加了 10%的乙二胺浸泡根段 2~5 d,采用番红固绿对染,观察菌丝侵入根组织情况。

2 结果与分析

2.1 内生真菌与大花蕙兰共培养结果

从野生兰科植物根系分离的 9 株真菌中通过共培养方式筛选出了 2 株真菌 C2y1、S1g1,能显著促进大花蕙兰组培苗根系伸长(图 1B、C)。对根系整



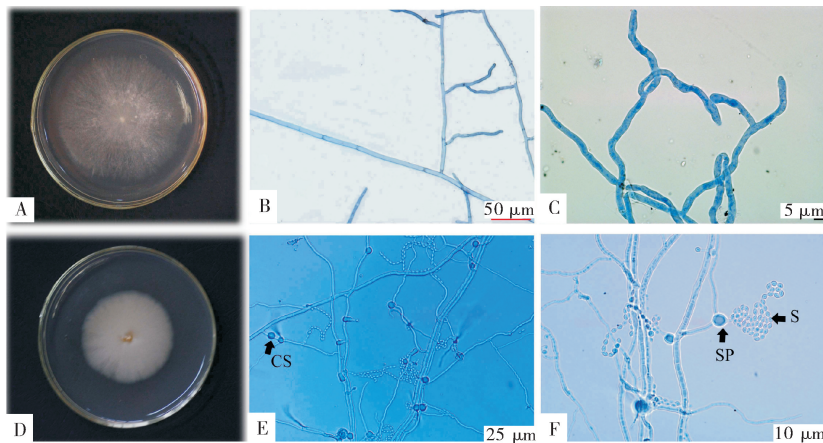
A: 未处理植株的根没有明显伸长 No obvious root elongation of un-inoculated plantlet; B,C: 真菌 C2y1 和 S1g1 分别与兰苗共培养, 兰苗根系显著伸长 Distinct root elongation of orchid plantlets inoculated with isolates C2y1 and S1g1, respectively; D: 对照根未被染色, 显示其没有真菌侵染 None of fungal structure was detected in mock-inoculated roots; E,F: 分别为 C2y1 和 S1g1 处理的兰根染色状况, 示真菌侵染程度 Root staining patterns of plantlets inoculated with C2y1 and S1g1, respectively.

图 1 真菌 C2y1 和 S1g1 促进植株根系伸长及根段染色结果

Fig.1 The isolates of C2y1 and S1g1 colonized the roots of *Cymbidium* plantlets and contributed the root elongation. 体染色后结果显示, 2 种真菌处理的兰根能不同程度地被染上色, 表明真菌可以入侵兰株根组织, 将其作为兰科植物的有益真菌进行进一步研究。

2.2 有益真菌的鉴定

2 株大花蕙兰益生真菌的形态观察(图 2)显示: 真菌 C2y1 呈圆形菌落, 基生菌丝白色、丝状、紧贴培养基生长, 表面有湿润感, 生长速度缓慢, 5 d 后菌落直径 2.0 cm, 不产生孢子, 菌丝在隔膜附近产生分枝, 分枝成直角或锐角, 有近似念珠状细胞产生, 具有兰科丝核菌的典型特征^[23]; 真菌 S1g1 菌落圆形、较薄, 平铺于培养基上, 气生菌丝白色、绒毛状, 生长速度慢, 在 PDA 培养基培养 5 d 后菌落直



A: 真菌 C2y1 在 PDA 培养基培养 15 d 的菌落形态 Colony morphology of isolate C2y1 in PDA at 15 d; B,C: 真菌 C2y1 的菌丝形态近似直角分支, 菌丝顶端膨大成近似念珠状 The hyphae of isolate C2y1 showed rectangular branching and terminal swelling into monilioid-like cells; D: 真菌 S1g1 在 PDA 培养基培养 15 d 的菌落形态 Colony morphology of isolate S1g1 in PDA at 15 d; E,F: 真菌 S1g1 的菌丝结构, 有大量孢子产生 The hyphal structure of isolate S1g1 and abundant spores; CS: 厚垣孢子 Chlamydo spores; SP: 孢子梗基部囊状膨大 Basal swelling of phialides; S: 分生孢子 Conidia.

图 2 真菌 C2y1 和 S1g1 在 PDA 培养基培养 15 d 的菌落及菌丝结构特点

Fig.2 Cultural and morphological characteristics of isolates C2y1 and S1g1 on PDA media at 15 days

径 2.0 cm, 菌落边缘褶皱状, 真菌菌丝有隔、成锐角分枝, 有大量的分生孢子产生, 孢子梗基部囊状膨大, 孢子椭圆形、两端微尖(图 2F), 厚垣孢子圆形透明状(图 2E)。

将 2 株真菌的 ITS 序列在 GenBank 上进行 Blast 比对, 选取了与真菌序列有较高相似度和覆盖率的菌株, 用 NJ 法构建同源进化树, 进行聚类分析, 结果如图 3 所示。真菌 C2y1 ITS 序列(NCBI 登录号: KJ499809)与瘤菌根菌属真菌 *Epulorhiza* sp.9 (ITS 登录号: HQ853685) 的相似度为 100%, 与 Ma 等^[24]报道的 *Epulorhiza* sp. (ITS 登录号: AJ313442) 相似度有 99%, 与 Zhao 等^[25]报道的瘤菌根菌属真菌 ML01 的相似度为 97%。综合 C2y1 菌丝、菌落特点及 ITS 序列同源比对结果, 将其归于瘤菌根菌属真菌。真菌 S1g1 ITS 序列(NCBI 登录号: KJ69917)与黄丝科真菌 *Cephalotheca sul-*

furea 相似率为 90%, 且与 Yaguch 等^[26]报道的 *C. sulfurea* 同源性较高, 根据其形态特点和 ITS 序列同源比对结果将其鉴定为 *Cephalotheca* 属真菌。

2.3 真菌对大花蕙兰营养生长的影响

共生培养 45 d 后, 接种菌株 C2y1、S1g1 的兰苗明显高于 CK 处理的兰苗, 且根系增长数量较多, 新生根呈鲜绿色, 叶片数增多。其中与真菌 C2y1 共生的兰苗其新根发生率为 94.5%, 高出对照 74.5%; 与 S1g1 共生的兰苗其根系伸长率高出对照 53.9%(表 1)。经单因素方差分析与多重比较, 接种 C2y1、S1g1 菌株的大花蕙兰组培苗其鲜质量增长率与对照组之间差异达到显著水平, 说明这 2 株菌株对大花蕙兰组培苗的生长有明显促进作用。此外, 接种真菌 C2y1 和 S1g1 的苗茎叶干质量和根干质量都显著高于对照, 而且 C2y1 处理的兰苗其总干质量显著高于 S1g1 处理。

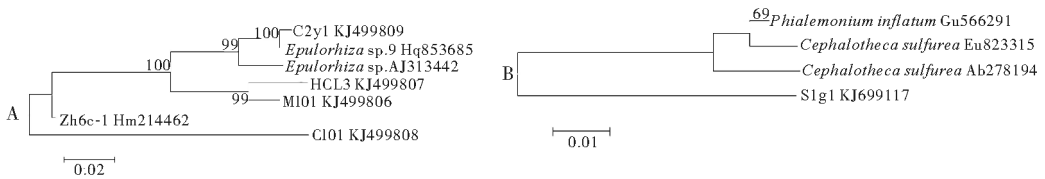


图 3 利用 NJ 法聚类分析真菌菌株 C2y1(A) 及 S1g1(B) 与相关菌株的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed by neighbor joining (NJ) method, using the ITS sequences of isolate C2y1 (A), S1g1 (B) and the related strains

表 1 接种 C2y1 和 S1g1 对大花蕙兰生长参数的影响

Table 1 The inoculation effects of isolates C2y1 and S1g1 on the growth parameters of *C. hybridum* plantlets

处理 Treatments	鲜质量增长/g Increased fresh weight	茎干干质量/g Leaf dry weight	根干质量/g Root dry weight (个)	总干质量/g Total dry weight	新根长/cm New root length	根伸长/cm Elongated root length	新根发生率/% Percentage of new root initiation	根系伸长率/% Percentage of elongating roots
CK	0.12±0.028c	0.16±0.020b	0.045±0.004b	0.20±0.017c	0.09±0.032b	0.25±0.238b	20.0	35.0
S1g1	0.49±0.013b	0.20±0.003a	0.065±0.012ab	0.26±0.014b	0.79±0.270a	0.86±0.110a	77.8	88.9
C2y1	0.92±0.053a	0.22±0.008a	0.084±0.001a	0.32±0.006a	0.9±0.380a	1.2±0.120a	94.5	82.7

注: 表中数值为 2 种真菌与大花蕙兰苗共生培养 45 d 后的结果, 采用邓肯氏新复极差法 (SSR 法) 进行差异显著性测验, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Note: Plantlets were harvested at 45 days after inoculation with isolates S1g1 and C2y1 or mock-inoculated. All the data were means ±SD. In each column, different letter indicates significant ($P < 0.05$) differences as evaluated by Duncan's multiple range test (DMRT). The same as follows.

2.4 不同真菌处理对大花蕙兰叶绿素含量的影响

从表 2 可以看出, 2 种真菌处理后植株的总叶绿素含量与对照差异不显著, 但真菌 C2y1 处理较 CK 显著促进了植株叶绿素 a 含量的增加, 高出 CK 46.32%, 但叶绿素 a 和叶绿素 b 的比率维持在 3 左右, 说明真菌处理在显著促进植株鲜质量增加时光合作用单位也能随之大量合成, 保证了植株基本代谢进程的稳定。

2.5 真菌接种对大花蕙兰矿质元素的吸收影响

2 种真菌对大花蕙兰幼苗矿质元素吸收影响如表 3 所示, 与真菌 C2y1 共培养的植株其 N、P、K、Ca 元素含量相比于对照都有显著增加, 而接种真菌 S1g1 的植株其 Ca 元素的含量增加显著。对于微量元素, 真菌 C2y1 显著促进了大花蕙兰对 Fe 元素的吸收, 菌根化苗 Fe 元素含量高出对照的 162.24%; 而真菌 S1g1 则显著促进了植株对微量元素 Mn 和

表 2 不同真菌处理对瓶内大花蕙兰苗的叶绿素含量影响

Table 2 Effect of isolates C2y1 and S1g1 on the chlorophyll content of *C. hybridum* plantlets

处理 Treatments	叶绿素 a 的含量/(mg/g) Chlorophyll a contents	叶绿素 b 的含量/(mg/g) Chlorophyll b contents	叶绿素总含量/(mg/g) Chlorophyll contents	叶绿素 a/叶绿素 b Chlorophyll a/Chlorophyll b
CK	0.367±0.024b	0.133±0.01a	0.500±0.03b	2.774
S1g1	0.487±0.018ab	0.175±0.03a	0.662±0.05ab	2.870
C2y1	0.537±0.053a	0.175±0.03a	0.711±0.08ab	3.119

表 3 真菌 C2y1 和 S1g1 对大花蕙兰矿质元素吸收的影响

Table 3 Effect of inoculation with strains of C2y1 and S1g1 on minerals accumulation in *C. hybridum* plantlets mg/plant

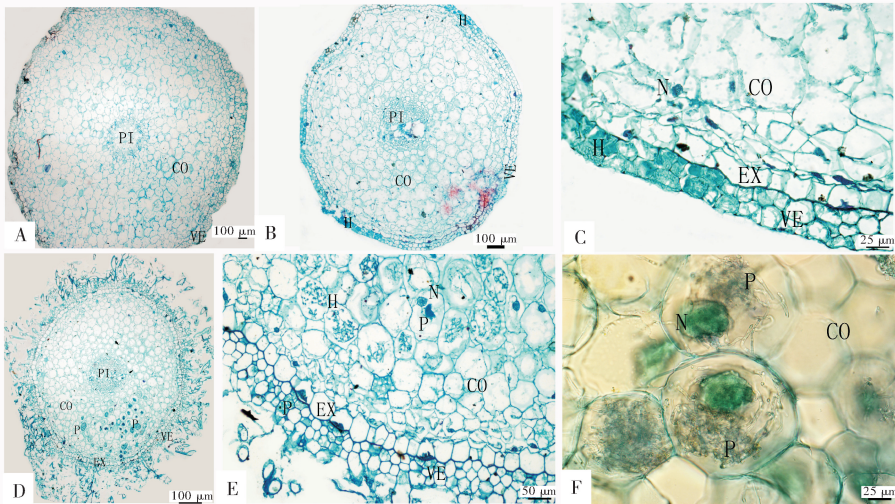
处理 Treatments	大量元素 Macro-element					微量元素 Micro-element		
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn
CK	30.80±1.21b	0.76±0.02b	2.96±0.15b	1.21±0.06b	0.57±0.05a	30.40±1.21c	25.35±0.02b	37.35±0.15c
C2y1	34.13±0.23a	1.01±0.02a	3.76±0.03a	1.71±0.02a	0.64±0.03a	79.72±0.23a	30.72±0.02ab	53.28±0.03b
S1g1	31.97±0.14ab	0.82±0.02b	3.41±0.19ab	1.83±0.19a	0.67±0.03a	43.01±0.14b	33.79±0.02a	62.78±0.19a

Zn 的吸收,分别高出对照 33.29% 和 68.09%。

2.6 真菌与兰根形成的共生结构观察

由图 4A 可以看出,大花蕙兰组培苗的根主要由根被、皮层和中柱组成。真菌 S1g1 只存在于根被细胞中,在皮层细胞中未见真菌的分布(图 4B、

C)。真菌 C2y1 的菌丝可侵入兰根皮层细胞并形成大量菌丝结(图 4D),并可观察到菌丝穿过细胞壁侵入邻近细胞(图 4F),在皮层细胞内有大量新定殖的菌丝和正在被消化的菌丝(图 4E)。伍建榕^[10]也曾观察到同样的现象,在皮层细胞中菌丝和菌丝结最



A:CK,未见真菌侵染 None fungal structure in CK; B、C:真菌 S1g1 在根细胞中的分布,主要分布于根被细胞中,在根毛附近有大量真菌聚集 The hyphae of isolate S1g1 colonized the velamen cells of orchid roots and also aggregated on the surface of infected roots; D、E、F:真菌 C2y1 在大花蕙兰根细胞中分布,大量的菌丝结存在于皮层细胞中,在根被细胞中也有真菌存在 Typical fungal pelotons were detected in the cortex cells and hyphae of isolate C2y1 also existed in the velamen cells; CO: 皮层 Cortex; EX: 外皮层 Exodermis; VE: 根被 Velamen; P: 菌丝结 Peloton; H: 菌丝 H yphae; PI: 髓 Pith.

图 4 不同真菌与苗共生 45 d 根横切片结构特点

Fig.4 Colonization characteristics of different fungi in roots of *C. hybridum* at 45 days post inoculation

终被消化,为兰花生长提供营养。

3 讨论

研究表明,瘤菌根菌属真菌 C2y1 与大花蕙兰苗可形成典型的兰科植物菌根结构,并促进植株

的生长和矿质元素吸收,这与赵杨景等^[15]、金辉等^[27]的研究结果一致。兰科丝核菌类真菌被认为是一种常见的兰科植物内生真菌,主要包括蜡壳儿目真菌(Sebacinales)、角担菌科真菌(Ceratobasidiaceae)和角膜菌科真菌(Tulasnellaceae)。本试验中

C2y1 为角膜菌科瘤菌根菌属真菌,该菌株能够促进植株对 N、P、Fe 等矿质元素的吸收,与 Zhao 等^[25] 研究结果一致。早在 1984 年 Alexander 等^[28] 证明菌根化的兰科植物吸收 P 元素含量是非菌根植物的 100 倍,菌丝是菌根真菌吸收和运输 P 元素的主要器官^[29]; Cameron 等^[2] 则证明菌根真菌能直接向植株运输 N 元素;Wang 等^[30] 报道丛枝菌能够缓解柑橘属植物因缺 Fe 引起的黄枯病;Zhao 等^[25] 认为接菌后能显著促进 Fe 元素的吸收,还与真菌能影响培养基的 pH 值有关。

本研究从野生兰科植物根系分离的菌株 Slg1 为黄丝菌科 *Cephalotheca* 属真菌,该菌株也能与大花蕙兰形成有益共生体。Hammad 等^[31] 从大豆根尖分离了 *C. sulfurea* AGH07 真菌,该菌株能够产生赤霉素(GAs)类植物激素并显著促进 Waito-C 大豆生物量的生长。适当浓度的赤霉素能够促进石斛根生长^[32]。在本试验中接种真菌 Slg1 也能显著促进大花蕙兰根系的伸长。真菌 Slg1 能够侵染大花蕙兰的根被细胞,显著促进植株对 Ca、Mn、Zn 等矿质元素的吸收^[33-34]。大量研究表明 Ca 能增加植物抗性^[35],Zn 能参与叶绿素生成、防止叶绿素的降解和形成碳水化合物,还能参与生长素的合成^[32]。

本试验证明 2 种亲缘关系甚远的真菌都能与大花蕙兰形成共生体,但兰科丝核菌 C2y1 较 Slg1 更显著促进植株生物量的增长及矿质元素 N、P、K 的吸收,这可能与真菌的特性有关。兰科丝核菌能在大花蕙兰根皮层细胞中形成典型的菌丝结构,而现在普遍认为,兰科植物通过消解皮层细胞中的真菌菌丝来获得营养^[23]。Richardson 等^[35] 在处于消解阶段的菌丝结中发现了高浓度的磷脂聚合物,并检测到 Mg^{2+} 、 K^{+} 和 Ca^{2+} 等离子。最近的研究还表明,兰科菌根真菌可以激活植物的离子转运系统从而增加宿主对氮、磷营养的吸收^[25]。真菌 Slg1 能显著促进大花蕙兰的生长,其是否能分泌赤霉素、这种促进作用是否源于赤霉素的效应等还有待进一步研究。

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,1998:356.
- [2] 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(2):405-416.
- [3] CAMERON D D,JOHNSON I,LEAKE J R,et al.Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*[J].Annals of Botany,2007,99(5):831-834.
- [4] LIU H,LUO Y,LIU H.Studies of mycorrhizal fungi of Chinese orchids and their role in orchid conservation in China—a review[J].The Botanical Review,2010,76(2):241-262.
- [5] 宋经元.菌根真菌对两种药用石斛的生长发育和基因表达的影响[D].北京:中国协和医科大学图书馆,2002.
- [6] 金辉,许忠祥,陈金花,等.铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养过程中的相互作用[J].植物生态学报,2009(3):433-441.
- [7] 魏勤,张丽梅,郝晓蕾,等.蝴蝶兰菌根真菌生物学特性及其应用研究(I)[J].云南大学学报(自然科学版),1998(S4):513-515.
- [8] 柯海丽.五唇兰菌根化育苗技术研究[D].广州:华南热带农业大学图书馆,2007.
- [9] 侯天文,金辉,刘红霞,等.实验室条件下五唇兰菌根真菌专一性研究[J].植物生态学报,2010(12):1433-1438.
- [10] 伍建榕.云南濒危野生兰花与菌根真菌的相互关系[D].南京:南京林业大学图书馆,2005.
- [11] 仲凯.美花兰 *Cymbidium insigne* 菌根化培养研究[D].北京:北京林业大学图书馆,2009.
- [12] 刘园,王四清.大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)的研究动向[J].园艺学报,2005,32(4):748-752.
- [13] 朱根发,王碧青,陈明莉,等.大花蕙兰与兰属植物间杂交研究[J].植物学通报,2005,22(4):445-448.
- [14] 颜容.兰科植物菌根真菌的分类及其与共生植物间的营养关系[J].西部林业科学,2004(4):50-53.
- [15] 赵杨景,郭顺星,高薇薇,等.三种内生真菌与大花蕙兰共生对矿质营养吸收的影响[J].园艺学报,1999,26(2):110-115.
- [16] DIJK E E N.Effects of mycorrhizal fungi on *in vitro* nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species[J].Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique,1995,73:1203-1211.
- [17] PITET M,CAMPRUBI A,CALVET C,et al.A modified staining technique for arbuscular mycorrhiza compatible with molecular probes[J].Mycorrhizal,2009,19(2):125-131.
- [18] HILLIS D M,DIXON M T.Ribosomal DNA:molecular evolution and phylogenetic inference[J].Quarterly Review of Biology,1991,66(4):411-453.
- [19] WHITE T J,BRUNS T,LEE S,et al.Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//INNIS M,GELFAND D H,SNINSKY J J.PCR protocols—a guide to methods and applications.San Diego,California:Academic Press,1990:315-322.
- [20] ZHAO X L,YANG J Z,LIU S,et al.The colonization patterns of different fungi on roots of *Cymbidium hybridum* plantlets and their respective inoculation effects on growth and nutrient uptake of orchid plantlets[J].World Journal Microbiology and Biotechnology,2014,30(7):1993-2003.

- [21] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006.
- [22] 李和平. 植物显微技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 258.
- [23] HANNE N R. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [24] MA M, TAN T K, WONG S M. Identification and molecular phylogeny of *Epulorhiza* isolates from tropical orchids[J]. Mycological Research, 2003, 107(9): 1041-1049.
- [25] ZHAO X, ZHANG J, CHEN C, et al. Deep sequencing-based comparative transcriptional profiles of *Cymbidium hybridum* roots in response to mycorrhizal and non-mycorrhizal beneficial fungi[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 747.
- [26] YAGUCHI T, SANO A, YARITA K, et al. A new *Cephalotheca* isolate from Korean patient[J]. Mycotaxon, 2006, 96: 309-322.
- [27] 金辉, 伍建榕, 陈曦, 等. 菌根真菌对春兰生长和矿质元素吸收的影响[J]. 北方园艺, 2006(6): 90-92.
- [28] ALEXANDER C, ALEXANDER I J, HADLEY G. Phosphate uptake by *Goodyera repens* relation to mycorrhizal infection [J]. New Phytologist, 1984; 97: 401-411.
- [29] 刘润进, 陈应龙. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 447.
- [30] WANG M, XIA R. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and iron uptake of *Poncirus trifoliata* under different pH[J]. Acta Microbiol Sinica, 2009, 49(10): 1374-1379.
- [31] HAMAYUN M, KHAN S A, KHAN A L, et al. Endophytic *Cephalotheca sulfurea* AGH07 reprograms soybean to higher growth[J]. Journal of Plant Interactions, 2012, 7(4): 301-306.
- [32] SMITH S E, READ D J. Mycorrhizal symbiosis [M]. 3rd ed. London: Academic Press, 2008.
- [33] 刘桂兰. 微量元素对植物生长发育的作用[J]. 现代农村科技, 2009(3): 55.
- [34] AIDITTI J. Factors affection the germination of orchid seeds [J]. The Botanical Review, 1967, 33(1): 1-83.
- [35] RICHARDSON K A, PETERSON R L, CURRAH R S. Seed reserves and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborean* (Orchidaceae) [J]. Canadian Journal of Botany, 1992, 70: 291-300.

Comparing the symbiotic effects of two endophytes on growth of *Cymbidium hybridum*

LIU Shu¹ CHEN Chunli^{1,2} LIU Min¹ LIAO Qinggang¹ ZHAO Xiaolan¹

1. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm/
College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University,

Guangzhou 510642, China;

2. Xi'an Ziwei Estate Development Co., LTD. in Shaanxi Province, Xi'an 710119, China

Abstract The vegetative growth of *Cymbidium hybridum* plantlets could be promoted through artificial mycorrhizae. In this study, two endophytes (C2y1 and S1g1) obtained from roots of wild orchids exhibited obvious growth-promoting effects on the *C. hybridum* plantlets through increasing root length, biomass and chlorophyll content. Furthermore, isolate C2y1 increased the N, P, K, Fe contents of the symbiotic plantlets. Especially the Fe content of the treated plants increased by 163.24% compared with the control. Isolate S1g1 significantly increased the accumulation of Ca, Mn, Zn (by 62%, 32%, and 68.09%, respectively) in symbiotic plantlets compared with the control. Combining with internal transcribed spacer sequence (ITS) and the morphological characteristics, isolate C2y1 and S1g1 was identified as *Epulorhiza* sp. and *Cephalotheca* sp., respectively. Microscopic studies showed that hyphae of isolate C2y1 infected the root cortex cells and formed typical orchid mycorrhizae, whereas hyphae of isolate S1g1 aggregated in the host velamen cells. It is indicated that artificial mycorrhization can effectively promote the vegetative growth and mineral element absorption for *Cymbidium* plantlets. Different fungi exhibit some degree of complementary promoting effects.

Keywords *Cymbidium hybridum*; mycorrhiza fungi; endophytic fungi; mycorrhization; ITS sequence; symbiosis; mineral elements

(责任编辑: 张志钰)