

五唇兰非致病真菌的特性及对组培苗生长的影响

陈金花^{1,2}, 朱国鹏^{1,2}, 宋希强^{2,3}, 胡美姣⁴, 李 凤²

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所 海南 儋州 571737; 2. 海南大学 热带园艺植物资源与遗传改良教育部重点实验室 海南 儋州 571737; 3. 中国科学院 植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093; 4. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:以从野生五唇兰植株上分离筛选到的非致病真菌为研究对象, 根据形态特征进行种类鉴定, 用羧甲基纤维素钠培养基和无机磷培养基进行培养, 筛选出具有解纤维和解磷能力菌株, 再将菌株接种到五唇兰组培苗上。结果表明: 在 14 株五唇兰非致病真菌中, 同时具有解纤维和解磷能力的菌株共 10 个除 R06 和 R09 菌株外, 其余菌株对五唇兰组培苗生长均有促进作用, 其中 RH18、R03 和 R14 菌株处理的五唇兰组培苗鲜重增长率极显著高于未接菌对照, RH19、R02 和 S02 菌株处理的五唇兰组培苗鲜重增长率显著高于未接菌对照, R05 和 R002 菌株处理与未接菌对照无显著差异。

关键词:五唇兰; 解纤维能力; 解磷能力; 菌根真菌

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)07-0081-05

当菌根菌与兰科植物成功建立共生关系后, 就承担起了传递营养元素的任务。Smith 采用标记¹⁴C 和³²P 证实 真菌分解纤维素和菌丝中的标记物向兰科植物原球茎运转^[1]。近几年, 在解磷菌和解纤维素菌的筛选和利用方面已有许多十分成功的实例, 但多数集中在农作物方面, 如红树林和棉花等, 而对兰科菌根菌的解纤维和解磷能力的研究鲜有报道^[2-4]。

兰科菌根真菌产生多酚氧化酶氧化基质中的单宁, 将纤维素分解成葡萄糖、醇和各种有机酸, 或吸取植物根系外的碳水化合物并输送到兰科植物体上, 如立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和瓜亡革菌(*Thanatephorus cucumeris*)^[5]。

兰科菌根菌除了为寄主输入大量的碳水化合物外, 还增加寄主对磷和其它营养元素的吸收^[6]。由于土壤中 95%~98% 的磷都不能直接吸收和利用, 而且磷不易流动, 所以在植物根周围常出现“贫磷区”, 而植物体只有通过分泌磷酸酶或根系的扩展来吸收 P 元素, 但这种方式的利用率很低。许多兰科植物的根是肥厚的肉

质根, 只有很少的侧根和根毛, 这样的根部特点更不利于吸收不易流动的磷和铁等矿质元素, 而菌根菌正好补充了这一缺点, 即帮助兰科植物更好地吸收矿质营养。由于菌根的根外菌丝及菌索的生长, 菌根菌除了能够分解土壤中不能直接吸收利用的磷外, 还大大地扩大了根的吸收面积和吸收速率, 深达“贫磷区”以外的土壤^[9]。还有人认为解磷微生物对植物的影响机制除了增加吸收磷量外还包括分泌了生长调节物质, 促进根系生长^[7]。此外, 解磷微生物还可以产生植酸酶、核酸酶和磷酸酶等加速植酸、核酸、磷脂等含磷有机化合物的分解, 促进磷素的释放, 从而提高植物磷素营养^[8]; 可分泌有机酸降低 pH 值并与铁、铝、钙、镁等离子结合, 从而使难溶性磷酸盐溶解^[9]。

现以五唇兰(*Doritis pulcherrima* Lindl.)非致病真菌为对象, 筛选出同时具有解纤维和解磷能力的菌株, 并研究其对五唇兰组培苗生长的影响, 从而改进菌根真菌筛选的常规方法, 探讨一个快速、高效的菌根真菌筛选途径, 为兰科植物菌根真菌的研究和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为 R02、R03 等共 14 株五唇兰非致病真菌; 供试植株为 3 条左右根、4 片左右叶的五唇兰组培苗; 培养基为无机磷固体培养基^[3]、羧甲基纤维素钠培养基^[10]和 DE 培养基^[11]。

1.2 试验方法

1.2.1 真菌初步鉴定 将分离出的菌落挑入 PDA 平板中活化, 通过低温、人为切断菌丝等方法诱导子实体, 综合有关兰科菌根真菌的报道, 参照有关书籍和文献^[12-13]

第一作者简介: 陈金花(1982-), 女, 硕士, 现从事热带花卉保育学研究。

通讯作者: 宋希强(1972-), 男, 博士生导师, 现从事生物多样性及其形成机制研究。E-mail: song.xstrong@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30860233); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(ZS055); 海南省研究生创新基金资助项目(Hxwxy2008-07); 海南大学科技基金资助项目(Rnd 0612)。

收稿日期: 2009-12-31

进行分类鉴定。

1.2.2 解磷菌筛选 将供试菌株分别接种到无机磷固体培养基上, 每个菌重复 3 次, 28℃暗培养 4~5 d, 测量固体培养基上解磷圈大小。根据解磷圈直径与菌落直径比值大小和解磷圈清晰度判断该菌解磷能力的大小。

1.2.3 解纤维菌筛选 将供试菌株分别接种到羧甲基纤维素钠培养基上, 每个菌重复 3 次, 28℃暗培养 4~5 d, 然后用刚果红染色法染色后观察培养基上菌落周围的透明水解圈。根据水解圈直径与菌落直径比值的大小和水解圈的清晰度判断该菌解纤维能力的大小。

1.2.4 对五唇兰组培苗生长的影响 将筛选到具有解纤维和解磷能力的真菌接种到 PDA 培养基上 28℃暗培养 7 d 后, 用打孔器在菌落边缘取直径为 0.5 mm 的菌块备用。在无菌条件下, 用无菌水冲洗粘附在五唇兰组

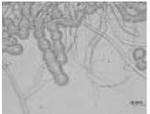
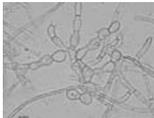
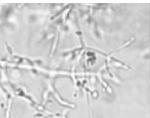
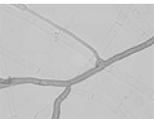
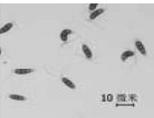
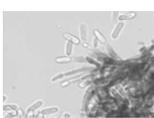
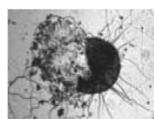
培苗根上的培养基, 无菌吸水纸吸干水分后称取鲜重, 将称重后的苗编号并转接在 DE 共生培养基中, 每袋 8 株; 然后取一个菌饼放在每 4 株五唇兰苗的中间, 与每株苗的距离约 1 cm 密封。将接菌苗放在 22~28℃培养室中进行共生培养, 每天光照 12~14 h, 光照强度 2 000 lx, 相对湿度 80%~90%。对照不接菌, 每个处理接 3 袋。最后, 观察记录苗的生长情况, 90 d 后统计成活率和苗的鲜重。

2 结果与分析

2.1 菌株种类

经初步鉴定, 14 株五唇兰非致病真菌分属丝核菌属 *Rhizoctonia* sp.、小核核菌属 *Sclerotium* sp.、盘多毛孢属 *Pestalotia* sp.、毛壳孢属 *Chaetomium* sp. 等 4 目 6 科 11 属(表 1)。

表 1 五唇兰非致病菌株的种类、菌落及其形态特征

序 菌株号	菌株种类	菌落形态	显微特征	序 菌株号	菌株种类	菌落形态	显微特征
1 R02	丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i> sp.	无旺盛的气生菌丝, 菌核褐色或黑色 有的菌落极薄, 呈细菌状; 菌丝分枝处成直角或锐角, 多有分隔, 无分生孢子; 经诱导未产生子实体		9 R003	丛梗孢属 <i>Monilia</i> sp.	白色或灰色菌落, 分生孢子梗分枝分生, 孢子成团时粉色、灰色或黄褐色, 单胞, 短柱形或圆形	
2 R03				10 RH08	木霉属 <i>Trichoderma</i> sp.	菌落白色毡状, 后期在表面产生黄绿色的分生孢子堆, 分生孢子从菌丝的侧枝上生出, 直立分枝, 小枝对生, 顶端不膨大, 上生孢子团, 分生孢子球形, 无色	
3 R05	小核核菌属 <i>Sclerotium</i> sp.	白色菌落, 菌核褐色至黑色, 球形, 组织紧密; 内部细胞牵涉, 软骨质至肉质, 未发现无性孢子		11 RH16	筒梗孢霉属 <i>Chromosporium</i> sp.	无色菌丝, 后期变为黑色; 侧生分生孢子; 分生孢子暗色, 卵圆形, 单胞	
4 R06	盘多毛孢属 <i>Pestalotia</i> sp.	白色菌落, 绒状; 有的边缘不规则, 分泌黑色色素或不分泌; 黑色分生孢子盘, 圆盘形或垫形, 近表生, 分生孢子暗色, 几个细胞, 末端细胞尖而无色, 纺锤形, 有多根无色顶尖的附属丝		12 RH18	丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i> sp.	无旺盛的气生菌丝, 菌核褐色或黑色, 有的菌落极薄, 呈细菌状; 菌丝分枝处成直角或锐角, 多有分隔, 无分生孢子; 经诱导未产生子实体	
5 R09	拟小卵孢属 <i>Ovalariopsis</i> sp.	白色菌落, 分生孢子梗直立, 简单, 分生孢子单胞, 无色, 棍棒形, 在顶部单生		13 RH19	丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i> sp.		
6 R12	色串孢属 <i>Tolua</i> sp.	黑色菌落, 绒毛状, 分泌黑色色素, 绒毛状, 分生孢子梗短或缺乏, 暗色球状分生孢子, 直链, 单细胞, 2.5 μm × 3.0 μm ~ 5.0 μm		14 S02	茎点霉属 <i>Phoma</i> sp.	分生孢子器暗色, 球形, 无孔; 分生孢子无色, 单胞, 卵圆形	
7 R14	毛壳孢属 <i>Chaetomium</i> sp.	灰白色菌落, 有的边缘不规则, 后期变成灰色或土黄色, 绒毛状, 分泌黄褐色色素, 子囊果瓶升, 球形, 灰色或者土黄色, 顶有孔, 四周有卷曲不分枝刚毛, 长而不分枝; 子囊孢子黑色梭形, 两端尖					
8 R002							

2.2 解纤维和解磷真菌

用无机磷培养基和羧甲基纤维素钠培养基培养后,从14株五唇兰非致病真菌中筛选出具有解纤维和解磷能力的菌株10株, R02、R03、R05和R06等。其中, S02的解纤维和解磷能力都比较强, 其余的菌株有的是解纤维能力较强, 有的是解磷能力较强, 还有的解纤维和解磷能力都不强(表2, 图1~2)。

表2 五唇兰非致病菌株的解磷、解纤维能力

序号	菌株号	解纤维能力	解磷能力	序号	菌株号	解纤维能力	解磷能力
1	R02	+	+	8	R002	+	++
2	R03	+	+	9	R003	++	-
3	R05	+	+	10	RH08	-	+
4	R06	++	+	11	RH16	-	-
5	R09	++	+	12	RH18	++	+
6	R12	-	+	13	RH19	++	+
7	R14	+	+	14	S02	++	++

注“++”表示该菌解纤维或解磷能力较强, “+”表示该菌具有解纤维或解磷能力, “-”表示未观察到解磷圈或水解圈

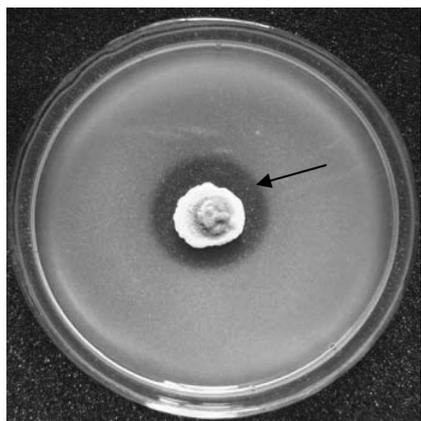


图1 S02的解磷作用

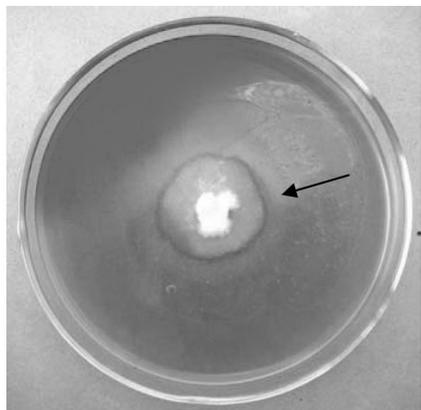


图2 S02的解纤维作用

2.3 解纤维和解磷真菌对五唇兰组培苗生长的影响

所有解纤维和解磷真菌与五唇兰组培苗都能在 DE

培养基上较好共生, 90 d 后五唇兰组培苗成活率达100%, 除 R06 和 R09 菌株外, 其余菌株使五唇兰组培苗的鲜重增长率均有不同程度地增高, RH18、R03、R14、RH19、R02、S02、R05 和 R002 分别比对照高出 56.72%、44.60%、41.15%、34.15%、14.17%、12.94%、6.43%和 5.18%。经方差分析和多重比较 RH18、R03 和 R14 对五唇兰组培苗鲜重增长率的影响极显著高于未接菌对照, RH19、R02 和 S02 处理达显著, R05、R002 处理与未接菌对照无显著差异, 而 R06 和 R09 显著差于对照(表3~4, 图3)。

表3 解磷和解纤维真菌对五唇兰组培苗鲜重增长率方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理间	152 429.2	10	15 242.92	5.166	0.0001
处理内	778 973.5	264	2 950.657		
总变异	931 402.7	274			

表4 解纤维和解磷真菌对五唇兰组培苗鲜重增长率的多重比较

处理	平均鲜重增长率/%	差异显著性	
		0.05	0.01
RH18	136.06	a	A
R03	123.94	ab	AB
R14	120.49	ab	ABC
RH19	113.49	abc	ABC
R02	93.51	bcd	ABCD
S02	92.28	bcd	ABCD
R05	85.77	cde	BCD
R002	84.52	cde	BCD
CK	79.34	cde	BCD
R09	77.39	de	CD
R06	52.10	e	D

3 讨论与结论

3.1 解纤维菌和解磷菌

贫瘠土壤中解纤维菌主要是以真菌为主, 在有氧中温条件下, 强烈分解纤维素的真菌有木霉属 (*Trichoderma* sp.)、青霉属 (*Penicillium* sp.)、曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 和镰刀菌属 (*Fusarium* sp.) 的一些种, 其中尤以木霉属 (*Trichoderma* sp.) 受到充分重视^[4]。在该试验中, 木霉属 (*Trichoderma* sp.) 的 RH08 未表现出解纤维能力, 而丝核菌属 (*Rhizoctonia* sp.) 的 RH18 和 RH19、毛壳菌属 (*Chaetomium* sp.) 的 R14、茎点霉属 (*Phoma* sp.) 的 S02 等却表现出较好的解纤维能力, 说明不同属间的菌株和同属不同种间的菌株解纤维能力差异较大。据报道, 解磷真菌主要是青霉属 (*Penicillium* sp.)、曲霉属 (*Aspergillus* sp.) 和根霉属 (*Rhizopus* sp.), 但是不同的土壤, 不同的作物根际, 解磷菌种群分布存在一定的差异^[9]。在该试验中丝核菌属 (*Rhizoctonia* sp.)、毛壳菌属 (*Chaetomium* sp.)、茎点霉属 (*Phoma* sp.)、小核核菌属 (*Sclerotium* sp.) 等 12 个菌株表现了解磷能力, 而在这几个属解磷能力方面的报道还鲜见。应对兰科菌根

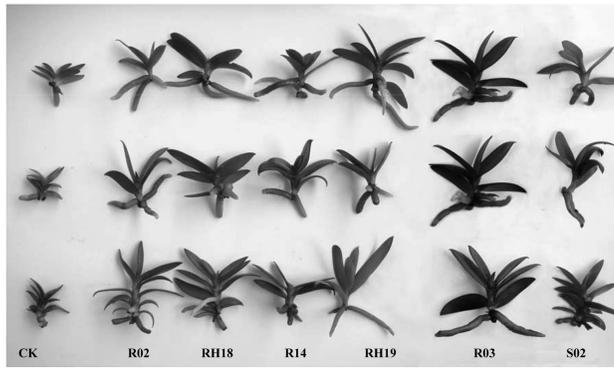


图3 6株解磷和解纤维菌菌株对五唇兰组培苗的影响

真菌解纤维能力和解磷能力进行进一步研究,以深入揭示菌根真菌与兰科植物之间的共生机制。

3.2 解纤维和解磷菌的利用

解纤维和解磷菌可制成生物肥应用到生产中。由于有机肥易滋生各种微生物并危害兰花,所以在兰花栽培上一般不施用基肥,常以无机肥和生物肥料代替,其中生物肥料是一种低成本、高产出、无污染的新型肥料。纤维素分解菌不仅可将这些物质分解成较简单的物质,亦可作为固氮菌的碳源,增加土壤中自生固氮菌和纤维素分解菌的数量,提高土壤的肥力和熟化程度。解磷菌具有解磷能力和促进植物生长的双重作用⁷。在解纤维、解磷和促进五唇兰组培苗生长方面,丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.)的R02、R03、RH18和RH19,毛壳菌属(*Chaetomium* sp.)的R14和茎点霉属(*Phoma* sp.)的S02表现出较好的综合能力,具有潜在的开发价值,应将其开发利用到兰科植物的实际栽培生产和保育中。

另外,通过羧甲基纤维素钠培养基和无机磷培养基筛选到具有解纤维和解磷能力的真菌中,丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.)、毛壳菌属(*Chaetomium* sp.)和茎点霉属(*Phoma* sp.)还是常见的兰科菌根真菌,所以,在兰科植物菌根真菌分离时,可尝试有针对性地使用解磷菌培养基和解纤维菌培养基进行分离,可大大缩小筛选范围,减少工作量。

3.3 存在的问题

土壤中的解磷菌大多数是腐生菌,而土壤中的碳源主要是植物残体,解磷菌无法直接利用,故解纤维菌的存在同时还满足了解磷菌生长所需的碳源营养,提高无机磷细菌溶解磷矿粉的能力¹³,所以,有效菌的混合接种比单一接种的效果要好¹⁴。试验中仅进行单一接种,在今后的试验中,可将解磷菌与解纤维菌进行有机搭配和配比进行试验。

另外,仅从有无产生透明圈来判断微生物解磷或解纤维能力还不够,需进一步进行磷酸酶或纤维素酶的测定。该试验还未对五唇兰根际细菌(或放线菌)、土壤细

菌(或放线菌)和内生细菌(或放线菌)进行研究,应进行补充试验,从多角度探索新的兰科菌根菌分离和筛选方式。

参考文献

- [1] Smith S E. Carbohydrate translocation in Orchid mycorrhizas [J]. *New Phytologist*, 1966(65): 488-499.
- [2] 万璐,康丽华,廖宝文,等. 红树林根际解磷菌分离培养及解磷能力的研究[J]. *林业科学研究*, 2004, 17(1): 89-94.
- [3] 郑燕玲,程萍,喻国辉,等. 石斛兰叶片内生菌的分离及其解磷能力的研究[A]. 第十届全国杀虫微生物学术研讨会暨全国生物农药与化学生物学研究产业化会议论文集摘要集, 2006.
- [4] 席琳乔,王静芳,马金萍,等. 棉花根际解磷菌的解磷能力和分泌有机酸的初步测定[J]. *微生物学杂志*, 2007, 27(5): 70-74.
- [5] Smith S E. Physiology and ecology of Orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition [J]. *New Phytologist*, 1967(66): 371-378.
- [6] 弓明钦,陈应龙,仲崇祿. 菌根研究及应用[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997: 52.
- [7] Datta M, Banik S, Gupta R K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland [J]. *Plant and Soil*, 1982(69): 365-373.
- [8] 林启美,赵小蓉,孙炎鑫,等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布[J]. *土壤与环境*, 2000(91): 34-37.
- [9] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. *土壤肥料*, 2001(3): 7-11.
- [10] 魏亚琴,李永泉,李红玉. 分解纤维素的三株真菌的筛选与鉴定[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2008(44): 92-96.
- [11] Dijk E, Chou N D. Effects of mycorrhizal fungion in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species [J]. *Canada Journal Botany*, 1995(73): 1203-1211.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 科学技术出版社, 1979.
- [13] 巴尼特,亨特著. 半知菌属图解[M]. 沈崇尧译. 北京: 科学出版社, 1977.
- [14] 邵宝林. 横断山北部高山区土壤真菌的初步研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006: 8.
- [15] 林启美,王华,赵小蓉,等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(2): 26-30.
- [16] 张晓伦,刘旭,饶泽昌. 高效纤维素分解菌混合培养及其降解能力[J]. *南昌大学学报*, 2005, 29(5): 500-501.

不同施肥量对高寒地区百合移栽苗生长的影响

杨 菁, 马晓岗, 张玉清, 田海宁, 穆德志

(青海大学 生物科学系, 青海 西宁 810016)

摘 要: 通过三因素四水平正交设计, 研究氮、磷、钾不同配比对高寒地区百合移栽苗生长的影响。结果表明: 1 kg 基质施用 522 mg 氮肥、1 176 mg 磷肥、296 mg 钾肥, 对高寒地区百合叶面积、株高、根长效果最好; 以 A₄B₃C₄ (522 mg/kg 氮肥+588 mg/kg 磷肥+444 mg/kg 钾肥) 的效果次之, 以不施任何肥料的效果最差, 在入土移栽到花盆中以 A₄B₄C₃ (522 mg/kg 氮肥+1 176 mg/kg 磷肥+296 mg/kg 钾肥) 时成活率最高, 可达到 85%。

关键词: 高寒地区; 百合; 氮肥; 磷肥; 钾肥

中图分类号: S 682.2⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)07-0085-03

百合 (*Lilium brownie*) 为百合科百合属多年生草本花卉, 广泛分布于北半球, 具有很高的观赏价值和实用价值, 是北半球温带和寒带地区主要的栽培花卉品种, 具有“球根花卉之王”的美誉^[1]。其适应范围广、生长期长, 故栽培面积不断扩大, 据估计, 2004 年全国的百合切花生产面积达 2 000 hm², 年生产百合切花 2 亿多支^[2]。

东方百合是百合的一个种, 花朵大、花瓣厚、花向上开, 花香馥郁且耐瘠薄、抗逆性强, 在荷兰、日本等发达国家很流行, 成为当今花卉主潮流之一。近年来, 西方先进的管理技术开始影响我国, 于是, 百合也进入我国和青海等高寒地区市场, 但受高寒气候影响花色单一、花形小, 花期较短, 种植较少, 不能满足市场的需求, 故对此方面进行配套施肥技术研究。

第一作者简介: 杨菁(1959), 男, 教授, 硕导, 现主要从事农作物及园艺作物遗传育种工作。

通讯作者: 马晓岗(1959), 男, 研究员, 硕士生导师, 现从事农作物及园艺作物遗传育种研究工作。

基金项目: 青海省重点科技攻关资助项目(2007-G-136)。

收稿日期: 2009-12-25

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试百合品种为东方百合, 购自青海农发有限公司。

供试肥料: 氮肥(尿素含氮 46%), 磷肥(过磷酸钙折合五氧化二磷 17%), 钾肥(硫酸钾折合氧化钾 54%)。

1.2 试验方法

The Characteristic of *D. Pulcherrima* No-pathogens and Effect to Seedlings *in vitro*

CHEN Jin-hua^{1,2}, ZHU Guo-peng^{1,2}, SONG Xi-qiang^{2,3}, HU Mei-jiao⁴, LI Feng¹

(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737; 2. Key Laboratory of Tropical Horticultural Plant Resources and Genetic Improvement, Ministry of Education, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737; 3. State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093; 4. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: *Doritis pulcherrima*'s no-pathogens were studied and the species identifications were given by morphological character. We screened out fiber-dissolving and phosphate-dissolving fungus by CMC-Na medium and Ca₃(PO₄)₂ medium in no-pathogens isolated from *D. pulcherrima* Lindl. Phosphate-dissolving and fiber-dissolving fungus were inoculated on seedling *in vitro*. The results showed that 10 strain no-pathogens in 14 had the abilities of fiber-dissolving and phosphate-dissolving; the promoting effect of phosphate-dissolving and fiber-dissolving fungi higher than control, excepted R06 and R09; fresh growth rate of *D. pulcherrima* seedlings inoculated RH18, R03, R14 were marked significant than control; inoculated RH19, R02, S02 were significant than control. The difference between R05, R002 and control were not significant.

Key words: *Doritis pulcherrima* Lindl.; fiber-dissolving ability; phosphate-dissolving ability; mycorrhizal fungus