

# 连瓣兰组织培养及菌根化研究

段雪甜<sup>1,2</sup>, 陈雨薇<sup>1,2</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>2</sup>, 伍建榕<sup>1,2</sup>

(1. 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, 云南 昆明 650224;

2. 西南林业大学 林学院, 云南省高校森林灾害预警控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘要:**以野生连瓣兰和组培连瓣兰为试材,采用内生真菌分离鉴定、内生真菌与连瓣兰组培苗的共生培养以及制作石蜡切片对其菌根结构进行观察等方法,研究菌根真菌对连瓣兰生长的影响,并找出适合连瓣兰生长的菌根真菌。结果表明:从保山野外采集的12株连瓣兰中分离得到的10个菌株中,有3株适合与组培苗进行共生培养,分别是丝核菌属(*Rhizoctonia* sp.)、毛壳菌属(*Chaetomium* sp.)、镰刀菌属(*Fusarium* sp.),其中丝核菌效果最佳,对无菌组培苗生长有良好的促进作用并在无菌组培苗根部形成菌丝结。

**关键词:**连瓣兰;组织培养;菌根真菌;共生培养;菌根化

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0111-03

兰科(Orchidaceae)植物俗称兰花,全世界约有700属20000多种及大量变种,主要分布于热带、亚热带和

温带地区,尤其南美洲和亚洲的热带地区为多<sup>[1]</sup>。连瓣兰(*Cymbidium lianpan*)属兰科兰属(*Cymbidium*),是中国兰花中栽培历史最为悠久、人们最为喜欢的种类之一,但它也是繁殖最为困难的种之一。再加上长期无节制的乱采滥挖,野生资源已枯竭,现在不仅已列入国家的珍惜濒危植物加以保护而且还收载于国际贸易公约(CITES)附录二中,受到国际保护<sup>[2]</sup>。采用组织培养技术进行规模化生产可获得大量优质种苗,对其繁殖有一定的参考价值。现阶段我国兰花组织培养技术已日趋成熟,但组培苗移栽时成活率低、生长缓慢,很难大面积推广,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<sup>[3]</sup>。

在自然条件下,内生菌根的形成对兰花来说是必不

**第一作者简介:**段雪甜(1992-),女,云南保山人,硕士研究生,研究方向为资源微生物学。E-mail:864230585@qq.com.

**责任作者:**伍建榕(1963-),女,福建清流人,博士,教授,现主要从事森林病理学和资源微生物利用等研究工作。E-mail:wujianrong63@aliyun.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31360198、31260175);云南省教育厅科学研究基金资助项目(2013Y123);云南省高校干热河谷植被恢复创新团队资助项目;云南省重点学科森林保护学资助项目(XKZ200905);云南省高等学校森林病虫害综合治理教学团队资助项目(20126005)。

**收稿日期:**2015-05-28

## Effect of pH Stress on Physiological Responses of Three Tissue Culture Seedlings in Blueberry

LI Xinyi, LI Jiahao, HAN Zhanjiang

(College of Plant Science, Tarim University, Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar, Xinjiang 843300)

**Abstract:** The respiration rate, MDA content, CAT activity changes of 'Bluecrop' (*Vaccinium corymbosum*), 'Northland' (*Vaccinium corymbosum* × *Vaccinium chamaebuxus*) and 'Gardenblue' (*Vaccinium ashei*) were investigated after growing for 70 days with pH stress from 5 to 9 by the plant tissue culture technique. The results showed that respiration rate and CAT activity of three blueberries reduced with pH value increasing while MDA content increased. The comprehensive evaluation results showed that 'Bluecrop' belonged to the most alkaline resistant variety, 'Northland' belonged to more alkaline resistant variety and 'Gardenblue' belonged to alkaline sensitive variety.

**Keywords:** blueberry; plant tissue culture; pH stress; physiological response

可少的。除非兰花得到外界有机碳源及维生素供应,否则如果没有真菌侵入,兰花就不能生长<sup>[4]</sup>。因此,连瓣兰菌根真菌的研究对连瓣兰产业化发展有关键性作用。但从野生连瓣兰中分离得到的内生菌是否与组织培养的无菌苗共生并有助其生长,还有待研究。魏勤等<sup>[5]</sup>曾将获得的兰花内生菌回接于蝴蝶兰组培移栽苗上,观察接种后蝴蝶兰组培移栽苗的生长情况,筛选出了对蝴蝶兰组培移栽苗有较强的促进生长作用的内生菌。这一试验结果表明组织培养的兰花无菌苗人工栽培已有路可循,但内生菌是否与兰花幼苗根共生还有待验证,现从野生连瓣兰中分离得到内生菌回接至组织培养的连瓣兰无菌苗,并进行石蜡切片对接后的连瓣兰无菌苗进行显微结构观察,旨在确认菌根真菌能与春兰共生并形成菌丝结,找到对连瓣兰生长有促进作用的菌根真菌,提高组织培养无菌连瓣兰苗移栽成活率。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

菌种来源:取野生连瓣兰的新鲜营养根作为分离材料,取较老的根部方可分离出菌根真菌。

PDA 培养基:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,水 1 000 mL。

无菌水:蒸馏水灭菌后置于冰箱中保存备用;表面消毒剂:75%酒精和 0.1%升汞。试验所用仪器主要有烧杯,锥形瓶,玻璃棒,培养皿,滤纸,酒精灯,镊子,解剖刀,解剖剪,口罩,电热恒温培养箱,立式压力蒸汽灭菌锅,超净工作台以及微波炉等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配置 将马铃薯去皮洗净后切成小块,加水 1 000 mL 煮沸 0.5 h,用纱布过滤取滤液,于滤液中加入称量好的葡萄糖、琼脂,加热使琼脂溶解,定容至 1 000 mL。分装到洗净晾干的三角瓶中,用封口膜及报纸包扎瓶口。

1.2.2 灭菌 将装有 PDA 培养基的三角瓶及所需培养皿放入高压灭菌锅,121℃,0.1 MPa 条件下灭菌 20 min,取出后在紫外灯灭菌过的超净工作台中将培养基倒到灭菌过的培养皿中,冷却备用<sup>[6]</sup>。

1.2.3 内生真菌的分离与培养 将试验所需的解剖刀、镊子和蒸馏水等放入高压灭菌锅,在 121℃,0.1 MPa 条件下灭菌 20 min,取出后与 75%酒精、0.1%升汞溶液、PDA 平板等放在超净工作台,紫外灯灭菌 20 min。分别取健康野生兰花植株菌根,用自来水冲洗干净,晾干水分,转到无菌超净台上进行下一步处理,自根尖取兰花新鲜营养根数条,用蒸馏水洗净,滤纸吸干水分,选取须根进行消毒,在超净工作台用 75%酒精和 0.1%的升汞溶液消毒,消毒时间根据须根的直径大小确定,其中酒精消毒时间为 30 s,升汞溶液消毒 3~7 min。最后 1 次

洗液备用,用以对照灭菌程度高低。用解剖刀在培养皿中将已灭菌的根切成 2~3 mm 的小段,用镊子将根段置于 PDA 培养基上,每皿 5 个,分布均匀,切口接触培养基放置,后放入 28℃恒温培养箱培养<sup>[7-8]</sup>。待培养基中的菌根长出明显菌丝体时,根据不同的菌落形态,在无菌条件下,使用接种环挑取少许菌丝移接到 PDA 平板中,后放入 28℃恒温培养箱培养。如此重复一次或几次纯化,可获得菌株的纯菌落。观察其平板菌落特征并记录,待菌株生长成熟,挑取菌丝体及孢子,观察形态并记录。从上所述所分离出来的 10 个菌株中筛选出的 3 个菌株(J1、J2 和 J3)进行回接试验。经形态学鉴定和分子鉴定得 J1 为镰刀菌、J2 为丝核菌、J3 为球毛壳菌。

1.2.4 内生真菌与连瓣兰无菌组培苗共生 供试菌株为从野生连瓣兰根部分离的 10 种内生菌中筛选出 3 个菌株(J1、J2 和 J3),无菌连瓣兰组培苗为实验室组培产生。将 3 个菌株分别接种到灭过菌的壳斗科麻栎叶上,在 25℃恒温培养直至菌丝长满叶片作为接种剂待用<sup>[9]</sup>。将组培苗移栽至土壤中,将长满内生菌的栎叶接种至兰花苗。距兰花幼苗根部 5 cm 处,每种菌接 5 盆,设置对照观察其生长状况(其中包括无菌栎叶和空白对照)。找出有益于兰花生长的菌。60 d 后取出幼苗,测其高度及鲜重。

1.2.5 石蜡切片制作 常规的石蜡切片制作。

1.2.6 处理苗菌根的结构 见图 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生真菌与连瓣兰无菌组培苗共生结果

接菌 60 d 后,对其生物量进行测定,无菌苗的高度和鲜重均有增加,并有新根长出(表 1,图 1)。J1、J2 和 J3 菌株处理苗的平均鲜重增长量比对照多出 3.7%、16.8%、2.2%。

表 1 供试无菌兰花苗 60 d 生长状况

菌株编号	植株在接菌 60 d 后生长状况
J1	部分菌株生长良好,长势弱
J2	菌株生长良好,叶片浓绿,部分苗长出新叶,有新根长出
J3	长势较弱,无新根长出,无明显增重
CK	部分菌株死亡,干枯,无新根长出

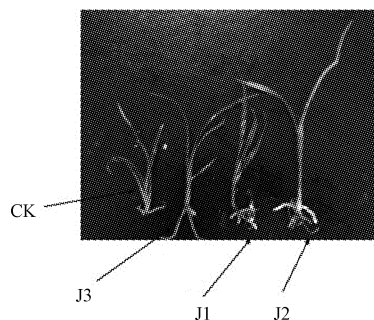


图 1 供试无菌兰花苗 60 d 生长状况

## 2.2 处理苗菌根的结构

将 J2 处理后的无菌苗根制作石蜡切片,观察到菌根的结构与一般营养根基本结构相同,从外到内依次为根被、皮层(外皮层、中皮层和内皮层)及中柱 3 层结构。并在皮层细胞中有明显的菌丝结等结构(图 2),而对照的根并没有菌丝结(图 3)。

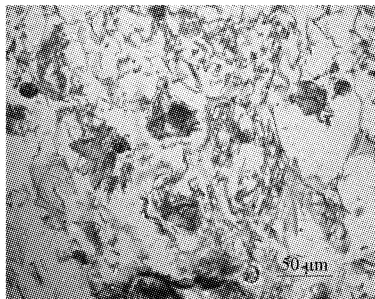


图 2 共生后无菌苗兰花根菌丝结

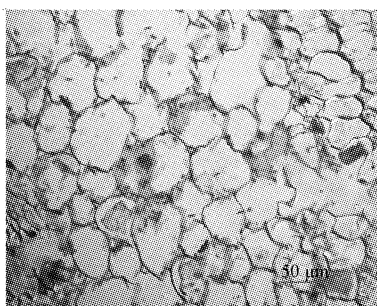


图 3 对照组兰花根

## 3 讨论

连瓣兰无菌组培苗与 J1、J2、J3 菌株共生后,生物量有了明显的增长,通过石蜡切片也可看到菌丝结的存在,由此可得到已形成的菌根。

目前,兰花的大规模繁殖主要依靠组织培养技术实现,但移植后的组培苗成活率较低,生长发育缓慢,这都是由于缺乏适合优良的菌根真菌为其提供营养,故筛选优良共生菌株,将对兰花规模化生产起到极大作用。

### 参考文献

- [1] 段春芳,李技林,方飞,等. 云南几种兰花菌根真菌的分离鉴定[J]. 西南农业学报,2010,23(3):8210.
- [2] 王莲辉,姜运力,杨春华,等. 连瓣兰组织培养与快速繁殖[J]. 贵州省林业科学研究院,2007,89(4):66-78.
- [3] 郭顺星,徐锦堂. 真菌在兰科植物种子萌发生长中的作用及相互关系[J]. 作物学通报,1990,7(1):13-17.
- [4] 李明. 兰科菌根的特点及其菌根真菌在兰花培育中的应用[J]. 云南师范大学学报,2001,21(4):68-71.
- [5] 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[J]. 云南大学学报,1998(20):513-515.
- [6] VENDRAME W A, CARVALHO V S, DIAS J M M. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds[J]. Scientia Horticulturae,2007,114(3):188-193.
- [7] 伍建榕. 云南濒危野生兰花与菌根真菌的相互关系研究[D]. 南京:南京林业大学,2005:79-88.
- [8] GUO S X, FAN L, CAO W Q, et al. *Mycena dendrobii*, a new mycorrhizal fungus[J]. Mycosy Stema,1999,18(2):141-144.
- [9] 伍建榕,韩素芬,朱有勇,等. 云南兰科植物菌根内生真菌种类研究[J]. 西南林学院学报,2006(3):5-10.

## Study on Tissue Culture and Mycorrhizal Fungi of *Cymbidium lianpan*

DUAN Xuetian<sup>1</sup>, CHEN Yuwei<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>2</sup>, LI Tingting<sup>1</sup>, WU Jianrong<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of State Forestry Administration for Biodiversity Conservation in Southwest China, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Higher Education Institutions, College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract:** Using wild *Cymbidium lianpan* and *Cymbidium* seed as test materials, using the method of isolating and identifying endophytic fungus, examining the interaction between aseptic seedlings and endophytic fungus in *Cymbidium lianpan* and making paraffin section of the mycorrhizal structure observation, to study the effect of mycorrhiza fungi on cymbidium lianpan growth, and find out the suitable mycorrhizal fungi for growth of *Cymbidium*. The results showed that from Baoshan field collection 12 cymbidium lianpan of 10 strains of isolated *Cymbidium*, there were three suits with the somaclone symbiotic cultivation, respectively was *Rhizoctonia* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., among them, the effect of *Rhizoctonia* sp. was the best, had a good role in promoting growth of sterile somaclone hypha and sterile somaclone in the root formation.

**Keywords:** *Cymbidium lianpan*; tissue culture; mycorrhizal fungi; symbiosis; mycorrhizal