

# 五唇兰菌根化育苗技术

柯海丽<sup>1</sup>, 宋希强<sup>1,2\*</sup>, 罗毅波<sup>2</sup>, 朱国鹏<sup>1</sup>, 凌绪柏<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>海南大学园艺园林学院, 海南儋州 571737; <sup>2</sup>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; <sup>3</sup>海南博大兰花科技有限公司, 海口 571101)

**摘 要:** 为探索菌根技术在兰科植物保育中的应用, 以野生五唇兰的内生菌根真菌和五唇兰组培苗为材料, 进行组培瓶苗和盆栽苗的菌根化研究。利用固体培养的菌丝体与五唇兰无菌组培苗进行共生培养, 15 d后, 根染色法检测结果表明, 真菌能够成功侵染根, 菌根化苗的移栽成活率均达到 100% (对照为 63.33%)。种植 90 d后各菌株处理苗的鲜样质量增长率均高于对照, 其中 F29菌株处理苗的鲜样质量增长率高于对照 31.3%。在大棚栽培条件下, 利用液体菌剂对盆栽苗进行菌根化培养。90 d后各菌株处理苗的成活率和鲜样质量增长率均高于对照, 其中 F29菌株处理成活率比对照高出 35%, 鲜样质量增长率比对照高 33.24%。

**关键词:** 兰花; 五唇兰; 内生菌根真菌; 育苗

**中图分类号:** S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 04-0571-06

## Seedling Cultivation of *Doritis pulcherrima* Lindl. with Mycorrhizal Fungi

KE Hai-li<sup>1</sup>, SONG Xi-qiang<sup>1,2\*</sup>, LUO Yi-bo<sup>2</sup>, ZHU Guo-peng<sup>1</sup>, and LING Xu-bo<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; <sup>2</sup>State Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>3</sup>Boda Orchid Technology Company Ltd., Haikou 571101, China)

**Abstract:** It aims at the application of mycorrhization technique in the orchid conservation. The endogenous fungi from the root of the wild plant of *Doritis pulcherrima* Lindl. were inoculated with seedlings of *D. pulcherrima* in flask and in pot. Firstly, the symbiotic cultivation of aseptic seedlings with the mycelium of solid culture was carried out in flask. According to the method of root coloration, the result showed that the fungi can successfully infect the root of *D. pulcherrima* seedling after 15 d, with 100% survival rate, while that of the control without mycorrhizal fungi was 63.33%. After 90 d, the fresh mass of these seedlings treated with fungi were all higher than the control, especially as for the treatment with fungi F29, there were even 31.3% higher than the control. Secondly, seedlings were also cultivated with the liquid strain in pot. After 90 d, both the survival rate and the fresh biomass of the mycorrhization seedlings were higher than those of the control. For the mycorrhization seedlings with F29, they have 35% survival rate and 33.24% fresh mass higher than those of the control, respectively. The results suggested that there was remarkable or significant difference between the inoculated plants and the control.

**Key words:** orchid; *Doritis pulcherrima* Lindl.; endomycorrhizal fungi; seedling cultivation

菌根化育苗技术已广泛应用于造林工程中, 世界上许多发达国家已将其作为营造速生丰产林不可缺少的生物措施。菌根化育苗不仅可促进苗木的早期生长, 而且可提高苗木质量 (蒋家淡 等,

收稿日期: 2007 - 12 - 17; 修回日期: 2008 - 02 - 22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30660153); 华南热带农业大学院校科技基金项目 (Rndy 0605; Rnd 0612)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: song.xiong@163.com)

致谢: 本研究野外调查工作得到霸王岭国家级自然保护区王文毅、杨世彬、陈庆和王进强等同志的大力协助, 谨表诚挚谢意。

2001; 仲崇禄 等, 2002)。

兰科植物是典型的菌根植物, 在长期的进化过程中已形成依赖菌根成活和生长的特性 (Ramsay & Dixon, 2003)。许多兰花特别是腐生兰对菌根已产生绝对的依赖性, 在自然条件下没有菌根就生长不良, 甚至死亡 (Hadley, 1982; 徐锦堂和郭顺星, 1989)。所有的兰花种子在自然条件下都需要与真菌共生才能萌发, 形成菌根是它们在自然条件下成活和生长的前提 (Benzing & Friedman, 1981; Arditto et al, 1990)。已有的研究表明, 共生真菌有助于提高幼苗移栽后的成活率 (Zettler et al, 2005) 和生长速度 (Ramsay & Dixon, 2003), 增加植株对逆境的抵抗能力, 维持较低的发病率, 增加花的数量和提高花的品质等 (Chang & Chou, 2001)。

自 1924 年美国植物学家 Knudson 利用人工添加营养物质的方法代替共生真菌, 成功实现了兰花种子的室内无菌播种以来, 组织培养技术已成为兰花产业种苗生产的一种常规方法 (Alam et al, 2002)。但是该技术应用于兰科植物的栽培仍有许多问题亟待解决: (1) 组培苗移栽成活率低, 人们虽然已成功培育出多种野生兰科植物组培苗, 但极低的试管苗移栽成活率成为规模化繁育的主要限制因子。(2) 幼苗生长缓慢, 如国兰 *Cymbidium* 组培苗移栽在大田栽培时出现幼苗生长停滞, 需经历一段较长时间的“墩苗期”才能恢复。(3) 组培苗抗逆性差, 易遭受病虫害。因此, 如何提高组培苗移栽成活率和植株的抗病性, 减少化肥农药的施用, 降低生产成本成为兰科植物生产者急切关注的问题。

本研究中从野生五唇兰分离获得一批菌种 (柯海丽 等, 2007a), 同时以野生五唇兰种子为外植体获得了一批组培苗 (柯海丽 等, 2007b)。在组培瓶内培养和盆栽条件下, 用筛选出来的内生真菌对五唇兰进行接种, 从真菌的处理、菌根染色、真菌的重分离、五唇兰植株生物量的增长等方面研究菌根化育苗技术, 以建立一套五唇兰菌根化育苗技术体系, 为五唇兰的资源保存奠定基础, 同时也为其它兰科植物的菌根化育苗, 快速繁殖和保存提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试植株: 瓶内接菌植株为具有 4~5 片叶, 3~4 条根, 生长较为一致的五唇兰无菌播种苗。盆栽接菌植株为移栽 7 d 后的盆栽组培苗。

供试菌种: 菌株分离自野生五唇兰根部, 编号为 F23、F29、F33、F58、F80, 分别经固体培养和液体发酵。固体培养从菌落边缘打取直径为 0.5 cm 的菌饼作为接种材料, 液体培养的菌种将菌丝体和发酵液打碎制成液体菌剂。

### 1.2 培养基及栽培基质

共生培养基为 DE 培养基 (Dijk & Eck, 1995), 共生栽培基质为苔藓 (121 灭菌 2 h)。

### 1.3 组培苗的瓶内菌根化

取直径为 0.5 cm 的菌饼接种于共生培养基上, 菌种活化 7 d 后接种五唇兰无菌苗, 每瓶接种 10 株苗, 每个处理重复 3 次。

15 d 后利用菌根染色法进行组培苗菌根化的快速检测。检测菌根化成功后, 将苗移栽到穴盘中, 用经 121 高压灭菌 2 h 的新鲜苔藓进行种植。移栽前对每株小苗进行编号并称其鲜样质量 (a)。90 d 后统计苗的移栽成活率并称取苗的鲜样质量 (b), 计算苗的鲜样质量增长率 (%):  $(b - a) / a \times 100$ 。

从每个处理的植株和对照植株中随机抽取 5 株苗进行真菌的重分离。

### 1.4 盆栽苗菌根化培养

对供试组培苗进行编号并称取其鲜样质量, 以无菌的苔藓为栽培基质, 将苗种于 5 cm 小盆中,

每盆种植 1 株幼苗。培养 7 d 后在苗的根部喷施 5 mL 菌液（菌液共施 3 次，每隔 15 d 喷洒 1 次），以喷洒无菌水作对照。每个处理重复 20 盆。培养 90 d 后统计鲜样质量增长率。从每个处理植株和对照植株中随机抽取 5 株苗进行真菌的重分离。

### 1.5 幼苗菌根化检测

菌根染色法：将对照和不同处理的根分别放入 10% KOH 中，121 脱色 20 min，无菌水冲洗 3 次，用苯胺蓝 90 条件下染色 4 h，在碱性条件下用  $H_2O_2$  脱色 8 min。脱水后根段中尚有蓝色的即为菌根（Batty et al, 2001）。

真菌的重分离：取其新生根在严格的表面消毒程序下，采用根段法对内生菌根真菌进行分离（柯海丽等，2007a）。

### 1.6 数据处理

采用 DPS7.55 统计软件比较不同处理对五唇兰组培苗鲜样质量增长率（%）的影响，并进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 真菌的侵染及染菌根段的快速检测

真菌与五唇兰无菌播种苗共培养 15 d 后，可见菌丝缠绕于五唇兰的根上，但并未往上蔓延侵染植株的叶片（图 1）。

菌根染色结果显示 5 种处理植株的根均被染上颜色，说明真菌已侵入根，对照的根并无蓝色（图 2）。

采用固体菌丝和组培苗进行瓶内菌根化育苗，真菌能够获得很好的生长，接种组培苗后对无菌苗的根部侵染性强，组培苗菌根化的成功率高。

### 2.2 菌根化苗的移栽

将菌根化苗（图 3）移栽到穴盘中，用经过 121 高压灭菌 2 h 的苔藓进行种植。90 d 后，各处理苗的成活率均达到 100%，高于对照 36.67%（表 1）。瓶内菌根化苗有助于提高五唇兰组培苗的抗性，大大提高了组培苗的移栽成活率。

各处理苗的平均鲜样质量增长率均不同程度的高于对照，F29、F23、F58、F33、F80 的鲜样质量增长率分别高于对照 31.3、6.62、4.92、4.3 和 3.78 个百分点，其中 F29 与 F23 菌株处理苗的鲜样质量增长率极显著高于对照，F58 菌株处理苗的鲜样质量增长率显著高于对照（表 1）。

90 d 后，对五唇兰移栽苗的根进行内生真菌的重分离，在各处理苗的根中均分离到了原接种菌株，而对照苗的根受外界环境的感染，在其根内分离到了 Fx（镰刀菌，表 1）。

表 1 组培瓶苗的菌根化培养

Table 1 Mycorrhization of seedling of <i>D. pulcherrima</i> in vitro						
处理 Treatment	处理植株数 Number of treated plant	真菌检测 Fungi detection	成活株数 Number of live plant	成活率 / % Survival rate	存活植株平均鲜样质量增长率 / % Average increment of fresh mass	真菌重分离 Reisolated
F23	30	+	30	100	44.307**	F23
F29	30	+	30	100	68.995**	F29
F33	30	+	30	100	41.993	F33
F58	30	+	30	100	42.612*	F58
F80	30	+	30	100	41.476	F80
对照 Control	30	-	19	63.33	37.692	Fx

注：“+”真菌侵染成功，“-”未检测到真菌；“\*”差异显著（ $P=0.05$ ），“\*\*”差异极显著（ $P=0.01$ ）。

Note: “+” Success fungal infection, “-” No fungi; “\*” Significant difference ( $P=0.05$ ), “\*\*” Remarkably significant difference ( $P=0.01$ ).



图 1 瓶内菌根化育苗  
Fig. 1 Mycorrhizal seedling



图 2 菌根真菌检测  
Fig. 2 Inspect of the mycorrhizal fungi



图 3 瓶内菌根化苗  
Fig. 3 Cultivation of mycorrhization plant of *D. pulcherrima* in vitro



图 4 盆栽菌根化育苗  
Fig. 4 Cultivation of mycorrhization plant of *D. pulcherrima* in pot

可见菌根化苗不但促进了植株的生长，而且受环境中的杂菌侵染的可能性小，有利于抵御病原菌的入侵。

### 2.3 盆栽苗菌根化培养

五唇兰盆栽苗培养 90 d后，菌液处理苗明显表现出旺盛的生长势，叶宽而翠绿，苗生长迅速且健壮。F29菌株处理的苗根系发达，有大量的新根产生。各菌液处理的苗均不同程度的提高了苗的成活率，F29、F80、F23、F58、F33处理苗的成活率分别为 100%、95%、85%、75%、75%，比对照分别高出 35、30、20、10和 10个百分点。

造成盆栽苗的处理植株中出现部分植株死亡的原因，可能是菌根化未获得成功，或由于菌液中含菌量的不均匀，造成菌剂量过大，使共生关系失去平衡。

各菌液处理 90 d后苗平均鲜种增长率均高于对照，F29、F80、F23、F58、F33处理苗分别比对照高出 33.244、21.442、14.847、3.076和 1.849个百分点，其中 F29、F80、F23、F58与对照差异达到了极显著，F33菌株处理的苗也显著高于对照（表 2，图 4）。

接菌苗新生营养根中均分离获得了原接种菌株（表 2），在 F33和对照处理苗中均分离到镰刀菌（F<sub>x</sub>），推测可能原因是早期浇灌的 F33菌液并未在苔藓上存活，而来自环境中的 F<sub>x</sub>侵染成功；或菌株 F33与菌株 F<sub>x</sub>能够很好的共生于五唇兰根部中。

表 2 盆栽菌根化苗栽培情况

Table 2 Culture of the mycorrhizal plant of *Doritis pulcherrima* with pot

处理 Treatment	处理植株数 Number of treated plant	成活株数 Number of live plant	成活率 / % Survival rate	平均鲜样质量增长率 / % Average increment of fresh mass	菌株重分离 Reisolated
F23	20	19	95	52.952 **	F23
F29	20	20	100	71.349 **	F29
F33	20	15	75	39.954 *	F33, F <sub>x</sub>
F58	20	15	75	41.181 **	F58
F80	20	17	85	59.547 **	F80
对照 Control	20	13	65	38.105	F <sub>x</sub> , F <sub>y</sub>

注：“\*”差异显著（ $P=0.05$ ），“\*\*”差异极显著（ $P=0.01$ ）。

Note：“\*” Significant difference（ $P=0.05$ ），“\*\*” Remarkably significant difference（ $P=0.01$ ）。

## 3 讨论

兰科菌根真菌为内生菌根类型，菌根化育苗首先要解决的就是兰苗菌根化的检测。在瓶内菌根化育苗时，由于接种的菌株单一，采用菌根染色法可以快速检测菌根化的成功与否。移栽后的菌根化苗和盆栽菌根化苗的检测则采用真菌的重分离，既可观察到接种的菌根真菌的存活状况又可检测菌根化苗的抗性。试验证明接种的菌根真菌可以在移栽苗的根中很好的生存，而且菌根化苗可以减少其它菌种的侵染。

一直以来兰苗的种植受环境因素的影响很大，特别是组培苗的培育。目前兰花的组培苗在育苗棚里经过精心的管理其成活率虽然可达到 80%~90%，但仍需经过几个月的炼苗才能稳定的成长并转为常规的栽培管理，从炼苗到出棚所需的设备、材料、时间都大大增加了组培苗的成本。本试验的菌根化苗在较为粗放的环境下，未经肥料、农药的管理，其成活率最高可达 100%，且鲜样质量增长率均高于同等条件下的无菌苗。可见菌根真菌在兰花育苗中的应用具有广阔的前景，不仅可为兰花工厂的育苗节约成本，而且有望降低兰苗种植受环境因素的限制。

## References

- Alam M K, Rashid M H, Hossain M S, Salam M A, Rouf M A. 2002. *In vitro* seed propagation of *Dendrobium* (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media. *Biotechnology*, 1: 111 - 115.
- Arditti J, Emst R, Wing Yam T. 1990. The contribution of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: A speculative review. *Lindleyana*, 5 (4): 249 - 255.
- Batty A L, Dixon K W, Brundrett M C, Sivasithamparan K. 2001. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. *New Phytologist*, 511 - 520.
- Benzing D H, Friedman W E. 1981. Mycotrophy: Its occurrence and possible significance among epiphytic Orchidaceae. *Selbyana*, 5: 243 - 247.
- Chang C N, Chou L C. 2001. Seed germination of *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* and the use of mycorrhizae. *Symbiosis*, 30: 29 - 40.
- Dijk E, Eck N D. 1995. Effects of mycorrhizal fungi on *in vitro* nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species. *Canada Journal Botany*, 73: 1203 - 1211.
- Hadley G. 1982. Orchid Mycorrhiza // Arditti J. In orchid biology review and perspective. Vol 2. Ithaca New York: Cornell University Press: 85 - 100.
- Jiang Jia-dan, Lin Yan-sheng, Zhan Zheng-yi, Bao Xiao-hong, Liu Heng-ping. 2001. The present application situation and research progress of the biological technology of mycorrhiza. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 23 (2): 216 - 219. (in Chinese)
- 蒋家淡, 林延生, 詹正宜, 鲍晓红, 刘亨平. 2001. 菌根生物技术应用现状与研究进展. *江西农业大学学报*, 23 (2): 216 - 219.
- Ke Hai-li, Song Xi-qiang, Tan Zhi-qiong, Liu Hong-xia, Luo Yi-bo. 2007a. Diversity of endophytic fungi in root of *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae). *Biodiversity Science*, 15 (5): 456 - 462. (in Chinese)
- 柯海丽, 宋希强, 谭志琼, 刘红霞, 罗毅波. 2007a. 野生五唇兰根部内生真菌多样性研究. *生物多样性*, 15 (5): 456 - 462.
- Ke Hai-li, Tan Zhi-qiong, Song Xi-qiang. 2007b. Asymbiotic germination and micropropagation of *Doritis pulcherrima* Lindl. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 15 (Supplement): 91 - 94. (in Chinese)
- 柯海丽, 谭志琼, 宋希强. 2007b. 五唇兰非共生萌发与微繁殖技术研究. *农业生物技术学报*, 15 (增刊): 91 - 94.
- Ramsay M M, Dixon K W. 2003. Opagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids // Dixon K W, Kell S P, Barrett R L, Cribb P J. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu Sabah: Natural History Publications (Borneo): 259 - 288.
- Xu Jin-tang, Guo Shun-xing. 1989. Fungus associated with nutrition of seed germination of *Gastrodia elata* - *Mycena osmundicola* Lange. *Acta Mycologica Sinica*, 8 (3): 221 - 226. (in Chinese)
- 徐锦堂, 郭顺星. 1989. 供给天麻种子萌发营养的真菌——紫萁小菇. *真菌学报*, 8 (3): 221 - 226.
- Zettler L W, Piskin K A, Stewart S L, Hartsock J J, Bowels M L, Bell T J. 2005. Probiotic mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley, and a technique to prompt leaf elongation in seedlings. *Studies in Mycology*, 53: 163 - 171.
- Zhong Chong-lu, Gong Ming-qin, Xu Da-ping, Chen Yu, Wang Feng-zhen, Chen Xia. 2002. Effectiveness of *in vitro* mycorrhizal inoculation of tissue cultured *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* in field trials. *Forest Research*, 15 (2): 190 - 196. (in Chinese)
- 仲崇禄, 弓明钦, 徐大平, 陈羽, 王凤珍, 陈霞. 2002. 巨尾桉瓶内菌根化组培苗的造林效应. *林业科学研究*, 15 (2): 190 - 196.