

黄花杓兰与菌根真菌共生关系研究*

王瑞苓, 胡虹**, 李树云

(中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 对黄花杓兰 (*Cypripedium flavum* P. F. Hunt et Summerh.) 植株的根进行了一个生长周期的采集和切片观察, 发现黄花杓兰具有相应的菌根结构, 菌丝的存在状态在各物候期有所不同, 可分为 5 个时期: (1) 4 月份联通菌丝时期; (2) 5 月份菌丝团时期 I; (3) 6、7 月份无菌丝团时期 I; (4) 8、9 月份菌丝团时期 II; (5) 10 月份无菌丝团时期 II。可以看出, 在植株生活转变期, 根细胞内出现菌丝团; 在植株完成正常的生命过程中, 真菌营养是光合营养的补充; 真菌菌丝团也作为植物营养的储存器, 菌丝团消解释放营养供给植株。在此基础上探讨了菌根真菌与黄花杓兰的共生关系的一个方面: 植株通过联通菌丝沟通各个细胞的物质交换, 菌根真菌利用植株体内物质完成生命活动, 菌丝团消解, 使真菌所储藏的营养物转化, 为植株所利用。

关键词: 黄花杓兰; 菌丝团; 真菌营养; 光合营养

中图分类号: Q 944, Q 945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253 - 2700(2004)04 - 0445 - 06

Notes on Symbiotic Relationship between *Cypripedium flavum* and Its Mycorrhizal Fungi

WANG Rui-Ling, HU Hong**, LI Shu-Yun

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: The roots of *Cypripedium flavum* P. F. Hunt et Summerh. had been sampled each month during growing season, and carried out observing actions on the endomycorrhizal formation and variation. The result shows that the growth of *C. flavum* often associated with orchid mycorrhizal fungi, which developmental varieties occur in different phenology phases. The following five periods can be divided: (1) communicate hyphae phase in April; (2) hyphal coils phase I appears in May; (3) non-hyphal coils phase I in June to July; (4) hyphal coils phase II appears in August and September; (5) non-hyphal coils phase II occurs in October. It can be perceived from above that hyphal coils arisen in cells of roots when the orchid life transits and mycotrophy is a necessary supplement of phototrophy. To *C. flavum*, the hyphal coils may be the temporary reservoirs of nutrient stored in rootstock and /or produced by photosynthesis. The nutrient is transformed by fungi and transported to plant when hyphal coils have been diggest-

* 基金项目: 国际科技合作重点项目计划资助 (2001CB711103); 国家自然科学基金 (30270151); 云南省自然科学基金 (2002C0062M)

** 通讯联系人 Author for correspondence

收稿日期: 2003 - 11 - 09, 2003 - 11 - 28 接受发表

作者简介: 王瑞苓 (1978 -) 女, 河北人, 在读硕士研究生, 主要从事真菌与植物的协同进化研究。

ed. We can explain partly the relationship between *C. flavum* and mycorrhizal fungi at this state: mycorrhizal fungi utilise the nutrient in plant cells to accomplish their life cycle; communicate bring about a transmutation of nutrients among cells of roots and plant utilize the nutrient from digested hyphal coils.

Key words: *Cypripedium flavum*; Hyphal coils; Mycotrophy; Phototrophy

菌根 (Mycorrhiza) 是植物与真菌经过长期的演化发展形成的一种特定共生结构。Harley (1989) 根据参与共生的真菌和植物种类的不同以及形成菌根的特点将菌根划为 7 种类型: 内外菌根, 外生菌根, 兰科菌根, 丛枝菌根, 浆果鹃类菌根, 水晶兰类菌根, 欧石楠类菌根。兰科菌根相对于其它类型有相当的特殊性。首先, 兰科植物的种子细小如尘埃, 成熟的种子仅具有一简单未分化的胚, 不具胚乳结构, 在自然条件下, 无法正常萌发。只有感染了合适的真菌后, 才可以萌发, 开始其正常的生长发育过程。其次, 兰科植物从萌发到形成具有正常叶绿体的幼苗大约需要几个月到半年的时间。这段时间里, 它不能进行光合作用, 靠真菌为其提供生长所需营养。最后, 在其成年植株期, 菌根真菌仍为其提供营养。目前认为菌根真菌为其提供的物质主要是碳水化合物、矿质元素、氨基酸、激素等 (Smith, 1967; Hijner & Arditti, 1973)。至今仍未确切检验到真菌在共生体中得到什么好处, 所以有人形象的称该共生关系为“反寄生” (郭秀珍和毕国昌, 1989)。

黄花杓兰 (*Cypripedium flavum* P. F. Hunt et Summerh.), 是兰科植物中一重要的高山花卉植物, 主要分布在云南西北部、西藏东南部、四川、甘肃南部和湖北西部 (房县), 海拔在 1 800 ~ 3 450 m。它的生长季节较短 (4 ~ 10 月), 鉴于高山恶劣的气候条件, 它能迅速完成生命周期, 继而休眠期间还开出相对较大的美丽的花朵。可以预见, 菌根真菌可能起了相当大的作用, 但这方面至今还未见文献报道。

我们实验室已经成功的繁育出黄花杓兰种子无菌萌发组培苗。但小苗的移栽成活率较低, 生长缓慢。另外, 野生成年植株引种到昆明, 也会出现一系列问题 (营养生长不佳, 株型叶型时有变异; 花小, 花色变淡或根本不开花)。本工作拟从对黄花杓兰的菌根切片入手, 了解菌根真菌在不同季节的存在状态, 从一定程度上反映真菌在植物各物候时期的作用, 为黄花杓兰的菌根工作打下基础, 并为其引种栽培提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料来源 云南省香格里拉县附近仙人洞高山上的黄花杓兰野生种群的成年植株的根。从 4 月份起, 在每月 10 日左右采样, 每月一次, 至 10 月 10 日植株倒苗为止, 共计一个生长周期。清水洗净, FAA 固定。

1.2 地理位置 仙人洞距中甸县城约 6 km, 东经 99°39', 北纬 27°46', 海拔 3 400 m。坡度约 75°。

1.3 气候 中甸全年平均气温 5.4℃, 极高温 25.1℃ (8 月份), 极低温 - 25.4℃ (1 月份), 5 cm 平均地温 9.1℃。霜日数 165.1 d, 霜期 9 月 30 日 ~ 5 月 27 日, 积温 1387.8 (> 10℃)。中甸年降水量 624.8 mm, 分布极为不均, 主要集中于 6 ~ 9 这 4 个月 (总量 480.6 mm), 约占总量的 77%, 但湿热基本上同步, 使植株在短期内迅速完成生命过程成为可能。

1.4 生境 黄花杓兰一般生于灌木丛中, 与它伴生的灌木主要有高山栎 (*Quercus* sp.), 山杨 (*Populus davidiana*), 柳属 (*Salix* sp.) 蔷薇属 (*Rosa* sp.), 杜鹃属 (*Rhododendron* sp.), 栒子属 (*Cotoneaster* sp.) 的植物。

将黄花杓兰的两年、三年和四年根分成上中下 3 段 (上段 2 cm, 下段 2 cm, 其余为中段), 用双面刀片进行徒手切片, OLYMPUS CX31 型显微镜下观察, JVC TK-C721EG 照相。

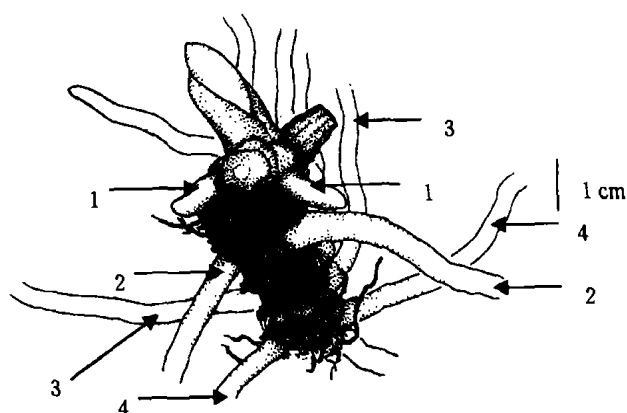


图1 黄花杓兰各根位置关系(九月份)

1. 一年根; 2. 两年根; 3. 三年根; 4. 四年根

Fig. 1 Position of various roots of *Cypripedium flavum* in September

1. the one-year root; 2. the two-year root; 3. the three-year root;

4. the four-year root

2 结果与讨论

2.1 根的形态发育

黄花杓兰在每年6月初根状茎的顶端形成2~4枚小根,称为一年根。同时在上端有去年6月份形成两枚小芽,称为充分发育的二年芽,另一枚称为未充分发育的二年芽,在十月初倒苗时一年根大约长到2~5 cm,小芽大约分化出7~9枚幼叶(翁恩生,2002)。翌年4月份一枚小芽开始萌动,另一枚休眠,上一年形成的一年根也开始生长,此时称为两年根。6月份新的一年根形成,开花,6月10日左右达到盛花期,花期大约有两周,

即而形成蒴果。果实在9月底至10月初成熟,然后地上植株死亡,完成其一年的生长周期(倒苗)。此时的两年根大约可以长到10~20 cm,也开始休眠。所以在黄花杓兰的根状茎上紧密地排列着一年根,两年根,三年根...甚至十几年的老根依然存活(图1)。只有在根状茎受到损伤或者老化处的根才会腐败死亡。数年的根匍匐蔓延,形成庞大的地下部分,这有利于它在陡峭粘滑的山坡上站稳“脚跟”,也利于水份和营养的吸收。

2.2 菌丝侵染形态

对黄花杓兰生长期中的根进行切片,发现黄花杓兰的根部存在典型的兰科菌根结构:根外无菌套,根的皮层组织内无哈蒂氏网,皮层细胞内与细胞间都存在相当数量密度的菌丝,菌丝有隔,可以形成结状或螺旋状的菌丝团。菌丝存在状态在老根与新根之间没有明显的差别;在根的上部(接地上茎2 cm左右)的密度比下部要少;根冠区没有菌丝侵染。菌丝的形态及菌丝团的存在与否在植株不同的物候期也有所不同,大致可以分为以下几个时期:

(1) 联通菌丝时期:4月份,菌丝在各个细胞之间相互联通,并使细胞内含物质凝集。(图2:1)

(2) 菌丝团时期Ⅰ:5月份在细胞内部出现结状的菌丝团。(图2:2)

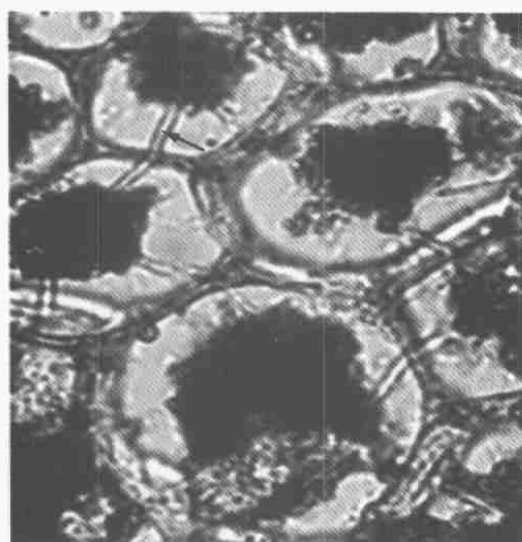
(3) 无菌丝团时期Ⅰ:6~7月份,没有出现菌丝团,也未见联通菌丝,细胞内有大量颗粒物。(图2:3)

(4) 菌丝团时期Ⅱ:8~9月份菌丝团又重新出现。(图2:4)

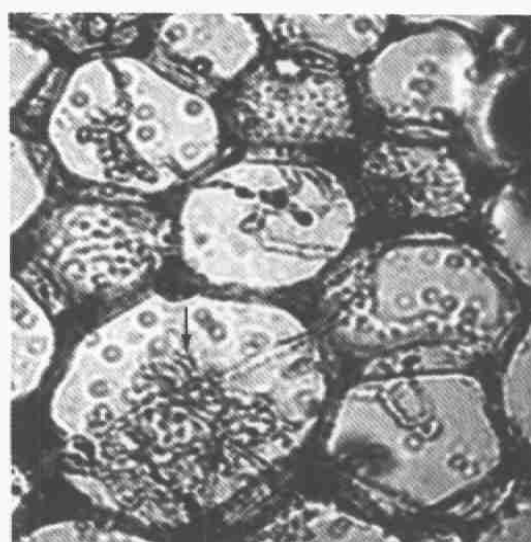
(5) 无菌丝团时期Ⅱ:10月份未见有菌丝团现象。(图2:5)

2.3 光合营养(phototrophy)及真菌营养(mycotrophy)与植株生长的关系

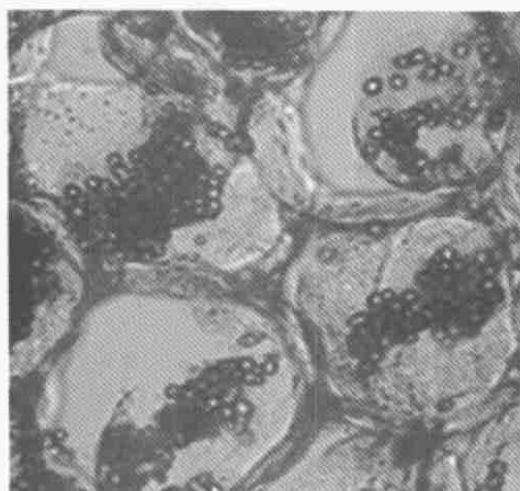
菌丝团的出现是兰科菌根的标志之一,对兰科植物的生长发育具有相当重要的意义。普遍认为,菌根真菌靠形成菌丝团,消解菌丝团,为兰科植物提供营养物质(Hadley & Williamson, 1972),这一过程被称为真菌营养(mycotrophy)。Rasmussen (2002)认为兰科植物真菌营养可以作为一部分的能量来源补充甚至代替光合营养。观察黄花杓兰菌丝团在各物候的变化,我们发现真菌营养一般在光合营养不能满足植株生长时出现。而在光合作用



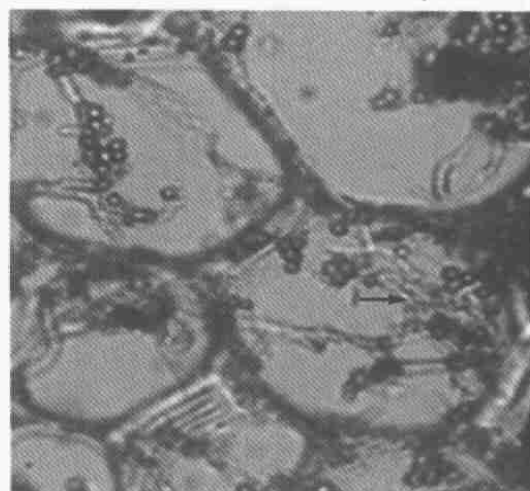
1



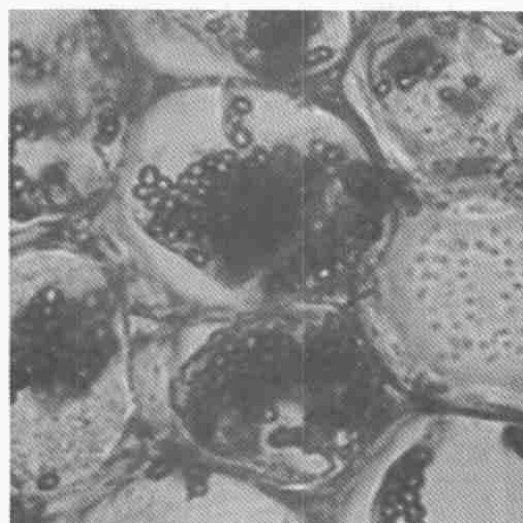
2



3



4



5

图2 菌丝存在状态

1. 联通菌丝时期 (4 月份), $\times 400$; 2. 菌丝团时期 I (5 月份), $\times 400$; 3. 无菌丝团时期 I (6~7 月份), $\times 400$; 4. 菌丝团时期 II (8~9 月份), $\times 400$; 5. 无菌丝团时期 II (10 月份), $\times 400$

Fig. 2 The formation of mycorrhizal hyphae

1. Communicate hyphae phase in April, $\times 400$; 2. hyphal coils phase I in May, $\times 400$; 3. non-hyphal coils phase I in June and July, $\times 400$; 4. hyphal coils phase II in August and September, $\times 400$; 5. non-hyphal coils phase II in October, $\times 400$

表 1 生长季中黄花杓兰生长物候、营养方式和菌丝状态

Table 1 Phenology and nutrition form of *Cypripedium flavum* and states of mycorrhizal hyphae in a growing season

月份 Month	4 月 April	5 月 May	6 月、7 月 June、July	8 月、9 月 August、september	10 月 October
植物物候 phenology	萌动 germination	展叶, 始花 opening leaves, first flower	盛花, 幼果 flower, yong capsule	果期, 叶片衰老 fruitage, leaves senesced	休眠 dormancy
菌丝状态 states of mycorrhizal hyphae	联通菌丝 communicate hyphae	菌丝团 hyphal coils formation and diggested	无 non-hyphal coils	菌丝团 hyphal coils formation and diggesting	无 non-hyphal coils
营养方式 nutrition form	利用储备物质 to utilize nutrient stored in roots	光合营养 真菌营养 phototrophy mycotrophy	光合营养 phototrophy	光合营养 真菌营养 phototrophy mycotrophy	—

旺盛, 光合产物完全可以使植株正常发育甚至有剩余时, 菌丝团并未出现。于是, 一年中, 会有两次菌丝团的出现, 也有两次无菌丝团时期。

黄花杓兰植株在 4 月份开始萌动, 此时的菌丝在各个细胞之间穿联 (图 2: 1; 图 3), 可能促进细胞之间的物质交流, 使根复苏开始生理活动。利用上一年根状茎储存物, 供给萌发所需。在 5 月份逐渐形成菌丝团 (图 2: 2; 图 4), 开始真菌营养。此时正值幼芽迅速萌发生长, 进而长成 10~35 cm 甚至更大的植株, 叶片逐渐展开, 而且形成花苞, 短期内有相当大的生长量, 急需大量的营养物, 真菌营养确实补充了一部分营养所需。6 月份为花期, 植株已经长成, 花苞开始打开, 叶片大而多, 光合营养完全可以满足植株生长。7 月份开始果期, 叶片仍然有足够的光合作用, 能提供植株的生长所需营养, 所以 6、7 月份没有菌丝团 (图 2: 3), 不需要真菌营养, 甚至光合营养产物还有所积累。8、9 月份, 植株开始逐步衰老, 果实逐渐成熟, 叶片慢慢变黄, 光合效率开始逐步衰退, 而植株仍需要大量营养, 形成一个蒴果里的数以万计的种子。所以真菌营养又出现, 为植株生长

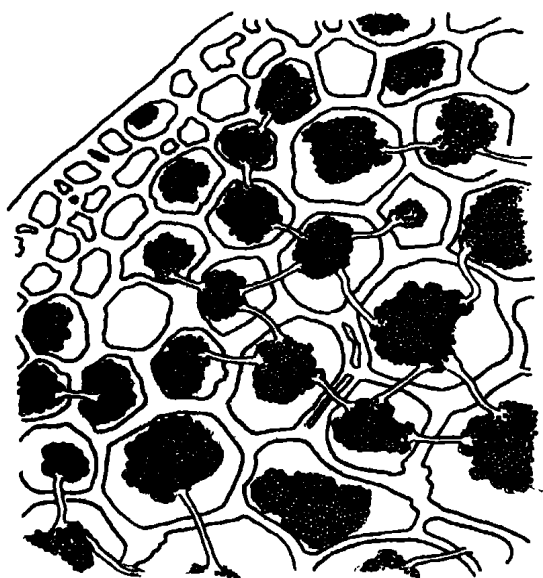


图 3 联通菌丝

Fig. 3 Communicate hyphae

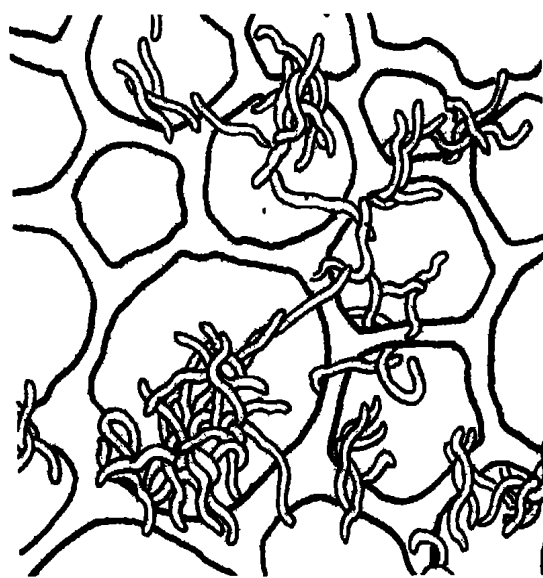


图 4 菌丝团

Fig. 4 Hyphal coils

提供一部分营养 (图 2: 4; 图 4)。10 月份为倒苗时期, 植株已经完成一个生长期的整个生命过程, 根部开始休眠, 根部的真菌也没有太大的活动, 没有看到有菌丝团 (图 2: 5)。

2.4 菌根营养与共生关系

真菌在细胞内生长, 形成大量的菌丝团, 所需的物质与能量的来源是一个关键问题。我们发现每次菌丝团出现之前, 植株都有相当大的物质能量积累。倒苗前的物质积累为翌年 5 月份菌丝团的形成提供营养, 6、7 月份强大的光合作用也积累了许多产物使 8、9 月份可以正常形成菌丝团。由此可见植株积累的营养物质被真菌利用形成菌丝团, 最后又以菌丝团消解的形式返还供给植株生长。所以对植株来讲, 真菌营养就是利用菌丝团这一营养存储器, 将植株体内的营养物质储藏起来必要时再释放出来。

在兰科植物与真菌的关系中, 许多人认为有偏利反寄生关系。但从我们的实验中可以看出菌根真菌与黄花杓兰是一个互惠互利的共生关系: 一方面, 真菌靠植株内的营养完成自身生长发育过程 (形成菌丝团, 然后消解), 这与 Harley 和 Smith (1983) 认为菌根真菌会消耗植株的一小部分光合作用产物是一致的。另一方面, 虽然在真菌营养整个过程植株的营养总量是损失了一小部分, 但真菌将原储存能量进行代谢、转化, 形成一些其他的形式的糖类、氨基酸、激素等, 通过消解返回供给植株生长。所以从这方面讲, 菌根真菌还是物质转化器。真菌还可以以联通菌丝的形式沟通各个根部细胞的物质与能量。在长期的演化中, 黄花杓兰与菌根真菌形成了一套完善的共生机制, 使真菌在植株不同的物候期, 不同的生长需要时采取不同的形式存在。

我们对黄花杓兰的菌根工作只是进行了一个前期的实验, 做了一个初步探讨性的工作, 对于菌根真菌种类的确定、反侵染工作、菌肥的制作、两者相互作用的微观机理等方面还有大量的工作要做, 这对黄花杓兰的保护与开发具有重要的意义。

致谢 本文的形成得到了李存信、臧穆、梁汉兴等先生的建议和指教, 本组同事及同学给予了无私的支持和帮助。

〔参 考 文 献〕

- 郭秀珍, 毕国昌, 1989. 林木菌根及应用技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 131—140
- Hadley G, Willason B, 1972. Feature of mycorrhiza infection in some Malayan orchids [J]. *New Phytologist*, **71**: 1111—1118
- Hanne N. Rasmussen, Dennis F. Whigham, 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy [J]. *New Phytologist*, **154**: 797—807
- Harley JH, Smith SE, 1983. Mycorrhizal Symbiosis [M]. London: Academic press, 268—295
- Harley JH, 1989. The Fourth Benefactors' Lecture: the significance of mycorrhiza [J]. *Mycol Res*, **92** (2): 129—139
- Hijner JA, Arditti J, 1973. Orchid mycorrhiza: Vitamin production and requirements by the symbionts [J]. *Amer J Bot*, **60** (8): 829—835
- Weng ES (翁恩生), Hu H (胡虹), Li SY (李树云), et al, 2002. Differentiation of flower bud of *Cypripedium flavum* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **24** (2): 222—228
- Smith SE, 1967. Carbohydrate translocation in orchid mycorrhiza [J]. *New Phytologist*, **66**: 371—378