

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201610037

引文格式: 安曼云. 云南杓兰菌根真菌组成及共生关系研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(6):763-767

AN MY. Composition of mycorrhizal fungi and symbiotic relationship of *Cypripedium yunnanense* [J]. *Guihaia*, 2017, 37(6):763-767

云南杓兰菌根真菌组成及共生关系研究

安曼云

(云南经济管理学院 工程学院, 云南 安宁 650106)

摘要: 杓兰属(*Cypripedium*)植物因具有较高的观赏和药用价值而长期被过度采集,已成为濒危植物。利用菌根技术进行杓兰属植物的保护和人工栽培,需要获得其可培养的菌根真菌。该研究采用分离培养法和共生回接方法,研究了云南杓兰菌根真菌菌群组成及其共生关系。结果表明:(1)从10株云南杓兰300块毛根组织中分离获得126株内生真菌,归属为3个菌属,分别是胶膜菌属(*Tulasnella*)73株、伏革菌属(*Corticium*)36株、角担菌属(*Ceratobasidium*)17株。其中,胶膜菌属为优势菌群,占总菌株数量的57.94%。(2)6株供试菌株中,4株菌株可显著缩短种子的萌发过程,6株菌株对幼苗的生长有显著的促进作用。(3)从中筛选获得一株CY-18高效促生真菌,对云南杓兰种子共生萌发和幼苗共生生长有极显著的促进作用。该研究结果为更好地利用菌根技术进行杓兰属植物资源的保护与可持续利用奠定了基础。

关键词: 云南杓兰, 菌根真菌, 优势菌群, 胶膜菌属

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2017)06-0763-05

Composition of mycorrhizal fungi and symbiotic relationship of *Cypripedium yunnanense*

AN Man-Yun

(*Engineering College Management, Yunnan College of Business Management, Anning 650106, Yunnan, China*)

Abstract: *Cypripedium* plants are endangered by over-harvesting due to their high ornamental and medicinal value. It is necessary to obtain the culturable mycorrhizal fungi in the application of mycorrhizal technology for the protection and artificial cultivation of *C. yunnanense*. The composition of mycorrhizal fungi and their symbiotic relationship of *C. yunnanense* were studied by culture-dependent and inoculate methods. The results showed that one hundred and twenty-six independent fungal isolates were obtained from three hundred root tissues of *C. yunnanense*. The isolates were identified to three genera: *Tulasnella* (seventy-three), *Corticium* (thirty-six) and *Ceratobasidium* (seventeen). Among them, *Tulasnella* (57.94%) were dominant genus. The mycorrhizal fungi could significantly shorten the seed germination process and promoted the seeding growth. The strain CY-18 was found to be a growth-promoting fungus. Moreover, above results simultaneously could be used as a valuable candidate sources for the protection and sustainable utilization of *C.* plants resources by mycorrhizal technology.

Key words: *Cypripedium yunnanense*, mycorrhizal fungi, dominant gunes, *Tulasnella*

云南杓兰(*Cypripedium yunnanense*)为兰科(Orchidaceae)杓兰属地生型多年生植物,主要分布在滇

西北高海拔的山坡上,其花色艳丽,极具观赏和药用价值(于永福,2004;陈丽飞等,2012)。近年来,杓

收稿日期: 2016-10-31 修回日期: 2017-02-28

基金项目: 云南省应用基础青年项目(2014FD070)[Supported by Yunnan Youth Program of Application Fundamentals (2014FD070)]。

作者简介: 安曼云(1985-),女,甘肃张掖人,硕士,讲师,主要从事植物学方面的研究,(Email)344745803@qq.com。

兰属植物的野生种群数量急剧下降,已处于濒危状态,亟待保护(赵国英等,2013)。但是,由于杓兰属植物多数自花不育导致自然结实率较低,人工繁育过程中种子无胚乳难以萌发、幼苗生长缓慢、死亡率高等问题极大地限制了杓兰的保育工作(杨颖婕,2016;郑桂灵等,2013)。如何实现杓兰属植物资源的保护与再生,已成为重要而急切的课题。

菌根是自然界中一种普遍的共生现象,所有兰科植物都与真菌共生形成兰科菌根(Orchid Mycorrhizae, OM)(盖雪鸽等,2014)。自然条件下,其种子萌发到开花结果的整个生活史对菌根真菌有绝对的依赖性(Dearmaley,2007)。兰科植物种子仅有原胚,自身贮存的营养物质有限,自然条件下萌发困难,需依靠真菌的侵染提供营养才能萌发(郑超文和肖娅萍,2014)。兰科菌根的形成是通过种子和根的侵入两条途径(周玉杰等,2009)。Harley等(1983)首次证实杓兰和真菌是互利共生的关系。Huynh et al(2009)研究发现杓兰的不同生长阶段与不同真菌类型共生。一些兰科植物在萌发期所需要的真菌多样性要比成年之后的需要更高(Bidartondo & Read,2008)。臧穆等(2004)研究发现黄花杓兰的根际和根皮层细胞内具有不同阶段的小型菌核。高倩等(2009)研究发现杓兰属植物菌根真菌的新近入侵、开始被消解、消解后的残余及消解后的物质4个阶段在杓兰的生活周期中周而复始地进行。赵欣宇等(2014)、权娇娇等(2015)和缪福俊等(2015)研究发现杓兰属植物根部存在丰富多样的真菌类型。邓莲等(2012)通过培养基优化及添加激素能使大花杓兰种子获得无菌萌发。黄家林和胡虹(2002)也通过培养基、激素和种子预处理后使黄花杓兰的种子无菌萌发。杓兰属植物与真菌存在较强的互作规律,菌根系统中存在多种内生真菌类型,其种子都能实现无菌萌发,但萌发进程相当缓慢,对于杓兰属植物种子和幼苗的无菌和不同真菌类型共生的效果对比方面研究的报道较少。本研究通过对云南杓兰不同内生真菌菌群、野外授粉、种子采集及活力检测、种子共生萌发、幼苗共生等进行系统研究,首次分析云南杓兰种子共生萌发和无菌萌发的进程阶段,掌握野生云南杓兰不同内生真菌类型对种子和幼苗的共生促进效果,旨在为深入研究杓兰与内生真菌的共生关系提供可利用的菌种资源,为杓兰属植物的保育提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 采样地概况及样品采集

采样地位于云南省香格里拉县纳帕村(99°37'56" N,27°51'34" E,海拔3 303 m)。云南杓兰生于林缘,样地中分布数量每100 m²为23株,为腐殖质土壤生境。云南杓兰毛根采集:2015年6月20日随机选取30株,每株根分布的不同方向选取10个毛根段(3~5 cm),放入冰盒;云南杓兰种子采集:2015年10月25日采集蒴果,经表面灭菌后用脱脂棉将其密封在无菌的小瓶中。将样品带回实验室置于4℃冰箱保存。

1.2 云南杓兰菌根真菌分离与纯化

采用组织块分离方法,以马铃薯葡萄糖(PDA)培养基进行真菌的分离与纯化。PDA培养基的配方及制作:马铃薯200 g,洗净后去皮切成小块,开水煮30 min,纱布过滤后取滤液加入葡萄糖20 g,琼脂15 g,加热至完全溶解,蒸馏水定容1 L,121℃灭菌20 min。

将云南杓兰毛根段切成1 cm的小段后进行消毒(70%酒精浸泡30 s,再用2%次氯酸钠浸泡消毒3~5 min,无菌水冲洗3~5次)。用无菌滤纸吸干水分后切成5 mm小块,接种含有硫酸链霉素(50 mg·L⁻¹)的PDA培养基中。每皿9块,重复3次。并对分离的真菌进行DNA提取和ITS扩增测序,将测序结果进行Blast比对分析,对真菌进行初步的分类。

$$\text{分离频率}(\%) = a/b \times 100$$

式中, a 为分离到的某一指定类型真菌的菌株数量, b 为分离的真菌菌株数量。

$$\text{分离率}(\%) = a/b \times 100$$

式中, a 为分离到的某一指定类型真菌的菌株数量, b 为分离样品组织块总数。

1.3 云南杓兰种子活性检测

采用TTC(Triphenyl tetrazolium chloride)染色法检测云南杓兰种子活性,在显微镜下统计有胚种子数目和染色数目,染成红色或浅红色代表有活力的种子。

$$\text{种子胚活力}\% = \text{有活力种子数} / \text{有胚种子数} \times 100\%$$

1.4 云南杓兰种子萌发试验

无菌萌发试验:将云南杓兰种子溶于无菌水中制备成悬浮液,取等量的种子悬浮液(200 μL)均匀地散布在改良过的Harvais培养基(去除NH₄NO₃,

表 1 云南杓兰菌根真菌菌群组成

Tabal 1 Composition of mycorrhizal fungi isolated from roots of *C. yunnanense*

| 属名 Genus name | 分离菌株数 Strain numbers (Plant) | 分离率 Isolation rate (%) | 分离频率 Isolation frequency (%) | GenBank 中比对菌名 及登录号 Nearest strain and access code | 相似性 Identity (%) |
|----------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|--|------------------------|
| 胶膜菌属 <i>Tulasnella</i> | 73 | 24.33 | 57.94 | <i>Tulpoasnella calosra</i> AY643804.3 | 99 |
| 伏革菌属 <i>Corticium</i> | 36 | 12.00 | 28.57 | <i>Corticium salmonicolor</i> EU435011.1 | 97 |
| 角担菌属 <i>Ceratobasidium</i> | 17 | 5.67 | 13.49 | <i>Ceratobasidium</i> sp. JQ768036.1 | 97 |

表 2 云南杓兰的种子活力

Table 2 Seed vitality of *C. yunnanense*

| 处理 Treatment | 种子数 Seed number (粒) | 有胚数 Embryo number (粒) | 胚红数 Red embryo number (粒) | 有胚率 Embryo rate (%) | 胚活力 Embryonic activity (%) |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 第 1 次重复 The first repetition | 84 | 81 | 37 | 96 | 46 |
| 第 2 次重复 The second repetition | 76 | 75 | 39 | 99 | 52 |
| 第 3 次重复 The third repetition | 111 | 88 | 55 | 79 | 63 |
| 平均值 Average | | | | 91.33 | 53.66 |

表 3 云南杓兰菌根真菌和种子共生萌发

Table 3 Symbiotic germination with mycorrhizal fungi and seed from *C. yunnanense*

| 属名 Genus name | 供试菌株 Strain | 种子萌发情况 Germination | | |
|-------------------------------|----------------|-----------------------|------------------|------------------|
| | | 10 周 10 weeks | 15 周 15 weeks | 20 周 20 weeks |
| 胶膜菌属 <i>Tulasnella</i> | CY-18 | ④ | ⑤ | ⑦ |
| | CY-2 | ② | ② | ⑤ |
| 伏革菌属 <i>Corticium</i> | CY-24 | ② | ② | ④ |
| | CY-43 | ② | ② | ③ |
| 角担菌属 <i>Ceratobasidium</i> | CY-79 | ① | ① | ① |
| | CY-22 | ① | | |

注: ①代表未萌发; ②代表种胚膨大; ③代表基毛出现; ④代表叶原基出现; ⑤代表第一片叶子; ⑥代表第二片叶子; ⑦代表根萌发。

Note: ① Not germination; ② Embryo swelling; ③ Leaf primordium appear; ④ First leaf appear; ⑥ Second leaf appear; ⑦ Root germination.

添加甘氨酸、谷氨酸、KT、BA 激素等), 3 瓶一组, 3 次重复。以不做预处理(种子不在 NaClO 溶液中浸泡, 培养基用 Harvais, 不加激素)做对照, 3 瓶。

共生萌发试验: 取等量的种子悬浮液(200 μ L)

均匀地散布在 Harvais 培养基上。观察 1 周, 去除有污染的三角瓶。从分离得到的每个菌属中选取 2 株菌株作为供试菌株, 共 6 株。6 株供试菌株的菌块(0.5 cm \times 0.5 cm)分别放入三角瓶中, 每种菌做 3 个重复, 以不接菌的 6 瓶做对照组, 培养观察。

萌发率 = 萌发种子数 / (播种数 \times 有胚率) \times 100%

1.5 云南杓兰幼苗共生生长试验

选取已培养好的云南杓兰无菌幼苗(由云南省林业科学院组培室提供)进行挑选并准确称量后移到三角瓶中(采用 Harvais 培养基), 每瓶 6 株。观察一周后, 去除有污染的瓶, 分别接入 6 株供试菌株的菌块(1 cm \times 1 cm), 每个菌株做 3 个瓶的重复。以不接菌的 10 瓶作为对照实验。每 10 d 进行生长情况观察, 60 d 后进行生物量相关数据测定。

鲜重增长率 = (接种 60 d 后的重量 - 初始重量) / 初始重量 \times 100%。

全氮含量: H_2SO_4 - H_2O_2 -蒸馏法; 全磷含量: H_2SO_4 - H_2O_2 -消煮-钼锑抗比色法; 全钾含量: H_2SO_4 - H_2O_2 -消煮-火焰光度计法。

2 结果与分析

2.1 云南杓兰菌根真菌菌群组成分析

如表 1 所示, 云南杓兰的毛根中分离获得多种真菌, 共分离获得 126 株, 经 ITS 测序结果与 GenBank 中比对分析, 将其初步归属至 3 个菌属。其中, 分离率最高的为胶膜菌属, 共有 73 株、分离率最少的为角担菌属, 共有 17 株。3 个菌属中胶膜菌属为优势菌群, 分离频率高达 57.94%。

2.2 云南杓兰种子活力分析

云南杓兰在野外自然授粉条件下结实率很低, 仅 3.33%。经人工授粉后其结实率显著提高, 为 46.67%, 并收集蒴果后进行了种子活力分析。由表 2

表 4 菌根真菌对云南杓兰幼苗鲜重增长率及营养元素的影响

Table 4 Effects of mycorrhizal fungi on the growth rate of fresh weight and the nutrient contents in seedlings of *C. yunnanense*

| 属名 Genus name | 供试菌株 Strain | 鲜重增长率 Growth rate of fresh weight (%) | N 含量 N content (%) | P 含量 P content (%) | K 含量 K content (%) |
|-------------------------------|----------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | CK | 49.48±5.53Ee | 2.88±0.17Ccd | 0.68±0.03Bb | 1.18±0.10Dd |
| 胶膜菌属 <i>Tulasnella</i> | CY-18 | 92.30±8.04Aa | 3.96±0.33Aa | 0.83±0.11Aa | 1.62±0.09Aa |
| | CY-2 | 86.12±7.44Bb | 4.01±0.15Aa | 0.78±0.02Aab | 1.52±0.08Aab |
| 伏革菌属 <i>Corticiium</i> | CY-24 | 63.72±6.34Cc | 3.78±0.12Bb | 0.71±0.08Bb | 1.58±0.08Aa |
| | CY-43 | 51.87±4.23Ee | 2.65±0.29Dd | 0.59±0.01Cd | 1.26±0.11Cc |
| 角担菌属 <i>Ceratobasidium</i> | CY-79 | 58.04±6.88 Dd | 2.93±0.14Cc | 0.65±0.06Cc | 1.34±0.03Bb |
| | CY-22 | 54.63±9.30Dde | 3.08±0.18Cc | 0.62±0.01Ccd | 1.35±0.07Bb |

注:小写字母表示 0.05 水平上差异显著,大写字母表示 0.01 水平上差异显著。

Note: Small letters show the notable discrepancy on 0.05 level, big letters express the notable discrepancy on 0.01 levels.

可知,云南杓兰种子有胚率为 91.33%,发育较好,种子完全成熟。经过 TCC 法检测,云南杓兰种子胚活力为 53.66%,满足后期种子萌发实验要求。

2.3 云南杓兰种子预处理和真菌共生对其萌发的影响

云南杓兰种子在不经任何预处理的情况下,其种皮开始慢慢皱缩,不能成功萌发。然而,在经过种子预处理及培养基优化后,促进了种子萌发,其萌发率为 18.05%。由表 3 可知,6 株供试菌株中,能促进云南杓兰种子萌发的有 4 株,并对其促进效果不同。其中,菌株 CY-18 对云南杓兰种子的萌发具有较强的共生促进萌发效果。

为了进一步研究菌根真菌和种子预处理两种方法对种子萌发的促生效果,将供试菌株回接和种子预处理后萌发阶段进行了对比分析,结果见图 1。回接菌株后可显著提高种子的萌发进程,不同菌株的共生萌发促进效果不同。4 株菌株中,CY-18 菌株表现出较强的共生萌发效果,在第 10 周时,种子开始出现叶原基,而预处理无菌的种子还处于未萌发状态,第 15 周时促使第一片叶子长出。表明云南杓兰的种子萌发对菌根真菌具有较高的依赖性。该菌株有希望成为兰科繁殖的促进种子萌发的真菌。

2.4 菌根真菌对云南杓兰幼苗的促生效果分析

6 株供试菌株过回接培养后,均能与云南杓兰幼苗形成共生体系,且在其根内检测到相应的菌株。如表 1 所示,6 株菌株均不同程度的促进了云南杓兰幼苗的鲜重增长率,不同的菌株表现出的促生效果不同。其中,能显著促进幼苗生长为胶膜菌属的 2 株(CY-18 和 CY-2),鲜重增长率和 N、P、K 含量分别显

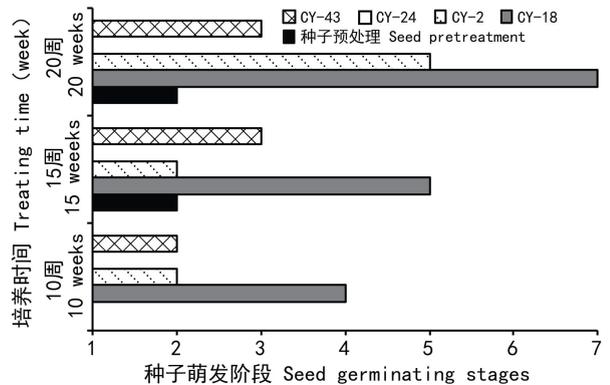


图 1 不同处理对云南杓兰种子萌发的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on seed germination of *C. yunnanense*

著高于对照。3 个菌属对云南杓兰幼苗的促生效果大小依次为胶膜菌属>伏革菌属>角担菌属。从 6 株供试菌株中筛选得到一株高效促生菌株 CY-18。

3 讨论

本研究采用组织块分离法对云南杓兰毛根中内生真菌进行了分离,其毛根系统中存在丰富多样的真菌类型,涉及 3 个菌属的真菌,均与幼苗建立共生体系。目前研究已知,与兰科植物形成共生的主要真菌类型约有 10 个属(盖雪鸽等,2014)。本研究获得的 3 个菌属在兰科其它植物菌根中已报道,属担子菌亚门,菌株数量在属水平上高于前人。胶膜菌属是兰科植物的常见菌群和优势菌群(缪福俊

等,2015),本研究也证实了胶膜菌属在上个菌属中分离频率最高,推断胶膜菌属菌根真菌对云南杓兰可能具有一定的寄主专一性。

兰科植物种子的萌发必须借助于菌根真菌为其提供营养才能萌发。那么是否真菌在兰科植物种子萌发时的作用能被其它物质代替呢?相关研究表明在培养基中添加一些营养物质可促进种子的无菌萌发(邓莲等,2012;黄家林和胡虹,2001)。因此可能认为真菌在兰科植物的种子萌发时并不是必需的。于是前人做了大量研究工作,发现真菌共生萌发可显著提高萌发率(邓莲2012)。菌根真菌侵染种子后,与其建立共生关系,把胚和基质连接起来,菌丝为胚发育提供养分、水分等物质(Liu et al,2010)。本研究首次发现不同类型的内生真菌不但可以显著提高云南杓兰种子的萌发率,还可显著缩短种子的萌发进程,在改良的培养基中无菌萌发的云南杓兰种子萌发进程极其缓慢,需半年至一年多时间。

本研究6株供试菌株中,均能促进和云南杓兰幼苗形成共生体系,不同程度地促进幼苗生长。但只有4株菌株能促进种子萌发,说明种子萌发对菌根真菌种群有特殊选择,而幼苗阶段开始,可与多种真菌建立共生关系,表现出更强的适应性。范黎(1994)研究推测,杓兰属植物生长的不同阶段所需的真菌类型可能不一样,而本研究证实了这一推测。在供试的6株菌根真菌中,CY-18和CY-2表现出较强的共生萌发及幼苗促生效果,且相比其它菌属真菌,培养这2株胶膜菌属的菌株时其生长速度较快,有希望成为杓兰属植物种子萌发和幼苗生长的高效促生菌,其促生机理仍待深入研究。

参考文献:

BIDARTONDO MI, READ DJ,2008. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development [J]. *Mol Ecol*,17(16):3707-3716.

CHEN LF, LIU SY, JIANG PD, et al,2012. Research progress on *Cypripedium* Linn [J]. *Hubei Agric Sci*,51(9):1733-1735. [陈丽飞,刘树英,江鹏道,等. 杓兰属植物研究进展 [J]. 湖北农业科学,51(9):1733-1735.]

DEARNALEY JDW, 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research [J]. *Mycorrhiza*,17(6):475-486.

DENG L,ZHANG M,WANG MM, et al,2012. Study on non-axenic germination of *Cypripedium macrathos* seed [J]. *Seed*,31(6):31-34. [邓莲,张毓,王茜茜,等,2012. 濒危兰科植物大花杓兰种子非共生萌发的研究 [J]. 种子,31(6):31-34.]

GAI XG,XING XK, GUO SX,2014. Ecological research of orchid mycorrhizae: a review [J]. *Mycosystema*,33(4):753-767. [盖雪鸽,邢晓科,郭顺星,2014. 兰科菌根的生态学研究进展 [J]. 菌物学报,33(4):753-767.]

GAO Q,LI SY,HU H,2009. Structure and annual changing pattern of mycorrhizae of four *Cypripedium* species [J]. *Guihaia*,29(2):187-191. [高倩,李树云,胡虹,2009. 四种杓兰的菌根结构及其周年动态 [J]. 广西植物,29(2):187-191.]

HARLEY JL, SMITH SE,1983. *Mycorrhizal symbiosis* [M]. New York: Academic Press: 1-483.

HUANG JL,HU H,2001. Seed germination requirements of *Cypripedium flavum* in axenic culture [J]. *Acta Bot Yunnan*,23(1):105-108. [黄家林,胡虹,2001. 黄花杓兰种子无菌萌发的培养条件研究 [J]. 云南植物研究,23(1):105-108.]

HUYNH TT, THOMSON R, MCLEAN CB, et al,2009. Functional and genetic diversity of mycorrhizal fungi from single plants of *Caladenia formosa* (Orchidaceae) [J]. *Ann Bot*,104(4):757-765.

LIU H L, LUO Y B, LIU H, 2010. Studies of mycorrhizal fungi of Chinese orchids and their role in orchid conservation in China—a review [J]. *Bot Rev*, (76): 241-262.

MIAO FJ,JIANG H,DING YD, et al,2015. Mycorrhizal fungal diversity of 5 species of *Cypripedium* plants in Shangri-La County [J]. *J W Chin For Sci*,44(4):58-62. [缪福俊,蒋宏,丁雅迪,等,2015. 香格里拉5种杓兰属植物菌根真菌的多样性分析 [J]. 西部林业科学,44(4):58-62.]

QUAN JJ,YANG B,LI J, et al,2015. Composition of mycorrhizal fungi communities for *Cypripedium flavum* [J]. *J S Agric*,46(12):2163-2167. [权娇娇,杨斌,李洁,等,2015. 黄花杓兰菌根真菌菌群组成分析 [J]. 南方农业学报,46(12):2163-2167.]

YANG YJ,2016. The study of reproductive biology and ecological adaptation of *Cypripedioideae* plant in China [J]. *Manage Res Sci & Technol Achiev*, (9):77-78. [杨颖婕,2016. 中国杓兰亚科植物的生态适应及繁殖生物学研究 [J]. 科技成果管理与研究, (9):77-78.]

YU YF,2004. The orchids in China [J]. *For Humank*, (5): 26-27. [于永福,2004. 中国兰花状况调查 [J]. 森林与人类, (5):26-27.]

ZANG M,WANG RL,HU H,2004. Bulbils exist in root of *Cypripedium flavum* [J]. *Acta Bot Yunnan*, 26(5): 495-496. [臧穆,王瑞苓,胡虹,2004. 黄花杓兰根内的小型菌核 [J]. 云南植物研究,26(5):495-496.]

ZHAO GY,XU BP,DONG R,2013. Research status of *Cypripedium* plants [J]. *N Hort*, (8):185-188. [赵国英,徐宝萍,董然,2013. 杓兰属植物研究现状 [J]. 北方园艺, (8):185-188.]

ZHAO XY,MIAO FJ,LI L, et al,2014. Mycorrhizal fungus rDNA ITS and specificity of *Cypripedium yunnanens* and *Cypripedium guttatum* [J]. *J W Chin For Sci*,43(3):57-61. [赵欣宇,缪福俊,李璐,等,2014. 云南杓兰和紫点杓兰菌根真菌 rDNAITS 序列及共生专一性分析 [J]. 西部林业科学,43(3):57-61.]

ZHENG CW,XIAO YP,2014. Summarization of research methods of Orchid mycorrhizal fungal [J]. *J Microbiol*,34(4):85-89. [郑超文,肖娅萍,2014. 兰科菌根真菌研究方法的概述 [J]. 微生物学杂志,34(4):85-89.]

ZHENG GL,LI P,TAI YD, et al,2010. Flowering and fruit set dynamics in *Cypripedium* [J]. *Acta Ecol Sin*, 30(12):3182-3187. [郑桂灵,李鹏,台永东,等,2010. 杓兰属植物的开花和结实动态 [J]. 生态学报,30(12):3182-3187.]

ZHOU YJ,SONG XQ,ZHU GP, et al,2009. Research of prospect for nutrition of orchid mycorrhizae [J]. *Chin J Trop Agric*, 29(2):83-87. [周玉杰,宋希强,朱国鹏,等,2009. 兰科植物菌根营养研究与展望 [J]. 热带农业科学,29(2):83-87.]