

四种杓兰的菌根结构及其周年动态

高倩^{1,2}, 李树云¹, 胡虹^{1*}

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 对黄花杓兰、云南杓兰、西藏杓兰和紫点杓兰四种高山杓兰成年植株的根进行了一个生长周期的切片观察。发现四种杓兰的菌根结构及其在一个生长周期中的动态变化有以下共同特征: 在其成年生活期的各个时期, 都有真菌入侵形成内生菌根结构, 菌丝在其根部皮层细胞内有四种存在状态: (a) 咖啡色或黄色、菌丝扭结缠绕而成的大菌丝结; (b) 灰褐色或黄色、由片断菌丝组成的大菌丝结; (c) 无色、零散的菌丝; (d) 橘红色和黄色、菌丝形态模糊的小菌丝结。真菌的入侵一消解在其成年生活期中周而复始地进行, 四种状态的菌丝是处于入侵一消解循环不同阶段的菌丝。并由此对高海拔环境下二者的共生关系进行了初步的探讨: 真菌侵入杓兰根部以获得自身生存和繁衍所需的营养物质, 杓兰利用真菌菌丝消解后的营养物质, 进行混合营养。

关键词: 高山杓兰; 菌根结构; 菌丝结; 共生关系

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)02-0187-05

Structure and annual changing pattern of mycorrhizae of four *Cypripedium* species

GAO Qian^{1,2}, LI Shu-Yun¹, HU Hong^{1*}

(1. Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2. Graduate School, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Roots of four alpine *Cypripedium* species (*C. flavum*, *C. yunnanense*, *C. tibeticum* and *C. guttatum*) were sliced up and observed throughout their lifecycle. Their common structure and annual changing pattern of mycorrhizae are as follows: Fungi infect and form endomycorrhizal structure with plants throughout the latter's grown period, and hyphae exist in the cortical cells of roots in the following four forms: (a) Coffee-colored or yellow big peloton consisting of twisted hyphae; (b) Dust-colored or yellow big peloton consisting of fragmentary hyphae; (c) Colorless scattered hyphae; (d) Orange or yellow small peloton with blurry hyphae. The four forms of hyphae are in different phases of the infection-decomposition circle, which goes round and round throughout the plants' grown period. It is primarily concluded that in the alpine area, fungi infect roots of the *Cypripedium* species for nutrients they need for their subsistence and multiply, and the *Cypripedium* species use them as nutrients, thus, processing mixotrophy.

Key words: Alpine *Cypripedium* species; mycorrhizal structure; peloton; symbiotic relation

菌根(Mycorrhiza)是共生真菌生存于健康的陆生植物根组织上而形成的联合吸收器官(Trappe, 1996), 是植物在长期的生存过程中与菌根真菌共同

进化的结果。兰科菌根是兰科植物与真菌形成的共生联合体, 对兰科植物的生长、发育及进化都起着重要的作用。杓兰属(*Cypripedium*)是杓兰亚科的四

收稿日期: 2007-11-05 修回日期: 2008-08-18

基金项目: 国家自然科学基金(30470182); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCXZ-YW-Z-033); 教育部“春晖计划”项目(2005)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470182); Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences(KSCXZ-YW-Z-033); the “haruteru program” Item of Education Ministry(2005)]

作者简介: 高倩(1981-), 女, 内蒙古鄂尔多斯市人, 博士研究生, 主要从事菌根研究, (E-mail) gaoqian@mail.kib.ac.cn.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: huhong@mail.kib.ac.cn)

个属之一,温带陆生兰,主要分布在温带地区和亚热带高山地区。杓兰对自然环境的要求很严格,多数种类都很难移植,野外杓兰的过度挖掘和环境的破坏,已迫使一些杓兰物种濒临灭绝(Cribb, 1997)。作为重要的观赏兰花,杓兰属成员目前已全部被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》保护植物名录(陈心启等, 1998)。

前人已做过一些有关杓兰菌根的研究。Shefferson 等(2005)推测杓兰(*C. californicum*)生境的营养情况影响它和真菌的共生关系。Shimura & Koda(2005)的研究表明杓兰(*C. macranthos*)和真菌是争斗关系,真菌一直努力从植物细胞获取营养物质,植物产生抗菌物质控制其生长并将其消解。王瑞苓等(2004)认为黄花杓兰根内的菌丝情况在各物候期有所不同,真菌营养是光合营养的补充。但高山地区杓兰和其菌根真菌的相互作用是怎样的?高山杓兰的难于引种驯化是否和菌根的形成有关?这方面的研究尚不多见。本研究选取了生长于同一地点的四种高山杓兰,对其菌根进行了切片制作和观察,旨在了解一周年中真菌在杓兰根内的存在状态及变化规律,在一定程度上反映二者的共生关系,为高山杓兰的人工繁育与物种保护提供一定的科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

四种杓兰:黄花杓兰(*C. flavum*)、云南杓兰(*C. yunnanense*)、西藏杓兰(*C. tibeticum*)和紫点杓兰(*C. guttatum*)成年植株的根于 2005 年 10 月~2006 年 9 月采自云南香格里拉县附近的纳帕海。每种植物随机取三个植株,采其全部的根。生长期(4~10 月)每月采两次,休眠期(11 月~次年 3 月)于 12 月采 1 次。

纳帕海生境:地理位置 99°35' E, 27°47' N, 海拔 3 450 m。年均气温(61~90 年)5~8 °C, 5 cm 地温平均比同时期气温高 3~4 °C, 冻土时间从 10 月下旬始至翌年 4 月止,约 120 d。年降水量约 600 mm, 一年中分布极不均匀, 6~9 月的降水占全年总量的 70%以上, 有明显的旱、湿季之分, 且湿热基本同步。土壤为黄沙壤, pH 值稍偏碱性。云杉林疏林下, 分布有四种杓兰, 伴生种有高山栎(*Qercus semecarpifolia*)、角蒿(*Nicotiana tabacum*)、马先蒿

(*Pedicularis resupinata*)等。

1.2 方法

将杓兰的根冲洗干净, 贮存于 FAA 固定液(甲醛、乙酸、95%乙醇以 5:5:90 混合)中。各个时期所采的四种杓兰的根, 均从每个植株的根中随机选取 3 条(每种植物均为 3 个植株, 共 9 条根), 将根分成根尖、基部及中段三段(根尖 1 cm, 基部 1 cm, 其余为中段), 徒手切片, OLYMPUS CX31 型显微镜下观察, JVC TK-C721EG 照相。入侵率计算见潘超美等(2002)的方法。

2 结果

2.1 四种杓兰的生活周期

四种杓兰有相似的生活周期。4~10 月为生长期, 11 月至次年 3 月为休眠期。生长期内, 4 月开始萌动, 5 月展叶、始花, 6、7 月盛花、幼果, 8、9 月结果、叶片衰老, 10 月开始休眠。

2.2 四种杓兰的菌根结构

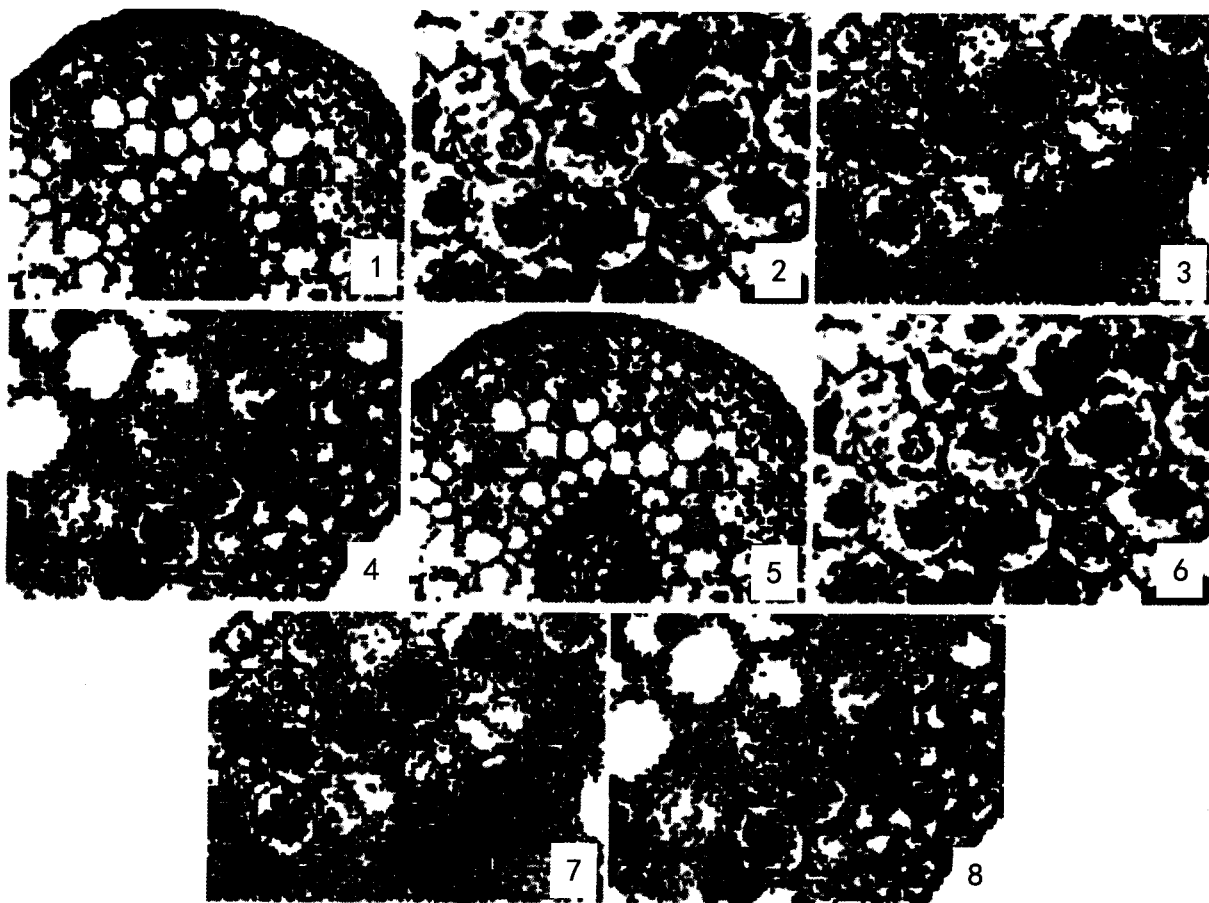
通过四种杓兰菌根切片的观察发现了它们菌根结构的共同特点: 为典型的兰科菌根结构(内生菌根), 无菌套(Hyphal mantle)和哈蒂氏网(Hartig net)。菌丝主要以缠绕的菌丝结形式存在于皮层的中间 3~4 层细胞, 根被、外皮层、皮层其余几层和内皮层细胞极少有侵染, 中柱细胞没有侵染。经测量并统计得出, 没有菌丝结及菌丝结被消解得所剩无几的细胞的平均直径为 $46.3 \pm 4.6 \mu\text{m}$ (统计 20 个无菌丝结细胞的直径大小得出)(图版 I: 1, 5; 图版 II: 3), 而有菌丝结的细胞的平均直径增大为 $82.4 \pm 6.8 \mu\text{m}$ (统计 20 个有菌丝结细胞的直径大小得出)(图版 I: 3; 图版 II: 4)(经 T-test 分析, 两数有显著性差异)。还发现菌丝结多的细胞内淀粉粒较少(图版 I: 2, 3; 图版 II: 4, 6), 菌丝结少和没有菌丝结的细胞内淀粉粒较多(图版 I: 5, 7)。

2.3 杓兰根内四种状态的菌丝

四种杓兰根中的菌丝均有以下四种存在状态(图版 I): (a)咖啡色或黄色、菌丝扭结缠绕组成的大菌丝结(图版 I: 2, 3); (b)暗灰色或黄色、由片段菌丝组成的大菌丝结(图版 I: 4); (c)无色、零散的菌丝(图版 I: 5); (d)橘红色和黄色、菌丝形态模糊的小菌丝结(图版 I: 6)。通过大量的切片观察, 认为: 状态 a 是新近入侵的菌丝, 密集而完整; 状态 b 是开始被消解的菌丝, 稍显松散, 很多已经片段化;

状态 c 是消解后残留的菌丝, 零散而稀疏; 状态 d 是菌丝被消解而成的物质, 菌丝的形态已被破坏。从状态 a~d 构成一个真菌的入侵—消解循环。菌丝

结在细胞的各个方向上由几根贯穿相邻两细胞细胞壁的菌丝连接起来, 各个时期的菌丝结都有这种连通现象。



图版 I 四种杓兰共有的菌根结构 1. 根被、外皮层、皮层、内皮层、中柱鞘、维管束和髓($\times 40$) (来自黄花杓兰); 2, 3. 黄色和咖啡色菌丝扭结缠绕的大菌丝结($\times 100$) (来自西藏杓兰); 4. 黄色、片断菌丝组成的大菌丝结($\times 100$) (来自云南杓兰); 5. 无色、零散菌丝($\times 100$) (来自黄花杓兰); 6. 橘红色、菌丝形态模糊的小菌丝结($\times 100$) (来自紫点杓兰); 7. 淀粉粒($\times 100$) (来自紫点杓兰); 8. 连通相邻两细胞内菌丝结的菌丝($\times 400$) (来自云南杓兰)。

Plate I Common structure of mycorrhizae of four *Cypripedium* species 1. Velamen, exodermis, cortex, endodermis, vascular bundle sheath, vascular bundle and pith ($\times 40$) (from *C. flavum*); 2, 3. Yellow and coffee-coloured big pelotons with twisted hyphae ($\times 100$) (from *C. tibeticum*); 4. Yellow big pelotons consisting of fragmentary hyphae ($\times 100$) (from *C. yunnanense*); 5. Colourless scattered hyphae ($\times 100$) (from *C. flavum*); 6. Orange small pelotons with blurry hyphae ($\times 100$) (from *C. guttatum*); 7. Starch grains ($\times 100$) (from *C. guttatum*); 8. Hyphae linking pelotons in two neighbouring cells ($\times 400$) (from *C. yunnanense*)

2.4 四种杓兰根内真菌的入侵—消解循环

四种杓兰根中具有共同的真菌入侵—消解现象, 入侵率为 29%~36%。按照某种状态菌丝所在横切面的数量在 100 个横切面中所占的比例, 我们把各种状态菌丝所占的比率划分为 80% 以上、50%~80%、20%~50% 和 20% 以下。观察到各个物候期的根中, 存在着各种状态和数量的菌丝, 即处在入侵—消解循环各个阶段的菌丝, 表明真菌的入侵—消解循环在周而复始地进行着。如黄花杓兰不同物候期根内的菌丝情况 (表 1)。未发现休眠期杓兰根内真菌的入侵、

消解和生长期有明显差异, 以 12 月为例, 黄花杓兰有 50%~80% 状态 a 和 20%~50% 状态 d 菌丝, 云南杓兰有 50%~80% 状态 a 和 20% 以下状态 b 菌丝, 西藏杓兰有 50%~80% 状态 b 和 20%~50% 状态 a 菌丝, 紫点杓兰有 20%~50% 状态 a 和状态 d 菌丝。总之, 在四种杓兰成年生活期的各个时期, 都观察到处在入侵—消解循环各个阶段的菌丝。

观察到, 同一物候期杓兰根中的菌丝同样处在入侵—消解循环的各个阶段: 同一植株不同的根, 同一条根的不同根段, 及四种不同杓兰根内的菌丝均以各

种状态和数量存在。

菌丝结细胞的平均直径增大和淀粉粒数量减少可能和真菌入侵后植物细胞内代谢活动的变化有关。

3 讨论

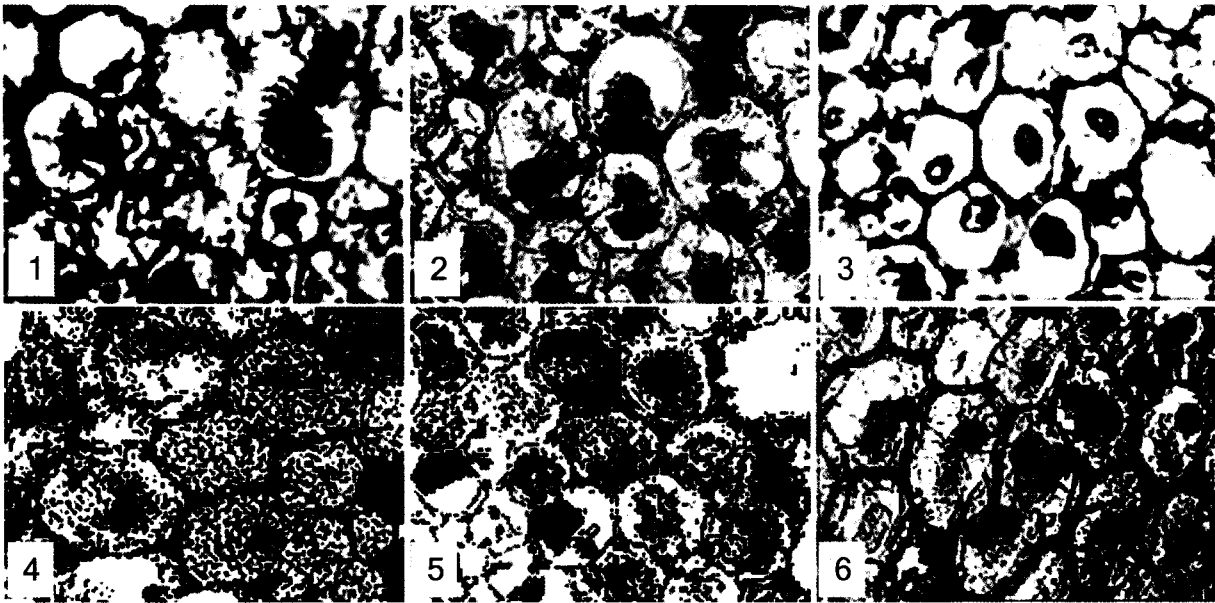
在四种高山杓兰成年植株的根中,入侵真菌的菌丝主要存在于皮层的中间 3~4 层细胞,根被、外皮层细胞和皮层外部几层细胞内偶尔有少量菌丝,可能是真菌向皮层中间几层细胞入侵途中留下的残余。有

入侵真菌的菌丝在杓兰的根内有 a、b、c、d 四种存在状态,代表它们处于入侵—消解循环的不同阶段,即新近入侵、开始被消解、消解后的残余及消解后的物质四个阶段。相邻细胞的菌丝结由菌丝连通,这是在侵染过程中,菌丝扭结充满细胞后穿过细胞壁进一步向相邻细胞侵染的结果。

表 1 黄花杓兰不同时期根内的菌丝状态和数量
Table 1 Form and quantity of *C. flavum* Hyphae in different periods

植物物候 Phenology	萌动 Sprout	展叶、始花 Open leaves, begin to flower			盛花、幼果 Bloom, begin to fruit				果期、叶片衰老 Fruit, leaves senesce			休眠 Dormancy	
月份 Month	4月中旬 Middle April	5月上旬 Early May	5月下旬 Late May	6月上旬 Early June	6月中旬 Middle June	7月上旬 Early July	7月中旬 Middle July	8月中旬 Middle August	9月上旬 Early September	9月下旬 Late September	10月上旬 Early October	12月中旬 Middle December	
a	+	—	++++	+	++++	++++	—	++	++	+++	++++	+++	
b	—	—	—	—	—	—	—	—	++++	—	—	—	
c	—	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—	
d	—	—	++	—	—	++	—	++++	++	++	++	++	

注:“a”、“b”、“c”、“d”代表菌丝的四种状态。按某种状态菌丝所在横切面的数量在 100 个横切面中所占的比例,把各种状态菌丝所占比率划分为 80% 以上、50~80%、20~50% 和 20% 以下。“++++”表示 80% 以上,“+++”50~80%,“++”20~50%,“+”20% 以下,“—”无菌丝。



图版 II 黄花杓兰各个时期的根内菌丝情况(×100) 1. 四月份植物开始萌动时; 2. 六月份植物盛花时; 3. 八月份植物结果时; 4. 九月份植物开始衰老时; 5. 十月份植物开始休眠时; 6. 十二月份植物休眠时。
Plate II Hyphal patterns of *C. flavum* in various periods of its lifecycle (×100) 1. Mycorrhizae in April when the plant begins to sprout; 2. In June when the plant blooms; 3. In August when the plant fruits; 4. In September when the plant begins to senesce; 5. In October when the plant begins the dormancy; 6. In December when the plant is dormant.

真菌入侵不久便被消解,然后再入侵、消解,这样的入侵—消解循环反复进行。休眠期杓兰的代谢活动大大减弱,但没发现此时真菌的入侵、消解情况和

生长期有明显差异。可以看出在杓兰的成年生活周期中(包括生长期和休眠期),真菌的入侵—消解都在其根内周而复始地进行,没发现这一过程和植物的物

候有必然联系(图版II)。偶尔有看不到菌丝的根段,细胞内有较多淀粉粒,推测是正好处于两个循环的间隙,即上一循环入侵的菌丝已被消解吸收,再一次的入侵尚未发生。

关于兰科植物和真菌的共生关系,有的学者认为二者是互利的(Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 1997),有的认为兰花寄生于真菌(Smith, 1966; Hadley, 1982),还有的认为二者是“你死我活”的斗争关系(Shimura & Koda, 2005),平衡的共生关系可在一定条件下变为寄生关系(Hadley, 1970)。通过对四种高山杓兰一个生活周期的菌根切片观察,对高山杓兰和真菌的共生关系有了初步的认识。真菌的入侵和消解在杓兰的生活周期中周而复始地进行,因高山环境下杓兰和真菌是彼此需要的,形成菌根共生关系使它们能更好地在营养物质相对较难获得的高山地区生存和繁衍。真菌增强植物吸收养分的能力,植物为真菌提供生长和扩大侵染面积所需的有机营养物质,杓兰和其菌根真菌是互利的。对真菌来说,在营养相对较难获得的高山地区,它们通过入侵植物以获得维持自身生存和繁衍所需的营养物质。对杓兰来说,真菌营养和光合营养是它获得营养的不同方式,从这个角度来看,杓兰是进行混合营养,即光合营养和真菌营养的结合,休眠期则只有真菌营养(Rasmussen, 1994; Shefferson 等, 2005)。一些能进行光合作用的兰花在其整个生命周期中都利用着真菌提供的碳水化合物(Bidartondo 等, 2004),即进行混合营养。混合营养是植物由自养向真菌营养进化的过渡,是真菌和植物相互适应的结果(Julou 等, 2005)。

在四种高山杓兰成年生活周期的各个时期,都发现了菌根的存在,因此高山杓兰移植过程中应注意菌根问题。本实验只是对高山杓兰和真菌的菌根共生关系进行了初步的观察和探讨,进一步对高山兰科植物菌根进行系统而深入的研究,全面分析二者的关系,将对促进兰科植物的快速繁殖、减轻其面临的濒危压力及其保护与开发具有重要意义。

致谢 衷心感谢臧穆研究员、杨祝良研究员、张石宝副研究员和严宁博士在图片整理和文章写作方面的建议和指导。

参考文献:

- 陈心启, 吉占和. 1998. 中国兰花全书[M]. 北京: 中国林业出版社, 14—115
- 潘超美, 陈汝民, 叶庆生. 2002. 野生建兰菌根显微结构特征[J]. 广州中医药大学学报, 19: 60—63
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, et al. 2004. Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees[J]. *Proc Biol Sci*, 271: 1 799—1 806
- Cribb P. 1997. The Genus *Cypripedium*[M]. Portland: Timber Press
- Harley JL, Smith S. 1983. Mycorrhizal Symbiosis[M]. London: Academic Press
- Hadley G. 1982. Orchid Mycorrhizae[M]//Ardetti J(eds). Orchid Biology: Reviews and Perspectives, 2. Ithaca and London: Cornell University Press, 83—118
- Hadley G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhizae[J]. *New Phytol*, 69: 1 015—1 023
- Julou T, Burghardt B, Gebauer G, et al. 2005. Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and nonphotosynthetic individuals of *Cephalanthera damasonium* [J]. *New Phytol*, 166: 639—653
- Rasmussen HN. 1994. The roles of fungi in orchid life history [C]//Pridgeon A(eds). Proceedings of the 14th World Orchid Conference. London, 130—137
- Smith SE, Read DJ. 1997. Mycorrhizal symbiosis[M]. San Diego: Academic Press
- Smith SE. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition[J]. *New Phytol*, 65: 488—499
- Shimura S, Koda Y. 2005. Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* following inoculation after cold treatment[J]. *Physiol Plant*, 123: 281—287
- Shefferson RP, Weiss M, Kull T, et al. 2005. High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*[J]. *Molecular Ecol*, 14: 613—626
- Trappe JM. 1996. What is a mycorrhizae[C]//Aguilarc A, Barrea JM(eds). Mycorrhizae in integrated systems. from genes to plant development. Proceedings of the 4th European Symposium on Mycorrhizae, EC Report EUR 16728. Luxembourg, 3—6
- Wang RL(王瑞苓), Hu H(胡虹), Li SY(李树云). 2004. Notes on symbiotic relationship between *Cypripedium flavum* and its mycorrhizal fungi(黄花杓兰与菌根真菌共生关系研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 26: 445—450
- Wang GW(王桂文), Li HY(李海鹰), Sun WB(孙文波). 2003. Primary study on mycorrhizas of mangrove in Qinzhou Bay(钦州湾红树林丛枝菌根初步研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(5): 445—449