



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103468587 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 25

(21) 申请号 201310424218. 5

(22) 申请日 2013. 09. 17

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 7553 2013. 04. 28

(71) 申请人 中国科学院西双版纳热带植物园

地址 666303 云南省西双版纳傣族自治州勐  
腊县勐仑镇中国科学院西双版纳热带  
植物园

(72) 发明人 邵士成 高江云 盛春玲

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务  
所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

*C12N 1/14* (2006. 01)

*A01H 4/00* (2006. 01)

*C12R 1/645* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

胶膜菌属真菌菌株及其在促进硬叶兰种子萌  
发中的应用

(57) 摘要

一种胶膜菌属 (*Tulasnella*) 真菌菌株 (CGMCC No. 7553), 其 ITS 序列已提交美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 其 Genbank 号为: KC796458. 1 及其在促进硬叶兰种子萌发上的应用。本发明的胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 通过与原球茎形成共生关系, 促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。实验证实, 接种从硬叶兰原球茎中分离到的 CGMCC No. 7553 菌株的种子萌发率为 74. 72%±16%。

1. 一种胶膜菌属 (*Tulasnella*) 真菌菌株 (CGMCC No. 7553)。
2. 如权利要求 1 所述的菌株 (CGMCC No. 7553), 其特征在于所述菌株 (CGMCC No. 7553) 的 nrDNA ITS 序列提交美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 序列号为 KC796458. 1。
3. 如权利要求 1 所述的胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553), 其特征在于所述菌株 (CGMCC No. 7553) 的生物学特征为: 菌株在 PDA 平板上培养 7 天其菌落白色, 气生菌丝发达, 圆周状发散生长, 略显稀疏, 菌丝具隔膜, 粗 3.0 - 5.5  $\mu\text{m}$ , 多数 4  $\mu\text{m}$  至 4.5  $\mu\text{m}$  分枝近直角, 分枝处缢缩, 距分枝不远处形成隔膜; 老菌丝细胞壁加厚现象明显; 培养 2 周后形成串珠状的厚垣孢子。
4. 权利要求 1 所述的胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 在促进硬叶兰种子萌发上的应用。
5. 如权利要求 4 所述的应用, 其特征在于胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 通过与原球茎形成共生关系, 促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。
6. 如权利要求 4 所述的应用, 其特征在于通过将硬叶兰种子与不同种类的真菌共同培养于燕麦培养基, 在人工培养箱内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下分别在有光条件 (光周期为 12/12h L/D) 和黑暗条件 (光周期为 0/24h L/D) 下培养, 使菌株与原球茎形成共生关系, 从而促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。
7. 权利要求 1 所述的胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 促进硬叶兰种子萌发的方法, 其特征在于胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 与原球茎形成共生关系, 促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。
8. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于通过硬叶兰种子与不同种类的真菌共同培养于燕麦培养基, 在人工培养箱内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下分别在有光条件 (光周期为 12/12h L/D) 和黑暗条件 (光周期为 0/24h L/D) 下培养, 菌株与原球茎形成共生关系, 进而促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。

## 胶膜菌属真菌菌株及其在促进硬叶兰种子萌发中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种能与硬叶兰 (*Cymbidium mannii*) 原球茎共生形成共生关系并促进种子萌发成原球茎进而长成幼苗的有效真菌菌株胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553),及其在促进硬叶兰种子萌发上的应用,具体来说涉及一种能与硬叶兰原球茎形成共生关系并促进其种子萌发生长至幼苗阶段的有效真菌。

### 背景技术

[0002] 兰科植物的种子非常细小,仅有发育不完全的胚,在自然条件下种子萌发需要依靠特定的共生真菌来获取营养物质。兰科植物种子的萌发可以通过非共生萌发培养和共生萌发培养两种方式。目前兰科植物种子的萌发,多采用人工培养基在无菌条件下进行非共生萌发,萌发率虽高,但在进行濒危种类野外回归时,非共生萌发(无菌萌发)幼苗移植到自然环境中生长缓慢,抗病原微生物能力差,存活率较低,并且由于无法与自然界中的真菌建立共生关系从而导致后续生长严重受阻。而通过种子和真菌的共生萌发获得的幼苗在回归到自然生境后具有较好的环境适应性。因此获得种子萌发的有效共生真菌是进行珍稀濒危兰科植物保护的第一步。利用种子迁地共生萌发技术诱导种子萌发成原球茎,分离原球茎中的共生真菌是获取促进种子萌发有效菌株最直接最高效的方法。共生萌发培养技术是指在特定的基质(培养基)中同时播种植物种子和共生真菌,该方法可以提高种子的萌发率、幼苗的生长速度以及移植到自然环境后的幼苗存活率。由于兰科植物种子与真菌的共生关系具有专一性,不同兰科植物种子的共生真菌不同,确定能与硬叶兰种子形成共生关系并促进其萌发的有效真菌是培育硬叶兰幼苗的关键环节,是开展硬叶兰原生境回归工作的基础。将硬叶兰种子和分离得到的真菌在人工培养基上进行共生萌发实验,筛选出能促进硬叶兰种子萌发至幼苗的有效共生真菌,可为高效生产菌根化幼苗提供必要条件,为开展硬叶兰的回归奠定基础。目前,现有技术中未见有胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 及其在促进硬叶兰种子萌发生长成幼苗生长方面的用途和方法的报道。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 及其在促进硬叶兰种子萌发生长成幼苗方面的用途和方法。本发明的菌株通过共生萌发实验将硬叶兰种子和不同的真菌及对照分别在燕麦培养基上培养,通过种子萌发率的比较,成功的获得促进硬叶兰种子萌发的有效菌株,从而为利用硬叶兰种子和真菌共生萌发来高效培育种苗开辟了一条新的途径。

[0004] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0005] 一种胶膜菌属 (*Tulasnella*) 真菌菌株 (CGMCC No. 7553)。

[0006] 如所述的菌株 (CGMCC No. 7553),该菌株 (CGMCC No. 7553) 的 nrDNA ITS 序列提交美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),序列号为 KC796458.1。

[0007] 如所述的胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553), 所述菌株 (CGMCC No. 7553) 的生物学特征为: 菌株在 PDA 平板上培养 7 天其菌落白色, 气生菌丝发达, 圆周状发散生长, 略显稀疏。光学显微镜下观察, 菌丝具隔膜, 粗  $3.0 - 5.5 \mu\text{m}$ , 多数  $4 \mu\text{m}$  至  $4.5 \mu\text{m}$  分枝近直角, 分枝处缢缩, 距分枝不远处形成隔膜; 老菌丝细胞壁加厚现象明显; 培养 2 周后形成串珠状的厚垣孢子。

[0008] 所述的胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 在促进硬叶兰种子萌发上的应用。

[0009] 如所述的应用, 胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 通过与原球茎形成共生关系, 促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。

[0010] 如所述的应用, 通过将硬叶兰种子与不同种类的真菌共同培养于燕麦培养基, 在人工培养箱内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下分别在有光条件 (光周期为 12/12h L/D) 和黑暗条件 (光周期为 0/24h L/D) 下培养, 使菌株与原球茎形成共生关系, 从而促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。

[0011] 所述的胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 促进硬叶兰种子萌发的方法, 其特征在于将胶膜菌 (*Tulasnella*) 菌株 (CGMCC No. 7553) 与原球茎形成共生关系, 促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。

[0012] 如所述的方法, 通过将硬叶兰种子与不同种类的真菌共同培养于燕麦培养基, 在人工培养箱内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下分别在有光条件 (光周期为 12/12h L/D) 和黑暗条件 (光周期为 0/24h L/D) 下培养, 使菌株与原球茎形成共生关系, 从而促进硬叶兰种子萌发并长成幼苗。

[0013] 为了实现本发明的目的, 本发明提供的具体步骤为:

[0014] 1、本发明菌种于 2013 年 04 月 28 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保存编号: CGMCC No. 7553。本发明菌株的 ITS 序列已提交美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 其 Genbank 号为: KC796458.1。

[0015] 2、本发明上述编号为 CGMCC No. 7553 的胶膜菌株在 PDA 平板上培养 7 天其菌落白色, 气生菌丝发达, 圆周状发散生长, 略显稀疏。光学显微镜下观察, 菌丝具隔膜, 粗  $3.0 - 5.5 \mu\text{m}$ , 多数  $4 \mu\text{m}$  至  $4.5 \mu\text{m}$  分枝近直角, 分枝处缢缩, 距分枝不远处形成隔膜; 老菌丝细胞壁加厚现象明显; 培养 2 周具串珠状的厚垣孢子。

[0016] 3、对本发明的硬叶兰种子萌发有效共生真菌 ITS 片段序列在美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 BLAST 比对分析, 其与 GU166410.1 *Tulasnellacalospora* 相似性最高达 98%。根据菌落、显微形态特征及分子生物学手段将本发明所涉及真菌鉴定为胶膜菌属 (*Tulasnella*) 真菌。

[0017] 4、硬叶兰种子与胶膜菌属真菌共生萌发实验

[0018] 利用种子与真菌在培养基内的共生萌发实验来检测分离到的真菌是否对种子萌发阶段有促进效果以及对比不同真菌对种子萌发阶段促进效果的差异。

[0019] 4.1 将保存于  $4^\circ\text{C}$  试管斜面内的供试菌株取出, 重新接种在 PDA 平板培养基上, 置于人工气候箱内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  培养, 进行活化。待真菌菌丝快长满培养皿时 (约 10 天) 取出作为共生萌发材料。

[0020] 4.2 配制共生萌发培养基: 所用培养基为燕麦琼脂培养基 (OMA,  $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  燕

麦粉 +8g · L<sup>-1</sup> 琼脂, pH=5.6 - 5.8)。将配好的培养基倒在旋口瓶中, 旋紧瓶盖, 灭菌 (121℃, 20min) 后备用。

[0021] 4.3 种子灭菌: 实验前将储存在 -20℃ 中的种子取出, 放在室温下 10 个小时, 使种子温度恢复至室温。将少量种子放在纸质的种子包内, 用订书钉将纸袋封好。将装有种子的纸袋浸泡在蒸馏水中 5 - 10 分钟, 轻轻的挤压出气泡。用镊子将纸袋转移到盛有次氯酸钠溶液 (有效氯离子浓度为 1%) 及含一滴洗涤剂的烧杯中, 轻轻搅拌或摇动烧杯。10 分钟后, 将纸袋移至超净工作台, 用无菌镊子将纸袋转移到盛有无菌蒸馏水的烧杯中, 轻轻摇动。重复冲洗种子 3 - 4 次。轻轻挤压出纸袋内多余的水, 用无菌剪刀剪开纸袋, 即可获得灭菌种子。

[0022] 4.4 播种与培养: 据文献 Dixon(1987) 所用的方法稍作修改。将无菌种子与 1g · L<sup>-1</sup> 无菌琼脂溶液制作成无菌种子悬浮液。在 OMA 培养基表面平行放置两片半径为 6cm 的半圆形无菌尼龙布 (孔径为 45 μm), 用移液枪吸取 150 μl 种子悬浮液均匀播种在每片尼龙布上。在培养基中间接种约 0.5cm<sup>3</sup> (1 × 1 × 0.5cm) 含有单一真菌纯培养物的琼脂块, 用封口膜将培养皿密封好。共分三组: 一组接种从硬叶兰原球茎中分离得到的编号为 CGMCC No. 7553 的菌株; 另外 2 组设置为对照, 其中一组接种从兜唇石斛 (*Dendrobiumaphyllum*) 原球茎内分离到的胶膜菌属 (*Tulasnella*) 真菌 (编号为 FDaI7); 另一组为空白对照组 (CK) 不接菌。每组重复 14 个培养皿, 在人工培养箱内 25 ± 2℃ 下恒温培养, 每组各 7 个培养皿分别在有光条件 (光周期为 12/12hL/D) 和黑暗条件 (光周期为 0/24h L/D) 下培养。

[0023] 4.5 检测: 播种后每周检测种子萌发情况, 记录种子萌发及形成原球茎的时间。培养数周后当培养皿中产生大量处于发育初期阶段的幼苗时将全部培养皿取出, 在立体显微镜下观察记录种子萌发及原球茎发育情况。在文献 Stewart&Zettler (2002) 对种子萌发和原球茎发育情况的分级标准基础之上稍作调整, 对种子萌发情况进行分级统计。统计光照和黑暗条件下接菌不同真菌的促种子萌发效果, 对比筛选能显著促进种子萌发并生长成幼苗的有效菌株。

[0024] 上述步骤中, 步骤 1 按照菌种保藏单位的要求提供三支试管斜面培养的菌种材料入库获取入册登记编号; 同时将测序所得的 ITS 碱基序列上传至 Genbank 提供的软件并提交获取 Genbank 号。

[0025] 步骤 2 所述观察菌株显微形态特征使用插片培养法, 霉菌培养箱在 25 ± 2℃ 条件下培养 7 至 10 天, 取插片按常规制片方法制片。根据观察需要选择不同生长时期的菌丝进行观察测量如: 位于插片底部的菌丝体生长时间较长可见串珠状厚垣孢子, 辅助显微镜测微标尺可对菌丝的粗细进行测量。

[0026] 步骤 3 所述的分子鉴定中, 采用 CTAB 法提取真菌 DNA, PCR 扩增所用引物为 ITS1 和 ITS4; PCR 反应体系 (25 μl) 包括: 2.5 μl 10 × PCR 缓冲液, 0.4 μl dNTP, 1.5 μl Mg<sup>2+</sup>, 1.5 μl ITS1, 1.5 μl ITS4, 0.2 μl Taq 酶, 15.4 μl ddH<sub>2</sub>O, 2 μl DNA 模板。扩增反应在 PCR 仪 Perkin Elmer 上进行, 如下 PCR 循环: 94℃ 预变性 3min, 循环 1 次; 94℃ 变性 1min, 51℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 30 次循环; 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增产物为上海生工生物工程有限公司进行测序。对所测序列提交美国国立生物技术信息中心数据库进行比对, 初步确认其分类学地位。

[0027] 步骤 4.4 所述的 150 μl 的悬浮液约含 150 粒硬叶兰种子, 所述的培养条件为: 光

照强度为 2000 - 3000Lx, 温度  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 光周期 12h/12h L/D。

[0028] 步骤 4.5 所述的种子萌发和原球茎发育情况参照文献 Stewart&Zettler(2002) 的方法对种子萌发和原球茎发育情况进行分级, 分为 5 个阶段: 阶段 0 描述为种胚透明, 种皮完好, 种子未萌发; 阶段 1 描述为种胚吸水膨胀; 阶段 2 描述为种胚继续膨大, 突破种皮, 视为萌发; 阶段 3 描述为出现原生分生组织, 即形成原球茎; 阶段 4 描述为长出第一片叶片; 阶段 5 描述为第一片叶片继续生长, 变长。

[0029] 所述的培养数周要根据种子萌发情况确定, 本项发明中选择 8 至 10 周, 因种子大部分已萌发且有些已达到幼苗阶段。

[0030] 参考文献为: Dixon K. 1987. Modern orchid growing for pleasure and profit, orchid club of south Australia: Inc., Adelaide. ; McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 145: 523-537. ; Stewart SL, Zettler LW. 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany* 72: 25-35. 。

[0031] 与现有技术相比, 本发明具备如下显著优益性:

[0032] 兰科植物种子的萌发可以通过非共生萌发培养和共生萌发培养两种方式。虽然大多数兰科植物可通过非共生萌发培养, 且具有较高的萌发率, 但是此方式获得的幼苗移植到自然界中, 生长缓慢, 抗病原微生物能力差, 存活率较低, 同时由于很难与后接触的真菌建立共生关系而导致后继生长严重受阻。共生萌发培养技术是指在特定的基质(培养基)中同时播种植物种子和共生真菌, 该方法可以提高种子的萌发率、幼苗的生长速度以及移植到自然环境后的幼苗存活率。由于兰科植物种子与真菌的共生关系具有专一性, 不同兰科植物种子的共生真菌不同, 确定能与硬叶兰种子形成共生关系并促进其萌发的有效真菌是培育硬叶兰幼苗的关键环节, 是开展硬叶兰原生境回归工作的基础。本发明的菌株通过共生萌发实验将硬叶兰种子和不同的真菌及对照分别在燕麦培养基上培养, 通过种子萌发率的比较, 成功的获得促进硬叶兰种子萌发的有效菌株, 从而为利用硬叶兰种子和真菌共生萌发来高效培育种苗开辟了一条新的途径。

[0033] 本发明从迁地共生萌发产生的原球茎中分离到的 CGMCC No. 7553 菌株, 即本发明收集硬叶兰原生地植株周围的枯枝落叶、树皮、苔藓和腐殖质等作为培养基质, 和硬叶兰的种子在实验室进行迁地共生萌发, 诱导种子萌发产生原球茎, 将获得的原球茎表面灭菌后在无菌条件下用人工培养基培养, 诱导原球茎中的内生真菌生长, 待长出菌丝时, 进行真菌的纯化, 获得纯菌落, 并进行真菌的分子鉴定和保存。此菌株不仅能显著促进硬叶兰种子萌发, 且能显著促进原球茎的形成以及显著促进原球茎后续发育成幼苗。说明只有接种菌株 CGMCC No. 7553 在光照条件下才能有效促进硬叶兰种子生长发育到幼苗阶段。

### 具体实施方式

[0034] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白, 以下通过实施例及试验数据, 对本发明进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明, 并

不用于限定本发明。

[0035] 实施例 1 :

[0036] 利用种子与真菌在培养基内的共生萌发实验来检测分离到的真菌是否对种子萌发阶段有促进效果以及对比不同真菌对种子萌发阶段促进效果的差异 :

[0037] 1、首先获取胶膜菌菌株(保存编号 :CGMCC No. 7553) :

[0038] 本发明从迁地共生萌发产生的原球茎中分离得到 CGMCC No. 7553 菌株 :收集硬叶兰原生地植株周围的枯枝落叶、树皮、苔藓和腐殖质等作为培养基质,和硬叶兰的种子在实验室进行迁地共生萌发,诱导种子萌发产生原球茎,将获得的原球茎表面灭菌后在无菌条件下用人工培养基培养,诱导原球茎中的内生真菌生长,待长出菌丝时,进行真菌的纯化,获得纯菌落。

[0039] 通过将硬叶兰种子与不同的真菌种类共同培养于燕麦培养基,在人工培养箱内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下分别在有光条件(光周期为 12/12h L/D) 和黑暗条件(光周期为 0/24h L/D) 下培养,结果显示此菌株能与原球茎形成共生关系并显著促进硬叶兰种子萌发至幼苗生长 ;同时通过菌落、显微形态学特征和分子生物学手段确定此真菌的分类学地位并保存之。

[0040] 真菌分类学地位的确定 :

[0041] 形态特征观察 :本发明的编号为 CGMCC No. 7553 的胶膜菌株在 PDA 平板上培养 7 天其菌落白色略带灰色,棉絮状,圆周状发散生长,气生菌丝白色中等略显稀疏 ;显微形态特征 :分枝近直角,分枝处缢缩,距分枝不远处形成隔膜,菌丝粗  $3.0 - 5.5 \mu\text{m}$  ;培养两周以上形成串珠状的厚垣孢子。

[0042] 分子生物学鉴定 :取出保存的真菌菌株,在超净工作台上用无菌接种针挑取菌丝接入灭菌后的液体马铃薯葡萄糖 (PDB) 培养基中。放入震荡摇床内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  震荡培养。培养时间视真菌的生长速度而定,一般为 3 - 6 天。抽滤约 100mg 的菌丝体,采用常规 CTAB 法提取 DNA,选择 ITS1 和 ITS4 为引物进行 PCR 扩增反应并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。对检测含有目标片段的样品进行测序。将得到的 ITS 片段序列提交美国国立生物技术信息中心数据库 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 并进行 BLAST 对比分析,获取 GenBank 号为 :KC796458.1。所得到的 ITS 序列与登录号为 GU166407.1 的真菌 *Tulasnellacalospora* 最为相似,最大相似度达到 98%,结合形态学分类特征确定分离到的真菌为胶膜菌属真菌。本发明上述菌种已采用试管斜面法于 2013 年 04 月 28 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保存编号 :CGMCC No. 7553 ;保存期限 :30 年。同时本实验室内将菌株接种于若干支试管斜面,于  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  霉菌培养箱培养 14d 后置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱保藏备用。

[0043] 2、共生萌发培养基

[0044] 所用培养基为燕麦琼脂培养基 (OMA,  $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  燕麦粉 +  $8\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, PH=5.6 - 5.8)。将配好的培养基倒在旋口瓶中,旋紧瓶盖,灭菌 ( $121^\circ\text{C}$ , 20min) 后备用。

[0045] 3、供试菌株重培养

[0046] 将保存于  $4^\circ\text{C}$  试管斜面内的供试菌株取出,重新接种在 PDA 培养基上,置于人工气候箱内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下进行活化。待真菌菌丝快长满培养皿时取出作为共生萌发材料。

[0047] 4、种子灭菌

[0048] 实验前将储存在  $-20^\circ\text{C}$  中的种子取出,放在室温下 10 个小时,使种子温度恢复至

室温。将少量种子放在纸质的种子包内,用订书钉将纸袋封好。将装有种子的纸袋浸泡在蒸馏水中 5 - 10 分钟,轻轻的挤压出气泡。用镊子将纸袋转移到盛有次氯酸钠溶液(有效氯离子浓度为 1%)及一滴洗涤剂的烧杯中,轻轻搅拌或摇动烧杯。10 分钟后,将纸袋移至超净工作台,用无菌镊子将纸袋转移到盛有无菌蒸馏水的烧杯中,轻轻摇动。重复冲洗种子 3 - 4 次。轻轻挤压出纸袋内多余的水,用无菌剪刀剪开纸袋,即可获得灭菌种子。

#### [0049] 5、播种与培养

[0050] 在文献 Dixon(1987) 所用方法的基础上稍作修改。将无菌种子与  $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  无菌琼脂溶液制作成无菌种子悬浮液。在 OMA 培养基表面平行放置两片半径为 6cm 的半圆形无菌尼龙布(孔径为  $45\ \mu\text{m}$ ),用移液枪吸取  $150\ \mu\text{l}$  种子悬浮液均匀播种在每片尼龙布上。在培养基中间接种约  $0.5\text{cm}^3$  ( $1 \times 1 \times 0.5\text{cm}$ ) 含有单一真菌纯培养物的琼脂块,用封口膜将培养皿密封好。一组接种从硬叶兰原球茎中分离得到的编号为 CGMCC No. 7553 的菌株,一组接种从兜唇石斛原球茎内分离到的编号为 FDaI7 的菌株,对照组(CK)不接菌。每组重复 14 个培养皿,在人工培养箱内  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  下恒温培养,每组各 7 个培养皿分别在有光条件(光周期为 12/12h L/D)和黑暗条件(光周期为 0/24h L/D)下培养。用封口膜密封后置于人工气候箱中培养。培养条件为:光照强度为 2000 - 3000Lx,温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,光周期 12h/12h L/D。

#### [0051] 6、检测

[0052] 播种后每周检测种子萌发情况,记录种子萌发及形成原球茎的时间。当有培养皿中产生大量处于发育初期阶段的幼苗时将全部培养皿取出,在显微镜下观察记录种子萌发及原球茎发育情况。在 Stewart&Zettler(2002)对种子萌发和原球茎发育情况的分级标准基础之上稍作调整,对种子萌发情况进行分级,统计各处理下的种子萌发率(G)、形成原球茎比率(C)以及处于各萌发阶段的种子、原球茎或幼苗的比率(K)。

[0053] 培养 5 周后,接种从硬叶兰原球茎中分离到的 CGMCC No. 7553 菌株和接种从兜唇石斛原球茎中分离到的 FDaI7 菌株的种子都萌发了(萌发率分别为  $74.72\% \pm 16\%$ ,  $69.82\% \pm 12\%$ )。但接种 CGMCC No. 7553 菌株的实验组在阶段 3、阶段 4 和阶段 5 三个阶段的种子数比率(分别为 29.30%, 13.63%, 12.04%)要高于接种 FDaI7 菌株实验组的种子数比率(分别为 13.51%, 1.36%, 1.67%),且在阶段 4 和阶段 5 存在显著性差异。说明 CGMCC No. 7553 菌株是对硬叶兰种子萌发以及原球茎发育有效的共生真菌。