

带叶兜兰种子原地共生萌发及有效菌根真菌的分离与鉴定

孙晓颖, 张武凡, 刘红霞*

(北京林业大学林学院, 北京 100083)

摘要: 为获得带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)种子萌发的共生真菌, 采用原地共生萌发技术获得了2株自然萌发的小幼苗, 并分离和筛选出了有效的种子萌发共生菌——瘤菌根菌(*Epulorhiza* sp.)。为验证分离菌株对带叶兜兰种子萌发的有效性, 将Phs34号菌株与带叶兜兰种子在灭菌后的原生境基质上进行室内共生萌发试验, 结果表明, 经过6周的培养, 对照组没有观察到种子的萌发; 接菌的种子胚明显膨大, 突破种皮, 形成原球茎, 平均萌发率为(58.35±3.41)%。这表明分离得到的瘤菌根菌能促进带叶兜兰的种子萌发。

关键词: 带叶兜兰; 种子原地共生萌发; 共生真菌; 瘤菌根菌属

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.01.009

In situ Symbiotic Seed Germination, Isolation and Identification of Effective Mycorrhizal Fungus in *Paphiopedilum hirsutissimum* (Orchidaceae)

SUN Xiao-ying, ZHANG Wu-fan, LIU Hong-xia*

(College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The aim was to obtain the compatible mycorrhizal fungi of lithophytic *Paphiopedilum hirsutissimum* using *in situ* seed baiting technique. Two natural small seedlings were harvested after *in situ* seed germination. The effective symbiotic fungi of genus *Epulorhiza* were isolated from these developed seedlings. In order to verify the effect of the isolated fungal strains on seed germination, one of strains, Phs34, was used to the *in vitro* symbiotic seed germination of *P. hirsutissimum* on the sterile habitat substrate. After cultured for 6 weeks, seeds inoculated with Phs34 started to develop into protocorms and average germination rate was (58.35±3.41)%, whereas seeds without the fungus failed to germinate. These indicated that the fungal strain Phs34 was compatible mycorrhizal fungus of *P. hirsutissimum*, and it will be helpful in seedling production and orchid conservation of *P. hirsutissimum*.

Key words: *Paphiopedilum hirsutissimum*; *In situ* symbiotic seed germination; Symbiotic fungi; *Epulorhiza*

兰科(Orchidaceae)是种子植物的一大家族, 约有800属25000~30000种^[1]。目前, 所有的野生兰花均被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》(CITES), 对于重点保护的珍稀濒危兰花种类, 急需了解其生物学和生态学特性^[2]。兰科植物的种子

数量巨大, 一个蒴果内包含上万粒粉尘状的种子, 然而兰花的种子胚发育不完全, 没有胚乳, 在自然条件下种子必须有特定真菌为其提供营养才能成功萌发, 随后建立稳定的共生关系, 直到发育成植株^[3-4]。目前, 许多兰科植物的种子建立了成熟的无

收稿日期: 2014-04-11

接受日期: 2014-05-07

基金项目: 国家科技支持计划项目(2008BAC39b05); 广西科学研究与技术开发计划主席基金项目(09203-04)资助

作者简介: 孙晓颖(1986~), 女, 博士研究生, 研究方向为兰科植物菌根生物学。E-mail: sunxiaoying121@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: hongxia@bjfu.edu.cn

菌萌发技术,但无菌幼苗出瓶后的成活率低,易感病,难以用于野外回归和规模化人工繁育;而通过种子与合适真菌共生萌发得到带菌幼苗,具有很好的环境适应性。因此,获得种子萌发阶段的有效共生真菌,是兰科植物菌根研究与兰花保育的关键环节^[5]。

为了获得兰科植物种子萌发阶段的共生真菌,Rasmussen等^[6]发明了兰科植物种子原地共生萌发技术(*in situ* seed baiting technique),他们将兰花种子装入尼龙膜制成的袋子中,埋于兰科植物原生境,一段时间后,观察种子袋内的种子是否萌发,随后可从萌发的原球茎或小幼苗中分离得到共生真菌,这项技术可应用于兰花种子的生物学和种子共生真菌的研究。在国际上,该项技术已成为兰科菌根真菌研究及兰花保育中的一项常用技术^[2]。然而,在国内,该项技术只成功应用于铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)和金钗石斛(*Dendrobium nobile*)^[7]及兜唇石斛(*Dendrobium aphyllum*)^[8]。

兜兰属(*Paphiopedilum*)植物,又称为“拖鞋兰”,在园艺界负有盛名。兜兰作为兰科植物中最诱人的花卉之一,深受世界各地人们的喜爱。由于自然生境的破坏和人为过度采集,野生兜兰种群受到巨大威胁。所有的野生兜兰都列为CITES附录1中^[9]。目前,全世界共有兜兰属植物79种,中国是全球兜兰种类最多的国家,达27种。然而,中国学者对兜兰植物的研究起步很晚,20世纪40年代才开始比较正式地研究兜兰植物^[10]。有关兜兰菌根的研究报道较少,主要针对成年兜兰植物菌根内生真菌的分离与鉴定^[11-13]。

本文以雅长兰科植物自然保护区分布的带叶兜兰(*P. hirsutissimum*)为研究对象,利用种子原地共生萌发技术诱导种子萌发,获得原球茎(或小幼苗),分离其中的共生真菌,将分离得到的真菌和兰花种子在灭菌后的原生境基质上进行室内共生萌发试验,筛选出对带叶兜兰种子萌发有促进作用的共生真菌,为带叶兜兰菌根研究和保育奠定基础,也为其它兰科植物的综合保护和人工繁育提供理论依据与技术参考。

1 材料和方法

1.1 研究地点和材料

研究地点为兰科植物种质基因园,位于广西西

北部乐业县的雅长兰科植物自然保护区(24°85' N, 106°38' E)内,属桂西中亚热带季风气候区^[14]。兰科植物种质基因园是自然与半自然状态相结合的野生兰科植物原地与迁地保护园,有原生地野生兰花22属41种,其中野生带叶兜兰居群数量巨大。

带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)为兜兰属地生或石上附生兰,广泛分布于云南东南部、贵州西南部、广西西北部;印度东北部、老挝、缅甸、泰国北部和越南北部等地,生于石灰岩地区岩石缝隙基质中^[10]。在雅长兰科植物自然保护区,带叶兜兰花期为4-5月(图1:A),果实成熟期为10-11月(图1:B)。2010年10月下旬采集自然授粉结实,发育良好,未开裂的带叶兜兰蒴果。随机取1个果荚,用75%酒精反复擦拭果实表面,切开果荚取出种子,经TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)染色法^[15]检测,带叶兜兰的种子活力在60%以上(图1:C)。其余蒴果在4℃下干燥保存备用。

同时收集带叶兜兰原生境的腐殖质及枯枝落叶,用于分离真菌对种子萌发的有效性检测时的培养基质。

马铃薯燕麦(POA)双抗培养基:马铃薯50g,燕麦8g,琼脂17g,蒸馏水1L,pH自然。依照常规生物学试验方法,配制分离培养基,121℃高压湿热灭菌20min,待培养基冷却至45℃左右,加入青霉素(50 μg mL⁻¹)和链霉素(50 μg mL⁻¹),摇匀迅速制备平板,每个平板约35mL培养基,用9mm的打孔器在平板上挨个打孔,用灭菌牙签将打好的小块培养基放入灭菌的空培养皿中,每皿10-20个,一个平板(9cm)约可以制作60块小培养基块。

1.2 种子的原地共生萌发

选择孔径为50 μm(300目)的尼龙膜,采用热封处理的方法制成种子袋。这种尼龙膜可以将种子保留在膜内,而且真菌菌丝可以穿透生长。先将尼龙膜剪裁成10cm宽的长条,对折后,每间隔3cm热封,做成3个小室相连的种子袋,每个种子袋约为3cm×5cm,在种子袋的左上边缘系上标签(图1:D)。取低温干燥保存的带叶兜兰蒴果1个,用75%酒精擦拭果荚表面,打开果实,将种子洒入0.3%的糊状水琼脂中,用小药勺轻轻将种子分散,混合均匀,制成种子悬浮液(图1:E),均匀涂抹于种子袋内,种子袋每个小室内约涂抹300粒种子。2011年5月,将制作好的种子袋埋于广西雅长兰

科植物自然保护区兰科植物种质基因园野生成年带叶兜兰根部附近(图 1: F),以周围的腐殖质覆盖。共选取 7 个样点,每个样点埋放 10 个种子袋,共计 70 个种子袋。12 个月后,对种子袋进行检查与回收。野外带叶兜兰种子的萌发率 \approx 萌发的原球茎(或小幼苗)/(回收的种子袋数 $\times 3 \times 300$)。

1.3 共生真菌的分离

原地萌发的带叶兜兰原球茎(或小幼苗),同种子袋一并装入自封袋或小心装入 5 mL 离心管,以原地腐殖质或苔藓等填充保护,尽快带回实验室。

在自来水下清洗,用柔软的毛笔小心除去原球茎(或小幼苗)表面的土壤及杂质。在超净工作台上,原球茎(或小幼苗)用 75% 的酒精浸泡 20~30 s,再用 1% 的 NaClO 灭菌 4 min,无菌水清洗 3~4 次。

在无菌空皿里加 500 μ L 无菌水,一手用无菌镊子夹住已消毒的原球茎(或小幼苗),一手用无菌手术刀尖轻轻地将其刮碎,越细越好,使菌丝团充分释放出来,如果是小幼苗只需处理根部。用 200 μ L 移液枪将菌丝团悬浮液转移至 1.5 mL 离心管中,再向培养皿中加少量无菌水冲洗,将剩余的菌丝团悬浮液全部转移至离心管。转移时利用枪头的阻挡,尽量不要吸取较大的植物组织。

上下摇动离心管,混匀菌丝团悬浮液,用 10 μ L 移液枪吸取 5~8 μ L 菌丝团悬浮液滴于每小块 POA 双抗培养基上。以最后一次漂洗原球茎(或小幼苗)的水作为对照,用封口膜密封培养皿,标明分离信息,置于 25 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。每隔 3 d 观察 1 次,待小块培养基上长出菌丝后,将小培养基块转移至 POA 培养基平板上进行纯化培养,纯化后的菌株以 POA 试管斜面 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 真菌对种子萌发的有效性检测

在带叶兜兰原生境收集的枯枝落叶和腐殖质,自然风干,用燕麦水饱和后,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 1.5 h (图 1: H),将基质分装于培养皿内,接入从原球茎(或小幼苗)分离到的真菌菌株(编号为 Phs34),培养 1 周后菌丝长满基质(图 1: I)。

取带叶兜兰未开裂的蒴果,用 75% 酒精反复擦拭蒴果表面以除去果皮绒毛,在超净工作台上,用 75% 的酒精浸泡 30 s,再用 4.5% 的 NaClO 灭菌 8 min,无菌水清洗 3~4 次。将蒴果置于事先放置无菌滤纸的培养皿内,一只手用镊子夹住蒴果,另

一只手用解剖刀纵切果实,取出种子。在上述长满菌丝的基质上铺合适大小的无菌滤纸,在滤纸上播撒带叶兜兰种子(图 1: J),用封口膜密封培养皿,标明信息,置于 25 $^{\circ}$ C 下黑暗培养。以不接种真菌的基质上播撒带叶兜兰种子作为对照,每种处理重复 4 个平板。共生培养 6 周左右统计萌发率。

1.5 真菌种类的分子鉴定

挑取燕麦液体培养基培养的 Phs34 号菌株的菌丝球,用无菌滤纸吸干多余水分,使用普通植物基因提取试剂盒(TIANGEN, China)提取菌株的 rDNA。利用 ITS1/ITS4 对真菌 rDNA 上的 ITS 区域进行 PCR 扩增。扩增反应体系(25 μ L)包括: 16.25 μ L ddH₂O, 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2.5 μ L dNTP (2.5 mmol L⁻¹), 1 μ L ITS1 (10 mmol L⁻¹), 1 μ L ITS4 (10 mmol L⁻¹), 0.25 μ L *Taq* 聚合酶, 1.5 μ L DNA。PCR 扩增反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 4 μ L 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,有明亮单一条带的扩增产物送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。得到的真菌正反两条序列用 DNAMAN 软件中的“Sequence assembly”程序拼接成一条 ITS 序列,如果拼接时碱基不匹配,根据峰值图,进行人工校对。登录 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)进行在线比对。

2 结果和分析

2.1 带叶兜兰种子的原地共生萌发

2012 年 5 月,种子袋埋放 12 个月后进行检查与回收。7 个样点中种子袋都有不同程度的丢失,共回收 59 个种子袋,其中 3 号和 4 号样点各有 1 个种子袋的 1 个小室有种子萌发形成小幼苗(图 1: G)。野外带叶兜兰种子的萌发率约为 3.8×10^{-5} 。

2.2 共生真菌的分离

约 1200 μ L 菌丝团悬浮液滴加到 150 个小块 POA 双抗培养基,经过一个月的不断纯化,有 94 个小块培养基长出菌丝,所有真菌菌株在 POA 平板上,形态特征相同,呈奶白色或淡黄色,菌丝稀薄,气生菌丝不发达,有特殊的芳香气味(图 1: K);光学显微镜下观察,无孢子,菌丝有隔,呈直角分支,有

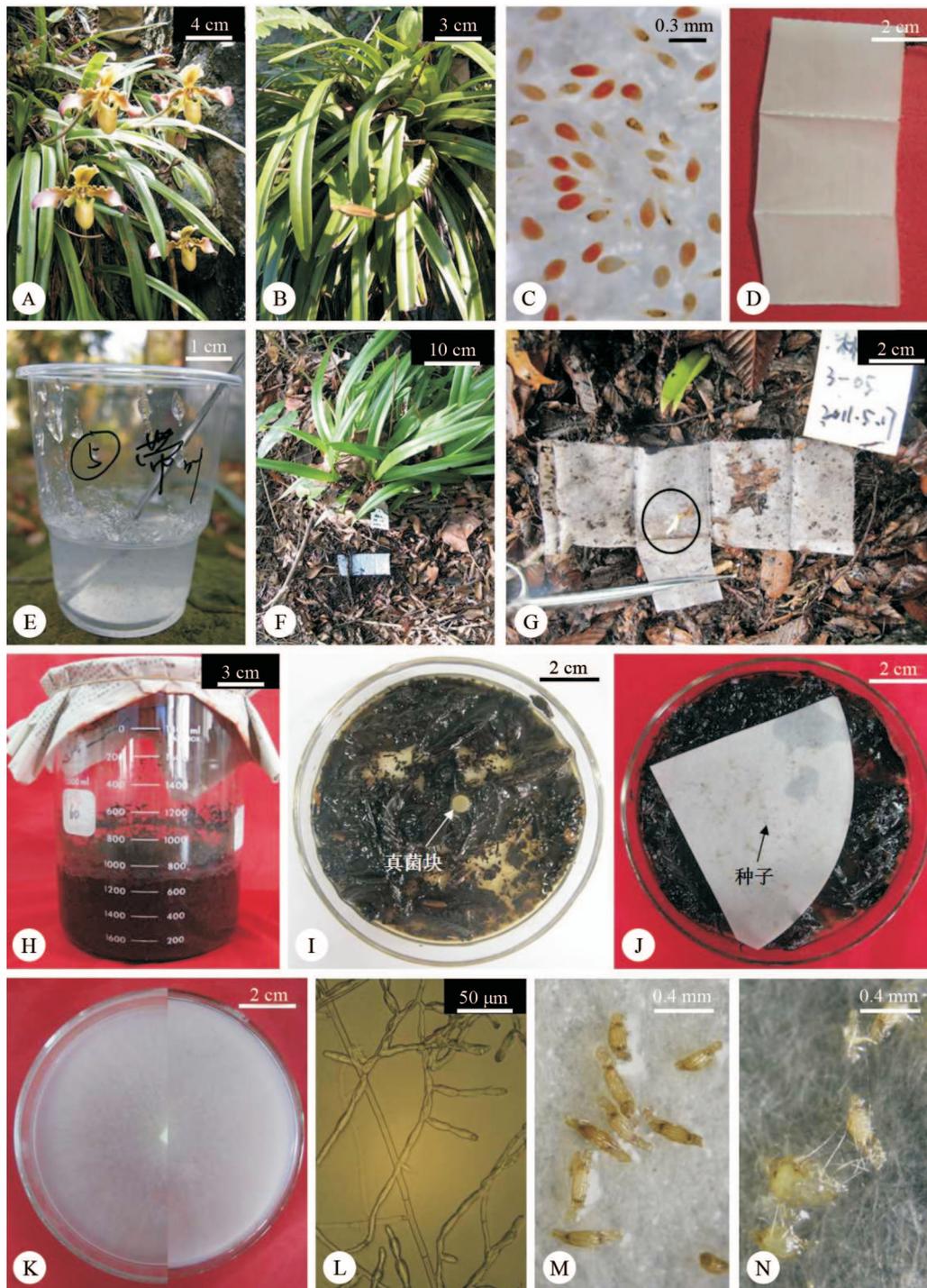


图1 带叶兜兰种子原地共生萌发及有效菌根真菌的分离与鉴定。A: 带叶兜兰的花; B: 带叶兜兰的蒴果; C: TTC 染色的种子; D: 三联种子袋; E: 种子悬浮液; F: 种子袋的埋放; G: 带叶兜兰种子原地共生萌发 1 年的小幼苗; H: 用于种子室内共生萌发的灭菌基质; I: 接种真菌; J: 播散种子; K: 分离菌株的菌落形态; L: 呈直角分支的菌丝和念珠状细胞; M: 种子室内共生萌发的对照处理; N: 接入 Phs34 菌株 6 周后, 种子膨大萌发。

Fig. 1 *In situ* symbiotic seed germination, isolation and identification of effective mycorrhizal fungus in *Paphiopedilum hirsutissimum*. A: Flowers of *Paphiopedilum hirsutissimum*; B: Capsule of *P. hirsutissimum*; C: Seeds stained with triphenyl tetrazolium chloride (TTC); D: Triple packet; E: Seed suspension; F: Place of seed packet; G: Seedling of *P. hirsutissimum* after *in situ* symbiotic seed germination for 1 year; H: Sterilized substrates used *In vitro* symbiotic seed germination; I: Inoculation of fungal isolate; J: Sowing of orchid seeds; K: Colony morphology of fungal isolates; L: The right-angle branching mycelia and chains of swollen moniloid cells; M: Control of symbiotic seed germination; N: Germination of seeds inoculated fungal isolate Phs34 after 6 weeks of sowing.

念珠状菌丝(图 1: L)。

2.3 真菌对种子萌发的有效性检测

带叶兜兰种子室内萌发培养 6 周后,不接菌的对照组没有观察到萌发的种子(图 1: M);接入 Phs34 号菌株的种子胚明显膨大,突破种皮,形成原球茎(图 1: N),平均萌发率为 $(58.35\pm 3.41)\%$ 。

2.4 真菌种类的分子鉴定

菌株 Phs34 测序后,得到的 ITS 片段经过 Blast 对比分析,与登录号为 FJ613228 的瘤菌根菌属真菌(*Epulorhiza sp.*)最为相似,最大相似度为 99%。根据菌株形态和分子特征以及能促进带叶兜兰种子萌发等特性,可以判定以 Phs34 号为代表的从带叶兜兰小幼苗根部分离到的真菌为带叶兜兰的菌根真菌。

3 讨论

获得兰科植物种子萌发阶段的有效共生真菌,是兰科植物菌根研究与兰花保育的关键环节,以种子袋为基础开展的兰科植物种子原地共生萌发技术是兰科植物种子的生物学和种子共生真菌研究的有效方法。兰科植物种子数量巨大,但自然萌发率极低,通过本研究带叶兜兰种子自然萌发率约为 3.8×10^{-5} 。如何从数量有限且体积较小的原球茎(或小幼苗)中分离得到共生真菌,分离方法和分离培养基是关键因素。菌丝团(Peloton)是兰科菌根真菌在兰科植物原球茎或植物根部细胞内形成的特殊结构^[16]。本研究参考从成年兰科植物根部分离菌根真菌的“菌丝团分离法”并加以改进^[17-19],成功从自然萌发的小幼苗中分离得到种类单一且对种子萌发有促进作用的共生真菌。

长期以来,兰科植物种子室内共生萌发多是使用人工配制的燕麦培养基^[20-22]作为共生培养基,也有用壳斗科(Fagaceae)植物叶片^[23]或栎树(*Quercus sp.*)树皮^[24]作为共生基质。本研究中,我们使用灭菌后的原生境腐殖质及枯枝落叶作为分离菌株与带叶兜兰种子共生萌发的培养基,带叶兜兰的种子能成功萌发,这为今后室内共生萌发又提供了一种可参考的共生培养基。

本研究利用种子原地共生萌发技术成功获得带叶兜兰的小幼苗,并从中分离出能促进带叶兜兰

种子萌发的共生真菌,为进一步开展带叶兜兰菌根真菌研究及其保育工作奠定基础,同时也为我国兰科植物的综合保护与利用提供可参考的研究案例。

参考文献

- [1] Yu P Z. The World of Orchid [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 1-6.
虞佩珍. 兰花世界 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 1-6.
- [2] Ke H L, Song X Q, Tan Z Q, et al. The technique of orchid seeds baiting *in situ* and its applications [J]. *Sci Silv Sin*, 2007, 43(5): 125-129.
柯海丽, 宋希强, 谭志琼, 等. 兰科植物种子原地共生萌发技术及其应用前景 [J]. *林业科学*, 2007, 43(5): 125-129.
- [3] Rasmussen H N. Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant [M]. New York, USA: Cambridge University Press, 1995: 1-112.
- [4] Dearnaley J. Further advances in orchid mycorrhizal research [J]. *Mycorrhiza*, 2007, 17(6): 475-486.
- [5] Johnson T R, Stewart S L, Dutra D, et al. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae): Preliminary evidence for the symbiotic culture advantage [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 90(3): 313-323.
- [6] Rasmussen H N, Whigham D F. Seed ecology of dust seeds *in situ*: A new study technique and its application in terrestrial orchids [J]. *Amer J Bot*, 1993, 80(12): 1374-1378.
- [7] Wang H, Fang H Y, Wang Y Q, et al. *In situ* seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: The endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(9): 2051-2059.
- [8] Zi X M, Sheng C L, Goodale U M, et al. *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae) [J/OL]. *Mycorrhiza*, 2014 [2014-02-23]. doi: 10.1007/s00572-014-0565-8.
- [9] Luo Y B, Jia J S, Wang C L. Conservation strategy and potential advantages of the Chinese *Paphiopedilum* [J]. *Biodiv Sci*, 2003, 11(6): 491-498.
罗毅波, 贾建生, 王春玲. 初论中国兜兰属植物的保护策略及其潜在资源优势 [J]. *生物多样性*, 2003, 11(6): 491-498.
- [10] Liu Z J, Chen S C, Chen L J, et al. The Genus *Paphiopedilum* in China [M]. Beijing: Science Press, 2009: 1-100.
刘仲健, 陈心启, 陈利君, 等. 中国兜兰属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 1-100.
- [11] Li M, Zhang Z. Studies and applications on mycorrhiza of *Paphiopedilum armeniacum* [J]. *J Biol*, 2001, 18(6): 17-18.
李明, 张灼. 杏黄兜兰菌根研究与应用 [J]. *生物学杂志*, 2001, 18(6): 17-18.
- [12] Tian F, Zhu G S, Gui Y, et al. Study on isolation and culture characteristics of *Paphiopedilum micranthum* mycorrhizal fungi

- [J]. North Hort, 2012(7): 61–64.
- 田凡, 朱国胜, 桂阳, 等. 硬叶兜兰菌根真菌的分离及培养特性研究 [J]. 北方园艺, 2012(7): 61–64.
- [13] Zhu X M, Hu H, Li S Y, et al. Interaction between endophytic fungi and seedlings of two species of *Paphiopedilum* during symbiotic culture [J]. Plant Divers Resour, 2012, 34(2): 171–178.
- 朱鑫敏, 胡虹, 李树云, 等. 内生真菌与两种兜兰共培养过程中的相互作用 [J]. 植物分类与资源学报, 2012, 34(2): 171–178.
- [14] He T P, Peng D R, Li D Q, et al. Study on the orchid diversity of Yachang Nature Reserve in Guangxi [J]. Guihaia, 2007, 27(4): 590–595.
- 和太平, 彭定人, 黎德丘, 等. 广西雅长自然保护区兰科植物多样性研究 [J]. 广西植物, 2007, 27(4): 590–595.
- [15] Brundrett M, Sivasithamparam K, Ramsay M, et al. Orchid Conservation Techniques Manual, First International Orchid Conservation Congress: Training Course [M]. Perth: Plant Science, King Park & Botanic Garden, 2001: 1–112.
- [16] Peterson R L, Massicotte H B, Melville L H. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology [M]. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2004: 125–144.
- [17] Zhu G S, Yu Z N, Gui Y, et al. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi [J]. Fungal Divers, 2008, 33: 123–137.
- [18] Chutima R, Dell B, Lumyong S. Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination of *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a terrestrial orchid in Thailand [J]. Symbiosis, 2011, 53(3): 149–156.
- [19] Steinfott U, Verdugo G, Besoain X, et al. Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst (Orchidaceae) [J]. Flora, 2010, 205(12): 811–817.
- [20] Yang Y L, Liu Z Y, Zhu G S. Study on symbiotic seed germination of *Pleione bulbocodioides* (Franch) Rolfe [J]. Microbiology, 2008, 35(6): 909–912.
- 杨友联, 刘作易, 朱国胜. 独蒜兰种子共生萌发研究 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 909–912.
- [21] Wu H F, Song X Q, Liu H X. *Ex-situ* symbiotic seed germination of *Dendrobium catenatum* [J]. Acta Ecol Sin, 2012, 32(8): 2491–2497.
- 吴慧凤, 宋希强, 刘红霞. 铁皮石斛种子的室内共生萌发 [J]. 生态学报, 2012, 32(8): 2491–2497.
- [22] Tan X M, Wang C L, Chen X M, et al. *In vitro* seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.) [J]. Sci Hort, 2014, 165: 62–68.
- [23] Xu J T, Guo S X, Fan L, et al. Symbiotic germination between *Gastrodia elata* and fungal species of *Mycena* [J]. Mycosystema, 2001, 20(1): 137–141.
- 徐锦堂, 郭顺星, 范黎, 等. 天麻种子与小菇属真菌共生萌发的研究 [J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 137–141.
- [24] Guo S T, Wu J R, Hu J, et al. Symbiotic seed germination of *Cymbidium mastersii* Griff. ex Lindl. [J]. J Yunnan Univ (Nat Sci), 2012, 34(3): 348–355.
- 郭仕坛, 伍建榕, 胡隽, 等. 大雪兰种子的共生培养研究 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(3): 348–355.