

硬叶兰种子的迁地共生萌发及有效共生真菌的分离和鉴定

盛春玲^{1,2} 李勇毅³ 高江云^{1*}

¹中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303; ²中国科学院研究生院, 北京 100049; ³“国立自然科学博物馆”, 台中 404

摘要 兰科植物的种子原地和迁地共生萌发技术是近年发展起来的开展兰科植物种子和共生真菌研究的有效方法。该研究对兰属(*Cymbidium*)附生植物硬叶兰(*C. mannii*)开展了种子的迁地共生萌发研究, 试图获得其种子萌发的有效真菌。利用硬叶兰成年植株根部周围的树皮、苔藓、枯枝落叶、腐殖质等作为培养基质, 进行种子的共生培养。在培养133天后, 成功地获得了处于不同阶段的已萌发种子、原球茎和幼苗, 并从原球茎中分离得到一种瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)真菌。用所分离到的FCb4菌株和一种从兜唇石斛(*Dendrobium aphyllum*)分离到的胶膜菌属(*Tulasnella*) FDaI7菌株和硬叶兰种子在燕麦琼脂培养基上进行共生萌发, 设置不接菌作为对照处理, 以检验FCb4菌株对硬叶兰种子萌发的有效性。经过58天的培养, 不接菌的对照处理中种子没有萌发, 接种FCb4和FDaI7菌株的处理都有很高的种子萌发率, 两种接菌处理在不同光照条件下的种子萌发率均无显著性差异。但暗培养条件下, 种子萌发形成原球茎后, 表现出生长停滞的趋势, 仅有很少的原球茎继续生长达到幼苗阶段, 说明原球茎发育后期与幼苗发育阶段需要光照。在光照条件下, 接种FCb4菌株处理中达到幼苗阶段种子的比例为(25.67 ± 9.27)%, 显著高于接种FDaI7菌株处理的(3.04 ± 2.27)% ($W = 56, p = 0.026$, Mann-Whitney *U*-test), 表明此研究中分离到的瘤菌根菌属真菌能有效地促使硬叶兰种子萌发并生长发育到幼苗阶段。

关键词 硬叶兰, 种子迁地共生萌发, 兰科植物保护, 原球茎, 共生真菌, 瘤菌根菌属

Ex situ symbiotic seed germination, isolation and identification of effective symbiotic fungus in *Cymbidium mannii* (Orchidaceae)

SHENG Chun-Ling^{1,2}, LEE Yung-I³, and GAO Jiang-Yun^{1*}

¹Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; and ³“National Museum of Natural Science”, Taichung 404, Taiwan, China

Abstract

Aims The *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques, which have been developed in recent years, are effective methods to study the compatible mycorrhizal fungi of orchids. Our aim was to obtain the compatible mycorrhizal fungi of epiphytic *Cymbidium mannii* using the *ex situ* seed baiting technique.

Methods Bark, moss, litter and humus around the roots of adult plants of *C. mannii* were collected as substrate to cultivate *C. mannii* seeds in the laboratory. The fungi were isolated from developed protocorms and identified by morphological and molecular characteristics. The effects of different mycorrhizal fungi and light on seed germination were examined by *in vitro* symbiotic germination.

Important findings The isolated fungus was identified as a species of the genus *Epulorhiza* and was named as FCb4. After 58 days cultivation, seeds inoculated with FCb4 strain and FDaI7 strain (*Tulasnella*, isolated from *Dendrobium aphyllum*) had a high germination ratio, whereas seeds without the fungus failed to germinate. There was no significant difference between the germination ratios of seeds inoculated with FCb4 and FDaI7 strains, but FCb4 was significantly superior for seedling formation and development compared with FDaI7 in light. This indicated a lower degree of symbiotic fungal specificity on seed germination than the protocorm development stage in *C. mannii*. The fungus we obtained was effective for seed germination, and protocorm and seedling development for *C. mannii*. Germination and protocorm production were higher in the dark (0/24 h light/dark) than the light condition (12/12 h light/dark), whereas the subsequent protocorm development was better with light. These findings will aid in seedling production and reintroduction of *C. mannii*.

收稿日期Received: 2012-04-12 接受日期Accepted: 2012-07-24

* 通讯作者Author for correspondence (E-mail: gjy@xtbg.org.cn)

Key words *Cymbidium manii*, *ex situ* symbiotic seed germination, orchid conservation, protocorm, symbiotic fungi, *Tulasnella*

作为植物保护中的“旗舰”类群(flagship group), 兰科植物保护的基础是对其生境的保护、管理和恢复; 世界各国各地区对濒危兰科植物长期的保护实践表明, 基于兰科植物生态学、传粉生物学、繁殖技术、真菌相互关系和种群遗传多样性研究基础上开展的兰科植物回归(reintroduction), 是有效的兰科植物综合保护(integrated conservation)策略(Stewart & Kane, 2007; Swarts *et al.*, 2007; Stewart, 2008)。然而, 兰科植物的回归面临着比其他植物更多的困难, 除了需要综合考虑回归的生境、传粉者、共生真菌以及和其他动植物之间的相互关系外, 回归材料的扩增是首先需要解决的问题。

种子萌发率低和幼苗存活率低是限制濒危兰科植物回归成功的主要因素(Batty *et al.*, 2006; Brundrett, 2007; Smith *et al.*, 2010)。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(Arditti, 1967; Smith & Read, 1997)。根状物(rhizoid)是由兰科植物表皮细胞形成的, 通常形成于萌发的种子和原球茎的表面, 也形成于幼苗的根部(Rasmussen, 1995)。兰科植物幼苗通过根状物附着在基质上, 根状物通过毛细作用吸收水分和养分。菌丝通过种子和原球茎表面的根状物进入植物细胞, 促进胚萌发和原球茎的生长和分化(Williamson & Hadley, 1970)。根状物和胚没有直接关系, 兰科植物种子吸水膨胀后, 表面产生根状物, 真菌菌丝通过根状物进入种子, 为发育不完全的胚提供养分, 从而使种子得以萌发, 根状物是真菌侵染种子和原球茎的重要通道(Rasmussen, 1992)。虽然目前采用人工培养基进行种子无菌萌发的技术已经很成熟, 但无菌萌发的幼苗在进行野外回归时, 移植到自然环境中存活率较低, 并且难以与自然环境中的真菌建立共生关系, 从而导致后续生长严重受限, 而通过种子和真菌在自然条件下共生萌发获得的幼苗在回归到自然生境中后具有较好的环境适应性(Stewart *et al.*, 2003)。因此, 获得兰科植物种子萌发阶段的有效共生真菌, 是开展珍稀濒危兰科植物回归的关键环节, 对兰科植物的有效保护具有重要意义。

长期以来, 用于兰科植物种子共生萌发研究的真菌多是从野生成年植株的根中分离得到的(Rasmussen & Whigham, 1993; Masuhara & Katsuya, 1994; Currah *et al.*, 1997; Zelmer & Currah, 1997; Brundrett *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003), 但由于野生兰科植物根中存在着大量作用未知的内生真菌, 这使得对种子萌发有效真菌的分离和筛选异常复杂而繁琐(柯海丽等, 2007); 并且, 不同种类的兰科植物的成年植株根中的菌根真菌是否也对种子萌发有效并不确定(Zettler *et al.*, 2005)。Rasmussen和Whigham (1993)发明了利用种子袋开展兰科植物种子原地共生萌发的技术(*in situ* seed baiting technique), 将装有种子的特制尼龙袋放置于特定兰科植物的原生境中诱导种子萌发, 从形成的原球茎中分离内生真菌(Batty *et al.*, 2001; Dearnaley, 2007; 柯海丽等, 2007)。基于相同的原理, Brundrett等(2003)发展出了种子迁地共生萌发技术(*ex situ* seed baiting technique), 从生长有兰科植物成年植株的原生境中收集的土壤、树皮、枯枝落叶、腐殖质等作为种子萌发的基质, 在实验室进行种子的萌发诱导, 与原地共生萌发相比, 迁地共生萌发能提供适宜的温湿度条件, 不受野外气候条件限制, 可随时进行实验操作, 同时便于观察种子的萌发过程和监测种子的萌发情况(Brundrett *et al.*, 2003)。

西双版纳是我国兰科植物分布最集中的地区之一, 有着极高的物种多样性(吉占和陈心启, 1995), 占全州面积的19%的石灰岩山森林中有着丰富的兰科植物。近20年来, 由于大面积的毁林开荒和橡胶等经济作物的种植, 使得石灰岩山季节性雨林“片断化”和“破碎化”非常严重, 成为橡胶林中的绿色“孤岛”, 兰科植物生长繁衍的生境受到严重威胁, 加之对一些具有药用或观赏价值的兰科植物的过度采集, 使得这一地区的兰科植物资源遭到严重破坏, 对这一脆弱生境中兰科植物的保护已刻不容缓。

兰属(*Cymbidium*)约有55种, 其中我国分布有49种(Liu *et al.*, 2009)。兰属植物多为地生种类, 但也有附生和腐生的种类。目前对兰属植物与共生真菌的相关研究大多是在地生种类开展的(胡陶等,

2008; Liu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010)。本研究以西双版纳石灰岩山森林中广泛分布的附生兰属植物硬叶兰(*Cymbidium mannii*)为研究对象, 利用种子迁地共生萌发技术诱导种子萌发, 获得原球茎, 分离原球茎中的共生真菌; 将分离得到的真菌和种子在人工培养基上进行共生萌发实验, 筛选出对硬叶兰种子萌发有效的共生真菌, 为开展硬叶兰的回归奠定基础, 同时, 也为西双版纳石灰岩山森林兰科植物的综合保护提供理论依据和技术参考。

1 材料和方法

1.1 研究材料和研究地点

硬叶兰(*Cymbidium mannii*)为兰属附生兰, 广泛分布于东南亚热带、亚热带地区 and 我国南方各省, 附生于海拔100–1 600 m的林中树干上(Liu *et al.*, 2009)。在西双版纳地区, 硬叶兰花期2–4月, 果实于翌年4–5月成熟。在2010年3月硬叶兰开花时, 对栽培于中国科学院西双版纳热带植物园野生兰园的硬叶兰植株进行人工异交授粉, 约390天后(2011年4月)采集果荚泛黄但尚未开裂的成熟蒴果。

野生兰园位于中国科学院西双版纳热带植物园的稀有濒危植物迁地保护区(21°45' N, 101°02' E; 海拔580 m), 属原始沟谷热带雨林, 绒毛番龙眼(*Pometia tomentosa*)和千果榄仁(*Terminalia myriocarpa*)为优势乔木, 平均冠层高度为30 m (Zhang & Cao, 1995)。野生兰园为半自然状态下的野生兰科植物迁地保护园, 收集栽培了约150种不同来源的当地野生兰科植物, 均为从野外移植的成年植株, 大部分兰科植物生长状况良好, 能正常开花, 一些种类可自然结实。野生兰园和西双版纳国家级自然保护区绿石林森林公园相距约2 km, 绿石林森林公园为原始的石灰山热带季节性湿润林, 有包括硬叶兰在内的31属49种兰科植物自然分布其中(Zhou *et al.*, 2012)。

1.2 研究方法

1.2.1 种子的迁地共生萌发

收集硬叶兰成年植株根部20 cm范围内的树皮、苔藓、枯枝落叶、腐殖质等, 在阴凉处自然风干后, 放入搅碎机加无菌蒸馏水搅碎, 作为种子迁地共生萌发的培养基质。滤除基质中多余的水分, 但保持其水分达到饱和状态。在6个直径为9 cm的培养皿中分装入容积的一半基质, 其上覆盖一片孔

径为45 μm 、直径为9 cm的无菌的圆形尼龙布。

将采集的硬叶兰果荚依次用75%的酒精擦拭、1% NaClO溶液浸泡10 min, 无菌水清洗3次后, 用无菌解剖刀切开果荚, 取出种子。种子先采用TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)染色法进行活力检测(Vujanovic *et al.*, 2000), 确保用于实验的种子活力为90%以上。除用于共生萌发实验的种子外, 其余的种子用无菌滤纸包好, 置于22 $^{\circ}\text{C}$, 用硅胶干燥24 h后, 存于无菌密闭玻璃小瓶中, 于–20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存(Batty *et al.*, 2001), 用于后续实验。

将用于萌发的种子和1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 无菌琼脂溶液加入有盖玻璃瓶中充分摇匀, 制作成种子悬浮液, 用移液枪吸取定量的种子悬浮液(约含90粒种子)均匀播撒在1 $\text{cm} \times 1 \text{ cm}$ 孔径为45 μm 的无菌尼龙布方片上。把播种好的尼龙布方片放置到已经准备好的培养皿中尼龙布上, 每个培养皿10片无菌尼龙布。把培养皿放入人工气候箱内, 于恒温(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、光照12/12 h 光/暗、光照强度为2 000 lx的条件下进行培养。定期检测, 确保培养基质湿润。监测各培养皿中种子的萌发情况, 参照Stewart等(2003)和Wang等(2011)的方法对种子萌发和原球茎发育情况进行分级描述(表1)。需要说明的是, 阶段1的“根状物”的产生, 并非一定与种子的真正萌发(胚萌发)有一一对应的关系, 即: 即使根状物产生了, 种子并不一定能够萌发, 其他因素也可能影响种子的萌发; 但没有根状物产生, 种子就一定不能萌发。在这个分级标准里, 虽然说阶段1为“视为萌发”, 真正意义上的种子萌发应该是阶段1至阶段3, 因为兰科植物种子的特殊性, 人为把其划分为这几个阶段, 完全是为了研究的方便。目前, 有关兰科植物种子萌发和真菌相互关系的研究相对较少, 很多作用机理并不清楚, 在没有更好的分级标准前, 这个分级标准在某种程度上是可行的。

记录每一阶段内种子、原球茎或幼苗的数量, 计算种子萌发率(G)及各阶段的种子、原球茎或幼苗的比率(K)。即 $G = g / t$; $K = k / t$, 其中, g 为培养皿中已萌发的种子数; k 为培养皿中各阶段的种子、原球茎或幼苗的数; t 为播种的种子总数。

1.2.2 原球茎被真菌侵染情况观察

当种子萌发形成原球茎后, 通过组织切片与染色来检测不同阶段原球茎被真菌侵染的情况。将原球茎浸于多聚甲醛-戊二醛固定液(2%多聚甲醛、

表1 硬叶兰种子不同萌发阶段
Table 1 Different germination stages of *Cymbidium mannii* seeds

萌发阶段 Germination stage	描述 Description
0	未萌发的种子 Ungerminated seed
1	种胚膨大, 产生根状物(视为萌发) Enlarged embryo, production of rhizoid(s) (= germination)
2	种胚继续膨大, 突破种皮(形成原球茎) Continued embryo enlargement, rupture of testa (= protocorm formation)
3	出现原生分生组织(原球茎发育阶段) Appearance of protomeristem (protocorm development)
4	长出第一片叶片及后续生长(幼苗发育初期) Emergence of first leaf and continue development (early stage of seedling development)

2.5%戊二醛、0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液, pH = 7.2)中, 置于4 ℃固定24 h后, 用0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液重复浸洗3次, 每次15 min, 分别用15%、30%、50%和70%的酒精, 依次对原球茎进行脱水30 min至无水阶段; 脱水后渐进置于Historesin树脂中, 再进行树脂聚合。聚合后, 将树脂块于切片机上进行连续切片, 切片厚度为3 μm; 将切片粘贴于载玻片上, 阴干后利用过碘酸希夫染色法(Periodic Acid Schiff Stain)以及1%靛氨黑(amido black 10 B)或1%甲苯胺蓝(toluidine blue O)进行组织化学染色(Yeung, 1999)。染色后于光学显微镜(Axioskop 2, Carl Zeiss AG, Jena, Germany)下观察, 并拍照记录。

1.2.3 原球茎内生真菌的分离

当通过组织学切片染色实验观察到原球茎已被真菌侵染时, 即可进行原球茎内生真菌的分离。采用马铃薯葡萄糖培养基(PDA; 200 g·L⁻¹马铃薯+20 g·L⁻¹葡萄糖+12 g·L⁻¹琼脂, 不需要调pH)作为真菌诱导分离的培养基, 灭菌后分装于直径为9 cm的无菌培养皿中。将获得的10个原球茎用1% NaClO溶液表面灭菌5 min后用无菌水清洗3–4次, 在超净工作台上用无菌刀片将原球茎横切成两半, 切口面贴于PDA培养基表面上; 另一组3个原球茎不切开直接置于PDA培养基中。用封口膜将培养皿封好, 标记后放入人工气候箱内, (25 ± 2) ℃条件下黑暗培养(王娣等, 2007)。

培养一段时间后, 待原球茎切口处长出菌丝时, 在超净工作台上进行真菌的分离, 用无菌接种针挑取原球茎切口处真菌菌落边缘菌丝于新的PDA培养基上。待新的菌丝长出后, 不断挑取菌丝尖端到新的PDA培养基上做系列转移, 转移3–5次后, 可得纯菌落。采用PDA试管斜面法对得到的真

菌于4 ℃进行保存(白毓谦等, 1987)。

1.2.4 真菌对种子萌发的有效性检测

参照Dixon (1987)的方法进行种子与真菌在人工培养基上的共生萌发实验。采用燕麦琼脂培养基(OMA; 4 g·L⁻¹燕麦+8 g·L⁻¹的琼脂, pH = 5.8)作为真菌和种子共生萌发培养基。将保存的硬叶兰种子进行解冻和灭菌(McKendrick, 2000), 制作成无菌种子悬浮液。在OMA培养基表面平行放置两张1 cm × 4 cm的无菌滤纸条, 用移液枪吸取150 μL种子悬浮液(约80粒种子)均匀播种在每张滤纸条上。在培养基中间接种约1 × 1 × 0.5 cm³、含有单一分离得到的真菌(编号为FCb4)的纯培养物的琼脂块, 用封口膜将培养皿密封好。设置2组对照, 一组接种从硬叶兰同一生境中的兜唇石斛(*Dendrobium aphyllum*)原球茎内分离到的胶膜菌属(*Tulasnella*)真菌(编号为FDa17); 另一组不接菌。每组重复20个培养皿, 在人工培养箱内(25 ± 2) ℃下恒温培养, 每组各10个培养皿分别进行光照(12/12 h, 光/暗)和黑暗(0/24 h, 光/暗)培养。

每周监测种子的萌发情况, 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, 按表1的分级标准统计并计算种子萌发率(*G*)、原球茎形成的比率(*C*), 以及处于各萌发阶段的种子、原球茎或幼苗的比率(*K*)。计算方法同前所述, 其中, $C = c / t$, *c*为每种处理下的各培养皿中形成原球茎的种子数(阶段2、3、4之和)。

对不同处理的种子萌发率、原球茎形成比率及各阶段的萌发种子、原球茎或幼苗比率进行显著性差异分析。数据进行反正弦转换后符合残差正态分布的采用双因素方差分析(two-way ANOVA), 并利

用最小显著差数法(LSD)进行多重比较; 数据转换后仍不满足残差正态分布的采用非参数检验中的曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U-test)进行分析。所有数据采用R软件(version 2.14.2)进行分析。

1.2.5 真菌种类的分子鉴定

在PDA平板培养基上对保存的真菌菌株活化后, 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PDA培养基, 于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 振荡培养, 待有大量菌球产生时, 挑取4-5个直径约为0.5 mm的菌球, 利用CTAB法提取待测真菌DNA (Weising *et al.*, 1995)。采用ITS1和ITS4引物进行PCR扩增 (White *et al.*, 1990), 扩增反应在PCR仪(GeneAmp 9700, Applied Biosystems, Foster, USA)上进行。PCR循环为: 94°C 预变性3 min, 循环1次; 94°C 变性1 min, 51°C 退火1 min, 72°C 延伸1 min, 30次循环; 最后 72°C 延伸10 min (段春芳等, 2010)。PCR扩增产物纯化后送上海生工生物工程有限公司进行测序, 将得到的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对比分析。

2 结果

2.1 硬叶兰种子的迁地共生萌发

在进行迁地共生萌发培养的6个培养皿中, 2个培养皿在培养过程中由于有大量杂菌污染, 不计入统计结果。其余4个培养皿在培养5周后陆续观察到种子萌发和原球茎形成。在培养133天时, 4个培养皿中均可观察到处于不同萌发阶段的种子、原球茎和幼苗(图1), 种子萌发率(G)为 $(49.81 \pm 19.09)\%$ ($\text{mean} \pm \text{SE}, n = 4$), 其中, 达到阶段1-4所占的比例分别为: $K_1 = (42.18 \pm 8.97)\%$, $K_2 = (5.34 \pm 2.66)\%$, $K_3 = (1.37 \pm 1.29)\%$, $K_4 = (0.92 \pm 0.69)\%$ ($n = 4$)。

2.2 原球茎被真菌侵染情况的观察

培养133天时, 对未萌发种子和不同阶段的原球茎进行组织学切片观察, 可以清楚地看到未萌发的种子并没有被真菌侵染, 而不同阶段的原球茎被真菌侵染的程度不同, 原球茎形成的初期, 仅基部被菌丝团侵染, 当原球茎形成顶端原生分生组织时, 菌丝团较多, 可以观察到原球茎中大量被消化的菌丝团(图2)。

2.3 原球茎内生真菌的分离

原球茎在PDA培养基培养7天后, 未切开的3个

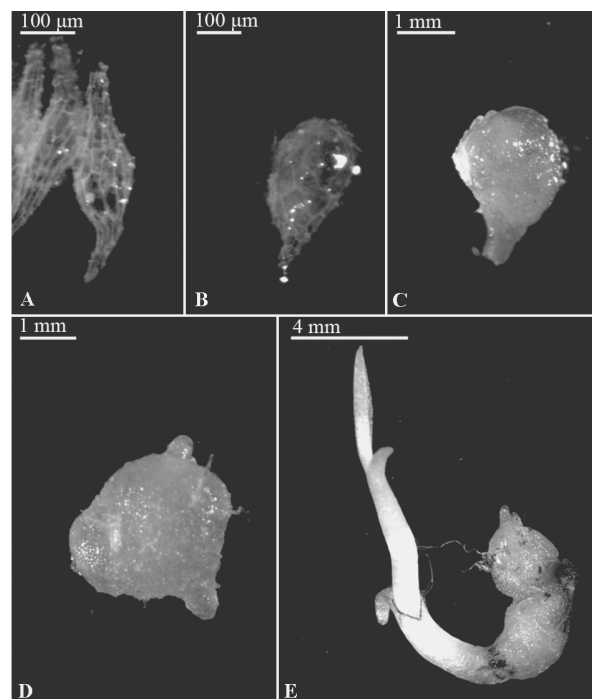


图1 硬叶兰种子迁地共生萌发133天后, 处于不同阶段的种子、原球茎和幼苗。A, 阶段0, 未萌发的种子。B, 阶段1, 种胚膨大, 产生根状物(视为萌发)。C, 阶段2, 种胚继续膨大, 突破种皮(形成原球茎)。D, 阶段3, 原球茎膨大, 出现原生分生组织。E, 阶段4, 幼苗。

Fig. 1 Seed, protocorm and seedling of *Cymbidium mannii* in different germination stages after 133 days of *ex situ* symbiotic seed germination. A, Stage 0, ungerminated seed. B, Stage 1, enlarged embryo, production of rhizoid(s) (= germination). C, Stage 2, continued embryo enlargement, rupture of testa (= protocorm formation). D, Stage 3, protocorm enlarges with appearance of protomeristem. E, Stage 4, seedling.

原球茎周围没有长出菌丝, 而切开的10个原球茎中有7个周围长出白色菌丝。从分别培养的7个原球茎分离的真菌, 经过3-4次纯化培养, 得到7个纯菌落, 分别命名为FCb1-FCb7。7个菌株在PDA培养基于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 黑暗培养12天后, 观察到具有相同的菌株菌落形态及菌丝显微结构。接种到新的PDA培养基上10天左右菌丝可长满整个培养皿, 菌落平, 气生菌丝白色, 平贴于培养基表面, 无菌核, 菌丝分支, 有隔, 生长迅速。

2.4 真菌对种子萌发的有效性检测

在开展的3组种子萌发培养实验中, 不接菌的对照组没有观察到种胚明显膨胀并产生根状物, 达到阶段1的种子; 2组接菌的处理中, 在培养1周后, 均观察到有种子明显膨胀, 并产生根状物, 达到阶段1, 培养2周后, 观察到原球茎(阶段2)。

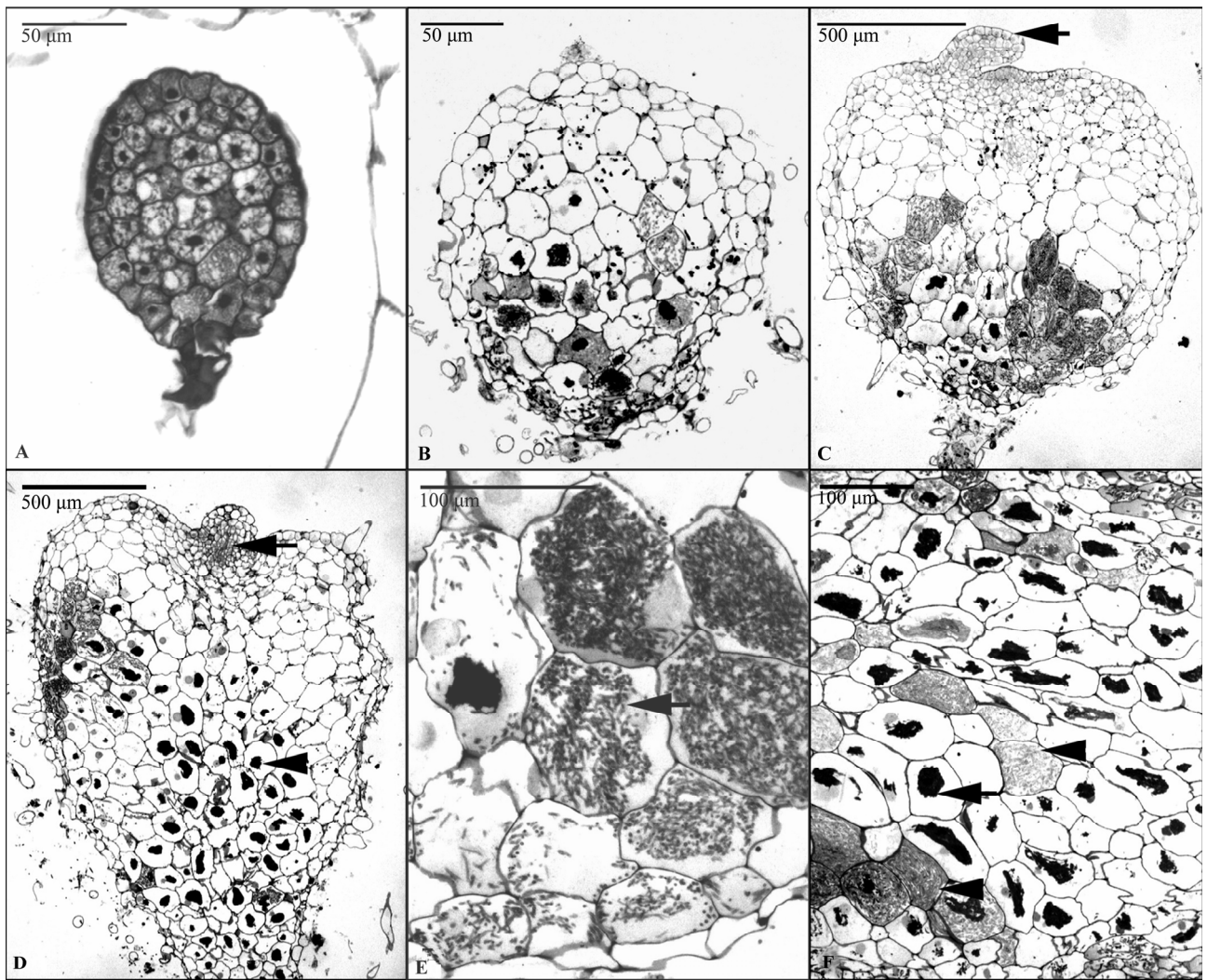


图2 硬叶兰种子及原球茎切片图。A, 未萌发的种子, 没有真菌侵染。B, 原球茎阶段, 菌丝团侵染原球茎基部。C, 原球茎形成第一片突起物(箭), 菌丝团侵染原球茎基部。D, 原球茎继续膨大, 形成顶端原生分生组织(箭), 此时菌丝团(箭头)较多。E, 图C的局部放大图, 箭所指为松散的菌丝团。F, 图D的局部放大图, 箭所指为被消化的菌丝团, 箭头所指为松散的菌丝团。

Fig. 2 Cross-section of seed and protocorm of *Cymbidium mannii*. A, Ungerminated seed without fungi infection. B, Protocorm with fungi infection on the base. C, Protocorm forms the first thrust (arrow), and fungi infect the base of protocorm. D, Protocorm enlarges with appearance of protomeristem (arrow) with lots of pelotons (arrowhead). E, Partial enlarged drawing of Fig. C, arrow indicates loosened pelotons. F, Partial enlarged drawing of Fig. D, arrow indicates digested pelotons, and arrowhead indicates loosened pelotons.

在培养58天时检测到有的培养皿中已有幼苗(阶段4)形成, 此时对所有不同处理的培养皿开盖进行种子萌发率和萌发情况统计, 其中接种FCb4菌株的实验组中共有6个培养皿中有杂菌污染, 不计入统计结果。结果表明, 不同真菌种类及光照条件对种子萌发率(G)均有显著影响, 不同真菌种类及真菌与光照的交互作用则没有显著影响(双因素方差分析(two-way ANOVA), 接菌处理, $F = 82.545$, $df = 2$, $p < 0.001$; 光照条件, $F = 5.216$, $df = 1$, $p =$

0.027 ; 接菌和光照处理, $F = 0.306$, $df = 1$, $p = 0.582$)。不接菌组光照培养条件($n = 10$)和黑暗培养条件($n = 10$)下都没有种子萌发(表2), 而2种接菌处理中, 接种本研究分离到的FCb4菌株实验组在光照和黑暗培养条件下的种子萌发率分别为($73.64 \pm 6.14\%$) ($n = 7$)和($85.04 \pm 5.15\%$) ($n = 7$); 接种FDa17菌株处理组中, 光照和黑暗培养条件下的种子萌发率分别为($69.82 \pm 3.80\%$) ($n = 10$)和 ($75.20 \pm 5.49\%$) ($n = 10$), 均显著高于相同光照条件下未接菌实验

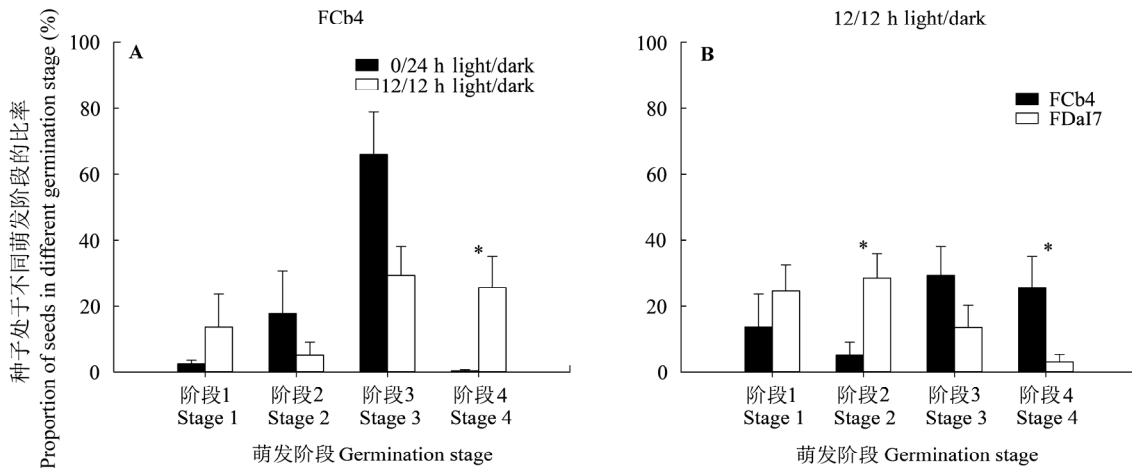


图3 培养58天后硬叶兰种子处于不同萌发阶段的比率(平均值±标准误差)。**A**, 接种FCb4菌株处理在不同光照条件下, 各阶段萌发的种子、原球茎和幼苗的比率。**B**, 接种FCb4和FDa17菌株处理在光照条件下(12/12 h 光/暗), 各阶段萌发的种子、原球茎和幼苗的比率。*表示同一阶段不同处理之间差异显著($\alpha = 0.05$)。

Fig. 3 Proportion of *Cymbidium mannii* seeds in different germination stages after 58 days cultivation (mean $\pm$ SE). **A**, Proportion of germinated seeds, protocorms and seedlings in different germination stages in the treatment inoculated with FCB4 strain under different light conditions. **B**, Proportion of germinated seeds, protocorms and seedlings in different germination stages in the treatments inoculated with FCB4 and FDa17 strains under the light condition (12/12 h light/dark). * indicates the significant difference between different treatments within the same stage ($\alpha = 0.05$).

表2 在不同处理下培养58天后硬叶兰种子的萌发率、形成原球茎的比率, 以及处于不同阶段的已萌发种子、原球茎和幼苗的比率(平均值±标准误差)

Table 2 Seed germination percentage, protocorm ratio and the proportion of germinated seeds, protocorms and seedlings in different germination stages in different treatments after 58 days cultivation for *Cymbidium mannii* (mean $\pm$ SE)

处理 Treatment	光照 Photoperiod (h Light/Dark)	重复 Replication	萌发率 Germination (%)	原球茎比率 Protocorm ratio (%)	不同阶段萌发的种子、原球茎或幼苗的比率 Proportion of germinated seeds, protocorms and seedlings in different stages (%)			
					阶段1 Stage 1	阶段2 Stage 2	阶段3 Stage 3	阶段4 Stage 4
FCb4菌株 FCb4 strain	12/12	7	73.64 $\pm$ 6.14	60.0 $\pm$ 12.08	13.63 $\pm$ 9.95	5.05 $\pm$ 4.05	29.30 $\pm$ 8.82	25.67 $\pm$ 9.27
	0/24	7	85.04 $\pm$ 5.15	83.89 $\pm$ 5.42	2.48 $\pm$ 1.06	17.7 $\pm$ 12.85	66.6 $\pm$ 13.05	0.35 $\pm$ 0.35
FDa17菌株 FDa17 strain	12/12	10	69.82 $\pm$ 3.80	45.11 $\pm$ 8.74	24.47 $\pm$ 7.94	28.56 $\pm$ 7.35	13.51 $\pm$ 6.75	3.04 $\pm$ 2.27
	0/24	10	75.20 $\pm$ 5.49	66.13 $\pm$ 8.56	9.48 $\pm$ 6.43	13.38 $\pm$ 4.72	50.56 $\pm$ 8.88	2.42 $\pm$ 1.00
对照 CK	12/12	10	0	0	0	0	0	0
	0/24	10	0	0	0	0	0	0

组(LSD, $p < 0.001$)。

光照条件对硬叶兰种子形成原球茎有显著影响, 不同真菌种类及真菌与光照的交互作用则没有显著影响(双因素方差分析, 光照条件, $F = 6.746$, $df = 1$, $p = 0.014$; 接菌处理, $F = 3.548$, $df = 1$, $p = 0.069$; 接菌和光照处理, $F = 0.056$, $df = 1$, $p = 0.814$)。同时, 两种接菌处理在暗培养条件下, 种子萌发形成原球茎后, 表现出生长停滞的趋势, 仅很

少的原球茎继续生长达到幼苗阶段(表2)。接种FCb4菌株处理中, 光照条件下种子生长到幼苗阶段(阶段4)的比例为(25.67 $\pm$ 9.27)% ($n = 7$), 显著高于暗培养条件下的(0.35 $\pm$ 0.35)% ($n = 7$; $W = 8$, $p = 0.020$, 曼-惠特尼U检验; 图3A), 也显著高于接种FDa17菌株光照处理条件下的比例(3.04 $\pm$ 2.27)% ($n = 7$; $W = 56$, $p = 0.026$, 曼-惠特尼U检验; 图3B)。说明只有菌株FCb4在光照条件下才能有效地促使

硬叶兰种子生长发育到幼苗阶段。

2.5 真菌种类的分子鉴定

从硬叶兰原球茎内分离到的7株菌株测序后,得到的ITS片段序列在NCBI中进行BLAST对比分析,均与登录号为AJ313440.1的瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)真菌最为相似,最大相似度为98%, *E*值为0。根据菌株形态及分子鉴定结果判定,从硬叶兰原球茎内分离到的真菌为瘤菌根菌属真菌。

3 讨论

获得兰科植物种子萌发阶段的有效共生真菌,是开展珍稀濒危兰科植物回归的关键环节,同时,在兰科植物保护和药用兰科植物的生产上也具有广泛的运用前景。利用种子袋开展的兰科植物种子原地共生萌发技术,已成为近年来发展起来的开展兰科植物种子和共生真菌研究的有效方法(Rasmussen & Whigham, 1993; McKendrick, 2000; Batty *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2011),从种子原地共生萌发形成的原球茎中分离对种子萌发有效的共生真菌,避免了以往从菌根中分离真菌的诸多问题,能简便、有效地获得兰科植物种子萌发阶段的有效共生真菌(Hollick, 2004; Wang *et al.*, 2011)。在此基础上发展起来的兰科植物种子迁地共生萌发技术,具有不受野外条件限制,能方便地对种子萌发的全过程进行监测和记录种子萌发情况等优点(Brundrett *et al.*, 2003)。

本研究利用成年植株根部周围的树皮、苔藓、枯枝落叶、腐殖质作为培养基质,开展硬叶兰种子的迁地共生萌发研究,在培养133天后,4个有效的培养皿中均有处于不同阶段的已萌发种子、原球茎和幼苗。迁地共生萌发的培养基质是决定种子萌发并形成原球茎,进而发育成幼苗的关键因素之一。虽然本研究的基质采集于野生兰园中迁地栽培的硬叶兰周围,但由于是从野外原生地移植的硬叶兰成年植株,移植时可能带有种子萌发阶段的共生真菌,同时野生兰园处于硬叶兰自然分布区域,有利于移植后真菌的生长,实验证明本研究成功地获得了硬叶兰的原球茎和幼苗。

对获得的原球茎进行组织学切片观察,可以看到原球茎已被真菌侵染,从分别培养的7枚原球茎分离到7个菌株(FCb1–FCb7),根据菌株形态及分子鉴定结果判定为瘤菌根菌属真菌。每个原球茎只分

离到1种内生真菌,也说明通过种子的迁地共生萌发获得原球茎,进而获得对种子萌发有效的共生真菌是简便有效的方法。目前已报道的兰科植物的共生真菌集中在蜡壳菌科、胶膜菌科和角担菌科。其中胶膜菌科的无性态属瘤菌根菌属真菌及与其对应的有性态属胶膜菌属真菌被证明是可以促进多种兰科植物种子萌发的有效真菌(Liu *et al.*, 2010)。胡陶等(2008)从地理分布不同的5种兰属植物中分离得到11个有代表性的菌根真菌菌株,鉴定为无性态的瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)真菌。通过鉴定结果推测,瘤菌根菌属真菌是与兰属植物形成菌根结构最普遍的真菌(胡陶等, 2008)。本研究结果进一步证实了这一推测。

Wu等(2010)将4株均属于角担菌科丝核菌属(*Rhizoctonia*)的真菌菌株接种到春兰(*C. goeringii*)种苗上。结果表明从春兰根中分离的2株真菌比从其他2种兰属植物根中分离到的2株真菌作用效果显著,说明春兰在种苗生长阶段与其共生真菌具有专一性。Rasmussen (1995)推测附生兰对真菌的依赖程度要小于地生兰。Liu等(2010)认为附生兰在种子萌发阶段是需要共生真菌的,只是在种子萌发阶段,附生兰与真菌关系的专一程度要小于地生兰。本研究仅对硬叶兰在种子萌发阶段与其共生真菌的专一性进行了探讨。

本研究中,接种FCb4菌株和FDa17菌株的处理在培养58天时,都有很高的种子萌发率,且均显著高于未接菌对照组(*LSD*, $p < 0.001$),说明2种真菌均能有效地促进硬叶兰种子萌发。Moore (1987)以真菌桶孔隔膜超微结构特征等形态学鉴定标准对原来隶属于丝核菌属的兰科菌根真菌重新研究后,建立了3个新属:角菌根菌属(*Ceratorhiza*)、瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)和念珠菌根菌属(*Moniliopsis*),对应的有性世代分别是:角担菌属(*Ceratobasidium*)、胶膜菌属(*Tulasnella*)和蜡壳菌属(*Sebacina*),因此,本研究从兜唇石斛原球茎中分离到的FDa17菌株(胶膜菌属)与从硬叶兰原球茎中分离到的FCb4菌株(瘤菌根菌属)实际为同一属真菌。两种接菌处理在相同光照条件下的种子萌发率均无显著性差异,说明硬叶兰在种子萌发阶段在属的水平上与共生真菌的专一性不强。在光照条件下,接种FCb4菌株的实验组在阶段3和阶段4形成的原球茎和幼苗的比率要高于接种FDa17菌株实验组,且在阶段4达到显著差

异($W = 56, p = 0.026$)。说明硬叶兰在原球茎发育后期及幼苗发育初期阶段在物种水平上与共生真菌具有较强的专一性, 本研究中分离到的FCb4菌株不仅对硬叶兰种子萌发阶段有效, 而且能有效地促使硬叶兰种子生长发育到幼苗初期阶段。

一般来说, 地生兰种子萌发阶段更倾向于黑暗条件(Godo *et al.*, 2010), 一些研究发现光照对一些地生兰种子的萌发有限制作用(Arditti *et al.*, 1981; Ernst, 1982; Yamazaki & Miyoshi, 2006); 而附生兰种子通常在有光条件和黑暗条件下都可以萌发(Arditti, 1967; Arditti & Ernst, 1984)。在本研究中, 两种接菌处理在暗培养条件下, 硬叶兰种子萌发形成原球茎的比率要显著高于有光条件下的实验组, 但是种子萌发形成原球茎后, 表现出生长停滞的趋势, 仅有很少的原球茎继续生长达到幼苗阶段, 同时, 在接种FCb4菌株的处理中, 光照条件下原球茎发育形成幼苗(阶段4)的比率要显著高于黑暗条件($W = 8, p = 0.020$)。这些结果说明, 黑暗条件更有利于硬叶兰原球茎的形成, 而在原球茎发育后期与幼苗发育阶段, 则需要光照。这与自然环境中硬叶兰的生活史一致, 硬叶兰附生于林中的树干上, 可能其种子在萌发阶段通常在附生植物树皮裂缝或岩石缝隙中, 当萌发形成原球茎后需要光照继续发育成为幼苗。

本研究利用种子迁地共生萌发技术成功地得到了硬叶兰的原球茎, 并从中分离出了对硬叶兰种子萌发有效的共生真菌, 为进一步开展硬叶兰种苗的繁育和野外回归奠定了基础, 为我国热带附生兰科植物的综合保护提供了新的思路和研究案例。

致谢 国家自然科学基金(31170358)和海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室开放课题资助。感谢西南林业大学伍建榕教授和云南农业大学杨根华教授在本研究中给予的指导和帮助。

参考文献

- Arditti J (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33, 1–97.
- Arditti J, Ernst R (1984). Physiology of germination orchid seeds. In: Arditti J ed. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, Vol. 3. Cornell University Press, New York. 177–222.
- Arditti J, Michaud JD, Oliva AP (1981). Seed germination of North American orchids. I. Native California and related

- species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia*, and *Platanthera*. *Botanical Gazette*, 142, 442–453.
- Bai YQ (白毓谦), Fang SK (方善康), Gao D (高东), Shi AH (施安辉) (1987). *Microbiology Experiment Technology* (微生物实验技术). Shandong University Press, Ji'nan. (in Chinese)
- Batty AL, Brundrett MC, Dixon KW, Sivasithamparam K (2006). *In situ* symbiotic seed germination and propagation of terrestrial orchid seedlings for establishment at field sites. *Australian Journal of Botany*, 54, 375–381.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett M, Sivasithamparam K (2001). Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a mediterranean bushland. *New Phytologist*, 152, 511–520.
- Brundrett MC (2007). Scientific approaches to Australian temperate terrestrial orchid conservation. *Australian Journal of Botany*, 55, 293–307.
- Brundrett MC, Scade A, Batty AL, Dixon KW, Sivasithamparam K (2003). Development of *in situ* and *ex situ* seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. *Mycological Research*, 107, 1210–1220.
- Currah RS, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA (1997). Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J, Pridgeon AM eds. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, VII. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 117–170.
- Dearnaley JDW (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17, 475–486.
- Dixon K (1987). Raising terrestrial orchids from seed. In: Harris WK ed. *Modern Orchid Growing for Pleasure and Profit*. Orchid Club of South Australia, Inc., Adelaide. 44–100.
- Duan CF (段春芳), Li ZL (李枝林), Fang F (方飞), Yang GH (杨根华), Chen SS (陈思思), Hong QY (洪群艳) (2010). Isolation and identification research of mycorrhizal isolated from several orchids in Yunnan Province. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* (西南农业学报), 23, 756–759. (in Chinese with English abstract)
- Ernst R (1982). Orchid seed germination and seedling culture—a manual: *Paphiopedilum*. In: Arditti J ed. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Cornell University Press, New York. 350–353.
- Godo T, Komori M, Nakaoki E, Yukawa T, Miyoshi K (2010). Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 46, 323–328.
- Hollick PS (2004). *Mycorrhizal Specificity in Endemic Western*

doi: 10.3724/SP.J.1258.2012.00859

- Australian Terrestrial Orchids (Tribe Diurideae): Implications for Conservation*. PhD dissertation, Murdoch University, Perth.
- Hu T (胡陶), Li LB (李潞滨), Yang K (杨凯), Tang Z (唐征), Liu ZJ (刘振静), Zhuang CY (庄彩云), Peng ZH (彭振华) (2008). Isolation and identification of *Cymbidium* mycorrhizae of China. *Journal of Beijing Forestry University* (北京林业大学学报), 30, 132–135. (in Chinese with English abstract)
- Ke HL (柯海丽), Song XQ (宋希强), Tan ZQ (谭志琼), Liu HX (刘红霞), Luo YB (罗毅波) (2007). The technique of orchid seeds baiting *in situ* and its applications. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 43, 125–129. (in Chinese with English abstract)
- Liu HX, Luo YB, Liu H (2010). Studies of mycorrhizal fungi of Chinese orchids and their role in orchid conservation in China—a review. *The Botanic Review*, 76, 241–262.
- Liu ZJ, Chen XQ, Cribb PJ (2009). *Cymbidium* Swartz. In: Wu ZY, Raven PH, Hong DY eds. *Flora of China*, Vol. 25. Science Press & Missouri Botanical Garden Press, Beijing & St. Louis. 264.
- Masuhara G, Katsuya K (1994). *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*, 127, 711–718.
- McKendrick S (2000). *In Vitro Germination of Orchids: a Manual*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation. <http://orchideenvermehrung.at/downloads/seed%20sowing%20manual.pdf>. Cited 10 April 2012.
- Moore RT (1987). The genera of *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon*, 29, 91–99.
- Rasmussen HN (1992). Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiologia Plantarum*, 86, 161–167.
- Rasmussen HN (1995). *Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rasmussen HN, Whigham DF (1993). Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany*, 80, 1374–1378.
- Smith SE, Read DJ (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York.
- Smith ZF, James EA, Mclean CB (2010). Mycorrhizal specificity of *Diuris fragrantissima* (Orchidaceae) and persistence in a reintroduced population. *Australian Journal of Botany*, 58, 97–106.
- Stewart SL (2008). Orchid reintroduction in the United States: a mini-review. *North American Native Orchid Journal*, 14, 54–59.
- Stewart SL, Kane ME (2007). Orchid conservation in the Americas—lessons learned in Florida. *Lankesteriana*, 7, 382–387.
- Stewart SL, Zettler LW, Minso J, Brown PM (2003). Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. *Selbyana*, 24, 64–70.
- Swarts ND, Batty AL, Hopper SD, Dixon KW (2007). Does integrated conservation of terrestrial orchids work? *Lankesteriana*, 7, 219–222.
- Tsi ZH (吉占和), Chen SC (陈心启) (1995). Miscellaneous notes on orchids in Xishuangbanna of Yunnan, China. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), 33, 281–296. (in Chinese with English abstract)
- Vujanovic V, St-Arnaud M, Barabé D, Thibeault G (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, 86, 79–86.
- Wang H, Fang HY, Wang YQ, Duan LS, Guo SX (2011). *In situ* seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2051–2059.
- Wang D (王娣), Jia SH (贾书华), Zhang ZX (张兆轩), Cai YP (蔡永萍), Lin Y (林毅) (2007). Isolation and culture of an endophytic fungus associated with *Dendrobium huoshanense* and its effects on the growth of plantlets. *Journal of Fungal Research* (菌物研究), 5, 84–88. (in Chinese with English abstract)
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1995). *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York. 315–322.
- Williamson B, Hadley G (1970). Penetration and infection of orchid protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and other *Rhizoctonia* isolates. *Phytopathology*, 60, 1092–1096.
- Wu JR, Ma HC, Lü M, Han SF, Zhu YY, Jin H, Liang JF, Liu L, Xu JP (2010). *Rhizoctonia* fungi enhance the growth of the endangered orchid *Cymbidium goeringii*. *Botany*, 88,

- 20–29.
- Yamazaki J, Miyoshi K (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98, 1197–1206.
- Yeung EC (1999). The use of histology in the study of plant tissue culture systems—some practical comments. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 35, 137–143.
- Zelmer CD, Currah RS (1997). Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with naturally occurring endophyte. *Lindleyana*, 12, 142–148.
- Zettler LW, Piskin KA, Stewart SL, Hartsock JJ, Bowles ML, Bell TJ (2005). Protocorm mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley, and a technique to prompt leaf elongation in seedlings. *Studies in Mycology*, 53, 163–171.
- Zhang JH, Cao M (1995). Tropical forest vegetation of Xishuangbanna, SW China and its secondary changes, with special reference to some problems in local nature conservation. *Biological Conservation*, 73, 229–238.
- Zhou X, Lin H, Fan XL, Gao JY (2012). Autonomous self-pollination and insect visitation in a saprophytic orchid, *Epipogium roseum* (D. Don) Lindl. *Australian Journal of Botany*, 60, 154–159.

责任编辑: 黄振英 责任编辑: 王 威