



不同真菌对2种药用石斛种子共生萌发的效应

字肖萌^{1,2}, 高江云^{1*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园 综合保护中心, 云南 勐腊 666303;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

【摘要】 兰科石斛属植物兜唇石斛 *Dendrobium aphyllum* 和齿瓣石斛 *D. devonianum* 均为传统中药材, 有着极高的药用价值。研究利用3种从不同兰科植物中分离得到的内生真菌在不同光照条件下与这2种石斛植物种子在树叶、松树皮和椰糠混合基质上进行共生萌发试验。研究结果表明, 胶膜菌属 *Tulasnella* FDal7 菌株及瘤菌根菌属 *Epulorhiza* FDd1 菌株分别能有效地促进兜唇石斛和齿瓣石斛种子的萌发及幼苗建成, 石斛与真菌存在共生专一性。共生培养60 d, 接菌 FDal7 的兜唇石斛种子, 原球茎或幼苗形成率分别为14.46%, 12.07%; 接菌 FDd1 的齿瓣石斛种子, 二者形成率分别为44.36%, 42.91%。在2种光照条件下, 已形成的原球茎均能够进一步发育为幼苗, 而持续黑暗条件会导致幼苗白化或畸形。研究结果为2种石斛的野外回归奠定了理论基础, 也为这2种药用石斛人工仿生态栽培的种苗扩繁提供了新的方法。

【关键词】 兜唇石斛; 齿瓣石斛; 种子共生萌发; 人工混合基质; 共生专一性

兰科植物的种子非常细小, 成熟的种子没有胚乳或子叶, 仅有未分化的胚, 在自然条件下需要依靠特定共生真菌提供营养来促进其萌发和发育^[1-3]。目前, 利用兰科植物种子在人工无菌培养基上进行非共生萌发的技术已经非常成熟, 使得通过种子大规模繁殖幼苗得以实现, 这在一些药用和观赏兰科植物的商业化生产中已得以广泛应用。非共生萌发技术的优点是种子萌发率较高, 一般在95%以上^[4], 但幼苗移植到自然环境当中存活率较低, 很难与真菌重新建立共生关系而导致后续的生长发育受到严重的抑制^[5-6]。兰科植物种子的共生萌发, 是在人工基质中播种种子并接种共生真菌, 利用真菌共生来促进种子萌发和获得幼苗。从理论上说, 共生萌发不仅能简化幼苗生产过程, 大大降低生产成本, 更重要的是能显著提高幼苗回归到自然环境中的存活率和幼苗生长速度^[7]。兰科植物种子共生萌发技术的应用, 在珍稀濒危兰科植物的回归、药用兰科植物的仿生态栽培等方面都具有巨大的潜在应用价值。

兰科石斛属 *Dendrobium* 的很多种类作为传统

的药材和保健品在我国利用历史悠久, 素有“中华仙草”之美称。西双版纳是我国石斛的主产区之一, 有野生石斛43种、1变种^[8], 其中有22种被加工成石斛商品^[9]。齿瓣石斛 *D. devonianum* 在业界被叫做“紫草”, 制成的成品称作“紫皮枫斗”, 市场价值很高。齿瓣石斛是目前人工集约化栽培规模仅次于铁皮石斛的种类, 其在西双版纳地区花期为4—5月, 附生于林中树干上, 其主要海拔分布范围为1 100~1 600 m, 和茶叶的最佳种植海拔重叠, 在很多茶园茶树上都有自然生长的齿瓣石斛。兜唇石斛 *D. aphyllum* 为西双版纳地区一种常见的石斛, 花期3—4月, 常附生于海拔600~1 000 m的林中树干或岩石上。其茎杆是加工各类药用石斛产品, 如石斛粉、石斛酒、石斛饮料等最主要的原料之一。

在人工自然或半自然条件下, 开展石斛的仿生态栽培, 相对于目前开展的人工集约化栽培, 省去了昂贵的棚架、苗床、喷灌系统等基础设施的投入和昂贵的日常管理成本, 从而可以满足贫困地区当地居民由于经济条件的限制无法承受的高成本和投入。选择药用价值较高的原生石斛种类, 利用西双版纳得天独厚的气候优势, 开展古茶园、果园等的石斛仿生态栽培, 进行粗放管理, 降低栽培管理难度和投入, 在增加居民收入、减贫致富的同时, 减少对野生资源的采集强度, 以达到保护的目的, 这也是石斛产业长期可持续发展的新途径。通过作者的实际调查发现, 种苗来源是决定石斛仿生态栽培成败的关键

【收稿日期】 2014-02-13

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31170358); 云南省环境保护厅省级环境保护专项资金项目

【通信作者】 * 高江云, 研究员, 研究生导师, 主要从事濒危植物迁地保护与再引种研究, Tel: (0691) 8716757, E-mail: gjy@xtbg.org.cn

【作者简介】 字肖萌, 硕士研究生, E-mail: zixiaomeng@xtbg.org.cn

• 3238 •



因素之一,通过获得特定对石斛种子萌发有效的真菌,开展种子的共生萌发生产种苗,是解决目前石斛仿生态栽培瓶颈问题的关键。

目前,作者通过原地共生萌发技术(*in situ* seed baiting technique)从齿瓣石斛和兜唇石斛原生萌发的原球茎中成功分离得到了2种内生真菌,通过前期实验室中在燕麦琼脂培养基(OMA)上的共生萌发实验,证明所获得的2种内生真菌分别是兜唇石斛和齿瓣石斛种子共生萌发的有效真菌^[10]。本研究在此基础上,在人工混合培养基上开展这2种药用石斛种子和不同真菌的共生萌发研究,为实际利用这2种真菌开展齿瓣石斛和兜唇石斛的共生种苗生产提供依据。

1 材料

本研究于2013年1—3月在中国科学院西双版纳热带植物园进行。兜唇石斛 *D. aphyllum* 和齿瓣石斛 *D. devonianum* 的种子为2011年4—5月花期人工异交授粉,果实自然成熟后于2012年3月采收,按 Seaton 和 Pritchard 的方法经过种子活力检测和干燥后,于-20℃保存^[11]。

供试的3种真菌菌株分别编号为 FDaI7, FCb4, FDD1。FDaI7 为通过原地共生萌发技术从兜唇石斛原球茎中分离获得的菌株,分子鉴定为胶膜菌属 *Tulasnella* 真菌^[10];FCb4 为通过迁地共生萌发技术从硬叶兰 *Cymbidium mannii* 原球茎中分离获得的菌株,分子鉴定为瘤菌根菌属 *Epulorhiza* 菌属^[12]。以上2种真菌的样本保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC, <http://www.cgmcc.net/>),编号分别为7552,7553。FDD1菌株则是从齿瓣石斛种子原生地萌发形成的原球茎中分离得到的真菌,通过分子测序,其ITS片段序列在美国国立生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行BLAST比对分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),与登录号为AJ313443.1的瘤菌根菌属 *Epulorhiza* 真菌最为相似,最大相似程度为95%,*E*值为0。根据菌株形态及分子鉴定结果判定为瘤菌根菌属真菌。3种菌株都采用PDA试管斜面法保存于4℃冰箱中待用^[13]。

2 方法

2.1 人工混合基质配制和种子播种 收集枯枝落

叶,自然风干后人工粉碎,松树皮先用水浸泡1月左右。将准备好的树叶、松树皮和椰糠按1:1:1加适量水均匀混合,作为2种石斛种子共生萌发的培养基质。滤除基质中多余水分,保持其水分达到饱和状态。将配好的混合基质分别装入144个长、宽、高分别为12,7,4.5 cm的透明塑料培养盒中,每盒装入约1/3容积的基质,基质上放置2条长宽为10,1.5 cm,孔径为45 μm的尼龙网布,用于播种。这样既不影响基质中的真菌菌丝穿过尼龙网布侵染石斛种子,又可使种子不掉落于基质中,便于计数和统计萌发率。将装好基质的培养盒盖上盒盖,在高压灭菌锅中于102.9 kPa,121℃条件下灭菌20 min,以消除基质中的杂菌,灭菌后的培养盒置于超净工作台于室温下自然冷却待用。

2种石斛的种子用1%有效氯离子浓度的次氯酸钠溶液浸泡15 min后,在超净工作台上分别取适量种子和质量浓度为1 g·L⁻¹的无菌琼脂溶液在锥形瓶中充分摇匀,制成种子悬浮液。兜唇石斛和齿瓣石斛1 mL种子悬浮液平均种子数分别为42,125.6粒。用移液枪吸取1 mL种子悬浮液,均匀播撒至培养盒中尼龙网布上,即每个培养盒中为2 mL种子悬浮液。兜唇石斛和齿瓣石斛种子各播种72个培养盒。

2.2 不同真菌接菌处理 取保存的 FDaI7, FCb4, FDD1,3种菌株,于9 cm培养皿,采用土豆葡萄糖琼脂培养基(PDA),在(25±2)℃黑暗条件下分别进行活化培养约1周,待菌丝长满培养皿,用灭菌解剖刀将长有菌丝的PDA培养基切成1 cm³的小块,作为接菌材料。将已播种兜唇石斛和齿瓣石斛种子的各72个培养盒随机分为4组,每组各18个培养盒,分别接种 FDaI7, FCb4, FDD1 的3种真菌菌块,另一组用空白PDA培养基作为对照。每个培养盒在2条尼龙网布之间的基质表面接入1~2块菌块。

2.3 共生萌发的培养条件 为了检验光照对2种石斛种子萌发和成苗的影响,进行了3个光照培养条件处理。处理1为光照培养箱内24 h全黑暗培养(0/24 h L/D);处理2为光照培养箱内黑暗光照交替培养(12/12 h L/D),培养箱温度均设置为(25±2)℃;处理3为室内自然光照及温度条件(natural light condition)。将2种石斛种子各4种接菌处理的18个培养盒,随机分为3组,每组6盒,分别在上述3个光照培养条件处理下进行共生萌发。



培养盒一直盖上盒盖进行相对密闭的共生培养,尽可能保证无其他杂菌污染。

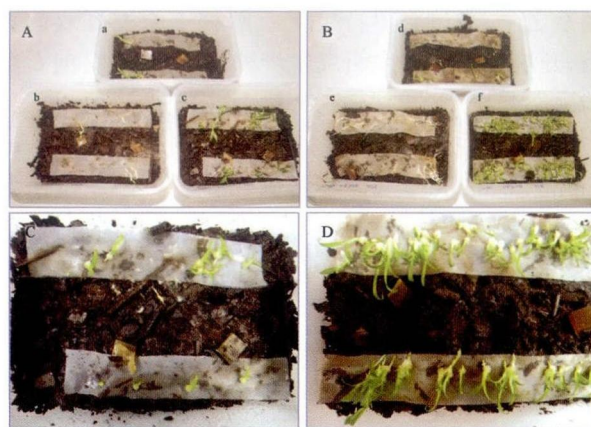
2.4 种子萌发情况检测和数据统计分析 每周透过盒子对2种石斛种子萌发情况进行观察和记录,在共生萌发3周后,可观察到有的处理中有种子陆续形成的原球茎;共生培养50 d时,有的处理中萌发的原球茎陆续开始发育成幼苗;共生培养60 d后,观察到2种石斛均有种子萌发为原球茎和形成幼苗,打开培养盒,分别统计每个培养盒内种子萌发为原球茎的数量(p)和幼苗的数量(s)。根据播种种子总数(t)计算原球茎比率($P' = p/t$),原球茎形成率[$P = (p + s)/t$]以及幼苗形成率($S = s/t$)。

利用SPSS统计软件进行一般线性模型单变量双因素分析(GLM-Univariate),分析不同接菌处理和光照条件对原球茎和幼苗形成率的影响,以及二者交互作用对2种石斛种子萌发及幼苗形成的影响;并利用最小显著差数法(LSD)进行不同处理差异性的多重比较。

3 结果与分析

3.1 真菌对2种石斛种子共生萌发的影响 在对2种石斛开展的不同种子共生萌发处理中,齿瓣石斛和兜唇石斛都只在接种分离来源于自身种的真菌,并在光照条件处理下种子才能正常萌发并形成幼苗,不接菌的空白对照组和接种来源于非自身种真菌的其他2种接菌处理,不但没有观察到有原球茎或者幼苗形成,甚至观察不到种子吸水膨胀的现象。

共生培养60 d后,兜唇石斛接菌FDd1,FCb4以及未接菌的空白对照处理,均未观察到有种子形成原球茎或幼苗;接菌FDaI7菌株的18个培养盒中,其中有4盒由于有大量外来杂菌污染,在培养过程中被弃,不计入统计结果,其余14盒,在3种光照条件下均有种子发育为原球茎及幼苗(图1),原球茎形成率为 $(14.46 \pm 1.47)\%$ ($n = 14$),幼苗形成率 $(12.07 \pm 1.31)\%$ ($n = 14$),均显著高于其他接菌处理(LSD, $P < 0.0001$) (图2)。而齿瓣石斛接菌FDaI7及FCb4菌块,以及未接菌的空白对照处理,均未观察到有种子萌发形成原球茎或幼苗;接菌FDd1菌株的18个培养盒,在3种光照条件下均有种子萌发为原球茎及幼苗(图1),原球茎率为 $(44.36 \pm 1.57)\%$ ($n = 18$),幼苗率 $(42.91 \pm 1.54)\%$ ($n = 18$),均显著高于其他接菌处理(LSD, $P < 0.0001$) (图2)。



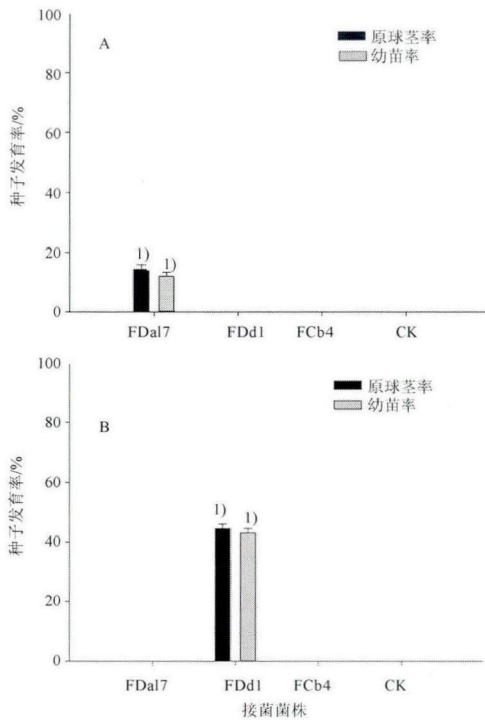
A. 兜唇石斛接种FDaI7菌株在3种光照条件下均发育为幼苗(a. 自然光照条件;b. 0/24 h L/D 黑暗条件;c. 12/12 h L/D 光照黑暗交替条件);B. 齿瓣石斛接种FDd1菌株在3种光照条件下均发育为幼苗(d. 自然光照条件;e. 0/24 h L/D 黑暗条件;f. 12/12 h L/D 光照黑暗交替条件);C. 兜唇石斛在12/12 h L/D 光照黑暗交替条件下接种FDaI7菌株,种子萌发为正常幼苗;D. 齿瓣石斛在12/12 h L/D 光照黑暗交替条件下接种FDd1菌株,种子萌发为正常幼苗。
图1 兜唇石斛与齿瓣石斛人工混合基质共生萌发60 d后,种子萌发为原球茎及幼苗情况

Fig. 1 Protocorms and seedlings of *Dendrobium aphyllum* and *D. devonianum* after 60 days on artificial substrate of symbiotic germination

以上统计结果表明,兜唇石斛和齿瓣石斛种子分别仅在FDaI7,FDd1菌株的作用下才能萌发,形成原球茎和幼苗;真菌对于促进2种石斛种子萌发均有显著作用;不同真菌种类对兜唇石斛和齿瓣石斛共生萌发过程中原球茎形成比率(P)及幼苗形成率(S)均有极显著影响(GLM-Univariate, $P < 0.0001$,表1)。

3.2 光照对2种石斛种子共生萌发的影响 兜唇石斛和齿瓣石斛种子分别在接种FDaI7,FDd1菌株条件下,经黑暗培养(0/24 h L/D)能够发育为白化的原球茎及幼苗,经光照培养(12/12 h L/D)则均能发育为正常绿色原球茎或幼苗,但不同光照条件下原球茎或幼苗的形成率存在差异(表2)。不同光照条件及真菌与光照的交互作用对2种石斛种子萌发过程中原球茎及幼苗的形成均无显著影响(GLM-Univariate, 表1)。

兜唇石斛种子在接种FDaI7菌株处理中,在光照培养箱条件下的原球茎形成率和幼苗形成率均高于黑暗培养箱条件以及实验室自然光照条件(表2),然而在不同光照条件下却有着相似比率的种子



A. 兜唇石斛; B. 齿瓣石斛; ¹⁾同一种子发育阶段不同接菌处理之间差异极显著($\alpha=0.01$)。

图2 兜唇石斛与齿瓣石斛人工混合基质共生萌发不同接菌处理种子萌发为原球茎及幼苗形成率($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Percentage of protocorms and seedlings formation of *Dendrobium aphyllum* and *D. devonianum* when inoculated with different fungi strains on artificial substrate($\bar{x} \pm s$)

表1 不同因子对兜唇石斛和齿瓣石斛种子原球茎和幼苗形成率的影响统计分析

Table 1 Statistic analysis result of the effect of different factors on symbiotic germination of *Dendrobium aphyllum* and *D. devonianum*

种子	原球茎/幼苗形成率	因子	自由度	F	P
兜唇石斛	原球茎(P)	真菌	3	40.099	<0.000 ¹⁾
		光照	2	1.550	0.221
		真菌与光照互作	11	1.433	0.219
	幼苗形(S)	真菌	3	34.386	<0.000 ¹⁾
		光照	2	1.944	0.153
		真菌与光照互作	11	1.797	0.116
齿瓣石斛	原球茎(P)	真菌	3	400.832	<0.000 ¹⁾
		光照	2	0.875	0.422
		真菌与光照互作	11	0.875	0.518
	幼苗形(S)	真菌	3	386.121	<0.000 ¹⁾
		光照	2	1.164	0.319
		真菌与光照互作	11	1.164	0.338

注:¹⁾该因子对结果影响极显著($\alpha=0.01$)。

表2 不同处理培养60 d后兜唇石斛和齿瓣石斛种子原球茎率和幼苗率($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Percentage of protocorms and seedlings in different treatments after 60 days cultivation for *Dendrobium aphyllum* and *Dendrobium devonianum* ($\bar{x} \pm s$)

种子	接菌处理	光照 (h L/D)	重复 /皿	原球茎形成率 /%	幼苗率 /%
兜唇石斛	FDa17 菌株	0/24	4	11.90 $\pm$ 4.12	9.52 $\pm$ 2.92
		12/12	6	18.65 $\pm$ 4.93	16.27 $\pm$ 4.49
		自然光	4	10.71 $\pm$ 1.19	8.33 $\pm$ 2.06
		0/24	6	45.51 $\pm$ 3.84	44.85 $\pm$ 3.60
齿瓣石斛	FDD1 菌株	12/12	6	47.24 $\pm$ 1.04	45.65 $\pm$ 0.96
		自然光	6	40.34 $\pm$ 5.32	38.22 $\pm$ 5.39

停留在原球茎阶段(表2);光照(12/12 h L/D)培养箱条件下幼苗形成率高于其他光照处理(表2)。然而不同光照条件下的原球茎形成率或幼苗率之间差异均不显著(LSD,光照条件:原球茎形成率 $P=0.372$;幼苗率 $P=0.297$)。

齿瓣石斛种子在接种 FDD1 菌株处理中,在光照(12/12 h L/D)条件下原球茎形成率为高于黑暗(0/24 h L/D)以及实验室自然光照条件,但三者之间无显著差异(LSD, $P=0.437$)。实验室自然光照条件下停留在原球茎阶段的种子比率(2.12 ± 0.57)%($n=6$)反而高于光照条件(1.59 ± 0.50)%($n=6$)及黑暗条件(0.66 ± 0.38)%($n=6$)(表2)。种子于恒温培养箱内萌发无论在光照或黑暗条件下其幼苗率均高于自然光照条件。然而光照培养箱(12/12 h L/D)条件下幼苗率却高于黑暗(0/24 h L/D)培养箱条件以及实验室自然光照条件(表2),同样三者之间差异不具有统计显著性(LSD, $P=0.339$)。

对2种石斛进行的人工基质共生萌发实验中,光照条件(12/12 h L/D)对2种石斛种子共生萌发都表现出最佳的光周期促进效果(表2);尽管统计结果显示光照在石斛种子共生萌发过程中对种子萌发为原球茎及幼苗的数量无显著作用,然而无论人工培养箱光照条件或是实验室自然光照条件下,共生培养出的均为绿色正常幼苗,分化有2~3片翠绿色新叶以及0.5~2.5 cm气生根(图1)。说明光照能够在石斛种子萌发过程中促进幼苗正常发育。同时发现培养箱内无论光照(12/12 h L/D)或者黑暗(0/24 h L/D)条件相较实验室自然环境条件均有更



高的原球茎或幼苗形成率(表2),这可能说明恒定温度 25℃对于石斛种子萌发也有着一定程度的促进作用。

4 讨论

对石斛开展人工混合基质共生萌发研究,是开展石斛仿生态栽培,解决种苗快繁技术瓶颈的直接有效方式,同时对于石斛资源的回归保护有着极为重要的意义。近年来也有一些关于地生兰及腐生兰于基质共生萌发的报道,腐生的虎舌兰 *Epipogium roseum* 种子播种于锯木和火山灰混合而成的基质上,经过6个月后有原球茎生成,尽管萌发率极低,但其中一个原球茎经过较长时间的生长最终发育为块茎并抽出花序^[14],紫花苞舌兰 *Spathoglottis plicata* Blume 种子播种于由土壤、椰糠和泥炭苔组成的地生兰常用栽培基质中,接种真菌菌株9周后,种子发育为原球茎^[15]。然而,鲜见有关附生兰在人工基质上共生萌发的研究的报道。本研究首次对附生兰中2种石斛属植物进行了人工混合基质共生萌发研究,为石斛仿生态栽培提供实际的生产依据。

目前已有记录的石斛属植物的共生真菌大部分是属于胶膜菌类真菌(*tulasnelloid fungi*)^[16-19]。本研究利用人工灭菌的树皮、椰糠和树叶最为人工混合基质,接种3种从不同兰科植物中分离获得的内生真菌,开展兜唇石斛和齿瓣石斛人工基质共生萌发研究。在培养60 d后,仅接种从兜唇石斛中分离得到的 FDaI7 菌株的兜唇石斛种子能发育成为幼苗,同样只有接种从齿瓣石斛植株中分离得到的 FDdI 菌株的齿瓣石斛种子能发育成为幼苗。FDaI7 和 FCb4 菌株分别能够有效促进齿瓣石斛和兜唇石斛种子的共生萌发及后续生长,又为胶膜菌科真菌可促进多种兰科植物种子共生萌发这一论断增加了新的证据。但从硬叶兰中分离得到的 FCb4 菌株,同为瘤菌根菌属 *Epulorhiza* 真菌,却对齿瓣石斛和兜唇石斛的基质共生萌发均无任何效用,这也表明这2种石斛种子在人工基质共生萌发条件下存在较强的真菌专一性。

从兜唇石斛中分离得到的胶膜菌属 *Tulasnella* 菌株 FDaI7,则可促使兜唇石斛种子在 *in vitro* 条件下于燕麦培养基(OMA)上萌发为原球茎后再发育至幼苗阶段,原球茎形成率为(85.72±5.10)%,幼苗形成率为(45.25±8.18)%,且在光照条件下,(11.17±9.86)%的幼苗还可进一步发育长出2片

以上叶片^[10]。本研究在人工混合基质上接菌 FDaI7 菌株进行兜唇石斛种子共生萌发,所得结果相较离体培养实验室条件共生萌发有着相同的趋势,但较低的成功率,原球茎形成率为(14.46±1.47)%,幼苗形成率为(12.07±1.31)%。而利用从硬叶兰植株中分离得到的瘤菌根菌属 *Epulorhiza* 菌株 FCb4,与兜唇石斛种子在燕麦培养基(OMA)上进行离体培养共生萌发,却也可促使种子萌发至原球茎阶段,原球茎形成率(20.25±11.15)%^[10],然而人工混合基质上接菌 FCb4 菌株,则无兜唇石斛种子能够萌发成为原球茎。Stewart 和 Kane 曾提出兰科植物与真菌共生萌发专一性在离体培养(*in vitro*)和原地萌发(*in situ*)2种不同条件下可能存在差异^[20]。国内外许多学者对兰科植物种子与真菌萌发专一性研究,均采用实验室离体培养条件进行共生萌发实验。该共生培养条件下,一些兰科植物表现出与特定真菌极强的共生专一性,Zettler 和 Hofer 对一种地生的兰科舌唇兰属植物 *Platanthera clavellata* 的种子进行离体培养共生实验,播种1年后,仅接种从该植物根中分离得到的真菌 *Epulorhiza inquilina* 的处理有种子发育为原球茎,显示出极强的共生萌发专一性^[21];Park, Lee 发现小菇属真菌仅在极窄的一个范围内(系统分类的一个极为接近的层级范围)能够促进天麻 *Gastrodia elata* 在离体培养条件的共生萌发^[22]。而在其他一些研究中这种与真菌的专一性则并不明显^[23-25]。Steinfert 等将从地生兰科植物 *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst 根中分离得到的7个菌株以及另外来源的2个菌株接种到该植物种子,在燕麦培养基上进行 *in vitro* 共生萌发实验,30天后,除1个外源的真菌菌株外,其余8个真菌都促使种子萌发,在离体共生萌发条件下显示出极宽泛的共生专一性^[24]。吴慧凤等在燕麦培养基上对铁皮石斛 *Dendrobium catenatum* 种子进行离体培养共生萌发,培养18周后,接种分离自铁皮石斛和美花石斛的4种真菌,种子均萌发为原球茎,其中分别来自铁皮石斛和美花石斛的2种菌株还对原球茎的发育和幼苗生长具有明显促进作用,显示铁皮石斛与共生真菌间没有严格的专一性,可以与瘤菌根菌属、链格孢属真菌形成共生关系^[25]。本研究中,兜唇石斛和齿瓣石斛在人工混合基质上的共生萌发不同于实验室离体培养条件共生萌发,可能更接近原地或者迁地共生萌发条件,而表现出极强的共生



专一性。这也说明,实验室内离体培养条件下筛选得到的种子萌发促生真菌在实际仿生态栽培种苗扩繁过程中可能仍面临考验。对石斛种子共生萌发真菌的筛选可考虑直接于人工混合基质上进行,能更为快捷和准确地获得目标真菌菌株。

附生兰种子通常在有光条件和黑暗条件下都可以萌发,Wang等利用种子袋技术对铁皮石斛和金钗石斛进行原地共生萌发实验中发现,仅在12/12 h L/D光照条件下原球茎才能进一步发育,也证实热带附生兰科植物在自然条件下种子萌发过程中,光照对幼苗建成有着重要作用^[26]。本研究中,尽管3种不同光照条件对种子发育为原球茎的比率和幼苗比率无显著影响,但持续黑暗条件却可使得萌发的原球茎畸形分化,不能形成正常幼苗。故而对石斛属等热带附生兰科植物的种子共生萌发,仍需考虑光照对于种子发育为正常幼苗的重要作用。

本研究中,光照条件(12/12 h L/D)对2种石斛种子共生萌发都表现出最佳的光周期促进效果;而恒温培养箱内无论光照(12/12 h L/D)或者黑暗(0/24 h L/D)条件相较实验室自然环境条件均有更高的原球茎或幼苗形成率,这可能说明温度对于石斛种子萌发有一定影响。

尽管本研究已成功实现利用特定的有效共生真菌对不同石斛种子开展基质共生萌发,然而对于石斛人工共生种苗的快速扩繁仍面临挑战。可能存在的最大问题在于迫切需要探明兰科植物幼苗持续生长发育后期(壮苗过程中),转换接纳不同共生真菌的复杂过程;获取幼苗不同阶段有效促生长共生真菌的同时,探索适宜的接菌时机和方法。

[参考文献]

[1] Manning J C, Van S J. The development and mobilisation of seed reserves in some African orchids [J]. Aust J Bot, 1987, 35 (3): 343.

[2] Rasmussen H N. Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

[3] Arditti J, Ghani A K A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications [J]. New Phytol, 2000, 145(3): 367.

[4] Huynh T T, McLean C B, Coates F, et al. Effect of developmental stage and peloton morphology on success in isolation of mycorrhizal fungi in *Caladenia formosa* (Orchidaceae) [J]. Aust J Bot, 2004, 52(2): 231.

[5] Anderson A B. Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae) [J]. Lindleyana,

1991, 6(4): 183.

[6] Oddie R L A, Dixon K W, Mc Comb J A. Influence of substrate on asymbiotic and symbiotic *in vitro* germination and seedling growth of two Australian terrestrial orchids [J]. Lindleyana, 1994, 9(3): 183.

[7] 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 Tissue Organ Cult, 2007, 90(3): 313.

[8] 高江云. 西双版纳石斛资源的保护利用[J]. 园艺学报, 1996, 23(2): 160.

[9] 王艳, 潘扬, 马国祥. 西双版纳地区的石斛资源调查及鉴定[J]. 中国野生植物资源, 1995 (3): 41.

[10] 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]. Mycorrhiza, 2014, doi: 10.1007/s00572-014-0565-8.

[11] Seaton P, Pritchard H. Orchid seed stores for sustainable use: a model for future seed-banking activities [J]. Lankesteriana, 2011, 11(3): 349.

[12] 盛春玲, 李勇毅, 高江云. 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[J]. 植物生态学报, 2012, 36 (8): 859.

[13] 白毓谦, 方善康, 高东, 等. 微生物实验技术[M], 济南: 山东大学出版社, 1987: 57.

[14] Yagame T, Yamato M, Mii M, et al. Developmental processes of achlorophyllous orchid, *Epipogium roseum*: from seed germination to flowering under symbiotic cultivation with mycorrhizal fungus [J]. J Plant Res, 2007, 120(2): 229.

[15] Aewsakul N, Maneesorn D, Serivichyaswat P, et al. *Ex vitro* symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates [J]. Sci Hortic, 2013, 160: 238.

[16] Nontachaiyapoom S, Sasirat S, Manoch L. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium*, and *Cymbidium*, collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand [J]. Mycorrhiza, 2010, 20(7): 459.

[17] Chen J, Wang H, Guo S X. Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. Mycorrhiza, 2012, 22(4): 297.

[18] Roberts P. *Rhizoctonia*-forming fungi: a taxonomic guide [M]. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1999.

[19] Goh C J. Studies on flowering in orchids-A review and future directions [J]. Proceed Nagoya Int Orchid Show, 1992, 92: 44.

[20] Stewart S L, Kane M E. Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevibras* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2007, 43(3): 178.

[21] Zettler L W, Hofer C J. Propagation of the little club-spur orchid



- (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications[J]. *Environ Exp Bot*, 1998, 39(3): 189.
- [22] Park E J, Lee W Y. *In vitro* symbiotic germination of myco-heterotrophic *Gastrodia elata* by *Mycena* species[J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2013, 7(2): 185.
- [23] 侯天文, 金辉, 刘红霞, 等. 实验室条件下五唇兰菌根真菌专一性研究[J]. *植物生态学报*, 2010, 34(12): 1433.
- [24] Steinfert U, Verdugo G, Besoain X, et al. Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst (Orchidaceae)[J]. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 2010, 205(12): 811.
- [25] 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.
- [26] Wang H, Fang H, Wang Y, 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.

Effects of different fungi on symbiotic seed germination of two *Dendrobium* species

ZI Xiao-meng^{1,2}, GAO Jiang-yun^{1*}

(1. Center for Integrative Conservation, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

[Abstract] The epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* and *D. devonianum* are used as traditional Chinese medicine, and became locally endangered in recent years because of over-collection. We test the effect of inoculations of endophytic fungi FDa17 (*Tulasnella* sp.), FDd1 (*Epulorhiza* sp.) and FCb4 (*Epulorhiza* sp.), which isolated from *D. aphyllum*, *D. denonianum* and *Cymbidium mannii*, respectively, on artificial substrate in these two *Dendrobium* species. In the symbiotic germination experiment, FDa17 and FDd1 were effective for protocorm formation and seedling development of *D. aphyllum* and *D. denonianum* separately. After 60 days, 14.46% of the *D. aphyllum* seeds grown to protocorms and 12.07% developed to seedlings inoculated only with FDa17, while contrasted with 0 when inoculated the other two isolates and non-inoculation treatment. However, in *D. denonianum*, seeds only grown to protocorms and developed to seedlings when inoculated with FDd1, the percentages were 44.36% and 42.91% distinguishingly. High specificity was shown in symbiotic germination on artificial substrate of *Dendrobium*. Protocorms could further develop to seedlings with or without light when inoculated the compatible fungi. However, light condition (12/12 h Light/Dark) produced the normal seedlings, while dark condition (0/24 h L/D) produced the abnormal seedlings. These may suggest that the development of young seedlings require light based on the effective symbiotic fungi. These findings will aid in seedling production of simulation-forestry ecology cultivation, conservation and reintroduction of *Dendrobium*.

[Key words] *Dendrobium aphyllum*; *Dendrobium devonianum*; symbiotic seed germination; artificial substrate; fungal specificity

doi:10.4268/cjcmm20141706

[责任编辑 吕冬梅]