

共生真菌对兰科植物种间杂交后代种子萌发的效应

范紫腾 毋钰灵 王新菊 李太强 高江云*

云南省植物繁殖适应与进化生态学重点实验室, 昆明 650500; 云南大学生态学与进化生物学实验室, 昆明 650500

摘要 石斛属(*Dendrobium*)植物在种子共生萌发过程中与真菌有着较为专一的共生关系, 为探讨这种共生关系在种间杂交后代上的进化和适应, 深入理解兰科植物和真菌共生关系的形成机制, 该研究利用能有效促进铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)和齿瓣石斛(*D. devonianum*)种子萌发形成幼苗, 并具有较强专一性的胶膜菌属(*Tulasnella*)真菌SSCDO-5和瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)真菌FDd1, 开展真菌对铁皮石斛和*D. tortile*种间杂交种子萌发效应的研究。结果表明, 在真菌与种子共生培养68天时, SSCDO-5菌株和FDd1菌株都能有效地促进杂交种子形成原球茎和幼苗, 两个接菌处理之间无显著差异, 来源于铁皮石斛的SSCDO-5菌株不但没有表现出优势, 反而在杂交石斛幼苗形成率上低于来源于齿瓣石斛的FDd1菌株(SSCDO-5: $(22.13 \pm 6.62)\%$; FDd1: $(29.53 \pm 5.51)\%$); SSCDO-5菌株和铁皮石斛在幼苗形成和发育阶段的共生专一性并没有在杂交后代上得到遗传或表现, 或者说是杂交打破了这种专一性的共生关系, 使得杂交后代能够与不同的真菌建立新的共生关系。该结果不支持关于共生真菌专一性是石斛属植物杂交后代形成的重要限制因素的假设, 推测石斛属植物在幼苗分化和发育阶段与真菌这种专一性的共生关系是在适应特定生态环境的过程中形成和建立的。

关键词 共生专一性; 菌根真菌; 兰科植物; 石斛属; 杂交物种形成; 种子共生萌发

范紫腾, 毋钰灵, 王新菊, 李太强, 高江云 (2019). 共生真菌对兰科植物种间杂交后代种子萌发的效应. 植物生态学报, 43, 374–382. DOI: 10.17521/cjpe.2019.0048

Effects of symbiotic fungi on seed germination of interspecific hybrid progenies in Orchidaceae

FAN Zi-Teng, WU Yu-Ling, WANG Xin-Ju, LI Tai-Qiang, and GAO Jiang-Yun*

Yunnan Key Laboratory of Plant Reproductive Adaption and Evolutionary Ecology, Kunming 650500, China; and Laboratory of Ecology and Evolutionary Biology, Yunnan University, Kunming 650500, China

Abstract

Aims Previous studies have shown that *Dendrobium* plants form a specific symbiotic relationship with fungi at differentiation stages during natural seed germination. In order to explore the evolution and adaptation of this symbiotic relationship in interspecific hybrid progenies, this study was to understand whether the strong specificity with symbiotic fungi during seedling formation and differentiation was also an important factor limiting the formation of hybrid progenies in *Dendrobium*, and the relationship between hybrid progenies of orchids and symbiotic fungi during seed germination stage.

Methods The effects of fungi on germination of interspecific hybrid seeds of *D. officinale* and *D. tortile* were studied using the highly specific fungi strains *Tulasnella* SSCDO-5 and *Epulorhiza* FDd1, which can effectively promote seed germination and seedling formation in *D. officinale* and *D. devonianum*, respectively.

Important findings The results showed that both SSCDO-5 and FDd1 strains could effectively promote the protocorm and seedling formation of hybrid seeds after 68 days incubation with no significant difference. The SSCDO-5 strain from *D. officinale* did not show any advantages, and the seedling formation rate of hybrid was lower than that of FDd1 strain from *D. devonianum*. The seedling formation rate incubation with SSCDO-5 strain was $(22.13 \pm 6.62)\%$ while with FDd1 strain was $(29.53 \pm 5.51)\%$. The specificity of SSCDO-5 strain with *D. officinale* at seedling formation and development stage was not inherited or expressed in hybrid progenies, indicating that hybridization broke the symbiotic relationship of this specificity, which enabled hybrid progenies to establish new symbiotic relationship with different fungi. Our results do not support the hypothesis that the specificity of symbiotic fungi is an important limiting factor for the formation of hybrid progenies in *Dendrobium*. We

收稿日期Received: 2019-03-05 接受日期Accepted: 2019-04-16

基金项目: 国家自然科学基金(U1702235)和云南大学部省合建项目(C176280109)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (U1702235), and the Ministry and Province Joint Construction Project of Yunnan University (C176280109).

* 通信作者Corresponding author (jiangyun.gao@ynu.edu.cn)

speculate that the symbiotic relationship between *Dendrobium* plants and fungi during seedling differentiation and development is formed and established in the process of adapting to specific ecological environment.

Key words symbiosis specificity; mycorrhizal fungi; Orchidaceae; *Dendrobium*; hybrid speciation; symbiotic seed germination

Fan ZT, Wu YL, Wang XJ, Li TQ, Gao JY (2019). Effects of symbiotic fungi on seed germination of interspecific hybrid progenies in Orchidaceae. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 43, 374–382. DOI: 10.17521/cjpe.2019.0048

兰科植物有25 000多种, 约占开花植物种类的8%, 广泛分布于除冰川和沙漠的各种陆地生态系统中, 以热带和亚热带种类最为丰富, 2/3 (69%)的种类为附生植物(Swarts & Dixon 2009; Zotz, 2013; Chase *et al.*, 2015)。兰科植物高度的物种多样性被认为是和其各自特定传粉者相适应进化的结果(Roberts, 2003), 而兰科植物在整个生活史的不同阶段都和真菌有着复杂的共生关系, 共生真菌在兰科植物完成整个生活史中起着关键的作用(Dearnaley *et al.*, 2012; McCormick & Jacquemyn, 2014)。这种共生关系在兰科植物的种子萌发和幼苗形成阶段尤其重要, 兰科植物的种子非常细小, 没有胚乳, 自然条件下完全依赖特定的共生真菌提供营养来促进其萌发和后续的幼苗形成(Arditti & Ghani, 2000; Bidartondo & Read, 2008; Dearnaley *et al.*, 2016)。

自然条件下, 不同兰科植物同域分布现象十分普遍, 一般认为其主要是依靠传粉者的特化而避免种间花粉传递, 从而避免了种间杂交和生殖干扰, 而兰科植物合子后的生殖隔离很弱(Coyne & Orr, 2004; Whitehead & Peakall, 2014), 这也是为什么通过人工种间(同属甚至同族)杂交很容易产生后代, 从而培育出几万种杂交兰花。在产业上, 杂交兰花都是通过种子的无菌萌发(非共生萌发)或组织培养进行种苗的繁殖和生产, 相关技术已经很成熟并得到了广泛应用(Kauth *et al.*, 2008), 而真菌对杂交种子萌发的影响却并不清楚。然而, 杂交是有花植物进化的重要机制和物种形成的重要途径(Hegarty & Hiscock, 2005; Mallet, 2005), 兰科植物也不例外, 不同类群的兰科植物自然杂交现象也不断被发现(Dafni & Ivri, 1979; Aceto *et al.*, 1999; Cozzolino & Widmer, 2005; Schatz, 2006)。这就带来一个十分有趣的问题, 杂交后代和真菌的共生关系是如何进化和相适应的? 特别是在专一性很强的种子萌发阶段。这方面的研究非常缺乏。Hollick等(2005)以澳大利亚*Caladenia*属的5个自然杂交种及其亲本种为研究材料, 分别从5个杂交种和各自亲本植株根里

分离共生真菌, 检验所得到的真菌对5个杂交种和各自亲本种子萌发的影响, 发现杂交种能够利用亲本的真菌, 同时能和完全不同的真菌建立共生关系。以红门兰属(*Orchis*)植物*O. simia*和*O. anthropophora*及其自然杂交后代为材料, 通过对比杂种后代和父母本在叶片生长、种子活力、花气味散发、菌根真菌种类及侵染速率等方面的差异, 研究了杂交对传粉者和菌根真菌的影响, 发现杂种后代和父母本有着相似的菌根真菌组成, 但菌根真菌对杂交后代的侵染率更高, 从而提高了营养生长和增强了花气味的产生(Schatz *et al.*, 2010)。

石斛属(*Dendrobium*)为兰科的大属, 全世界有1 500–1 600种, 都为附生植物, 主要分布于热带东南亚及大洋洲地区, 具有很高的观赏价值, 是兰科重要的观赏类群, 我国有石斛属植物80余种, 很多种类都是传统的中药材和保健品。我们近期对一些附生兰科植物, 包括不同种类的石斛属植物的研究发现, 从自然形成的原球茎发育后期或幼苗分化初期分离得到的真菌, 在幼苗形成阶段有着很强的专一性, 实验证明种子萌发初期和真菌并没有专一性, 但在原球茎发育为幼苗时, 共生真菌却表现出了极强的专一性(盛春玲等, 2012; Zi *et al.*, 2014; Zhou & Gao, 2016; Huang *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2019), 也就是说在幼苗分化和发育阶段需要依赖专一的共生真菌提供营养, 这一结论也得到了其他研究者的认同(Rasmussen *et al.*, 2015)。不同石斛属植物同域分布现象也十分普遍, 例如, 在西双版纳地区, 同一生境下可以发现不同种类的石斛属植物, 甚至同一株大树树干上都有不同种类的石斛属植物生长, 在西双版纳分布的48种石斛属植物中, 52.1%的种类(25种)集中在3–5月的干热季开花, 37.5%的种类(18种)在5–10月的雨季开花(高江云等, 2014), 不同种类同域分布且花期重叠的现象很常见。然而, 并没有石斛属植物自然杂交种的发现和报道, 除了传粉者导致的合子前的生殖隔离, 共生真菌在幼苗形成和分化阶段这种很强的专一性是否也是限制石斛

属植物杂交后代形成的重要因素? 兰科植物杂交后代在种子萌发阶段和共生真菌有着怎样的进化关系和适应性?

本文基于前期研究工作的基础, 利用已获得的不同石斛属植物种子萌发的有效共生真菌, 通过人工授粉获得杂交种子, 开展不同真菌对杂交后代种子萌发的研究, 以期理解兰科植物和真菌的共生关系提供新的视野, 其研究结果也为利用种子共生萌发开展观赏或药用杂交石斛的种苗生产提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究材料

本研究开展不同真菌对兰科植物种间杂交后代种子的萌发效应研究, 杂交种子来源于铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)和*Dendrobium tortile*的种间人工授粉所结的果实, 于2017年9月偶然从兰花栽培者手中所得, 不能确定具体的父母本。用于实验对照的2种石斛属植物为铁皮石斛和齿瓣石斛(*D. devonianum*), 铁皮石斛果实为2018年1月25日采集于贵州省兴义市一个人工仿生态铁皮石斛栽培基地, 为组培苗移栽到林下岩石上生长2年的植株自然授粉所结的果实; 齿瓣石斛果实为2016年4月采集于云南省西双版纳州基诺乡古茶园, 自然生长于古茶树上的植株自然授粉所结的果实。果实采收后按兰科植物种子长期保存的标准(高江云等, 2014), 经过适当干燥后, 保存于云南大学生态学与进化生物学实验室兰科植物种子库。实验前对每一批种子都采用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。

供试的2种真菌为编号SSCDO-5和FDd1的菌株, 菌株SSCDO-5为从铁皮石斛种子迁地共生萌发获得的原球茎中分离、纯化得到的菌株, ITS序列鉴定为胶膜菌属(*Tulasnella*)真菌, 经种子回接实验表明能有效促进铁皮石斛种子萌发形成幼苗(未发表数据)。菌株FDd1为从齿瓣石斛自然形成的原球茎中分离和纯化得到的菌株, 为瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)真菌, 能有效促进齿瓣石斛种子萌发和幼苗形成(Huang *et al.*, 2018), 2种真菌都采用PDA试管斜面法保存于4 °C冰箱。本研究于2018年6–10月在云南大学生态学与进化生物学实验室进行。

1.2 研究方法

1.2.1 种子共生萌发处理

以上3种石斛的种子分别在燕麦琼脂培养基(OMA; 4 g·L⁻¹燕麦 + 8 g·L⁻¹的琼脂, pH值5.8)上接种SSCDO-5和FDd1菌株进行共生培养, 同时分别设置不接菌的MS和OMA培养基作为营养丰富培养基和营养缺乏培养基进行对照处理(Zhou & Gao, 2016)。将保存的铁皮石斛、齿瓣石斛和杂交石斛种子分别进行解冻和灭菌处理(McKendrick *et al.*, 2000), 制成无菌种子悬浮液, 用移液枪吸取0.5 mL种子悬浮液, 均匀播撒至培养皿内培养基表面, 以上3种石斛每个培养皿平均种子数分别为85、30和36粒($n = 4$)。

菌株SSCDO-5和FDd1在PDA培养基上分别进行活化培养约2周, 待菌丝长满培养皿, 用灭菌的1 mL枪头将长有菌丝的PDA培养基切成直径为8 mm的圆块, 作为接菌材料, 每个培养皿在培养基中间接种一个菌块, 用封口膜将培养皿密封好。不接菌的MS和OMA培养基也接入同样大小的空白PDA培养基琼脂块作为对照。按不同石斛种子分为3组实验, 每组4个处理, 每个处理重复30个培养皿, 总共360个培养皿, 在恒温培养箱内((25 ± 2) °C)进行光照(12/12 h, 光照/黑暗)培养。

1.2.2 种子萌发情况观察和数据统计分析

参照Arditti (1967)和其他相关研究对兰科植物种子萌发阶段的分级标准, 本研究将种子萌发简化为4个阶段: 种子未萌发、种子萌发(种胚膨大并产生根状物)、原球茎形成和发育(种胚膨大突破种皮至出现原生分生组织)、幼苗分化和发育阶段(长出第一片叶片及后续生长)。需要说明的是, 这一分级标准是为了研究方便而人为划分的阶段(盛春玲等, 2012)。

不同石斛种子的3组实验同时于2018年6月13日开始, 之后每周监测各组不同处理的种子萌发情况, 记录种子萌发、原球茎形成和幼苗分化的时间和情况, 当一组实验中有培养皿产生大量幼苗, 同时3个以上培养皿中的幼苗观察到有根分化时, 视为该组实验结束, 将全部培养皿取出, 去除被杂菌污染的培养皿, 按以上分级标准统计每组实验不同处理的种子萌发数量(g), 原球茎数量(p)和幼苗的数量(s), 并根据播种的种子总数(t), 计算种子萌发率($G = (g + p + s)/t$), 原球茎形成率($P = (p + s)/t$)和幼苗形

成率($S = s/t$)。

对3种石斛在不同培养基及不同接菌处理下的种子萌发率、原球茎形成率和幼苗形成率进行显著性差异分析。用Non-parametric Test中的One-Sample K-S检验各组数据是否服从正态分布, 对于服从正态分布的数据用单因素方差分析和最小显著差数(LSD)法进行分析; 不满足正态分布的数据采用广义线性模型(GLM)分析。所得结果均用平均值 \pm 标准误差(mean \pm SE)表示。所有数据的统计分析及作图均利用SPSS 25.0和SigmaPlot 12.5两个软件完成。

2 结果

2.1 不同实验组种子萌发情况

在3组实验中, 从种子萌发、原球茎形成和幼苗发育的速度来看, 齿瓣石斛组最快, 杂交石斛组次之, 铁皮石斛组最慢。齿瓣石斛组播种7天时观察到有种子开始萌发, 14天时有原球茎形成, 28天时开始形成幼苗, 58天时观察到有3个以上培养皿中的幼苗长出了根, 实验结束时统计不同处理每个培养皿中的种子萌发数、原球茎数和幼苗数。杂交石斛组播种10天时观察到有种子开始萌发, 22天时有原球茎形成, 31天时开始形成幼苗, 68天时观察到有3个以

上培养皿中的幼苗长出了根, 实验结束并统计数据。铁皮石斛组播种16天时观察到有种子开始萌发, 29天时有原球茎形成, 40天时开始形成幼苗, 79天时观察到有3个以上培养皿中的幼苗长出了根, 实验结束并统计数据。不同处理3种石斛在不同时期种子萌发及原球茎和幼苗形成情况见图1。

2.2 不同接菌处理对种子萌发率、原球茎形成率和幼苗形成率的影响

2.2.1 铁皮石斛组

共生培养79天时, 铁皮石斛种子萌发率各处理间具有显著差异($F = 7.620, p < 0.001$; 图2A), 其中, FDd1接菌处理($89.58 \pm 4.83\%$) ($n = 29$)、SSCDO-5接菌处理($88.88 \pm 3.73\%$) ($n = 29$)和不接菌MS处理($79.29 \pm 4.46\%$) ($n = 28$)显著高于不接菌OMA处理($65.35 \pm 3.36\%$) ($n = 29; p < 0.001$), 但三者间没有显著性差异($p > 0.05$; 表1)。

不同处理间原球茎形成率具有显著差异(Wald $\chi^2 = 629.565, df = 3, p < 0.001$; 图2B), SSCDO-5接菌处理($88.88 \pm 3.73\%$)显著高于FDd1接菌处理($6.55 \pm 4.78\%$) ($p < 0.001$), 而不接菌MS和OMA处理没有原球茎形成(图2B)。不同处理中, 仅SSCDO-5接菌处理形成了幼苗($69.66 \pm 5.80\%$), 而其他3个处理

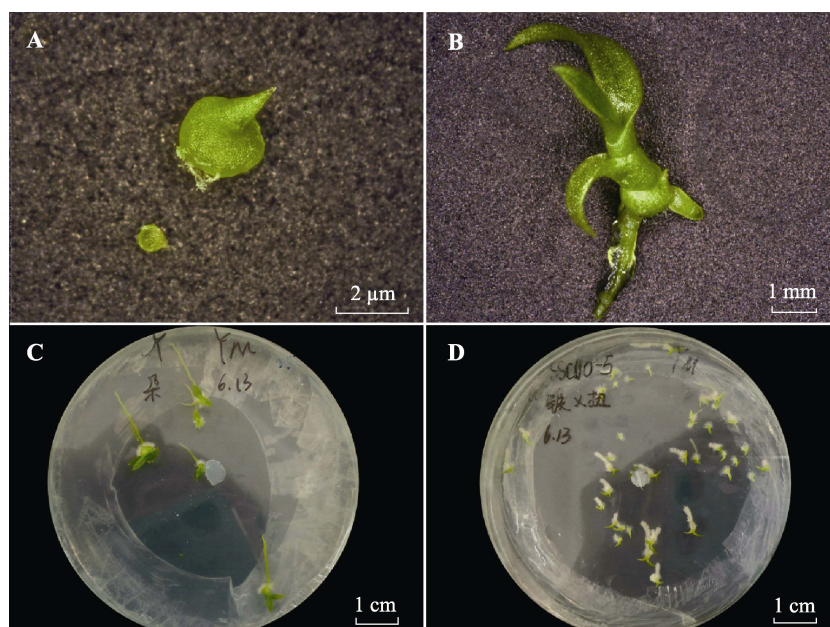


图1 三种石斛在不同处理、不同时期种子萌发及原球茎和幼苗形成情况。A, 铁皮石斛种子和SSCDO-5菌株共生培养30天时萌发的种子和形成的原球茎。B, 齿瓣石斛种子和FDd1菌株共生培养58天时形成的幼苗。C, 杂交石斛种子和FDd1菌株共生培养68天时的幼苗情况。D, 杂交石斛种子和SSCDO-5菌株共生培养68天时的幼苗情况。

Fig. 1 Seed germination, protocorm and seedling formation of three *Dendrobium* species under different treatments at different stages. A, Germinating seed and formed protocorm of *D. officinale* after 30 days incubation with SSCDO-5 strain. B, A seedling of *D. devonianum* after 58 days incubation with FDd1 strain. C, Seedlings of hybrid after 68 days incubation with FDd1 strain. D, Seedlings of hybrid after 68 days incubation with SSCDO-5 strain.

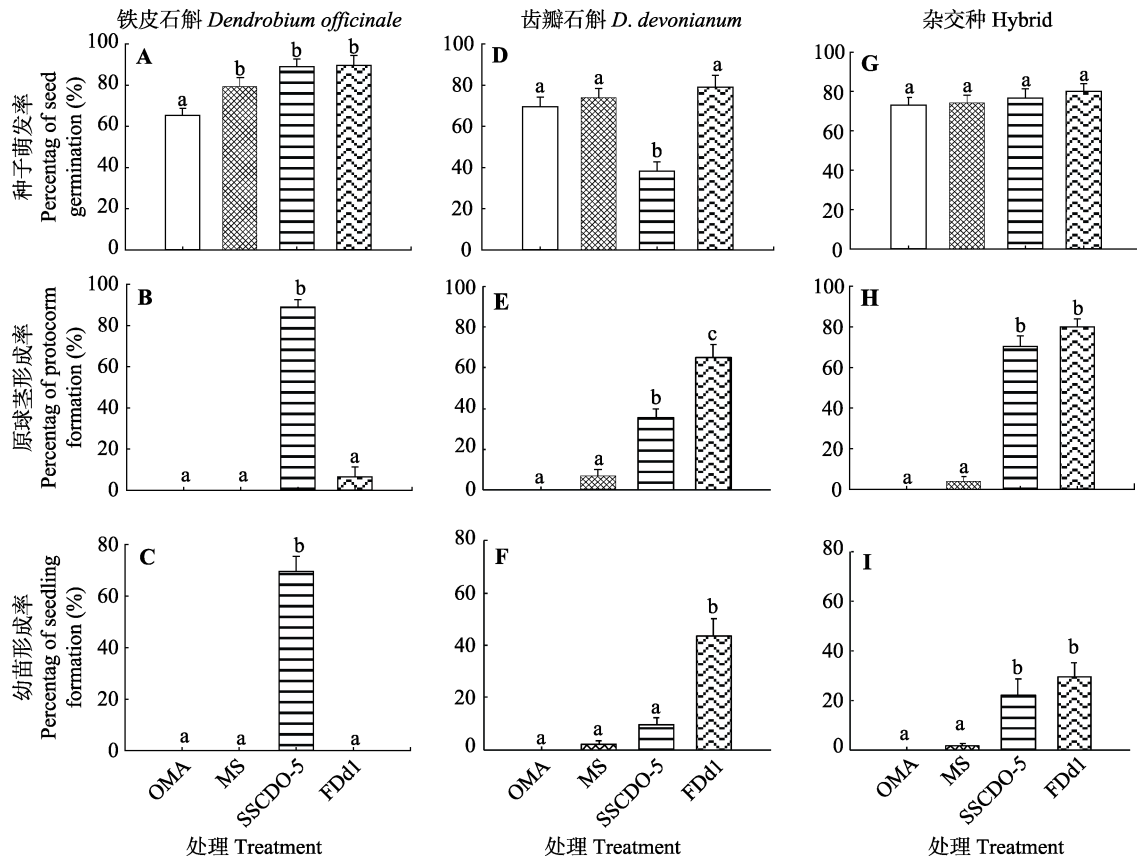


图2 三种石斛不同处理下种子萌发率(A、D、G)、原球茎形成率(B、E、H)和幼苗形成率(C、F、I)(平均值±标准误差)。柱子不同小写字母表示同一阶段不同处理之间差异显著($\alpha = 0.05$)。OMA, 不接菌的燕麦琼脂培养基作为营养缺乏对照处理; MS, 不接菌的MS培养基作为营养丰富对照处理; SSCDO-5, 燕麦培养基上接种SSCDO-5菌株处理; FDd1, 燕麦培养基上接种FDd1菌株处理菌的处理。

Fig. 2 Percentage of seed germination (A, D, G), protocorm (B, E, H) and seedling (C, F, I) formation of different treatments in three *Dendrobium* species (mean \pm SE). Different lowercase letters above the bars represent significant differences between different treatments at the same stage ($\alpha = 0.05$). OMA, oatmeal agar medium without fungal inoculation was used as nutrient-poor control treatment; MS, MS medium without fungal inoculation was used as nutrient-rich control treatment; SSCDO-5, treatment of fungal inoculation with SSCDO-5 strain on OMA medium; FDd1, treatment of fungal inoculation with FDd1 strain on OMA medium.

在实验期间均未观察到有幼苗形成(图2C)。

2.2.2 齿瓣石斛组

共生培养58天时, 各处理间齿瓣石斛种子萌发率具有显著差异($F = 14.912$, $p < 0.001$; 图2D)。其中, 不接菌OMA处理($69.49 \pm 4.72\%$ ($n = 26$))、不接菌MS处理($73.93 \pm 4.40\%$ ($n = 28$))和FDd1接菌处理($78.97 \pm 5.76\%$ ($n = 30$))显著高于SSCDO-5接菌处理($38.28 \pm 4.53\%$ ($n = 30$; $p < 0.001$), 但三者间没有显著性差异($p > 0.05$; 表1)。

不同处理间原球茎形成率具有显著差异(Wald $\chi^2 = 136.544$, $df = 3$, $p < 0.001$; 图2E), 其中, FDd1接菌处理的原球茎形成率($65.17 \pm 6.42\%$)显著高于SSCDO-5接菌处理($35.48 \pm 4.42\%$)和不接菌MS处理($6.55 \pm 3.41\%$) ($p < 0.001$), 而不接菌OMA处理没有原球茎形成。

四种处理中, 不接菌OMA处理没有幼苗形成, FDd1接菌处理的幼苗形成率为($43.68 \pm 6.38\%$), 显著高于SSCDO-5接菌处理的($9.68 \pm 2.42\%$)和不接菌MS处理的($2.14 \pm 1.12\%$) ($p < 0.001$; 图2F); 而后两个处理间无显著性差异($p = 0.127$; 表1)。

2.2.3 杂交石斛组

共生培养68天时, 各处理间杂交石斛种子萌发率无显著差异($F = 0.569$, $p = 0.636$; 表1)。不接菌OMA处理、不接菌MS处理、SSCDO-5接菌处理和FDd1接菌处理的种子萌发率分别为($73.03 \pm 3.38\%$ ($n = 24$))、($74.23 \pm 3.92\%$ ($n = 29$))、($76.72 \pm 4.57\%$ ($n = 28$))和($80.04 \pm 3.93\%$ ($n = 27$)), 不同处理两两比较没有显著差异($p > 0.05$; 图2G)。

不同处理间原球茎形成率具有显著差异(Wald $\chi^2 = 396.690$, $df = 3$, $p < 0.01$; 图2H)。其中, 不接菌

表1 不同处理三种石斛种子萌发率、原球茎形成率和幼苗形成率的多重比较(均值差±标准误差)
Table 1 Multiple comparisons on seed germination rate, protocorms formation rate and seedlings formation rate of different treatments for three *Dendrobium* species (mean ± SE)

多重比较 Multiple comparisons	铁皮石斛 <i>D. officinale</i>			齿瓣石斛 <i>D. devonianum</i>			杂交种 Hybrid		
	种子萌发率 Seed germination rate	原球茎形成率 Protocorms formation rate	幼苗率 Seedlings formation rate	种子萌发率 Seed germination rate	原球茎形成率 Protocorms formation rate	幼苗率 Seedlings formation rate	种子萌发率 Seed germination rate	原球茎形成率 Protocorms formation rate	幼苗率 Seedlings formation rate
OMA-MS	-0.139 3 ± 0.058 2*	0.000 0 ± 0.042 7	0.000 0 ± 0.053 4	-0.044 4 ± 0.071 1	-0.065 5 ± 0.063 9	-0.021 4 ± 0.051 6	-0.012 0 ± 0.058 1	-0.039 3 ± 0.053 0	-0.017 2 ± 0.064 4
OMA-SSCDO-5	-0.235 3 ± 0.057 7***	-0.888 8 ± 0.042 3***	-0.696 6 ± 0.052 9***	0.312 1 ± 0.069 5***	-0.354 8 ± 0.062 4***	-0.096 8 ± 0.050 4	-0.036 9 ± 0.058 1	-0.704 0 ± 0.053 0***	-0.221 3 ± 0.064 4**
OMA-FDd1	-0.242 3 ± 0.058 2***	-0.065 5 ± 0.042 7	0.065 5 ± 0.053 4	-0.094 8 ± 0.070 5	-0.651 7 ± 0.063 3***	-0.436 8 ± 0.051 2***	-0.070 1 ± 0.059 1	-0.800 4 ± 0.053 9***	-0.295 3 ± 0.065 5***
MS-SSCDO-5	-0.096 0 ± 0.058 2	-0.888 8 ± 0.042 7***	-0.696 6 ± 0.053 4***	0.356 5 ± 0.068 1***	-0.289 4 ± 0.061 1***	-0.075 3 ± 0.049 4	-0.024 9 ± 0.055 3	-0.664 8 ± 0.050 4***	-0.204 0 ± 0.061 3**
MS- FDd1	-0.102 9 ± 0.058 7	-0.006 6 ± 0.043 1	0.065 5 ± 0.053 8	-0.050 4 ± 0.069 2	-0.586 2 ± 0.062 1***	-0.415 4 ± 0.050 2***	-0.058 1 ± 0.056 3	-0.761 1 ± 0.0513 4***	-0.278 0 ± 0.062 4***
SSCDO-5- FDd1	-0.007 0 ± 0.058 2	0.823 3 ± 0.042 7***	0.631 0 ± 0.053 4***	-0.406 9 ± 0.067 5***	-0.296 9 ± 0.060 6***	-0.340 0 ± 0.049 0***	-0.033 2 ± 0.056 3	-0.096 4 ± 0.051 3	-0.074 0 ± 0.062 4

OMA, 不接菌的燕麦琼脂培养基作为营养缺乏对照处理; MS, 不接菌的MS培养基作为营养丰富对照处理; SSCDO-5, 燕麦培养基上接种SSCDO-5菌株处理; FDd1, 燕麦培养基上接种FDd1菌株处理菌的处理。
OMA, oatmeal agar medium without fungal inoculation was used as nutrient-poor control treatment; MS, MS medium without fungal inoculation was used as nutrient-rich control treatment; SSCDO-5, treatment of fungal inoculation with SSCDO-5 strain on OMA medium; FDd1, treatment of fungal inoculation with FDd1 strain on OMA medium. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

OMA处理没有原球茎形成, FDd1接菌处理(80.04 ± 3.93)%和SSCDO-5接菌处理(70.40 ± 5.18)%之间并没有显著性差异($p = 0.06$), 但均显著高于不接菌MS处理(3.93 ± 2.73)% ($p < 0.001$; 表1)。

不同处理间杂交石斛的幼苗形成率具有显著差异(Wald $\chi^2 = 32.085$, $df = 3$, $p < 0.001$; 图2I)。FDd1接菌处理(29.53 ± 5.51)%和SSCDO-5接菌处理(22.13 ± 6.62)%的幼苗形成率没有显著差异($p = 0.236$), 但均显著高于不接菌MS处理(1.72 ± 0.67)% ($p < 0.001$; 表1), 而不接菌OMA处理没有幼苗形成(图2I)。

3 讨论

长期以来, 用于兰科植物种子共生萌发相关研究的真菌多是从野生成年植株的根中分离和筛选获得(Masuhara & Katsuya, 1994; Zelmer *et al.*, 1996; Brundrett *et al.*, 2003; Stewart & Kane, 2007; Nontachaiyapoom *et al.*, 2010), 由于野生植株根中可能存在作用未知的不同内生真菌, 得到的菌株往往是随机的, 更为重要的是, 成年植株根中的真菌对种子萌发是否有效并不确定(Zettler *et al.*, 2005), 然而, 很多研究结果都表明所获得的真菌能有效促进种子萌发, 这样的结果在很大程度上是由于采用了Arditti (1967)的种子萌发标准, 即把种胚膨大并产

生根状物即视为种子萌发, 并没有关注真菌对后续幼苗形成和发育的影响。而兰科植物在种子萌发后都要经历或短或长的非光合作用阶段, 完全依靠真菌提供有机碳(Rasmussen *et al.*, 2015), 非亲和的真菌或许能刺激种子萌发, 但并不能支持后续的幼苗发育(Bidartondo & Read, 2008; Rasmussen *et al.*, 2015)。

在我们对不同石斛属植物的研究中, 也得到了相同的结果, 利用种子诱导技术从自然形成的原球茎或幼苗分化初期分离得到的真菌, 在幼苗形成阶段有着很强的专一性, 实验证明不同来源的真菌都能促进种子萌发和原球茎形成, 但却不能有效促进幼苗的形成和发育(Zi *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2019)。例如, 本研究所用的FDd1的菌株, 在和齿瓣石斛种子共生培养50天时, 幼苗形成率为(72.36 ± 11.7)%, 很多幼苗已经有根的发育, 但作为对照处理的2种真菌, FDd17和FCb4菌株, 分别为硬叶兰(*Cymbidium mannii*)和兜唇石斛(*D. aphyllum*)种子萌发的有效共生真菌(盛春玲等, 2012; Zi *et al.*, 2014), 虽然都能有效促进齿瓣石斛种子萌发和原球茎的形成, 但FDd17接菌处理的幼苗形成率仅为(0.74 ± 1.7)%, 而FCb4接菌处理没有观察到幼苗; 到了共生培养90天时, FDd17接菌处理的幼苗形成率为(23.59 ± 24.52)%, FCb4接菌处理的幼苗形成率

为(9.08 ± 12.51)%, 而FDd1接菌处理的幼苗形成率在共生培养50天时就已趋于饱和, FDd1真菌能快速促进齿瓣石斛种子萌发并有效形成幼苗, 对于附生兰科植物在自然条件下种群幼苗的成功建立至关重要(Huang *et al.*, 2018)。

胶膜菌科真菌是兰科植物最主要的一种菌根真菌类群, 也是很多石斛属植物种子萌发的有效共生真菌(Liu *et al.*, 2010; Dearnaley *et al.*, 2012; Zi *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018), 瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)被认为是胶膜菌属(*Tulasnella*)的无性态属(anamorph/teleomorph pair; Dearnaley *et al.*, 2012)。本研究中, SSCDO-5菌株为胶膜菌属真菌, FDd1菌株为瘤菌根菌属真菌, 能分别有效地促进铁皮石斛和齿瓣石斛原球茎和幼苗形成, 在幼苗形成和发育阶段表现出了很强的专一性(图2), 这和我们先前的研究结果一致(Huang *et al.*, 2018; Shao *et al.*, unpublished data), 而这种专一性的共生关系是如何形成和维系的, 兰科植物种子和对应真菌是如何相互选择和识别的, 其机制并不清楚。在对不同类群兰科植物种子的非共生萌发研究中都发现, 未成熟的种子比成熟的种子更容易萌发, 因为成熟种子的种皮会导致种子透水性降低(Ramsay & Stewart, 1998; Yamazaki & Miyoshi, 2006; Lee, 2007; Kauth *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2010), 而在本研究和我们先前的研究中都发现, 与作为对照的营养丰富培养基处理相比较, 在亲和真菌的接菌处理中, 幼苗形成所需要的时间显著较短, 同时具有显著高的幼苗形成率(Zhou & Gao, 2016), 这是否也暗示种子的种皮结构和真菌建立了特定的信号传导和识别机制, 一方面使得亲和的真菌能快速侵染种子, 促进种子萌发和幼苗形成, 另一方面可以防止不亲和真菌的侵染?

本研究中, 杂交种子的父母本之一为铁皮石斛, SSCDO-5菌株和FDd1菌株都能有效地促进杂交石斛原球茎和幼苗的形成, 虽然两者之间无显著差异(图2), 但来源于铁皮石斛的SSCDO-5菌株不但没有表现出优势, 反而在杂交石斛幼苗形成率上低于来源于齿瓣石斛的FDd1菌株(SSCDO-5: (22.13 ± 6.62)%; FDd1: (29.53 ± 5.51)%)。对本研究而言, SSCDO-5菌株和铁皮石斛在幼苗形成和发育阶段的专一性并没有在杂交后代上得到遗传或表现, 或者说是杂交打破了这种专一性的共生关系, 使得杂交后代能够和不同的真菌建立新的共生关系。这一

结果不支持我们关于共生真菌专一性是石斛属植物杂交后代形成的重要限制因素的假设, 但也可以推测兰科植物和真菌的共生关系是在适应特定生态环境的过程中形成和建立的。Stimart和Ascher (1981)在兜兰属(*Paphiopedilum*)植物种子的非共生萌发研究中发现, 杂交后代种子普遍比原生种种子更容易萌发, 说明杂交改变了种子的种皮结构, 如果真菌和种子的专一性共生关系建立在特定的种皮结构上, 那么能很好地解释本研究的结果, 即杂交后代的种子能和更广泛的真菌建立共生关系。Hollick等(2005)的研究结果表明, *Caladenia*属的5个自然杂交种能够利用亲本的真菌, 同时能和完全不同的真菌建立共生关系, 他们认为兰科植物和真菌共生的关系是生态和潜在的专一性, 本研究结果与之相似。Schatz等(2010)在对红门兰属植物的研究中发现, 杂交后代和父母本有着相似的菌根真菌组成, 但菌根真菌对杂交后代的侵染率更高, 从而提高了营养生长和增强了花气味的产生, 说明杂交后代更容易和真菌建立共生关系。对热带附生兰菌根真菌网络结构的研究也表明, 菌根真菌的组成和兰科植物的系统发育关系没有显著相关性, 主要受附生性的影响, 也就是生态因素决定了菌根真菌的群落组成(Martos *et al.*, 2012)。

在兰科植物种子萌发阶段和真菌共生关系的研究上, 目前仍然还处于真菌对种子萌发效应的表象观察, 本研究也不例外, 所得到的结果是否具有普遍性还不清楚, 需要开展更多的案例研究, 同时, 从分子和生理上对这种共生关系的形成、进化、生态适应及生理机制等方面开展深入研究, 相信能给我们带来新的认识。

参考文献

- Aceto S, Caputo P, Cozzolino S, Gaudio L, Moretti A (1999). Phylogeny and evolution of *Orchis* and allied genera based on ITS DNA variation: Morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 13, 67–76.
- Arditti J (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33, 1–97.
- Arditti J, Ghani AKA (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145, 367–421.
- Bidartondo MI, Read DJ (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17, 3707–3716.

- 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.
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, Berg C, Schuitman A (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177, 151–174.
- Coyne JA, Orr HA (2004). *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Cozzolino S, Widmer A (2005). Orchid diversity: An evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 487–494.
- Dafni A, Ivri Y (1979). Pollination ecology of, and hybridization between, *Orchis coriophora* L. and *O. collina* Sol. ex Russ. (Orchidaceae) in Israel. *New Phytologist*, 83, 181–187.
- Dearnaley JDW, Martos F, Seloosse MA (2012). Orchid mycorrhizas: Molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: Hock B ed. *Fungal Associations*. 2nd edn. Springer, Berlin, Germany. 207–230.
- Dearnaley JDW, Perotto S, Seloosse MA (2016). Structure and development of orchid mycorrhizas. In: Martin F ed. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. Springer, Berlin. 63–86.
- Gao JY, Liu Q, Yu DL (2014). *Orchids of Xishuangbanna: Diversity and Conservation*. China Forestry Publishing House, Beijing. 15–31. [高江云, 刘强, 余东莉 (2014). 西双版纳的兰科植物: 多样性和保护. 中国林业出版社, 北京. 15–31.]
- Hegarty MJ, Hiscock SJ (2005). Hybrid speciation in plants: New insights from molecular studies. *New Phytologist*, 165, 411–423.
- Hollick PS, Taylor RJ, McComb JA, Dixon KW (2005). If orchid mycorrhizal fungi are so specific, how do natural hybrids cope? *Selbyana*, 26, 159–170.
- Huang H, Zi XM, Lin H, Gao JY (2018). Host-specificity of symbiotic mycorrhizal fungi for enhancing seed germination, protocorm formation and seedling development of over-collected medicinal orchid, *Dendrobium devonianum*. *Journal of Microbiology*, 56, 42–48.
- Kauth P, Dutra D, Johnson T (2008). Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. In: Teixeira da Silva JA ed. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Global Science Books, Iselworth, UK. 375–391.
- Lee YI (2007). The asymbiotic seed germination of six *Paphiopedilum* species in relation to the time of seed collection and seed pretreatment. *Acta Horticulturae*, 755, 381–386.
- 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.
- Long B, Niemiera AX, Cheng ZY, Long CL (2010). *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 101, 151–162.
- Mallet J (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 229–237.
- Martos F, Francios M, Pailler T, Kottke I, Cédric G, Marc-André Seloosse (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*, 21, 5098–5109.
- 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.
- McCormick MK, Jacquemyn H (2014). What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist*, 202, 392–400.
- McKendrick SL, Leake JR, Read DJ (2000). Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: Transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist*, 145, 539–548.
- Meng YY, Shao SC, Liu SJ, Gao JY (2019). Do the fungi associated with roots of adult plants support seed germination? A case study on *Dendrobium exile* (Orchidaceae). *Global Ecology and Conservation*, 17, e00582. DOI: 10.1016/j.gecco.2019.e00582.
- Nontachaiyapoom S, Sasirat S, Manoch L (2010). 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. *Mycorrhiza*, 20, 459–471.
- Ramsay MM, Stewart J (1998). Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium Calceolus* L.) in Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126, 173–181.
- Rasmussen HN, Dixon KW, Jersakova J, Tesitelova T (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116, 391–402.
- Roberts DL (2003). Pollination biology: The role of sexual reproduction in orchid conservation. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ eds. *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah. 113–136.
- Schatz B (2006). Fine scale distribution of pollinator explains the occurrence of the natural orchid hybrid \times *Orchis bergonii*. *Ecoscience*, 13, 111–118.
- Schatz B, Geoffroy A, Dainat B, Bessiere JM, Buatois B, Hossaert-Mckey M, Seloosse MA (2010). A case study of modified interactions with symbionts in a hybrid mediterranean orchid. *American Journal of Botany*, 97, 1278–1288.
- Sheng CL, Li YY, Gao JY (2012). *Ex situ* symbiotic seed

- germination, isolation and identification of effective symbiotic fungus in *Cymbidium mannii* (Orchidaceae). *Chinese Journal of Plant Ecology*, 36, 859–869. [盛春玲, 李勇毅, 高江云 (2012). 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. 植物生态学报, 36, 859–869.]
- Stewart SL, Kane ME (2007). Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 178–186.
- Stimart DP, Ascher PD (1981). *In vitro* germination of *Paphiopedilum* seed on a completely defined medium. *Scientia Horticulturae*, 14, 165–170.
- Swarts ND, Dixon KW (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104, 543–556.
- Vujanovic V, St-Arnaud M, Barabe D, Thibeault G (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, 86, 79–86.
- Whitehead MR, Peakall R (2014). Pollinator specificity drives strong pre-pollination reproductive isolation in sympatric sexually deceptive orchids. *Evolution*, 68, 1561–1575.
- Yamazaki J, Miyoshi K (2006). *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cepha-*
- lanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98, 1197–1206.
- Zelmer CD, Cuthbertson L, Currah RS (1996). Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37, 439–448.
- 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.
- Zhou X, Gao JY (2016). Highly compatible Epa-01 strain promotes seed germination and protocorm development of *Papilionanthe teres* (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 125, 479–493.
- Zi XM, Sheng CL, Goodale UM, Shao SC, Gao JY (2014). *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 24, 487–499.
- Zotz G (2013). The systematic distribution of vascular epiphytes—A critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 453–481.

责任编辑: 曹 敏 责任编辑: 李 敏



扫码加入读者圈
听语音, 看问答