

菌根真菌促白花白及种子萌发影响研究

浦雨琳^{1,2}, 黄卫昌², 黄清俊¹, 李善敏², 任俏宁^{1,2}, 曾歆花^{2*}

1. 上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海 201418; 2. 上海辰山植物园/华东野生濒危资源植物保育中心, 上海 201602

摘要: 白花白及为白及的变种, 具有较高的观赏和药用价值, 目前尚无其种子萌发和繁育的研究报道。本研究以白花白及种子作为试验材料, 开展室内种子萌发和盆栽验证试验, 研究不同来源菌根真菌 (MB-15、MB-18、MH1-E 和 YDLXB) 对白花白及种子萌发和幼苗生长的影响。结果表明: 不同菌根真菌对白花白及种子的促萌发效果存在差异, 其中以来源于白及菌根的蜡壳菌属真菌 MB-18 的促进作用最为显著, 其室内共生萌发种子萌发率和幼苗率较对照分别提高 10.76% 和 20.55%, 盆栽试验中则分别提高了 36.95% 和 355.78%。此外, 直播条件下白花白及种子能够萌发, 但其幼苗的形成过程受到限制, 而供试的菌根真菌 (MB-15、MB-18、MH1-E 和 YDLXB) 则可有效地促进幼苗的形成。本研究结果对白花白及的种质资源保护、种苗规模化繁育和可持续利用具有重要意义。

关键词: 白花白及; 菌根真菌; 种子萌发; 盆栽试验

中图分类号: S567.239 文献标志码: A

Effects of Mycorrhizal Fungi on Seed Germination of *Bletilla striata* var. *Alba*

PU Yulin^{1,2}, HUANG Weichang², HUANG Qingjun¹, LI Shanmin², REN Qiaoning^{1,2}, ZENG Xinhua^{2*}

1. School of Ecological Technology and Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China; 2. Shanghai Chenshan Botanical Garden / Eastern China Conservation Centre for Wild Endangered Plant Resources, Shanghai 201602, China

Abstract: *Bletilla striata* var. *Alba* is a variant of *B. striata* which possesses high ornamental and medicinal value. However, there have been no reports on its seed germination and propagation to date. In this study, using the seeds of *B. Striata* var. *Alba* as the experimental material, indoor seed germination tests and pot tests were carried out to investigate the effects of mycorrhizal fungi from different sources (MB-15, MB-18, MH1-E and YDLXB) on seed germination and seedling growth. The results demonstrated that various mycorrhizal fungi had different effects on promoting the germination of *B. striata* var. *Alba* seeds. Among them, the *Sebacina* fungus MB-18, derived from the roots of *B. striata*, exhibited an extremely significant promotional effect. Compared with the control treatment, the germination rate and seedling formation rate in the petri dish experiment increased by 10.76% and 20.55% respectively, while in the pot validation test was 36.95% and 355.78%, respectively. Moreover, when sown directly, the seeds of *B. striata* var. *Alba* could germinate, but the seedling formation process was hindered. However, compatible mycorrhizal fungi (MB-15, MB-18, MH1-E and YDLXB) effectively promoted the formation of seedlings. The results are of great significance for the germplasm conservation, large-scale seedling breeding and sustainable utilization of *B. striata* var. *Alba*.

Keywords: *Bletilla striata* var. *Alba*; mycorrhizal fungi; seed germination; pot test

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.05.018

收稿日期 2025-01-24; 接受日期 2025-02-21

基金项目 上海市农业科技创新项目 (No. 2021-02-08-00-12-F00778); 上海市绿化和市容管理局科技攻关项目 (No. G242413, No. G252413)。

作者简介 浦雨琳 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 兰科植物与菌根真菌共生。*通信作者 (Corresponding author): 曾歆花 (ZENG Xinhua), E-mail: zengxinhualuxi@163.com。

兰科植物种子细小,无胚乳,自然条件下种子的成功萌发和早期原球茎阶段均需要菌根真菌的定殖,对菌根真菌有着不同程度的依赖性^[1]。菌根真菌可为兰科植物种子萌发及幼苗生长提供所需的碳氮源以及矿物质等营养物质^[2-3]。高匹配度的共生真菌对兰科植物的种子萌发、幼苗建成、种群恢复以及野外回归实践等均发挥着重要作用^[4]。徐锦堂等^[5]研究发现,自然条件下天麻种子需与紫萁小菇(*Mycena osmundicola* Lange) GSF-8104 等真菌拌种才能萌发形成原球茎,而原球茎及营养繁殖茎则必须与蜜环菌(*Armillaria mellea* Fr.)共生才能正常生长形成粗壮的新生麻。此外,紫萁小菇等真菌对白及种子萌发、形成原球茎的叶片、假根等分化具有显著促进作用,且菌根化的幼苗移栽到野外比无菌组培苗具有更高的存活率和生长速率^[6]。ZI 等^[7]研究发现,从兜唇石斛(*Dendrobium aphyllum*)原球茎中分离得到的胶膜菌属(*Tulasnella* spp.)真菌能极显著促进其种子萌发和幼苗形成,成苗率达 45.2%,而同样从原球茎中分离得到的木霉属(*Trichoderma* spp.)真菌则抑制其种子萌发。AGGARWAL 等^[8]利用真菌共生萌发技术,有效地培育出健壮的掌裂兰(*Dactylorhiza hatagirea*)幼苗,并将其成功地引入原生栖息地。共生萌发法被认为是保护兰科资源的一种有效方式,甚至被应用于兰科植物的繁育生产^[9]。

白及(*Bletilla striata*)为兰科(Orchidaceae)白及属(*Bletilla*)的多年生草本植物,为我国传统的中药材,具有止血、抗菌、消肿生肌和抗肿瘤等功效,临床应用广泛^[10-11]。近年来由于市场需求量增大,野生资源匮乏,已被《中国高等植物红色名录》列为濒危物种^[12]。白花白及(*Bletilla striata* var. *alba*)为白及的变种,花呈白色,具有较高的观赏和药用价值,此外其生物量较普通白及大,极具市场开发潜力。本团队前期研究发现,白花白及相比普通白及具有更高的药用价值,其多糖、葡萄糖和甘露糖含量分别是普通白及的 2.59、3.14、2.25 倍^[13]。目前,白及的繁育多以组培为主,该方法能保持白及的稳定性并实现种苗快速繁育,但存在炼苗存活率和块茎有效成分低等问题^[14]。也有学者尝试采用种子直播的方法进行规模化繁育,种子萌发率可达 69.7%^[15],但存在后期生长缓慢、温湿度管理要求高等问题。

而通过筛选有效菌株与种子共生萌发的方法,不仅能提高种子萌发率,快速成苗,而且能抵御外界不良环境的伤害,有效解决上述问题。此外,白及种子中含有蛋白质、脂肪和碳水化合物等营养物质,对真菌的要求不严格^[16]。徐玲玲等^[14]利用鬼伞属(*Coprinus*)、胶膜菌属(*Tulasnella*)、腊壳菌属(*Sebacina*)和无孢腊壳菌属(*Serendipita*)菌株与白及种子进行共生萌发,发现腊壳菌菌株 SL15-7 和无孢腊壳菌菌株 JST-3 不仅能促进种子萌发和幼苗形成,而且对幼苗生根也有显著效果。陈晓芳等^[17]利用 *Epulorhiza* sp. 和 *Sebacina* sp. 菌株对黄花白及种子进行共生萌发,发现这 2 种菌均显著促进黄花白及种子萌发,萌发率分别比对照提高 8.61% 和 18.43%。目前对于白及属种子共生萌发研究主要集中在白及和黄花白及上,且以室内共生萌发为主,但缺乏相关的验证试验,而对于营养价值更高的白花白及则未见报道,这不利于白花白及的资源保护、规模化繁育和可持续开发利用。

本研究通过开展菌根真菌与白花白及种子的共生萌发试验,分析不同来源菌根真菌对种子萌发和幼苗生长的影响,筛选出对白花白及种子萌发和幼苗生长具有促进作用的菌根真菌,并通过盆栽试验来验证其促生效应,旨在为白花白及种苗的规模化繁育提供可利用的菌种资源,为促进白及产业化发展和种质资源保护提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 于 2023 年 9 月在上海辰山植物园苗圃采集成熟且尚未开裂的白花白及蒴果作为种子萌发材料。

1.1.2 供试基质 (1) 菌株活化培养基。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 200 g/L 马铃薯, 20 g/L 葡萄糖, 15 g/L 琼脂。

(2) 菌液制备培养基。马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB): 200 g/L 马铃薯, 20 g/L 葡萄糖。

(3) 种子萌发共生培养基。燕麦琼脂培养基(OMA): 2.5 g/L 燕麦, 10 g/L 琼脂。

(4) 室内盆栽基质。灭菌后的草炭和珍珠岩混合基质(体积比为 3:1)。

1.1.3 真菌材料 选用 2 株分离自白及根组织的蜡壳菌属菌株(MB-15、MB-18)、1 株分离自蒙自兰原球茎的蜡壳菌属菌株(MH1-E)和 1 株植

物广谱内生菌印度梨孢菌菌株（YDLXB）。以 *Tulasnella calospora*（GU166419）为外类群，利用分离菌株的 ITS 序列与 NCBI 中获得的近缘种序列构建最大似然法（maximum likelihood, ML）系统发育树,利用 MEGA 11.0 软件进行序列比对，

通过 FigTree v 1.4.4 软件进行系统发育树的编辑，设置 bootstrap 值为 1000, 系统发育分析结果如图 1 所示。在共生萌发前，将菌株置于(25±2)℃ 黑暗条件下培养 7~10 d，菌落边缘生长旺盛的菌丝用于真菌接种。菌株情况如表 1 所示。

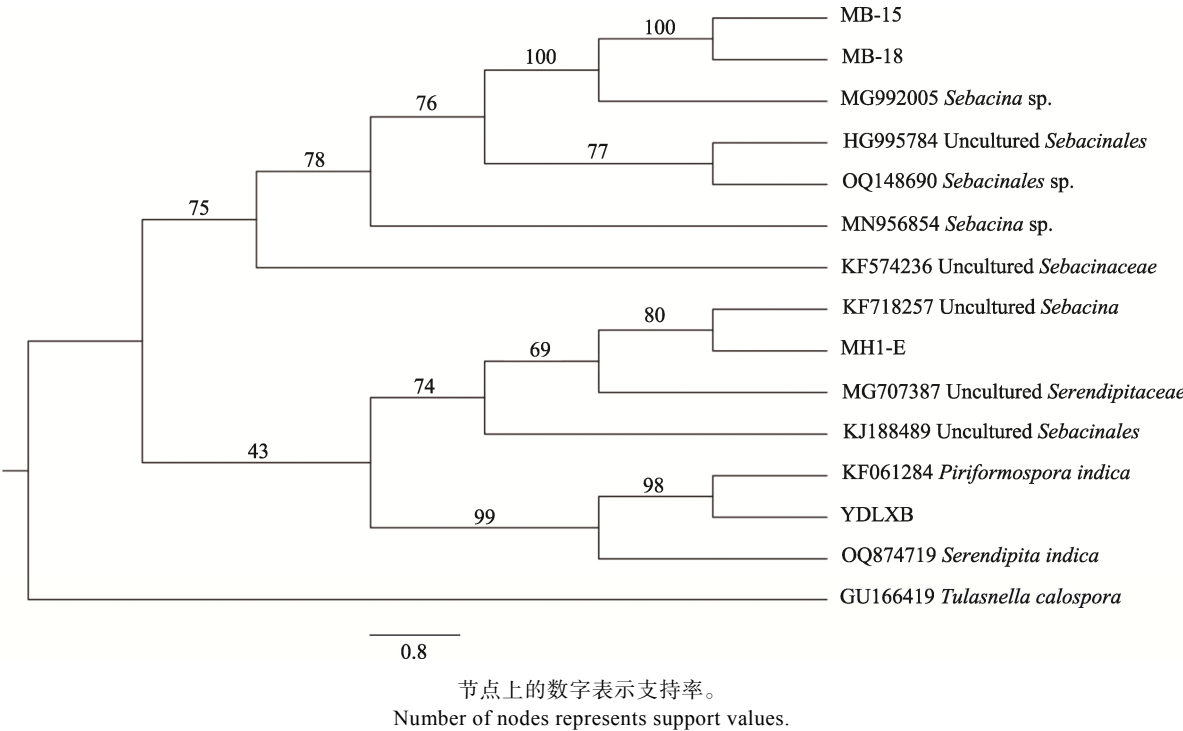


图 1 基于核糖体 ITS 序列构建的最大似然法（ML）系统发育树
Fig. 1 Maximum-likelihood (ML) tree constructed based on rDNA-ITS sequences

表 1 供试菌株的分子鉴定
Tab. 1 Molecular identification of tested strains

菌株 Strain	拉丁名称 Latin name	中文名称 Chinese name	来源 Source	登录号 Accession No.	同源性 Identity/%
MB-15	<i>Sebacina</i> sp.	蜡壳菌属	白及根系	PQ610543	99.64
MB-18	<i>Sebacina</i> sp.	蜡壳菌属	白及根系	PQ610544	99.64
MH1-E	Uncultured <i>Sebacina</i>	蜡壳菌属	蒙自兰原球茎	PQ628116	93.33
YDLXB	<i>Serendipita indica</i>	印度梨形孢	植物广谱内生菌	PQ899502	98.71

1.2 方法

1.2.1 种子萌发试验 共设 5 个处理：未接种（CK），以及分别接种菌根真菌 MB-15、MB-18、MH1-E 和 YDLXB，每个处理重复 10 次。超净工作台上选择饱满的白花白及蒴果，先用 75%酒精消毒 30 s，再用 3.5%次氯酸钠消毒 10 min，后用无菌水冲洗 3 次。用无菌滤纸吸干蒴果表面水分，用镊子和解剖刀将蒴果切开，将种子制成种子悬浮液。吸取种子悬浮液，每个培养皿撒播 1 mL（约含 100 粒种子），将直径为 5 mm 的真菌菌块置于

培养皿中部。置于 12 h 光照、12 h 黑暗，光照强度为 2000 lx，温度为(25 ± 2)℃的环境中培养，分别于 15、35、115 d 观察，统计种子萌发情况。
1.2.2 室内盆栽试验 将真菌接种于 PDB 培养基中，在恒温振荡摇床中 27 ℃、160 r/min 条件下培养 7 d。盆栽试验在塑料盆（口径 12 cm、底径 8 cm、高 8 cm）中进行，共设 5 个处理：未接种（CK），以及分别接种菌根真菌 MB-15、MB-18、MH1-E 和 YDLXB，每盆装入 80 g 基质，基质含水量为 100%，在基质上方铺一层孔径为 250 目的

尼龙网布。每盆播 100 粒左右种子，每个处理重复 3 次。在处理组每盆中加入 10 mL 真菌菌液，在对照组中接入 10 mL 无菌培养基提取液。置于 12 h 光照、12 h 黑暗，光照强度为 2000 lx，温度为(25±2)℃的环境中培养，定期浇水，分别于 25、50、105 d 观察、统计种子萌发情况，105 d 时测定白花白及的株高、叶长、叶宽、叶数、球茎粗、根长、根粗、根数和鲜质量等指标。

1.2.3 真菌侵染情况观察 在共生 105 d,种子萌发形成根系后，取出根段，用双面刀片切成薄片（约 100 μm），切片置于光学显微镜下观察，通过徒手切片观察不同处理根系的真菌侵染情况。

1.2.4 真菌对种子萌发的有效性检测 参照 STEWART 等^[18]对种子萌发阶段的分级标准，将种子萌发分为 4 个阶段：种子未萌发阶段、种子萌发（种胚膨大并产生根状物）阶段、原球茎形成和发育（种胚膨大突破种皮至出现原分生组织）阶段及幼苗分化和发育阶段（长出第 1 片叶及后

续生长）阶段（表 2），分别计算各阶段种子萌发率、原球茎率和幼苗率。

于培养皿和盆栽试验每个处理中分别选取 5 皿/3 盆，观察，统计皿/盆中的种子萌发数或幼苗数，计算萌发率、原球茎率、幼苗率。计算公式如下：种子萌发率=萌发种子数/播种种子总数×100%；原球茎率=(原球茎数+幼苗数)/播种种子总数×100%；幼苗率=幼苗数/播种的种子总数×100%。

1.3 数据处理

采用 Excel 2019 软件对试验数据进行整理、统计，采用 SPSS 26.0 软件对数据进行单因素方差分析，利用邓肯式新复极差法（Duncan’s new multiple-range test）进行多重比较（P<0.05），采用 Origin 2021 软件绘图。

2 结果与分析

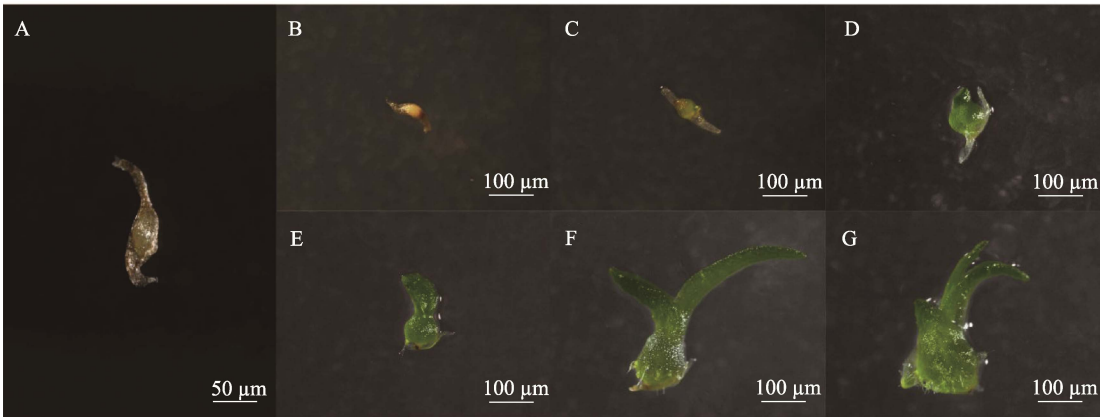
2.1 不同发育阶段种子萌发形态

未萌发的白花白及种子细小，长 144.14 μm，宽 21.46 μm，呈两头稍尖中间鼓的枣核形，胚位于种皮中央，种皮半透明，此时处于 0 级萌发(图 2A)；将种子播种在 OMA 培养基上后，种胚及种皮开始吸水膨胀，3~7 d 种胚膨大变绿，视为进入萌发的第 1 阶段（图 2B、图 2C）；7~15 d 时，种胚继续膨胀并突破种皮，形成原球茎，到达萌发的第 2 阶段（图 2D）；15 d 后原球茎体积逐渐增大并发育形成第 1 片叶，长出细长绒毛状的假根（图 2E），30 d 后原球茎长出 1~2 片叶进入幼苗阶段，此时处于萌发的第 3 阶段（图 2F、图 2G）。

表 2 白花白及种子不同萌发阶段

Tab. 2 Different germination stages of *B. striata* var. *Alba* seeds

阶段 Stage	描述 Description
0	未萌发的种子
1	种胚吸水膨胀，呈绿色（视为种子萌发）
2	种胚膨大，突破种皮至出现原分生组织（原球茎形成和发育阶段）
3	长出第 1 片叶片及后续生长（幼苗分化和发育阶段）



A: 阶段 0; B、C: 阶段 1; D: 阶段 2; E~G: 阶段 3。
A: Stage 0; B, C: Stage 1; D: Stage 2; E~G: Stage 3.

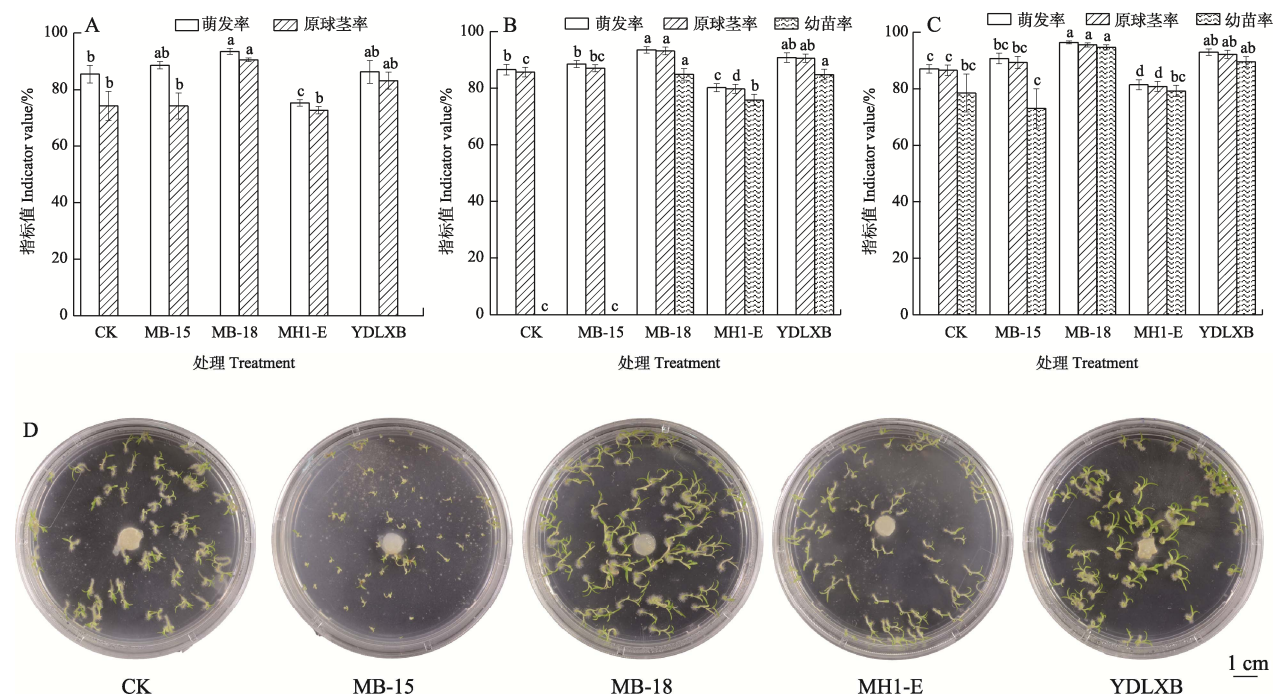
图 2 白花白及种子无菌萌发发育阶段

Fig. 2 Developmental stages of asymbiotic seed germination of *B. striata* var. *Alba*

2.2 兰科菌根真菌对白花白及种子萌发和幼苗生长的影响

2.2.1 种子萌发试验 结果表明，不同处理的种子萌发情况存在显著差异（图 3）。共生萌发第 15 天，5 组处理的白花白及种子均萌发进入原球茎阶段，各处理的萌发率与原球茎率存在一定差异。MB-18 处理的萌发率和原球茎率分别为 93.51% 和 90.57%，显著高于 CK，MB-15 和 YDLXB 处理与 CK 之间无显著差异，而 MH1-E 处理的萌发率显著低于 CK（图 3A）。第 35 天，各处理的白花白及种子萌发率存在较大差异。其中，MB-18

处理的种子萌发率（93.55%）显著高于 CK、MB-15 和 MH1-E 处理；MB-18 和 YDLXB 处理的原球茎率分别为 93.17% 和 90.54%，显著高于 CK 和 MH1-E 处理；此外，MB-18、MH1-E、YDLXB 处理的种子已萌发形成幼苗，幼苗率分别为 84.88%、75.87% 和 84.80%，而 CK 和 MB-15 处理的种子尚未形成幼苗（图 3B）。第 115 天，MB-18 处理的萌发率、原球茎率和幼苗率分别为 96.42%、95.51% 和 94.64%，均显著高于 CK，而 MB-15、MH1-E 和 YDLXB 处理的幼苗率与 CK 无显著差异（图 3C）。第 115 天各处理的种子萌发生长情况见图 3D。

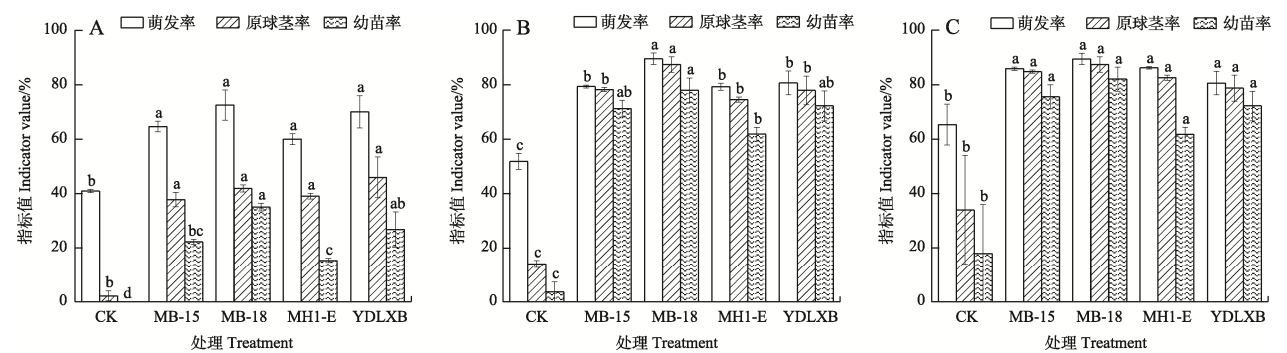


A: 15 d; B: 35 d; C, D: 115 d. 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
A: 15 d; B: 35 d; C, D: 115 d. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).
图 3 种子萌发试验中不同处理白花白及的萌发情况

Fig. 3 Germination of *B. striata* var. *Alba* under different treatments in seed germination test

2.2.2 盆栽试验 (1) 兰科菌根真菌对白花白及种子萌发率和成苗率的影响。室内盆栽试验结果表明，菌液 MB-15、MB-18、MH1-E、YDLXB 对白花白及种子均表现出较好的促萌发效果，与 CK 均差异显著（图 4）。其中，MB-18 菌液在室内盆栽试验中的促萌发效果最好，生长状态明显优于 CK（图 5）。共生萌发第 25 天，4 组菌液处理的种子促萌发及成苗效果显著，均萌发进入第 3 阶段，此时 CK 的种子仍处于第 2 阶段，未形成幼苗（图 4A）。第 50 天，MB-18 的促萌发效果最为显著，萌发率、原球茎率和幼苗率分别为 89.50%、87.39%、

77.97%，显著高于 CK（图 4B）。第 105 天，与 CK 相比，4 组菌液处理的种子萌发率、原球茎率及幼苗率均有显著提高，且种子以第 3 阶段为主，而 CK 的大部分种子仍停留在第 2 阶段（图 4C）。
(2) 兰科菌根真菌对白花白及幼苗生长指标的影响。4 组菌液处理对白花白及幼苗地上和地下部分的生长均有促进作用，显著提高了幼苗株高、叶长、叶宽、叶数、根长、根粗、根数及鲜质量（表 3），除 MB-15 和 MH1-E 处理外，其余菌液处理均显著增加白花白及的球茎粗和鲜质量，其中，MB-18 处理的所有指标均显著高于 CK



A: 25 d; B: 50 d; C: 105 d。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
A: 25 d; B: 50 d; C: 105 d. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 4 盆栽试验中不同处理白花白及的萌发情况

Fig. 4 Germination of *B. striata* var. *Alba* under different treatments in pot test

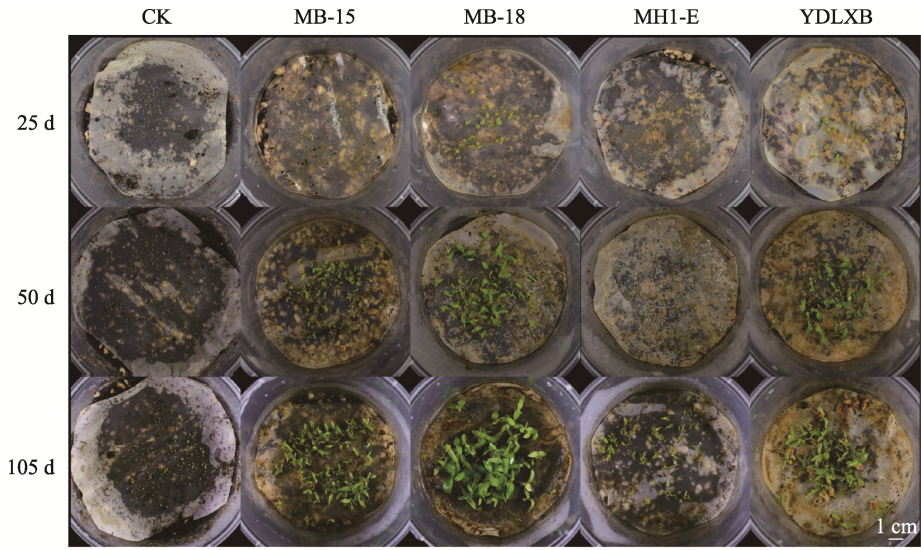


图 5 不同培养时间不同处理白花白及的萌发情况

Fig. 5 Seed germination of *B. striata* var. *Alba* at different culture time under different fungal treatments

表 3 不同处理白花白及的生长发育指标

Tab. 3 Growth and development index of *B. striata* var. *Alba* in different treatments

指标 Index	CK	MB-15	MB-18	MH1-E	YDLXB
株高/mm	1.74±0.07 ^b	10.28±1.22 ^a	11.74±0.50 ^a	11.21±0.49 ^a	12.05±0.87 ^a
叶长/mm	0.83±0.10 ^c	9.83±0.89 ^a	10.14±0.75 ^a	6.91±0.87 ^b	9.02±1.03 ^{ab}
叶宽/mm	0.45±0.05 ^c	2.55±0.38 ^b	3.75±0.29 ^a	2.54±0.25 ^b	3.16±0.26 ^{ab}
叶数	1.00±0.00 ^b	2.80±0.37 ^a	2.60±0.24 ^a	3.00±0.32 ^a	2.80±0.20 ^a
球茎粗/mm	1.24±0.19 ^b	1.36±0.20 ^b	2.38±0.29 ^a	1.13±0.11 ^b	2.00±0.20 ^a
根长/mm	0.00±0.00 ^b	6.94±0.81 ^a	5.56±1.18 ^a	4.57±0.60 ^a	6.57±1.33 ^a
根粗/mm	0.00±0.00 ^b	0.56±0.07 ^a	0.72±0.11 ^a	0.53±0.09 ^a	0.57±0.04 ^a
根数	0.00±0.00 ^c	1.80±0.37 ^{ab}	2.40±0.24 ^a	1.40±0.24 ^b	1.80±0.20 ^{ab}
鲜质量/g	0.0007±0.0002 ^c	0.0219±0.0023 ^b	0.0346±0.0034 ^a	0.0156±0.0028 ^b	0.0383±0.0013 ^a

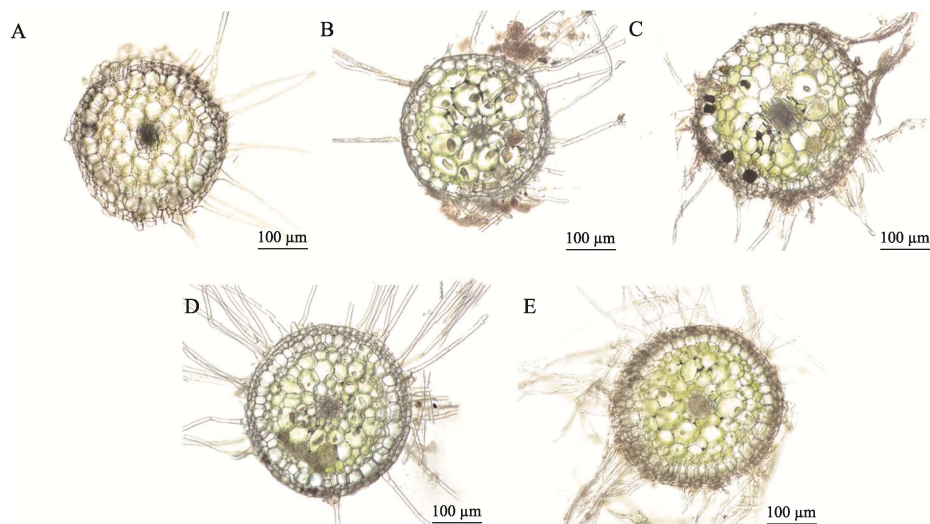
注：不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

和其他接菌处理，促生效果最好。

2.3 不同处理白花白及根内真菌侵染定殖情况

选取盆栽试验中不同处理的白花白及幼苗根段进行侵染观测,CK 的根段未见真菌菌丝的侵染

(图 6A), 而 MB-15、MB-18、MH1-E、YDLXB 菌液处理的根段能观测到真菌菌丝的定殖(图 6B~图 6E), 菌丝主要分布在根段的皮层薄壁细胞上, 表明白花白及与处理的 4 种真菌建立了共生关系。



A: CK; B: MB-15; C: MB-18; D: MH1-E; E: YDLXB.

图 6 菌根真菌在白花白及根内的定殖情况

Fig. 6 Colonization of mycorrhiza fungi in root of *B. striata* var. *Alba*

3 讨论

自然条件下兰科植物种子萌发率极低, 种子萌发障碍给兰科植物繁育和资源保护带来巨大挑战^[19]。自然条件下几乎所有兰科植物种子均与真菌形成共生关系, 依靠真菌侵染提供营养而萌发, 但不同类型的菌根真菌对兰科植物种子促萌发效应存在较大的差异^[20-21]。不匹配的真菌可能会促进种子萌发, 但不会支持其幼苗的后续生长发育^[22], 而匹配度高的真菌则可迅速将无营养储备的微小种子发育成幼苗^[23]。本研究中的 3 株蜡壳菌属菌株和 1 株梨形孢属菌株对白花白及种子的促萌发效果存在较大差异, 其中分离自白及菌根的蜡壳菌属真菌 MB-18 和植物广谱内生菌的梨形孢属真菌 YDLXB 能极显著促进种子萌发和幼苗形成, 且以 MB-18 的促进作用最为显著。其他学者的研究表明, 蜡壳菌属 (SL15-7、QZPS-G018) 以及梨形孢属 (R6) 真菌能够有效地促进白及^[14, 24]和黄花白及^[17]的种子萌发和幼苗形成, 且对幼苗生根、幼苗鲜质量和干质量增加均有显著促进作用。蜡壳菌属和梨形孢属真菌同属于蜡壳菌目真菌, 可推断蜡壳菌目真菌为促进白及属种子萌发的有效真菌, 且蜡壳菌属真菌的促萌发效果要优于梨形孢属真菌。

兰科植物与菌根真菌的共生关系受多种因素的影响, 不同条件下菌根真菌的促萌发作用也存在较大差异。本研究的培养皿萌发试验中, 蜡壳菌属真菌 MB-15 对白花白及种子萌发和幼苗生长

无显著促进作用, 且真菌 MH1-E 抑制其种子萌发, 而盆栽试验中这 2 株真菌却不同程度地促进种子萌发和幼苗建成。其他兰科植物也有类似的情况, 如铁皮石斛 (*D. officinale*)^[25]、鸟巢兰 (*Neottia nidus-avis*)^[26]和绶草 (*Spiranthes sinensis*)^[27]等兰科植物种子的萌发受环境因素的影响, 在自然条件下和实验室条件下表现出不同的专一性。这是因为兰科植物与菌根真菌的专一性关系受多种因素影响, 如兰科植物分类地位、营养和生态类型、地理分布、土壤养分有效性等^[28-29]。厘清不同培养条件菌根真菌对兰科植物种子萌发的影响, 对兰科植物的保育和栽培、濒危兰科植物种群资源的保护和恢复具有重要意义。

相比其他兰科植物, 白及属植物与菌根真菌的专一性较弱。如珍稀陆生兰 (*Caladenia huegelli*) 专一地与 *Serendipita vermifera* 共生^[30], 金钗石斛 (*D. nobile*) 高度专一地与胶膜菌科 (Tulasnellaceae) 真菌共生^[31], *Pterostylis nutans* 和 *Sarcophilus weinthalii* 仅与角担菌属 (*Ceratobasidium*) 真菌共生^[32-33], 而珊瑚兰 (*Corallorhiza trifida*) 专一地与革菌科 (Telephoraceae) 真菌共生^[34]。本研究中, 盆栽试验的 3 株蜡壳菌属菌株和 1 株梨形孢属菌株均显著地促进白花白及种子萌发和幼苗生长。此外, 也有学者研究发现, 镰刀菌属 (*Fusarium oxysporum*) 菌株 KB-3、丝衣霉属 (*Byssosclamyces spectabilis*) 菌株 1-N2 和毛栓菌 (*Trametes hirsuta*) 均能显著缩短白及种子

的萌发时间,并且提高其幼苗的芽长、假鳞茎干质量、假鳞茎直径、鲜质量和株高等生长指标^[35-37]。表明白及属植物与菌根真菌专一性较弱,能与多种菌根真菌形成共生关系,这有利于白及对土壤中营养元素的吸收和对环境的适应,在一定程度上解释了白及分布范围较广和适应性较强的原因。此外,白及种胚的薄壁细胞中储存有蛋白质、脂肪和碳水化合物等营养成分,即使在无外源营养供给的情况下,其营养储备也足以支持其种子实现初始萌发,这使得个别菌株与 CK 相比无显著促进萌发效果。

基于兰科植物天然的真菌共生特性,利用真菌共生技术对兰科植物进行保育以及规模化繁育是兰科植物研究的重要方向^[38]。因此,寻找促进兰科植物种子萌发的共生真菌,对濒危兰科植物的保护和繁育具有重要意义。据报道,分离自天麻(*Gastrodia elata*)原球茎中的紫萁小菇真菌 GSF-8104 有效地推动了天麻人工栽培和保育工作,分离自鼓槌石斛(*D. chrysotoxum*)原球茎中的菌株 GC-14 和 GC-15,以及来源于白旗兜兰(*Paphiopedilum spicerianum*)原球茎中的 GYBQ01 和 GYBQ02 菌株,成功实现了鼓槌石斛与白旗兜兰的野外回归^[39-41]。本研究中的 4 株菌株均能与白花白及建立共生关系,在萌发幼苗根系中形成菌丝团,其中以白及菌根中分离的蜡壳菌属真菌 MB-18 的促进作用最为显著,在培养皿内培养 115 d 后种子萌发率、原球茎率、幼苗率比 CK 处理分别提高了 10.76%、10.37% 和 20.55%;盆栽试验中则分别提高了 36.95%、157.18% 和 355.78%,均显著促进种子萌发和幼苗建成。因此,蜡壳菌属菌株 MB-18 可能是白花白及从种子萌发、幼苗生长到成年植株整个发育过程中均具有促进作用的“万能”菌株,这对白花白及的规模化繁育和资源保护具有重要意义。蜡壳耳目(*Sebacinales*)真菌已被证实能够支持多种濒危兰科植物的种子萌发和幼苗发育,如马达加斯加中部高地特有地生兰(*Cynorkis purpurea*)、铁皮石斛(*D. officinale*)和金钗石斛(*D. nobile*)等^[42-43]。当这些亲和真菌与种子或幼苗建立起共生关系后,它们能够通过菌丝在细胞内的侵染、消解及再侵染的循环过程,将营养物质有效地提供给植物,从而为濒危兰科植物的种子萌发和植株生长提供必要的支持^[44-45]。

4 结论

本研究比较了不同兰科菌根真菌对白花白及种子的促萌发效果,研究发现白花白及种子可以在无真菌共生的条件下实现自萌发,这可能与其种胚细胞含有的脂质为种子萌发提供营养有关^[16],但后续的幼苗形成和生长发育过程需要菌根真菌的参与。不同菌根真菌对白花白及种子的促萌发作用存在一定差异,与兼容性(compatibility)高的菌根真菌(MB-18)共生时,其种子萌发率、原球茎率和幼苗率均显著增加;镜检显示其他菌株虽然也可以和白花白及形成共生关系,但不能明显促进种子萌发、形成原球茎和幼苗。此外,盆栽试验显示,蜡壳菌 MB-18 对白花白及幼苗生长有显著的促进作用,可能是白花白及从种子萌发到成年植株整个发育过程中均具有促进作用的“万能”菌株,这一菌株的获得对白花白及的规模化繁育、种质资源保护和微生物菌剂的开发具有重要意义。

参考文献

- [1] MERCKX V S F T. Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi[M]. New York: Springer, 2013: 1-17.
- [2] 李景燕, 张丽华, 钟静, 段连生. 不同菌根真菌对铁皮石斛穴盘苗生长及生根的影响[J]. 华北农学报, 2022, 37 (增刊 1): 172-177.
LI J H, ZHANG L H, ZHONG J, DUAN L S. Effects of different mycorrhizal fungi on growth and root system of plug seedlings of *Dendrobium officinale*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2022, 37(Suppl. 1): 172-177. (in Chinese)
- [3] ZHAO D K, SELOSSE M A, WU L M, LUO Y, SHAO S C, RUAN Y L. Orchid reintroduction based on seed germination-promoting mycorrhizal fungi derived from protocorms or seedlings[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 701152.
- [4] HUANG H, ZI X M, LIN H, GAO J Y. Host-specificity of symbiotic mycorrhizal fungi for enhancing seed germination, protocorm formation and seedling development of over-collected medicinal orchid, *Dendrobium devonianum*[J]. Journal of Microbiology, 2018, 56(1): 42-48.
- [5] 徐锦堂, 郭顺星. 供给天麻种子萌发营养的真菌——紫萁小菇[J]. 真菌学报, 1989(3): 221-226, 245.
XU J T, GUO S X. Fungus associated with nutrition of seed germination of *Gastrodia elata*: *Mycena osmundicola* Lange [J]. Acta Mycologica Sinica, 1989(3): 221-226, 245. (in Chinese)
- [6] 郭顺星, 徐锦堂. 白及种子萌发和幼苗生长与紫萁小菇等

- 4种真菌的关系[J]. 中国医学科学院学报, 1992(1): 51-54, 79-80.
- GUO S X, XU J T. The relation between the seed germination and seedling development of *Bletilla striata* and *Mycena osmundicola* etc. fungi[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 1992(1): 51-54, 79-80. (in Chinese)
- [7] ZI X M, SHENG C L, GOODALE U M, SHAO S C, GAO J Y. *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae) [J]. Mycorrhiza, 2014, 24(7): 487-499.
- [8] AGGARWAL S, ZETTLER L W. Reintroduction of an endangered terrestrial orchid, *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo, assisted by symbiotic seed germination: first report from the Indian subcontinent[J]. Nature and Science, 2010, 8(10): 139-145.
- [9] TUPAPAC OTERO J, MOSQUERA A T, FLANAGAN N S. Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond[J]. Lankesteriana, 2013, 13: 57-63.
- [10] 王晓敏, 吴明开, 罗晓青. 珍稀药用兰科植物白及的研究现状与展望[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(3): 42-45.
- WANG X M, WU M K, LUO X Q. Present situation and prospect of *Bletilla striata*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(3): 42-45. (in Chinese)
- [11] 朱新焰, 字淑慧, 唐宇, 张智慧, 杨竹雅, 石亚娜, 钱均祥, 孙信梅, 王家金, 季鹏章. 不同生长年限白及的多糖组织化学定位研究[J]. 西南农业学报, 2019, 32(3): 511-515.
- ZHU X Y, ZI S H, TANG Y, ZHANG Z H, YANG Z Y, SHI Y N, QIAN J X, SUN X M, WANG J J, JI P Z. Histochemistry localization of polysaccharides of *Bletilla striata* in different growth years[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2019, 32(3): 511-515. (in Chinese)
- [12] 覃海宁, 杨永, 董仕勇, 何强, 贾渝, 赵莉娜, 于胜祥, 刘慧圆, 刘博, 严岳鸿, 向建英, 夏念和, 彭华, 李振宇, 张志翔, 何兴金, 尹林克, 林余霖, 刘全儒, 侯元同, 刘演, 刘启新, 曹伟, 李建强, 陈世龙, 金效华, 高天刚, 陈文俐, 马海英, 耿玉英, 金孝锋, 常朝阳, 蒋宏, 蔡蕾, 臧春鑫, 武建勇, 叶建飞, 赖阳均, 刘冰, 林秦文, 薛纳新. 中国高等植物受威胁物种名录[J]. 生物多样性, 2017, 25(7): 696-744.
- QIN H N, YANG Y, DONG S Y, HE Q, JIA Y, ZHAO L N, YU S X, LIU H Y, LIU B, YAN Y H, XIANG J Y, XIA N H, PENG H, LI Z Y, ZHANG Z X, HE X J, YIN L K, LIN Y L, LIU Q R, HOU Y T, LIU Y, LIU Q X, CAO W, LI J Q, CHEN S L, JIN X H, GAO T G, CHEN W L, MA H Y, GENG Y Y, JIN X F, CHANG C Y, JIANG H, CAI L, ZANG C X, WU J Y, YE J F, LAI Y J, LIU B, LIN Q W, XUE N X. Threatened species list of China's higher plants[J]. Biodiversity Science, 2017, 25(7): 696-744. (in Chinese)
- [13] ZHU J, CAI Y M, YANG L Y, LI X, LUO S F, ZENG X H, ZHANG Y C, HUANG W C. Differential metabolic analysis of *Bletilla striata* and its mutants based on widely targeted metabolomics and transcriptomics[J]. Industrial Crops and Products, 2023, 204: 117245.
- [14] 徐玲玲, 张焱, 赵明阳, 李肖肖, 南梦月, 孟凡菊. 菌根真菌对白及种子萌发和幼苗生根的作用[J]. 菌物学报, 2019, 38(9): 1440-1449.
- XU L L, ZHANG Y, ZHAO M Y, LI X X, NAN M Y, MENG F J. Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and seedling rooting of *Bletilla striata*[J]. Mycosystema, 2019, 38(9): 1440-1449. (in Chinese)
- [15] 牛俊峰, 王喆. 白及种子直播繁育新方法[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2016, 44(4): 83-86.
- NIU J F, WANG Z Z. The new direct seeding and breeding method of *Bletilla striata*[J]. Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition), 2016, 44(4): 83-86. (in Chinese)
- [16] ZHANG M, SHAO Q S, XU E T, WANG Z A, WANG Z, YIN L H. *Bletilla striata*: a review of seedling propagation and cultivation modes[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2019, 25(3): 601-609.
- [17] 陈晓芳, 刘淮, 陶刚, 朱英, 刘作易. 兰科菌根真菌对黄花白及 *Bletilla ochracea* Schltr. 种子萌发率的影响[J]. 西南农业学报, 2012, 25(4): 1393-1397.
- CHEN X F, LIU Z, TAO G, ZHU Y, LIU Z Y. Study on seed germination of *Bletilla ochracea* improved by mycorrhizal fungi of orchid[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(4): 1393-1397. (in Chinese)
- [18] STEWART S L, ZETTLER L W. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinqueveta*, *H. macroceratitis*) from Florida[J]. Aquatic Botany, 2002, 72(1): 25-35.
- [19] YANG F S, SUN A H, ZHU J, DOWNING J, SONG X Q, LIU H. Impacts of host trees and sowing conditions on germination success and a simple ex situ approach to generate symbiotic seedlings of a rare epiphytic orchid endemic to Hainan island, China[J]. Botanical Review, 2017, 83: 74-86.
- [20] 杨前宇, 何聪芬, 梁立雄, 王涛, 李璐滨, 刘蕾. 菌根真菌对3种兰花幼苗生长作用研究[J]. 核农学报, 2019, 33(4): 687-695.
- YANG Q Y, HE C F, LIANG L X, WANG T, LI L B, LIU L. Effect of mycorrhizal fungi on the plantlets growth of three species of orchid[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(4): 687-695. (in Chinese)
- [21] 金有亮, 杨福孙, 宋希强, 周兆德. 文心兰组培苗与野生兰科植物内生真菌共培养的生长效应研究[J]. 热带作物

- 学报, 2011, 32(8): 1483-1487.
- JIN Y L, YANG F S, SONG X Q, ZHOU Z D. Studies on symbiotic culture growth effect of *Oncidium* tissue culture seedlings and native orchidaceae plants endophytic fungi[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(8): 1483-1487. (in Chinese)
- [22] RASMUSSEN H N, DIXON K W, JERSAKOVA J, TESITELOVA T. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements[J]. Annals of Botany, 2015, 116(3): 391-402.
- [23] GHIRARDO A, FOCHI V, LANGE B, WITTING M, SCHNITZLER J P, PEROTTO S, BALESTRINI R. Metabolomic adjustments in the orchid mycorrhizal fungus *Tulasnella calospora* during symbiosis with *Serapias vomeracea*[J]. New Phytologist, 2020, 228(6): 1939-1952.
- [24] XI G J, SHI J, LI J B, HAN Z M. Isolation and identification of beneficial orchid mycorrhizal fungi in *Bletilla striata* (Thunb.) Rehb.f. (Orchidaceae)[J]. Plant Signaling & Behavior, 2020, 15(12): e1816644.
- [25] WANG X J, WU Y H, MING X J, WANG G, GAO J Y. Isolating ecological-specific fungi and creating fungus-seed bags for epiphytic orchid conservation[J]. Global Ecology and Conservation, 2021, 28: e01714.
- [26] MCKENDRICK S L, LEAKE J R, TAYLOR D L, READ D J. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp.[J]. New Phytologist, 2002, 154(1): 233-247.
- [27] MASUHARA G, KATSUYA K. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae)[J]. New Phytologist, 1994, 127(4): 711-718.
- [28] SWIFT S, MUNROE S, IM C, TIPTON L, HYNSON N A. Remote tropical island colonization does not preclude symbiotic specialists: new evidence of mycorrhizal specificity across the geographic distribution of the Hawaiian endemic orchid *Anoectochilus sandwicensis*[J]. Annals of Botany, 2019, 123(4): 657-666.
- [29] 唐燕静, 郭顺星, 陈娟. 兰科植物与菌根真菌专一性研究进展[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2021, 42(3): 63-74.
- TANG Y J, GUO S X, CHEN J. Advances in the specificity of Orchid-mycorrhizal fungi[J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition), 2021, 42(3): 63-74. (in Chinese)
- [30] SWARTS N D, SINCLAIR E A, FRANCIS A, DIXON K W. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(15): 3226-3242.
- [31] XING X K, MA X T, MEN J X, CHEN Y H, GUO S X. Phylogenetic constrains on mycorrhizal specificity in eight *Dendrobium* (Orchidaceae) species[J]. Science China Life Sciences, 2017, 60(5): 536-544.
- [32] IRWIN M J, BOUGOURE J J, DEARNALEY J D W. *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a specific association with two *Ceratobasidium* root associated fungi across its range in eastern Australia[J]. Mycoscience, 2007, 48(4): 231-239.
- [33] GRAHAM R R, DEARNALEY J D W. The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*[J]. Fungal Diversity, 2012, 54(1): 31-37.
- [34] ZIMMER K, MEYER C, GEBAUER G. The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial myco-heterotroph[J]. New Phytologist, 2008, 178(2): 395-400.
- [35] JIANG J W, ZHANG K, CHENG S, NIE Q W, ZHOU S X, CHEN Q Q, ZHOU J L, ZHEN X, LI X T, ZHEN T W, XU M Y, HSIANG T, SUN Z X, ZHOU Y. *Fusarium oxysporum* KB-3 from *Bletilla striata*: an orchid mycorrhizal fungus[J]. Mycorrhiza, 2019, 29(5): 531-540.
- [36] CHEN J H, LI L L, TIAN P W, XIANG W, LU X, HUANG R S, LI L B. Fungal endophytes from medicinal plant *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. F. promote the host plant growth and phenolic accumulation[J]. South African Journal of Botany, 2021, 143: 25-32.
- [37] 罗琳, 黄学敏, 陈晓悦, 李龙, 邢玥, 林作栋, 景诗梦, 刘舒雅, 彭东辉. 寒兰根内生真菌诱导子对白芨种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 热带作物学报, 2021, 42(2): 442-448.
- LUO L, HUANG X M, CHEN X Y, LI L, XING Y, LIN Z D, JING S M, LIU S Y, PENG D H. Effects of endophytic fungal elicitors from *Cymbidium kanran* roots on seed germination and plant growth of *Bletilla striata*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(2): 442-448. (in Chinese)
- [38] 高越, 郭顺星, 刑晓科. 兰科植物种子共生萌发真菌多样性及共生萌发机制研究进展[J]. 菌物学报, 2019, 38(11): 1808-1825.
- GAO Y, GUO S X, XING X K. Fungal diversity and mechanisms of symbiotic germination of orchid seeds: a review[J]. Mycosystema, 2019, 38(11): 1808-1825. (in Chinese)
- [39] 徐锦堂, 牟春. 天麻原球茎生长发育与紫萁小菇及蜜环菌的关系[J]. 植物学报, 1990, 32(1): 26-31.
- XU J T, MU C. The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1990, 32(1): 26-31. (in Chinese)
- [40] SHAO S C, WANG Q X, BENG K C, ZHAO D K,

- JACQUEMYN H. Fungi isolated from host protocorms accelerate symbiotic seed germination in an endangered orchid species (*Dendrobium chrysotoxum*) from southern China[J]. *Mycorrhiza*, 2020, 30(4): 529-539.
- [41] 杨文科. 促进白旗兜兰种子共生萌发有效真菌的分离与应用[D]. 昆明: 云南大学, 2021.
- YANG W K. Isolating effective fungi to facilitate seed germination of *Paphiopedilum spicerianum* and application in conservation practice[D]. Kunming: Yunnan University, 2021. (in Chinese)
- [42] RAFTER M, YOKOYA K, SCHOFIELD E J, ZETTLER L W, SARASAN V. Non-specific symbiotic germination of *Cynorkis purpurea* (Thouars) Kraezl., a habitat-specific terrestrial orchid from the Central Highlands of Madagascar[J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26(6): 541-552.
- [43] WANG H, FANG H Y, WANG Y Q, DUAN L S, GUO S X. *In situ* seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: the endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae)[J]. *World Journal of Microbiol & Biotechnol*, 2011, 27(9): 2051-2059.
- [44] RASMUSSEN H N. Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination *in vitro*[J]. *New Phytologist*, 1990, 116(1): 137-147.
- [45] 金辉, 许忠祥, 陈金花, 韩素芬, 葛颂, 罗毅波. 铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养过程中的相互作用[J]. *植物生态学报*, 2009, 33(3): 433-441.
- JIN H, XU Z X, CHEN J H, HAN S F, GE S, LUO Y B. Interaction between tissue-cultured seedlings of *Dendrobium officinale* and mycorrhizal fungus (*Epulorhiza* sp.)[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2009, 33(3): 433-441. (in Chinese)