

胶膜菌属真菌 S7 糖类成分对铁皮石斛种子萌发的影响

陈彤垚, 陈晓梅, 杨建文, 李媛媛, 邱先丹, 王爱荣, 曾旭*, 郭顺星* (中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 教育部中草药物质基础与资源利用重点实验室, 北京 100193)

摘要:目的 研究胶膜菌属真菌 S7 (*Tulasnella* sp.) 糖类成分对铁皮石斛种子萌发的影响。方法 通过水提醇沉法制备 S7 菌丝多糖和发酵液多糖。三氟乙酸水解制备菌丝多糖和发酵液多糖的水解物。利用柱前衍生高效液相色谱法 (PMP-HPLC) 测定多糖的单糖组成。在水琼脂和 1/2 MS 培养基中分别添加菌丝多糖及其水解物, 发酵液多糖及其水解物, 以及菌丝多糖特有单糖组分和混合单糖组分, 研究 S7 糖类成分对铁皮石斛种子萌发的影响。结果 水琼脂培养基对照组 (WACK1) 萌发率 (88.65 ± 4.71)%, 种子能萌发至 3 级 (原球茎)。与 WACK1 相比, 添加菌丝多糖及其水解物对萌发率没有显著影响 ($P > 0.05$), 但种子能萌发至 4 级 (1 片叶); 添加发酵液多糖水解物能显著降低萌发率 ($P < 0.05$)。菌丝多糖由葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸、木糖、甘露糖、岩藻糖、核糖和阿拉伯糖组成, 摩尔比为 15.05:1.00:0.70:0.35:0.30:0.29:0.13:0.13。发酵液多糖由阿拉伯糖、半乳糖、木糖和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比为 1.22:1.00:0.71:0.47。岩藻糖是菌丝多糖特有的单糖组分。1/2 MS 培养基对照组 (MSCK) 萌发率和 5 级萌发率 (2 片叶) 分别为 (98.10 ± 0.46)% 和 (50.97 ± 4.33)%。与 MSCK 相比, 添加 0.20 ~ 20 mg · L⁻¹ 岩藻糖对萌发率没有显著影响 ($P > 0.05$), 但 5 级萌发率有显著提高 ($P < 0.05$), 是 MSCK 的 1.36 ~ 1.47 倍。结论 S7 菌丝体多糖及其水解物具有促进铁皮石斛原球茎发育的作用, 岩藻糖是 S7 菌丝多糖水解物中促进种子萌发后进一步分化发育的活性成分。

关键词: 铁皮石斛; 胶膜菌属; 菌丝多糖; 岩藻糖; 种子萌发

doi: 10.11669/cpj.2024.07.003 中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)07-0579-10

Effects of Carbohydrate Components of Fungus S7 on Seed Germination of *Dendrobium officinale*

CHEN Tongyao, CHEN Xiaomei, YANG Jianwen, LI Yuanyuan, QIU Xiandan, WANG Airong, ZENG Xu*, GUO Shunxing* (Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College Chinese Academy of Medical Sciences, Key Laboratory of Bioactive Substances and Resource Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of carbohydrate components of fungus S7 (*Tulasnella* sp.) on seed germination of *Dendrobium officinale*. **METHODS** The polysaccharides of S7 mycelia (MP) and of S7 fermentation broth (FP) were prepared by water extraction and alcohol precipitation. MP and FP were hydrolyzed by trifluoroacetic acid to obtain hydrolysates, MPH and FPH. The monosaccharide composition of MP and FP were determined by PMP-HPLC. MP, FP, MPH, FPH, and the unique and mixed monosaccharide of MP were added to water agar (WA) and 1/2 MS media respectively to study the effects of carbohydrate on the seed germination of *Dendrobium officinale*. **RESULTS** The germination rate of WA medium group (WACK1) was (88.65 ± 4.71)%, and seeds germinated to stage 3 (protocorm). Compared with WACK1, adding MP and MPH had no significant effect on germination rate ($P > 0.05$), and seeds could germinate to stage 4 (having one leaf), while adding FPH could significantly reduce germination rate ($P < 0.05$). MP was composed of glucose, galactose, glucuronic acid, xylose, mannose, fucose, ribose and arabinose in a molar ratio of 15.05:1.00:0.70:0.35:0.30:0.29:0.13:0.13. FP was composed of arabinose, galactose, xylose and glucuronic acid in a molar ratio of 1.22:1.00:0.71:0.47. Fucose was the unique monosaccharide component of MP. The germination rate and stage 5 (having two leaves) germination rate of 1/2 MS medium group (MSCK) was (98.10 ± 0.46)% and (50.97 ± 4.33)%, respectively. Compared with MSCK, adding 0.20 ~ 20 mg · L⁻¹ fucose had no significant effect on germination rate ($P > 0.05$), while significantly increased stage 5 germination rate ($P < 0.05$), which was 1.36 ~ 1.47 times that of MSCK. **CONCLUSION** MP and MPH promote the development of protocorm of *D. officinale*. Fucose is an active component in MPH that could promote the further differentiation and development of seeds after germination.

KEY WORDS: *Dendrobium officinale*; *Tulasnella* sp.; mycelia polysaccharide; fucose; seed germination

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助 (2021-I2M-1-031); 国家自然科学基金项目资助 (81573526)

作者简介: 陈彤垚, 女, 博士研究生 研究方向: 药用植物菌根生物学; 陈晓梅, 女, 博士, 研究员 研究方向: 药用植物菌根生物学。陈彤垚与陈晓梅为共同第一作者 * 通讯作者: 曾旭, 男, 博士, 副研究员 研究方向: 药用植物菌根生物学 Tel: (010)57833259; 郭顺星, 男, 博士, 研究员, 博士生导师 研究方向: 菌根生物学 Tel: (010)57833231

兰科植物的种子在自然条件下是以“共生萌发”的方式萌发的,即种子先与特定的真菌建立共生关系,由真菌为种子萌发提供营养物质,这期间植物是完全异养的^[1-2]。能够与兰科植物种子共生的真菌被称为“萌发菌”。胶膜菌属(*Tulasnella*)是兰科植物主要的萌发菌类群之一^[3-4]。已有研究报道,胶膜菌属萌发菌能通过产生植物激素促进兰科植物种子萌发和幼苗生长^[5-6];体外实验中,香草酸等胶膜菌属真菌 S7 (*Tulasnella* sp.) 的菌丝体代谢产物能促进铁皮石斛种子萌发和原球茎发育^[7]。

微生物多糖影响植物种子萌发的报道较多。成团泛菌脂多糖促进紫花苜蓿种子萌发、幼苗生长及结瘤^[8]。乳酸菌胞外多糖显著提高逆境胁迫下水稻种子的发芽势、发芽率等指标,促进幼苗根系生长^[9]。香菇多糖和内生真菌(*Bionectria pityrodes*)多糖均能显著提高药用植物苦荞种子的出苗率,并促进幼苗生长^[10-11]。近年出现了一些低分子糖类成分影响植物种子萌发的报道:果糖、葡萄糖等浸种能有效缓解盐胁迫对玉米种子萌发的抑制作用^[12];海藻糖浸种能缓解盐胁迫对甜瓜种子的伤害,显著提高萌发率并促进幼苗生长^[13];蔗糖浸种能明显改善蚬壳花椒种子萌发早期的生理状态,显著提高萌发率^[14];壳寡糖浸种能显著提高低温下花生种子的萌发能力^[15];有关萌发菌糖类代谢产物对兰科植物种子萌发作用的研究尚未见报道。

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)是中药铁皮石斛的唯一基原植物^[16]。课题组前期报道了真菌 S7 及其代谢产物有促进铁皮石斛种子萌发及原球茎发育的作用^[7,17]。在此基础上,本实验进一步研究了 S7 菌丝体和发酵液多糖对铁皮石斛种子萌发的作用,以期发现 S7 促萌发作用的活性物质。

1 材料和方法

1.1 生物材料

铁皮石斛蒴果购自浙江金华市。蒴果表面消毒后收集无菌种子,4℃保存。菌株 S7 分离自金钗石斛(*Dendrobium nobile*)^[18],由中国医学科学院药用植物研究所生物技术中心保藏。

1.2 单糖对照品

11 个单糖对照品均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,分别是:D-核糖(Rib,98%),D-甘露糖(Man,99%),D-半乳糖(Gal,99%),D-半乳糖醛酸一水合物(GalA,97%),D-葡萄糖(Glc,98%),D-葡萄糖醛酸(GlcA,98%),D-木糖(Xyl,98%),D-阿

拉伯糖(Ara,98%),D-氨基葡萄糖盐酸盐(GlcN,99%),L-鼠李糖一水合物(Rha,99%),L-岩藻糖(Fuc,98%)。

1.3 多糖的制备

菌株 S7 的保藏菌种,经 PDA 平板活化,转接至麦麸液体培养基,24~26℃振荡暗培养 21 d。培养结束后,用 80~100 目尼龙网过滤,分离菌丝体和发酵液。菌丝体经蒸馏水冲洗,冷冻干燥。每升培养基大约可获得 8.0 g 干燥菌丝体和 0.9 L 发酵液^[17]。

菌丝体先以 20 倍甲醇提取 3 次,残渣再以 20 倍去离子水提取 3 次;合并水提取液,减压浓缩至无醇味,加入无水乙醇至醇浓度 80%,4℃放置过夜;醇沉物用水溶解,Sevage 法脱蛋白,水溶液减压浓缩后冷冻干燥,制得菌丝多糖(MP)^[19]。发酵液减压浓缩至无醇味,按前述方法醇沉、脱蛋白、冷冻干燥,制得发酵液多糖(FP)。以干燥菌丝体和发酵液体积计算,MP 和 FP 得率分别为 6.2% 和 0.45%。按制备 FP 的方法制备麦麸液体培养基多糖(WP)。以培养基体积计,WP 得率 0.14%。

1.4 多糖含量测定

分别称取 MP、FP 和 WP 适量,加水溶解,配置成 20 mg·mL⁻¹ 的样品溶液,平行备样 3 份。取 1.0 mL 多糖溶液,加 4.0 mL 无水乙醇混匀,4℃静置 4 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min;弃去上清液,沉淀加水溶解定容至 25 mL,为样品溶液。以 D-葡萄糖为对照品,苯酚-硫酸法测定 MP、FP 和 WP 的多糖含量^[20]。

1.5 多糖的单糖组成分析

分别称取 MP、FP 和 WP 适量,加水溶解,配置成 20 mg·mL⁻¹ 的样品溶液,平行备样 3 份,MP 和 WP 分别稀释 10 倍和 4 倍进行葡萄糖含量测定。取 1.0 mL 多糖溶液,加 4.0 mL 无水乙醇混匀,4℃静置 4 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min;弃去上清液,沉淀加水溶解定容至 25 mL,为样品溶液。以 D-葡萄糖为对照品,苯酚-硫酸法测定 MP、FP 和 WP 的多糖含量^[20]。

1.5.1 单一对照品和混合对照品溶液的制备 分别称取 Man、GlcN、Rib、Rha、GlcA、GalA、Glc、Gal、Xyl、Ara 和 Fuc 对照品 200 mg,精密称定,加水溶解,定容至 10 mL,制成 11 个单一对照品母液。用 11 个单一对照品母液配制 5 个系列浓度的混合对照品溶液,溶液中各对照品终浓度依次为 0.10、0.50、1.00、1.50 和 1.82 mg·mL⁻¹,用于线性关系、

精密度和稳定性考察。用 Man、Rib、GlcA、Glc、Gal、Xyl、Ara 和 Fuc 的单一对照品母液配制各对照品终浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,用于加样回收试验考察准确性。

1.5.2 多糖水解 分别称取 MP、FP 和 WP 适量,加水溶解配置成 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液,平行备样 5 份。再加入等体积 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氟乙酸(TFA)溶液,充氮气(N_2)封管, $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 水解 4 h;水解液加适量甲醇蒸干,除去 TFA,制得 3 种多糖水解物:MPH、FPH 和 WPH^[20]。

1.5.3 单糖的衍生化 柱前衍生高效液相色谱法(PMP-HPLC)分析多糖的单糖组成,并测定各单糖组分的含量^[21-22]。衍生化试剂:1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(1-phenyl-3-menthyl-5-pyrazolone, PMP)。

11 个单一对照品母液和系列浓度的混合对照品溶液各取 $50 \text{ } \mu\text{L}$,加 $50 \text{ } \mu\text{L}$ $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液和 $100 \text{ } \mu\text{L}$ $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMP 甲醇溶液,涡旋混匀, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应 80 min。反应液冷却后加 $100 \text{ } \mu\text{L}$ $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液中和,再加水至 2.0 mL ,以等体积氯仿萃取 3 次,合并水相,定容至 2 mL ,为对照品测定溶液。取 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 水按前述方法制备空白溶液。多糖水解物 MPH、FPH 和 WPH,按前述方法依次进行衍生化、中和、萃取和定容,为样品测定溶液。对照品和样品测定溶液及空白溶液,经 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜过滤,用于 HPLC 分析。

1.5.4 色谱仪及色谱条件 高效液相色谱仪: Waters 2996 photodiode Array Detector, Waters 2707 Autosampler, Waters 600 Controller。色谱柱: Luna $\text{C}_{18}(2)$ ($100 \text{ } \text{Å}$, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$, Phenomenex)。流动相:A 相为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 6.7); B 相为乙腈。流动相洗脱梯度见表 1。柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。检测波长 260 nm 。

表 1 单糖组成测定的流动相梯度洗脱条件

Tab.1 Mobile phase and gradient elution for monosaccharide composition analysis

t_{R}/min	Mobile phase A/%	Mobile phase B/%
0.00	83.0	17.0
30.00	84.0	16.0
30.01	87.0	13.0
38.00	87.0	13.0
40.00	84.0	16.0
85.00	84.0	16.0
85.01	83.0	17.0
90.00	83.0	17.0

1.5.5 方法学考察 不同浓度的混合对照品测定溶液分别进样,制备标准曲线。单糖浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品测定溶液,连续测定 6 次,根据对照品峰面积计算相对标准偏差(RSD),考察仪器的精密度。单糖浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,按对照品测定溶液的制备方法平行制备 6 份混合对照品测定溶液进行测定,根据对照品峰面积计算 RSD,考察方法的精密度。单糖浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品测定溶液,室温放置,分别于 0、4、8、16、24、48 h 进样,根据对照品峰面积计算 RSD,考察样品的稳定性。

按样品测定溶液的制备方法平行制备 5 份 MP 测定溶液,测定各对照品在样品中的峰面积,考察样品的重复性。MP 有 8 个单糖组分。向 $50 \text{ } \mu\text{L}$ MP 水溶液中加入 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 含 8 个单糖对照品的混合对照品溶液,按样品测定溶液的制备方法,平行制备 5 份样品测定溶液,测定各对照品的含量,计算加样回收率(%)和 RSD,考察样品的准确性。

1.6 添加多糖、多糖水解物、混合单糖及岩藻糖的培养基制备

多糖 MP、FP 和 WP 分别加水溶解, $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌后加入水琼脂(WA)培养基,根据前期筛选结果,3 种多糖的最适添加浓度分别为: $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。多糖水解物 MPH、FPH 和 WPH 按上述方法处理,加入 WA 培养基。培养基中多糖水解物浓度与相应多糖一致。对照组为 WACK1。

根据 MP 单糖组成分析结果,配制混合单糖(Mix)和岩藻糖(Fuc)溶液, $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 过滤除菌后分别加入 WA 培养基和 1/2 MS 培养基。添加了 Mix 和 Fuc 的培养基均有 3 个浓度,分别相当于培养基中 MP 终浓度为 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (LMix 和 LFuc)、 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (MMix 和 MFuc) 和 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (HMix 和 HFuc)。添加组分及浓度见表 2。对照组为 MSCK 和 WACK2。

1.7 种子萌发实验

萌发实验在直径 9 cm 的培养皿上进行。用无菌水分散种子,快速吸取种子混悬液铺洒在培养基平板上,播种量每皿 $100 \sim 150$ 粒,重复 6 皿。培养条件:光照周期 12 h/12 h(光/暗),光照强度 $1500 \sim 2000 \text{ lx}$,培养温度 $24 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$ 。观察周期 90 d。从第 10 天开始,每 10 d 观察 1 次,记录各萌发级别的种子数量,计算萌发率。

种子萌发级别及分级标准^[17,23]:0级,未见种胚膨大,种子未萌发;1级,种胚吸水膨大,未突破种皮;2级,种胚突破种皮;3级,出现具有顶端分生组织的原球茎;4级,出现第一片叶;5级,出现第二片叶。

萌发率计算方法见公式1~2

总萌发率(%) = 2级及2级以上萌发的种子数量/播种量 × 100% 公式(1)

3级萌发率(%) = 3级萌发的种子数量/播种量 × 100% 公式(2)

4级和5级萌发率计算方法同3级萌发率。

表2 培养基中的单糖组分的添加浓度

Tab. 2 Monosaccharide composition and concentrations in *D. officinale* seed germination medium

Monosaccharide composition	$\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$					
	LMix	LFuc	MMix	MFuc	HMix	HFuc
Mannose (Man)	0.23	0	2.3	0	23	0
Ribose (Rib)	0.08	0	0.8	0	8	0
Glucuronic acid (GlcA)	0.57	0	5.7	0	57	0
Glucose (Glu)	11.41	0	114.1	0	1141	0
Galactose (Gal)	0.76	0	7.6	0	76	0
Xylose (Xyl)	0.22	0	2.2	0	22	0
Arabinose (Ara)	0.08	0	0.8	0	8	0
Fucose (Fuc)	0.20	0.20	2.0	2.0	20	20

1.8 统计方法

用SPSS 19.0软件对数据进行分析。两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为存在显著性差异。实验结果以“均值 ± 标准差”的形式表示。

2 结果

2.1 多糖及多糖水解物对种子萌发过程的影响

WACK1组种子70 d出现3级萌发,形成原球茎,90 d时萌发率和3级萌发率分别是(88.65 ± 4.71)%和(0.24 ± 0.41)%。原球茎能继续分化发育是种子萌发形成幼苗的前提。观察期内WACK1组没有出现4级萌发的种子,即原球茎尚未发育至形成叶片。

3个多糖组的种子均能正常萌发,90 d时萌发率与对照组相比均无显著差异($P > 0.05$)。MP组种子萌发后的发育速度比对照组快,50 d出现3级萌发,比对照组提前了20 d;80 d出现4级萌发;90 d时3级和4级萌发率分别是(5.99 ± 4.65)%和(7.26 ± 4.68)%,与对照组相比有显著差异($P < 0.05$)。FP和WP组种子均在60 d出现3级

萌发,90 d时3级萌发率分别是(0.52 ± 0.45)%和(2.56 ± 1.52)%;观察期内两组均没有出现4级萌发的种子。

3个多糖水解物组中只有MPH组种子能正常萌发,90 d时萌发率(88.08 ± 0.25)%,与对照组相比无显著差异($P > 0.05$)。该组种子萌发后的发育速度也比对照组快,分别在40 d和80 d时出现3级和4级萌发,90 d时3级和4级萌发率分别是(5.94 ± 2.29)%和(5.10 ± 0.73)%。FPH和WPH组种子萌发率始终显著低于对照组($P < 0.05$),90 d时萌发率分别为(2.73 ± 3.10)%和(5.29 ± 1.66)%;观察期内两组均没有出现3级萌发的种子。

由此可见,MP和MPH促进了萌发后种子的分化发育,原球茎可发育至4级;FPH和WPH抑制种子萌发。

2.2 PMP-HPLC单糖分析的方法学考察

空白对照(1A),混合对照品溶液的单糖分离良好,出峰顺序与参考文献一致(图1B)^[21]。以峰面积为纵坐标,对照品溶液浓度为横坐标,计算线性回归方程和线性范围,回归方程的相关系数(r^2)均在0.999以上(表3),线性关系良好。

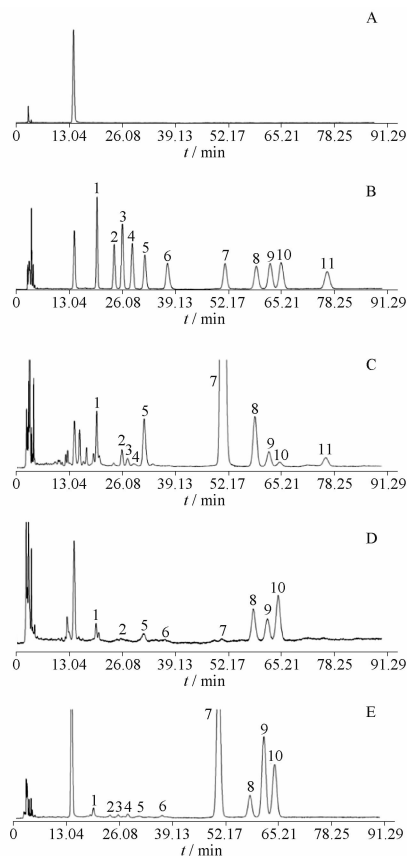
表3 菌丝体及发酵液多糖中单糖对照品的标准曲线、相关系数和线性范围

Tab. 3 Calibration data of 11 monosaccharides of the S7 mycelia and fermentation broth polysaccharides

Monosaccharide	Regression equation	Linear range / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	r^2
Mannose	$Y = 1458.2X - 23647$	100.30 - 1823.64	0.9992
Glucosamine	$Y = 1001.1X - 7391.3$	100.45 - 1826.36	0.9996
Ribose	$Y = 1543.6X$	100.25 - 1822.73	0.9991
Rhamnose	$Y = 1206.8X - 32101$	99.50 - 1809.09	0.9991
Glucuronic acid	$Y = 1114.6X - 86524$	99.70 - 1812.73	0.9999
Galacturonic acid	$Y = 1009.7X - 34383$	99.65 - 1811.82	0.9995
Glucose	$Y = 1207.6X - 98685$	100.55 - 1828.18	0.9999
Galactose	$Y = 1219.8X - 84753$	100.25 - 1822.73	0.9996
Xylose	$Y = 1377.3X - 76913$	100.35 - 1824.55	0.9999
Arabinose	$Y = 1457.2X - 67095$	99.45 - 1808.18	0.9999
Fucose	$Y = 1130.5X - 76290$	100.00 - 1818.18	0.9992

仪器精密度试验中对照品色谱峰面积的RSD为0.13%~0.87%;方法精密度试验中对照品色谱峰面积的RSD为0.41%~0.97%;稳定性试验中对照品色谱峰面积的RSD为0.11%~0.97%。

重复性试验中Man、Rib、GlcA、Glc、Gal、Xyl、Ara和Fuc等8个对照品色谱峰面积的RSD为



A - 空白对照; B - 混合对照品; C - 菌丝多糖水解物; D - 发酵液多糖水解物; E - 麦麸培养基多糖水解物; 峰 1 - 甘露糖; 峰 2 - 氨基葡萄糖; 峰 3 - 核糖; 峰 4 - 鼠李糖; 峰 5 - 葡萄糖醛酸; 峰 6 - 半乳糖醛酸; 峰 7 - 葡萄糖; 峰 8 - 半乳糖; 峰 9 - 木糖; 峰 10 - 阿拉伯糖; 峰 11 - 岩藻糖。

A - blank solution; B - standards; C - MPH; D - FPH; E - WPH; Peak 1 - mannose; Peak 2 - glucosamine; Peak 3 - ribose; Peak 4 - rhamnose; Peak 5 - glucuronic acid; Peak 6 - galacturonic acid; Peak 7 - glucose; Peak 8 - galactose; Peak 9 - xylose; Peak 10 - arabinose; Peak 11 - fucose.

图 1 对照品和多糖水解产物衍生化的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the derivatives of the standards and the hydrolysis product of polysaccharides

表 4 菌丝体及发酵液中多糖的单糖组成分析. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 4 Monosaccharide composition analysis of S7 mycelia and fermentation broth the polysaccharides. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Monosaccharide composition	Polysaccharides					
	S7 Mycelia		S7 fermentation broth		Wheat Bran Agar	
	Content/%	Molar ratio	Content/%	Molar ratio	Content/%	Molar ratio
Mannose	0.72 ± 0.01	0.30	0	0	0	0
Ribose	0.26 ± 0.00	0.13	0	0	0	0
Glucuronic acid	1.78 ± 0.06	0.70	1.13 ± 0.03	0.47	0	0
Glucose	35.66 ± 1.22	15.05	0	0	5.30 ± 0.05	5.38
Galactose	2.37 ± 0.03	1.00	2.21 ± 0.06	1.00	0.98 ± 0.08	1.00
Xylose	0.69 ± 0.02	0.35	1.32 ± 0.04	0.71	3.21 ± 0.25	3.92
Arabinose	0.26 ± 0.01	0.13	2.26 ± 0.08	1.22	2.17 ± 0.08	2.64
Fucose	0.62 ± 0.02	0.29	0	0	0	0

2.4.1 WA 培养基 WACK2 组种子 70 d 出现 3 级萌发, 90 d 时出现 4 级萌发, 此时的萌发率、3 级和 4

1.07%~4.50%; 准确度试验中对照品的加样回收率 90.88%~109.08%, 各对照品的 RSD 为 0.79%~2.73%。以上结果表明, 本研究建立的 PMP-HPLC 检测单糖对照品的方法准确可靠。

2.3 多糖含量测定及多糖的单糖组成分析

MP、FP 和 WP 的多糖含量分别为 $(52.74 \pm 1.04)\%$ 、 $(25.60 \pm 0.49)\%$ 和 $(14.92 \pm 0.09)\%$ 。MP 由 Glc、Gal、GlcA、Xyl、Man、Fuc、Rib 和 Ara 组成 (图 1C), 其中 Glc 是含量最丰富的组分, 含量 $(35.66 \pm 1.22)\%$ 。FP 由 Ara、Gal、Xyl 和 GlcA 组成 (图 1D), 其中 Ara 和 Gal 含量最高, 分别为 $(2.26 \pm 0.08)\%$ 和 $(2.21 \pm 0.06)\%$ 。WP 由 Glc、Xyl、Ara 和 Gal 组成 (图 1E), 其中 Glc 含量最高, 为 $(5.30 \pm 0.05)\%$ 。HPLC 法测定结果见表 4。单糖组成分析结果表明, Fuc 是 MP 特有的单糖组分。

根据表 4 的结果计算, MP、FP 和 WP 的各单糖组分总含量分别为 42.36%、6.92% 和 11.66%。据此推测 3 个多糖含有较多非碳水化合物类物质或难溶于水的杂质。比较两种测定方法的结果, MP 和 WP 的 HPLC 法结果分别是苯酚-硫酸法结果的 80% 和 78%, 结果之间的差距较小, 而 FP 两种方法的测定结果差距大, 说明 FP 所含杂质对测定结果有较大影响。

2.4 混合单糖及岩藻糖对种子萌发过程的影响

为了验证 MPH 促进萌发后的种子分化发育的作用和探讨 MP 特有组分 Fuc 对种子萌发过程的影响, 本实验根据 MP 单糖组分配比配制了含 Glc、Gal、GlcA、Xyl、Man、Fuc、Rib 和 Ara 的混合单糖溶液以及 Fuc 溶液, 分别加入 WA 培养基和 1/2 MS 培养基, 进行种子萌发实验。

级萌发率分别是 $(92.41 \pm 0.95)\%$ 、 $(2.65 \pm 1.38)\%$ 和 $(0.72 \pm 1.26)\%$, 观察期内未出现 5 级萌发的种子

(表5、图2A)。

WALMix 组种子 20 d 萌发率是对照组的 1.57 倍 ($P < 0.05$), 50 d 出现 3 级萌发, 比对照组提前了 20 d, 出现 4 级萌发的时间与对照组一致; 90 d 萌发率与对照组相比没有显著差异 ($P > 0.05$), 3 级萌发率是对照组的 2.12 倍 ($P < 0.05$), 4 级萌发率与对照组没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 2B)。WAMMix 组种子 90 d 萌发率、3 级和 4 级萌发率与对照组相比均没有显著差异 (图 2C)。WAHMix 组种子 90 d 萌发率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 没有出现 4 级萌发 (图 2D)。由此可见, WA 培养基含相当于 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MP 的混合单糖能促进萌发种子的分化发育, 显著提高萌发种子中原球茎

的比例; 相当于 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MP 的混合单糖能抑制种子萌发, 抑制原球茎发育。

90 d 时 3 个岩藻糖组种子萌发率均与对照组没有显著差异 ($P > 0.05$) (表 5)。WAHFuc 组种子分别在 60 d 和 80 d 出现 3 级和 4 级萌发, 均比对照组提前了 10 d; 90 d 时 3 级萌发率是对照组的 2.46 倍 ($P < 0.05$), 4 级萌发率与对照组没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 2, 图 3 中 A4 和 B4)。WALFuc 和 WAMFuc 组种子 90 d 时 3 级和 4 级萌发率均与对照组没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 3 中 A2、B2、A3 和 B3)。由此可见, WA 培养基含 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 岩藻糖能促进萌发种子的分化发育, 显著提高萌发种子中原球茎的比例; 岩藻糖降低浓度后失去上述作用。

表 5 种子在含有混合单糖和岩藻糖的水琼脂(WA)培养基上的萌发率. % , $n = 6, \bar{x} \pm s$

Tab. 5 Germination rates of seeds cultured on WA medium containing mixed monosaccharides and fucose. % , $n = 6, \bar{x} \pm s$

t/d	WACK2	WALMix	WAMMix	WAHMix	WALFuc	WAMFuc	WAHFuc
10	1.58 ± 1.56	3.30 ± 0.98	8.22 ± 5.06	2.59 ± 0.57	3.84 ± 0.45	2.13 ± 0.93	2.44 ± 0.98
20	25.68 ± 1.81	40.28 ± 1.10 ¹⁾	35.34 ± 4.08 ¹⁾	22.22 ± 2.27	38.81 ± 4.56 ¹⁾	41.01 ± 0.99 ¹⁾	27.54 ± 0.58
30	83.07 ± 5.84	91.60 ± 4.87	88.37 ± 5.53	72.12 ± 6.66	87.38 ± 2.79	87.53 ± 1.71	86.01 ± 4.89
40	91.12 ± 0.88	92.13 ± 3.54	93.56 ± 4.33	87.00 ± 1.65	94.47 ± 1.17 ¹⁾	92.97 ± 4.95	93.5 ± 3.01
50	91.15 ± 1.96	91.11 ± 2.38	92.52 ± 2.79	87.59 ± 3.09	93.45 ± 2.99	91.76 ± 2.09	92.63 ± 4.24
60	91.73 ± 1.92	92.61 ± 1.98	94.60 ± 2.38	86.62 ± 1.09 ¹⁾	90.49 ± 3.17	92.46 ± 0.84	92.98 ± 1.99
70	91.98 ± 1.51	93.15 ± 0.49	93.64 ± 1.37	86.71 ± 2.52 ¹⁾	93.55 ± 1.72	93.23 ± 1.06	93.01 ± 1.90
80	92.41 ± 0.95	93.32 ± 2.32	94.90 ± 2.11	86.70 ± 1.20 ¹⁾	91.59 ± 4.41	92.61 ± 3.76	93.34 ± 3.99
90	92.40 ± 4.50	95.68 ± 1.37	94.94 ± 0.30	85.57 ± 1.38 ¹⁾	95.63 ± 0.12	95.18 ± 1.82	92.44 ± 0.69

注: WACK2 - 水琼脂培养基中未添加混合单糖和海藻糖; WALMix - 水琼脂培养基中混合单糖浓度 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; WALFuc - 水琼脂培养基中海藻糖浓度 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; WAMMix - 水琼脂培养基中混合单糖浓度 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; WAMFuc - 水琼脂培养基中海藻糖浓度 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; WAHMix - 水琼脂培养基中混合单糖浓度 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; WAHFuc - 水琼脂培养基中海藻糖浓度 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 与同时期的 WACK2 相比有显著差异, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

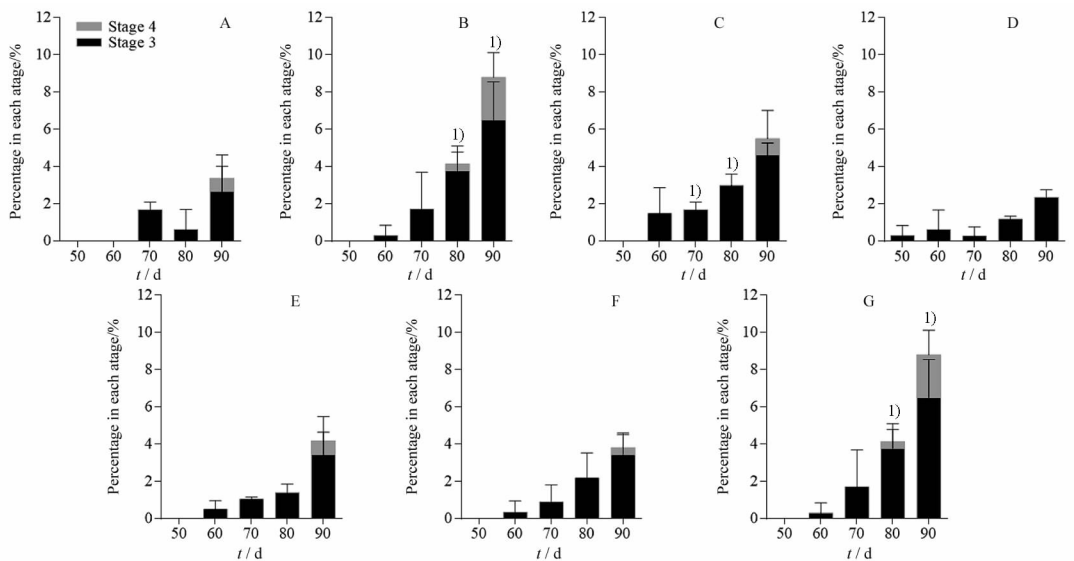
Note: WACK2 - Water agar medium (WA) without mixed monosaccharides and fucose; WALMix - WA contained $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of mixed monosaccharides; WALFuc - WA contained $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of fucose; WAMMix - WA contained $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of mixed monosaccharides; WAMFuc - WA contained $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of fucose; WAHMix - WA contained $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of mixed monosaccharides; WAHFuc - WA contained $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of fucose; ¹⁾ $P < 0.05$, significant difference compared with WACK2 during the same period.

2.4.2 1/2 MS 培养基 MSCK 组种子 20 d 出现原球茎(3 级萌发)和第一片叶(4 级萌发), 40 d 出现第二片叶(5 级萌发), 90 d 萌发率(98.10 ± 0.46)% (表 6), 5 级萌发率(50.97 ± 4.33)% (图 4A)。

MSMMix 和 MSHMix 组种子 10 d 萌发率分别是对照组的 1.29 倍和 1.19 倍 ($P < 0.05$) (表 6)。MSMMix 组出现 5 级萌发种子的时间与对照组一致, MSLMix 和 MSHMix 组的则分别比对照组晚了 10 d 和 20 d。90 d 时 3 个混合单糖组萌发率与对照组相比均没有显著差异 ($P > 0.05$), MSLMix 和 MSMMix 组 5 级萌发率分别是对照组的 1.47 倍和 1.62 倍 ($P < 0.05$), MSHMix 组 5 级萌发率与对照组相比没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 4B ~ D)。由此可见, 1/2 MS 培养基含相当于 $32 \sim 320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MP 的混合单

糖能促进原球茎发育, 显著提高 5 级萌发种子的比例; 混合单糖的浓度提高至相当于 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MP 时仍未表现出抑制种子萌发和原球茎发育的作用。与在 WA 培养基上的作用相比, 混合单糖在 1/2 MS 培养基上促进萌发后种子分化发育的作用更明显。

3 个岩藻糖组种子出现 5 级萌发的时间与对照组一致; 90 d 时种子萌发率与对照组相比均没有显著差异 ($P > 0.05$) (表 6, 图 5), 5 级萌发率均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 是对照组的 1.36 ~ 1.47 倍 (图 4E ~ G)。由此可见, 1/2 MS 培养基含 $0.20 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 岩藻糖能促进原球茎发育, 显著提高 5 级萌发种子的比例。岩藻糖在 1/2 MS 培养基上促进萌发后种子分化发育的作用更明显, 这与混合单糖的表现一致。

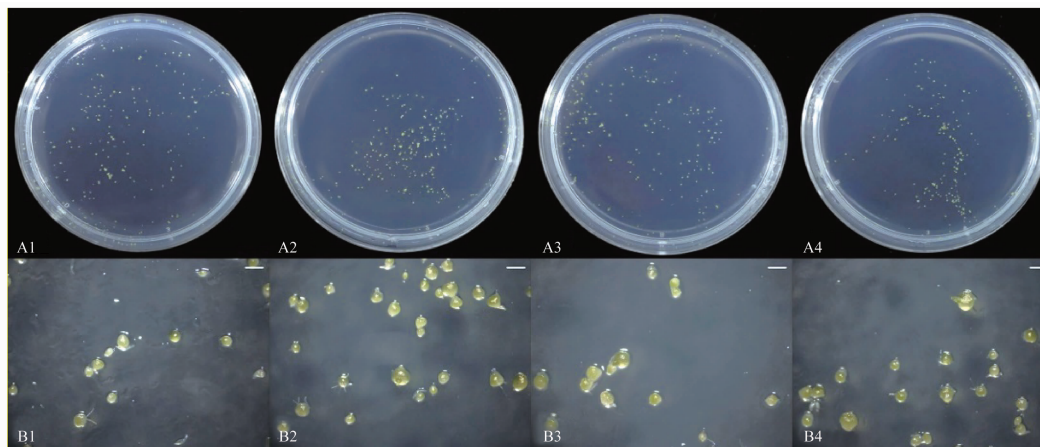


A - 水琼脂培养基中未添加混合单糖和海藻糖; B - 水琼脂培养基中混合单糖浓度 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C - 水琼脂培养基中海藻糖浓度 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; D - 水琼脂培养基中混合单糖浓度 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; E - 水琼脂培养基中海藻糖浓度 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; F - 水琼脂培养基中混合单糖浓度 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; G - 水琼脂培养基中海藻糖浓度 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 与相同时期的 WACK2 相比有显著差异, $^1)P < 0.05$ 。

A - WACK2; B - WALMix; C - WAMMix; D - WAHMix; E - WALFuc; F - WAMFuc; G - WAHFuc; $^1)P < 0.05$, significant difference compared with WACK2 during the same period.

图2 WA培养基添加混合单糖和岩藻糖对原球茎发育的影响

Fig. 2 Effects of WA medium containing mixed monosaccharides and fucose on protocorm development



A1 ~ A4 - 肉眼观察; B1 ~ B4 - 体视镜观察, 标尺 = 0.5 mm。A1 和 B1-WACK2; A2 和 B2-WALFuc; A3 和 B3-WAMFuc; A4 和 B4-WAHFuc。

A1 - A4 - under vision; B1 - B4 - under a stereoscope. Scale bar = 0.5 mm. A1 and B1-MSCK; A2 and B2-MSLFuc; A3 and B3-MSMFuc; A4 and B4-MSHFuc.

图3 种子在含岩藻糖的WA培养基上培养90 d的萌发情况

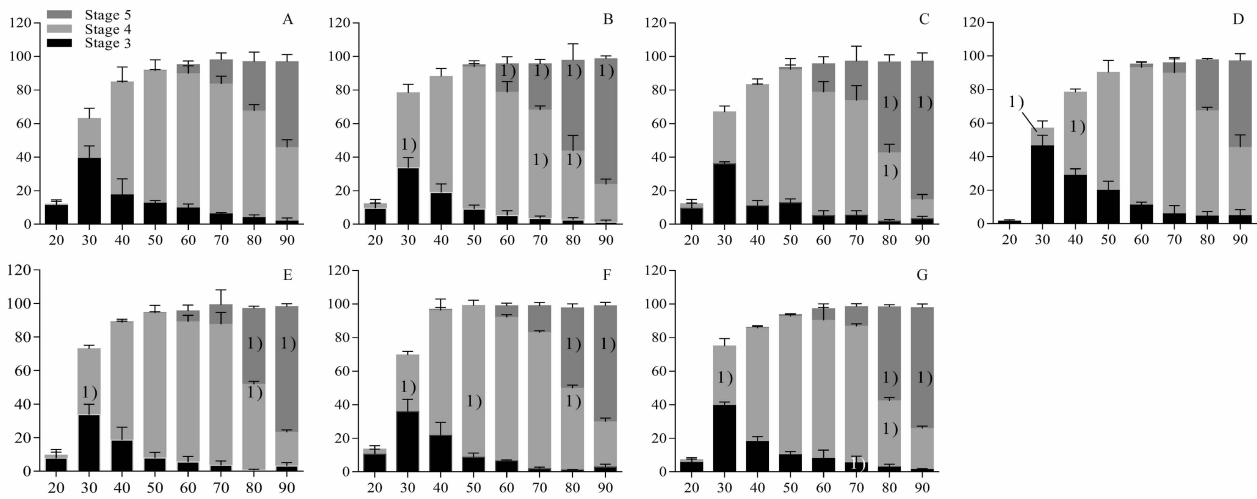
Fig. 3 Seed germination for day 90 on WA media containing mixed monosaccharides and fucose

3 讨论

单糖^[12]、双糖^[13-14]、寡糖^[15,24]和多糖等糖类成分均能影响植物种子萌发,其中多糖的来源丰富,包括昆虫多糖^[25]、藻类多糖^[26-27]、细菌细胞壁多糖和胞外多糖^[8-9,28]、真菌子实体及菌丝体多糖和发酵液多糖^[10-11,19],以及中药材多糖等^[29-30]。用于上述研究的种子都能独立萌发,主要是水稻、玉米等农作物,以及少量药用植物。鲜有多糖完全水解物影响

种子萌发的研究报道。

兰科植物的种子不能独立萌发,必须与真菌共生萌发。萌发菌从兰科植物种子的胚柄端入侵,定殖在原球茎皮层细胞中并形成菌丝圈(pelotons),这标志着共生关系的建立^[31-32]。根据 Dearnaley 等^[33]提出的兰菌根养分转运模型,在包含健康成熟菌丝圈的植物细胞中,植物通过生物膜从真菌获取氮、磷和碳营养;在包含衰老菌丝圈的植物细胞中,植物



A - 1/2MS 培养基中未添加混合单糖和海藻糖; B - 1/2MS 培养基中混合单糖浓度 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C - 1/2MS 培养基中海藻糖浓度 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; D - 1/2MS 培养基中混合单糖浓度 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; E - 1/2MS 培养基中海藻糖浓度 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; F - 1/2MS 培养基中混合单糖浓度 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; G - 1/2MS 培养基中海藻糖浓度 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 与同时期的 MSCK 相比有显著差异, $^{1)}P < 0.05$ 。

A - MSCK; B - MSLMix; C - MSMMix; D - MSHMix; E - MSLFuc; F - MSMFuc; G - MSHFuc; $^{1)}P < 0.05$, significant difference compared with MSCK during the same period.

图 4 1/2 MS 培养基添加混合单糖和岩藻糖对原球茎发育的影响

Fig. 4 Effects of mixed monosaccharides and fucose in 1/2 MS medium on development of protocorm

表 6 种子在含有混合单糖和岩藻糖的 1/2 MS 培养基上的萌发率. %, $n = 6, \bar{x} \pm s$

Tab. 6 Germination rates of seeds cultured on 1/2 MS medium containing mixed monosaccharides and fucose. %, $n = 6, \bar{x} \pm s$

t/d	MSCK	MSLMix	MSMMix	MSHMix	MSLFuc	MSMFuc	MSHFuc
10	43.86 ± 2.79	55.18 ± 7.38	56.65 ± 6.91 ¹⁾	52.07 ± 2.72 ¹⁾	49.26 ± 5.79	37.57 ± 0.99	47.68 ± 1.94
20	96.11 ± 1.51	97.09 ± 2.65	96.18 ± 2.75	89.17 ± 2.19 ¹⁾	95.83 ± 2.06	95.71 ± 0.90	95.04 ± 0.29
30	96.72 ± 1.94	97.32 ± 1.44	95.07 ± 0.76	96.89 ± 1.22	97.10 ± 0.89	97.31 ± 2.22	95.97 ± 0.87
40	96.76 ± 1.17	94.58 ± 2.77	94.74 ± 2.99	98.05 ± 0.11	96.06 ± 2.91	98.38 ± 1.48	96.29 ± 1.08
50	98.47 ± 0.98	97.43 ± 0.87	96.07 ± 4.15	98.46 ± 1.56	98.10 ± 1.32	99.08 ± 0.93	97.51 ± 1.15
60	97.85 ± 0.63	97.81 ± 0.95	98.65 ± 0.48	97.24 ± 1.07	97.93 ± 0.68	99.14 ± 0.09	98.01 ± 0.53
70	98.25 ± 0.77	97.23 ± 1.01	98.32 ± 0.11	97.50 ± 1.10	99.24 ± 0.04	99.06 ± 0.02	98.41 ± 1.19
80	96.93 ± 0.67	98.96 ± 1.12	97.91 ± 0.35	97.87 ± 2.32	97.68 ± 1.95	97.64 ± 1.12	98.57 ± 1.02
90	98.10 ± 0.46	99.16 ± 0.06	99.05 ± 0.42	98.21 ± 1.00	98.75 ± 0.58	98.93 ± 0.47	98.42 ± 1.18

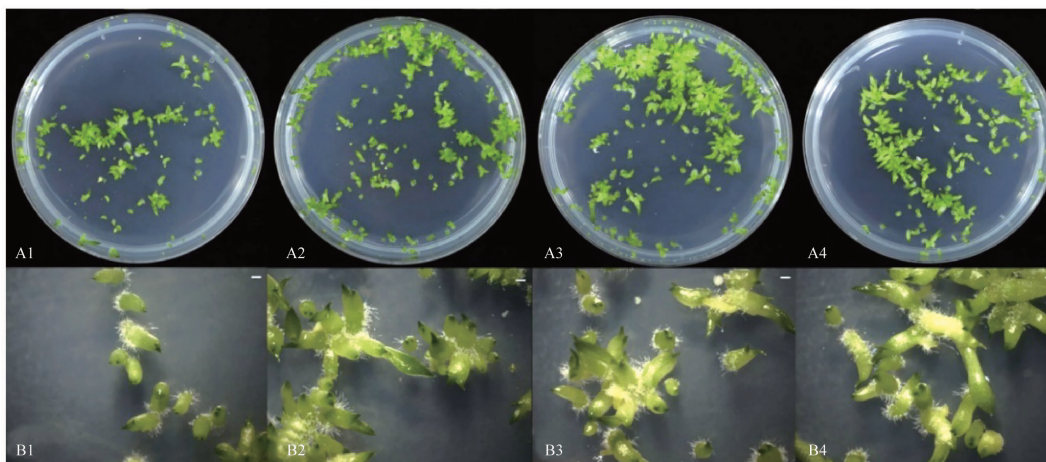
注: MSCK - 1/2MS 培养基中未添加混合单糖和海藻糖; MSLMix - 1/2MS 培养基中混合单糖浓度 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; WALFuc - 1/2MS 培养基中海藻糖浓度 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; WAMMix - 1/2MS 培养基中混合单糖浓度 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; WAMFuc - 1/2MS 培养基中海藻糖浓度 $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; WAHMix - 1/2MS 培养基中混合单糖浓度 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; WAHFuc - 1/2MS 培养基中海藻糖浓度 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 与同时期的 MSCK 相比有显著差异, $^{1)}P < 0.05$ 。

Note: MSCK - 1/2 MS medium without mixed monosaccharides and fucose; MSLMix - 1/2 MS medium contained $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of mixed monosaccharides; MSLFuc - 1/2 MS medium contained $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of fucose; MSMMix - 1/2 MS medium contained $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of mixed monosaccharides; MSMFuc - 1/2 MS medium contained $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of fucose; MSHMix - 1/2 MS medium contained $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of mixed monosaccharides; MSHFuc - 1/2 MS medium contained $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of fucose; $^{1)}P < 0.05$, significant difference compared with MSCK during the same period.

通过消化真菌菌丝吸收氮、磷和碳营养。本研究中,萌发菌 S7 的菌丝多糖 (MP) 和 MP 水解物 (MPH) 有促进铁皮石斛原球茎发育的作用,发酵液多糖 (FP) 和 FP 水解物 (FPH) 没有这一作用。结合兰菌根养分转运模型推测,铁皮石斛原球茎细胞可以消化并利用 S7 菌丝体降解产生的水溶性糖类物质。

岩藻糖是 MP 的单糖组分之一。铁皮石斛种子在含 $0.20 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 岩藻糖的 1/2MS 培养基上培养 90 d 时,种子萌发率与对照组没有差异,但 5 级萌发率比对照组提高了 36% ~ 47%。该结果提

示,岩藻糖促进原球茎发育的作用机制可能与其提高培养基营养无关。岩藻糖是一种功能性单糖,植物根系分泌的岩藻糖可参与调节根际微生物多样性^[34]。岩藻糖常见于植物或微生物多糖中^[35]。黑木耳、杏鲍菇、平菇和紫丁香蘑等真菌多糖的单糖组分中含有岩藻糖^[36-40]。Takashima 等^[41]报道,细胞壁的碳水化合物组分中是否含有岩藻糖,对锈菌纲 (Urediniomycetes) 真菌的次级分类有重要意义。据笔者了解,截至目前,尚未见兰科植物种子萌发菌多糖的单糖组分研究报道,以及岩藻糖促进兰科植物原球茎发育的研究报道。



A1 ~ A4 - 肉眼观察; B1 ~ B4 - 体视镜观察, 标尺 = 0.5 mm。A1 和 B1-MSCK; A2 和 B2-MSLFuc; A3 和 B3-MSMFuc; A4 和 B4-MSHFuc。

A1 - A4 - under vision; B1 - B4 - under a stereoscope, scale bar = 0.5 mm. A1 and B1-MSCK; A2 and B2-MSLFuc; A3 and B3-MSMFuc; A4 and B4-MSHFuc.

图5 种子在含岩藻糖的 1/2 MS 培养基上培养 90 d 的萌发情况

Fig. 5 Seed germination for day 90 on 1/2 MS media containing mixed monosaccharides and fucose

有关兰科植物萌发菌糖类成分的研究报道很少。小菇属 (*Mycena*) 真菌是腐生型兰科植物天麻的萌发菌^[42]。Zheng^[43]报道了天麻萌发菌 HL-003 的菌丝体多糖主要由半乳糖和鼠李糖组成, 半乳糖含量超过 90%; 发酵液多糖主要由半乳糖和阿拉伯糖组成, 半乳糖含量超过 80%; 菌丝体多糖体外抗氧化能力比发酵液多糖更强。该作者没有研究 HL-003 多糖对天麻种子萌发的影响。目前已发现胶膜菌属真菌是多种地生型和附生型兰科植物的萌发菌, 包括白及、杓兰、硬叶兰以及多种石斛属植物等^[6, 44-46]。课题组前期研究已发现, 萌发菌 S7 小分子代谢产物香草酸和苯甲醇等有加快铁皮石斛种子萌发和促进原球茎发育的作用^[7]。本研究发现, S7 菌丝体多糖 (MP) 的单糖组分岩藻糖是促进种子萌发后原球茎进一步分化发育的活性成分。这一结果丰富了我们对萌发菌促萌发活性物质基础的认识, 并为兰科植物萌发菌作用机制的研究提供了新的思路。根据本研究结果, MP 的主要单糖组分是葡萄糖, 其相对含量占 8 个单糖组分总含量的 80% 以上, 这与 HL-003 菌丝体多糖的完全不同, 提示出萌发菌细胞壁可溶性多糖的单糖成分可能是种子识别特殊类群萌发菌的化学标记物质。

本研究报道了岩藻糖促进原球茎发育作用的浓度范围。此范围内的 3 个处理组之间 5 级萌发率没有显著差异。由于实验设计的原因, 本研究未能发现岩藻糖作用的最低和最高浓度。后续研究中应在现有浓度范围的基础上, 进一步降低和提高浓度, 以确定岩藻糖作用的浓度范围。

REFERENCES

- [1] JACQUEMYN H, MERCKX VSFT. Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants [J]. *J Ecol*, 2019, 107 (4): 1567-1581.
- [2] WANG D, JACQUEMYN H, GOMES S I F, *et al.* Symbiont switching and trophic mode shifts in Orchidaceae [J]. *New Phytol*, 2021, 231(2): 791-800.
- [3] BRUNDRETT M C, TEDERSOO L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity [J]. *New Phytol*, 2018, 220(4): 1108-1115.
- [4] GAO Y, HANG Y, LIU J, *et al.* Advances on orchid symbiotic fungi promoting seed germination [J]. *Plant Physiol J* (植物生理学报), 2020, 56(2): 141-150.
- [5] WANG T, SONG Z, WANG X, *et al.* Functional insights into the roles of hormones in the *Dendrobium officinale*-*Tulasnella* sp. germinated seed symbiotic association [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3484.
- [6] LIU S, LV D, LU C, *et al.* *Tulasnella* can contribute to breakthrough in germination of the medicinal orchid *Bletilla striata* via producing plant hormones [J]. *Rhizosphere*, 2022, 22: 100527.
- [7] YANG J W, CHEN T Y, CHEN X M, *et al.* Promoting effects of *Tulasnella* sp. S7 metabolites on *Dendrobium officinale* seed germination [J]. *Sci Sin Vitae* (中国科学: 生命科学), 2022, 53 (6): 885-899.
- [8] HUANG R, YAO B, ZHANG Y J, *et al.* Effect of *Pantoea agglomerans* CQ10 lipopolysaccharide on seed germination and seedling growth of alfalfa [J]. *Acta Agrestia Sin* (草地学报), 2021, 29(5): 965-971.
- [9] ZHANG W P, YANG Z, WU P J, *et al.* Effect of exopolysaccharides of lactic acid bacteria on seed germination and seedling growth of rice under different stress [J]. *J Nucl Agric Sci* (核农学报), 2019, 33(1): 138-147.
- [10] ZHANG C Q, ZHAO J L, ZHAO G, *et al.* Effects of lentinan on germination and flavonoid biosynthesis in *Fagopyrum tataricum* sprout cultures [J]. *Food Ind* (食品工业), 2014, 35(8): 123-126.
- [11] XIANG D B, ZHAO J L, MA C R, *et al.* Effects of seed soaked by polysaccharide obtained from endophytic fungus on the sprout and seedling quality of tartary buckwheat [J]. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), 2018, 45(11): 1-6.
- [12] ZHANG C R, XU G H, SONG C Y, *et al.* Effects of sugar im-

- mersion on seed germination and seedling growth of maize under salt stress [J]. *Seed* (种子), 2021, 40(8): 51-56.
- [13] AILIJIAN M, QIN Q, JIANG Y, *et al.* Effects of seed soaking with exogenous trehalose on the germination of melon under different saline conditions [J]. *North Hort* (北方园艺), 2022, (21): 16-22.
- [14] WANG H, PENG S M, SUN J K, *et al.* Study on redox state regulated by exogenous sucrose during the early germination of *Zanthoxylum dissitum* [J]. *Plant Physiol J* (植物生理学报), 2021, 58(8): 1587-1597.
- [15] SHI X L, YANG Y Q, HAN S Y, *et al.* Effects of chitoooligosaccharide soaking on germination and physiological metabolism of peanut seeds [J]. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2022, DOI: 10.19802/j.issn.1007-9084.2021322.
- [16] *Ch. P* (2020) Vol I (中国药典 2020 年版. 一部) [S]. 2020:295-296.
- [17] YANG J W, CHEN X M, MENG Z X, *et al.* Effects of *Tulasnella* sp. S7 and its extract on *Dendrobium officinale* seed germination [J]. *Sci Sin Vitae* (中国科学: 生命科学), 2020, 50(5): 559-570.
- [18] TAN X M, WANG C L, CHEN X M, *et al.* *In vitro* seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.) [J]. *Sci Hort Amst*, 2014, 165: 62-68.
- [19] SONG Y Y, YANG Z, MA X Y, *et al.* The preliminary study on effect of polysaccharide of endophytic fungi from plant on salt resistance of corn [J]. *Liaoning Agric Sci* (辽宁农业科学), 2014, (3): 32-34.
- [20] ZHOU X, WANG X, LIU SP, *et al.* Analysis of monosaccharide composition and content of polysaccharide from *Nostoc sphaeroides* Kützing extractive [J]. *Food Mach* (食品与机械), 2018, 34(8): 65-71.
- [21] WANG X R, LIU H H, LUAN C F, *et al.* Comparison of two methods for analysis of monosaccharide composition of polysaccharides from pomegranate peel [J]. *Guangzhou Chem Ind* (广州化工), 2018, 46(15): 105-107.
- [22] ZHANG Q, YUAN Y, DENG Y L, *et al.* Monosaccharide composition analysis and antioxidant activity comparison of polysaccharide from *Tremella fuciformis* cultivated in different methods [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2019, 40(8): 54-60.
- [23] STEWART S L, ZETTLER L W, MINSO J, Brown P M (2003). Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida [J]. *Selbyana*, 2003, 24: 64-70.
- [24] MA C Y, BU N, MA L J. Effects of alginate-derived oligosaccharide on seed germination and seedling physiological characters of sorghum [J]. *J Shenyang Norm Univ Nat Sci* (沈阳师范大学学报 自然科学版), 2010, 28(1): 79-82.
- [25] BI R, CUI J, WU L, *et al.* Effect of insect polysaccharides on soybean regulation and yield [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2015, 37(4): 402-405.
- [26] GONG J, ZHANG B C, SUO F Y. Influence of exopolysaccharides from dominant cyanobacteria in microbiotic crusts on seed germination of several desert herbaceous plants [J]. *J Des Res* (中国沙漠), 2015, 35(3): 639-645.
- [27] LIU H Y, LI Y, CHEN J W. Effects of seaweed polysaccharides on seed germination and physiological and biochemical characteristics of maize seedlings [J]. *Mod Agric Sci Technol* (现代农业科技), 2019, (18): 3-5.
- [28] WEI H Y, LI Y, PENG S Y, *et al.* Promoting crop growth under stress conditions by exopolysaccharides: review and perspective [J]. *Jiangsu Agric Sci* (江苏农业学报), 2022, 38(4): 1123-1134.
- [29] YANG J, XIE X L, HU Y P, *et al.* Effects of extracts from root of *Rheum tanguticum* on seed germination and seedling growth of *Triticum aestivum* and *Elymus nutans* [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 2009, 29(3): 320-324.
- [30] GUO Z X, GU D Z, HUANG F F, *et al.* Study on extraction of polysaccharide from dregs of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bailey and of seed germination of Chinese cabbage [J]. *Seed* (种子), 32(2): 24-27.
- [31] GUO S X, XU J T. Studies on the cell ultrastructure in the course of *Gastrodia elata* digesting *Mycena osmundicola* Lange and *Armillaria mellea* Fr. [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 1990, 9(3): 218-225.
- [32] LI Y Y, CHEN X M, ZHANG Y, *et al.* Immunolocalization and changes of hydroxyproline-rich glycoproteins during symbiotic germination of *Dendrobium officinale* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 552.
- [33] DEARNALEY J D W, CAMERON D D (2017). Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis-further evidence for a mutualistic association [J]. *New Phytol*, 2017, 213(1): 10-12.
- [34] SHARMA P, KUMAR T, YADAV M, *et al.* Plant-microbe interactions for the sustainable agriculture and food security [J]. *Plant Gene*, 2021, 28(3): 100325.
- [35] MA W, ZOU X. Research progress on the production of *L*-fucose by fermentation [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2021, 47(16): 308-312.
- [36] MA L, ZHAO Y, YU J, *et al.* Characterization of Se-enriched *Pleurotus ostreatus* polysaccharides and their antioxidant effects *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111, 421-429.
- [37] SHU X, ZHANG Y, JIA J, *et al.* Extraction, purification and properties of water-soluble polysaccharides from mushroom *Lepista nuda* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 128: 858-869.
- [38] PAK S J, CHEN F, MA L, *et al.* Functional perspective of black fungi (*Auricularia auricula*): Major bioactive components, health benefits and potential mechanisms [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2021, 114: 245-261.
- [39] LI X L, YANG H B, LV Y, *et al.* Isolation, purification and structural identification of *Pleurotus eryngii* polysaccharides [J]. *J Food Saf Qual* (食品安全质量检测学报), 2022, 13(7): 2097-2104.
- [40] WANG W, TAN J, NIMA L, *et al.* Polysaccharides from fungi: A review on their extraction, purification, structural features, and biological activities [J]. *Food Chem X*, 2022, 15: 100414.
- [41] TAKASHIMA M, HAMAMOTO M, NAKASE T. Taxonomic significance of fucose in the class Urediniomycetes; Distribution of fucose in cell wall and phylogeny of urediniomycetous yeasts [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2000, 23(1): 63-70.
- [42] YANG Z P, QIN L Y, WANG Y C, *et al.* Rapid screening of the germination fungus *Mycena* sp. of *Gastrodia elata* by PCR amplification [J]. *Chin Edible Fungi* (中国食用菌), 2019, 38(1): 51-57.
- [43] ZHENG P P. Research on polysaccharides of Tianma fungus germination HL-003 [D]. Kunming: Southwest Forestry University, 2016.
- [44] SHENG C L, LEE Y I, GAO J Y. *Ex situ* symbiotic seed germination, isolation and identification of effective symbiotic fungus in *Cymbidium mannii* (Orchidaceae) [J]. *Chin J Plant Ecol* (植物生态学报), 2012, 36(8): 859-869.
- [45] KHAMCHATRA N, DIXON K, CHAYAMARIT K, *et al.* Using *in situ* seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* Rehb. f. (Orchidaceae) [J]. *Agric Nat Res*, 2016, 50(1): 8-13.
- [46] AN M Y. Composition of mycorrhizal fungi and symbiotic relationship of *Cypripedium yunnanense* [J]. *Guihaia* (广西植物), 2017, 37(6): 763-767. (收稿日期:2023-02-17)