

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

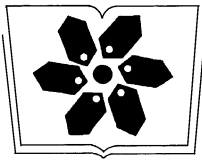
Acta Ecologica Sinica



第32卷 第8期 Vol.32 No.8 **2012**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 32 卷 第 8 期

2012 年 4 月 (半月刊)

目 次

东北地区 5 种阔叶树苗木对火烧的生理响应	王 荣, 胡海清	(2303)
梭梭木虱发生规律及其影响因素	李粉莲, 吴雪海, 王佩玲, 等	(2311)
基于遥感降尺度估算中国森林生物量的空间分布	刘双娜, 周 涛, 舒 阳, 等	(2320)
流域景观格局与河流水质的多变量相关分析	赵 鹏, 夏北成, 秦建桥, 等	(2331)
内蒙古达赉湖地区赤狐生境选择及生境景观特征分析	张洪海, 李成涛, 窦华山, 等	(2342)
雅鲁藏布江流域底栖动物多样性及生态评价	徐梦珍, 王兆印, 潘保柱, 等	(2351)
用组合模型综合比较的方法分析气候变化对朱鹮潜在生境的影响	翟天庆, 李欣海	(2361)
2010 年牧区 2 代草地螟成虫迁飞的虫源分析	张 丽, 张云慧, 曾 娟, 等	(2371)
基于细胞色素 b 基因的中国岩羊不同地理种群遗传差异分析	李楠楠, 刘振生, 王正寰, 等	(2381)
喀斯特峰丛洼地不同退耕还林还草模式的土壤微生物特性	鹿士杨, 彭晚霞, 宋同清, 等	(2390)
永定河沿河沙地杨树人工林生态系统呼吸特征	方显瑞, 张志强, 查同刚, 等	(2400)
基于湿地植物光谱的水体总氮估测	刘 克, 赵文吉, 郭逍宇, 等	(2410)
背瘤丽蚌 F 型线粒体基因组全序列分析	陈 玲, 汪桂玲, 李家乐	(2420)
流域“源-汇”景观格局变化及其对磷污染负荷的影响——以天津于桥水库流域为例	李崇巍, 胡 婕, 王 飒, 等	(2430)
线虫群落对抚顺煤矸石山周边土壤可溶性盐污染的响应	张伟东, 吕 莹, 肖 莹, 等	(2439)
地上竞争对林下红松生物量分配的影响	汪金松, 范秀华, 范 娟, 等	(2447)
湿地松和马尾松人工林土壤甲烷代谢微生物群落的结构特征	王 芸, 郑 华, 陈法霖, 等	(2458)
马尾松和杉木树干韧皮部水溶性糖 $\delta^{13}\text{C}$ 值对气象因子的响应	卢钰茜, 王振兴, 郑怀舟, 等	(2466)
沙坡头人工植被演替过程的土壤呼吸特征	高艳红, 刘立超, 贾荣亮, 等	(2474)
豫西刺槐能源林的热值动态	谭晓红, 刘诗琦, 马履一, 等	(2483)
铁皮石斛种子的室内共生萌发	吴慧凤, 宋希强, 刘红霞	(2491)
红光与远红光比值对温室切花菊形态指标、叶面积及干物质分配的影响	杨再强, 张继波, 李永秀, 等	(2498)
扑草净对远志幼苗根系活力及氧化胁迫的影响	温银元, 郭平毅, 尹美强, 等	(2506)
地表臭氧浓度增加和 UV-B 辐射增强及其复合处理对大豆光合特性的影响	郑有飞, 徐卫民, 吴荣军, 等	(2515)
AMF 对喀斯特土壤枯落物分解和对宿主植物的养分传递	何跃军, 钟章成, 董 鸣	(2525)
传统豆酱发酵过程中细菌多样性动态	葛菁萍, 柴洋洋, 陈 丽, 等	(2532)
定位施肥对紫色菜园地磷素状况的影响	孙倩倩, 王正银, 赵 欢, 等	(2539)
基于生态需水保障的农业生态补偿标准	庞爱萍, 孙 涛	(2550)
保障粮食安全造成的生态价值损失评估模型及应用	芦蔚叶, 姜志德, 张应龙, 等	(2561)
专论与综述		
疏浚泥用于滨海湿地生态工程现状及在我国应用潜力	黄华梅, 高 杨, 王银霞, 等	(2571)
问题讨论		
厌氧氨氧化菌群体感应系统研究	丁 爽, 郑 平, 张 萌, 等	(2581)
基于形态结构特征的洞庭湖湖泊健康评价	帅 红, 李景保, 夏北成, 等	(2588)
研究简报		
黄土高原不同树种枯落叶混合分解效应	刘增文, 杜良贞, 张晓曦, 等	(2596)
不同经营类型毛竹林土壤活性有机碳的差异	马少杰, 李正才, 王 斌, 等	(2603)
干旱对辣椒光合作用及相关生理特性的影响	欧立军, 陈 波, 邹学校	(2612)
硅和干旱胁迫对水稻叶片光合特性和矿质养分吸收的影响	陈 伟, 蔡昆争, 陈基宁	(2620)

期刊基本参数: CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 326 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 36 * 2012-04



封面图说: 红树林粗大的气生根——红树林是热带、亚热带海湾及河口泥滩上特有的常绿灌木或乔木群落。由于海水环境条件特殊,红树林植物具有一系列特殊的生态和生理特征。其中之一就是气根,红树从根部长出许多指状的气生根露出海滩地面,以便在退潮时甚至潮水淹没时用以通气,故称呼吸根。在中国,红树林主要分布在海南、广西、广东和福建省沿海,它一般分布于高潮线与低潮线之间的潮间带,往往潮差越大,红树的呼吸根就长得越高越粗大。

彩图提供: 陈建伟教授 北京林业大学 E-mail: cites.chenjw@163.com

DOI: 10.5846/stxb201101280147

吴慧凤, 宋希强, 刘红霞. 铁皮石斛种子的室内共生萌发. 生态学报, 2012, 32(8): 2491-2497.

Wu H F, Song X Q, Liu H X. *Ex-situ* symbiotic seed germination of *Dendrobium catenatum*. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(8): 2491-2497.

铁皮石斛种子的室内共生萌发

吴慧凤¹, 宋希强^{1,2,*}, 刘红霞³

(1. 海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海口, 570228;

2. 海南大学园艺园林学院, 海口, 570228; 3. 北京林业大学森林培育和保护国家重点实验室, 北京 100083)

摘要: 由于人为的采挖和原生境的破坏, 使得铁皮石斛野生资源已濒临灭绝。因此, 保护铁皮石斛野生资源及其生境, 加快其野生资源的繁殖显得非常重要。以铁皮石斛种子(TTC 染色显示种子生活力为 77.65%)为材料, 与分离自 2 种野生兰科植物根部的 4 株共生真菌(C20 来自铁皮石斛, L12, L24b 和 L28 来自美花石斛)在燕麦培养基上进行共生萌发。经过 18 周的共生培养, 4 株真菌均不同程度地促进了铁皮石斛种子的萌发, 其中菌株 L24b (*Epulorhiza*) 和 L28 (*Epulorhiza*) 显著提高了种子的萌发率, 分别比对照高出 26.51% 和 12.20%, 但未形成幼苗, 只是处于原生分生组织阶段(阶段 3); 菌株 C20 (*Epulorhiza*) 和 L12 (*Alternaria*) 虽没有显著提高种子的萌发率, 但对原球茎的发育和幼苗的生长有明显的促进作用; 而对照的种子仍然处于膨大转绿期, 即萌发阶段(阶段 2)。同时发现, TTC 染色显示的铁皮石斛种子生活力要高于种子共生萌发的萌发率(除了菌株 L24b)。研究结果表明: 种子生活力染色检测的活力值只代表种子所具有的潜在的萌发能力, 而不能代表实际的萌发率。在异地条件下, 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。菌株 C20 和 L12 能促进萌发后的种子进一步分化成幼苗。这两个菌株为铁皮石斛的人工优质栽培和野外种群的建立提供了可能。

关键词: 铁皮石斛; 共生萌发; 种子生活力; 菌根真菌

Ex-situ symbiotic seed germination of *Dendrobium catenatum*

WU Huifeng¹, SONG Xiqiang^{1,2,*}, LIU Hongxia³

1 Key Laboratory of Protection and Developmental Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China

2 College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou 570228, China

3 State Key Laboratory of Silviculture and Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: *Dendrobium catenatum* is a perennial, epiphytic orchid. It is not only an ornamental plant, but also an invaluable medicinal herb in China. It has the functions of benefiting the stomach and spleen, nourishing Yin and kidney, moistening the lungs, promoting the production of body fluid and improving immunity. Natural seed set is low and the wild resource of *D. catenatum* is scarce. In recent decades, *D. catenatum* had been over-collected for its high profits, which led to drastic reduction of the wild populations of *D. catenatum*. In addition, *D. catenatum*'s habitats were severely degraded. Together, these factors have driven *D. catenatum* to the verge of extinction. There is mature tissue culture technology of *D. catenatum*, but the survival rate of sterile plants in tissue culture is low, seedling growth rate is slow, and large scale production is difficult. Therefore, it's very important to protect the wild resources and habitats of *D. catenatum*. Effective ex-situ propagation of the species may help to boost the wild populations. It is well known that mycorrhizal fungi play an important role in the germination, growth and development of orchids, and understanding the relationship between orchids and mycorrhizae is important for the conservation of orchids. Our aim is to find the symbiotic fungi which can promote seed

基金项目: 国家自然科学基金(31160178); 国家科技支撑计划(2008BAC39B05); 霍英东青年教师基金(11029); 海南大学科技基金(hd09xm14)

收稿日期: 2011-01-28; **修订日期:** 2011-06-20

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: song.strong@163.com

germination and production of symbiotic seedlings, and use them in the artificial cultivation and reintroduction. We used seeds (with seed viability of 77.65% based on TTC staining) harvested from wild plants of *D. catenatum* in Hunan province, and inoculated them with four symbiotic fungi that were isolated from the roots of *D. catenatum* (C20) and *D. loddigessi* (L12, L24b and L28) respectively in petri dishes with oat meal agar. Seed germination and protocorm development were observed using Dino-Lite Digital-Microscope and Olympus Microscope once a week. After 18-weeks cultivation, all four symbiotic fungi promoted germination of *D. catenatum* seeds, but to various degrees. Specifically, seeds co-cultured with strains L24b (*Epulorhiza*) and L28 (*Epulorhiza*) had a significantly higher germination rates (88.41% and 74.10%, respectively) than that of the control (61.90%), but they were not able to form seedlings and were developed only to the stage of protomeristem (stage 3). Strains C20 (*Epulorhiza*) and L12 (*Alternaria*) did not significantly improve seed germination rate compared with control treatment. However, they promoted seeds to form symbiotic seedlings. During the same period of time, seeds in the control treatment were still in the stage of embryo enlargement with ruptured testa (= germination, stage 2). TTC staining showed that the seed viability is higher than the germination rate of symbiotic seed germination (excepted for strain L24b). Our study suggested that seed viability staining only represent the potential of germination instead of the real germination rate. The specificity between symbiotic fungi and *D. catenatum* is low *in vitro* because seeds of *D. catenatum* can form symbiosis between the fungi of *Epulorhiza* and *Alternaria*, and these two strains were from different orchids. Strains C20 and L12 may be used for high quality artificial cultivation as well as restoration of wild populations of *D. catenatum*.

Key Words: *Dendrobium catenatum*; symbiotic germination; seed viability; mycorrhizal fungi

兰科植物是一种独特的菌根植物,在其整个生活史中都与菌根真菌有着紧密的联系。自然界中,种子萌发阶段或不能进行光合自养的时期必须部分或完全依靠菌根真菌为其提供营养才能生存^[1]。虽然组培技术推动了兰科植物的繁育,但是仍有部分物种,尤其是一些稀有濒危的地生兰却难以通过组培来繁殖。而共生萌发技术的应用,成功繁育了这些稀有和濒危物种^[2-3]。随着共生萌发技术的成功应用以及其体现出来的优势,现已逐渐被应用于附生兰的研究中,如对五唇兰 (*Doritis pulcherrima*)^[4]、*Epidendrum cinnabarinum*、*Bulbophyllum vaginatum*^[5]、*Stelis* 属的三种兰花、*Pleurothallis lilijae*^[6]等附生兰的共生萌发研究,为附生兰的快速繁育和种群恢复以及其与真菌间的专一性研究提供了一个有效的方法。

兰科植物与菌根真菌之间的专一性问题,一直是争论的焦点^[7]。研究学者一度曾认为,二者间存在着高度的专一性,但此后的大量研究证明,真菌与兰花之间的专一性并不十分严格。在异地与原地条件下,兰花与真菌之间表现出不同的专一性^[8-9],这些差异导致一些学者认为兰花共生真菌的专一性普遍低^[10]。而另一些学者认为兰花与共生真菌的专一性可能体现在兰科植物的属或甚至是种一级的阶层^[11]。共生真菌的专一性是限制兰科植物种子萌发和生长过程中的瓶颈,不仅在兰花幼苗的建立中起着决定作用^[12],并且在兰花的重引上也发挥了关键作用^[13-15]。

铁皮石斛 (*Dendrobium catenatum*) 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 草本植物,是我国特有珍稀濒危植物,也是传统名贵中药之一^[16-17]。虽然铁皮石斛的组培快繁技术已十分成熟,但是在生产过程中仍然存在组培苗移栽成活率低、生长缓慢、难以养护、有效药用成分含量低等问题,其主要原因可能是缺乏与之共生的真菌^[18]。铁皮石斛的内生真菌研究主要集中在原球茎和幼苗的生长上,而对种子萌发的研究相对鲜见,目前仅见郭顺星等人^[19-20]对铁皮石斛种子拌菌播种后的萌发率进行了统计,且对接菌萌发中的种子细胞超微结构的变化进行了观察,然而关于萌发后的生长状况,以及萌发阶段的专一性研究未见相关报道。本研究利用来自铁皮石斛和美花石斛的4株共生真菌,将其与铁皮石斛种子在燕麦培养基上进行共生萌发试验,旨在筛选出促进种子萌发的有效菌株,并对铁皮石斛种子萌发阶段与真菌的专一性关系进行探讨,为繁殖优质种苗和有效促进铁皮石斛原生境重引入提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

种子:经人工授粉结实的成熟种子,采自于湖南崑山国家地质公园。

供试菌株:菌株 C20 分离自铁皮石斛根部,菌株 L12, L24b 和 L28 来自美花石斛根部。经鉴定, C20, L24b 和 L28 为瘤菌根菌属(*Epulorhiza*), L12 为链格孢属(*Alternaria*)。

1.2 培养基

菌株活化培养基:PDA 培养基, 200 g/L 土豆+20 g/L 葡萄糖+17 g/L 琼脂, pH 值自然。

共生培养基:OMA 培养基, 4 g/L 燕麦+8 g/L 琼脂, pH 值 5.8。

1.3 种子生活力的测定

TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)法,按照检测兰科植物种子生活力的方法^[21]对铁皮石斛种子进行生活力的测定。用 5% 的次氯酸钙溶液处理种子 30 min, 1% 的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑磷酸盐缓冲液在 30 ℃ 黑暗条件下染色 24 h。用移液枪吸取混匀的种子置于载玻片上,在生物显微镜(Leica DM 2500)下观察拍照,随机选择 15 个视野,进行统计。胚被染上红色的种子为有生活力的种子。种子的生活力(%)=胚被染上红色的种子/所检测的种子×100%。

1.4 室内种子共生萌发

将定性滤纸(直径 6 cm)折叠成信封状,把铁皮石斛的种子放入其中,然后用夹子夹住封口,置于 5% 的次氯酸钠中,充分摇匀,消毒 20 min, 无菌水冲洗 3—4 次,每次 5 min。将表面消毒好的种子加入少量无菌水,制成种子悬浮液,吸取 50 μL 的悬浮液均匀地涂抹在燕麦培养基上,然后挑取直径为 0.5 cm 的菌饼接种到培养基的中间,以不接菌为对照。封口膜密封后置于人工气候箱中,每天光照 10 h(10/14 h L/D),强度为 40 μmol·m⁻²·s⁻¹, (23±1) ℃, RH 70%—75% 条件下培养。每处理 5 个重复,培养 1 周后开始观察种子的萌发情况,用 0—5 个阶段对种子的萌发和幼苗的生长发育进行分级描述(表 1, 参照 Stewart & Zettler^[10]的方法,并进行修改)。

每个生长阶段的发芽率=该阶段的种子萌发数/供试的活力种子总数×100%。

1.5 数据分析

试验数据利用 SAS9.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA),多重比较采用 Duncan 检验法。

2 结果

2.1 种子生活力测定

经过 TTC 染色,胚分别被染成红色、淡红色和不染色的。凡胚被染成红色的种子活力最强,淡红的次之,未染色的为无活力或发育不良的种子(图 1)。按照公式计算,得出铁皮石斛种子的生活力为 77.65% (SE=1.14%)。

2.2.1 种子萌发动态

播种 2 周后,与 L12、L28 和 L24b 菌株共生培养的种子开始膨大、转绿;3 周后种子开始萌发。而与 C20 菌株共生培养的种子和对照在 3 周后开始膨大、转绿;培养 5 周后,种皮破裂,开始萌发。种子周围连接着一些菌丝。

在 11 周时, C20 菌株处理的部分种子开始出现原生分生组织,即达到阶段 3。但是 L12、L28、L24b 和对照的种子还是处于阶段 2,继续膨大,种皮破裂,但未出现原生分生组织。

表 1 铁皮石斛种子萌发阶段

Table 1 Germination stages of *Dendrobium catenatum*

阶段 Stage	描述 Description
0	种胚透明,种皮完好,未萌发
1	种胚膨大,转绿
2	种胚继续膨大,种皮破裂(=萌发)
3	出现原生分生组织
4	长出第一片叶
5	第 1 片叶伸长,并继续生长,长出第 2 片叶

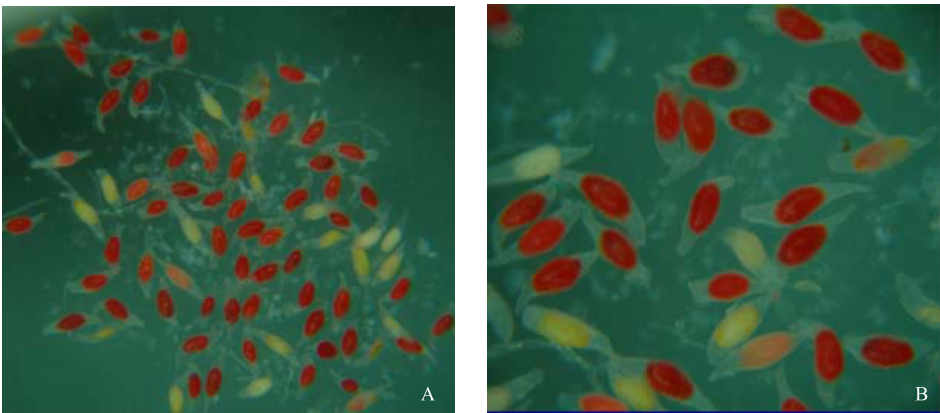


图1 铁皮石斛种子 TTC 染色图(图 A 为 4×,图 B 为 10×)

Fig. 1 TTC staining seeds in *Dendrobium catenatum* (FigA 4×,FigB 10×)

培养 14 周后,C20 菌株处理的种子,原生分生组织出现小芽,并进一步的开始长出了第 1 片叶(阶段 4,图 2A),有些原来处于阶段 2 的也长出了原生分生组织,即阶段 3。接菌 L12 的种子,开始出现原生分生组织(图 2C)。接 L28 菌株的种子开始出现叶原基(图 2E)。其他处理的种子仍继续转绿膨大,只是比在第 11 周时稍显膨大。

18 周时,接菌株 C20 的种子,发现有若干已经长出了第 2 片叶,第 1 片叶伸长并继续生长,达到阶段 5(图 2B),其他的种子仍然处于原生分生组织阶段。接菌株 L12 的种子已经长出第 1 片叶(图 2D)。接 L24b 菌株的种子开始出现原生分生组织(图 2F)。对照的种子仍然处于膨大转绿期间,即阶段 2(图 2G)。其他处理的种子基本只是长到第 2 阶段,即继续膨大萌发期,但是各种子的膨大程度有所差异。

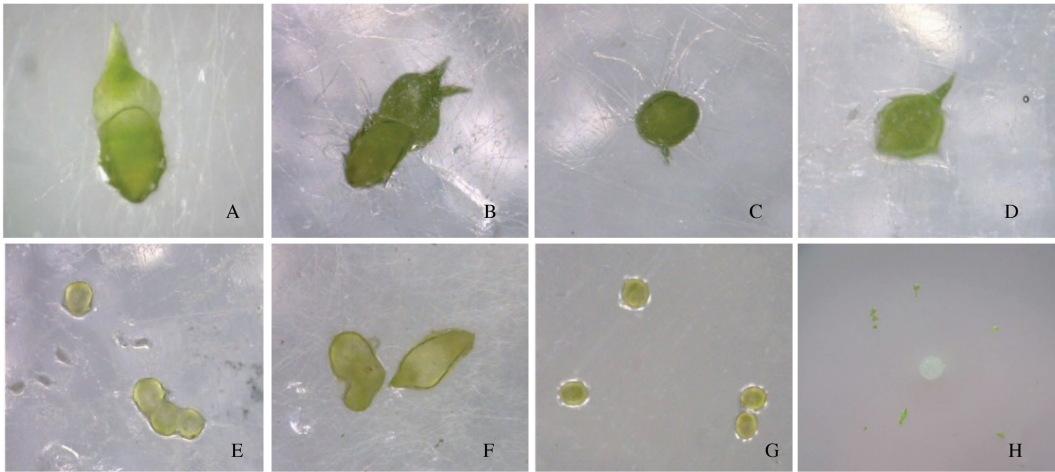


图2 种子与真菌共生培养情况

Fig 2 Germination and development of seeds co-cultured with fungi

A:种子与菌株 C20 培养 14 周,长出第 1 片叶;B:种子与菌株 C20 培养 18 周,长出了第 2 片叶;C:种子与菌株 L12 培养 14 周,开始出现原生分生组织;D:种子与菌株 L12 培养 18 周,长出第 1 片叶;E:种子与菌株 L28 培养 14 周,开始出现原生分生组织;F:种子与菌株 L24b 培养 18 周,开始出现原生分生组织;G:对照的种子培养 18 周,仍处于进行膨大萌发期;H:种子与菌株 C20 培养,长出若干粒原球茎

2.2.2 种子共生萌发率比较

经过 18 周的共生培养,各处理的种子萌发动态参差不齐,且同个培养皿中的种子萌发动态也不一样,部分种子长出第 1 片叶,但部分种子仍然在继续膨大和转绿。无菌的对照萌发率为 61.90%,与 C20、L12、L28 和 L24b 菌株共生培养的萌发率都高于对照,其中菌株 L24b 和 L28 的种子萌发率,显著高出对照 26.51% 和

12.20%。4 株菌株都能促使种子生长到原生分生组织阶段,其中 L12 和 L24b 的出现原生分生组织的百分率显著高于对照(分别为 7.03% 和 10.28%),C20 和 L28 的原生分生组织分别高出对照 3.86% 和 4.32%,但不存在显著性差异。然而,只有菌株 C20 和 L12 的种子生长到幼苗(分别为 2.05% 和 3.59%)。与 L24b 菌株共生的种子虽然萌发率最高(88.4%),出现原生分生组织的比例也最高(10.28%),都显著地高于对照,但是却还没有进一步长出叶片。L12 菌株的种子萌发率虽然与对照不存在显著性差异,但种子能继续生长,长出第 1 片叶(3.59%),显著地高于对照(0)。菌株 C20 处理后的种子有少量已经长出第 2 片叶并继续生长(1.36%)。而对照的种子还处于继续膨大萌发期(61.90%)。因此,C20 和 L12 有助于萌发后的生长,效果较好。在各处理条件下种子萌发率和原球茎的生长发育百分率见表 2。

表 2 4 株内生真菌对铁皮石斛种子萌发和原球茎生长的影响(18 周)

Table 2 Effects of four fungal mycobionts on seed germination and protocorm development of *Dendrobium catenatum* (18 weeks)

菌株 Strains	种子萌发率和原球茎的生长发育百分率/% Percentage of seed germination and protocorm development /%			
	阶段 2 Stage2	阶段 3 Stage3	阶段 4 Stage4	阶段 5 Stage5
C20	68.72 ± 1.80	3.86 ± 1.94	2.05 ± 1.01	1.36 ± 0.65 *
L12	64.38 ± 4.22	7.03 ± 2.04 *	3.59 ± 1.49 *	0
L24b	88.41 ± 1.69 *	10.28 ± 3.11 *	0	0
L28	74.10 ± 2.17	4.32 ± 1.35	0	0
CK	61.90 ± 2.08	0	0	0

数据为平均值±标准误差(n=5); * 表示 $\alpha=0.05$ 水平上的显著性差异

3 讨论

3.1 种子生活力测定

TTC 染色作为一种快速检测种子生活力的方法,早已成功应用于热带附生兰种子生活力的分析中^[22]。种子生活力的高低是进行种子共生萌发实验能否成功的关键因素。在本试验中,铁皮石斛的种子生活力(77.65±1.14)%比种子共生萌发实验中观察到的要高,这可能是因为计算种子生活力时,计入了胚被染成淡红的种子,而胚被染成淡红色的活力不强,在萌发过程中某些活力不强的种子可能无法突破种皮,就没有萌发,而经 L24b 真菌处理的种子萌发率(88.41±1.69)%却要高于种子生活力,可能与该真菌的作用有关,一些活力不强的种子经过 L24b 的侵染后活力提高了。因此,种子生活力染色检测的活力值只代表种子所具有的潜在的萌发能力,而不能代表实际的萌发率。有报告指出 TTC 法检测的种子生活力与实际萌发率结果不一致,这可能与兰花种皮的渗透性有关^[23],也可能是该组织与特殊染料反应所致^[24]。由此发现,种子生活力和萌发率之间似乎并不存在既定的正比关系,这在对黄龙沟的几种兰科植物生活力测定中也得到了验证^[25]。然而,种子生活力是否在一定的范围内,萌发率才是最高呢?这还有待于进一步的探讨和研究。

3.2 菌根真菌的专一性

专一性的存在有助于探讨未测试过的兰科植物的种子萌发^[1]。兰花种子与各种菌根真菌的共生萌发试验表明,一种真菌能与多种兰科植物的种子形成共生关系,来自 *Spiranthes brevilabris* 的 1 株瘤菌根菌属真菌不仅促进 *S. brevilabris* 种子的萌发,长出叶片^[26],且能促使 *Habenaria macroceratitis* 种子的萌发^[10];而不同的真菌也可促进同一种兰科植物的种子萌发,如来自金线莲根部的瘤菌根菌属、小菇属(*Mycena*)、丝核菌属(*Rhizoctonia*)等 6 个属的真菌能同时促进长苏石斛(*D. brymerianum*)种子的萌发^[27]。这些研究结果表明,在异地条件下,某些兰科植物的种类与真菌的专一性较低。

据文献报道,从细叶石斛(*D. hancockii*)和见血清(*Liparis nervosa*)的原球茎中分离到的微囊菌属(*Microascus*)和毛壳菌属(*Chaetomium*)的菌株使铁皮石斛种子的发芽率达 64%,而无菌播种则无一粒萌发^[19];来自金钗石斛的兰小菇(*M. orchidicola*)和铁皮石斛的石斛小菇(*M. dendrobii*)对铁皮石斛种子萌发也较好,可达 51.5% 和 42%^[20]。本研究,3 株瘤菌根菌属真菌都能促进种子的萌发,萌发率分别达 68.7%、

88.4% 和 74.1%, 与 1 株链格孢属真菌共生后的种子萌发率(64.4%) 也比对照高(61.9%)。由此可见, 在异地条件下, 铁皮石斛与共生真菌没有严格的专一性, 铁皮石斛可以与多种真菌共生萌发, 且有些真菌是来自其他的兰科植物。因此, 如何在众多的真菌中, 高效的筛选出对铁皮石斛种子萌发有用的真菌仍需进一步研究。

3.3 种子共生萌发

研究表明, 非共生幼苗建立的兰花种群仍然需要自然条件下的共生真菌来维持幼苗生长^[13], 共生萌发产生的幼苗不仅比非共生幼苗生长的更快, 而且共生萌发的幼苗和块茎移至野外所建立的兰花种群比直接播种到野外建立的兰花种群要更优越^[28-29]。因此, 种子共生萌发是繁育兰花和维护原生境更可取的方法。

铁皮石斛种子共生萌发的结果表明, 合适的真菌能加快种子的萌发, 原球茎和幼苗后续的生长, 而且, 共生真菌还能提高铁皮石斛的药效成分^[30]。此外, 种子伴菌播种后不但能提供种子发芽所需的营养, 而且由于真菌含有抗生素类物质, 保护种子免遭杂菌污染, 从而为种子萌发及其生长创造了良好的环境^[19]。因此, 合适的共生真菌有利于提高铁皮石斛种子的萌发和后续生长以及其药用价值, 应加以充分的研究和应用。

本研究采用燕麦培养基作为共生基质, 成分简单, 改进了以往拌无菌树叶播种的方法, 既简便, 又大大地提高了萌发率。相对非共生而言, 共生的培养基比较简单, 因为它们只需要为真菌提供营养, 而非共生的培养基, 必须为种子萌发和幼苗的生长提供所有的有机物和矿物质需要。

在本研究中, 铁皮石斛的种子与 4 株共生真菌培养 18 周后, 种子萌发率得到了提高, 但是只有与 C20 和 L12 菌株共生萌发的少量种子能生长到原球茎和幼苗, 这可能与培养时间, 真菌的种类及其营养供应持续有关。然而, 萌发的幼苗能否移栽或继续成活, 能否进行重引, 铁皮石斛种子与真菌相互作用的机理, 这些都是将来需要继续深入研究的问题。倘若能将原地和异地两种共生萌发技术一起应用于铁皮石斛的研究和生产上, 这不仅可以进一步了解铁皮石斛种子和真菌的互作关系, 快速筛选出促进萌发的有效真菌, 而且还有利于铁皮石斛野外种群的建立和恢复。

致谢: 美国佛罗里达州国际大学刘虹博士、中国科学院西双版纳热带植物园高江云研究员、西南林业大学伍建榕教授、中国科学院兰州化学物理研究所金辉博士和上海中医药大学中药学院孟千万博士对写作给予帮助, 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所胡美娇老师对真菌的分离和鉴定给予指导。

References:

- [1] Fan L, Guo S X. Research development of orchid mycorrhizal fungi. *Microbiology*, 1998, 25(4): 227-230.
- [2] Clements M A, Muir H, Cribb P J. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin*, 1986, 41(2): 437-445.
- [3] Muir H J. Symbiotic micropropagation of *Orchis laxiflora*. *Orchid Review*, 1987, 95: 27-29.
- [4] Hou T W, Jin H, Liu H X, Luo Y B. Mycorrhizal specificity of *Doritis pulcherrima* in *in-vitro* research. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2010, 34(12): 1433-1438.
- [5] Tan L Y, Aung T, Yam T W. Studies on the growth rate of tropical orchid seeds in symbiotic cultures. 2004 [2011-01-28]. http://staff.science.nus.edu.sg/~scilooe/srp_2003/sci_paper/botanic/research_paper/tan_liyang.pdf.
- [6] Suárez J P, Weiß M, Abele A, Garnica S, Oberwinkler F, Kottke I. Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 2006, 110(11): 1257-1270.
- [7] Rasmussen H N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 2002, 244(1/2): 149-163.
- [8] Masuhara G, Katsuya K. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*, 1994, 127(4): 711-718.
- [9] Taylor D L, Bruns T D, Szaro T M, Hodges S A. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *American Journal of Botany*, 2003, 90(8): 1168-1179.
- [10] Stewart S L, Zettler L W. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquaseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany*, 2002, 72(1): 25-35.
- [11] Stewart S L, Kane M E. Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant*, 2007, 43(3): 178-186.

- [12] Bidartondo M I, Read D J. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 2008, 17(16): 3707-3716.
- [13] Zettler L W. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. *Selbyana*, 1997, 18(2): 188-194.
- [14] Stewart S L, Zettler L W, Minso J, Brown P M. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. *Selbyana*, 2003, 24(1): 64-70.
- [15] Batty A L, Brundrett M C, Dixon K W, Sivasithamparam K. New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil. *Australian Journal of Botany*, 2006, 54(4): 367-374.
- [16] Chen X Q, Liu Z J, Zhu G H, Lang K Y, Ji Z H, Luo Y B, Jin X H, Cribb P J, Wood J J, Gale S W, Ormerod P, Vermeulen J J, Wood H P, Clayton D, Bell A. *Flora of China: Orchidaceae*. Beijing: Science Press, 2009, 25: 382-382.
- [17] He P R, Song X Q, Luo Y B, He M G. Reproductive biology of *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) in Danxia landform. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34(2): 124-127.
- [18] 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.) during symbiotic culture. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2009, 33(3): 433-441.
- [19] Guo S X, Xu J T. Studies on the effects of fungi on the course of seed germination of *Dendrobium lohohens* and *Dendrobium candidum*. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 1991, 13(1): 46-49.
- [20] Guo S X, Cao W Q, Gao W W. Isolation and biological activity of mycorrhizal fungi from *Dendrobium officinale* and *D. nobile*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2000, 25(6): 338-341.
- [21] He M G, Song S Q, Song X Q, Wang R X. Testing method of orchid seeds vitality; China, 200910086543.9. 2009-11-04 [2011-01-28].
- [22] Singh F. Differential staining of orchid seeds for viability testing. *American Orchid Society Bulletin*, 1981, 50: 416-418.
- [23] St-Arnaud M, Lauzer D, Barabé D. *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 1992, 7: 22-27.
- [24] Vierheilig H, Coughlan A P, Wyss U, Piché Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 5004-5007.
- [25] Hou T W. *Mycorrhizal Fungi Diversity of the Dominant Orchids in the Huanglong Valley, Sichuan* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2010.
- [26] Stewart S L, Kane M E. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006, 86(2): 159-167.
- [27] Guo S X, Chen X M, Yu X M, Fan L. Investigation on the isolation of mycorrhizal fungi from *Anoetochilus roxburghii* and its biological activity. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2000, 35(7): 443-445.
- [28] Batty A L, Brundrett M C, Dixon K W, Sivasithamparam K. *In situ* symbiotic seed germination and propagation of terrestrial orchid seedlings for establishment at field sites. *Australian Journal of Botany*, 2006, 54(4): 375-381.
- [29] Johnson T R, Stewart S L, Dutra D, Kane M E, Richardson L. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)-preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2007, 90(3): 313-323.
- [30] Shuai H Y. Studies on Isolation, Identification and Bioactivity of Endophytic Fungi from *Dendrobium candidum* Grew in Huanjiang of Guangxi [D]. Nanning: Guangxi University, 2008.

参考文献:

- [1] 范黎, 郭顺星. 兰科植物菌根真菌的研究进展. *微生物学通报*, 1998, 25(4): 227-230.
- [4] 侯天文, 金辉, 刘红霞, 罗毅波. 实验室条件下五唇兰菌根真菌专一性研究. *植物生态学报*, 2010, 34(12): 1433-1438.
- [17] 何平荣, 宋希强, 罗毅波, 何明高. 丹霞地貌生境中铁皮石斛的繁殖生物学研究. *中国中药杂志*, 2009, 34(2): 124-127.
- [18] 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. *植物生态学报*, 2009, 33(3): 433-441.
- [19] 郭顺星, 徐锦堂. 真菌在罗河石斛和铁皮石斛种子萌发中的作用. *中国医学科学院学报*, 1991, 13(1): 46-49.
- [20] 郭顺星, 曹文琴, 高微微. 铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定. *中国中药杂志*, 2000, 25(6): 338-341.
- [21] 何明高, 宋松泉, 宋希强, 王瑞霞. 检测兰科植物种子生活力的方法: 中国, 200910086543.9. 2009-11-04 [2011-01-28]
- [25] 侯天文. *四川黄龙沟优势兰科植物菌根真菌多样性研究* [D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [27] 郭顺星, 陈晓梅, 于雪梅, 范黎. 金线莲菌根真菌的分离及其生物活性研究. *中国药理学杂志*, 2000, 35(7): 443-445.
- [30] 帅红艳. *广西环江产铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其生物活性的研究* [D]. 南宁: 广西大学, 2008.

CONTENTS

Physiological responses of five deciduous broad-leaved tree seedlings in the Northeast Area of China to burning	WANG Rong, HU Haiqing (2303)
The occurrence regularity of psyllid in <i>Haloxylon</i> spp and its influencing factors	LI Fenlian, WU Xuehai, WANG Peiling, et al (2311)
The estimating of the spatial distribution of forest biomass in China based on remote sensing and downscaling techniques	LIU Shuangna, ZHOU Tao, SHU Yang, et al (2320)
Multivariate correlation analysis between landscape pattern and water quality	ZHAO Peng, XIA Beicheng, QIN Jianqiao, et al (2331)
Red fox habitat selection and landscape feature analysis in the Dalai Lake Natural Reserve in Inner Mongolia	ZHANG Honghai, LI Chengtao, DOU Huashan, et al (2342)
Research on assemblage characteristics of macroinvertebrates in the Yalu Tsangpo River Basin	XU Mengzhen, WANG Zhaoyin, PAN Baozhu, et al (2351)
Climate change induced potential range shift of the crested ibis based on ensemble models	ZHAI Tianqing, LI Xinhai (2361)
Analysis of the sources of second generation meadow moth populations that immigrated into Chinese pastoral areas in 2010	ZHANG Li, ZHANG Yunhui, ZENG Juan, et al (2371)
Genetic diversity based on cytochrome <i>b</i> gene analysis of different geographic populations of blue sheep in China	LI Nannan, LIU Zhensheng, WANG Zhenghuan, et al (2381)
Soil microbial properties under different grain-for-green patterns in depressions between karst hills	LU Shiyang, PENG Wanxia, SONG Tongqing, et al (2390)
Ecosystem and soil respiration of a poplar plantation on a sandy floodplain in Northern China	FANG Xianrui, ZHANG Zhiqiang, ZHA Tonggang, et al (2400)
Estimating total nitrogen content in water body based on reflectance from wetland vegetation	LIU Ke, ZHAO Wenji, GUO Xiaoyu, et al (2410)
Analysis on complete F type of mitochondrial genome in <i>Lamprotula lei</i>	CHEN Ling, WANG Guiling, LI Jiale (2420)
The source-sink landscape pattern change and its effect on phosphorus pollution in Yuqiao watershed	LI Chongwei, HU Jie, WANG Sa, et al (2430)
Responses of soil nematode communities to soluble salt contamination around Gangue hill in Fushun	ZHANG Weidong, LV Ying, XIAO Ying, et al (2439)
Effect of aboveground competition on biomass partitioning of understory Korean pine (<i>Pinus koraiensis</i>)	WANG Jinsong, FAN Xiuhua, FAN Juan, et al (2447)
Research of methane metabolic microbial community in soils of slash pine plantation and Masson pine plantation	WANG Yun, ZHENG Hua, CHEN Falin, et al (2458)
$\delta^{13}\text{C}$ values of stem phloem water soluble sugars of <i>Pinus massoniana</i> and <i>Cunninghamia lanceolata</i> response to meteorological factors	LU Yuxi, WANG Zhenxing, ZHENG Huaizhou, et al (2466)
Soil respiration patterns during restoration of vegetation in the Shapotou area, Northern China	GAO Yanhong, LIU Lichao, JIA Rongliang, et al (2474)
Dynamics of caloric value of <i>Robinia pseudoacacia</i> L. energy forest in the west of Henan Province	TAN Xiaohong, LIU Shiqi, MA Luyi, et al (2483)
<i>Ex-situ</i> symbiotic seed germination of <i>Dendrobium catenatum</i>	WU Huifeng, SONG Xiqiang, LIU Hongxia (2491)
Effects of red/far red ratio on morphological index, leaf area and dry matter partitioning of cut chrysanthemum flower	YANG Zaiqiang, ZHANG Jibo, LI Yongxiu, et al (2498)
Effect of prometryne on root activity and oxidative stress of <i>Polygala tenuifolia</i> Willd. seedling roots	WEN Yinyuan, GUO Pingyi, YIN Meiqiang, et al (2506)
Combined effects of elevated O_3 concentration and UV-B radiation on photosynthetic characteristics of soybean	ZHENG Youfei, XU Weimin, WU Rongjun, et al (2515)
Nutrients transfer for host plant and litter decomposition by AMF in Karst soil	HE Yuejun, ZHONG Zhangcheng, DONG Ming (2525)
The dynamics of bacteria community diversity during the fermentation process of traditional soybean paste	GE Jingping, CHAI Yangyang, CHEN Li, et al (2532)
Effect of site-specific fertilization on soil phosphorus in purple garden soil	SUN Qianqian, WANG Zhengyin, ZHAO Huan, et al (2539)
A method of determining standards for ecological compensation in agricultural areas, giving priority to environmental flows in water allocation	PANG Aiping, SUN Tao (2550)
The loss of ecosystem services value caused by food security assessment model and its application	LU Weiye, JIANG Zhide, ZHANG Yinglong, et al (2561)
Review and Monograph	
Review of the current situation of coastal ecological engineering using dredged marine sediments and prospects for potential application in China	HUANG Huamei, GAO Yang, WANG Yinxia, et al (2571)
Discussion	
Quorum sensing in anaerobic ammonium oxidation bacteria	DING Shuang, ZHENG Ping, ZHANG Meng, et al (2581)
Health evaluation of Dongting Lake based on morphological characters	SHUAI Hong, LI Jingbao, XIA Beicheng, et al (2588)
Scientific Note	
Effects of mix-leaf litter decomposition of different trees in the Loess Plateau	LIU Zengwen, DU Liangzhen, ZHANG Xiaoxi, et al (2596)
Changes in soil active organic carbon under different management types of bamboo stands	MA Shaojie, LI Zhengcai, WANG Bin, et al (2603)
Effects of drought stress on photosynthesis and associated physiological characters of pepper	OU Lijun, CHEN Bo, ZOU Xuexiao (2612)
Effects of silicon application and drought stress on photosynthetic traits and mineral nutrient absorption of rice leaves	CHEN Wei, CAI Kunzheng, CHEN Jining (2620)

《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 元。

国内邮发代号:82-7 国外邮发代号:M670 标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报

(SHENGTAI XUEBAO)

(半月刊 1981 年 3 月创刊)

第 32 卷 第 8 期 (2012 年 4 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 32 No. 8 2012

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100071	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元