

兰科植物原地与迁地种子共生萌发应用

崔磊¹, 曹宏影², 穆立菁^{1*}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省林业厅, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 原地种子共生萌发与迁地种子共生萌发是近年来野生兰科植物繁育的新技术。介绍两种共生萌发技术国内外的应用现状, 分析两种萌发技术在学习过程中出现的问题, 提出两种共生萌发技术的研究趋势。

关键词 野生兰花; 原地种子共生萌发; 迁地种子共生萌发; 共生真菌

中图分类号 S682.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)30-11987-02

兰科植物(简称兰花)是多样性较高的高等植物, 主要由5大亚科组成, 约870属^[1]30 000~25 000种^[2-3]。目前全世界所有的野生兰花种类均被列入了濒危野生动植物国际贸易公约(CITES)。在自然环境中, 兰花种子只有与真菌共生才能萌发^[4], 而在人工培养环境中, 非共生幼苗建立的兰花种群也需要共生真菌来维持幼苗生长^[5]。共生萌发获取的幼苗不仅比非共生幼苗生长快, 而且抵御不良环境的能力也比非共生幼苗强^[6]。然而在自然界中, 促进兰花种子萌发真菌可能不存在于成熟兰花植株中, 因此兰花种子萌发阶段共生真菌很难确定。目前, 兰花种子原地共生萌发是有效获取种子共生萌发真菌的一项快捷技术, 而迁地种子共生萌发是在原地种子共生萌发基础上建立起来的一种有潜力的种子共生萌发技术。

1 原地种子共生萌发与迁地种子共生萌发应用现状

1.1 原地种子共生萌发应用现状 种子原地共生萌发是将兰花的种子放在捕捉浮游生物的尼龙网上, 将尼龙网对折后用幻影灯片框固定, 再用尼龙线将固定好的尼龙网拴在一根标签上一起埋入兰花成熟植株周围, 161~210 d后挖出, 在其萌发后定向分离出种子萌发共生真菌, 从而提高兰花种子萌发阶段共生真菌筛选效率^[7]。

在国外, Rasmussen等用此技术成功获得了 *Corallorhiza odontorhiza*, *Goodyera pubescens* 和 *Galearis spectabilis* 3种兰花的原球茎^[8]。Batty等采用此技术发现离 *Caladenia arenicola* 兰花植株近的种子萌发率高, 随着距离的增大种子萌发率减小, 土壤中适量钾离子的含量与兰花种子萌发率显著相关^[9]。Bidartondo等采用此技术回收了 *Cephalanthera* 和 *Epipactis* 二属植物的原球茎, 并对其种子萌发阶段、幼苗阶段和成年阶段的共生真菌进行了分子系统学研究, 发现种子萌发阶段和成年兰时期有较多的真菌种与其共生, 幼苗期的共生真菌种类较少, 推测这些真菌种可同时出现在这3个时期, 也可能只出现在其中的一个或两个时期。还有的研究者大量设置种子播种点, 研究区域内有效真菌的分布情况, 为兰科植物的保护级别的设定提供数据支持^[11]。在国内, 对原地种子共生萌发技术的应用较少。

1.2 迁地种子共生萌发应用现状 迁地种子共生萌发就是利用原地种子共生萌发原理, 将野生兰花生长地的土壤带回实验室。在兰花冬眠时, 土壤中的菌根真菌仍然处于活跃状态, 而其他杂菌的作用此时较小, 利用采集土样为培养基, 在人工控制温湿的情况下诱导种子萌发^[12]。

一些濒危野生兰花受到独特授粉机制、生物学与生态学特性等限制因素的影响, 采用原地种子共生萌发不切实际, 一般采用迁地种子共生萌发。迁地种子共生萌发具有用种量小, 不受野外条件限制, 能方便地对种子萌发的全过程进行监测和记录种子萌发情况等优点。Mark等通过对几种地生兰样地土壤的对比, 确定最适合迁地共生萌发的土壤是成熟兰花附近的包括枯枝落叶的表层腐殖质层, 采集不同种类的兰科种子放置在同一土壤基质中, 通过调控萌发条件发现同一土壤基质可以促进不同种类兰科种子萌发^[12]。Batty等采用原地与迁地种子共生萌发技术对两种兰科种子做连续4年的对比试验, 证明采用迁地萌发种子存活率远高于原地萌发种子的存活率^[13]。

在国内, 徐锦堂等将大麻种子播撒在从野外森林环境中收集的腐烂落叶的表面, 在适宜的温湿条件下, 28~35 d后获得萌发原球茎, 从中分离的紫萁小菇(*Mycena osmundicola*)能够促进大麻种子萌发与原球茎生长^[14-15]。随后, 郭福星等采用种子伴菌播种方法证明了紫萁小菇可较大提高几种石斛种子的萌发率^[16-17]。最近, 盛春玲等利用硬叶兰成年植株根部周围的枯枝落叶、腐殖质等作为培养基, 成功地获得了处于不同萌发阶段的种子原球茎, 并从原球茎中分离到瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)真菌, 通过接种试验证明此研究分离到的瘤菌根菌属真菌能有效地促使硬叶兰种子萌发并生长发育到幼苗阶段^[18]。

2 两种种子共生萌发问题分析

2.1 原地种子共生萌发问题分析

2.1.1 用种量多, 工作量大。在兰花原生境中, 能促使种子萌发的真菌未必是一种或几种, 而种子袋“诱捕”只能获取该区域的真菌, 超过这个区域的真菌种类就不易“诱捕”。在自然环境中, 虽然有效真菌主要分布在成熟母株附近, 但有效真菌的分布较零散, 潜在的适合兰花生长区域就很难发现。要想“诱捕”较多的兰花真菌, 需要在兰花原生境中投放较多的种子袋, 采用大量的兰科种子来“诱捕”有效真菌, 在有限的生长季节迅速获取萌发种子原球茎, 完成这项工作劳动强度较大^[19]。

基金项目 国家林业局野生植物保护管理项目(LYJ41313404)。

作者简介 崔磊(1982-), 男, 黑龙江伊春人, 助理工程师, 在读博士, 从事菌根开发与利用研究。*通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事菌根方面的研究。

收稿日期 2013-09-30

2.1.2 不良自然因素与人为干扰影响。埋在自然生境中的兰花种子,如果在其萌发与生长阶段遇到干旱、山洪、动物啃食或病虫害等不良自然因素的影响,就会减少种子袋的回收数量。与此同时,遮阴、土壤肥力与杂草竞争等环境因素也会影响原地萌发原球茎的存活^[20]。

人为干扰主要表现在对野生兰花的采挖与种子袋的破坏,许多野生兰花具有较高的观赏价值与经济价值,造成当地农民对野生兰花资源的乱采滥挖,减少成熟母株数量。埋于野外的种子袋不易长期监控,导致回收种子袋的大量减少。除此之外,还包括野生兰花伴生灌木的砍伐^[21]、开荒地等人为了人为干扰。

2.2 迁地种子共生萌发问题分析

2.2.1 迁移土壤处理境困难。当土壤成分与结构发生改变时,许多野生兰花将会生长不良或者不能存活。将兰花种子放入迁移土壤中,土壤湿度与氧气通透条件与自然生境不同,特别是处理大量土壤样品时,无菌土壤滤网的使用不当可能会引起土壤样品的交叉感染,影响试验结果^[22]。

2.2.2 种子萌发原球茎生长困难。完成真菌接种的种子很难跨越原球茎发育阶段,完成幼苗发育阶段。一方面,种子萌发不同阶段需要的营养成分与温湿条件还不明确^[23];另一方面,种子萌发的最有效真菌分离较困难。

总之,原地种子共生萌发与迁地种子共生萌发都有自身的优势与不足,选择那种方法要依据兰科植物的实地情况与濒危程度来确定。

3 原地种子共生萌发与迁地种子共生萌发技术研究趋势

3.1 探索原生境野生兰花的潜在分布区域 目前,两种种子共生萌发的研究主要集中在确定促使种子共生萌发真菌的种类,缺乏对共生真菌在兰花生态系统中生存和分布影响的研究,如果真菌确实是兰花分布限制因素,那么真菌分布区域与生态环境的关系将成为兰花的重要研究方向,加强这方面的研究有助于解释和解决一些兰科植物濒危的现状。

3.2 加强有效共生真菌种类分离 内生真菌与兰花种子形成共生关系的过程主要分为接触、侵入和定植,而促进种子萌发的真菌主要分两类:一类是需氧真菌,易侵入种子,但在种子原球茎中容易消解,不容易定植,此类真菌容易分离;另一类则是厌氧真菌,此类真菌生长速度慢,而且在合适的温湿条件下才能侵入特殊的兰花种子,此类真菌在萌发原球茎中不易消解,容易定植,但分离难度较大。因此,种子共生萌发需要加强对厌氧真菌的分离,与此同时,促进种子萌发的有效共生真菌是一种还是几种真菌共同作用需要进一步研究。

3.3 结合原生境调查,深入研究兰花生理特性 兰花不同于其他植物,特别是地生兰,具有独特的授粉机制与生境需求。两种种子共生萌发技术只完成诱导共生真菌促使种子萌发这一阶段,但要实现从种子到成熟植株就需要较长的时间与独特的生长环境。因此,两种种子共生萌发技术必须与兰花的生物学与生态学相结合,逐步实现野生兰科植物的生态回归与引种驯化,协调野生兰花的生态价值与经济价值。

参考文献

- [1] CHASE M W, CAMERON K M, BARRETT R L, et al. DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification [M]//DIXON K W, KELL S P, BARRETT R L, et al. Orchid conservation. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications, 2003: 69-90.
- [2] MABBERLEY D J. The plant book [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- [3] CRIBB P J, KELL S P, DIXON K W, et al. Orchid conservation: A global perspective [M]//DIXON K W, KELL S P, BARRETT R L, et al. Orchid Conservation. Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu, Sabah, 2003: 1-24.
- [4] ARDITTI J, ERNST R, WING Y T, et al. The contribution of orchidmycorrhizal fungi to seed germination: A speculative review [J]. Lindleyana, 1990, 5(4): 249-255.
- [5] ZETTLER L W. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives [J]. Selbyana, 1997, 18(2): 188-194.
- [6] JOHNSON T R, STEWART S L, DUTRA D, et al. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) -preliminary evidence for the symbiotic culture advantage [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 90(3): 313-323.
- [7] 姜鹏, 范黎. 兰科植物与真菌共生关系研究方法及其应用 [J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 895-901
- [8] RASMUSSEN H N, WHIGHAM D F. Seed ecology of dust seeds in situ: A new study technique and its application in terrestrial orchids [J]. American Journal of Botany, 1993, 80: 1374-1378.
- [9] BATTY A L, DIXON K W, BRUNDETT M, et al. Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland [J]. New Phytologist, 2001, 152: 511-520.
- [10] BIDARTONDO M I, READ D J. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development [J]. Molecular Ecology, 2008, 17(16): 3707-3716.
- [11] SWART N D, SINCLAIR E A. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid [J]. Molecular Ecology, 2010, 19: 3226-3242.
- [12] BRUNDETT M C, SCADE A, BATTY A L, et al. Development of in situ and ex situ seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats [J]. Mycol Res, 2003, 107(10): 1210-1220.
- [13] BATTY A L, BRUNDETT M C, DIXON K W, et al. In situ symbiotic seed germination and propagation of terrestrial orchid seedlings for establishment at field sites [J]. Australian Journal of Botany, 2006, 54: 375-381.
- [14] 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, 8(3): 221-226.
- [15] 冉砚珠, 徐锦堂. 紫萁小菇等天麻种子萌发菌的筛选 [J]. 中国中药杂志, 1990, 15(5): 15-18.
- [16] 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 [J]. 中国医学科学院学报, 1991, 13(1): 46-49.
- [17] WANG H, FANG H Y, WANG Y Q, et al. In situ seed baiting techniques in *Dendrobium officinale* Kimura et Migo and *Dendrobium nobile* Lindl.: The endangered Chinese endemic *Dendrobium* (Orchidaceae) [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27: 2051-2059.
- [18] 盛春玲, 李勇毅, 高江云. 硬叶兰种子的迁地共生萌发及有效共生真菌的分离与鉴定 [J]. 植物生态学报, 2012, 36(8): 859-869.
- [19] HOLLICK S H. Mycorrhizal specificity in endemic Western Australian terrestrial orchids (tribe Diurideae): Implications for conservation [D]. Australia: Murdoch University, 2004.
- [20] SCADE A, BRUNDETT M C, BATTY A, et al. Survival of transplanted orchid seedlings in urban bushland habitats with high or low weed cover [J]. Australian Journal of Botany, 2006, 54: 383-389.
- [21] 董世林. 植物资源学 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1994.
- [22] MAGALI WRIGHT, ROB CROSS, KINGSLEY DIXON, et al. Propagation and reintroduction of *Caladenia* [J]. Australian Journal of Botany, 2009, 57: 373-387.
- [23] BATTY A L, BRUNDETT M C, DIXON K W, et al. New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil [J]. Australian Journal of Botany, 2006, 54: 367-374.