

兰科药用植物共生真菌促进种子萌发研究进展

高燕燕, 杭烨, 刘剑东, 李扬, 刘智, 李林, 田海露, 张明生*

贵州大学生命科学学院, 贵州大学山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵阳550025

摘要: 兰科植物种子细小如尘、无胚乳、存在萌发障碍, 在自然条件下需要依赖共生真菌提供碳源、氮源、水及其他营养物质才能萌发。本文以相关研究文献为基础, 对国内外兰科植物种子促萌发真菌研究历程、种类及共萌发过程中营养物质传递机制等方面进行综述, 为兰科植物资源保护和再生、人工栽培及深入开展共生机制的研究提供参考。

关键词: 兰科植物; 共生真菌; 种子萌发

兰科(Orchidaceae)植物种类繁多, 超过28 000种(Christenhusz和Byng 2016), 是被子植物门第三大家族(Chase等2015), 具有很高的观赏和药用价值; 其种子细小如尘, 数量巨大, 每个蒴果中含有上万颗种子, 每颗种子干重为0.3~24 μg (Arditti和Chani 2000); 种子缺少胚乳(Rasmussen和Whigham 1993), 只有极少量的碳源储存在原胚中(Manning和Van 1987), 在自然条件下萌发率仅有万分之几(董芳2008)。不同兰科种子萌发困难原因各有差异, 有些成熟种子产生脱落酸等次级代谢产物抑制萌发(于雪梅2000), 有些地生兰种子种皮过于坚韧而造成萌发障碍(Lee等2005), 部分兰科种子胚未发育成熟[如杜鹃兰(*Cremastra appendiculata*)](王汪中2017), 还有部分兰科种子缺少乙醛酸循环体系及各种酶系, 不能利用自身的营养物质(于雪梅2000)。种子萌发障碍给物种繁育及资源保护带来极大困难。有研究者提出, 在自然环境下几乎所有兰科植物均会与真菌形成兰科菌根(Taylor等2003; 武静宇2009; 杨前宇2018), 在没有共生真菌协助的情况下, 种子基本无法完成萌发过程(Dearnaley 2007), 多数只能吸水膨胀至种皮破裂阶段(Rasmussen和Whigham 1993)。当种子萌发形成原球茎, 由于原球茎缺少叶绿体不能进行光合作用, 必须依赖共生真菌提供营养(Leak 2004; Fochi等2017)。随后原球茎继续生长发育至子叶形成[部分兰科植物不一定具有子叶, 如鬼兰(*Dendrophylax lindenii*)], 此时, 部分兰科植物所需的营养部分来自自身的光合作用产物, 部分来自共生真菌, 这一类兰科植物被称为部分真菌异养型兰科植物; 然

而还有一部分兰科植物不能进行光合作用, 整个生命周期依赖共生真菌提供营养, 这一类兰科植物被称为完全异养型(图1) (Stöckel等2014)。

从发现兰科种子促萌发真菌至今, 研究者在兰科种子促萌发真菌的筛选分离、特异性、共生机制研究等方面做了不少工作(Warcup 1973, 1988; Swangmaneecharern等2012; 徐锦堂和郭顺星1989; Fochi等2017; 严亮2014), 对兰科资源的保护及再生发挥了重要作用。本文就国内外兰科植物共生真菌促进种子萌发的研究历程、促萌发真菌种类、营养关系及营养物质传递机制等方面进行综述, 拟为进一步研究兰科植物种子萌发提供参考。

1 兰科植物种子促萌发真菌研究简史

1840年Link首次发现兰科植物根部有内生真菌存在, 之后在兰科根部细胞中发现菌丝体, 1886年Wahhrlich观察到两者之间可形成菌根结构(董芳2008)。共生真菌是否在兰科植物的生长发育中发挥作用, 一直未得到确切的答案。直到1889年法国研究者Bernard发现落叶上被真菌侵染的鸟巢兰属(*Neottia*)植物种子能够萌发成幼苗, 这一发现引起了学术界的广泛关注, 并提出了真菌具有诱导种子萌发成幼苗的大胆推测; 这一推测于1903

收稿 2019-09-16 修定 2019-11-15

资助 国家自然科学基金(81660627)、贵州省科技计划(黔科合平台人才[2017]5788)、贵州省高层次创新型人才培养计划(黔科合人才[2015]4031)、贵州省科技创新人才团队建设专项(黔科合平台人才[2016]5624)。

* 通讯作者(mshzhang@163.com)。

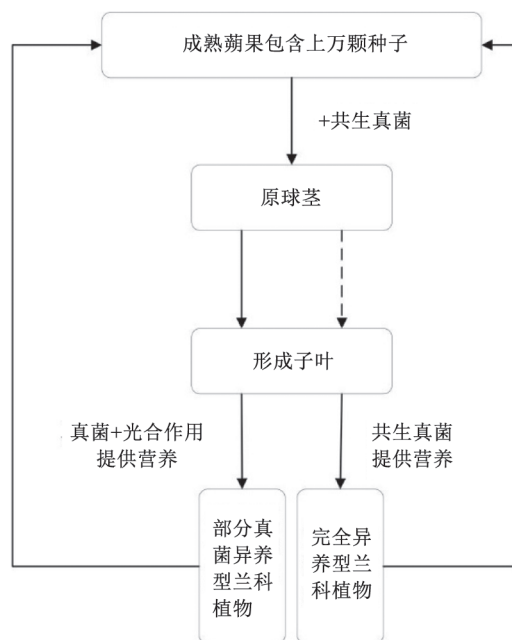


图1 兰科植物与真菌共生模式图

Fig.1 The schematic of symbiotic between orchidaceae and mycorrhiza fungi

年在关于真菌和兰科植物种子萌发的关系研究中得到了证实(董芳2008; Stöckel等2014)。1929年 Catoni等从兰科植株上分离到促萌发真菌,并在培养过程中成功观察到子实体的形成,该真菌被鉴定为伏革菌属真菌,这一发现极大地推动了兰科种子促萌发真菌的分离与鉴定工作(田佳妮2015)。Smith (1966)从红门兰(*Dactylorchis purpurella*)根中分离得到丝核类(rhizoctonia)真菌,并发现该真菌对其种子萌发具有显著促进作用。Warcup (1971, 1973, 1991)从驴兰(*Diuris*)、澳大利亚兰花等不同兰科植物中分离得到胶膜菌属真菌(*Tulasnella*)、白腐菌等多种共生真菌,并发现它们均能够在不同程度上促进不同兰科种子的萌发。从兰科共生真菌发现至20世纪90年代,寻找兰科共生真菌引起了学术界的关注,但大多数只是依据传统形态学等方法鉴定真菌。大量研究表明,从成年植株根中分离获得的真菌种类多样,但往往未必能够促进种子萌发或形成幼苗(Taylor和McCormick 2008; Stewart和Kane 2006; Rasmussen等2015)。很多研究表明,兰科植物生长发育的不同阶段与特定的真

菌紧密相关(Long等2013)。因此,研究者认为原地捕获法将是获得促萌发真菌的有效途径,Zi等(2014)、Huang等(2018)、Meng等(2019)研究者采用在石斛(*Dendrobium*)的原生地埋下种子,当种子萌发成原球茎后,以原球茎为材料,成功分离获得促进种子萌发的有效真菌。这一方法的成功应用将很好地解决从成年根中不能获得促萌发真菌的短板,为兰科物种的保育提供有效途径。

我国在寻找兰科种子促萌发真菌上起步较晚,直至上世纪90年代,徐锦堂等(1989)从无光合作用的异养型植物天麻(*Gastrodia elata*)原球茎中分离得到一株促进天麻种子萌发真菌,鉴定为紫萁小菇(*Mycena osmundicola*);该真菌被广泛应用于天麻有性繁殖生产过程,实现了天麻人工栽培,为天麻物种保护和再生奠定了重要基础(郭顺星和徐锦堂1990a)。此后,范黎等(1996)、郭顺星和徐锦堂(1990b)在墨兰(*Cymbidium sinense*)、石斛等其他兰科中分离得到促萌发真菌。

21世纪以来,国内外研究者相继在石斛(郭顺星等2000; Zi等2014; Huang等2018; 严亮2014; Meng等2019)、杓兰(*Cypripedium yunnanense*) (安曼云2017)、龙头兰(*Pecteilis susannae*) (Chutima等2011)、虾脊兰(*Calanthe*) (Youm等2012)、独蒜兰(*Pleione bulbocodioides*) (杨友联等2008)等不同兰科植物中分离得到不同种类促萌发真菌;随着分子生物学技术的快速发展,原位杂交、同位素跟踪法等技术为互作机制的研究提供了便利,大大推动了兰科植物人工栽培、资源保护工作的开展。

2 促进兰科种子萌发共生真菌的多样性

自然条件下促进兰科种子萌发的真菌包括外生真菌和内生真菌,其中外生真菌大多与邻近的树木附生,多为腐生菌(Liebel和Gebauer 2011),内生真菌可存在植株的根、茎、叶等不同组织中。大多数情况下,促萌发真菌从成年兰科植物根、原球茎中分离得到(Huang等2018)。已报道的对兰科植物种子有促萌发作用的真菌主要集中在丝核类真菌,包括蜡壳菌属(*Sebacina*)真菌、胶膜菌属

(*Tulasnella*)真菌和角担菌属(*Ceratobasidium*) (Zhao等2013; Rasmussen等2015; Rafter等2016), 除此之外, 小菇属(*Mycena*)、瘤菌根菌属(*Epulorhiza*)、鬼伞属(*Coprinellus*)以及其他部分菌属真菌也有报道能够促进不同兰科种子萌发(徐锦堂和郭顺星1989; Chutima等2011; Huang等2018) (表1)。

早期研究者主要通过形态学对促萌发真菌进行鉴定, 多数只能鉴定到属。随着DNA分子鉴定技术的出现, 不少未知促萌发真菌被成功鉴定, 这将有效解决有些兰科植物无菌萌发困难、繁殖速率缓慢的问题, 对兰科植物的保护具有重要意义。但仍有些共生真菌由于序列进化速度太快, 通过引物并不能鉴别, 这也是共生真菌种类鉴定的一个短板(Tayor和Mccormic 2008)。

3 促进兰科种子萌发共生真菌与兰科植物的专一性

专一性一直是学术界讨论的热点, 早期工作者认为兰科植物与促萌发真菌具有较强的专一性, 但部分研究者并不赞同这种观点(Curtis 1939; Warcup 1973; 范黎等1996), 他们发现从一种兰科植物中分离得到的共生真菌能够促进多种兰科种子萌

发。Warcup (1973)研究表明多种胶膜菌属真菌能够促进驴兰种子萌发, 其他真菌均不能促进其萌发; 同时发现至少有3种胶膜菌属真菌能够促进柱帽兰(*Thelymitra*)种子萌发。范黎(1997)对兰科种子与小菇属中石斛小菇、紫萁小菇、兰小菇等共生真菌进行共萌发试验, 发现试验组采用的菌株均能促进天麻种子萌发形成原球茎, 说明不同的真菌可促进同种兰花种子萌发。Bonnardeaux (2007)研究了6种地生兰种子与12种真菌(包含8种瘤菌根菌属真菌、2种蜡壳菌属真菌、1种内生子囊菌真菌及1种角担菌属真菌)共生情况, 结果发现其中2种地生兰种子可与12种真菌形成共生关系, 另外4种地生兰种子仅能与角担菌属真菌和蜡壳菌真菌共生, 并不同程度上提高了种子萌发率。杨友联等(2008)从独蒜兰中分离的共生真菌与种子通过燕麦培养基共生萌发, 发现菌株处理组与空白对照相比, 萌发率提高7%; 同时从同一兰科植物中分离得到的同一属的不同菌株, 有的能促进种子萌发, 有的会引起原球茎死亡。从部分研究数据得出: (1)同种真菌可与不同兰科种子形成共生关系, 寻找合适的共生真菌是决定兰科植物种子能否成功萌发的关键; (2)不同真菌对同种兰科种子萌发

表1 部分促进兰科植物种子萌发的共生真菌
Table 1 Part of mycorrhiza fungi on promoting seeds germination of orchids

萌发真菌种属	宿主植物名称	分离部位	参考文献
胶膜菌属 <i>Tulasnella</i>	驴兰 <i>Diuris</i>	根	Warcup 1971
	虾脊兰属 <i>Calanthe</i>	根	Youm等2012
	兜唇石斛 <i>Dendrobium aphyllum</i>	根	Zi等2014
	硬叶兰 <i>Cymbidium mannii</i>	根	Huang等2018
	云南杓兰 <i>Cypripedium yunnanense</i>	根	安曼云2017
角担菌属 <i>Ceratobasidium</i>	羽柱鹦喙兰 <i>Gavilea australis</i>	根	Fracchia等2014
蜡壳菌属 <i>Sebacina</i>	鸟巢兰 <i>Neottia nidus-avis</i>	原球茎	McKendrick等2002
瘤菌根 <i>Epulorhiza</i>	齿瓣石斛 <i>Dendrobium devonianum</i>	原球茎	Huang等2018
	兜唇石斛 <i>Dendrobium. aphyllum</i>	原球茎	Huang等2018
	龙头兰 <i>Pecteilis susannae</i>	根	Chutima等2011
紫萁小菇 <i>Mycena osmundicola</i>	天麻 <i>Gastrodia elata</i>	原球茎	徐锦堂和郭顺星1989
兰小菇 <i>Mycena orchndicola</i>	墨兰 <i>Cymbidium sinense</i>	根	范黎等1996
石斛小菇 <i>Mycena dendrobii</i>	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	根	Guo等1999
鬼伞属 <i>Coprinellus</i>	杜鹃兰 <i>Cremastra appendiculata</i>	根	Yagame等2013
木霉属 <i>Trichoderma</i>	独蒜兰 <i>Pleione bulbocodioides</i>	根	杨友联等2008
毛壳菌属 <i>Chattonium</i>	见血清 <i>Liparis nervosa</i>	原球茎	郭顺星和徐锦堂1991
革菌属 <i>Thelephora</i>	铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	原球茎	McKendrick等2000

的影响不一致(Warcup 1973),说明共生真菌与兰科宿主之间并不存在十分严格的种属特异性。

目前,研究者普遍认为兰科植物与共生真菌之间存在生态专一性和潜在专一性。Curtis (1939)指出,兰科共生真菌种类分布情况与其栖息地有关而不是与寄主种类有关。Warcup等(1973)指出只有在自然条件下,真菌与兰科种子共萌发过程才能体现两者之间的专一性,而在实验室条件下,两者之间专一性较弱。1983年Hadley采用丝核类真菌与10种兰花种子进行共萌发,得出与Curtis一致的观点。Esnault等(1994)对濒危兰科植物盘龙参(*Radix seu Spiranthis Lanceae*)与根腐病菌进行种子共萌发试验,结果表明:在自然条件下,两者具有高度专一性;在实验室条件下,盘龙参可与丝核菌类真菌共萌发。有研究者认为兰科植物在特定生活中必须与特定的真菌共生,获得生长发育所需要的营养物质,如促进兰科植物种子萌发的真菌与促进幼苗生长的真菌具有差异(Otero等2002),只有专一的真菌方能促进某种兰科种子萌发(McKendrick等2002)。从成年兰科植物根中分离得到的真菌并不总是能促进其种子萌发,而原地萌发是寻找促进兰科种子萌发研究的有效环节(武静宇2009)。

虽然兰科种子与合适共生真菌能够建立良好的共生关系,对于促进种子萌发及保育工作具有重要价值,但两者之间的关系非常复杂,仍有许多诸如共生真菌侵入机制、共生体系调控、营养传递机制等方面的问题亟待解决;加之实验室条件与自然环境差异,致使其在生产上的应用十分有限。

4 促进兰科种子萌发共生真菌的营养传递机制研究

Bernard提出在自然条件下兰科种子依赖共生真菌才能萌发的理论,但是真菌究竟起什么作用,如何发挥作用,整个共生萌发过程的细节也尚待明确。随着研究的逐渐系统、深入,共生真菌与兰科种子萌发过程之间互作关系也逐渐清晰(Wu等2010; Chutima等2011; Fracchia等2013)。

在自然条件下,多数兰科种子萌发依赖共生真菌提供生长发育所需要的碳、氮、维生素等营养物质以及激素等代谢调控物质(Stöckel等2014;

Alghamid 2019)。碳源作为植物生长发育的必需营养物质之一,种子萌发异养阶段只能依靠共生真菌提供(McKendrick等2002)。1966年Smith率先证实促萌发真菌能够将纤维素分解为葡萄糖提供给种子,朱国胜(2009)在研究贵州独蒜兰、杜鹃兰共生真菌中也得出了同样结论。郭顺星和徐锦堂(1990d)从兰科植物原球茎中筛选得到促萌发菌,成分检测发现其中含有较多总糖和还原糖,能够为种子萌发提供足够的碳源。角担菌属真菌通过菌丝吸收基质中葡萄糖进而转化为甘露醇和海藻糖,并以海藻糖的形式转运到小斑叶兰(*Goodyera repens*)的原球茎中(Hadley 1984)。有研究者通过同位素丰度法比较共生真菌植株和非共生植株叶片中氮和碳的含量,结果表明成年完全异养型植株¹⁵N和¹³C的含量明显比周围自养型植株高很多,部分异养型植株¹⁵N和¹³C的含量介于二者之间(Gebauer和Meyer 2003)。在共生过程中,真菌从周围环境中取得养分,然后将其分解成葡萄糖、核糖等小分子碳水化合物(石兆勇等2003);部分真菌菌丝体穿过种皮,产生淀粉酶使胚内淀粉水解,促进胚原体继续生长;还有些真菌可将淀粉粒降解为可溶性糖改变培养基pH,进而促使种子萌发(Mehra等2017)。吕亨等(2018)通过观察杜鹃兰假鳞茎侧芽基部细胞的变化过程,检测发现从休眠到萌发期间侧芽自由水含量上升,束缚水含量降低,相关的调控基因也出现了变化;然而对于种子萌发是否也同样存在这种现象,值得深入探讨。可以看出,不同兰科、不同真菌对碳源的利用形式存在较大差异,在实践中建立兰科种子与真菌共生体系需要根据真菌利用的最佳碳源来选择合适基质。

在自然生态系统中氮是植物生长的限制因子之一,种子萌发过程通过真菌不断获取硝酸盐(Koegel等2015)、氨基酸(Fochi等2017)等不同形式的氮。美胞胶膜菌与兰科植物共生时,真菌能够为种子萌发提供铵盐、氨基酸,但不能提供硝酸盐(Fochi等2017); Kuga等(2014)采用¹⁵N同位素法标记NH₄NO₃作为氮源,发现角担菌属真菌能够将¹⁵N传递给原球茎,促进其发育。

共生过程中,真菌除了提供碳、氮等营养物

质之外, 还能够通过激活某种信号, 进而合成与种子萌发相关的维生素、激素[如赤霉素(gibberellic acid, GA)、玉米素(zeatin, Z)、脱落酸(abscisic acid, ABA)]以及谷氨酰胺、谷氨酸、天冬氨酸及其他多种氨基酸, 促进种子萌发(Harvais和Pekkala 1975; 吴静萍等2002)。GA广泛存在于真菌、细菌和植物中, 参与调控植物生长发育的各个阶段, 能够打破植物休眠、诱导有丝分裂、促进种子发芽, 在一定程度上提高萌发率(阎波等2017), 作为植物种子萌发最重要的信号分子, 暗示其可能参与或影响了种子萌发过程中相关的信号转导途径(张集慧等1999; Liu等2015); Z可促进细胞分裂、分化, 对种子萌发具有明显促进作用。

兰科种子与真菌共萌发过程中, 真菌可破坏外皮层细胞或根被组织侵染种子, 也可以通过根毛或穿过外皮层薄壁细胞进入种子内皮层中(Esnault等1994)。真菌侵入种子之后, 将基质和胚连接起来, 形成一个共生系统, 通过菌丝传递不同种类营养物质促进种子萌发。在种子细胞中, 真菌被细胞膜及植物-真菌界面原生质体所包围, 断裂的菌丝被消化分解、重新定殖缠绕形成菌丝结, 进而促进兰科种子萌发(Cameron等2006; Kuga等2014)。目前, 研究者普遍认为共生真菌通过以下两种途径为兰科种子萌发提供营养: (1)菌丝通过分解周围环境中的有机物, 将得到的碳水化合物或其他来源的营养物质经过菌丝团传递给种子或原球茎, 促进其萌发; (2)消化侵入的菌丝(Fochi等2017), 菌丝溶解释放C、N、P给宿主植物(图2)。

为了更清楚地了解真菌侵染种子的过程, Jiang等(2019)通过荧光蛋白标记共生真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*), 以此来追踪整个侵染途径, 这将为更好地研究宿主与共生真菌的互作机制提供新的思路。

在早期的研究中, 对于兰科种子和共生真菌营养关系的研究主要集中在表观层面, 随着生物技术的快速发展, 越来越多的研究者通过分子生物学技术深入剖析促萌发机制(Stöckel等2014; 杨前宇2018; Zhao等2013)。曾旭等(2018)采用cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA end, RACE)技术获得丝氨酸羧肽酶基因*GeSCPL*, 推测该基因可能参与天麻种子萌发过程, qPCR结果表明, 天麻种子与石斛小菇23号菌共萌发过程中, 该基因表达量上升。赵明明等(2013)通过分子生物学手段筛选出了一系列参与铁皮石斛种子与真菌共生萌发的关键候选基因, 利用抑制差减杂交cDNA文库法研究铁皮石斛共生萌发原球茎中的基因表达, 发现 Ca^{2+} 信号转导基因、氨基酸类代谢调控相关基因及跨膜蛋白基因在共生萌发过程中起作用, 且细胞壁降解酶类基因特异性表达, 暗示宿主植物可能通过分解真菌细胞壁以摄取营养物质促进萌发。张岗等(2013)利用RT-PCR、RACE方法, 率先从小菇属真菌侵染的铁皮石斛根中克隆到1个促分裂原活化蛋白激酶基因(*DoMPI*)和1个钙依赖蛋白激酶基因(*DoCPK1*), 推测其能够促进铁皮石斛种子萌发, 可能在该共生体系中起作用。

Fochi等(2017)通过LMD (laser micro-dissec-

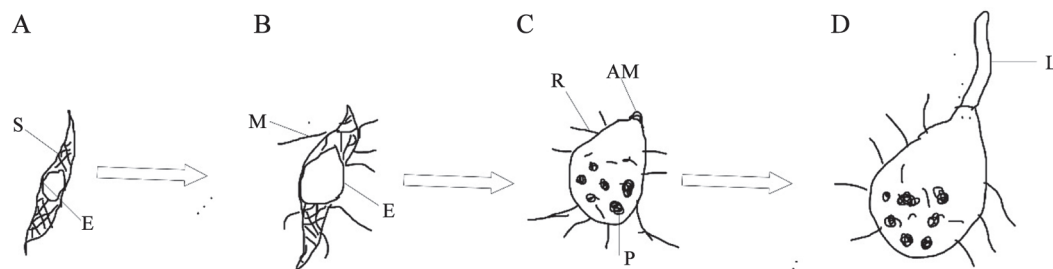


图2 共生真菌与兰科种子共萌发营养物质传递机制

Fig.2 The delivery mechanism of nutrient on seeds germination between mycorrhiza fungi and orchids

A: 种子未萌发; B: 种子与真菌共生突破一侧种皮; C: 种子萌发形成原球茎; D: 子叶形成。S: 种子; E: 种胚; M: 菌丝; P: 菌丝结; R: 根毛; AM: 顶端分生组织; L: 子叶。

tion)法观察美胞胶膜菌与种子共萌发过程中特殊基因表达,进而推测其吸收、转运营养物质及基因表达调控的过程。结果显示:(1)该菌基因组中具有2个功能性转运铵载体*TcAMT1*、*TcAMT2*和几个氨基酸转运载体,主要向宿主传递有机氮,由于基因组中缺少铵同化基因,导致其不能通过铵同化获得氮源;(2)试验组中美胞胶膜菌氮转运载体的表达明显高于对照组,尤其是氨基酸转运载体*TcAAT1*、*TcAAT2*、*TcAAT6*呈现明显上调;(3)共生菌侵染的原球茎中氨基酸转运载体*SvAAP1*、*SvAAP2*和寡肽的转运载体呈现明显上调。Balestrini等(2014)以虎舌兰(*Epipogium roseum*)为研究材料,其种子与美胞胶膜菌共生时,发现*SvNod1*基因在含有菌丝结的原球茎中呈上升表达,暗示该基因可能参与种子萌发过程信号转导。在兰科种子与促萌发真菌共生体系中,共生真菌如何侵染进入种子并参与营养物质传递及相关信号转导过程中仍有很多尚不清楚,因此寻找促进不同兰科种子萌发的共生真菌、揭示促萌发作用机制,能够为实现兰科植物大规模栽培、资源保护提供理论支持。

5 展望

自然环境下,兰科植物种子需要依赖共生真菌才能完成萌发过程,并与其建立稳定的共生关系。由于市场需求量增加及人为过度挖掘,导致多数野生兰科物种数量急剧减少。寻找更多促进兰科种子萌发共生真菌,研究其多样性、专一性及其共生机制,对利用共生真菌开展兰科植物物种保护及繁育工作具有重大意义。从19世纪发现促进兰科种子萌发共生真菌至今,国内外研究者对兰科植物共生真菌促进种子萌发的研究并未间断过,但所取得的成果仅仅是冰山一角,仍有许多未知的领域需要不断探索。

目前,在兰科共生真菌促进种子萌发方面仍有很多亟需深入探讨的问题:(1)兰科植物种类繁多,虽然它们与促进其种子萌发的共生真菌不一定存在十分严格的专一性,但仍有很多兰科物种未能寻找到合适的促进种子萌发共生真菌。如何快速高效地获得更多兰科种子萌发的共生真菌是

解决兰科植物扩繁保育问题的关键;(2)目前对共生真菌与兰科种子共萌发过程中共生机制尚有许多问题未明确,从分子层面上确定兰科植物共生真菌促进萌发、原球茎发育中一系列过程,挖掘更多参与共萌发调控机制的相关基因,是深入研究共生机制的重要途径之一;(3)国内外对兰科植物、促萌发真菌全基因组研究还十分有限,铁皮石斛、小蝴蝶兰全基因组测序的完成,为深入揭示共萌发机制工作奠定了重要基础,但仍有很多兰科物种亟需结合基因组学深入研究两者之间的共生机制。

参考文献(Reference)

- Alghamdi SA (2019). Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi J Biol Sci*, 26 (3): 495–502
- An MY (2017). Composition of mycorrhizal fungi and symbiotic relationship of *Cypripedium yunnanense*. *Guihaia*, 37 (6): 763–767 (in Chinese with English abstract) [安曼云 (2017). 云南杓兰共生真菌组成及共生关系研究. *广西植物*, 37 (6): 763–767]
- Balestrini R, Nerva L, Sillo F, et al (2014). Plant and fungal gene expression in mycorrhizal protocorms of the orchid *Serapias vomeracea* colonized by *Tulasnella acalospora*. *Plant Signal Behav*, 9 (11): e977707
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, et al (2007). Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationship and alien invasions. *Mycol Res*, 111 (1): 51–61
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ (2006). Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol*, 171 (2): 405–416
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, et al (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Bot J Linn Soc*, 177 (2): 151–174
- Christenhusz MJM, Byng JW (2016). The number of known plant species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261 (3): 201–217
- Chutima R, Dell B, Vessabutr S, et al (2011). Endophytic fungi from *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a threatened terrestrial orchid in Thailand. *Mycorrhiza*, 21 (3): 221–229
- Curtis JT (1939). The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *Am J Bot*, 26: 390–399
- Dearnaley JDW (2007). Further advances in orchid mycorrhizal

- zal research. *Mycorrhiza*, 17: 475–486
- Dong F (2008). Screen several orchid mycorrhizal fungi and preliminary test on the seed germination condition (dissertation). Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese with English abstract) [董芳(2008). 几种兰科植物菌根真菌的筛选及种子萌发条件的研究(学位论文). 北京: 北京林业大学]
- Esnault AL, Masuhara G, McGee PA (1994). Involvement of exodermal passage cells in mycorrhiza infection of some orchids. *Mycol Res*, 98 (6): 672–676
- Fan L, Guo S, Cao W, et al (1996). Isolation, culture, identification and biological activity of *Myceana orchidicola* sp. nov. in *Cymbidium sinense* (orchidaceae). *Acta Mycol Sin*, 15 (4): 251–255 (in Chinese with English abstract) [范黎, 郭顺星, 曹文琴等(1996). 墨兰共生真菌一新种的分离、培养、鉴定及其生物活性. 真菌学报, 15 (4): 251–255]
- Fan L (1997). A fundamental study on mycorrhiza from orchidaceous plants (dissertation). Beijing: Peking Union Medical College (in Chinese with English abstract) [范黎 (1997). 兰科植物菌根的基础研究(学位论文). 北京: 中国协和医科大学]
- Fochi V, Chitarra W, Kohler A, et al (2017). Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella-calospora Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhiza. *New Phytol*, 213: 365–379
- Fracchia S, Silvani V, Flachslan E, et al (2014). Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr., a terrestrial orchid endemic from Argentina. *Mycorrhiza*, 24: 35–43
- Fracchia S, Rickert AA, Flachslan E, et al (2014). Mycorrhizal compatibility and symbiotic reproduction of *Gavilea australis*, an endangered terrestrial orchid from south Patagonia. *Mycorrhiza*, 24: 627–634
- Gebauer G, Meyer M (2003). ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytol*, 160: 209–223
- Guo SX, XU JT (1990a). Studies on the cell ultrastructure in the course of *Gastrodia elata* digesting *Mycena osmundicola* Lange and *Armillaria mellea* FR. *Acta Mycol Sin*, 9 (3): 218–225 (in Chinese with English abstract) [郭顺星, 徐锦堂(1990a). 天麻消化紫萁小菇及蜜环菌过程中细胞超微结构变化的研究. 真菌学报, 9 (3): 218–225]
- Guo SX, Xu JT (1990b). Isolation and culture of fungi promoting seed germination of Shihu etc medicinal plants of orchid family (Orchidaceae). *Chin Tradit Herbal Drugs*, 6: 30–31 (in Chinese with English abstract) [郭顺星, 徐锦堂(1990b). 促进石斛等兰科药用植物种子萌发的真菌分离与培养. 中草药, 6: 30–31]
- Guo SX, Xu JT (1990c). Determination of primary metabolic of fungi promoting seed germination of *Gastrodia elata* Bl. and other Orchidaceae medicinal plants. *Chin J Chin Mater Med*, 15 (6): 12–14 (in Chinese with English abstract) [郭顺星, 徐锦堂(1990c). 促进天麻等兰科药用植物种子萌发的真菌初生产物分析. 中国中药杂志, 15 (6): 12–14]
- Guo SX, Xu JT (1990d). Effects of fungi and its liquid extract on seed germination of *Dendrobium hancockii* Rolf. *Chin J Chin Mater Med*, 15 (7): 13–15 (in Chinese with English abstract) [郭顺星, 徐锦堂(1990d). 真菌及其培养物提取液在细叶石斛种子萌发中的作用. 中国中药杂志, 15 (7): 13–15]
- Guo SX, Xu JT (1991). Studies on the effects of fungi on the course of seed germination of *Dendrobium lohohens* and *Dendrobium candidum*. *Acta Acad Med Sin*, 13 (1): 46–49 (in Chinese with English abstract) [郭顺星, 徐锦堂(1991). 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, 13 (1): 46–49]
- Guo S, Fan L, Cao W, et al (1999). *Mycena dendrobii*, a new mycorrhizal fungus. *Mycosystem*, 18 (2): 141–144
- Guo SX, Cao WQ, Gao WW (2000). Isolation and biological activity of mycorrhizal fungi from *Dendrobium candidum* and *D. nobile*. *Chin J Chin Mater Med*, 25 (6): 338–341 (in Chinese with English abstract) [郭顺星, 曹文琴, 高微微 (2000). 铁皮石斛与金钗石斛共生真菌的分离及其生物活性测定. 中国中药杂志, 25 (6): 338–341]
- Hadley G (1984). Uptake of ^{14}C glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorms. *New Phytol*, 96 (2): 263–273
- Harvais G, Pekkala D (1975). Vitamin production by a fungus symbiotic with orchids. *Can J Bot*, 53: 156–163
- Huang H, Zi XM, Lin H, et al (2018). Host-specificity of symbiotic mycorrhizal fungi for enhancing seed germination, protocorm formation and seedling development of over-collected medicinal orchid, *Dendrobium devonianum*. *J Microbiol*, 56 (1): 42–48
- Jiang J, Zhang K, Cheng S, et al (2019). *Fusarium oxysporum* KB-3 from *Bletilla striate*: an orchid mycorrhizal fungus. *Myzorrhiza*, doi.org/10.1007/s00572-019-00904-3
- Koegel S, Brule D, Wiemken A, et al (2015). The effect of different nitrogen sources on the symbiotic interaction between *Sorghum bicolor* and *Glomus intraradices*: expression of plant and fungal genes involved in nitrogen assimilation. *Soil Biol and Biochem*, 86: 156–163
- Kuga Y, Sakamoto N, Yurimoto H (2014). Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytol*, 202: 594–605

- Leake JR (2004). Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhiza and arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 422–428
- Lee YI, Lee N, Yeung EC, et al (2005). Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination in vitro. *J Am Soc Hortic Sci*, 130 (5): 747–753
- Liebel HT, Gebauer G (2011). Stable isotope signatures confirm carbon and nitrogen gain through ectomycorrhizas in the ghost orchid *Epipogium aphyllum* Swartz. *Plant Biol*, 13 (2): 270–275
- Liu SS, Chen J, Li SC, et al (2015). Comparative transcriptome analysis of genes involved in *GA-GID1-DELLA* regulatory module in symbiotic and asymbiotic seed germination of *Anoetochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. (Orchidaceae). *Int J Mol Sci*, 16: 30190–30203
- Long JRD, Swarts ND, Dixon KW, et al (2013). Mycorrhiza preference promotes habitat invasion by a native Australian orchid: *Microtis media*. *Ann Bot*, 111: 409–418
- Lü X, Li XL, Que YF, et al (2018). Lateral buds germination of *Cremastra appendiculata* and its related gene expression analysis. *Plant Physiol J*, 54 (9): 1467–1474 (in Chinese with English Abstract) [吕亨, 李小兰, 阙云飞等 (2018). 杜鹃兰侧芽萌发及其相关基因表达分析. *植物生理学报*, 54 (9): 1467–1474]
- Manning JC, Van Staden J (1987). The development and mobilization of seed reservation in some African Orchids. *Aus J Bot*, 35: 343–353
- Mehra S, Morrison PD, Coates F, et al (2017). Differences in carbon source utilisation by orchid mycorrhizal fungi from common and endangered species of *Caladenia* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 27: 95–108
- Meng YY, Shao SC, Liu SJ, et al (2019). Do the fungi associated with roots of adult plants support seed germination? A case study on *Dendrobium exile* (Orchidaceae). *Glob Ecol Conse*, 17: e00582
- McKendrick SL, Leake JR, Read DJ (2000). Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhiza *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytol*, 145: 539–548
- McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, et al (2002). Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp.. *New Phytol*, 154: 233–247
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *Am J Bot*, 89 (11): 1852–1858
- Rafter M, Yokoya K, Schofield EJ, et al (2016). Non-specific symbiotic germination of *Cynorkis purpurea* (Thouars) Kraezl., a habitat-specific terrestrial orchid from the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza*, 26: 541–552
- Rasmussen HN, Whigham DF (1993). Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *Am J Bot*, 80 (12): 1374–1378
- Rasmussen HN, Dixon KW, Jersáková J, et al (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Ann Bot*, 116: 391–402
- Shi Z, Chen Y, Liu R (2003). Mycorrhizal diversity and its significance in plant growth and development. *Chin J Appl Ecol*, 14 (9): 1565–1568 (in Chinese with English abstract) [石兆勇, 陈应龙, 刘润进 (2003). 菌根多样性及其对植物生长发育的重要意义. *应用生态学报*, 14 (9): 1565–1568]
- Smith SE (1966). Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol*, 65 (4): 488–499
- Stewart CL, Kane ME (2006). Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 86: 159–167
- Stöckel M, Tešitelová T, Jersáková J, et al (2014). Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytol*, 202: 606–615
- Swangmaneecharern P, Serivichyaswat P, Nontachaiyapoom S (2012). Promoting effect of orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza* isolates on seed germination of *Dendrobium* orchids. *Science Hortic*, 148: 55–58
- Taylor DL, Bruns TD, Szaro TM, et al (2003). Divergence in mycorrhiza specialization within *Hexalecitrisspicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *Am J Bot*, 90 (8): 1168
- Taylor DL, McCormick MK (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytol*, 177: 1120–1033
- Tian JN (2015). Research on diversity of root endophytic fungi and rhizosphere of several orchids (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Forestry (in Chinese with English abstract) [田佳妮 (2015). 几种兰花根际土壤真菌及根内生真菌研究 (学位论文). 北京: 中国林业科学研究院]
- Wang WZ (2017). The obstacle reasons and breaking methods on seed germination of *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino (dissertation). Guiyang: Guizhou University (in Chinese with English abstract) [王汪中 (2017). 杜鹃兰种子萌发障碍原因及其破除方法研究 (学位论文). 贵阳: 贵州大学]
- Warcup (1971). Specificity of mycorrhiza association in some Australian terrestrial orchids. *New Phytol*, 70: 41–46

- Warcup JH (1973). Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. *New Phytol*, 72: 387–392
- Warcup JH (1988). Mycorrhiza associations of isolates of *Sebacinavermitera*. *New Phytol*, 110: 227–231
- Warcup JH (1991). The *Rhizoctonia* endophytes of *Rhizanthella* (Orchidaceae). *Mycol Res*, 95 (6): 656–659
- Wu J, Qian J, Zheng S (2002). A preliminary study on ingredient of secretion from fungi of orchid mycorrhiza. *Chin J Appl Ecol*, 13 (7): 845–848 (in Chinese with English abstract) [吴静萍, 钱吉, 郑师章(2002). 兰花菌根分泌物成分的初步分析. *应用生态学报*, 13 (7): 845–848]
- Wu J, Ma H, Lü M, et al (2010). *Rhizoctonia* fungi enhance the growth of the endangered orchid *Cymbidium goeringii*. *Botany*, 88: 20–29
- Wu JY (2009). Specificity relation between orchidaceae and symbiotic fungi of orchid mycorrhizal (dissertation). Shijiazhuang: Hebei University (in Chinese with English abstract) [武静宇(2009). 兰科菌根真菌与植物专一性关系研究(学位论文). 石家庄: 河北大学]
- Xu JT, Guo SX (1989). Fungus associated with nutrition of seed germination of *Gastrodia elata* – *Mycena osmundicola* Lange. *Acta Mycol Sin*, 8 (3): 221–226 (in Chinese with English abstract) [徐锦堂, 郭顺星(1989). 天麻种子萌发营养的真菌—紫萁小菇. *真菌学报*, 8 (3): 221–226]
- Yagame T, Funabiki E, Nagasawa E, et al (2013). Identification and symbiotic ability of psathyrellaceae fungi isolated from a photosynthetic orchid, *Cremastra appendiculata* (Orchidaceae). *Am J Bot*, 100 (9): 1823–1830
- Yan B, Chen J, Guo SX (2017). Advances in regulating effects of hormones in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol J*, 53 (6): 916–924 (in Chinese with English abstract) [阎波, 陈娟, 郭顺星(2017). 植物菌根共生中的激素调控作用研究进展. *植物生理学报*, 53 (6): 916–924]
- Yan L (2014). The genome of *Dendrobium officinale* illuminates biology of important traditional Chinese herb (dissertation). Changchun: Jilin University (in Chinese with English abstract) [严亮(2014). 中国传统兰科药用植物铁皮石斛基因组及其生物学特性研究(学位论文). 长春: 吉林大学]
- Yang QY (2018). Study on diversity of orchidaceae mycorrhizal fungi and its influence on orchid (dissertation). Beijing: Chinese Academy of Forestry (in Chinese with English abstract) [杨前宇(2018). 兰科菌根真菌多样性研究及其对兰科植物的影响(学位论文). 北京: 中国林业科学研究院]
- Yang YL, Liu ZY, Zhu GS (2008). Study on symbiotic seed germination of *Pleione bulbocodioides* (Franch) Rolfe. *Acta Microbiol Sin*, 35 (6): 909–912 (in Chinese with English abstract) [杨友联, 刘作易, 朱国胜(2008). 独蒜兰种子共生萌发研究. *微生物学通报*, 35 (6): 909–912]
- Youm JJ, Han HK, Chung JM, et al (2012). Identification of orchid mycorrhizal fungi isolated from five species of terrestrial orchids in Korea. *Korean J Mycol*, 40 (3): 132–135
- Yu XM (2000). Studies on the symbiotic mechanisms between *Anoecilus roxburghii* and its endophytic fungi (dissertation). Beijing: Peking Union Medical College (in Chinese with English abstract) [于雪梅(2000). 金线莲与内生真菌相互作用机理研究(学位论文). 北京: 中国协和医科大学]
- Zeng X, Guo S (2018). Cloning and analysis of *SCPL* gene in symbiotic germination of *Gastrodia elata* seed. *Mol Plant Breed*, 16 (13): 4211–4218 (in Chinese with English abstract) [曾旭, 郭顺星(2018). 天麻种子共生萌发中SCPL基因的克隆与分析. *分子植物育种*, 16 (13): 4211–4218]
- Zhao MM, Zhang G, Song C, et al (2013). Construction of an SSH cDNA library from symbiotic germinated seeds of *Dendrobium officinale* and sequence analysis. *Chin Pharmacol J*, 48 (5): 341–345 (in Chinese with English abstract) [赵明明, 张岗, 宋超等(2013). 铁皮石斛种子接菌共生萌发抑制差减杂交文库的构建及序列分析. *中国药理学杂志*, 48 (5): 341–345]
- Zhang G, Zhao MM, Zhang DW, et al (2013). Reference gene selection for real-time quantitative PCR analysis of *Dendrobium officinale*. *Chin J Chin Mater Med*, 48 (19): 1664–1668 (in Chinese with English abstract) [张岗, 赵明明, 张大为等(2013). 铁皮石斛实时定量PCR内参基因的筛选. *中国中药杂志*, 48 (19): 1664–1668]
- Zhang J, Wang C, Guo S, et al (1999). Studies on the plant hormones produced by 5 species of endophytic fungi isolated from medicinal plants (Orchidaceae). *Acta Acad Med Sine*, 21 (6): 460–465 (in Chinese with English abstract) [张集慧, 王春兰, 郭顺星等(1999). 兰科药用植物的5种内生真菌产生的植物激素. *中国医学科学院学报*, 21 (6): 460–465]
- Zhao MM, Zhang G, Zhang DW, et al (2013). ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale*. *PLoS ONE*, 8 (8): e72705
- Zhu GS (2009). Establishment of a rice enhancer trap mutant library by t-DNA insertion (dissertation). Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [朱国胜(2009). 贵州特色药用兰科植物杜鹃兰和独蒜兰共生真菌研究与应用(学位论文). 武汉: 华中农业大学]
- Zi XM, Sheng CL, Goodale UM, et al (2014). In situ seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 24: 487–499

Advances on orchid symbiotic fungi promoting seeds germination

GAO Yanyan, HANG Ye, LIU Jiandong, LI Yang, LIU Zhi, LI Lin, TIAN Hailu, ZHANG Mingsheng*

School of Life Sciences, Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Orchidaceae seeds are tiny, without endosperm and must depend on suitable mycorrhizal fungi for carbon nutrients, nitrogen, water and other nutrient sources to germinate in natural conditions. Research progress of the development of endophytic fungi on seed germination, a various of endophytic fungi on seed germination and the nutrition relationship between nutrition sources and endophytic fungi are reviewed to provide a reference for orchid plant rapid propagation and conversation.

Key words: orchid plant; endophytic fungi; seeds germination

Received 2019-09-16 Accepted 2019-11-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81660627), the Science and Technology Program in Guizhou (2017-5788), the Project of High-level Innovative Talents in Guizhou (Grant No. 2015-4031), and the Special Fund of Science and Technology Innovation Talent Team Construction in Guizhou (2016-5624).

*Corresponding author (mshzhang@163.com).