论文

胶膜菌属真菌S7(*Tulasnella* sp.)及提取物对铁皮石斛种子萌发的影响

杨建文¹, 陈晓梅^{1*}, 孟志霞¹, 朱卫东², 单婷婷¹, 黄庆², 周丽思¹, 郭顺星^{1*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 浙江寿仙谷医药股份有限公司, 金华 321200

* 联系人, E-mail: cxm_implad@163.com; sxguo@implad.ac.cn

收稿日期: 2019-12-30; 接受日期: 2020-03-09; 网络版发表日期: 2020-04-02

中国医学科学院医学与健康科技创新工程(批准号: 2017-I2M-3-013)和国家自然科学基金(批准号: 81573526)资助

摘要 兰科植物种子细小, 无胚乳, 自然条件下依赖共生的真菌为其提供营养实现种子萌发。前期研究表明, 在燕麦琼脂(oatmeal agar, OMA)培养基上与兰科铁皮石斛种子共生培养时, 胶膜菌属真菌S7(*Tulasnella* sp.)能促进种子萌发。本文用S7培养物在6种基质上进行播种实验, 考察S7的田间使用效果; 将S7提取物分别加入OMA和MS培养基中, 考察S7提取物对铁皮石斛种子萌发的影响。研究发现: (i) 不使用S7, 种子在3种基质上能够出芽, 最高出芽率为 $1.96\% \pm 1.26\%$, 在1种基质上能形成幼苗, 最高成苗率为 $0.96\% \pm 1.07\%$ 。使用S7, 种子在6种基质上都能够出芽并形成幼苗; 种子在泥炭土: 锯末(1:1)基质上的萌发效果最好, 出芽率和成苗率分别达到 $26.68\% \pm 6.26\%$ 和 $20.97\% \pm 6.93\%$ 。这些结果验证了S7具有促进铁皮石斛种子萌发作用, 可应用于田间播种, 同时说明播种基质能够影响S7的作用。(ii) OMA培养基中添加高浓度S7菌丝体提取物后, 培养50天形成原球茎, 比对照组提前了20天; 60天时形成叶片, 对照组原球茎未见继续发育; 培养80天种子萌发率为 $54.90\% \pm 2.46\%$, 与对照组相比提高了 57.6% ($P < 0.05$), 出芽率为 $9.11\% \pm 4.17\%$, 对照组仅为 $0.41\% \pm 0.38\%$ 。这些结果提示, S7菌丝体提取物中含有可以促进种子萌发与原球茎发育的物质。本研究为进一步探索该菌的实际应用价值, 并探索共生真菌中促进兰科种子萌发的活性代谢产物奠定了基础, 为兰科种子共生萌发的机制研究开拓了新的思路。

关键词 铁皮石斛, 胶膜菌属, 田间播种, 真菌提取物

兰科(Orchidaceae)包括763属28000多种植物, 是被子植物中数量最多、进化程度最高的家族之一^[1]。兰科植物种子细小, 无胚乳, 只有分化不完全的原胚, 胚中储存的营养不足, 在自然条件下, 必须与合适的真菌建立共生关系, 由真菌提供碳水化合物等营养物质

才能够完成种子萌发, 此过程又被称为共生萌发(symbiotic germination)^[2,3], 能够促进种子萌发的真菌被称为萌发菌。

共生萌发现象一直是兰科植物研究的热点。根据现有报道, 担子菌门(Basidiomycota)的蜡壳耳目(Seba-

引用格式: 杨建文, 陈晓梅, 孟志霞, 等. 胶膜菌属真菌S7(*Tulasnella* sp.)及提取物对铁皮石斛种子萌发的影响. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 559–570
Yang J W, Chen X M, Meng Z X, et al. Effects of *Tulasnella* sp. S7 and its extract on *Dendrobium officinale* seed germination (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 559–570, doi: 10.1360/SSV-2019-0305

cinales)、胶膜菌科(Tulasnellaceae)和角担菌科(Cerato-basidiaceae)是主要的兰科萌发菌类群^[4]; 其中, 胶膜菌科胶膜菌属(*Tulasnella*)的多株真菌能促进石斛属植物种子萌发^[5,6], 是具有一定专属性的萌发菌类群。发掘萌发菌的生产应用价值和探讨共生萌发的作用机理是研究者普遍关注的两个重点。在萌发菌的开发利用方面, 由于对兰科植物种子与萌发菌之间的互作关系缺乏了解, 目前萌发菌的使用主要限于实验研究, 光合自养型兰科植物仍然依赖组织培养技术生产种苗, 无法田间播种生产。组培生产种苗的过程不仅能耗高, 成本高, 生产的种苗还存在环境适应性差, 移栽后生长缓慢, 且成活率低等问题^[7,8]。这已成为制约兰科植物资源再生和可持续利用的瓶颈。在共生萌发机理方面, 目前的报道主要集中在共生萌发的分子和形态机制研究方面^[9]。Li等人^[10]报道, 在铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)种子与胶膜菌属菌株S6共生萌发的过程中, 种子细胞壁上富含羟脯氨酸的糖蛋白能识别萌发菌, 并帮助植物建立共生隔离, 将真菌的感染和定殖限制在原球茎基部的皮层细胞内。郭顺星和徐锦堂^[11]报道, 外源添加萌发菌提取物可以使细叶石斛(*D. hancockii* Rolfe)种子在湿海绵上的无菌萌发率达到40%~70%。对真菌化学成分的研究表明, 真菌能够产生糖、氨基酸、蛋白质等多种代谢产物^[12,13]。但与兰科植物种子萌发活性物质相关的研究报道至今还很少见。除激素类成分^[14]外, 未见有对胶膜菌属真菌其他化学成分的研究。分析萌发菌的代谢产物, 研究其促萌发作用的活性物质, 将有助于人们了解共生萌发的物质基础。

铁皮石斛为兰科石斛属多年生附生草本植物, 其干燥茎入药, 具有益胃生津, 滋阴清热的功效, 为我国传统名贵中药。现代药理学研究证明, 铁皮石斛具有增强免疫力, 延缓衰老等作用^[15,16]。胶膜菌属真菌*S7(Tulasnella sp.)*为本课题组前期分离获得的1株铁皮石斛萌发菌。铁皮石斛种子与*S7*共生萌发能缩短萌发周期, 并显著提高萌发率^[5]。在此基础上, 本研究将*S7*与铁皮石斛种子一起播种, 考察其田间使用效果, 为利用*S7*生产铁皮石斛种苗提供了科学依据; 将*S7*提取物加入培养基中, 考察其对种子萌发的影响, 为共生萌发的物质基础研究奠定基础, 以进一步挖掘其促萌发的活性物质。

1 材料与方法

1.1 生物材料

铁皮石斛种子。2018年11月从浙江省金华市购买铁皮石斛蒴果。部分蒴果室温放置, 待果荚自然干燥开裂, 收集种子, 均匀混合, 置干燥器中室温保存, 用于田间播种。部分果荚经过表面消毒处理^[10], 收取无菌种子, 4℃保存, 用于*S7*提取物影响种子萌发的研究。

菌株*S7*。分离自金钗石斛根部, 经鉴定为*Tulasnella sp.*, 由中国医学科学院药用植物研究所生物技术中心保藏^[5]。保藏菌种经过PDA(potato dextrose agar)平板活化: (i) 接种至麦麸固体培养基, 24~26℃暗培养50~60 d; (ii) 接种至麦麸液体培养基, 24~26℃振荡暗培养21 d, 摇床转速120 r/min。(麦麸固体培养基组成: 麦麸: 锯末体积比1:1, 含水量60%~70%; 麦麸液体培养基组成: 麦麸3%, 葡萄糖2%, KH_2PO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, pH自然。)

1.2 田间播种

(1) 种子计数。播种前精密称取室温保存的种子10.0 mg, 分散在50 mL蒸馏水中, 摇匀后快速吸取100 μL 混悬液, 滤纸吸干水分, 体视镜下计数种子数量, 重复6次, 计算均值。种子数量=均值 $\times$ 500。以上操作重复3次。本文实验中, 10.0 mg铁皮石斛种子的数量约为1.5万粒。

(2) 种子萌发能力检测。播种前取适量种子3份, 进行以下平行操作: 1% NaClO表面消毒45 s, 无菌水冲洗3次, 播种在 Φ 90 mm的MS培养基平板上, 播种量100~150粒/皿, 重复6皿。培养皿置于光培养室培养, 光照周期为12 h/12 h(光/暗), 光照强度为1500~2000 lx, 温度为24~26℃^[10]。从播种第2周开始, 每2周用体视镜观察计数一次, 计算萌发率和出芽率。第18周结束观察。

根据Stewart等人^[17]的报道, 将铁皮石斛种子萌发分为6个级别: 0级, 未萌发; 1级, 种胚吸水膨大; 2级, 种胚膨大, 种皮破裂(萌发); 3级, 出现顶端分生组织, 即形成原球茎(出芽); 4级, 顶端分生组织继续生长, 伸长并弯曲, 出现第一片叶; 5级, 第一片叶伸长并继续生长, 并出现第二片叶。种子萌发形成原球茎, 就具有了进一步发育成苗的潜力。(萌发率(germination rate, GR)=2级及以上种子数量/播种量 $\times$ 100%^[18], 出芽率(bud ra-

tio, BR)=3级及以上种子数量/播种量 $\times 100\%$.)

(3) 播种基质与播种方法. 2018年11月29日播种. 播种基质6种, 组成及体积比分别为: 1#, 为基础基质, 泥炭土:锯末(1:1); 2#, 泥炭土:锯末:珍珠岩(1:1:0.5); 3#, 泥炭土:锯末:蛭石(1:1:0.5); 4#, 为基础基质, 泥炭土:竹屑(1:1); 5#, 泥炭土:竹屑:珍珠岩(1:1:0.5); 6#, 泥炭土:竹屑:蛭石(1:1:0.5). 苗盘规格: 70 cm $\times$ 70 cm $\times$ 8 cm. 苗盘底层铺4~5 cm碎松树皮, 上面铺3~4 cm播种基质. S7固体培养物用量: 15.0 g/盘. 培养物等量分装, 均匀撒在6种播种基质上, 作为6个处理组(T). 以不加S7固体培养物的播种基质作为6个对照组(CK). 每种处理重复4盘. 种子播种量: 20.0 mg/盘. 种子按80.0 mg/包等量分装. 1包种子以1.5 L水分散后均匀喷洒在4盘播种基质上.

将苗盘置于浙江省武义县浙江寿仙谷医药股份有限公司种植基地的连栋大棚内, 苗盘上搭塑料拱棚保

温保湿, 拱棚宽1.4 m, 高0.8 m(图1). 使用精创GSP-6温湿度记录仪自动记录温度和相对湿度, 探头置于苗盘上方5~10 cm处, 记录间隔1 h. 根据记录计算日均温度和日均相对湿度. 大棚采用自然光照, 光照过强时加1~2层70%遮阳网, 控制光照强度低于15000 lx.

(4) 计数方法. 第一次观察计数时间为2019年4月11日, 即播种133天. 之后约每个月计数1次, 时间分别是播种163天, 197天, 228天, 261天, 286天和322天, 至2019年10月17日结束观察, 合计数7次. 按每月30天计算, 将播种时间单位换算为“月”, 观察计数时间分别为4.43月、5.43月、6.57月、7.60月、8.70月、9.53月和10.73月. 将未形成完整叶片的原球茎(protocolorms)和已形成完整叶片的幼苗(seedlings)分别计数(图2A). 计数时, 在38 cm $\times$ 16 cm硬纸上划出3个7 cm $\times$ 7 cm的方框, 随机放在苗盘上(图2B), 计数各方框内的原球茎数量和幼苗数量, 二者之和为出芽(buds)数量. 每个苗盘

图1 种子田间播种的生长环境. A: 放置在连栋大棚内的苗盘; B: 搭建在苗盘上的塑料拱棚(网络版彩图)

Figure 1 Growth environment after sowing. A: Seedling-raising plates in a multispan plastic greenhouse; B: plastic tunnel over seedling-raising plates (color online)

图2 种子田间播种萌发与计数. A: 播种6.57个月的T-1#组, 基质为泥炭土:锯末(1:1), 加S7, 示原球茎与幼苗, 标尺=1 cm; B: 计数方框(网络版彩图)

Figure 2 Seed germination and counting method after sowing in a field experiment. A: Protocorms and seedlings after sowing 6.57 months in T-1#, the medium comprised peat soil and pine sawdust in a 1:1 ratio, with S7 added, Scale bar=1 cm; B: square boxes for counting (color online)

均重复上述操作3次, 采集到9个方框的幼苗数量和出芽数量, 计算每个苗盘的播种出芽率和成苗率。(播种出芽率(sowing bud ratio, SBR)=9个方框出芽数量之和/0.09/30000×100%; 成苗率(percentage of seedling emergence, PSE)=9个方框幼苗数量之和/0.09/30000×100%.)

1.3 含S7提取物培养基上的种子萌发

(1) S7提取物的制备. 田间播种后第一次观察已发现S7可以显著促进种子萌发. 在此基础上研究S7提取物对种子萌发的影响. S7液体培养结束后, 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. 干燥菌丝体用20倍甲醇回流提取3次, 回收溶剂, 制得菌丝体提取物(mycelium extract, ME), 得率约20%. 发酵液减压浓缩, 加入乙醇至醇浓度80%, 4℃放置过夜, 取上清液, 回收乙醇, 制得发酵液提取物(fermentation extract, FE), 得率约0.3%. 灭菌后的麦麸液体培养基, 按照FE制备方法, 制得麦麸培养基提取物(wheat bran medium extract, WE), 得率约1.2%.

(2) S7提取物的添加. FE以超纯水溶解, 稀释为2个浓度, 经0.22 μm过滤除菌, 加入燕麦琼脂(oatmeal agar, OMA)培养基^[5]中, 终浓度分别为0.5 g/L和2.0 g/L, 编号OMFL和OMFH. 由于ME难溶于水, 因此以50%甲醇水溶液溶解, 并稀释为2个浓度, 过滤除菌后加入OMA培养基中, 终浓度分别为0.256 g/L和1.020 g/L, 编号OMML和OMMH. 同法制备含FE和ME的MS培养基, 终浓度分别为FE 0.5 g/L和ME 0.256 g/L, 编号MSFL和MSML.

分别在OMA和MS培养基中加入对应体积的超纯水(OMCK1和MSCK1)和50%甲醇水溶液(OMCK2和MSCK2), 作为空白溶剂对照. OMCK2和MSCK2中甲醇浓度0.4 mL/L. 分别制备含WE的OMA和MS培养基, 终浓度均为0.5 g/L, 编号OMCK3和MSCK3, 作为培养基提取物对照.

(3) 播种与计数方法. 4℃保存的无菌种子, 分散在无菌水中, 振荡混悬. 快速吸取种子混悬液铺洒在上述各组培养基平板表面, 播种量100~150粒/皿, 重复6皿, 置于“1.2 (2)种子萌发能力检测”相同条件下培养.

从培养第10天开始, 每10天用体视镜观察一次, 记

录不同萌发级别的种子数量, 计算萌发率. 至萌发率停止增加, 结束观察. 种子萌发分级标准以及萌发率和出芽率的计算方法同“1.2 (2)种子萌发能力检测”. 3级萌发率=3级种子的数量/播种量×100%. 4级和5级萌发率计算方法同3级萌发率.

1.4 统计分析

用SPSS 19.0软件对数据进行分析, 两组间比较采用独立样本 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 S7对铁皮石斛种子田间播种的影响

(1) 田间播种种子的萌发能力. MS培养基上6个萌发级别的铁皮石斛种子如图3所示. 播种第4周能观察到2级萌发的种子, 第6周能观察到3级萌发的种子. 播种第10周和第18周的萌发率之间已经没有显著差异($P>0.05$), 分别为90.00%±2.89%和90.41%±1.94%; 出芽率之间有显著差异($P<0.05$), 分别为24.37%±2.24%和80.33%±3.30%. 该结果表明, 用于田间播种的种子萌发能力良好.

(2) 对田间播种出芽的影响. 图4为计数期间的日均温度和日均相对湿度散点图. 计数期间日均温度13.6~30.5℃, 日均相对湿度58.3%~99.9%. 利用SPSS软件分别对日均温度和日均相对湿度(y)与播种时间(月)(x)的关系进行二次曲线拟合, 温度模型具有统计意义($P<0.01$), 模型表达式: $y=-0.8720x^2+14.0023x-29.5507$, $R^2=0.642$; 相对湿度模型没有统计意义($P>0.05$). 根据日均温度模型表达式计算, 播种后8.0月日均温度达到最高值.

不使用S7, 能观察到种子在基质2#, 3#和5#上出芽; CK-2#组6.57月的播种出芽率最高, 为1.96%±1.26%(表1). CK-3#和CK-5#组仅分别在7.60月和4.43月时观察到种子出芽, 播种出芽率分别为0.01%±0.02%和0.02%±0.05%. 使用S7后, 种子在6种基质上均能出芽(图5); 出芽效果最好的是T-1#和T-3#组, 均在7.60月达到播种出芽率最高值, 分别是26.68%±6.26%和23.87%±6.14%.

比较S7在1#和4#两种基础基质上的作用. T-1#组最高播种出芽率显著高于T-4#组($P<0.05$), 两组分别是

图3 体视镜下铁皮石斛种子的6个萌发级别. A: 0级; B: 1~3级; C: 4~5级. 标尺=0.5 mm(网络版彩图)

Figure 3 Six stages of *Dendrobium officinale* seed germination under a stereoscope. Stages (A) 0, (B) 1–3, and (C) 4 and 5. Scale bar=0.5 mm (color online)

图4 田间播种计数期间生长环境的温、湿度散点图和拟合曲线

Figure 4 Scatter plots and fitting curve of temperature and relative humidity of the growth environment during counting in a field experiment

26.68%±6.26%和11.77%±4.88%(图5A), 表明S7在基质1#上的促种子萌发作用较基质4#的好. 基质2#和3#是在1#的基础上分别加入珍珠岩和蛭石. T-3#组播种出芽率与T-1#组没有显著差异($P>0.05$); T-2#组播种出芽率显著低于T-1#组($P<0.05$)(图5B). 基质5#和6#与基质4#的比较也能获得相似的结果(图5C). 这些结果表明, 基质中的蛭石基本不影响S7的作用, 而珍珠岩对S7的作用有影响.

利用SPSS软件对CK-2#组和6个处理组的播种出芽率均值(y)与播种时间(月)(x)的关系进行二次曲线拟合, CK-2#组模型没有统计意义($P>0.05$), 6个处理组模型均有统计意义, 模型表达式和相关系数等见表2, 拟合曲线见图6. 根据模型表达式计算各处理组达到最高

出芽率的时间. T-1#, T-2#和T-3#组出芽持续时间最长, 分别持续到播种后8.1月、8.0月和7.8月; T-4#, T-5#和T-6#组出芽持续时间短, 分别持续到7.0月、6.0月和6.4月. 这些结果提示, 萌发菌S7在泥炭土-锯末为主的基质上能更持久地发挥作用. 此外, 根据计算获得的T-1#, T-2#和T-3#组达到播种出芽率最高值的时间与日均温度达到最高值的时间非常接近, 据此推测, 在以泥炭土-锯末为基础的播种基质上, 气温降低可能是导致后期播种出芽率下降的原因之一.

(3) 对田间播种成苗的影响. 不使用S7, 只有在基质2#上出芽的种子能够继续分化发育, 形成幼苗; CK-2#组成苗率最高为0.96%±1.07%(表1). 使用S7后, 6种基质上出芽的种子都能够继续分化发育, 形成幼苗(图7). 与播种出芽率结果相似, 种子在基质1#和3#上的成苗效果最好, 均在9.53月达到成苗率最高值, 分别达到20.97%±6.93%和18.73%±7.18%, 结果没有显著差异($P<0.05$); 加入珍珠岩的T-2#组成苗率显著低于T-1#组($P<0.05$), 珍珠岩对成苗有影响. 利用SPSS软件对CK-2#组和6个处理组的成苗率均值(y)与播种时间(月)(x)的关系进行二次曲线拟合, 模型均没有统计意义($P>0.05$).

2.2 S7提取物对铁皮石斛种子萌发与发育的影响

(1) 对种子萌发的影响. MSCK1组萌发速度快, 萌发率在20天时即达到54.35%±2.47%, 最高为67.97%±1.14%(图8A). MS培养基加入甲醇会抑制种子萌发. MSCK2组最高萌发率为48.69%±5.14%, 与MSCK1组的最高萌发率相比降低了38%($P<0.05$). MS培养基中加入WE对萌发率没有影响.

图5 田间播种实验加S7的处理组的播种出芽率折线图. A: T-1#和T-4#组, 基质分别为泥炭土:锯末(1:1)和泥炭土:竹屑(1:1); B: T-1#, T-2#和T-3#组, T-2#和T-3#组基质分别为泥炭土:锯末:珍珠岩(1:1:0.5)和泥炭土:锯末:蛭石(1:1:0.5); C: T-4#, T-5#和T-6#组, T-5#和T-6#组基质分别为泥炭土:竹屑:珍珠岩(1:1:0.5)和泥炭土:竹屑:蛭石(1:1:0.5). *: 相同时间两组相比有显著差异($P<0.05$); ^: 相同时间与T-1#组相比有显著差异($P<0.05$); #: 相同时间与T-4#组相比有显著差异($P<0.05$)(网络版彩图)

Figure 5 Line charts of the SBR of S7 treatment groups in a field experiment. A: T-1# and T-4#; the medium comprised peat soil and pine sawdust in a 1:1 ratio and peat soil and bamboo sawdust in a 1:1 ratio, respectively; B: T-1#, T-2#, and T-3#; the medium of T-2# and T-3# comprised peat soil, pine sawdust, and perlite in a 1:1:0.5 ratio and peat soil, pine sawdust, and vermiculite in a 1:1:0.5 ratio, respectively; C: T-4#, T-5#, and T-6#; the medium of T-5# and T-6# comprised peat soil, bamboo sawdust, and perlite in a 1:1:0.5 ratio and peat soil, bamboo sawdust, and vermiculite in a 1:1:0.5 ratio, respectively. *: Significant difference between the two groups at the same time ($P<0.05$); ^: significant difference compared to T-1# at the same time ($P<0.05$); #: significant difference compared to T-4# at the same time ($P<0.05$) (color online)

表1 田间播种CK-2#组的播种出芽率与成苗率

Table 1 The SBR and PSE of CK-2# in a field experiment

时间(月)	4.43	5.43	6.57	7.60	8.70	9.53	10.73
播种出芽率(%)	0.31±0.26	1.77±1.57	1.96±1.26	1.94±1.79	0.92±0.83	0.45±0.32	0.21±0.37
成苗率(%)	—	—	0.24±0.34	0.96±1.07	0.22±0.30	0.45±0.31	0.10±0.09

注: CK-2#组基质为泥炭土:锯末:珍珠岩(1:1:0.5), 不加S7

图6 田间播种实验添加S7的处理组播种出芽率与播种时间的拟合曲线. A: T-1#, T-2#和T-3#组; B: T-4#, T-5#和T-6#组(网络版彩图)

Figure 6 SBR-growth time fitting curves of S7 treatment groups in a field experiment. A: T-1#, T-2#, and T-3#; B: T-4#, T-5#, and T-6# (color online)

MSML组最高萌发率为 $47.89\% \pm 4.18\%$ (图8B), 与MSCK2组没有显著差异($P>0.05$), 但20 d时萌发率即达到 $45.07\% \pm 2.59\%$, 显著高于此时的MSCK2组萌发

率($P<0.05$). 与MSML组相似, MSFL组最高萌发率与MSCK3组没有显著差异(图8C), 但10天时萌发率显著高于MSCK3组($P<0.05$). 这些结果提示在MS培养基

表 2 田间播种实验加S7的处理组播种出芽率与播种时间拟合曲线的模型表达式**Table 2** Model expressions of SBR-growth time fitting curves of S7 treatment groups in a field experiment

组别	模型表达式	<i>P</i>	相关系数 R^2	组别	模型表达式	<i>P</i>	相关系数 R^2
T-1#	$y=-0.0163x^2+0.2642x-0.8126$	<0.01	0.951	T-4#	$y=-0.0077x^2+0.1073x-0.2647$	<0.05	0.889
T-2#	$y=-0.0074x^2+0.1046x-0.2316$	<0.01	0.898	T-5#	$y=-0.0012x^2+0.0143x-0.0240$	<0.05	0.801
T-3#	$y=-0.0139x^2+0.2182x-0.6357$	<0.01	0.916	T-6#	$y=-0.0029x^2+0.0370x-0.0628$	<0.01	0.905

注: T-1#组基质为泥炭土:锯末(1:1); T-2#组基质为泥炭土:锯末:珍珠岩(1:1:0.5); T-3#组基质为泥炭土:锯末:蛭石(1:1:0.5); T-4#组基质为泥炭土:竹屑(1:1); T-5#组基质为泥炭土:竹屑:珍珠岩(1:1:0.5); T-6#组基质为泥炭土:竹屑:蛭石(1:1:0.5)

图 7 田间播种实验加S7的处理组的成苗率折线图. A: T-1#和T-4#组; B: T-1#, T-2#和T-3#组; C: T-4#, T-5#和T-6#组. *: 相同时间两组相比有显著差异($P<0.05$); ^: 相同时间与T-1#组相比有显著差异($P<0.05$); #: 相同时间与T-4#组相比有显著差异($P<0.05$) (网络版彩图)

Figure 7 PSE line charts of S7 treatment groups in a field experiment. A: T-1# and T-4#; B: T-1#, T-2#, and T-3#; C: T-4#, T-5#, and T-6#. *, Significant difference between the two groups at the same time ($P<0.05$); ^: significant difference compared to T-1# at the same time ($P<0.05$); #: significant difference compared to T-4# at the same time ($P<0.05$) (color online)

上, ME和FE可能对种子萌发的早期事件有影响.

在营养贫瘠的OMA培养基上, OMCK1组最高萌发率为 $54.81\%\pm 1.65\%$, 只有MSCK1组的 81% ($P<0.05$) (图9A). OMA培养基加入甲醇(OMCK2组)也会抑制种子萌发. 添加WE的OMCK3组最高萌发率与OMCK1组没有显著差异($P>0.05$), 但10~40 d的萌发率均显著高于OMCK1组($P<0.05$), 推测WE中含有一些营养成分, 有利于种子快速萌发.

较高浓度ME能显著促进OMA培养基上种子的萌发(图9B). OMMH组萌发率一直显著高于OMCK2组 ($P<0.05$), 最高萌发率为 $54.90\%\pm 2.46\%$, 是OMCK2组的1.6倍, 与OMCK1组的水平相当, 提示ME中含有促进种子萌发的成分. 与ME相反, 提高FE浓度显著抑制OMA培养基上种子的萌发(图9C). OMFH组的最高萌发率为 $31.54\%\pm 1.08\%$, 只达到OMCK3组的 56% ($P<0.05$).

(2) 对原球茎发育的影响. 本文中, 铁皮石斛种子田间播种后观察到原球茎, 是判断种子出芽的依据. 与

田间播种相比, MS培养基上种子萌发出原球茎的时间短, 原球茎发育速度快. MSCK1组20 d出现原球茎, 30 d长出第一片叶, 为4级萌发, 60 d长出第二片叶, 为5级萌发. MSCK1组最高出芽率为 $61.94\%\pm 1.02\%$, 5级萌发率 $34.20\%\pm 0.88\%$ (图10A). 含甲醇的MS培养基上原球茎发育也受到抑制(图10B). MSCK2组最高出芽率和5级萌发率均显著低于MSCK1组($P<0.05$). MS培养基中加入WE基本不影响原球茎的发育(图10C).

MS培养基加入ME不影响原球茎发育(图10D). 加入FE使原球茎发育变慢(图10E). 尽管80 d时MSFL组出芽率与MSCK3组没有显著差异($P>0.05$), 但5级萌发率显著低于MSCK3组($P<0.05$), 分别为 $25.64\%\pm 1.34\%$ 和 $32.74\%\pm 2.26\%$.

与MS培养基相比, OMA培养基上原球茎发育慢, 观察期内3个对照组都没有4级萌发的种子. OMCK1组70 d出现原球茎, 出芽率最高为 $0.43\%\pm 0.74\%$ (图11A). OMCK2组出芽率与OMCK1组没有显著差异 ($P>0.05$) (图11B). OMCK3组60 d出现原球茎, 且最高

图 8 MS培养基上各提取物组的萌发率折线图。A: MSCK1, MSCK2和MSCK3组, MSCK2和MSCK3组的甲醇和麦麸培养基提取物浓度分别为0.4 mL/L和0.5 g/L; B: MSCK2和MSML组, MSML组的甲醇和菌丝体提取物浓度分别为0.4 mL/L和0.256 g/L; C: MSCK3和MSFL组, MSFL组的发酵液提取物浓度0.5 g/L。*: 相同时间与MSCK1组相比有显著差异($P<0.05$); ^: 相同时间与MSCK2组相比有显著差异($P<0.05$); #: 相同时间与MSCK3组相比有显著差异($P<0.05$)(网络版彩图)

Figure 8 Line charts of germination rate of extract groups in MS medium. A: MSCK1, MSCK2, and MSCK3; the concentration of methanol and WE in MSCK2 and MSCK3 was 0.4 mL/L and 0.5 g/L, respectively; B: MSCK2 and MSML; the concentration of methanol and ME in MSML was 0.4 mL/L and 0.256 g/L, respectively; C: MSCK3 and MSFL; the concentration of FE in MSFL was 0.5 g/L. *: Significant difference compared to MSCK1 at the same time ($P<0.05$); ^: significant difference compared to MSCK2 at the same time ($P<0.05$); #: significant difference compared to MSCK3 at the same time ($P<0.05$) (color online)

图 9 OMA培养基上各提取物组的萌发率折线图。A: OMCK1, OMCK2和OMCK3组, OMCK2和OMCK3组的甲醇和WE浓度分别为0.4 mL/L和0.5 g/L; B: OMCK2, OMML和OMMH组, OMML和OMMH组的ME浓度分别为0.256 g/L和1.020 g/L, 甲醇浓度均为0.4 mL/L; C: OMCK3, OMFL和OMFH组, OMFL和OMFH组的FE浓度分别为0.5 g/L和2.0 g/L。*: 相同时间与OMCK1组相比有显著差异($P<0.05$); ^: 相同时间与OMCK2组相比有显著差异($P<0.05$); #: 相同时间与OMCK3组相比有显著差异($P<0.05$)(网络版彩图)

Figure 9 Line charts of germination rate of extract groups in OMA medium. A: OMCK1, OMCK2, and OMCK3; the concentration of methanol and WE in OMCK2 and OMCK3 was 0.4 mL/L and 0.5 g/L, respectively; B: OMCK2, OMML, and OMMH; the concentration of ME in OMML and OMMH was 0.256 g/L and 1.020 g/L, respectively, and of methanol was 0.4 mL/L for both; C: OMCK3, OMFL, and OMFH; the concentration of FE in OMFL and OMFH was 0.5 g/L and 2.0 g/L, respectively. *: Significant difference compared to OMCK1 at the same time ($P<0.05$); ^: significant difference compared to OMCK2 at the same time ($P<0.05$); #: significant difference compared to OMCK3 at the same time ($P<0.05$) (color online)

出芽率与OMCK1组有显著差异($P<0.05$), 推测是WE中营养成分的作用(图11C)。

与OMA培养基上萌发率的结果相似, 较高浓度ME的OMMH组原球茎发育快, 在50 d出现原球茎, 60 d出现4级萌发的种子, 是种子萌发能够达到4级的唯一一个组。OMMH组最高出芽率为 $9.11\% \pm 4.17\%$, 较OMCK2组有显著提高($P<0.05$) (图11E, 图12), 提示ME中含有促进原球茎分化发育的成分。较高浓度FE的OMFH组没有种子进入3级萌发阶段, 形成原球茎

(图11G)。

3 讨论

3.1 将S7用于铁皮石斛田间播种的可行性

种子萌发过程对真菌的高度依赖是导致兰科植物自然繁殖率低, 资源再生困难的重要原因之一。目前, 石斛属、蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*)和香荚兰属(*Vanilla*)等光合自养型兰科植物已经能够商业化生产^[19]。它们

图 10 MS培养基上各提取物组的3~5级萌发率柱形图. A: MSCK1组; B: MSCK2组; C: MSCK3组; D: MSML组; E: MSFL组. *: 相同时间与MSCK1组相比有显著差异($P<0.05$); ^: 相同时间与MSCK2组相比有显著差异($P<0.05$); #: 相同时间与MSCK3组相比有显著差异($P<0.05$)

Figure 10 Bar diagrams of germination percentage in stages 3–5 of extract groups in MS medium. A: MSCK1; B: MSCK2; C: MSCK3; D: MSML; E: MSFL. *: Significant difference compared to MSCK1 at the same time ($P<0.05$); ^: significant difference compared to MSCK2 at the same time ($P<0.05$); #: significant difference compared to MSCK3 at the same time ($P<0.05$)

图 11 OMA培养基上各提取物组的3~5级萌发率柱形图. A: OMCK1; B: OMCK2; C: OMCK3; D: OMML; E: OMMH; F: OMFL; G: OMFH. *: 相同时间与OMCK1组相比有显著差异($P<0.05$); ^: 相同时间与OMCK2组相比有显著差异($P<0.05$); #: 相同时间与OMCK3组相比有显著差异($P<0.05$)

Figure 11 Bar diagrams of germination percentage in stages 3–5 of extract groups in OMA medium. A: OMCK1; B: OMCK2; C: OMCK3; D: OMML; E: OMMH; F: OMFL; G: OMFH. *: Significant difference compared to OMCK1 at the same time ($P<0.05$); ^: significant difference compared to OMCK2 at the same time ($P<0.05$); #: significant difference compared to OMCK3 at the same time ($P<0.05$)

的人工繁殖需要经过两个步骤: 先通过组培快繁获得大量种苗, 包括实生苗或无性苗, 然后将种苗移栽温室或大田生长^[20]. 铁皮石斛的种苗生产包含了无菌萌发、诱导分化、继代、生根、壮苗、炼苗等多个环节. 本文首次在铁皮石斛种植基地内, 利用胶膜菌属真菌S7与铁皮石斛种子在田间播种, 获得了实生苗, 为萌发菌S7的生产应用奠定了基础. 萌发菌的使用有望打破兰科植物人工繁殖过程对组培技术的依赖, 大幅度降低种苗生产成本, 具有良好的应用前景. 据报道, 70%以上的兰科植物是附生性^[21], 本文结果对兰科植物的人工繁殖技术研究有重要的参考和借鉴作用.

在后续田间实验研究中, 需要就播种量、播种方法、施菌方法、萌发菌地区适应性、育苗周期、温湿度和光照强度等因素对出芽和成苗的影响进行深入考察, 并通过增加计数面积比例、改进取样方法等措施进一步优化田间计数方法, 以建立成熟稳定的铁皮石斛田间播种技术.

3.2 基质对铁皮石斛种子出芽和成苗的影响

蛭石和珍珠岩是常用的植物栽培基质, 是用于提高洋葱、茄子等作物种子萌发率的引发基质^[22,23], 也是铁皮石斛等多种兰科植物常用的培养基质^[24,25]. 珍

图 12 光照培养80天后的种子。A: OMCK2组, 肉眼观察; B: OMMH组, 肉眼观察; C: OMCK2组, 体视镜观察; D: OMMH组, 体视镜观察。标尺=0.5 mm(网络版彩图)

Figure 12 Seeds were light-cultured for 80 days. A: OMCK2 under vision; B: OMMH under vision; C: OMCK2 under a stereoscope; D: OMMH under a stereoscope. Scale bar=0.5 mm (color online)

珠岩还可以用于丛枝菌根真菌的培养^[26]。本研究, 使用萌发菌, 种子在含有珍珠岩的基质上的出芽和成苗都受到了抑制。由于尚未看到有关珍珠岩抑制兰科植物种子萌发和幼苗生长的报道, 因此本课题推测珍珠岩可能是通过影响萌发菌S7的生长或促萌发活性而间接影响了铁皮石斛种子的出芽。基质是植物栽培成功的关键。为适应其附生性和浅根性的特点, 栽培铁皮石斛不用土壤, 而是使用树皮、碎木屑等疏松透

气、排水性好的基质。本研究中以泥炭土和锯末为主的播种基质不利于铁皮石斛幼苗生根、定植, 这可能是引起后期成苗率大幅度降低的原因之一。本文结果提示, 评价萌发菌作用时不能忽视基质因素。不同类群的植物和萌发菌, 以及不同的植物-真菌共生体是否对基质有不同偏好, 值得进一步考察。

3.3 萌发菌活性物质研究展望

本文研究发现, 胶膜菌属真菌S7的菌丝体提取物有促进种子萌发和原球茎发育的作用。在共生萌发物质基础研究方面, 多篇文献报道石斛属植物萌发菌提取物中含有赤霉素和脱落酸等植物激素^[13,14]。Wang等人^[14]的转录组学研究发现, 在胶膜菌与铁皮石斛种子共生萌发时, 真菌影响了植物激素的生物合成, 受到影响的激素包括茉莉酸、脱落酸和独脚金内酯。除植物激素外, 菌根真菌的代谢产物还包括碳水化合物、氨基酸等营养物质^[12], 烟酸^[27]、维生素B^[28]等能够参与植物新陈代谢过程的物质和脂氧素等^[29]能够介导植物与真菌互作的物质。此外, 真菌能产生不同类型的抗菌成分^[30,31], 而有文献报道, 萌发菌可通过抑制杂菌生长而间接的促进铁皮石斛种子萌发^[32]。田间实验中, S7能否通过产生抗菌成分为铁皮石斛种子萌发提供更加适宜的微环境, 还有待进一步研究。对共生萌发过程的生理、生化和化学分析等研究, 将能够明确S7提取物促萌发活性的作用机制, 揭示活性作用的物质基础。

参考文献

- 1 Christenhusz M J M, Byng J W. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 2016, 261: 201–217
- 2 Arditti J. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot Rev*, 1967, 33: 1–97
- 3 Rasmussen H N. *Terrestrial Orchids, from Seed to Mycotrophic Plant*. New York: Cambridge University Press, 1995. 39–107
- 4 Gao Y, Guo S X, Xing X K. Fungal diversity and mechanisms of symbiotic germination of orchid seeds: A review (in Chinese). *Mycosystema*, 2019, 38:1808–1825 [高越, 郭顺星, 邢晓科. 兰科植物种子共生萌发真菌多样性及共生萌发机制研究进展. *菌物学报*, 2019, 38: 1808–1825]
- 5 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.). *Sci Hortic*, 2014, 165: 62–68
- 6 Fang H Y. Discovery on the symbiotic fungi for seed germination and its characterization of medicinal plants in Orchidaceae (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Beijing: Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, 2008 [房慧勇. 兰科药用植物种子萌发特性及促萌发真菌的发现. 博士学位论文. 北京: 中国协和医科大学, 2008]
- 7 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. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 90: 313–323
- 8 Chen J, Zhang L C, Xing Y M, et al. Advances in research on mycorrhizal symbiosis of *Dendrobium* (Orchidaceae) (in Chinese). *Chin Pharm J*,

- 2013, 48: 1644–1648 [陈娟, 张丽春, 邢咏梅, 等. 兰科石斛属植物菌根共生研究进展. 中国药理学杂志, 2013, 48: 1644–1648]
- 9 Zhang Y, Li Y Y, Chen X M, et al. Morphologic techniques for observing seed symbiotic germination of *Dendrobium officinale* (in Chinese). J Capital Norm Univ (Nat Sci Edi), 2019, 40: 35–42 [张盈, 李媛媛, 陈晓梅, 等. 铁皮石斛种子共生萌发形态学观察. 首都师范大学学报(自然科学版), 2019, 40: 35–42]
 - 10 Li Y Y, Chen X M, Zhang Y, et al. Immunolocalization and changes of hydroxyproline-rich glycoproteins during symbiotic germination of *Dendrobium officinale*. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 552
 - 11 Guo S X, Xu J T. Effects of fungi and its liquid extract on seed germination of *Dendrobium hancockii* Rolfe (in Chinese). Chin J Chin Mater Med, 1990, 15: 397–399 [郭顺星, 徐锦堂. 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, 1990, 15: 397–399]
 - 12 Guo S X, Xu J T. Determination of primary metabolic products of fungi promoting seed germination of *Gastrodia elata* Bl. and other Orchidaceae medicinal plants (in Chinese). Chin J Chin Mater Med, 1990, 15: 12–14 [郭顺星, 徐锦堂. 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, 1990, 15: 12–14]
 - 13 Zhang J H, Wang C L, Guo S X, et al. Studies on the plant hormones produced by 5 species of endophytic fungi isolated from medicinal plants (Orchidaceae) (in Chinese). Acta Acad Med Sin, 1999, 21: 49–54 [张集慧, 王春兰, 郭顺星, 等. 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, 1999, 21: 49–54]
 - 14 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. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3484
 - 15 Pharmacopoeia Committee of The People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China vol. 1 (in Chinese). Beijing: China Medical Science Press, 2015. 282–283 [国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015. 282–283]
 - 16 Zou R C, Wang Q, Sun J, et al. Research progress in *Dendrobium officinale* polysaccharides in China in the latest decade (in Chinese). Food Res Dev, 2018, 39: 209–214 [邹荣灿, 王乾, 孙俊, 等. 国内近10年铁皮石斛多糖研究进展. 食品研究与开发, 2018, 39: 209–214]
 - 17 Stewart S L, Zettler L W, Minso J, et al. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. Selbyana, 2003, 24: 64–70
 - 18 Wu H F, Song X Q, Liu H X. Ex-situ symbiotic seed germination of *Dendrobium catenatum* (in Chinese). Acta Ecol Sin, 2012, 32: 2491–2497 [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: 2491–2497]
 - 19 Zhang S, Yang Y, Li J, et al. Physiological diversity of orchids. *Plant Divers*, 2018, 40: 196–208
 - 20 Li G Y, Su Y Y, Li S M, et al. Screening of *Dendrobium officinale* culture medium (in Chinese). J Anhui Agric Sci, 2015, 43: 61–63 [李关艳, 苏有勇, 李思梅, 等. 铁皮石斛栽培基质的筛选研究. 安徽农业科学, 2015, 43: 61–63]
 - 21 Hsiao Y Y, Pan Z J, Hsu C C, et al. Research on orchid biology and biotechnology. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52: 1467–1486
 - 22 Ji Y L, Diao Y W. Effect of perlite matrix priming on germination of eggplant seeds (in Chinese). Shandong Agric Sci, 2008, 4: 42–44 [吉玉玲, 蔣原温. 珍珠岩引发对茄子种子发芽率的影响. 山东农业科学, 2008, 4: 42–44]
 - 23 Li J S, Gao Y M, Feng Y. Effect of solid medium priming on onion seed's germination rate (in Chinese). North Hortic, 2006, 2006: 16–17 [李建设, 高艳明, 冯艳. 蛭石和珍珠岩基质引发对洋葱种子发芽率影响. 北方园艺, 2006, 2006: 16–17]
 - 24 Lei Y, Ren Y X, Wu L H. Experimental study on tissue culture of *Dendrobium officinale* in Tianshui area (in Chinese). Gansu Agric Sci Tech, 2019, 9: 39–42 [雷颖, 任俞新, 吴利红. 天水地区铁皮石斛组织培养试验研究. 甘肃农业科技, 2019, 9: 39–42]
 - 25 Song Z H. Study on soilless culture and regulation of florescence of *Phalaenopsis* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Baoding: Hebei Agricultural University, 2008 [宋朝辉. 蝴蝶兰无土栽培及花期调控技术研究. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学, 2008]
 - 26 Bi Y L, Sun H, Guo N, et al. Propagate-effects of different substrates and strain combinations on rbuscular mycorrhizal fungi (in Chinese). Chin J Appl Environ Biol, 2017, 23: 616–621 [毕银丽, 孙欢, 郭楠, 等. 不同基质和菌种组合对丛枝菌根真菌扩繁效果的影响. 应用与环境生物学报, 2017, 23: 616–621]
 - 27 Zhu G S. Establishment of a rice enhancer trap mutant library by t-DNA insertion (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009 [朱国胜. 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. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2009]
 - 28 Wu J P, Qian J, Zheng S Z. A preliminary study on the ingredient of secretion from fungi of orchid mycorrhiza (in Chinese). Chin J Appl Ecol, 2002, 13: 845–848 [吴静萍, 钱吉, 郑师章. 兰花菌根菌分泌物成分的初步分析. 应用生态学报, 2002, 13: 845–848]
 - 29 Guo W J. Studies on the fungal metabolites affecting the growth and active components of three traditional Chinese Medicine (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Beijing: Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, 2007 [郭文娟. 真菌对三

- 种中药生长发育和有效成分影响的物质基础研究. 博士学位论文. 北京: 中国协和医科大学, 2007]
- 30 Guo S X, Xu J T. The bacteriostasis of fermentation liquid of fungi promoting seed germination of *Gastrodia elata* etc medicinal plant of Orchinaceae (in Chinese). *Chin Pharm J*, 1990, 25: 200–202 [郭顺星, 徐锦堂. 促进天麻等兰科药用植物种子萌发的真菌发酵液的抑菌作用. *中国药学杂志*, 1990, 25: 200–202]
- 31 Tareq F S, Hasan C M, Rahman M M, et al. Anti-staphylococcal calopins from fruiting bodies of *Caloboletus radicans*. *J Nat Prod*, 2018, 81: 400–404
- 32 Zhao X M, Yuan L W, Zhang Y. Study on key factors of seed germination of *Dendrobium officinale* (in Chinese). *Agric Tech Serv*, 2015, 32: 87–88 [赵昕梅, 远凌威, 张玉. 铁皮石斛种子萌发关键因素研究. *农技服务*, 2015, 32: 87–88]

Effects of *Tulasnella* sp. S7 and its extract on *Dendrobium officinale* seed germination

YANG JianWen¹, CHEN XiaoMei¹, MENG ZhiXia¹, ZHU WeiDong², SHAN TingTing¹,
HUANG Qing², ZHOU LiSi¹ & GUO ShunXing¹

¹ Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China;
² Zhejiang Longevity Valley Botanical Co., Ltd, Jinhua 321200, China

Orchidaceae seeds are tiny, without an endosperm. In nature, seed germination depends on symbiotic fungi for nutrients. In symbiotic culturing with seeds of the orchid *Dendrobium officinale* on oatmeal agar (OMA) medium, *Tulasnella* sp. S7 promotes seed germination. This study investigated the field application effects of S7 on seed germination of *D. officinale* by using S7 culture for a sowing experiment with six media. S7 extract was added to OMA and Murashige and Skoog media for seed culture. Without S7, seeds sprouted on three media; the highest sowing bud ratio (SBR) was 1.96%±1.26%. In addition, seedlings emerged on one media; the highest percentage of seedling emergence (PSE) was 0.96%±1.07%. With S7, seeds sprouted and formed seedlings on all six media. Seeds germinated best on peat soil:sawdust (1:1) medium, with the SBR and PSE reaching 26.68%±6.26% and 20.97%±6.93%, respectively. These results showed that S7 can promote seed germination of *D. officinale* and can be applied to field sowing and that the culture medium influences the effects of S7. After adding high-concentration S7 mycelium extract to OMA medium, the protocorm formed after 50 days of culture, 20 days earlier than the control group; leaves formed on day 60; and the control group protocorm did not continue to develop. After 80 days of culture, the seed germination rate was 54.90%±2.46%, 57.6% higher compared to the control group ($P<0.05$), and the bud rate was 9.11%±4.17% compared to the control group (0.41%±0.38%). These results indicated that the S7 mycelium extract contains substances that can promote seed germination and protocorm development. This study laid the foundation for further exploration of the practical application value of S7 and of active metabolites that promote the germination of orchid seeds in symbiotic fungi, which provide us with new ideas for studying the mechanism underlying symbiotic germination of orchid seeds.

***Dendrobium officinale*, *Tulasnella* sp., field sowing, fungal extract**

doi: 10.1360/SSV-2019-0305