

海南霸王岭三种植被类型下血叶兰根内和根区土壤中共生真菌多样性及其种子原位共生萌发初探

兰烯^{1,2,3}, 赵莹^{1,2,3}, 罗天雄³, 宋希强^{1,2,3}, 钟云芳^{1,3*}, 冯雪萍^{2,3*}

1 海南大学 热带特色林木花卉遗传与种质创新教育部重点实验室, 海南 海口 570228

2 海南省热带特色花木资源生物学重点实验室, 海南 海口 570228

3 海南大学热带农林学院, 海南 海口 570228

摘要: 本研究以海南传统黎药血叶兰 *Ludisia discolor* 为研究材料, 通过对海南热带雨林霸王岭片区 3 种植被类型(热带沟谷雨林、热带低地雨林、两种植被类型中间过渡带)中生长的血叶兰根系及根区土壤样品进行真菌群落组成和多样性对比分析, 并依次在 3 种植被类型内开展种子原位共生萌发实验, 探究其特定兰科菌根真菌资源。结果表明, 血叶兰根内和根区土壤样本间的共生真菌群落组成存在显著差异, 随着植被类型由热带沟谷雨林向热带低地雨林转变, 根区土壤中的真菌扩增子序列变异体(ASVs)减少, 根内的真菌 ASVs 增加。另外, 在血叶兰根内及根区土壤样品中发现兰科菌根真菌角担菌科 *Ceratobasidiaceae* 与蜡壳耳科 *Sebacinaceae* 真菌, 分别在热带低地雨林与热带沟谷雨林的根内丰度最高。通过种子原位共生萌发实验筛选出角担菌属 *Ceratobasidium* 真菌。将菌株与血叶兰种子进行室内共生萌发实验, 接种(32±4) d 后, 种子胚明显膨大形成原球茎, 平均萌发率为(30.75±5.14)%, 同期未接菌的对照组中未见萌发。这表明所分离的角担菌属真菌能够有效促进血叶兰的种子萌发。本研究揭示了不同植被类型对血叶兰共生真菌多样性的影响, 并鉴定出可促进血叶兰种子萌发的兰科菌根真菌, 为血叶兰的生境适应性研究、生态保护及人工繁育提供了重要科学依据。

关键词: 血叶兰; 种子原位共生萌发; ITS 扩增子测序; 核心菌群; 兰科植物保育

[引用本文]

兰烯, 赵莹, 罗天雄, 宋希强, 钟云芳, 冯雪萍, 2025. 海南霸王岭三种植被类型下血叶兰根内和根区土壤中共生真菌多样性及其种子原位共生萌发初探. 菌物学报, 44(6): 250030

Lan X, Zhao Y, Luo TX, Song XQ, Zhong YF, Feng XP, 2025. Diversity of symbiotic fungi in roots and rhizosphere soil of *Ludisia discolor* in three vegetation types in Bawangling area of Hainan and isolation of germination-enhancing fungi through *in situ* baiting experiment. Mycosystema, 44(6): 250030

资助项目: 海南省自然科学基金(322MS019, 322QN229)

This work was supported by the Hainan Province Natural Science Foundation (322MS019, 322QN229).

*Corresponding authors. E-mail: ZHONG Yunfang, zhongyf@hainanu.edu.cn; FENG Xueping, fxp@hainanu.edu.cn

Received: 2025-02-17; Accepted: 2025-03-05

Diversity of symbiotic fungi in roots and rhizosphere soil of *Ludisia discolor* in three vegetation types in Bawangling area of Hainan and isolation of germination-enhancing fungi through *in situ* baiting experiment

LAN Xi^{1,2,3}, ZHAO Ying^{1,2,3}, LUO Tianxiong³, SONG Xiqiang^{1,2,3}, ZHONG Yunfang^{1,3*}, FENG Xueping^{2,3*}

1 Key Laboratory of Genetics and Germplasm Innovation of Tropical Special Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

2 Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Characteristic Flower and Plant Resources Biology, Haikou 570228, Hainan, China

3 School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

Abstract: Comparative analysis of fungal community composition and diversity in root and rhizosphere soil samples of traditional medicinal plant *Ludisia discolor* growing in three vegetation types (tropical valley rainforest, tropical lowland rainforest, and the transitional zone between the two vegetation types) in the Bawangling area of Hainan's tropical rainforest is conducted. Isolation of germination-enhancing fungi is also carried out through *in situ* baiting experiment to explore the specific orchid mycorrhizal fungal (OMF) resources in the three vegetation types. There are significant differences in the symbiotic fungal community composition between the root and rhizosphere soil samples. Fungal amplicon sequence variants (ASVs) in the rhizosphere soil decrease and those in the roots increase with the transitions of vegetation types from tropical valley rainforest to tropical lowland rainforest. Ceratobasidiaceae and Sebacinaceae, both specific to orchids, were found to be abundant in the root and rhizosphere soil, but the highest abundance was found in the roots. *Ceratobasidium* species were identified using *in situ* baiting technique. In indoor germination experiments, (32±4) d after inoculation with the fungal strain, the seed embryos significantly enlarged to form protocorms, with an average germination rate of (30.75±5.14)%, while no germination was observed in the control group without fungal inoculation. This suggests that the isolated *Ceratobasidium* fungi can effectively promote seed germination of *L. discolor*. The results reveal the deep impact of environmental changes on the diversity of symbiotic fungi in *L. discolor* and provide evidence for screening symbiotic fungal species facilitating seed germination in artificial propagation of orchids.

Keywords: *Ludisia discolor*; *in situ* baiting; ITS amplicon sequencing; core fungal communities; Orchidaceae conservation

兰科 Orchidaceae 植物是被子植物中物种最为丰富的科之一，全球约有 29 000 多种(Perez-Escobar *et al.* 2024)，在我国分布约 1 700 多种(Yang *et al.* 2024)。兰科植物被认为是被子植物中进化程度最高的科之一(谢泰祥等 2024)，其在生态系统中的作用也独具一格。由于兰科种子

缺乏胚乳，在萌发初期没有足够的养分储备，无法独立吸收养分(Yeung 2017)，必须与土壤中的特定真菌建立共生关系，通过这些真菌吸收并转移水分和矿物质，从而为种子提供所需的营养(Yeh *et al.* 2019)。在种子萌发过程中依赖与真菌建立短期、互惠的共生关系，这一过程被称为共

生萌发(Waterman *et al.* 2012),这种共生关系不仅在种子萌发阶段至关重要,而且对兰科植物从种子萌发到成年植株的生长和繁殖起着决定性作用,可帮助植物适应不同的生态系统并提高繁殖成功率(Anghelescu *et al.* 2023)。因此,种子共生萌发是保育兰科植物和维护其原生境更为可取的方法(吴慧凤等 2012)。兰科植物主要与担子菌 3 个科的真菌形成菌根,这些真菌总称为丝核菌 *Rhizoctonia*,包括鸡油菌目 *Cantharellales* 的角担菌科 *Ceratobasidiaceae* 和胶膜菌科 *Tulasnellaceae*,以及蜡壳菌目 *Sebacinales* 的无孢蜡壳科 *Serendipitaceae* (Dearnaley *et al.* 2012; Weiß *et al.* 2016)。它们通过提供必要的养分支持,帮助兰科植物种子萌发和幼苗生长,确保种群的维持和健康(Jiang *et al.* 2019)。

兰科菌根真菌(orchid mycorrhizal fungi, OMF)主要为兰科植物提供营养支持,特别是在种子萌发和幼苗早期生长阶段(Favre-Godal *et al.* 2020)。共生真菌泛指与宿主生物形成长期共生关系的一类真菌,其多样性不仅包括与植物互惠共生的菌根真菌,还涵盖内生真菌等类群。这些真菌通过营养交换、次生代谢物合成或微环境调控等机制,显著影响宿主的生长发育及生态适应性(Rodriguez *et al.* 2009; Smith & Read 2010)。其中菌根真菌主要通过植物根内形成菌丝团结构,协助宿主植物高效吸收土壤中的氮、磷等矿质营养。而其他共生真菌则可能通过分泌植物生长调节物质、激活激素信号通路或诱导系统抗性机制,直接参与宿主植物的生长发育调控与逆境适应(Bonfante & Anca 2009; 储薇等 2022)。虽然 OMF 在兰科植物的生长和营养吸收中扮演主要角色,但共生真菌中的非菌根真菌同样具有协同作用,可以帮助兰科植物适应各种生态环境(Watkinson 2016),保持植物、真菌与 OMF 三者的稳定,维持这种独特的生态平衡(Chauhan & Attri 2024)。兰科植物共生真菌的种类、群落结构,以及其与兰科植物的共生效果,受到周围土壤类型、气候条件和植被类型等不同环境因子的影响(Xing *et al.* 2019; Li *et al.* 2021),呈现明显的空间梯度效应(Diez 2007)。相关研究表明,热

带和亚热带地区的兰科植物根内和根区土壤中共生真菌群落多样性通常较高,尤其是在湿润的森林土壤中,呈现出明显的环境依赖性(Oliveira *et al.* 2014)。兰科植物根内和根区土壤中均存在共生真菌,且大多数根内的共生真菌在周围土壤中也都能被检测到(Kottke *et al.* 2008)。另外 Han *et al.* (2016)发现兰科植物根内和根区土壤中的共生真菌群落结构显著不同,共生真菌在根内的丰度是最大的,只有少数共生真菌在土壤样本中被检测到。因此,探究环境变化对兰科植物根内及根区土壤共生真菌的多样性变化,对兰科植物的保护和种群修复具有重要作用。

海南热带雨林位于海南岛中南部,拥有丰富的生物多样性(邢福武 2012; 马海霞等 2022),其中也包括众多的兰科植物。常年湿润、高温、降水量充沛等条件促进了微生物的繁衍(Lan *et al.* 2021),为兰科植物创造了理想的生存条件。血叶兰 *Ludisia discolor* 是血叶兰属 *Ludisia* 地生兰,广泛分布于我国广东、海南和云南南部及东南亚热带地区(Yu *et al.* 2019)。长期以来,血叶兰是我国传统黎药的重要组成部分。然而,随着栖息地的丧失和过度采集,血叶兰的野外种群急剧减少,已被列为我国国家二级重点保护野生植物(国家重点保护野生植物名录 https://www.gov.cn/zhengce/2021-09/07/content_5727413.htm)。本研究分析不同植被类型对血叶兰根内及根区土壤中共生真菌群落组成的影响,并采用原位共生萌发实验,分离和鉴定到能显著促进种子萌发及原球茎发育的关键真菌,以期明确以下科学问题:(1) 不同植被类型生境条件下,血叶兰根内及根区土壤的共生真菌群落差异;(2) 血叶兰在生长初期与哪类真菌形成了共生关系? 研究结果将为血叶兰种子共生萌发真菌的筛选、生物育种策略,快速繁殖技术及野外种群回归提供理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 研究地概况

采样地位于海南热带雨林国家公园霸王岭片区(19.110 6°N–19.112 1°N, 109.108 8°E–

109.112 9°E), 该区域属于典型的热带季风气候, 四季变化不明显, 旱季与雨季分明(Gao *et al.* 2013)。研究区域海拔介于 100–400 m 之间, 土壤类型主要为山地砖红壤和黄壤, 区域内植被类型主要包括热带沟谷雨林和热带低地雨林, 进一步划分为 3 类样地: 热带沟谷雨林样地(A12)、热带沟谷雨林与热带低地雨林的过渡带样地(A34)及热带低地雨林样地(A56)。样品采集时分别记录分布有血叶兰的 3 类植被类型的优势树种、伴生树种、草本植物及藤本植物(表 1)。

1.2 血叶兰根系和根区土壤样品采集及处理

1.2.1 根系和根区土壤样品采集

由于野生血叶兰多附生于石壁上, 种群分布稀疏, 植株稀少, 同时原生血叶兰根系短细。在确保每个样方的根系样本不超过总根量的 1/3 的前提下, 挑选发育良好的血叶兰种群进行营养根与根区土壤的采集。在同植被类型的生境中挑选出 3 个血叶兰种群, 每个种群中挑选 5–10 株长势良好的血叶兰植株个体, 收集其距根尖 1–2 cm 的营养根根段, 并将同一种群的根段样本混合为一组根系样本, 最终在每个植被类型中得到 3 组根系样本, 分别编号为 R12-1、R12-2、R12-3; R34-1、R34-2、R34-3; R56-1、R56-2、R56-3, 并置于冰盒中低温保存。根区土壤采样参考张文杰等(2024)的方法并有少量变动, 将血叶兰种群距根系 3 cm 范围内 5–10 cm 深度的土层作为根区土壤, 并在采样血叶兰根段周围用五点采样法采集根区土壤并混匀, 一个血叶兰种群的根区土壤视为一个重复, 每个植被类型共 3 组重复分别编号为 S12-1、S12-2、S12-3; S34-1、S34-2、S34-3; S56-1、S56-2、S56-3, 并将其分别装入无菌自封袋中, 置于室温下保存。所有样本 24 h 内带回实验室进一步处理。

1.2.2 根系和根区土壤样品预处理

血叶兰根段样品用流水清洗 5 min, 刮除根被及附着物, 切除腐烂部分, 再用洗洁精浸泡 5 min 并流水冲净。随后转至超净工作台上, 根段依次用 75%无水乙醇浸泡 30 s, 1% NaClO 浸泡 5 min, 并振荡摇晃, 最后用无菌水冲洗 5 遍以上, 去除表面残留的乙醇和 NaClO, 最后

用无菌滤纸吸去多余水分。将最后一遍冲洗的无菌水接种到培养皿上进行无菌验证确保消毒效果。处理完成后, 将根段装入无菌冻存管中, 存放于–80 °C冰箱中保存备用。

血叶兰每份根区土壤样品使用 2 mm 规格筛子去除残渣和石头等杂质, 此步骤重复 3 次, 并充分混匀, 将过筛的根区土壤样品置于–80 °C冰箱中保存备用。

1.3 真菌总 DNA 的提取和 rDNA-ITS 扩增子测序

用试剂盒(MP Biomedicals)提取真菌总 DNA, 其操作按照试剂盒说明书进行。将 DNA 样品装于 2 mL 离心管内, 并置于干冰内储存, 运输至上海派森诺生物科技股份有限公司进行 rDNA-ITS 扩增子测序, 用超微量分光光度计对提取的 DNA 进行定量, 以保证样品 DNA 的质量和浓度满足后续实验需求。以真菌核糖体 DNA 的内部转录间隔区 ITS2 序列为目标, 用兰科菌根真菌特异性引物 ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAAC GCAGC-3')和 ITS4OF (5'-GTTACTAGGGGAA TCCTTGTT-3')并添加特异性标签序列(AAGCA CTG)对 ITS2 区域进行 PCR 扩增(Waud *et al.* 2014)。扩增过程中, 采用 Illumina 的标准操作流程, 以保证数据的准确性和可靠性。后续的 PCR 产物用于扩增文库的构建。对合格的文库, 在 Illumina NovaSeq 机器上利用 NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (500 cycles)进行 2×250 bp 的双端测序。

1.4 根样和土样测序数据处理

根据原始下机数据整理形成包含样品名称、样品分组、引物序列的 metadata 文本文件, 将此文件在 QIIME2 软件转化为 manifest 文件, 并将原始数据导入 QIIME2。使用 Cutadapt v2.3 软件去除原始序列接头和引物后, 在 R 软件中, 使用 DADA2 插件进行序列质量控制、去嵌合体 and 去重复等操作, 将序列以 100%相似度聚类, 得到 amplicon sequence variants (ASVs) 代表序列, 去除序列总数仅为 1 的 ASVs 后得到 ASVs 特征表, 使用 IBM SPSS Statistics 26 对结果进行独立样本 *t* 检验分析, 并作差异显著性分析。对比根区土壤与根内的 ASVs 数据,

表 1 血叶兰样地植被类型及群落组成

Table 1 The vegetation types and community composition of *Ludisia discolor* sample plots in the Bawangling scenic spot of Hainan Tropical Rainforest National Park

海拔区间	优势树种	伴生树种	草本植物	附生藤本植物
Elevation range	Dominant tree species	Associated tree species	Herbaceous plants	Climbing plants
热带沟谷雨林(A12) 0–100 m	木棉 <i>Bombax ceiba</i> 、斜叶榕 <i>Ficus tinctoria</i>	厚壳桂 <i>Cryptocarya chinensis</i> 、红果桫欏 <i>Dysoxylum gotadhora</i> 、海南破布叶 <i>Microcos chungii</i> 、海南单籽暗罗 <i>Monoon laui</i> 、假苹婆 <i>Sterculia lanceolata</i> 、水蓼 <i>Persicaria hydropiper</i> 、水柳 <i>Homonoia riparia</i> 、白楸 <i>Mallotus paniculatus</i> 、重阳木 <i>Bischofia polycarpa</i> 、枝花李榄 <i>Chionanthus ramiflorus</i> 、狭叶杜英 <i>Elaeocarpus angustifolius</i> 、鱼骨木 <i>Psyrax dicocca</i> 、药用狗牙花 <i>Tabernaemontana bovina</i> 、狭叶泡花树 <i>Meliosma angustifolia</i> 、裸花紫珠 <i>Callicarpa nudiflora</i>	益智 <i>Alpinia oxyphylla</i> 、伏石蕨 <i>Lemmaphyllum microphyllum</i> 、大尖囊兰 <i>Phalaenopsis deliciosa</i> 、血叶兰 <i>Ludisia discolor</i> 、火焰兰 <i>Renanthera coccinea</i> 、落地生根 <i>Bryophyllum pinnatum</i> 、假芒萁 <i>Sticherus truncatus</i>	百足藤 <i>Pothos repens</i> 、狮子尾 <i>Rhaphidophora hongkongensis</i>
过渡带区域(A34) 100–200 m	枫香树 <i>Liquidambar formosana</i> 、海南榄仁 <i>Terminalia nigrovenulosa</i>	黄藤 <i>Daemonorops jenkinsiana</i> 、海南轴榈 <i>Licuala hainanensis</i> 、刺桑 <i>Taxotrophis ilicifolia</i> 、叶被木 <i>Taxotrophis taxoides</i> 、印度藤儿茶 <i>Senegalia pennata</i> 、木薯 <i>Manihot esculenta</i> 、粗毛野桐 <i>Hancea hookeriana</i> 、光叶巴豆 <i>Croton laevigatus</i> 、黄杞 <i>Engelhardia roxburghiana</i> 、银柴 <i>Aporosa dioica</i> 、厚皮树 <i>Lannea coromandelica</i> 、香合欢 <i>Albizia odoratissima</i> 、东方闭花木 <i>Cleistanthus concinnus</i> 、山石榴 <i>Catunaregam spinosa</i> 、羽脉山麻秆 <i>Alchornea rugosa</i> 、皂帽花 <i>Dasymaschalon trichophorum</i> 、毛柿 <i>Diospyros strigosa</i> 、毛萼紫薇 <i>Lagerstroemia balansae</i> 、破布叶 <i>Microcos paniculata</i> 、细叶谷木 <i>Memecylon scutellatum</i> 、翻白叶树 <i>Pterospermum heterophyllum</i> 、猪肚木 <i>Canthium horridum</i>	伏石蕨 <i>Lemmaphyllum microphyllum</i> 、乌毛蕨 <i>Blechnopsis orientalis</i> 、铁线蕨 <i>Adiantum capillus-veneris</i> 、巢蕨 <i>Asplenium nidus</i> 、崖姜 <i>Drynaria coronans</i> 、中华叉柱兰 <i>Cheirostylis chinensis</i> 、血叶兰 <i>Ludisia discolor</i> 、鹅掌柴 <i>Heptapleurum heptaphyllum</i> 、垂穗石松 <i>Palhinhaea cernua</i> 、紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i> 、海芋 <i>Alocasia odora</i>	百足藤 <i>Pothos repens</i> 、狮子尾 <i>Rhaphidophora hongkongensis</i>
热带低地雨林(A56) 200–300 m	青梅 <i>Vatica mangachapoi</i> 、龙眼 <i>Dimocarpus longan</i>	高山榕 <i>Ficus altissima</i> 、纤枝蒲桃 <i>Syzygium stenocladum</i> 、叶被木 <i>Taxotrophis taxoides</i> 、风轮桐 <i>Epiprinus siletianus</i> 、水柳 <i>Homonoia riparia</i> 、黑柿 <i>Diospyros nitida</i> 、乌材 <i>Diospyros eriantha</i> 、细子龙 <i>Amesiodendron chinense</i> 、沙煲暗罗 <i>Polyalthia obliqua</i> 、粗毛野桐 <i>Hancea hookeriana</i> 、日本粗叶木 <i>Lasianthus japonicus</i> 、大管 <i>Micromelum falcatum</i> 、海南菜豆树 <i>Radermachera hainanensis</i> 、粗糠柴 <i>Mallotus philippensis</i> 、细基丸 <i>Huberanthra cerasoides</i>	半柱毛兰 <i>Cheirostylis chinensis</i> 、血叶兰 <i>Ludisia discolor</i> 、伏石蕨 <i>Lemmaphyllum microphyllum</i> 、铁线蕨 <i>Adiantum capillus-veneris</i> 、巢蕨 <i>Asplenium nidus</i> 、海芋 <i>Alocasia odora</i>	百足藤 <i>Pothos repens</i> 、狮子尾 <i>Rhaphidophora hongkongensis</i>

分别根据在门、科、属 3 种分类单位水平上, 选取两者共有 ASVs 进行分析, 筛选潜在的共生真菌。

使用 QIIME2 软件对所有样本进行真菌鉴定, 识别每个样本的真菌 ASVs。针对每个样本中鉴定到的真菌序列, 通过该软件中的 qiime feature-table rarefy 功能, 以最低样本量的 95% 进行抽平, 以确保各样本的测序深度一致。预测在统一测序深度下的 ASVs 数量及其相对丰度, 计算 α 多样性指数, 绘制稀疏曲线。使用 R 软件中的 VennDiagram 包绘制不同样本间的 Venn 图, 分析不同分组间独有和共有的 ASVs 数量。基于真菌 UNITE 数据库, 运用 QIIME2 软件中的 classify-sklearn 插件对每个 ASVs 特征序列进行物种注释, 绘制物种堆积柱状图。使用 R 软件中的 vegan 包和 ggplot2 包分别计算 Bray-Curtis 距离, 绘制主坐标分析图, 结合 ANOSIM 进行相似性分析, 评估样本间群落结构差异。

1.5 血叶兰种子的活力评估及共生萌发研究

1.5.1 种子收集和保存

对血叶兰野生植株进行多批次异花授粉。成熟果荚采收后, 进行种子活力测定并干燥保存。授粉约 90 d 后采集成熟蒴果, 干燥低温保存法处理。使用 75%乙醇的脱脂棉清洗果荚表面后, 用无菌水冲洗 3 次。使用无菌刀具剖开果实, 轻拍果皮使种子脱落。将种子用无菌滤纸包好, 在 22 °C 下用无水氯化钙干燥 3 d 后装入密闭离心管并标记。种子置于 4 °C 进行短期保存, 置于含硅胶的密闭容器中放入 -20 °C 冰箱进行长期保存。

1.5.2 种子活力测定

采用 TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)法: 将种子放入 1 mL 离心管中, 加入纯水浸泡 24 h, 随后加入 1%浓度的 TTC 染液, 置于 37 °C 水浴恒温箱中, 在黑暗条件下染色 24 h。随后, 使用移液枪将混匀的种子吸取并置于载玻片上, 利用体视显微镜(ZEISS Stereo microscope Stemi 508)观察并拍照。随机选择 15 个视野进行统计分析, 胚被染成红色的种子视为有活力的种子。

种子活力(%)=(红色胚种子数/总种子数)×100%。

1.5.3 种子原位共生萌发试验

在血叶兰种子原位共生萌发实验前进行预处理, 先用 1% NaClO 溶液消毒种子 2 min, 反复振荡后用无菌水冲洗 3–5 次, 使种子悬浮于 0.1%无菌琼脂溶液中, 控制每 100 μ L 约含种子 60–100 粒。放入孔径为 50 μ m 的尼龙膜种子袋 (3 cm × 5 cm), 每袋约 900 粒, 串联成 10 个种子袋, 晾干后保存在 4 °C 冰箱。共制作 120 个种子袋, 在每种植被类型的生境中, 选择血叶兰植株周围作为埋设位置, 每种植被类型内均匀放置 40 个种子袋, 每个种子袋与植株之间保持 5–10 cm 的间距。种子袋埋深控制在 2–3 cm, 并用周围的腐殖质覆盖, 腐殖质层厚度为 1–2 cm, 期间每 30 d 统计一次萌发情况。

1.6 促萌发真菌的分离、筛选及鉴定

1.6.1 原球茎内共生真菌的分离

促萌发真菌的分离采用 PDA 培养基(200 g/L 马铃薯、20 g/L 葡萄糖、12 g/L 琼脂, 自然 pH)。用 1% NaClO 溶液消毒原球茎表面 5 min, 清洗 3–4 次后, 将原球茎切开或不切开直接放于 PDA 培养基中培养。在(25±2) °C 条件下进行黑暗培养, 观察菌丝生长后, 取菌落边缘纯净的菌丝接种到新的 PDA 培养基上进行纯化, 连续 3–5 次后获得菌株 XYLYDY2, 并通过 PDA 试管斜面法保存于 4 °C。

1.6.2 共生真菌对血叶兰种子萌发的有效性检测

采用燕麦培养基(OMA) (4 g/L 燕麦、8 g/L 琼脂, pH=5.8)进行真菌与种子共生萌发实验。取保存的供试菌株(编号 XYLYDY2)在 PDA 培养基上进行活化后, 将冷冻保存的血叶兰种子经解冻和表面灭菌处理后, 与 0.1%无菌琼脂液混合, 制备成均匀的无菌种子悬浮液。在 OMA 培养基表面平行放置两条 1 cm × 4 cm 的无菌滤纸条, 使用移液枪吸取 100 μ L 种子悬浮液 (约 80 粒种子), 均匀播种于每条滤纸条上。接种一个 1 cm × 1 cm × 0.5 cm 的供试菌饼置于中央。另取相同大小、未接菌的 PDA 培养基制成饼状置于中央, 作为阴性对照。每组处理重复 4 个培养皿, 在人工培养箱内于 60%–80%湿度和(25±2) °C 恒温条件下培养, 同时设置光照

(12 h/12 h, 光/暗)和黑暗(0 h/24 h, 光/暗)两种条件。经过 7 周共生培养后统计萌发率。

种子萌发率(%)=(萌发种子数/总播种种子数)×100%。

1.6.3 原球茎被真菌侵染情况的观察

培养 35 d 后, 使用墨水染色法观察真菌对血叶兰原球茎的侵染情况, 以验证与真菌的共生关系是否建立。将不同发育阶段的原球茎置于 2 mL 离心管内, 在 4 °C 下使用 FAA 固定液固定 24 h 以上后, 用纯净水洗涤 3–5 次。将原球茎完全浸泡在 10% KOH 溶液中, 于 121 °C、110 kPa 条件下高压灭菌 20 min。灭菌后用 2% HCl 溶液中和 5 min。最后将原球茎转移到含有 10% 墨水和 3% 乙酸的混合溶液中, 在 95 °C 水浴中加热 30 min (根据材料大小适当调整染色时间和试剂体积), 确保原球茎染色充分。染色结束后, 将 100% 乳酸加入离心管中, 并将其保存在 4 °C 条件下。观察时, 用镊子夹取染色后的原球茎置于载玻片上, 覆盖盖玻片轻轻碾压, 并在光学显微镜(CX23LED RFS1C)下观察拍照。

1.6.4 原球茎内真菌的分子鉴定及系统发育树的构建

取 XYLYDY2 菌株样品加入 200 µL 缓冲液 GA 振荡悬浮, 随后依次加入 180 µL 缓冲液、20 mg/mL 溶壁酶(37 °C 处理 ≥30 min)、20 µL 蛋白酶 K 和 220 µL 缓冲液 GB, 经 70 °C 加热 10 min 后处理, 加入 220 µL 无水乙醇离心处理。混合液经吸附柱纯化(12 000 r/min 离心 30 s), 依次用缓冲液 GD、漂洗液 PW 清洗后, 以 50–200 µL TE 缓冲液洗脱 DNA。PCR 扩增所使用的引物为 ITS1/ITS4 (Taylor & McCormick 2010), 其反应体系含 1 µL DNA 模板(20 ng/µL)、5 µL Mg²⁺缓冲液、1 µL Taq 酶(5U)、1 µL dNTP (10 mmol/L)、1.5 µL ITS1/ITS4 引物(10 µmol/L)及 39 µL ddH₂O。扩增程序为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 7 min。取 3 µL 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 500–700 bp 目标条带。

将 PCR 扩增产物送往上海派森诺生物科技股份有限公司进行 rDNA-ITS 测序。将获得的

ITS 序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对分析, 当 ITS 序列同源性超过 95% 时, 属于同一个属 (Hughes *et al.* 2009)。得到的真菌 ITS 序列与从 NCBI 中获得的近缘种序列构建系统发育树。以 *Fusarium nematophilum* 作为外类群分析角担菌科的系统发育关系。用 MEGA 软件中的 ClustalW 进行序列比对, MrModeltest 软件进行最适模型计算, 最佳模型 K80+G, 系统发育树参数为 nst=2, rates=gamma, Prset statefreqpr=fixed (equa), 用 MrBayes 软件构建系统发育树, 取样代数 1 000。用 FigTree 软件对系统发育树进行可视化和编辑。

2 结果与分析

2.1 不同植被类型生境下的根内及根区土壤真菌组成

在门分类水平上, 血叶兰根内及其根区土壤中的真菌群落差异较小, 根区土壤中子囊菌门的相对丰度为 66.52%, 低于根内中的 81.22%; 担子菌门在根区土壤中的相对丰度为 28.16%, 高于根内的 15.83% (图 1A)。

在科分类水平上, 根内及其根区土壤的真菌群落组成存在显著差异(图 1B)。从根内和根区土壤中均鉴定出 OMF 角担菌科和蜡壳耳科 Sebacinaceae 真菌, 且根内的相对丰度均高于根区土壤。其中, 角担菌科真菌同时存在于中间过渡带植被类型的根区土壤 S34 (0.33%) 和根内 R34 (0.85%), 在热带低地雨林根内 R56 相对丰度达到最高(1.45%)。蜡壳耳科在 S56 中存在 (0.9%), 且在热带沟谷雨林根内 R12 相对丰度达到最高(1.23%) (附表, 国家微生物科学数据中心 NMDCX0002080)。

2.2 不同植被类型生境下血叶兰根内及根区土壤真菌多样性

2.2.1 根内和根区土壤 ITS 扩增子测序分析

基于 Illumina NovaSeq-PE250 高通量测序, 经过质量控制和去除嵌合体处理, 通过稀释曲线图可表明测序深度合理, 已覆盖大部分物种(图 2A)。不同植被类型下血叶兰根区土壤和根样品的序列长度为 227–442 bp, 平均为 349 bp, 总共获得 1 343 312 条高质量 ITS 序列。

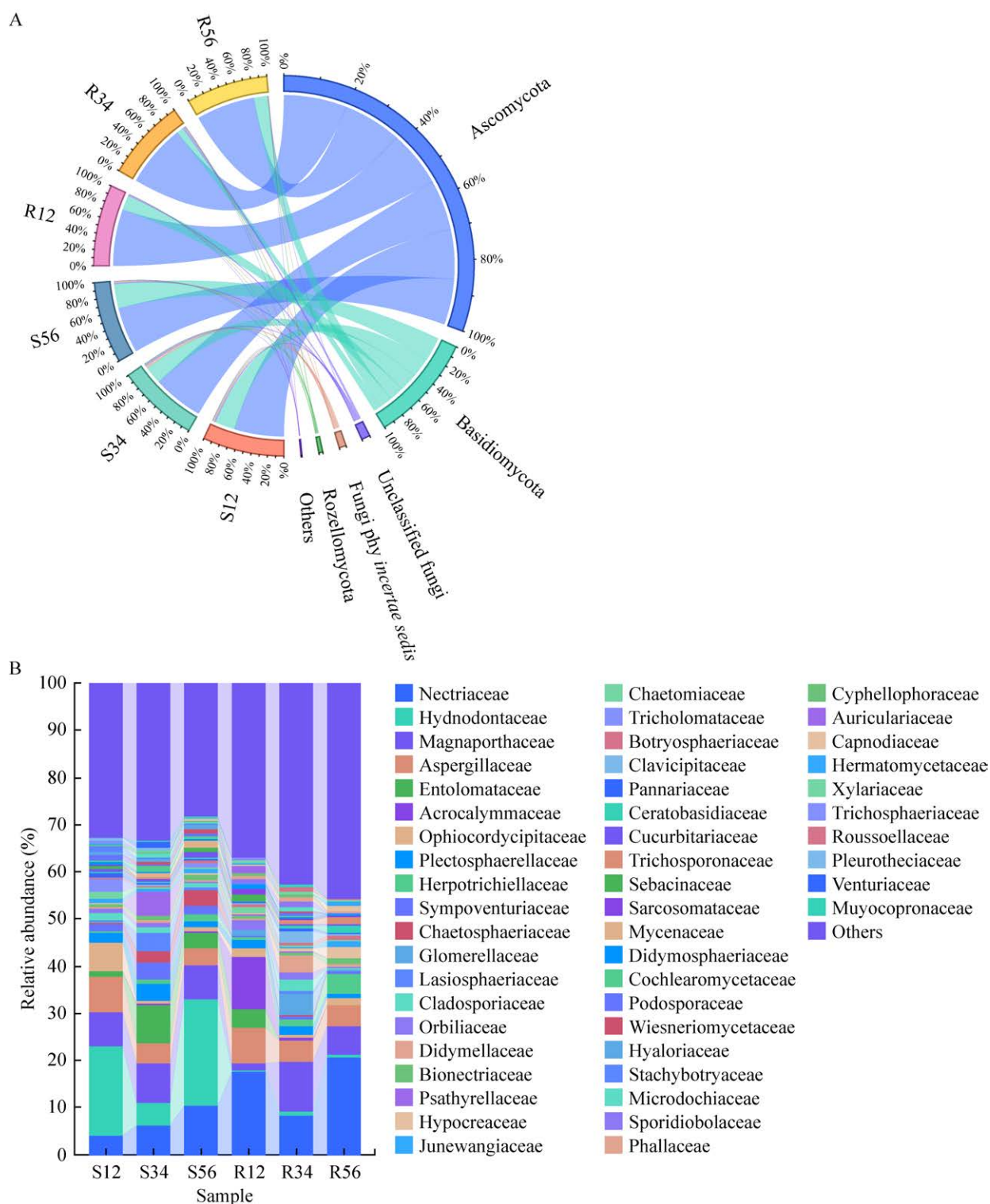


图 1 血叶兰根内和根区土壤不同分类水平内共生真菌组成 A: 门; B: 科. S12、S34、S56 分别为 A12、A34、A56 植被生境内的根区土壤; R12、R34、R56 分别为 A12、A34、A56 植被生境内的根. 下同
Fig. 1 The composition of symbiotic fungi in the root system and rhizosphere soil of *Ludisia discolor* at different taxonomic levels. A: Phylum; B: Family. S12, S34, and S56 represent the rhizosphere soil in the A12, A34, and A56 vegetation habitats, respectively; R12, R34, and R56 represent the root systems in the A12, A34, and A56 vegetation habitats, respectively. The same below.

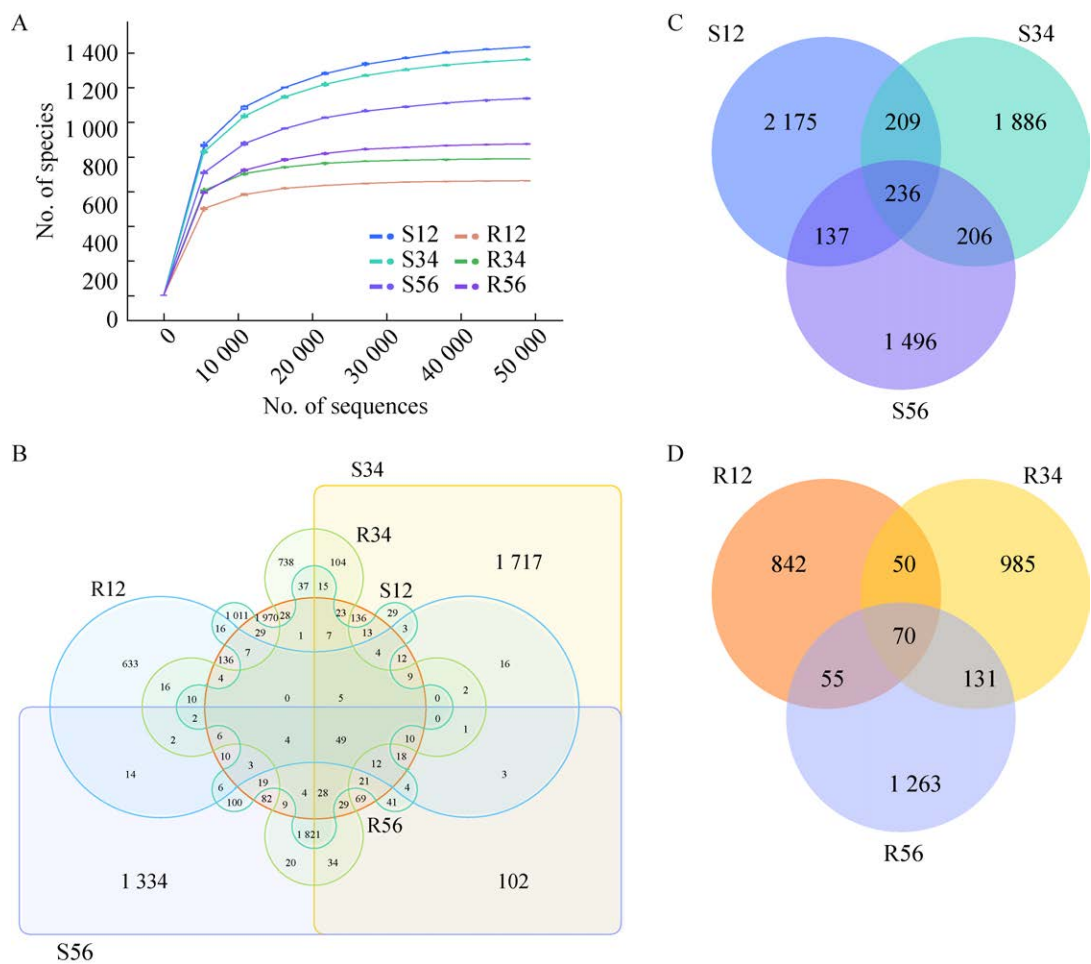


图 2 不同植被类型下血叶兰样品共生真菌 ASVs 分析图 A: 根区土壤和根内共生真菌 ASVs 的稀疏曲线; B: 根区土壤和根内共生真菌 ASVs 分布的韦恩图; C: 根区土壤共生真菌 ASVs 分布的韦恩图; D: 根内共生真菌 ASVs 分布的韦恩图

Fig. 2 Analysis of shared fungal ASVs in *Ludisia discolor* samples under different vegetation types. A: Rarefaction curves of fungal ASVs in rhizosphere soil and endophytic roots; B: Venn diagrams illustrating the distribution of fungal ASVs between rhizosphere soil and endophytic roots; C: Venn diagrams demonstrating fungal ASV distribution patterns in rhizosphere soil; D: Venn diagrams showing fungal ASV distribution patterns within endophytic roots.

通过数据抽平及聚类分析共鉴定出 8 806 个 ASVs, 根区土壤共 6 345 个, 根内共 3 396 个, 两者共同的 ASVs 有 26 个。通过对 3 种植被类型中血叶兰根区土壤和根内的 3 组重复样本间进行相关性分析, 结果显示 $P>0.01$, 表明重复样本间无显著性差异。在不同植被类型样地中, S12、S34、S56 根区土壤的 AVSs 分别为 3 512 个、2 866 个、2 370 个, 表明热带沟谷雨林内的根区土壤(S12)中真菌多样性最高; R12、R34、R56 根内的 AVSs 分别为 1 172 个、

1 433 个、1 741 个, 表明热带低地雨林内的根内(R56)真菌多样性最高(图 2B)。同一生境中, 根区土壤真菌 ASVs 明显多于根内。随着植被类型由热带沟谷雨林向热带低地雨林转变, 根区土壤中的真菌 ASVs 减少, 根内的真菌 ASVs 增加(图 2C, 2D)。

2.2.2 根内和根区土壤的共生真菌 α 多样性

所有组别的测序覆盖度(Goods coverage)接近于 1 (图 3D)。在不同植被类型中, 血叶兰根区土壤的真菌群落在物种丰富度(Chao1 指数)和

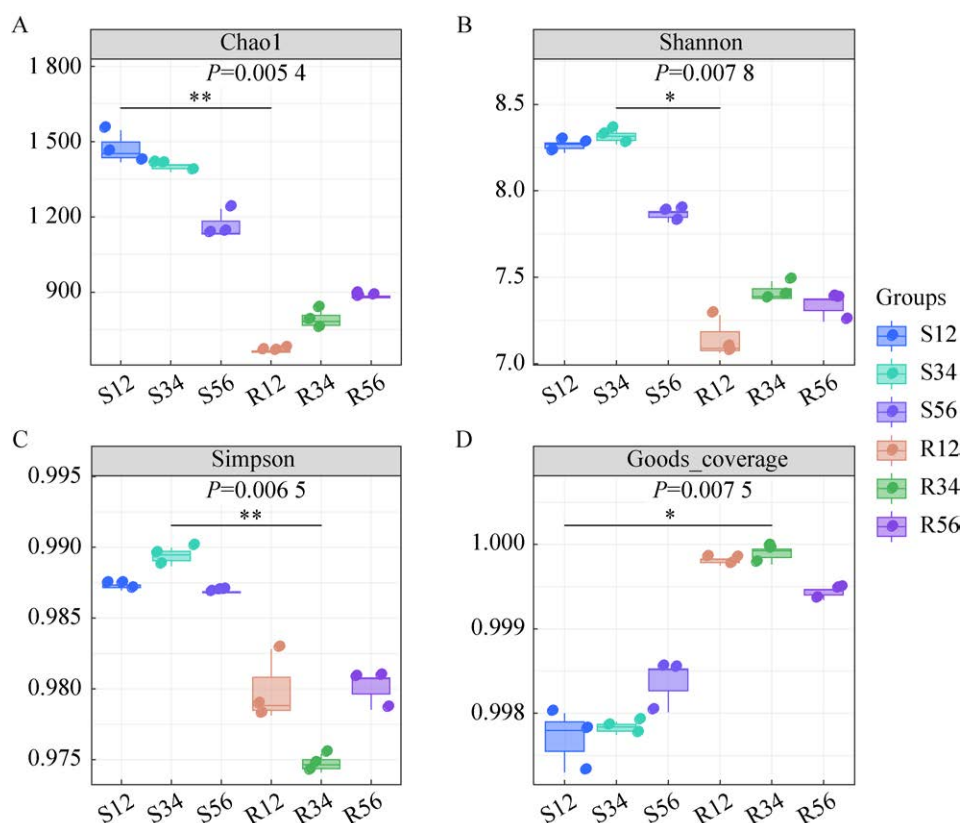


图3 不同植被类型下血叶兰的根区土壤和根内共生真菌的 α 多样性指数箱线图 A: Chao 1 指数箱线图; B: Shannon 指数箱线图; C: Simpson 指数箱线图; D: Goods coverage 指数箱线图

Fig. 3 Boxplot of alpha diversity index of soil and root-associated fungi of *Ludisia discolor* under different vegetation types. A: Box plot of Chao1 index; B: Box plot of Shannon index; C: Box plot of Simpson index; D: Box plot of Goods coverage index.

多样性(Shannon 指数)上均显著高于根内。其中, Chao1 指数显示(图 3A), 热带沟谷雨林中的血叶兰根区土壤(S12)真菌丰富度最高, 而根内普遍较低。在 Shannon 指数中(图 3B), 中间过渡带的血叶兰根区土壤(S34)内真菌多样性最高, 而热带沟谷雨林中的血叶兰根内(R12)真菌多样性最低。根据 Chao 1 指数组间相关性分析 $P=0.0054$ ($P<0.01$)、Shannon 指数组间相关性分析 $P=0.0078$ ($P<0.01$)以及 Simpson 指数(图 3C)组间相关性分析 $P=0.0065$ ($P<0.01$), 表明不同生境对血叶兰真菌群落组成具有显著影响。

2.2.3 不同植被类型生境下的根内及根区土壤共生真菌 β 多样性

为进一步明确不同植被类型内共生真菌群落结构的差异, 采用非度量多维尺度分析(NMDS)分析不同生境对血叶兰菌根真菌群落组成的影

响。结果显示, 3 种植被类型内的血叶兰根内、根区土壤, 以及根内和根区土壤中样本间的真菌群落组成存在分化差异的趋势(图 4)。

2.2.4 不同植被类型生境下的根内及根区土壤共生真菌组成差异

层次聚类热图显示了血叶兰在不同植被类型内的血叶兰根区土壤(S12、S34、S56)和根内(R12、R34、R56)的真菌群落组成及其丰度分布。结果显示, 角担菌科角担菌属 *Ceratobasidium* 在热带低地雨林植被类型内的血叶兰根内(R56)显示出最高的丰度(1.66), 在中间过渡带(R34)中的丰度也较高(0.78), 而在其他样点中的丰度较低。蜡壳耳科蜡壳菌属 *Sebacina* 在热带沟谷雨林植被类型内的血叶兰根内(R12)显示出最高的丰度(1.50), 在热带沟谷雨林植被类型内的血叶兰根区土壤(S56)中也表现出较高的丰度

(0.87), 而在 R34 和 R56 样品中的丰度较低。表明这 2 个真菌科在不同植被类型生境中的分布存在显著差异, 蜡壳耳科真菌在根区土壤中的分布较为集中, 而角担菌科真菌在某些样点的根内具有显著的生态优势(图 5)。

2.3 种子共生萌发

2.3.1 种子活力及原位共生萌发

成熟血叶兰种子染色后, 经统计其种子活力率为(76.49±3.19)%, 大部分种子胚被染为红色或浅橙色, 表明胚发育良好, 具有生命活力(图 6B)。在血叶兰原位共生萌发实验过程中共进行 3 次(间隔 30 d)回访检测其萌发情况, 其中前两次回访均未发现种子袋内有萌发迹象, 将

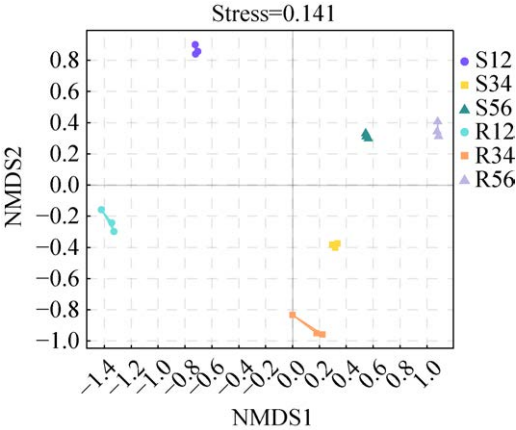


图 4 血叶兰根区土壤和根内共生真菌 NMDS 分析
Fig. 4 NMDS analysis of the rhizosphere soil and root-associated fungi of *Ludisia discolor*.

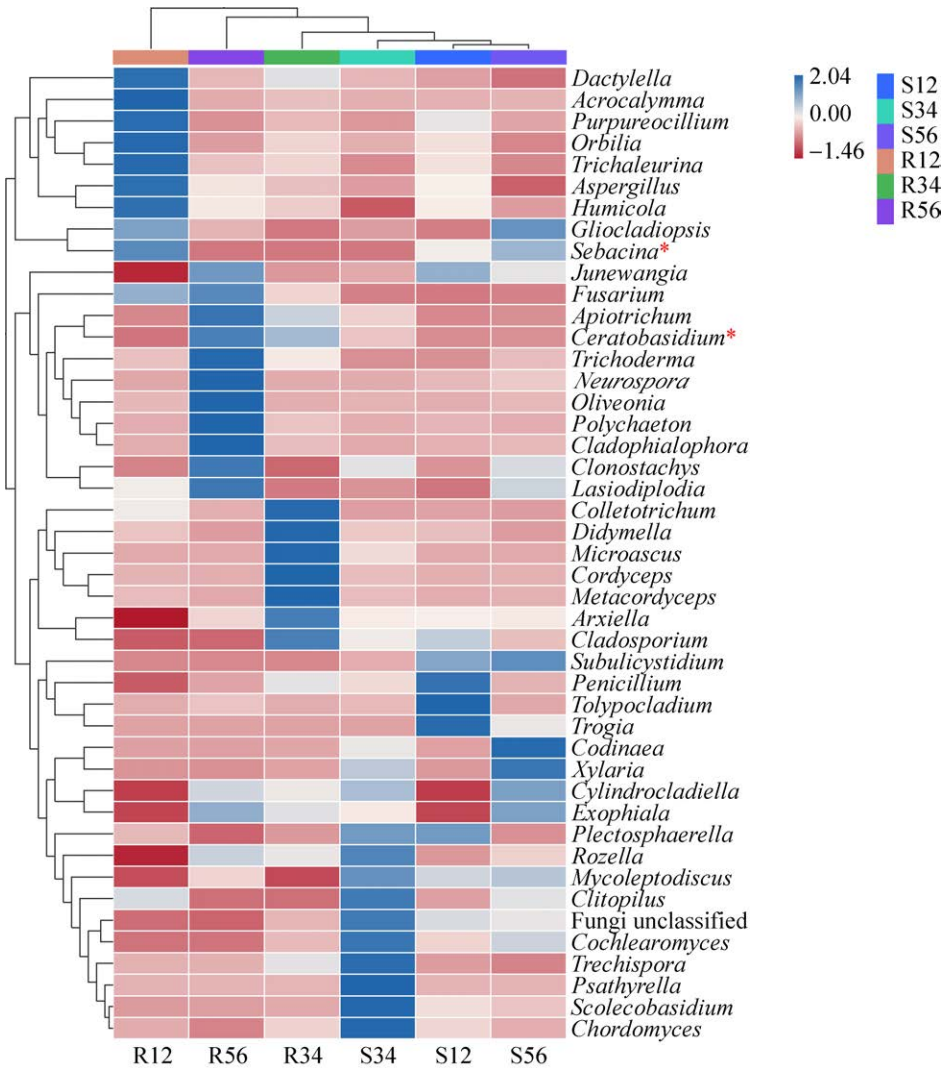


图 5 血叶兰根区土壤和根内共生真菌物种组成热图分析 红色星号表示兰科植物的菌根真菌
Fig. 5 Heatmap analysis of the species composition of soil and root-associated fungi in *Ludisia discolor*. Red asterisk indicates orchid mycorrhizal fungi.

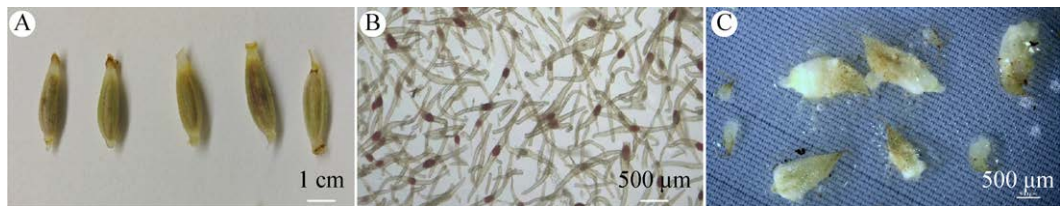


图 6 血叶兰蒴果和种子 A: 果荚; B: 被 TTC 染色的种子; C: 种子原位共生萌发形成的原球茎
Fig. 6 Capsule and seed of *Ludisia discolor*. A: Capsule; B: Seeds stained with TTC; C: The original tuber formed by *in situ* baiting.

种子袋放回原位继续待其萌发。在原位共生萌发 90 d 后，观察到种子袋内有长圆锥形原球茎产生，黄白色，长 1–2 mm，宽 0.5–1.5 mm。由于野外客观不可控因素，部分种子袋出现损失，共回收 110 个种子袋带回实验室。发现热带沟谷雨林与热带低地雨林中间过渡带(A34)，热带低地雨林(A56)生境中共有 14 个袋内出现少量萌发，总萌发种子 50 粒，萌发率为 (2.73±1.05)%，其中中间过渡带的种子袋萌发最多，共有 38 粒种子(10 袋)萌发(图 6C)。

2.3.2 原球茎内分离的共生真菌种类鉴定

从原位共生萌发获得的原球茎内，共分离出 25 株真菌，经菌落形态特征筛选，其中 22 株为同一菌株，编号为 XYLYDY2。观察到菌落均呈淡黄色至透明状，表面有绒毛状菌丝(图 7A)。显微观察下菌丝呈圆柱状，具明显的隔膜，生长速度约为 5 mm/d (图 7B)。通过分子鉴定及与 NCBI 数据库比对，基于核酸序列构建的系统发育树显示，血叶兰共生的角担菌科真菌位于 Clade I 分支，与来自日本的兰科植物 *Liparis*

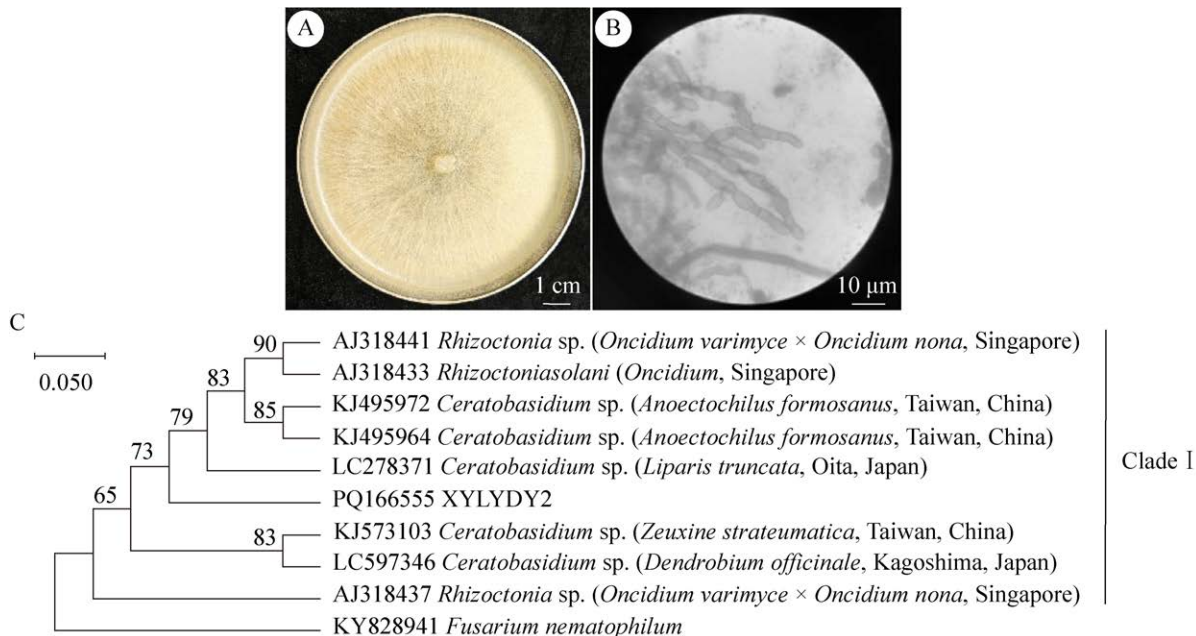


图 7 血叶兰原球茎分离获得的菌株 XYLYDY2 及其系统发育树 A: 菌落形态; B: 菌丝特征; C: 系统发育树, XYLYDY2 为本研究获得菌株，参考序列括号内为真菌寄主和分布地区，图中节点处标注的是>50 的后验概率值，比例尺代表替换率为 0.05

Fig. 7 Strain XYLYDY2 isolated from *Ludisia discolor* protocorms and its phylogenetic analysis. A: Colony morphology; B: Hyphal characteristics; C: Phylogenetic tree with XYLYDY2 obtained in this study. Reference sequences include host species and geographic origins in parentheses. Node labels indicate posterior probability values>50, and the scale bar represents a substitution rate of 0.05.

truncata 原球茎中所分离的角担菌属的真菌(登录号: LC278371)最为相似(Tsutsumi *et al.* 2022), 其最大相似度为 98%, XYLYDY2 号菌株被鉴定为角担菌科角担菌属 *Ceratobasidium* 真菌(登录号: PQ166555)(图 7C)。

2.3.3 真菌对种子萌发的有效性

血叶兰种子在燕麦培养基(OMA)上与 XYLYDY2 号菌种(角担菌属真菌)共生时, 参考 Arditti (1977)的方法, 血叶兰种子萌发及原球茎发育表现出显著的阶段性变化, 约在共培养 32 d 后, 其萌发率为(30.75±5.14)%, 未接菌的对照组未观察到萌发现象。播种后(9±9) d, 在第 0 阶段时种子处于未萌发状态, 外部形态无显著变化, 种胚仍被种皮包裹。播种后(23±3) d, 进入第 I 阶段的种子吸收水分后开始膨胀, 种皮破裂。至(32±4) d, 在第 II 阶段的种胚一侧突破种皮并呈黄绿色, 标志着萌发启动并发育成原球茎。在(53±2) d, 种胚进一步发育, 形成乳白色的锥状体, 第 III 阶段是种胚形态向胚胎体过渡的关键时期。此阶段后期进入原分生组织形成期, 其体积显著增大, 顶端逐渐形成锥状凸起, 颜色由乳白色转为浅绿色, 标志着光合作用的开始。播种后(72±3) d, 在第 IV 阶段原球茎形成叶原基, 逐渐具备发育成幼苗的潜力。播种后(90±2) d, 在第 V 阶段, 幼根形成, 标志着种子的萌发及初级发育完成, 有 4.23%的幼苗生长至此阶段(图 8)。

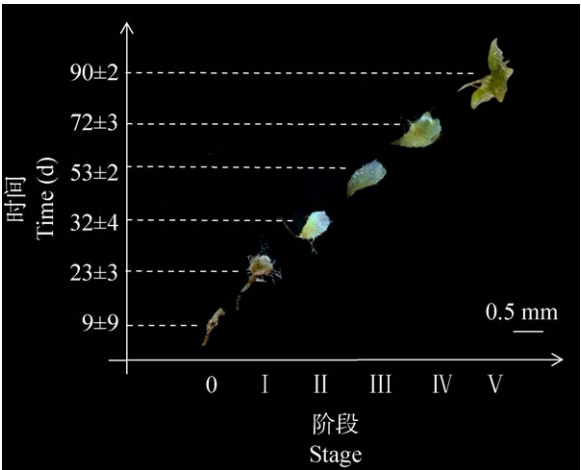


图 8 血叶兰种子共生萌发过程
Fig. 8 Symbiotic germination process of *Ludisia discolor* seeds.

2.3.4 真菌侵染情况

对与 XYLYDY2 号菌株共培养的血叶兰种子和原球茎进行染色观察表明, 在已经萌发的种子和原球茎中, 墨水染色显示真菌菌丝广泛分布于细胞内部, 且可观察到大量蓝黑色的菌丝团聚, 表明真菌在种子或原球茎细胞内成功定殖并形成菌丝团。进一步分析表明, XYLYDY2 号菌株的菌丝在种子萌发的早期即通过侵入种子和原球茎细胞促进种子的萌发, 表明真菌与寄主植物之间的共生关系在种子萌发阶段就已开始建立(图 9)。

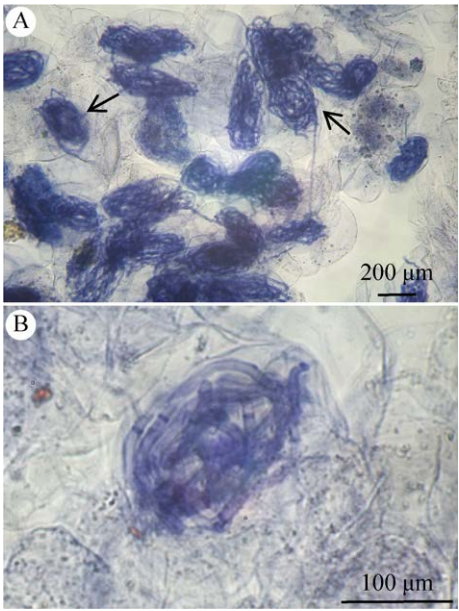


图 9 血叶兰原球茎中的真菌侵染观察 A: 原球茎胞内菌丝团(箭头) (×20 倍); B: 皮层细胞中的单个菌丝团(×100 倍)

Fig. 9 Fungal colonization observed in the protocorms of *Ludisia discolor*. A: Intracellular hyphae cluster within the protocorm (arrow) (×20); B: Individual fungal hyphal mass localized in cortical cells (×100).

3 讨论

3.1 血叶兰根内及根区土壤中共生真菌群落的植被类型响应

兰科植物与菌根真菌的共生关系极易受环境变动影响, 任何环境条件的改变都可能破坏其共生稳定性(Yeh *et al.* 2019)。本研究检测到

血叶兰根系及根区土壤中共生真菌组成存在显著差异,其中角担菌科和蜡壳耳科真菌在根内的丰度显著高于根区土壤,且前者比例随植被类型向热带低地雨林过渡而升高,而土壤中无此趋势。该结论表明角担菌科真菌与热带低地雨林中的血叶兰根部易建立共生关系形成菌根,而蜡壳耳科真菌主要分布于热带沟谷雨林的血叶兰根内,两者在不同植被类型中表现出不同的生态偏好。另外,角担菌科与蜡壳耳科真菌是两类典型 OMF,可针对性支持兰科植物在不同生境中的发育需求(高越等 2019)。因此,血叶兰可能通过高度特异性的共生策略,在种子萌发及幼苗阶段依赖特定真菌类群,以适应不同的生境。

血叶兰根内共生真菌的多样性在不同植被类型下呈现显著差异,从热带沟谷雨林向热带低地雨林过渡时,其多样性逐渐增加。这一变化模式与五唇兰的研究结论一致(柯海丽等 2007),表明兰科植物根内真菌组成受生境条件主导。可能是沟谷雨林的较高的植物多样性,加剧了宿主-真菌间的资源竞争(Phillips *et al.* 2003; de Long *et al.* 2013),导致仅少数竞争优势显著的真菌能够成功定殖。而低地雨林中较低的植物多样性可能削弱宿主对共生菌的筛选压力(Lodge & Cantrell 1995),使更多广适性真菌类群侵入根系,从而提升根内真菌多样性(Ghazoul & Sheil 2010)。上述结果表明,血叶兰对共生真菌的依赖性可能由生境条件动态调控,其根系共生关系并非由单一真菌类群主导,而是多类群协同作用的结果。

根区土壤共生真菌群落的多样性随植被类型从热带沟谷雨林向热带低地雨林过渡呈现显著下降趋势,与根内共生真菌的变化相反。热带沟谷雨林的高湿度、稳定年均温及丰富的植物多样性(Or *et al.* 2007),协同促进有机质分解与养分循环(Cicczazzo *et al.* 2016),并通过多样化根系分泌物,如糖类等维持较高的真菌多样性(宋战超等 2020)。而热带低地雨林的干湿季交替导致土壤温湿度剧烈波动,植物多样性下降导致宿主筛选机制减弱(Boddy *et al.* 2014; van

der Heijden *et al.* 2016),促使广适性腐生真菌竞争性排斥专性共生真菌,最终减少土壤共生真菌多样性。表明环境稳定性通过调控资源可利用性、植物多样性通过提供异质性碳源,共同驱动根区共生真菌群落的生态位分化,进而影响血叶兰的共生策略,即沟谷雨林中高多样性共生真菌通过功能冗余增强宿主适应性,而低地雨林中血叶兰依赖少数优势共生真菌以应对环境压力。

3.2 不同生境与共生真菌斑块协同驱动血叶兰种子萌发

兰科植物种子的原位共生萌发实验一直以来被作为研究植物-真菌共生关系的关键佐证(Zi *et al.* 2014),且种子活力是评估共生萌发机制的重要基础。血叶兰成熟种子活力达到 76.49%,说明种子胚具有一定的生理活性。而原位萌发率仅 2.73%,萌发率较低的原因可能与自然生境中共生真菌的分布相关。在 Selosse & Rousset (2011)提出的“真菌资源斑块化”理论中,菌根网络的空间分布类似于不均衡的“资源市场”,种子需精准定位到有效共生真菌的斑块区域才能完成萌发。然而,人工播种的种子袋通常以均匀方式投放,难以匹配自然生境中真菌斑块的高度动态分布(如腐殖质层、根系分泌物梯度等)。Jacquemyn *et al.* (2010)提出的“微生境彩票”效应,进一步解释了兰科植物种子萌发的偶然性。例如,大花杓兰 *Cypripedium macranthos* 的种子超出母株附近真菌斑块的核心区,导致在自然生境中萌发率仅为 1%–3% (McCormick *et al.* 2016)。李业斐等 (2024)对兜兰属 *Paphiopedilum* 进行原位共生萌发实验时,萌发率不足 5%,主因是其共生真菌仅存在于未受干扰的原植被腐殖层中,而在土壤中未呈现连续的梯度分布,导致种子在无菌资源区域无法建立共生关系(Han *et al.* 2016)。因此,野外血叶兰种子萌发高度依赖所处微生境中动态分布的共生真菌资源板块,其能否成功定位并接触有效菌丝网络决定了萌发概率。

中间过渡带植被类型结合了热带沟谷雨林与热带低地雨林间的环境特征(如湿度、温度、

土壤 pH 等), 是两种植被类型间形成的交错带, 其土壤中的有机质含量和养分有效性介于两种植被类型之间, 为不同的共生真菌提供了多样化的营养资源(Peay *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017)。菌根共生萌发形成的血叶兰原球茎, 主要集中分布于过渡带(A34)植被类型中, 这一现象可能与该区域独特的植被组成及其微环境密切相关。该植被类型主要以落叶乔木为主, 其凋落物会在土壤层上形成一定厚度的腐殖质层。Dearnaley *et al.* (2012)发现腐殖质中的纤维素含量较高, 且易被共生真菌所分泌的纤维素酶所降解, 为种子萌发提供可溶性糖类, 从而促进种子胚胎的发育和原球茎的形成。另外, 中间过渡带植被提供了相对其他单一植被类型更稳定的温湿度及适宜的光照条件, 避免了沟谷雨林的高湿度导致种子缺氧腐烂, 又可在一定程度上抑制低地雨林周期性干旱对共生真菌菌丝网络的破坏(Zhang *et al.* 2018)。因此, 中间过渡带植被类型形成的稳定性环境和持续性营养供给, 可能使得血叶兰及其共生真菌在该生境内能够保持较为高效的共生关系, 进而显示出相对于单一植被类型更高的萌发率。

本研究从血叶兰种子原位共生萌发获得的原球茎中分离出 XYLYDY2 号菌株, 被鉴定为角担菌属真菌, 属于常见的兰科菌根真菌(Rasmussen & Whigham 1998; Favre-Godal *et al.* 2020)。值得一提的是, 与血叶兰同为线柱兰亚族 *Spiranthinae* 的多个近缘属, 包括线柱兰属 *Zeuxine*、斑叶兰属 *Goodyera* 和金线兰属 *Anoectochilus* 等, 也均与角担菌属真菌存在共生关系(Porter 1942; Zhang *et al.* 2020; Bibikov *et al.* 2023), 这种共生关系可能是该亚族植物适应特定环境和生存方式的关键因素之一。研究进一步验证了在实验室条件下, XYLYDY2 号菌株对血叶兰种子的萌发具有显著促进作用, 并观察到菌丝团固定殖于宿主细胞内, 表明该菌株与血叶兰种子建立共生关系。de Rose *et al.* (2023)通过同位素标记实验证实, 角担菌属真菌可通过菌丝网络快速转运土壤中的碳源和氮源至宿主的原球茎, 使兰科植物从异养向自

养过渡, 这或许为血叶兰萌发加速的关键机制。通过缩短血叶兰种子在异养阶段的滞留时间, 从而触发其萌发程序的快速启动, 形成“宿主选择生境-生境筛选真菌-真菌促进宿主”的正反馈循环。

研究表明, 角担菌属真菌是促进血叶兰种子萌发的重要共生真菌, 而最适宜萌发的环境为热带低地雨林及其与热带沟谷雨林的中间过渡带。这一研究为血叶兰的种群恢复和兰科植物的保育提供了科学依据, 尤其在自然生境中优化兰科植物的繁殖策略方面具有重要意义。鉴于血叶兰种子萌发对特定真菌的高度依赖性, 未来可结合人工培育技术, 利用角担菌属真菌促进种子萌发, 提高血叶兰幼苗的存活率, 以支持其野外种群的恢复。未来研究应以完善血叶兰与角担菌属真菌的共生机制为重点, 从而为兰科植物尤其是血叶兰种群的恢复与生态适应性研究提供理论支持和科学依据。

致谢

中国科学院西双版纳植物园邵士成研究员和海南大学王伟伟博士对论文撰写给予指导、海南大学热带农林学院陈骅璋同学、王梦雪同学在野外试验给予帮助, 特此感谢。

作者贡献

兰烯: 野外调查、样品采集、实验及数据分析、论文构思及撰写; 赵莹: 论文修改; 罗天雄: 论文修改; 宋希强: 论文审核; 钟云芳: 实验指导; 冯雪萍: 论文修改。

利益冲突

作者声明, 该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Anghelescu NE, Vafaee Y, Ahmadzadeh K, Chen JT, 2023. Asymbiotic seed germination in terrestrial orchids: problems, progress, and prospects. In: Tiwari P, Chen JT (eds.) *Advances in Orchid Biology, Biotechnology and*

- Omics. Springer, Berlin. 221-260
- Arditti J, 1977. Orchid seed germination and seedling culture. *Orchid Biology, Reviews and Perspectives*, 1: 83-176
- Bibikov N, Voronina E, Kamzolkin O, Yarmeeva M, Kurakov A, 2023. Ceratobasidioid mycobionts in Russian populations of *Goodyera repens* and mycorrhizal specificity in Goodyerinae subtribe (Orchidaceae). <https://www.researchsquare.com/article/rs-3252508/v1>
- Boddy L, Buntgen U, Egli S, Gange AC, Heegaard E, Kirk PM, Mohammad A, Kauserud H, 2014. Climate variation effects on fungal fruiting. *Fungal Ecology*, 10: 20-33
- Bonfante P, Anca IA, 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63(1): 363-383
- Chauhan P, Attri LK, 2024. Mycorrhizal associations in orchids: a review. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 13(2): 279
- Chu W, Guo XL, Zhang C, Zhou LT, Wu ZY, Lin WX, 2022. Research progress and prospects on arbuscular mycorrhizal fungi-plant-root microbe interactions. *Chinese Journal of Eco-Agriculture (Bilingual)*, 30(11): 1709-1721 (in Chinese)
- Ciccazzo S, Esposito A, Borruso L, Brusetti L, 2016. Microbial communities and primary succession in high altitude mountain environments. *Annals of Microbiology*, 66: 43-60
- de Long JR, Swarts ND, Dixon KW, Egerton-Warburton LM, 2013. Mycorrhizal preference promotes habitat invasion by a native Australian orchid: *Microtis media*. *Annals of Botany*, 111(3): 409-418
- de Rose S, Kuga Y, Sillo F, Fochi V, Sakamoto N, Calevo J, Perotto S, Balestrini R, 2023. Plant and fungal gene expression coupled with stable isotope labeling provide novel information on sulfur uptake and metabolism in orchid mycorrhizal protocorms. *The Plant Journal*, 116(2): 416-431
- Dearnaley JD, Martos F, Selosse MA, 2012. 12 Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: Hock B (ed.) *Fungal associations* (Vol. 9). Springer, Berlin. 207-230
- Diez JM, 2007. Hierarchical patterns of symbiotic orchid germination linked to adult proximity and environmental gradients. *Journal of Ecology*, 95(1): 159-170
- Favre-Godal Q, Gourguillon L, Lordel-Madeleine S, Gindro K, Choisy P, 2020. Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza*, 30: 5-22
- Gao J, Wu Z, Zhang Q, Su D, Zhao R, Zou F, 2013. Comparison of compositions and functional guilds of bird communities across an edge-interior gradient in secondary forest at Houmiling, Hainan Island, China. *Biodiversity Science*, 21(6): 677
- Gao Y, Guo SX, Xing XK, 2019. Research advances in fungal diversity and symbiotic germination mechanisms of orchid seed germination. *Mycosystema*, 38(11): 1808-1825 (in Chinese)
- Ghazoul J, Sheil D, 2010. *Tropical rain forest ecology, diversity, and conservation*. Oxford University Press, New York. 1-534
- Han JY, Xiao HF, Gao JY, 2016. Seasonal dynamics of mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum spicerianum* (Rchb. f) Pfitzer—a critically endangered orchid from China. *Global Ecology & Conservation*, 6: 327-338
- Hughes KW, Petersen RH, Lickey EB, 2009. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist*, 182(3): 795-798
- Jacquemyn H, Brys R, Jongejans E, 2010. Seed limitation restricts population growth in shaded populations of a perennial woodland orchid. *Ecology*, 91(1): 119-129
- Jiang J, Zhang K, Cheng S, Nie Q, Zhou SX, Chen Q, Zhou JL, Zhen X, Li XT, Zhen TW, Xu MY, Hsiang T, Sun ZX, 2019. *Fusarium oxysporum* kb-3 from *Bletilla striata*: an orchid mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza*, 29(5): 531-540
- Ke HL, Song XQ, Tan ZQ, Liu HX, Luo YB, 2007. Diversity of endophytic fungi in the roots of wild *Doritis pulcherrima*. *Biodiversity Science*, 15(5): 456-462 (in Chinese)
- Kottke I, Haug I, Setaro S, Suárez JP, Weiß M, Preußing M, Nebel M, Oberwinkler F, 2008. Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology*, 9(1): 13-23
- Lan G, Wu Z, Yang C, Sun R, Chen B, Zhang X, 2021. Forest conversion alters the structure and functional processes of tropical forest soil microbial communities. *Land Degradation & Development*, 32(2): 613-627
- Li T, Wu S, Yang W, Selosse MA, Gao J, 2021. How mycorrhizal associations influence orchid distribution and population dynamics. *Frontiers in Plant Science*, 12: 647114
- Li YF, Chen H, Li JZ, Zeng JJ, Wu KL, Zeng SJ, Fang L, 2024. Comparative study on morphology and anatomy of symbiotic and asymbiotic seed germination in *Paphiopedilum spicerianum*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1374.Q.20241210.1434.002.html> (in Chinese)
- Lodge DJ, Cantrell S, 1995. *Fungal communities in wet*

- tropical forests: variation in time and space. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1): 1391-1398
- Ma HX, Si J, Dai YC, Zhu AH, Cui BK, Fan YG, Yuan Y, He SH, 2022. Diversity of wood-inhabiting macrofungi in Hainan Province, south China. *Mycosystema*, 41: 695-712
- McCormick MK, Taylor DL, Whigham DF, Burnett Jr RK, 2016. Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, 104(3): 744-754
- Oliveira SF, Bocayuva MF, Veloso TGR, Bazzolli DMS, da Silva CC, Pereira OL, Kasuya MCM, 2014. Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. *Mycorrhiza*, 24: 55-64
- Or D, Smets BF, Wraith JM, Dechesne A, Friedman SP, 2007. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media—a review. *Advances in Water Resources*, 30(6-7): 1505-1527
- Peay KG, von Sperber C, Cardarelli E, Toju H, Francis CA, Chadwick OA, Vitousek PM, 2017. Convergence and contrast in the community structure of Bacteria, Fungi and Archaea along a tropical elevation-climate gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5): fix045
- Perez-Escobar OA, Bogarín D, Przelomska NA *et al.* (more than 20 authors), 2024. The origin and speciation of orchids. *New Phytologist*, 242(2): 700-716
- Phillips OL, Martínez RV, Vargas PN, Monteagudo AL, Zans MEC, Sánchez WG, Cruz AP, Timaná M, Yli-Halla M, Rose S, 2003. Efficient plot-based floristic assessment of tropical forests. *Journal of Tropical Ecology*, 19(6): 629-645
- Porter JN, 1942. The mycorrhiza of *Zeuxine strateumatica*. *Mycologia*, 34(4): 380-390
- Rasmussen HN, Whigham DF, 1998. Importance of woody debris in seed germination of *Tipularia discolor* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 85(6): 829-834
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman ARA, 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2): 314-330
- Selosse MA, Rousset F, 2011. The plant-fungal marketplace. *Science*, 333(6044): 828-829
- Smith SE, Read DJ, 2010. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego. 1-605
- Song ZC, Wang H, Liu SR, Hu JJ, Ming AG, Chen H, Li CY, Wu JT, Shi ZM, Lu LH, Cai DX, 2020. Relationship between tree species richness in South Asian subtropical mixed plantations and soil microbial diversity and community composition. *Acta Ecologica Sinica*, 40(22): 8265-8273 (in Chinese)
- Taylor DL, McCormick MK, 2010. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 177(4): 1020-1033
- Tsutsumi C, Hosoya T, Yamashita Y, Yukawa T, 2022. Mycorrhizal fungi isolated from *Liparis krameri* (Orchidaceae) in Japan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany*, 48(3): 79-87
- van der Heijden MG, de Bruin S, Luckerhoff L, van Logtestijn RS, Schlaeppi K, 2016. A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. *The ISME Journal*, 10(2): 389-399
- Wang XM, Li YJ, Song XQ, Meng QW, Zhu J, Zhao Y, Yu WG, 2017. Influence of host tree species on isolation and communities of mycorrhizal and endophytic fungi from roots of a tropical epiphytic orchid, *Dendrobium sinense* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 27: 709-718
- Waterman RJ, Klooster MR, Hentrich H, Bidartondo MI, 2012. Species interactions of mycoheterotrophic plants: specialization and its potential consequences. In: Merckx V (ed.) *Mycoheterotrophy*. Springer, New York. 267-296
- Watkinson SC, 2016. Mutualistic symbiosis between fungi and autotrophs. In: Watkinson SC, Boddy L, Money NP (eds.) *The fungi*. Academic Press, Cambridge. 205-243
- Waud M, Busschaert P, Ruyters S, Jacquemyn H, Lievens B, 2014. Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology Resources*, 14(4): 679-699
- Weiβ M, Waller F, Zuccaro A, Selosse MA, 2016. Sebaciales—one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist*, 211(1): 20-40
- Wu HF, Song XQ, Liu HX, 2012. *Ex-situ* symbiotic seed germination of *Dendrobium catenatum*. *Acta Ecologica Sinica*, 32(8): 2491-2497 (in Chinese)
- Xie TX, Zheng QD, Wang Y, Lan LY, Xu YF, Ou Y, Yao YH, Ai Y, 2024. Research progress on the symbiotic relationship between Orchidaceae plants and symbiotic fungi. *Molecular Plant Breeding*, 22(8): 2778-2784 (in Chinese)
- Xing FW, 2012. *Catalogue of plant species diversity in Hainan*. Huazhong University of Science and Technology Press, Wuhan. 1-630 (in Chinese)
- Xing X, Jacquemyn H, Gai X, Gao Y, Liu Q, Zhao Z, Guo S, 2019. The impact of life form on the architecture of orchid mycorrhizal networks in tropical forest. *Oikos*,

128(9): 1254-1264

- Yang F, Gao J, Li J, Wei Y, Xie Q, Jin J, Lu C, Zhu W, Wong SM & Zhu G, 2024. The China orchid industry: past and future perspectives. *Ornamental Plant Research*, 4(1): e002
- Yeh CM, Chung K, Liang CK, Tsai WC, 2019. New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. *Applied Sciences*, 9(3): 585
- Yeung EC, 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*, 58(1): 33
- Yu X, Xie TX, Liu B, Zhang DY, Liu XD, Ai Y, Liu ZJ, 2019. The complete chloroplast genome sequence of *Ludisia discolor* from Hainan of China. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2): 3663-3664
- Zhang S, Yang Y, Li J, Qin J, Zhang W, Huang W, Hu H, 2018. Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, 40(4): 196-208
- Zhang WJ, Gao SN, Liang YQ, Wang MG, Shao SC, 2024. Distribution characteristics of endophytic and rhizosphere soil fungi at different developmental stages of *Spathoglottis plicata*. *Acta Microbiologica Sinica*, 44(9): 3366-3378 (in Chinese)
- Zhang Y, Li Y, Chen X, Meng Z, Guo S, 2020. Combined metabolome and transcriptome analyses reveal the effects of mycorrhizal fungus *Ceratobasidium* sp. AR2 on the flavonoid accumulation in *Anoectochilus roxburghii* during different growth stages. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2): 564
- Zi XM, Sheng CL, Goodale UM, Shao SC, Gao JY, 2014. *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 24(7): 487-499

[附中文参考文献]

- 储薇, 郭信来, 张晨, 周柳婷, 吴则焰, 林文雄, 2022. 丛枝菌根真菌-植物-根际微生物互作研究进展与展望. *中国生态农业学报*, 30(11): 1709-1721
- 高越, 郭顺星, 邢晓科, 2019. 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*, 38(11): 1808-1825
- 柯海丽, 宋希强, 谭志琼, 刘红霞, 罗毅波, 2007. 野生五唇兰根部内生真菌多样性研究. *生物多样性*, 15(5): 456-462
- 李业斐, 陈红, 李俊泽, 曾晶珏, 吴坤林, 曾宋君, 房林, 2024. 白旗兜兰种子共生萌发与非共生萌发的形态解剖学比较研究. *热带亚热带植物学报*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1374.Q.20241210.1434.002.html>
- 马海霞, 司静, 戴玉成, 朱安红, 崔宝凯, 范宇光, 员媛, 何双辉, 2022. 中国海南省木生大型真菌多样性研究. *菌物学报*, 41: 695-712
- 宋战超, 王晖, 刘世荣, 胡佳佳, 明安刚, 陈海, 李朝英, 伍俊廷, 史作民, 卢立华, 蔡道雄, 2020. 南亚热带混交人工林树种丰富度与土壤微生物多样性和群落组成的关系. *生态学报*, 40(22): 8265-8273
- 吴慧凤, 宋希强, 刘红霞, 2012. 铁皮石斛种子的室内共生萌发. *生态学报*, 32(8): 2491-2497
- 谢泰祥, 郑清冬, 王艺, 兰琳英, 徐艳芳, 欧悦, 姚亚合, 艾叶, 2024. 兰科植物与共生真菌互作关系的研究进展. *分子植物育种*, 22(8): 2778-2784
- 邢福武, 2012. 海南植物物种多样性编目. 武汉: 华中科技大学出版社. 1-630
- 张文杰, 高世南, 梁玉琼, 王梦雪, 邵士成, 2024. 紫花苞舌兰不同发育阶段根内及根区土壤真菌的分布特征. *微生物学报*, 44(9): 3366-3378