

不同培养基对兰科药用植物手参原球茎共生真菌的分离效果

姜喜铃, 丁万隆, 邢晓科*

中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 兰科植物手参 *Gymnadenia conopsea* 作为国家二级重点保护野生植物具有重要的药用价值。目前手参还未实现人工栽培, 但其种子的真菌共生萌发已获成功。为明确除促萌发真菌外, 还有哪些土著真菌参与了手参种子的萌发过程, 本研究在自然条件下采用促萌发真菌伴播手参种子, 获得了种子萌发形成的原球茎, 进而对比了 6 种常见的培养基 PDA (马铃薯葡萄糖琼脂培养基)、MMN (改良 Melin-Norkrans 培养基)、FIM (真菌分离培养基)、MEA (麦芽浸膏琼脂培养基)、CAM (胡萝卜葡萄糖琼脂培养基) 和 CMA (玉米粉琼脂培养基) 对手参原球茎共生真菌分离效果的影响。共从 6 种培养基上分离获得了 75 个菌株, 其中 MMN、CAM、PDA、FIM、MEA、CMA 培养基依次分离得到 20 株、16 株、15 株、11 株、8 株、5 株菌。此外, 真菌的多样性分析结果表明, MMN 培养基的 Chao 1、Shannon-Wiener 和 Simpson 多样性指数最高, CAM 和 PDA 培养基次之, CMA 培养基最低。综上所述, 真菌分离效果最好的是 MMN 培养基, 其次是 CAM 和 PDA 培养基, 而 FIM 和 MEA 培养基对真菌的分离效果影响不大, CMA 培养基的分离效果最差。本研究结果可为其他兰科植物原球茎共生真菌的分离提供借鉴, 所获得的菌株也有望进一步应用于功能菌剂的研发。

关键词: 兰科种子; 共生萌发; 共生真菌分离; 真菌多样性

[引用本文] 姜喜铃, 丁万隆, 邢晓科, 2022. 不同培养基对兰科药用植物手参原球茎共生真菌的分离效果. 菌物学报, 41(6): 952-961

Jiang XL, Ding WL, Xing XK, 2022. Effects of different media on the isolation of symbiotic fungi from protocorm of medicinal orchid *Gymnadenia conopsea*. Mycosystema, 41(6): 952-961

基金项目: 国家自然科学基金(32170013); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程-重大协同创新项目(2021-1-I2M-031) Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (32170013), and CAMS Initiative for Innovative Medicine (2021-1-I2M-031).

*Corresponding author. E-mail: xkxing2009@hotmail.com

ORCID: XING Xiaoke (0000-0002-1845-5076)

Received: 2022-01-26, accepted: 2022-02-26

Effects of different media on the isolation of symbiotic fungi from protocorm of medicinal orchid *Gymnadenia conopsea*

JIANG Xiling, DING Wanlong, XING Xiaoke*

Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: The terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea* with important medicinal value has been listed in the National Key Protected Wild Plant (Category II). At present, *G. conopsea* could not be cultivated artificially, however, seed symbiotic germination has been successfully achieved. In order to determine whether other indigenous fungi were also involved in seed germination process besides the initial germination-promoting fungi, isolation of symbiotic fungi from protocorms formed by germination-promoting fungi under natural conditions were performed on six common media PDA (potato dextrose agar medium), MMN (modified Melin-Norkrans medium), FIM (fungal isolation medium), MEA (malt extract agar medium), CAM (carrot agar medium) and CMA (corn meal agar medium), and the relative abundance were compared. In total, 75 fungal isolates were obtained from the 6 media, and the number of fungal isolates obtained from MMN, CAM, PDA, FIM, MEA and CMA was 20, 16, 15, 11, 8 and 5, respectively. The results of fungal diversity analysis showed that fungal diversity index (Chao 1, Shannon-Wiener, and Simpson diversity index) of the isolates from MMN medium was the highest, and that from CAM and PDA medium was less, while that from CMA medium was the lowest. In short, MMN is the most effective, followed by CAM and PDA, and FIM and MEA media have little effect, while CMA is the worst. Our results provide reference for the isolation of symbiotic fungi from protocorms of other orchids. The fungal strains obtained in this study hopefully could be further used for research purpose and development of functional microbial agents.

Keywords: orchid seed; symbiotic germination; isolation of symbiotic fungi; fungal diversity

兰科是世界上有花植物中最大的科之一, 据估计已超过 26 000 种(Joppa *et al.* 2011), 可与多种真菌共生, 然而兰科植物由于种子微小, 无胚乳, 在自然条件下萌发困难, 因此非常依赖真菌为种子萌发提供必要的营养(Smith & Read 2008; Rafter *et al.* 2016), 从而促进种子萌发和植物的生长发育(Rasmussen & Rasmussen 2009), 因而兰科植物与真菌有着天然的共生关系。菌根真菌已被认为是影响兰科植物分布的重要因素之一(McCormick *et al.* 2018), 并在缓解植物生物和非生物胁迫如干旱、盐胁迫、极端温度、抗病

等方面发挥着重要作用(McCormick & Jacquemyn 2014; Diagne *et al.* 2020)。目前认为兰科菌根真菌类群主要包括角担菌科 Ceratobasidiaceae、胶膜菌科 Tulasnellaceae 和 Serendipitaceae 等(Dearnaley *et al.* 2012; Jacquemyn *et al.* 2017)。

为了实现兰科种子的萌发, 通常采用的方法是从植物的根部或原球茎中分离共生真菌, 这些分离得到的菌株在促进兰科植物种子萌发(Gao *et al.* 2020)、幼苗生长(Porras-Alfaro & Bayman 2007)以及对兰科植物的种群恢复方面具有重要作用(Li *et al.* 2021; Zhao *et al.* 2021), 尤其是从

原球茎中分离的共生真菌已被证明对种子萌发具有较好的促进效果(Selosse *et al.* 2017; Meng *et al.* 2019)。因此,分离和鉴定兰科植物原球茎共生真菌,对于揭示兰科植物共生真菌的多样性,筛选促进种子萌发的菌株,以及进一步研究共生真菌的生态功能等方面均具有重要意义(Yang *et al.* 2020; Zhao *et al.* 2021)。然而,原球茎共生真菌的成功分离受到多种因素的影响,如分离部位(Shao *et al.* 2020)、分离方法(Zhu *et al.* 2008)和培养基种类(黄芳和张春英 2013)等。其中培养基种类对于兰科植物共生真菌分离效果的影响较大,例如 Shimura & Koda (2005)利用 5 种培养基 AWA (酸性水琼脂培养基)、CWA (氯霉素水琼脂培养基)、PSA (马铃薯蔗糖琼脂培养基)、OMA1 (燕麦琼脂培养基)和 GPA (绿豌豆琼脂培养基)对杓兰 *Cypripedium calceolus* 共生真菌进行分离,仅在 CWA 和 OMA1 培养基分离到 3 种类似丝核菌 *Rhizoctonia* 的真菌。由于不同真菌通常具有多样化和特定的营养需求,在缺乏特定营养物质的情况下难以生长,因此不同培养基对真菌分离的效果也通常存在显著差异(Gao & Liu 2010; Qi *et al.* 2012)。

手参 *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. 是一种广域分布的地生型兰科植物,零星分布于亚洲的温带、亚热带以及欧洲北部地区,在我国主要分布于东北、华北、西北及四川、云南、西藏等地。手参为我国传统中药,也是藏药和蒙药的常用药,具有补肾益精、理气止痛等作用(Shang *et al.* 2017)。由于手参还未实现人工栽培,其开发和应用完全依赖野生资源,市场需求的不断攀升加之较低的自然繁殖率,其野生种群数量急剧下降,现已被我国《重点保护野生植物名录》列为二级保护植物(国家林草局和农业农村部,2021年9月7日, http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-09/09/content_5636409.htm)。为实现手参资源的可持续利用,在前期研究中我们从手参成年

植株根部分离获得了一个菌株 *Ceratobasidium* GS2,并在实验室条件下首次成功实现了手参种子真菌共生萌发(高越等 2019; Gao *et al.* 2020),进而在自然条件下与该菌株伴播同样实现了手参种子的萌发(结果另文发表)。由于手参自然繁殖率较低,有关手参的有性繁殖还未见相关报道,另外,在野生条件下的土壤中找到其细微如尘的种子自然萌发所形成的原球茎十分困难,而前期在自然条件下手参种子的成功萌发则使我们获得手参的原球茎成为可能。因此,本研究拟明确在自然条件下,除了所使用的 GS2 菌株外,在种子萌发突破种皮后形成原球茎的过程中,有哪些土著真菌参与其中,因而采用不同的培养基对原球茎中的共生真菌进行了分离,并对比不同培养基对原球茎共生真菌的分离效果,以期为今后开展其他兰科植物原球茎共生真菌的分离提供参考。

1 材料与方法

1.1 手参原球茎来源

1.1.1 菌株来源

GS2 (GenBank 登录号 OK655 751)是从手参根部分离出的一株促萌发真菌,其被证明可以在实验室条件下促进手参种子萌发和早期幼苗发育(高越等 2019; Gao *et al.* 2020)。

1.1.2 真菌栽培种制备

按照麦麸:树叶:锯末=2:1:1 的比例制作固体基质,保持含水量在 60%左右,然后将基质装入至 500 mL 培养瓶的 2/3 处,并在 121 °C 下灭菌 3 h。待基质冷却后,在超净工作台中向每个瓶子内接种 5 个 1 cm×1 cm 的 GS2 菌株接种块,用封口膜密封后置于 25 °C 的暗培养室中培养 1 个月左右,待菌丝长满整个培养瓶后即可用作原位种子萌发实验的栽培种。

1.1.3 实验设计

实验用种子袋为 8 cm×7 cm 的可降解玉米纤维袋,共设计 3 组实验,每组 100 个种子袋,

每袋装入约 150 粒种子。A 组: 接入 2 g GS2 栽培种; B 组: 接入 2 g 无菌基质; C 组: 仅含种子。

1.1.4 手参种子野外萌发实验

2019 年 4 月在西藏林芝比日神山海拔 3 700 m 的林缘草地, 将所有手参种子袋随机埋在深度为 10–13 cm 土壤中, 并附上塑料标签以便回收。于 2020 年 9 月回收种子袋, 发现 A 组中的手参种子已有原球茎形成(图 1), 而 B 组和 C 组中的手参种子均无萌发迹象。将收集到的含有原球茎的种子袋存于冰盒中带回实验室进行共生真菌的分离工作。

1.2 培养基类型

PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 12 g, 去离子水 1 000 mL, 马铃薯切块后加水煮沸 20 min, 过滤后取滤液定容至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 25 min。

MMN 培养基: CaCl_2 0.05 g, MgSO_4 0.15 g, NaCl 0.025 g, FeCl_3 (1%) 1.2 mL, KH_2PO_4 0.5 g, Vitamin B₁ 100 μg , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g, 麦芽粉 6 g, 葡萄糖 10 g, 柠檬酸 0.2 g, 琼脂 12 g, 去离子水 1 000 mL, 121 °C 灭菌 25 min。

MEA 培养基: 麦芽粉 30 g, 大豆蛋白胨 3 g, 琼脂 15 g, 去离子水 1 000 mL, 121 °C 灭菌

25 min。

FIM 培养基: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.2 g, KCl 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 酵母膏 0.1 g, 蔗糖 5.0 g, 琼脂 12 g, 去离子水 1 000 mL, 121 °C 灭菌 25 min。

CMA 培养基: 玉米粉 40 g, 琼脂 12 g, 去离子水 1 000 mL, 121 °C 灭菌 25 min。

CAM 培养基: 胡萝卜 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 12 g, 去离子水 1 000 mL, 胡萝卜切块后加水煮沸 20 min, 过滤后取滤液定容至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 25 min。

1.3 共生真菌的分离和纯化

选取已形成原球茎的 5 个种子袋, 每个种子袋随机取 10 个原球茎, 分离时采用上述 6 种培养基。制备好的培养基以 1 cm 直径的打孔器打孔, 将培养基片转至新培养皿中, 每皿间隔放入 7 片, 每种培养基各制备 6 皿。将原球茎置于流水下冲洗干净, 依次浸没在 75%乙醇溶液中 1 min, 1.5% NaClO 溶液 1 min, 75%乙醇溶液 30 s, 无菌水清洗 6 次, 重复此操作。将已表面消毒的原球茎置于无菌的培养皿中, 倒入少量无菌水, 用回形针轻刮原球茎皮层, 释放菌丝团, 用封口膜封口后置于 25 °C 黑暗条件下培养 24 h (Zhu *et al.* 2008)。

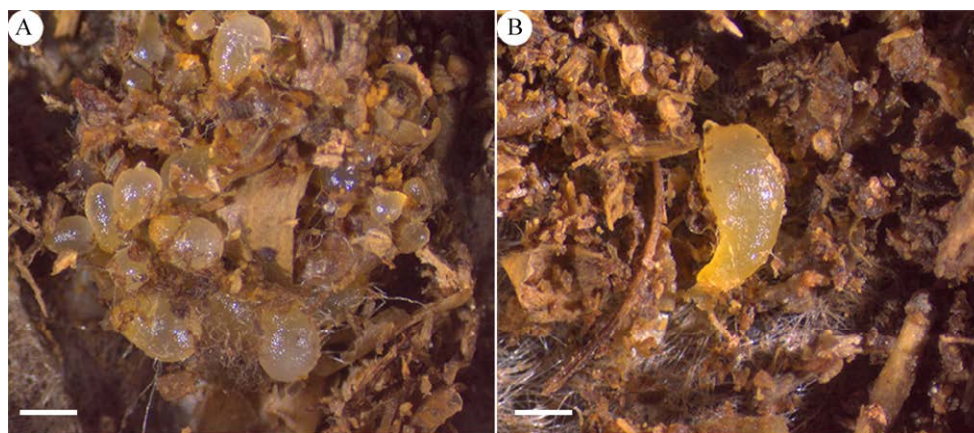


图 1 自然条件下 GS2 伴播手参种子的萌发 A: 种子突破表皮; B: 形成的原球茎. 标尺=500 μm

Fig. 1 Germinating seeds of *Gymnadenia conopsea* mixed with GS2 inoculum under natural condition. A: Seeds break through testa; B: Protocorm formation. Bars=500 μm .

真菌的分离采用单菌丝团分离培养法,具体操作如下:在体视显微镜下用移液枪从每份培养液中吸取单个菌丝团分别将其转接到直径 1 cm 圆形培养基(PDA、MMN、MEA、FIM、CMA 和 CAM 培养基)上,封口膜封口后置于 25 ℃ 黑暗条件下培养 3–5 d。

在无菌条件下,用接种针挑取菌丝尖端 0.5 cm 左右的菌丝,转接至相应的培养基上,25 ℃ 黑暗条件下培养,反复纯化 3 次。将纯化后的菌株转接到试管中,4 ℃ 保存。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 形态学鉴定

根据《真菌鉴定手册》对从不同培养基分离的共生真菌进行形态学的初步鉴定(魏景超 1979)。

1.4.2 分子生物学鉴定

参照 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)使用说明提取菌株的 DNA。采用通用引物 ITS1-OF/ITS4-OF (Waud *et al.* 2014)和 ITS1/ITS4 (White *et al.* 1990)扩增 ITS 序列。25 μL 的 PCR 扩增反应体系包括:12.5 μL PCR Master Mix,引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 2 mL,用 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 15 s, 58 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 50 s, 共 35 个循环;72 ℃ 再延伸 7 min,4 ℃ 保存。取 3 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物由中美泰和(北京)生物科技有限公司进行双向测序。获得的序列在 GenBank 中进行 BLAT 比对,查找相似性最高的序列信息,并结合菌株形态学特征,确定真菌种类。

1.5 数据分析

为研究不同培养基上手参原球茎共生真菌类群的丰富度和多样性,采用相对多度(relative abundance)评估分离的真菌物种对群落总多度贡献的大小,以物种个体数量作为多度的测量指

标(马克平 1994);采用 Chao 丰富度指数(Chao1 richness index)作为度量物种丰富度的指标(Chao 1984),辛普森多样性指数(Simpson diversity index) (Simpson 1949)和香农-威纳多样性指数(Shannon-Wiener diversity index) (Spellerberg & Fedor 2003)分析从不同培养基分离的共生真菌多样性。利用 R 软件包计算各参数(R Core Team 2016)。采用 SPSS 26.0 (IBM SPSS Statistics, USA) 进行统计学分析,统计检验为 Kruskal-Wallis 检验,以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结果与分析

2.1 手参原球茎共生真菌的群落组成

利用单菌丝团分离培养法从 6 种培养基共获得 75 株真菌,结合形态学和 rDNA-ITS 序列最终鉴定为 30 种,隶属 12 个科,相对多度最高的 3 个科分别是裂褶菌科 Schizophyllaceae (42.86%)、耙齿菌科 Irpicaceae (22.86%)和角担菌科 Ceratobasidiaceae (11.43%) (图 2A),每个菌株在不同培养基上的分离率见表 1。

2.2 不同培养基对手参原球茎共生真菌的分离效果的影响

在从 5 组手参原球茎分离的 75 株共生真菌中,其中从 MMN 培养基上分离得到的真菌菌株数量最多(20 株),略高于 CAM 培养基(16 株)和 PDA (15 株)上分离得到的菌株数量,分离菌株数量最少的是 CMA (5 株)。对比担子菌与子囊菌的分离效果,共分离得到 11 株子囊菌,64 株担子菌,仅 FIM 培养基上未分离到子囊菌,其余 5 种培养基中均分离到子囊菌;从 6 种培养基中都分离到了担子菌,其中在 MMN 和 CAM 培养基中均分离到了原始菌株 GS2,在 PDA 和 FIM 培养基上分离到了角担菌科真菌 B-F-5B-1。此外,在 6 种培养基中均分离到了裂褶菌科真菌,说明裂褶菌科真菌对培养基的选择性较低,其中 MMN 培养基对裂褶菌科的分离效果最好,其相

对多度最高为 30%; FIM 对角担菌科真菌的分离效果最好, 其相对多度最高为 18.2%, CMA 培养基对耙齿菌的分离效果较好, 其相对丰度最高为 18.8% (表 1)。

6 种培养基真菌的分离结果见表 1, 从 PDA 培养基上分离得到的真菌物种数均值最高, 为 2.40 ± 0.80 , 其次是 MMN (2.20 ± 0.75) 和 CAM 培养基 (2.00 ± 1.41), 但不具有统计意义上的显著差异 ($P\geq0.05$); 从 CMA 培养基中分离得到的真菌物种的均值最低, 仅有 1.00 ± 0.63 。MMN、CAM 和 PDA 培养基上分离得到的真菌菌株平均值分别为 4.00 ± 1.27 、 3.20 ± 1.47 和 3.00 ± 1.90 , FIM、MEA、CMA 则较少, 分别为 2.20 ± 0.98 、 1.60 ± 1.02 、 1.00 ± 0.63 , 6 种培养基的分离得到的真菌菌株平均值存在显著差异 ($P<0.05$)。综合真菌分离的物种和菌株数量, MMN 培养基在对手参原球茎共生真菌显示了较为充分的分离效果。

2.3 不同培养基分离共生真菌的多样性

从 6 种培养基分离共生真菌的多样性具有

显著性差异 (Simpson 指数, $P<0.05$; Shannon-Wiener 指数, $P<0.05$), 其中 MMN 培养基的 Shannon-Wiener 和 Simpson 指数最高, 表明其具有较好的均衡性和多样性, 其次是 CAM 和 PDA 培养基 (表 2)。CMA 培养基的 Shannon-Wiener 和 Simpson 指数最低, 这可能是 CMA 培养基对真菌的选择性较高, 说明 CMA 培养基适用于分离和培养特定种属的真菌, 例如, 仅在 CMA 培养基上分离到了 Diaporthaceae 真菌。此外, 不同培养基的真菌丰富度具有显著性差异 ($P<0.05$) (表 2), MMN 培养基的 Chao 1 指数仍高于其他培养基。此外, 6 种培养基分离的真菌物种组成和相对多度略有差异, 其中 MMN 和 PDA 的相对多度最高, 而 MEA 和 CMA 培养基的相对多度最低 (图 2B), 这可能是由于真菌对营养的要求不同所导致的对培养基的偏好性选择。因此, 就真菌的物种丰富度和物种多样性而言, 对真菌分离效果最好的培养基为 MMN 培养基, 其次是 CAM 和 PDA 培养基。

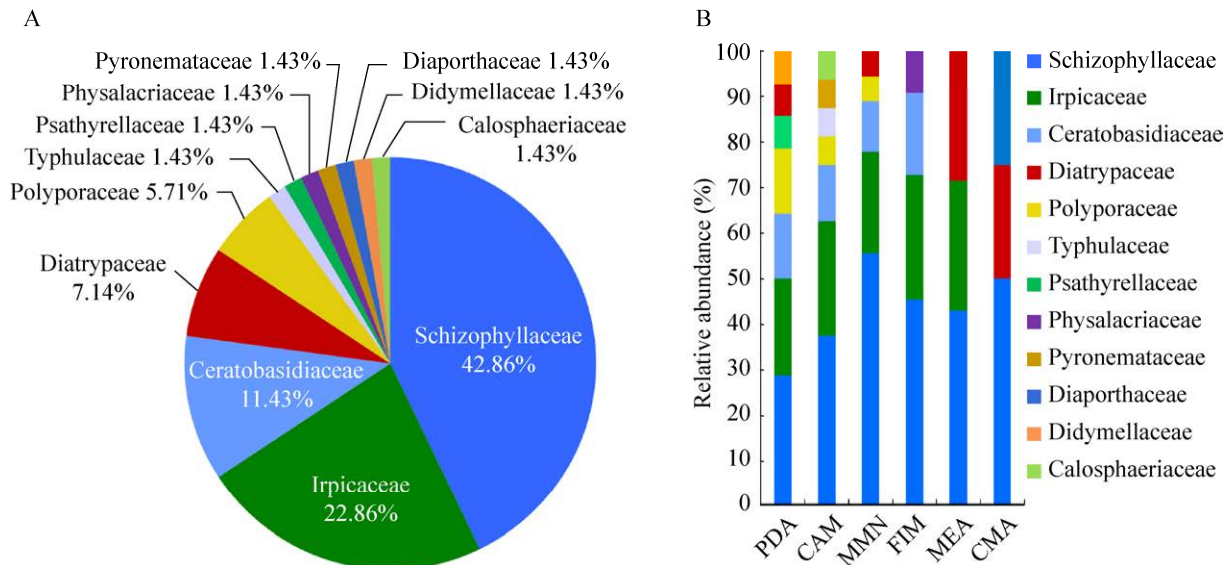


图 2 手参原球茎共生真菌科水平的相对多度 A: 所有分离到的共生真菌的相对多度; B: 每种培养基上分离到的共生真菌的相对多度

Fig. 2 Relative abundance of symbiotic fungi isolated from protocorm of *Gymnadenia conopsea* at family level in total (A) and each medium (B).

表 1 真菌的分子鉴定及不同培养基上的相对多度

Table 1 Molecular identification and relative abundance of fungi on different media

样本 Sample	GenBank 登录号 GenBank accession No.	鉴定结果 Proposed identification	相对多度 Relative abundance (%)					
			PDA	MMN	MEA	FIM	CMA	CAM
Z-E-4A-1	OL471317	Basidiomycota sp.			12.5			
Z-M-5A-1	OL471298	<i>Ceratobasidium</i> sp.		10				12.5
B-F-5B-1	OL471297	Ceratobasidiaceae sp.	13.3			18.2		
B-H-5A-1	OL693805	<i>Chaetomium</i> sp.						6.3
B-E-5C-1	OL471318	<i>Coprinopsis</i> sp.	6.7					
B-F-5A-1	OL471319	<i>Cryptomarasmius</i> sp.				9.1		
Z-H-4A-1	OL693804	<i>Diatrype</i> sp.						6.3
Z-E-5A-1	OL693807	Didymellaceae sp.	6.7					
Z-C-5C-1	OL693808	<i>Eutypella</i> sp.					20	
B-M-2A-1	OL471289	<i>Funalia</i> sp.		5				
Z-M-4B-2	OL471306	<i>Irpex</i> sp. 1	6.7	5		9.1		6.3
Z-M-5D-1	OL471304	<i>Irpex</i> sp. 2	6.7	5		9.1		18.8
Z-E-4A-2	OL471305	<i>Irpex</i> sp. 3			12.5			
Z-F-4A-3	OL471303	<i>Irpex</i> sp. 4	6.7	10	12.5	9.1		
Z-M-4C-1	OL693802	<i>Lemonniera</i> sp.		5				
Z-E-4D-1	OL693806	<i>Peroneutypa</i> sp.	6.7	5	25		20	
Z-P-4D-1	OL471316	Polyporales sp.	6.7				20	
Z-P-5A-1	OL471295	<i>Schizophyllum</i> sp. 1	6.7					
Z-C-5A-2	OL471294	<i>Schizophyllum</i> sp. 2					20	
Z-C-5B-1	OL471292	<i>Schizophyllum</i> sp. 3					20	
Z-E-4C-1	OL471293	<i>Schizophyllum</i> sp. 4			25			
Z-F-4A-2	OL471291	<i>Schizophyllum</i> sp. 5	20	30	12.5	27.3		18.8
Z-H-4B-2	OL471290	<i>Schizophyllum</i> sp. 6		15		9.1		12.5
Z-M-2A-1	OL471311	<i>Schizophyllum</i> sp. 7		5				
Z-H-3A-2	OL471296	<i>Schizophyllum</i> sp. 8				9.1		6.3
Z-M-5E-1	OL693803	Sordariomycetes sp.		5				
Z-H-3C-1	OL471314	<i>Typhula</i> sp.						6.3
Z-H-5C-2	OL471307	<i>Trametes</i> sp. 1						6.3
B-E-5A-1	OL471308	<i>Trametes</i> sp. 2	6.7					
B-E-5B-1	OL471309	<i>Trametes</i> sp. 3	6.7					

表 2 不同培养基对手参原球茎共生真菌的多样性影响

Table 2 Effects of different media on diversity of symbiotic fungi isolated from germinating seeds of *Gymnadenia conopsea*

培养基 Media	物种数均值 Observed species	菌株个体数均值 Number of isolates	Chao 1 丰富度指数 Chao1 richness index	香农-维纳指数 Shannon-Wiener index	辛普森指数 Simpson's index
PDA	2.40±0.80a	3.00±1.90b	3.80±2.41b	0.79±0.41b	0.62±0.11a
MMN	2.20±0.75a	4.00±1.27a	4.94±1.43a	1.10±0.34a	0.66±0.10a
CAM	2.00±1.41a	3.20±1.47b	4.20±1.08a	0.98±0.26ab	0.63±0.10a
FIM	1.60±1.02b	2.20±0.98c	3.00±1.76c	0.70±0.35b	0.48±0.26b
MEA	1.20±0.75b	1.60±1.36c	2.38±1.39c	0.54±0.30c	0.39±0.25c
CMA	1.00±0.63c	1.00±0.63d	1.88±1.24c	0.42±0.07d	0.33±0.24d

注：同一列标有不同小写字母的表明组间差异显著($P<0.05$)，相同小写字母的表明组间差异不显著($P\geq0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significantly difference ($P<0.05$), same letters in the same column indicate no significant difference ($P\geq0.05$).

3 讨论

本研究通过对比不同培养基对分离共生真菌多样性的影响,发现手参原球茎中共生真菌分离效果与所使用的培养基存在一定的关联性,另外还发现手参原球茎中的共生真菌具有较高的多样性。除了本研究中常见的 6 种培养基外,SDA (沙氏葡萄糖琼脂培养基)、AWA、CWA、SAM (蔗糖琼脂培养基)、OMA 和 GPA 也可作为分离兰科共生真菌的基础培养基(Qayyum *et al.* 2016; Zettler & Corey 2018)。由于不同真菌对营养的多样化需求,不同培养基成分对真菌的分离效果不同,如 MMN 和 PDA 对成年兰科共生真菌有着非常好的分离效果(Stewart *et al.* 2003; Adeoyo *et al.* 2019),而 CWA 和 OMA 培养基对构兰中的共生真菌表现出较好的分离效果(Shimura & Koda 2005; Shimura *et al.* 2009)。本研究发现 MMN、CAM 及 PDA 培养基对手参原球茎共生真菌的分离效果较好,这可能由于这些培养基中的高碳水化合物含量(例如 PDA=20 g 葡萄糖/L)更受对营养需求高、生长速度较快的原球茎共生真菌(例如裂褶菌属 *Schizophyllum* sp.和角担菌属 *Ceratobasidium* sp.真菌)等的青睐。Yokoya *et al.* (2015)利用 FIM 成功地从马达加斯加的附生、陆生和石生兰科植物中分离出了一些广谱的内生真菌,尽管 FIM 培养的碳水化合物含量较低(FIM=5 g 蔗糖/L),但在分离其他兰科植物(例如鬼兰 *Dendrophylax lindenii* 和大花万代兰 *Vanda coerulea*)的共生真菌方面也有着不错的效果(Aggarwal *et al.* 2012; Hoang *et al.* 2017)。此外,含有丰富碳水化合物的 CMA 培养基和 MMN 培养基在分离兰科共生真菌方面也具有良好的分离效果(Marx 1969; Currah *et al.* 1997; Pereira *et al.* 2005; Sousa *et al.* 2019; Xi *et al.* 2020)。然而在本研究中 FIM、MEA 和 CMA 培养基可能由于其碳水化合物含量较少(例如

FIM=5 g 蔗糖/L)或培养基中缺少某些原球茎共生真菌喜好的营养物质导致其分离效果不佳,这表明成年兰科共生真菌类群和原球茎共生真菌类群对营养物质的需求存在差异性。

本研究综合分离的真菌物种数、菌株数量、真菌相对多度和多样性指数对 6 种常见培养基对手参原球茎共生真菌分离效果进行评估,结果表明 6 种培养基对手参原球茎共生真菌的分离效果存在显著性差异,其中 MMN 的分离效果最好, CAM 和 PDA 次之, FIM 和 MEA 培养基对真菌的分离效果影响不大, CMA 培养基的分离效果最差。今后在其他兰科植物原球茎共生真菌的分离中可借鉴参考。另外,从手参原球茎中分离到的其他共生真菌,其在种子萌发过程中所起的作用及可能的生态功能还需在今后的研究中逐渐阐明。

[REFERENCES]

- Adeoyo OR, Pletschke BI, Dames JF, 2019. Molecular identification and antibacterial properties of an ericoid associated mycorrhizal fungus. *BMC Microbiology*, 19(1): 1-8
- Aggarwal S, Nirmala C, Beri S, Rastogi S, Adholeya A, 2012. *In vitro* symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered Indian orchid *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. *European Journal of Environmental Sciences*, 2(1): 33-42
- Chao A, 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4): 265-270
- Currah RS, Zelter CD, Hambleton S, Richardson KA, 1997. Fungi from orchid mycorrhizas. In Arditti J, Pridgeon AM (eds.) *Orchid biology: reviews and perspectives*, VII VII. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 117-170
- Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA, 2012. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In: Hock B (ed.) *Fungal associations*. Springer, Berlin. 207-230
- Diagne N, Ngom M, Djighaly PI, Fall D, Hoche V, Svistoonoff S, 2020. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity*, 12(10):

370

- Gao L, Liu X, 2010. Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Microbiology*, 79(5): 612-619
- Gao Y, Chen YH, Xing XK, 2019. Symbiotic fungi inducing seed germination of medicinal *Gymnadenia conopsea* of Orchidaceae. *Mycosystema*, 38(11): 1948-1957 (in Chinese)
- Gao Y, Zhao ZY, Li JY, Liu N, Jacquemyn H, Guo S, Xing XK, 2020. Do fungal associates of co-occurring orchids promote seed germination of the widespread orchid species *Gymnadenia conopsea*. *Mycorrhiza*, 30(2): 221-228
- Hoang NH, Kane ME, Radcliffe EN, Zettler LW, Richardson LW, 2017. Comparative seed germination and seedling development of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae), and molecular identification of its mycorrhizal fungus from South Florida. *Annals of Botany*, 119(3): 379-393
- Huang F, Zhang CY, 2013. Effects of different sterilizations and media on the isolation of orchid mycorrhizal fungi. *Journal of Biology*, 30(5): 93-95 (in Chinese)
- Jacquemyn H, Duffy KJ, Selosse MA, 2017. Biogeography of orchid mycorrhizas. In: Tedersoo L (ed.) *Biogeography of mycorrhizal symbiosis*. Springer, Cham. 159-177
- Joppa LN, Roberts DL, Pimm SL, 2011. How many species of flowering plants are there? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278: 554-559
- Li Y, Boeraeve M, Cho Y, Jacquemyn H, Lee Y, 2021. Mycorrhizal switching and the role of fungal abundance in seed germination in a fully mycoheterotrophic orchid, *Gastrodia confusoides*. *Frontiers in Plant Science*, 12: 775290
- Ma KP, 1994. Measuring method of biome diversity I: measuring method of α diversity (Part 1). *Biodiversity Science*, 2(3): 162-168 (in Chinese)
- Marx DH, 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance to pathogenic infections. I. antagonism of mycorrhizal fungi to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-163
- McCormick MK, Jacquemyn H, 2014. What constrains the distribution of orchid populations?. *New Phytologist*, 202(2): 392-400
- McCormick MK, Whigham DF, Canchani-Viruet A, 2018. Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219(4): 1207-1215
- Meng YY, Zhang WL, Selosse MA, Gao JY, 2019. Are fungi from adult orchid roots the best symbionts at germination? a case study. *Mycorrhiza*, 29(5): 541-547
- Pereira OL, Kasuya MCM, Borges AC, Araújo E, 2005. Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany*, 83(1): 54-65
- Porrás-Alfaro A, Bayman P, 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99(4): 510-525
- Qayyum S, Khan I, Maqbo F, Zhao YG, Gu QB, Peng CS, 2016. Isolation and characterization of heavy metal resistant fungal isolates from industrial soil in China. *Pakistan Journal of Zoology*, 48(5): 1241-1247
- Qi FH, Jing TZ, Zhan YG, 2012. Characterization of endophytic fungi from *Acer ginnala* Maxim. in an artificial plantation: media effect and tissue-dependent variation. *PLoS One*, 7(10): e46785
- Rafter M, Yokoya K, Schofield EJ, Zettler LW, Sarasan V, 2016. Non-specific symbiotic germination of *Cynorkis purpurea* (Thouars) Kraeuzl., a habitat-specific terrestrial orchid from the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza*, 26(6): 541-552
- Rasmussen HN, Rasmussen FN, 2009. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118: 334-345
- Selosse MA, Minasiewicz J, Boullard B, 2017. An annotated translation of Noël Bernard's 1899 article 'On the germination of *Neottia nidus-avis*'. *Mycorrhiza*, 27(6): 611-618
- Shang XF, Guo X, Liu Y, Pan H, Miao XL, Zhang JY, 2017. *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.: a systemic review of the ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology of an important Asian folk medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 24
- Shao SC, Wang QX, Beng KC, Zhao DK, Jacquemyn H, 2020. Fungi isolated from host protocorms accelerate symbiotic seed germination in an endangered orchid species (*Dendrobium chrysotoxum*) from southern China. *Mycorrhiza*, 30(4): 529-539
- Shimura H, Koda Y, 2005. Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* following inoculation after cold treatment. *Physiologia Plantarum*, 123(3): 281-287
- Shimura H, Sadamoto M, Matsuura M, Kawahara T, Naito S, Koda Y, 2009. Characterization of mycorrhizal fungi isolated from the threatened *Cypripedium macranthos* in a northern island of Japan: two phylogenetically distinct fungi associated with the orchid. *Mycorrhiza*, 19(8): 525-534
- Simpson EH, 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163:

688

- Smith SE, Read DJ, 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press, San Diego. 1-780
- Sousa KCI, Araújo LJD, Silva CDS, Carvalho JCBD, Sibov ST, Gonçalves LDA, Pereira MCD, Gonçalves FJ, Filippi MCC, 2019. Seed germination and development of orchid seedlings (*Cyrtopodium saintlegerianum*) with fungi. *Rodriguésia*, 70: e02302016
- Spellerberg IF, Fedor PJ, 2003. A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon-Wiener’ index. *Global Ecology and Biogeography*, 12(3): 177-179
- Stewart SL, Zettler LW, Minso J, Brown PW, 2003. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. *Selbyana*, 24(1): 64-70
- R Core Team, 2016. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 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
- Wei JC, 1979. Fungal identification manual. Scientific and Technological Press, Shanghai. 1-802 (in Chinese)
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315-322
- Xi GJ, Shi J, Li JB, Han ZM, 2020. Isolation and identification of beneficial orchid mycorrhizal fungi in *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f. (Orchidaceae). *Plant Signaling & Behavior*, 15(12): e1816644
- Yang WK, Li TQ, Wu SM, Finnegan PM, Gao JY, 2020. *Ex situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for assisted colonization in *Paphiopedilum spicerianum*, a critically endangered orchid in China. *Global Ecology and Conservation*, 23: e01147
- Yokoya K, Zettler LW, Kendon JP, Bidartondo MI, Stice AL, Skarha S, Corey LL, Knight AC, Sarasan V, 2015. Preliminary findings on identification of mycorrhizal fungi from diverse orchids in the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza*, 25: 611-625
- Zettler LW, Corey LL, 2018. Orchid mycorrhizal fungi: isolation and identification techniques. In: Lee YI, Yeung EC (eds.) *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols*. Humana Press, New York. 27-59
- Zhao DK, Selosse MA, Wu L, Luo Y, Shao SC, Ruan YL, 2021. Orchid reintroduction based on seed germination-promoting mycorrhizal fungi derived from protocorms or seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 12: e701152
- Zhu GS, Yu ZN, Gui Y, Liu ZY, 2008. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity*, 33(12): 123-137

[附中文参考文献]

- 高越, 陈艳红, 邢晓科, 2019. 兰科药用植物手参种子的真菌共生萌发. *菌物学报*, 38(11): 1948-1957
- 黄芳, 张春英, 2013. 不同消毒和培养基条件对兰花菌根真菌分离的影响. *生物学杂志*, 30(5): 93-95
- 马克平, 1994. 生物群落多样性的测度方法 I: α 多样性的测度方法(上). *生物多样性*, 2(3): 162-168
- 魏景超, 1979. 真菌鉴定手册. 上海: 科学技术出版社. 1-802