

华石斛原地与异地播种萌发原球茎比较

谈逸^{1,2}, 杨福孙^{1*}, 周兆德¹

(1. 海南大学农学院, 海口 570228; 2. 海南大学环境与植物保护学院, 海口 570228)

摘要: 兰科植物种子共生萌发需要共生真菌的参与。真菌受生境的影响, 原地与异地种子萌发状况是否一致对于兰科植物保护十分重要。以华石斛 *Dendrobium sinense* 为材料, 比较华石斛种子原地与实验室内播种于不同附生宿主树皮上其种子萌发情况。结果表明: (1) 两者均在播种 75 d 后华石斛种子开始萌发, 播种后 135 d 后附生宿主树上华石斛萌发原球茎数达到高峰, 在 185 d 后华石斛种子萌发的原球茎数基本趋于稳定; (2) 异地条件下 150 d 后, 部分绿色原球茎开始逐渐白化消亡; (3) 碎叶蒲桃上华石斛在 2 种环境中均有少量种子萌发, 雅加松、马蹄荷上华石斛在原地与异地条件下均无种子萌发, 大叶布拉栎上的华石斛只在异地萌发, 竹叶松上的华石斛种子只在原地萌发。可见, 原地与异地对于华石斛萌发原球茎存在一定程度的影响。

关键词: 华石斛; 种子萌发; 原球茎

中图分类号: S682.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2014)06-0999-05

Difference in protocorm germination of *Dendrobium sinense* between the original habitat and the transplanted environment

TAN Yi^{1,2}, YANG Fusun¹, ZHOU Zhaode¹

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228;

2. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: Symbiotic fungus is indispensable to seed budding of orchid plants. Habitats can affect fungus; therefore, environmental conditions in the seed germination site should be as similar as to the original habitat to keep an ideal seed germination and seedling growth. In this experiment, *Dendrobium sinense* seeds were germinated in different host barks as epiphytes in the local (the originally-grown site) site and the laboratory. The results were as follows. (1) *D. sinense* seeds sowed in the local site and laboratory began to germinate at day 75. The germination rate of *D. sinense* protocorms grown as epiphytes on host barks peaked at day 135 and the germination rate of protocorms from *D. sinense* seeds tended to be stabilized 185 days after seeding; (2) Under the laboratory condition, parts of green protocorms started disappearing at day 150; (3) A small amount of *D. sinense* seeds planted on *Syzygium buxifolium* germinated under the local and laboratory conditions. There was no germination of the seed grown on *Exbucklandiatonkinensi* and *Pinus massoniana*. *D. sinense* seeds on *Cyclobalanopsis blake* germinated only under the laboratory condition, whereas *D. sinense* seeds on *Podocarpus neriifolium* germinated only under the local condition, indicating that germination of *D. sinense* protocorms was influenced by the environment conditions in the seeding site.

Key words: *Dendrobium sinense*; seed germination; protocorm

华石斛(*Dendrobium sinense*)多年生附生兰科植物, 海南特有种^[1], 分布于海拔 1000 m 以上热带常绿阔叶林或高山云雾林^[2-3], 自然繁殖率低、生长慢。由于生态环境破坏和人为过度采挖, 如何保护包括

华石斛在内的濒危野生兰科植物成为当前兰科植物研究的热点和难点。兰科植物菌根属于内生菌根中的兰类菌根。共生菌通过种子和根两条途径侵入形成菌根, 一是通过对成长新根的侵染^[4], 二是通过

收稿日期: 2014-04-27

基金项目: 国家自然科学基金(31160399)资助。

作者简介: 谈逸, 硕士研究生。E-mail: 691668190@qq.com

* 通信作者: 杨福孙, 副教授。E-mail: fsyang1590@163.com

种子侵染^[5]。兰科植物是典型的菌根植物，依赖菌根成活和生长。

不同真菌生长环境条件不同，受到原地异地不同外界环境主要包括温度、pH、湿度、营养等条件的影响，菌根真菌的生长适宜温度、pH范围与其生态分布存在着一定相关性。真菌与兰花之间的专一性并不十分严格。原地与异地环境条件会存在差异，真菌与兰科植物种子在原地和异地条件下会表现出不同的专一性^[6-7]，通过结合自然条件下及实验室条件的研究，Masuhara等^[6]在1994提出了生态专一性和潜在专一性的概念，前者指在自然环境条件下可与一个特定兰花种形成菌根的真菌的范围，后者指在实验室条件下，可与同种兰科植物形成菌根真菌的范围。在自然条件下表现为高度专一，而在实验室条件下，其专一性并不是特别严格。这些差异导致一些学者认为兰花共生真菌的专一性普遍低^[8]。而另一些学者认为兰花与共生真菌的专一性可能体现在兰科植物的属或甚至是种一级的阶层^[9]。由于专一性不强，同时真菌生长环境不同，致使不同环境条件下促进兰科种子萌发原球茎的真菌可能存在差异，从而造成目前兰科植物共生萌发真菌的分离与筛选存在偏差，制约了菌肥在兰花产业上的应用，其专一性会对兰科植物种子萌发和生长过程以及兰科植物的保育起到重要作用。

本试验通过异地与原地播种实验获得其萌发原球茎的差异，分析出现这些异同的可能原因，是基于华石斛等濒危兰科植物的保育，旨在促进华石斛共生萌发的研究，提高华石斛人工播种的萌发率，为维护物种多样性等更高级目标的基础性研究。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

华石斛种子采集于海南省霸王岭国家级自然保护区。树皮：华石斛附生偏好性树种碎叶蒲桃 *Syzygium buxifolium*、毛棉杜鹃 *Rhododendron moulmainense*^[10]，附生较少树种竹叶松 *Podocarpus neriifolius*、雅加松 *Pinus massoniana*，基本不附生树种大叶布拉栎 *Cyclobalanopsis blake*、大果马蹄荷 *Exbucklandiatonkinensi*^[11]，采集于海南省霸王岭自然保护区华石斛野生居群。

1.2 试验方法

1.2.1 原生境播种 于雨季7月份在海南省霸王岭国家级自然保护区东五区进行华石斛原生境进行播种，选用华石斛附生偏好性树种碎叶蒲桃、毛棉杜鹃^[10]，附生较少树种竹叶松、雅加松，基本不附生

树种大叶布拉栎、大果马蹄荷^[11]进行树杆上涂布方式播种，成熟华石斛种子用无菌水配成种子液，将种子液涂布于华石斛宿主树皮上。在华石斛植株附生处涂布长1m的树围。种子涂布树皮后，采用无菌纱布进行覆盖。

1.2.2 异地播种 将从原地采取的各种树皮，及时用无菌水润湿，置于直径9cm的培养皿内，将此培养皿套在12cm的培养皿中，空出部分加入适量无菌水，并用已消毒吸水纱布连通，以保证其水分。每种树皮基质重复3次。然后将成熟华石斛种子用无菌水溶于50mL玻璃试管中，配成种子悬浮液，用灭菌小刷子将种子悬浮液尽量均匀地涂布于树皮基质上，每皿3mL。盖上直径12cm培养皿的皿盖，封口膜密封防止空气杂菌的影响。将上述培养皿置于人工光照培养箱中进行培养：培养温度26℃，相对湿度70%~80%，光照强度1500~2000lx，光照时间为14h·d⁻¹。每15d记录原球茎萌发数。

1.2.3 原地环境监测 在原地环境下，采用(Apresys 176-TH型)便携式温湿度自动记录仪在华石斛着生相对集中群落样方内据华石斛附生高度固定，进行跟踪测定，仪器设定为每2h自动记录1次；并于6、7和9月的第1周(晴天，若不是晴天就往后推)，连续7d采用TES 1336A型照度计，测定以上3个样地华石斛附生处照度，以空地照度作对照，每天自上午8:00至下午18:00，每2h测定1次。透光度(%)=样地照度/空地照度×100。

1.3 数据分析

采用Excel 2003数据处理，用sas9.1统计分析软件比较不同条件下华石斛萌发的差异。

2 结果与分析

2.1 试验条件的对比

原地自播种到萌发(7—11月)日温差较大，且日均温随季节变化而不断变化(图1)。在异地试验控制条件下，温度保持在26℃，原地日湿度差也较大，变化范围在51.1%~100%，在异地条件下，湿度保持在相对湿度70%~80%范围内。原地的湿度、光照、温度变化都受到天气条件的影响较大(表1)，树皮上的菌会受外界影响发生迁移，种子是否萌发存在多变性和不可控性。而培养箱内环境各方面因素较为稳定，培养皿内，真菌的种类也保持不变，不易发生迁移，但树皮营养会随种子萌发和原球茎成苗逐渐减少。

2.2 原地与异地播种萌发原球茎时间比较

异地播种后75d能观察到有华石斛种子开始萌

发, 碎叶蒲桃树皮上最先萌发原球茎, 但原球茎的萌发数量较少 (表 2); 随后一周毛棉杜鹃和大叶布拉栎的种子也相继萌发。播种 135 d 后, 大叶布拉栎树皮上萌发原球茎数达最高峰, 之后萌发原球茎有些逐渐死亡或白化现象。但在毛棉杜鹃树皮上萌发原球茎白化现象不明显。其余 3 种竹叶松、雅加

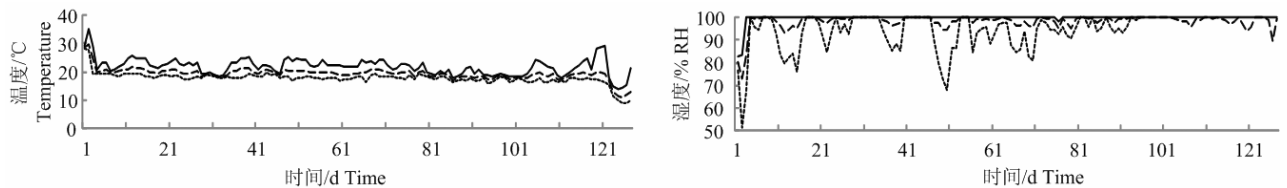
松和大果马蹄荷树皮基质上均未发现萌发原球茎。

除萌发数量有一定差异外, 原球茎的形态也有些差异, 碎叶蒲桃和大叶布拉栎树皮基质上萌发的原球茎较细长, 颜色偏白 (图 2 和图 3); 毛棉杜鹃树皮上的较粗圆, 颜色较绿 (图 4)。

表 1 原地与异地试验条件的比较

Table 1 The comparison of experimental conditions between local and laboratory environment

		温度/°C Temperature	空气湿度/% RH Humidity	光照/lx Illumination
原地 Local environment	最高 Maximum	35.2	100.0	2410.0
	最低 Minimum	8.9	51.1	539.0
	平均 Average	19.3	98.3	1121.2
异地 Laboratory environment		26.0	70.0~80.0	昼 Day: 1500.0~2000.0; 夜 Night: 0.0



最高 Maximum——; 最低 Minimum·····; 平均 Average——

图 1 7-11 月原地温湿度变化

Figure 1 The change of temperature and humidity from July to November under the local condition

表 2 华石斛播种后萌发原球茎动态

Table 2 The germinated dynamic state of protocorms after *Dendrobium sinense* seeds planted

树种 Variety		生长天数/d Growing time				树种 Variety		生长天数/d Growing time			
		75	135	185	300			75	135	185	300
碎叶蒲桃 <i>Syzygium buxifolium</i>	A	4.67	5	1.33	1	竹叶松	A	1	1.67	0.67	0.67
大叶布拉栎 <i>Cyclobalanopsis blake</i>	B	1	2	1	0	<i>Podocarpus neriifolii</i>	B	0	0	0	0
毛棉杜鹃 <i>Rhododendron moulmainense</i>	A	0	0	0	0	雅加松 <i>Pinus massoniana</i>	A	0	0	0	0
	B	11	33.67	30	0	大果马蹄荷 <i>Exbucklandi-atonkinensi</i>	B	0	0	0	0
	A	1.67	3.33	2	2		A	0	0	0	0
	B	6	32.67	25	0		B	0	0	0	0

A: 原地 Local environment; B: 异地 Laboratory environment.

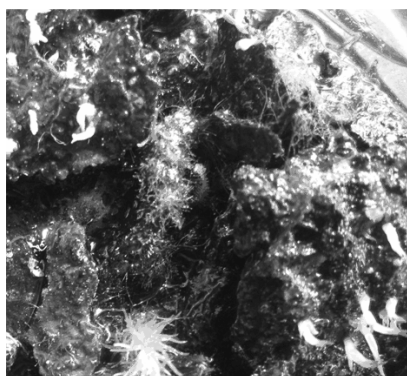


图 2 异地大叶布拉栎上萌发原球茎

Figure 2 The germinated protocorms on *Cyclobalanopsis blake* under laboratory environment



图 3 异地碎叶蒲桃上萌发原球茎

Figure 3 The germinated protocorms on *Syzygium buxifolium* under laboratory environment



图 4 异地毛棉杜鹃上萌发原球茎

Figure 4 The germinated protocorms on *Rhododendron moulmainsense* under laboratory environment

原生境条件下, 播种后 75 d 后可观察到华石斛种子萌发; 播种后 135 d 后附生宿主树上华石斛萌发原球茎数达到高峰, 在 185 d 后华石斛种子萌发的原球茎数基本趋于稳定。但没有观察到种子白化现象。

2.3 原地与异地不同播种树皮对华石斛种子萌发原球茎数量的比较

在原地和异地两种不同生境下, 雅加松、大果马蹄荷、碎叶蒲桃这 3 种树皮华石斛种子萌发情况差别不明显, 碎叶蒲桃在 2 种环境中均有少量种子萌发, 雅加松、马蹄荷在原地与异地条件下均无种子萌发(表 3)。大叶布拉栎在原生境条件下无种子萌发, 在室内条件下, 萌发数达到 33.67, 萌发数最

多, 而竹叶松在室内条件下无种子萌发, 但在原生境条件下有少量种子萌发。毛棉杜鹃上的华石斛种子在两种生境均有萌发, 但原地播种种子萌发数 3.33 远低于异地种子萌发数 32.67。室内播种, 虽原球茎数量萌发数存在较大差异, 但差异不显著; 原地条件下, 华石斛种子萌发数基本符合对附生树皮的属性, 以偏好性树皮萌发数最多, 不附生的树皮上没有原球茎萌发, 且不同树皮间萌发原球茎数差异性达显著水平。

2.4 原地与异地原球茎成苗的情况比较

异地未见原球茎成苗, 原地和异地 2 种不同生境下, 雅加松、大果马蹄荷、大叶布拉栎这 3 种树皮无原球茎成苗。毛棉杜鹃树皮上华石斛原球茎成苗情况在原地与异地存在显著差异, 另 5 种树皮上华石斛成苗情况原地异地之间差异不显著(表 4)。

异地条件下无原球茎成苗, 可能原因是树皮上营养物质的匮乏或者真菌与原球茎的共生关系发生了不平衡的变化, 致使原球茎不能继续生长成苗。例如大叶布拉栎树皮上原球茎到 240 d 后, 室内大叶布拉栎树皮上萌发的原球茎几乎全数消亡。室内外竹叶松和雅加松树皮上无原球茎成苗, 可能由于这两种树皮上无华石斛原球茎成苗所需真菌, 原地条件虽然较异地养分充足, 真菌稳定, 但其温度、湿度等环境因素多变, 原球茎也较难以成苗。其具体影响因子还需进一步试验。

表 3 原地与异地不同播种树皮华石斛种子萌发数差异比较

个

Table 3 The contrast of *Dendrobium sinense* seed germination rates cultured in different barks between local and laboratory environment

树皮种类 Type of bark	大叶布拉栎 <i>Cyclobalanopsis blake</i>	毛棉杜鹃 <i>Rhododendron moulmainsense</i>	碎叶蒲桃 <i>Syzygium buxifolium</i>	竹叶松 <i>Podocarpus neriifolium</i>	雅加松 <i>Pinus massoniana</i>	大果马蹄荷 <i>Exbucklandi-atonkinensi</i>
异地 Laboratory environment	33.67 ^a	32.67 ^a	2 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
原地 Local environment	0 ^c	3.33 ^{ab}	5 ^a	1.67 ^{bc}	0 ^c	0 ^c

注: 表中 a, b 表示横向不同播种树皮之间经 Duncan's 新复极差方差分析分别达到显著水平的结果。

Note: a and b respectively represent significant difference between different experimental barks by Duncan's analysis of variance (horizontal).

表 4 原地与异地华石斛原球茎成苗比较

个

Table 4 The comparison of the seedling of *Dendrobium Sinense* protocorms between local and Laboratory environment

树皮种类 Type of bark	大叶布拉栎 <i>Cyclobalanopsis blake</i>	毛棉杜鹃 <i>Rhododendron moulmainsense</i>	碎叶蒲桃 <i>Syzygium buxifolium</i>	竹叶松 <i>Podocarpus neriifolium</i>	雅加松 <i>Pinus massoniana</i>	大果马蹄荷 <i>Exbucklandi-atonkinensi</i>
异地 Laboratory environment	0 ^a	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
原地 Local environment	0 ^a	2 ^a	1 ^a	0.67 ^a	0 ^a	0 ^a

注: 表中 a, b 表示纵向不同播种树皮之间经 Duncan's 新复极差方差分析分别达到显著与极显著的结果。

Note: a and b respectively represent significantly different and very significantly different between different seeding environments by Duncan's analysis of variance (longitudinal).

3 讨论

近年来, 关于原生境和实验室内的华石斛种子萌发均有所成果, 但对于两者之间的异同还没有一个系统的比较, 兰科植物种子原地共生萌发技术为兰科植物保育及维持兰科植物正常居群所常用, 华石斛的异地萌发也可以为繁殖优质种苗和有效促进其原生境重引入提供重要理论依据。华石斛的种子萌发受多方面因素作用, 因此, 如何控制其萌发要素, 筛选促其种子萌发的有益菌根真菌, 应当是一个重要方向。

大叶布拉栎树皮在室内播种形成较多原球茎, 与野外播种结果差异极大, 原因可能是树皮上存在有益共生真菌, 在原生境条件下由于某种限制而没能成功形成共生关系, 或者是菌种发生了迁移。室内萌发时竹叶松和雅加松树皮上没有出现原球茎, 这两种树皮在原生境条件下也不是偏好性树种, 差别不大。原生境条件下萌发的原球茎数量远低于室内萌发, 其最主要原因可能是其多变的温度、湿度等环境因素导致的, 室内环境稳定因此种子萌发较多。野外原球茎消亡的主要原因是由于温度和湿度的下降, 室内萌发原球茎存在大量的白化现象, 可能原因是树皮上营养物质的匮乏或者真菌与原球茎的共生关系发生了不平衡的变化, 致使原球茎不能继续生长成苗。上述不利影响在大叶布拉栎树皮上原球茎的动态中表现的尤为突出: 到 240 d 后, 室内大叶布拉栎树皮上萌发的原球茎几乎全数消亡, 这与原生境中大叶布拉栎树上无华石斛附生的调查结果相符^[10-11]。但原地异地种子萌发存在的差异原因还需进一步证明。

随着研究的深入, 分别分离原地异地不同树种萌发的华石斛原球茎菌根真菌并对比两者之间的异同, 筛选华石斛种子萌发的有利真菌, 将原地和异地两种共生萌发技术一起应用于华石斛的研究和生

产上, 提高华石斛种子萌发率及成苗率, 将有利于华石斛野外种群的建立和恢复, 为华石斛的保育提供更多技术支持。

参考文献:

- [1] 余文刚, 金志强, 罗毅波, 等. 海南岛兰科植物区系的组成及其特征[J]. 热带作物学报, 2007, 28(2): 108-114.
- [2] 王毅. 海南五指山野生兰科植物的垂直分布格局[J]. 热带农业科学, 2011, 31(4): 28-32.
- [3] 施国政, 周铁烽, 尹光天, 等. 海南岛尖峰岭野生兰科植物资源分布与保护对策[J]. 福建林业科技, 2008, 35(3): 203-207.
- [4] 徐锦堂, 牟春, 冉砚珠. 天麻种子萌发动态及紫萁小菇菌丝侵入的细胞学观察[J]. 中国医学科学院学报, 1990, 12(5): 313-317.
- [5] 范黎, 郭顺星, 肖培根. 密花石斛等兰科植物菌根的显微结构研究[J]. 植物学报, 2000, 17(1): 73-79.
- [6] Masuhara G, Katsuya K, In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, var. *amoena* (*M. Bieberstein*) Hara (*Orchidaceae*) [J]. *New Phytologist*, 1994, 127(4): 711-718.
- [7] Taylor D L, Bruns T D, Szaro T M, et al. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (*Orchidaceae*), a nonphotosynthetic desert orchid [J]. *American Journal of Botany*, 2003, 90(8): 1168-1179.
- [8] Stewart S L, Zettler L W. Symbiotic germination of three semiaquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinqueseta*, *H. macroceratitis*) from Florida[J]. *Aquatic Botany*, 2002, 72(1): 25-35.
- [9] Stewart S L, Kane M E. Symbiotic seed germination and evidence for in vitro mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (*Orchidaceae*) and its implications for species-level conservation[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant*, 2007, 43(3): 178-186.
- [10] 杨福孙. 濒危兰科植物华石斛基于内生菌根真菌的保育生物学[D]. 海南: 海南大学, 2009.
- [11] 姜昊颖, 杨福孙, 宋希强. 华石斛原生境条件下人工播种的初步探讨[J]. 热带林业, 2011, 39(2): 40-43.