

研究报告

齿瓣石斛不同月龄幼苗根内共生真菌多样性动态变化分析

梁玉琼^{1,2}, 王梦雪^{2,3}, 高世南^{2,4}, 张文杰^{2,4}, 席会鹏⁵, 邵士成^{*2}

1 云南大学 生态与环境学院, 云南 昆明 650500

2 中国科学院西双版纳热带植物园 热带森林生态学重点实验室, 云南 西双版纳 666303

3 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

4 中国科学院大学, 北京 100049

5 中国科学院西双版纳热带植物园 园林园艺中心, 云南 西双版纳 666303

梁玉琼, 王梦雪, 高世南, 张文杰, 席会鹏, 邵士成. 齿瓣石斛不同月龄幼苗根内共生真菌多样性动态变化分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(11): 4451-4463.

LIANG Yuqiong, WANG Mengxue, GAO Shinan, ZHANG Wenjie, XI Huipeng, SHAO Shicheng. Dynamics of symbiotic fungal diversity in roots of *Dendrobium devonianum* seedlings at different developmental stages[J]. Microbiology China, 2024, 51(11): 4451-4463.

摘要:【背景】兰科植物整个生命周期都与真菌形成密切的共生关系, 种子萌发、幼苗形成等关键发育阶段都需要共生真菌为其提供营养。【目的】探究齿瓣石斛(*Dendrobium devonianum*)不同月龄幼苗共生真菌多样性及其变化规律。【方法】基于种子-真菌野外直播技术获得齿瓣石斛不同月龄幼苗并采集根样品, 采用扩增子测序技术研究共生真菌群落组成、相对丰度及多样性。【结果】齿瓣石斛 2-6 月龄幼苗中共有 944 个扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV), 隶属 5 门 24 纲 71 目 144 科 218 属。2-4 月龄幼苗的优势真菌为无孢蜡壳属(*Serendipita*)、篮状菌属(*Talaromyces*)和弯孢属(*Curvularia*), 6 月龄幼苗的优势真菌为篮状菌属和蜡壳耳属(*Sebacina*)。优势共生真菌类群在幼苗期发生了 2 次转变, 即 2 月龄前由胶膜菌属(*Tulasnella*)转变成无孢蜡壳属; 6 月龄期由无孢蜡壳属转变成蜡壳耳属。【结论】齿瓣石斛幼苗发育过程中对于共生真菌的选择是一个动态过程, 可能是主动选择环境中的最适真菌, 亦或是被动选择了环境中相对丰度较高的真菌。这一结果为了解齿瓣石斛不同发育阶段共生真菌群落的多样性和动态变化提供了新的证据, 并为分离获得促进幼苗生长、提高幼苗成活率的关键真菌类群提供了科学依据。

关键词: 齿瓣石斛幼苗; 共生真菌; 真菌转换; 无孢蜡壳属; 蜡壳耳属; 成苗率; 原地种子直播

资助项目: 国家自然科学基金(32171655); 中国科学院西部之光青年学者项目(E1XB011B01); 中国科学院西双版纳热带植物园“十四五”规划项目(E3ZKFF8B)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32171655), the West Light Talent Program of the Chinese Academy of Sciences (E1XB011B01), and the 14th Five-year Plan of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences (E3ZKFF8B).

*Corresponding author. E-mail: shaoshicheng@xtbg.org.cn

Received: 2024-03-06; Accepted: 2024-04-17; Published online: 2024-05-13

Dynamics of symbiotic fungal diversity in roots of *Dendrobium devonianum* seedlings at different developmental stages

LIANG Yuqiong^{1,2}, WANG Mengxue^{2,3}, GAO Shinan^{2,4}, ZHANG Wenjie^{2,4}, XI Huipeng⁵, SHAO Shicheng^{*2}

1 School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Key Laboratory of Tropical Forest Ecology, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna 666303, Yunnan, China

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

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

5 Centre for Gardening and Horticulture, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna 666303, Yunnan, China

Abstract: [Background] Orchids form a close symbiotic relationship with mycorrhizal fungi throughout their life cycle. The symbiotic fungi provide essential nutrients during seed germination and seedling establishment of orchids. [Objective] To reveal the diversity and dynamics of the endophytic (symbiotic) fungi of *Dendrobium devonianum* seedlings at different developmental stages. [Methods] The seedlings of *D. devonianum* were developed from *in situ* symbiotic seed germination, and the root samples were collected from the seedlings two, three, four, and six months after germination, respectively. Amplicon sequencing was employed to analyze the fungal community composition, abundance, and diversity. [Results] A total of 944 amplicon sequence variants (ASVs) were obtained from roots of seedling at all the four stages, belonging to 218 genera, 144 families, 71 orders, 24 classes of 5 phyla. The dominant fungal genera in *D. devonianum* seedlings of two to four months were *Serendipita*, *Talaromyces*, and *Curvularia*, respectively, while *Talaromyces* and *Sebacina* were dominant in the roots of six-month-old seedlings. The dominate symbiotic fungi underwent two shifts during seedling development. The first switch was from *Tulasnella* to *Serendipita* in the seedlings less than two months old and the second was from *Serendipita* to *Sebacina* in the seedlings of four to six months old. [Conclusion] The fungi in *D. devonianum* seedlings experience dynamic changes. The seedlings may actively choose the most compatible fungal partners or may be passively associated with the mycorrhizal fungi with high relative abundance in the environment. These new insights into the dynamics of symbiotic fungi during orchid seedling development offer a scientific basis to isolate fungal strains that might be employed to promote the growth and improve the survival of *D. devonianum* seedlings.

Keywords: *Dendrobium devonianum* seedlings; symbiotic fungi; fungal shifts; *Serendipita*; *Sebacina*; seedling survival rate; *in situ* seed germination

兰科(*Orchidaceae*)植物是显花植物的第二大科, 广泛分布于热带、亚热带和温带各种陆地生态系统中, 全世界约 29 524 种, 是植物物

种保护的旗舰类群, 许多种类具有重要的药用价值和观赏价值^[1-2]。

兰科植物是典型的菌根植物, 能与特定真

菌类群形成共生关系,即兰科菌根^[3]。兰科植物的生长发育和菌根真菌有着密切的关系,种子萌发、幼苗和成年植株等不同发育阶段均和真菌形成共生关系,依靠菌根真菌提供营养^[4-6]。据报道,与兰科植物形成共生关系的真菌大多属于担子菌门(*Basidiomycota*)的胶膜菌科(*Tulasnellaceae*)、角担菌科(*Ceratobasidiaceae*)、腊壳耳科(*Sebacinaceae*)、无孢蜡壳科(*Serendipitaceae*),以及外生菌根类群如红菇科(*Russulaceae*)、革菌科(*Thelephoraceae*)^[3,7-9],但近年来内生真菌也被报道可以与兰科植物形成菌根,如薄毛盘菌属(*Tricharina*)、盘菌属(*Peziza*)和镰刀菌属(*Fusarium*)等^[10-13]。

共生真菌类群和相对丰度在兰科植物生活史中并非固定不变,而是随着宿主植物的生长发育阶段、季节和海拔等因素发生变化^[14]。筒距兰(*Tipularia szechuanica*)和黄花白芨(*Bletilla ochracea*)开花时期的共生真菌多样性高于萌芽期、休眠期、生长期和果期^[15-16];蓝紫倒距兰(*Anacamptis morio*)不同季节的根中优势共生真菌具有差异,春季优势真菌为盘菌属,夏季为角担菌属(*Ceratobasidium*),秋冬季为胶膜菌属(*Tulasnella*)^[17];梳帽卷瓣兰(*Bulbophyllum andersonii*)真菌组成在较高海拔的优势真菌为无孢蜡壳科和丝盖伞科(*Inocybaceae*)真菌,而在低海拔的优势真菌为角担菌科和胶膜菌科真菌^[18]。此外,同一种兰科植物的不同生活型共生真菌组成也表现出类似的差异,如石生型禾叶贝母兰(*Coelogyne viscosa*)的优势真菌为胶膜菌,而树附生型则为蜡壳耳目(*Sebacinales*)真菌^[19]。这些结果表明,兰科植物对共生真菌具有选择性,能够根据个体不同的发育阶段或不同的生境条件来选择最适合的共生真菌,以维持自身的营养需求^[20]。

兰科植物不同发育阶段的营养需求变化会导致共生真菌类群的转变^[21]。天麻(*Gastrodia*

elata)需要与2种真菌共生才能完成整个生活史,即种子萌发阶段需要和小菇属(*Mycena*)真菌共生才能萌发并发育至米麻,随后米麻需要与蜜环菌属(*Armillaria*)真菌建立营养关系后才能正常生长发育并完成生活史^[22]。鸟巢兰属(*Neottia*)植物由自养至真菌异养的营养类型进化过程中,优势真菌类群由无孢蜡壳科(*Serendipitaceae*)逐渐转变成了蜡壳耳科(*Sebacinaceae*)^[7,23]。自养或混合营养型兰科植物幼苗具有独特性,相比种子其可以逐步进行光合作用,对真菌的依赖程度降低,但根不如成年植株发达,根内真菌种类少。研究表明头蕊兰属(*Cephalanthera*)和火烧兰属(*Epipactis*)植物幼苗的共生真菌多样性低于成年植株^[24]。铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)、琉球石斛(*D. okinawense*)和细茎石斛(*D. moniliforme*)的促种子萌发真菌并不能促进幼苗生长^[25];同时细茎石斛原球茎时期和成年时期真菌多样性远大于幼苗时期,即不同生长阶段真菌多样性变化存在“瓶颈”^[26]。

石斛属是兰科植物中的第二大属,全世界有1800多种,主要分布在东亚、南亚和东南亚^[27-28]等地区,我国约有80种,主要分布在云南省、广西壮族自治区、西藏自治区等地区^[29],常附生于树上或岩石上。石斛是六大观赏兰花之一,多数种类具有重要的药用价值。前期研究利用种子-真菌直播技术开展了齿瓣石斛(*D. devonianum*)种子野外直播,发现齿瓣石斛种子萌发率较高(9.4%)^[30],但后期实际成苗数远不及萌发的幼苗数量,野外观察发现存活下来的幼苗发育健全,具有完整的根、假鳞茎和叶,而死亡的幼苗基本无根分化,其原因可能与天麻和细茎石斛萌发情况类似,在幼苗生长至成年植株的过程中随着营养需求的变化,真菌多样性或优势类群发生了变化,但实际情况如何还有

待进一步验证。因此,本研究分析了 2-6 月龄齿瓣石斛幼苗期共生真菌群落的组成及其相对丰度变化,了解了齿瓣石斛不同发育阶段共生真菌群落的多样性和动态变化,为分离获得促进幼苗生长、提高幼苗成活率的关键真菌类群提供了科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

齿瓣石斛俗称紫皮石斛,以其养胃生津、滋阴除热的功效而闻名,具有重要药用价值^[31]。它广泛分布于广西壮族自治区、贵州省、云南省等地区,主要生长在海拔 1 100-1 600 m 的密林树干或岩石上,花期通常为 4-5 月。

编号为 CY 的胶膜菌分离自 2012 年 7 月齿瓣石斛种子野外自然萌发形成的原球茎^[32]。

实验样地龙帕古茶园(21°59'05"N, 101°05'07"E, 海拔 1 150 m)位于西双版纳傣族自治州景洪市基诺乡亚诺村,茶园内茶树为大叶普洱茶(*Camellia assamica*),间种遮阴树种短刺栲(*Castanopsis echidnocarpa*)和西南木荷(*Schima wallichii*)^[32]。该地区的年平均气温为 18-20 °C,年降雨量为 1 400-1 800 mm,茶树树干上自然生长着多种附生兰科植物,如隔距兰(*Cleisostoma linearilobatum*)、槽舌兰(*Holcoglossum* spp.)、勐海石斛(*D. sinominutiflorum*)、万代兰(*Vanda* spp.)、异型兰(*Chiloschista yunnanensis*)及齿瓣石斛等。

真菌培养采用 PDB 培养基(g/L):去皮新鲜马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0。121 °C 灭菌 20 min,冷却备用。

葡萄糖,西陇科学股份有限公司;植物基因组 DNA 提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; DL1500 DNA Marker, TaKaRa 公司。 NovaSeq-PE250 测序仪, Illumina 公司;

NanoDrop, 赛默飞世尔科技公司; PCR 扩增仪, 应用生物系统公司; 电泳仪, 北京六一生物科技股份有限公司; 凝胶仪, 北京百晶生物技术有限公司; 超低温冷冻储存箱, 中科美菱低温科技股份有限公司。

1.2 根系样品的采集及处理

1.2.1 种子-真菌直播

利用种子-真菌直播技术^[33]将齿瓣石斛促萌发真菌胶膜菌 CY^[32]接种至 PDB 培养基在 (28±1) °C、150 r/min 条件下振荡培养 5-7 d, 用医用纱布过滤后取其菌丝体与琼脂粉混合磨成菌粉,加入采集自茶园的自产结实、成熟但尚未开裂的齿瓣石斛种子。随机称取 0.20 g 真菌-种子-琼脂粉混合物 3 次,分别统计其中种子的总数,取 3 次统计的平均值作为每个种子袋的标准种子数。为控制每个种子袋种子数量约 100 粒,根据标准种子数换算真菌-种子-琼脂粉混合物质量,称取后倒入装有 0.50 g 干苔藓的纸质茶叶袋中,封口备用。

将制作好的种子袋带至龙帕古茶园中,用无菌水浸泡 5 min,使其充分吸收水分后,用保鲜膜将种子袋固定在茶树树干上,20-30 d 形成原球茎后,用镊子或牙签等小心戳开保鲜膜进行开孔放苗,为原球茎后续生长发育提供空间。

1.2.2 样品的采集与处理

于播种后 2、3、4 和 6 个月采集齿瓣石斛幼苗根样,根据采集时间样品编号分别为 LP2M、LP3M、LP4M 和 LP6M(图 1),每株幼苗采集 1-2 cm 根段,每个月龄期取 3 个重复,用湿润苔藓包裹放置于冰盒中,保持其新鲜状态,随后迅速带回实验室进行处理。

在实验室内将根样品置于流水下冲洗,去除附着在根表面的苔藓、地衣等杂质。将根样品放入超净工作台中,先用 75%乙醇溶液浸泡 30 s,再用无菌水冲洗 3 次后,使用解剖刀轻轻

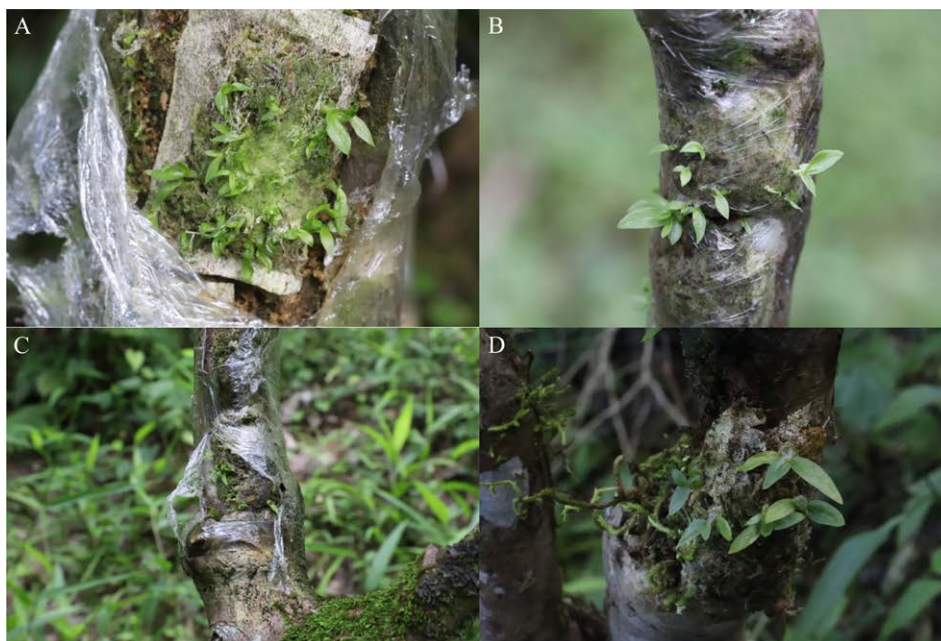


图 1 基于种子-真菌直播生长的齿瓣石斛不同月龄幼苗 A: 2月龄幼苗. B: 3月龄幼苗. C: 4月龄幼苗. D: 6月龄幼苗

Figure 1 Seedlings of *Dendrobium devonianum* in different developmental stages based on *in situ* symbiotic seed germination. A: LP2M. B: LP3M. C: LP4M. D: LP6M.

刮去根被, 将其放入 75%乙醇溶液中浸泡 30 s, 无菌水冲洗 5 次, 装入无菌冻存管中, 做好标记后使用液氮进行快速冷冻, 置于 -80°C 冰箱保存备用。

使用植物基因组 DNA 试剂盒提取齿瓣石斛不同月龄根样品的总 DNA。随后, 利用兰科菌根真菌特异性引物 ITS86F (5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[34]对 rDNA 上的内转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2)进行扩增。PCR 反应体系(25 μL): NEBQ5 DNA 聚合酶 0.25 μL , 5 \times PCR 缓冲液 5 μL , 5 \times GC 缓冲液 5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 2 μL , DNA 模板 2 μL , ITS86F 引物(10.0 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , ITS4 引物(10.0 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 无菌水 8.75 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 27 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR

扩增完成后, 通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 产物的浓度和完整性。使用 Axygen 凝胶回收试剂盒从凝胶中切取并回收目标产物, 随后对纯化后的 DNA 进行测序文库构建, 并使用 NovaSeq-PE250 测序仪进行 2 \times 250 bp 的双端测序分析。

1.3 数据处理及分析

使用 Cutadapt v4.7 软件去除原始序列接头和引物后, 在 R v4.3.2 软件中利用 dada2 软件包对序列进行质量控制, 包括过滤低质量序列、合并双端序列、去除错误和重复嵌合序列, 获得特征表和代表序列。为了更精确地反映真菌多样性并减少测序误差, 采用扩增子序列变体 (amplicon sequence variant, ASV, 99%相似度)代替 OTU。在 UNITE v9.0 真菌数据库对 ASV 代表序列进行物种注释, 得到不同分类水平下的真菌物种组成。为确保分析的准确性, 过滤非

真菌序列后获得了每个 ASV 及其在不同样本中的相对丰度数据。

根据得到的 ASV 表和物种注释信息,使用 microeco 软件包计算每个样本在门和属分类水平下的真菌物种相对丰度,使用 ggplot2 软件包绘制物种堆叠柱状图,分析其每个月龄幼苗优势真菌(相对丰度大于 5% 视为优势类群),并分析这些真菌类群在每个月龄样本中所占比例。同时,使用韦恩图比较不同月龄幼苗样本的 ASV 数量,分析不同样本共有和特有的 ASV 数量,进一步揭示共生真菌群落的组成差异。

为了探讨不同月龄幼苗根内共生真菌的多样性,基于 ASV 聚类分析结果,使用 vegan 软件包根据最小样本读数 73 707 进行抽平后,计算不同月龄幼苗的真菌 α 多样性指数,包括 Shannon 指数、Simpson 指数、ACE 丰富度指数和 Pielou 均匀度指数,以此评估各样本真菌群落的多样性和丰富程度,采用 t 检验分析样品间差异显著性($P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为极显著差异),使用 ggplot2 软件包进行箱线图绘制。

使用 vegan 软件包计算 Bray-Curtis 距离,使用主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)对其进行降维排序,结合 Adonis 检验,使用 ggplot2 软件包进行可视化,即每个样本以点的形式映射于二维坐标系,以两点间距离表征样本间或组间的差异程度。

2 结果与分析

2.1 测序数据统计

经过滤低质量和重复序列后,齿瓣石斛不同月龄期幼苗根中共产生 1 198 796 条序列,合并为 1 050 个 ASV,去除注释为非真菌的 ASV 后,获得 944 个真菌 ASV,属于 5 门 24 纲 71 目 144 科 218 属。其中 LP2M、LP3M、LP4M 和 LP6M 的 ASV 总数分别为 355、255、287 和 300,

独有 ASV 数量为 255、159、173 和 196。4 个月龄幼苗间共有 25 个 ASV (图 2, 表 1),其中无孢蜡壳属(*Serendipita*) 4 个,篮状菌属(*Talaromyces*) 3 个,弯孢属(*Curvularia*) 3 个,蜡壳耳属(*Sebacina*) 1 个。

2.2 不同月龄幼苗的真菌群落组成

门分类水平下,4 个月龄幼苗间真菌组成差异较小,主要由子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门组成。子囊菌门在 2–6 月龄幼苗中的相对丰度分别为 46.7%、70.6%、50.5%和 33.2%,而担子菌所占比例为 53.2%、29.4%、49.5%和 66.7%,不同月龄幼苗根内真菌类群的相对丰度在门分类水平上具有动态变化特征(图 3A)。此外,壶菌门(*Chytridiomycota*)、毛霉菌门(*Mucoromycota*)和被孢霉门(*Mortierellomycota*)的真菌在幼苗中也有零星分布,但其相对丰度均不足 0.1%。

属分类水平下,2–4 月龄幼苗的共生真菌群落主要由无孢蜡壳属、篮状菌属、弯孢属和卡洛斯酵母菌(*Carlosroaea*)等真菌组成,其中无孢蜡壳属真菌相对丰度最高,2、3 和 4 月龄

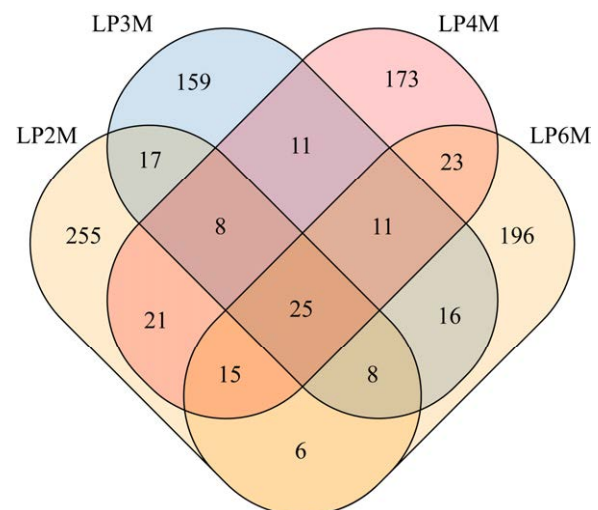


图 2 不同月龄幼苗扩增子序列变体水平的韦恩图
Figure 2 Venn diagram at amplicon sequence variant level of seedlings in different developmental stages.

表 1 四个月龄幼苗共有的 25 个扩增子序列变体信息

Table 1 Amplicon sequence variant information shared by 4-month-old seedlings

4 个月龄共有的 ASV ASV common to four months old	分类 Classify	数量 Quantities
ASV4, ASV5, ASV6, ASV9	无孢蜡壳属 <i>Serendipita</i>	4
ASV2, ASV35, ASV215	篮状菌属 <i>Talaromyces</i>	3
ASV3, ASV80, ASV144	弯孢属 <i>Curvularia</i>	3
ASV7	蜡壳耳属 <i>Sebacina</i>	1
ASV10	卡洛斯酵母菌 <i>Carlosrosaea</i>	1
ASV11	银耳属 <i>Tremella</i>	1
ASV15	拟棘壳孢属 <i>Pyrenochaetopsis</i>	1
ASV19	顶齿霉属 <i>Acrodontium</i>	1
ASV23	枝孢菌属 <i>Cladosporium</i>	1
ASV45	三态胶状菌属 <i>Trimorphomyces</i>	1
ASV46	镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	1
ASV48	楠链孢壳菌属 <i>Cladophialophora</i>	1
ASV49	赛托油脂酵母菌属 <i>Saitozyma</i>	1
ASV58	粪壳菌纲 <i>Chaetosphaeriaceae</i>	1
ASV148	黑粒囊菌 <i>Nigrograna</i>	1
ASV490	晶杯菌科 <i>Hyaloscyphaceae</i>	1
ASV512	头毛孢霉属 <i>Cephalotrichum</i>	1
ASV596	木霉属 <i>Trichoderma</i>	1

幼苗分别为 33.7%、52.7%和 41.2%，属于优势真菌类群(图 3B)。但 6 月幼苗的共生真菌组成与 2、3、4 月龄幼苗不同，主要由篮状菌属、蜡壳耳属、卡洛斯酵母菌、支孢瓶霉属 (*Cladophialophora*)和镰刀菌属(*Fusarium*)等真菌组成，而且各真菌类群相对丰度比例接近，分别为 12.8%、12.7%、9.7%、9.5%和 9.2% (图 3B)。

在前 3 个月龄中占据优势的无孢蜡壳属真菌，在 6 月龄幼苗中占比降低至 4.2%，在前 3 个月龄中相对丰度低的蜡壳耳属真菌(相对丰度小于 1%)在 6 月龄中相对丰度增加至 12.7%，为优势真菌类群(图 3C)。此外，胶膜菌属真菌在 2、3、4 和 6 月龄幼苗中均存在，但相对丰度较低，仅有 0.82%、1.15%、0.12%和 0.13%。

2.3 不同月龄幼苗真菌的 α 多样性分析

根据 α 多样性差异性 t 检验结果，不同月龄幼苗间 Shannon 和 Simpson 多样性指数并无显著差异($P>0.05$) (图 4A、4B)。ACE 丰富度指数在 2 月龄幼苗与 3 月龄幼苗真菌群落中存在极显著差异($P<0.01$)，在 3 月龄幼苗和 4 月龄幼苗中存在显著差异($P<0.05$) (图 4C)。Pielou 均匀度指数无显著差异(图 4D)。Goods_coverage 指数为 1，说明本研究样本覆盖率高，未被检测出的真菌类群概率低。

2.4 不同月龄幼苗真菌的 β 多样性分析

为进一步明确不同月龄幼苗间共生真菌群落结构的差异，采用主坐标分析(PCoA)进行真菌群落的差异性分析。主坐标 1 (PC1)解释了差异的 24.15%，主坐标 2 (PC2)解释了差异的 12.54%。除 2 月龄、3 月龄具有部分交集外，其他月龄幼苗有明显聚类区分(图 5)，菌落组成具有明显差异($R=0.688$, $P=0.001$)。

3 讨论与结论

在运用种子-真菌直播技术开展齿瓣石斛种子回归保护过程中，种子萌发形成幼苗的幼苗率较高但最终成苗率低。最终成苗的个体均形成了发育良好的根，根在固定个体附生在茶树树干的同时可能招募特定的共生真菌提供营养。实验样地龙帕古茶园自然生长有齿瓣石斛种群，说明茶园环境中存在适合其生长发育的菌根真菌。

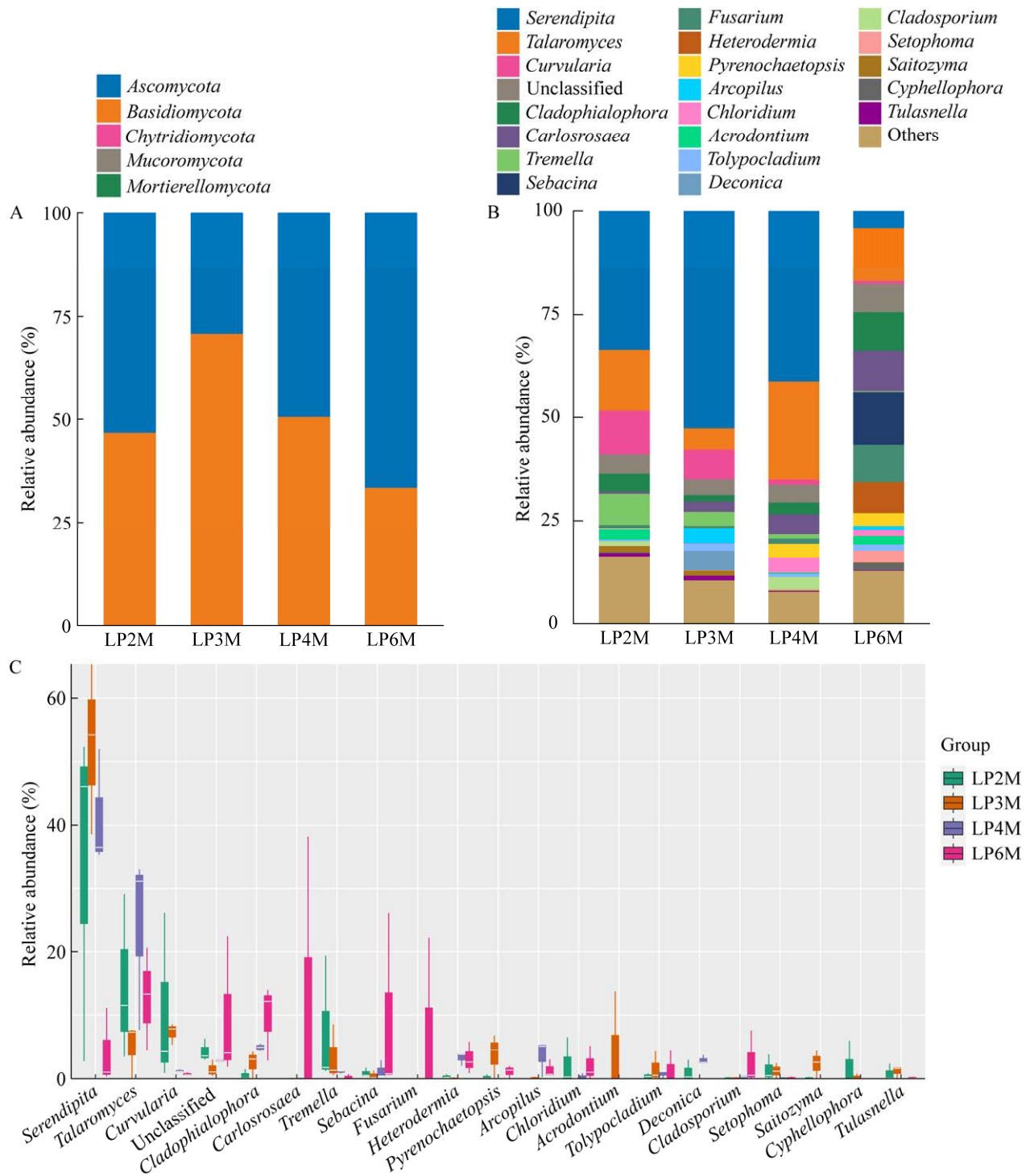


图3 不同分类水平内(共)生真菌组成及优势类群变化 A: 门. B: 属. C: 属分类水平下优势真菌类群变化.

Figure 3 Composition and dynamics of endophytic (symbiotic) fungi at different taxonomic levels. A: Phylum. B: Genus. C: Changes in dominant fungal groups at the genus taxonomic level.

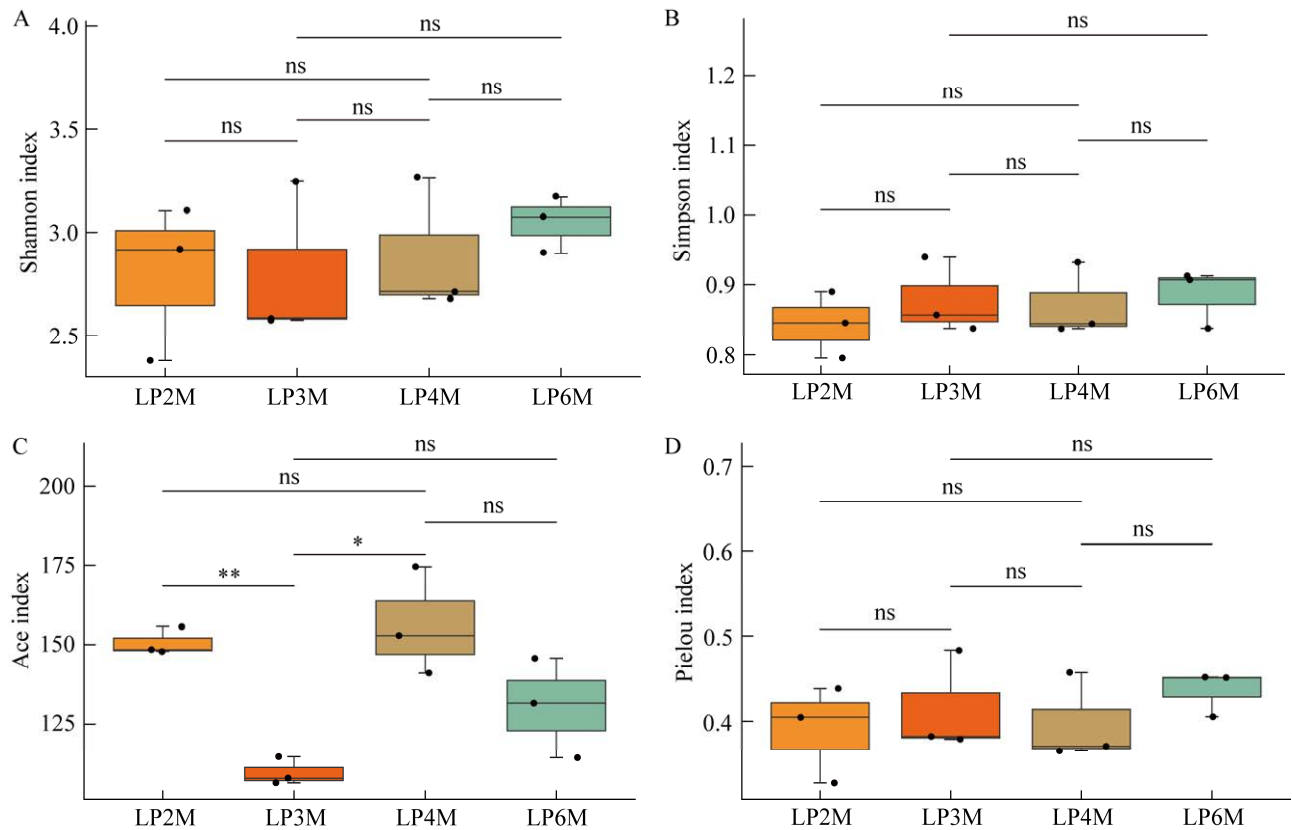


图 4 不同月龄幼苗真菌群落的 α 多样性指数 A: Shannon 指数. B: Simpson 指数. C: ACE 指数. D: Pielou 指数

Figure 4 Alpha diversity indices of seedlings in different developmental stages. A: Shannon index. B: Simpson index. C: ACE index. D: Pielou index. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: No significant difference.

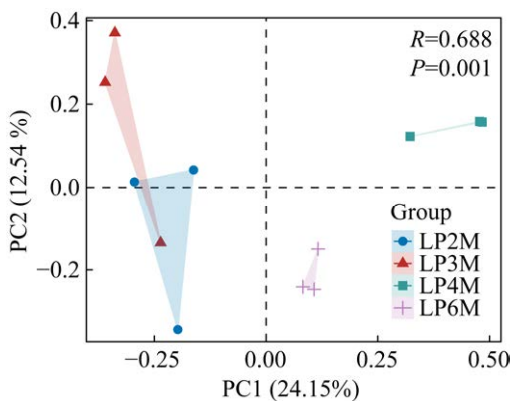


图 5 齿瓣石斛不同月龄幼苗根内真菌群落的主坐标分析

Figure 5 Principal coordinate analysis on fungal communities in the roots of *Dendrobium devonianum* seedlings across different developmental stages.

本研究对齿瓣石斛不同月龄幼苗的真菌群落组成进行分析发现, 其优势真菌类群发生了 2 次转变。这与 Selosse 等^[35]的观点类似, 他们认为兰科植物进化过程中从内生真菌招募部分特定真菌经历多次转变成为兰科植物共生真菌, 这可能是造成齿瓣石斛成苗率低的原因之一。在种子-真菌直播时加入经前期实验验证能促齿瓣石斛种子萌发形成幼苗的 CY 菌株为胶膜菌属真菌^[32], 此真菌经过室内摇瓶发酵, 产生了肉眼可见的大量菌丝体, 在播种时较其他真菌具有绝对优势, 但在 2-6 个月龄幼苗中的胶膜菌属真菌的相对丰度均较低(相对丰度小于 2%), 可能是由于此胶膜菌在实验样地的生长逐

渐衰退引起的。Waud 等^[34]研究了引物选择对兰科菌根真菌群落多样性的影响,发现 2 对引物 ITS3/ITS4OF 和 ITS86F/ITS4 可以有效地扩增 rDNA ITS2 片段,单独使用 ITS86F 和 ITS4 引物也能够检测出大量胶膜菌科真菌,排除了本研究引物低特异性造成的测序偏差,说明从 2 月龄之前优势真菌类群就已经发生了转变,由胶膜菌属转变为无孢蜡壳属。两种真菌均可从腐烂的树皮或木材中获取碳,为幼苗早期生长发育提供碳源,但在氮源利用方式上存在差异^[36-37],或许这一差异和共生真菌的转变有关。

无孢蜡壳属真菌是 2、3 和 4 月龄幼苗的绝对优势真菌类群,分别占比 33.7%、52.7%和 41.2%,而蜡壳耳属真菌的相对丰度低(小于 1%);相反,蜡壳耳属真菌的相对丰度在 6 月龄中占比增加,占据相对优势(12.7%),而无孢蜡壳属真菌在 6 月龄幼苗中的相对丰度降低,仅占 4.2%。这一结果与天麻、细茎石斛等类似,都具有真菌类群转换现象^[22,25-26]。有研究表明,无孢蜡壳属真菌无法为高度依赖真菌异养的兰科植物提供足够的碳源,而部分蜡壳耳属真菌成员与树木形成外生菌根而从中获取大量的碳^[7,23]。齿瓣石斛 2、3 和 4 月龄幼苗叶片较小,光合能力较低,由无孢蜡壳属真菌分解枯枝落叶中的木质素固定碳并转化成生长所能直接利用的碳源^[38];6 月幼苗长出 2-3 叶,光合作用逐渐增强,对真菌依赖性降低,可能通过与蜡壳耳属真菌和周围树木建立联系并从中获得足够的碳源,供给自身生长发育^[7]。

此外,篮状菌属、弯孢属、支孢瓶霉属和镰刀菌属等内生真菌在齿瓣石斛幼苗中也具有较高的相对丰度,作为潜在兰科菌根真菌而存在根中^[35,39]。篮状菌广泛存在于西双版纳附生兰中,是铁皮石斛典型内生菌,同时在长药兰

属(*Serapias*)植物中也能分离得到,虽然不能促进种子萌发和幼苗生长^[40-42],但对黑曲霉(*Aspergillus niger*)、西瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*)等有较强且广谱的抑制作用^[43],齿瓣石斛幼苗中的篮状菌属真菌可能有助于提高幼苗抗病性。支孢瓶霉属真菌是国兰、铁皮石斛等兰科植物常见内生真菌^[44-46],可能与无孢蜡壳属和蜡壳耳属真菌共同协作为幼苗提供丰富的碳源。弯孢属真菌通常为植物病原菌,会引起玉米叶斑病^[47]和石斛花锈病^[48]。镰刀菌属真菌常被报道为植物病原菌,导致铁皮石斛枯萎^[49],但 Jiang 等^[11]发现镰刀菌属真菌能够促进白芨(*B. striata*)和细茎石斛种子萌发,目前对于镰刀菌是否为兰科菌根真菌尚存争议。本研究中弯孢属真菌和镰刀菌属真菌广泛存在于幼苗中,是普通的内生菌还是导致幼苗死亡的原因需要进一步验证。

齿瓣石斛不同月龄幼苗真菌组成和相对丰度具有动态变化特征,在幼苗期间经历了 2 次优势真菌类群转换,说明齿瓣石斛对于其真菌伙伴的选择是一个动态过程,可能是齿瓣石斛主动选择环境中的最适真菌,抑或是被动选择了环境中相对丰度较高的真菌。这一结果为认识齿瓣石斛幼苗发育过程和共生真菌的互作提供了科学见解,为分离获得促进幼苗生长、提高存活率的活性菌种资源提供了科学依据和理论基础。

致谢

感谢普洱学院王汶倩、龙兰等在野外实验中对本研究的帮助;感谢中国科学院西双版纳热带植物园 Kyle Warwick Tomlinson 教授对摘要的修改。

REFERENCES

- [1] PÉREZ-ESCOBAR OA, BOGARÍN D, PRZELOMSKA NAS, ACKERMAN JD, BALBUENA JA, BELLOT S, BÜHLMANN RP, CABRERA B, AGUILAR CANO J, CHARITONIDOU M, CHOMICKI G, CLEMENTS MA, CRIBB P, FERNÁNDEZ M, FLANAGAN NS, GRAVENDEEL B, HÁGSATER E, HALLEY JM, HU AQ, JARAMILLO C, et al. The origin and speciation of orchids[J]. *New Phytologist*, 2024, 242(2): 700-716.
- [2] SHAO SC, JACQUEMYN H, SELOSSE MA. Improved use of mycorrhizal fungi for upscaling of orchid cultivation and population restoration of endangered orchids in China[J]. *Symbiosis*, 2024, 92(2): 149-158.
- [3] DEARNALEY JDW, MARTOS F, SELOSSE MA. 12 orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects[M]//Fungal Associations. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012: 207-230.
- [4] DEARNALEY JDW. Further advances in orchid mycorrhizal research[J]. *Mycorrhiza*, 2007, 17(6): 475-486.
- [5] RASMUSSEN HN, RASMUSSEN FN. Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in *Orchidaceae*[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2014, 175(3): 313-327.
- [6] RASMUSSEN HN, DIXON KW, JERSÁKOVÁ J, TĚŠITELOVÁ T. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements[J]. *Annals of Botany*, 2015, 116(3): 391-402.
- [7] WEIB M, WALLER F, ZUCCARO A, SELOSSE MA. *Sebacinales*-one thousand and one interactions with land plants[J]. *New Phytologist*, 2016, 211(1): 20-40.
- [8] OKAYAMA M, YAMATO M, YAGAME T, IWASE K. Mycorrhizal diversity and specificity in *Lecanorchis (Orchidaceae)*[J]. *Mycorrhiza*, 2012, 22(7): 545-553.
- [9] LIU HC, JACQUEMYN H, YU S, CHEN W, HE XY, HUANG YQ. Mycorrhizal diversity and community composition in co-occurring *Cypripedium* species[J]. *Mycorrhiza*, 2023, 33(1): 107-118.
- [10] DURÁN-LÓPEZ ME, CAROCA-CÁCERES R, JAHREIS K, NARVÁEZ-VERA M, ANSALONI R, CAZAR ME. The micorrryzal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera* promote seed germination and seedling development of the terrestrial orchid *Epidendrum secundum* Jacq[J]. *South African Journal of Botany*, 2019, 125: 54-61.
- [11] JIANG JW, ZHANG K, CHENG S, NIE QW, ZHOU SX, CHEN QQ, ZHOU JL, ZHEN X, LI XT, ZHEN TW, XU MY, HSIANG T, SUN ZX, ZHOU Y. *Fusarium oxysporum* KB-3 from *Bletilla striata*: an orchid mycorrhizal fungus[J]. *Mycorrhiza*, 2019, 29(5): 531-540.
- [12] 王美娜, 胡玥, 李鹤娟, 李健, 陈建兵, 兰思仁. 兰科植物菌根真菌研究新见解[J]. *广西植物*, 2021, 41(4): 487-502.
- WANG MN, HU Y, LI HJ, LI J, CHEN JB, LAN SR. New insights into orchid mycorrhizal fungi research[J]. *Guihaia*, 2021, 41(4): 487-502 (in Chinese).
- [13] WATERMAN RJ, BIDARTONDO MI, STOFBERG J, COMBS JK, GEBAUER G, SAVOLAINEN V, BARRACLOUGH TG, PAUW A. The effects of above- and belowground mutualisms on orchid speciation and coexistence[J]. *The American Naturalist*, 2011, 177(2): E54-E68.
- [14] ZENG XH, DIAO HX, NI ZY, SHAO L, JIANG K, HU C, HUANG QJ, HUANG WC. Temporal variation in community composition of root associated endophytic fungi and carbon and nitrogen stable isotope abundance in two *Bletilla* species (*Orchidaceae*)[J]. *Plants*, 2020, 10(1): 18.
- [15] 侯天文, 金辉, 刘红霞, 安德军, 罗毅波. 四川黄龙沟优势兰科植物菌根真菌多样性及其季节变化[J]. *生态学报*, 2010, 30(13): 3424-3432.
- HOU TW, JIN H, LIU HX, AN DJ, LUO YB. The variations of mycorrhizal fungi diversity among different growing periods of the dominant orchids from two habitats in the Huanglong Valley, Sichuan[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(13): 3424-3432 (in Chinese).
- [16] 刁海欣, 黄卫昌, 曾歆花, 黄清俊. 黄花白及 *Bletilla ochracea* 不同生长发育期的菌根真菌多样性变化[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2020, 44(4): 346-353.
- DIAO HX, HUANG WC, ZENG XH, HUANG QJ. Study on the mycorrhizal fungi diversity of *Bletilla ochracea* across different growth and development stages[J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2020, 44(4): 346-353 (in Chinese).
- [17] ERCOLE E, ADAMO M, RODDA M, GEBAUER G, GIRLANDA M, PEROTTO S. Temporal variation in mycorrhizal diversity and carbon and nitrogen stable isotope abundance in the wintergreen meadow orchid *Anacamptis morio*[J]. *New Phytologist*, 2015, 205(3): 1308-1319.
- [18] 李佳瑶. 菌根真菌群落组成对兰科植物空间分布的响应[D]. 北京: 北京协和医学院硕士学位论文, 2021.

- LI JY. Response of mycorrhizal fungal community composition to spatial distribution of *Orchidaceae* plants[D]. Beijing: Master's Thesis of Peking Union Medical College, 2021 (in Chinese).
- [19] XING XK, GAI XG, LIU Q, HART MM, GUO SX. Mycorrhizal fungal diversity and community composition in a lithophytic and epiphytic orchid[J]. *Mycorrhiza*, 2015, 25(4): 289-296.
- [20] 毛益婷. 兰科石斛属根部内生真菌及其对种子萌发和苗木生长的效应[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2011.
- MAO YT. Endophytic fungus from the *Dendrobium* plants and effects on seed germination and seedling growth[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2011 (in Chinese).
- [21] WANG DY, JACQUEMYN H, GOMES SIF, VOS RA, MERCKX VSFT. Symbiont switching and trophic mode shifts in *Orchidaceae*[J]. *New Phytologist*, 2021, 231(2): 791-800.
- [22] 徐锦堂, 郭顺星. 供给天麻种子萌发营养的真菌: 紫萁小菇[J]. *真菌学报*, 1989, 8(3): 221-226, 245.
- XU JT, GUO SX. Fungus associated with nutrition of seed germination of *Gastrodia elata*: *Mycena osmundicola* Lange[J]. *Mycosystema*, 1989, 8(3): 221-226, 245 (in Chinese).
- [23] YAGAME T, OGURA-TSUJITA Y, KINOSHITA A, IWASE K, YUKAWA T. Fungal partner shifts during the evolution of mycoheterotrophy in *Neottia*[J]. *American Journal of Botany*, 2016, 103(9): 1630-1641.
- [24] BIDARTONDO MI, READ DJ. Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development[J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(16): 3707-3716.
- [25] ZHANG LY, RAMMITSU K, KINOSHITA A, TOKUHARA K, YUKAWA T, OGURA-TSUJITA Y. Symbiotic culture of three closely related *Dendrobium* species reveals a growth bottleneck and differences in mycorrhizal specificity at early developmental stages[J]. *Diversity*, 2022, 14(12): 1119.
- [26] MENG YY, FAN XL, ZHOU LR, SHAO SC, LIU Q, SELOSSE MA, GAO JY. Symbiotic fungi undergo a taxonomic and functional bottleneck during orchid seeds germination: a case study on *Dendrobium moniliforme*[J]. *Symbiosis*, 2019, 79(3): 205-212.
- [27] ZHU GH, JI ZH, JEFFREY JW, HOWARD PW. *Dendrobium*[M]//Flora of China: Vol. 25. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2009: 367-397.
- [28] SCHUITEMAN A. Typification of infrageneric taxa in *Dendrobium (Orchidaceae)*[J]. *Muelleria*, 2012, 30(1): 3-7.
- [29] 李孟凯, 余应鹏, 王伟, 邢震, 陈学达. 中国石斛属(兰科)植物新资料[J]. *广西植物*, 2024, 44(5): 1003-1006.
- LI MK, YU YP, WANG W, XING Z, CHEN XD. New records of *Dendrobium (Orchidaceae)* from China[J]. *Guihaia*, 2024, 44(5): 1003-1006 (in Chinese).
- [30] SHAO SC, MOHANDASS D, GAO JY. In situ symbiotic seed germination in *Dendrobium* spp. (*Orchidaceae*): implications for orchid restoration[J]. *Proceedings of the 18th EOCCE*, 2019: 36-46.
- [31] 倪凯, 何鹏飞, 梁志庆, 王胤骁, 沈宇明, 段兴恩. 齿瓣石斛研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2023, 44(1): 86-90.
- NI K, HE PF, LIANG ZQ, WANG YX, SHEN YM, DUAN XE. Research progress of *Dendrobium devonianum*[J]. *Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, 2023, 44(1): 86-90 (in Chinese).
- [32] SHAO SC, BURGESS KS, CRUSE-SANDERS JM, LIU Q, FAN XL, HUANG H, GAO JY. Using *in situ* symbiotic seed germination to restore over-collected medicinal orchids in southwest China[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 888.
- [33] 邵士成, 高江云, 黄晖, 刘强. 一种齿瓣石斛种子和共生真菌混合播种的育苗方法: CN105815002B[P]. 2018-03-27.
- SHAO SC, GAO JY, HUANG H, LIU Q. Seedling growing method adopting *Dendrobium devonianum* seed and symbiotic fungus mixed sowing: CN105815002B[P]. 2018-03-27 (in Chinese).
- [34] WAUD M, BUSSCHAERT P, RUYTERS S, JACQUEMYN H, LIEVENS B. Impact of primer choice on characterization of orchid mycorrhizal communities using 454 pyrosequencing[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(4): 679-699.
- [35] SELOSSE MA, PETROLLI R, MUJICA MI, LAURENT L, PEREZ-LAMARQUE B, FIGURA T, BOURCERET A, JACQUEMYN H, LI TQ, GAO JY, MINASIEWICZ J, MARTOS F. The waiting room hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes?[J]. *Annals of Botany*, 2022, 129(3): 259-270.
- [36] SARMIENTO DJC. *Tulasnella* spp. as saprotrophic and mycorrhizal fungi of tropical orchids: morphology, molecular taxonomy, and ecology[D]. Frankfurt: PhD thesis of Johann Wolfgang Goethe-University, 2016.

- [37] FOCHI V, CHITARRA W, KOHLER A, VOYRON S, SINGAN VR, LINDQUIST EA, BARRY KW, GIRLANDA M, GRIGORIEV IV, MARTIN F, BALESTRINI R, PEROTTO S. Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora-Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas[J]. *New Phytologist*, 2017, 213(1): 365-379.
- [38] SUETSUGU K, HARAGUCHI TF, OKADA H, TAYASU I. *Stigmatodactylus sikokianus* (Orchidaceae) mainly acquires carbon from decaying litter through association with a specific clade of *Serendipitaceae*[J]. *New Phytologist*, 2021, 231(5): 1670-1675.
- [39] CEVALLOS S, DECLERCK S, SUÁREZ JP. *In situ* orchid seedling-trap experiment shows few keystone and many randomly associated mycorrhizal fungal species during early plant colonization[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1664.
- [40] 冯晓晓, 陈家杰, 刘峰, 胡卫珍, 林福呈, 章初龙. 西双版纳 5 种附生兰非菌根内生真菌多样性研究[J]. *菌物学报*, 2019, 38(11): 1876-1885.
- FENG XX, CHEN JJ, LIU F, HU WZ, LIN FC, ZHANG CL. Diversity of non-mycorrhizal endophytic fungi from five epiphytic orchids from Xishuangbanna, China[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(11): 1876-1885 (in Chinese).
- [41] 朱彦明, 金锦游, 崔永一. 内生真菌对铁皮石斛种苗生长的影响[J]. *浙江农业科学*, 2019, 60(9): 1601-1605.
- ZHU YM, JIN JY, CUI YY. Effect of endophytic fungi on growth of *Dendrobium officinale* seedlings[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2019, 60(9): 1601-1605 (in Chinese).
- [42] KÖMPE YÖ, MUTLU VA, ÖZKOÇ İ, DEMIRAY S, SERHAT B. Fungal diversity and *ex vitro* symbiotic germination of *Serapias vomeracea* (Orchidaceae)[J]. *Acta Botanica Croatica*, 2022, 81(1): 108-116.
- [43] 柴晓蕾, 宋希强, 朱婕. 华石斛内生真菌组织分布特点及其抑菌活性[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(1): 137-144.
- CHAI XL, SONG XQ, ZHU J. Diversity of endophytic fungi isolated from *Dendrobium sinense* with different culture media and their antimicrobial activities[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39(1): 137-144 (in Chinese).
- [44] BELL J, YOKOYA K, KENDON JP, SARASAN V. Diversity of root-associated culturable fungi of *Cephalanthera rubra* (Orchidaceae) in relation to soil characteristics[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8695.
- [45] ARIFIN AR, PHILLIPS RD, WEINSTEIN AM, LINDE CC. *Cryptostylis* species (Orchidaceae) from a broad geographic and habitat range associate with a phylogenetically narrow lineage of *Tulasnellaceae* fungi[J]. *Fungal Biology*, 2022, 126(8): 534-546.
- [46] 胡瑶, 雷星宇, 张跃龙, 李宏告, 李丽辉. 野生国兰根系共生真菌群落结构及生物学功能[J/OL]. *分子植物育种*, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231207.1125.008.html>.
- HU Y, LEI XY, ZHANG YL, LI HG, LI LH. Analysis on community structure and biological function of symbiotic fungi in wild orchid root system[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231207.1125.008.html> (in Chinese).
- [47] WANG SQ, LU ZX, LANG B, WANG XH, LI YQ, CHEN J. *Curvularia lunata* and *Curvularia* leaf spot of maize in China[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(51): 47462-47470.
- [48] STŘEDA T, KRÉDL Z, POKORNÝ R, SANGCHOTE S. Effect of wetting period on infection of orchid flowers by *Alternaria alternata* and *Curvularia eragrostidis*[J]. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 2013, 41(1): 1-8.
- [49] MIRGHASEMPOUR SA, MICHAILIDES T, CHEN WL, MAO BZ. *Fusarium* spp. associated with *Dendrobium officinale* dieback disease in China[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(9): 919.