

流苏石斛种子非共生萌发的研究

余 乐¹, 兰芹英², 汤庚国³

(1. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏 泰州 225300; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 3. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 通过对流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook.) 成熟种子进行无菌播种诱导原球茎, 研究了其在不同温度、不同质量浓度植物生长调节剂配比下种子无菌萌发情况, 原球茎分化获得幼苗。结果表明: 25 ℃, Knudson C(KC) + 2% 蔗糖 + 0.7% 琼脂时, 原球茎诱导时间为 7–15 d, 种子萌发率可达 98.3%。25 ℃, KC + 2 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1–0.5 mg·L⁻¹ NAA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂时, 有利于原球茎诱导和幼苗分化, 分化率可达 91.2%。幼苗继代转接后均能正常生长、增殖和生根。

关键词: 流苏石斛; 种子; 非共生萌发

中图分类号: S682.31 文献标识码: A 文章编号: 1001–389X(2011)04–0346–03

Study on nonsymbiotic sprout of *Dendrobium fimbriatum* Hook.

YU Le¹, LAN Qin-ying², TANG Geng-guo³

(1. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou, Jiangsu 225300, China;
2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China
3. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

Abstract: Seeds of *Dendrobium fimbriatum* were sown aseptically for protocorms induced and organogenesis, also the effects of different temperature, hormones combinations on the seed nonsymbiotic germination were studied. The results showed that protocorms, green and big, were induced after 7–15 d on KC basal medium with 2% sucrose, solidified with 0.7% agar at 25 ℃ and the seed germination rate maybe up to 98.3%. The actions of protocorm inducing and seeding differentiation were effective when they were cultured on KC medium + 2 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1–0.5 mg·L⁻¹ NAA with 3% sucrose, solidified with 0.7% agar at 25 ℃. The percentage of induction and proliferation maybe up to 91.2%. The seedlings on subculture medium could normally multiply, root and regrowth.

Key words: *Dendrobium fimbriatum* Hook.; seed; nonsymbiotic germination

流苏石斛(*Dendrobium fimbriatum* Hook.) 为兰科(Orchidaceae) 石斛属(*Dendrobium*) 多年生附生植物, 已被国家列为重点保护的珍稀濒危植物^[1], 是《中国药典》收录的 5 种药用石斛之一。根据传统医学, 石斛主要有滋阴清热、生津止渴等功效^[2], 是一种非常具有开发利用价值的野生兰。近年来, 由于生境的不断破坏, 加之流苏石斛自身的生长、繁殖特性和对生长环境的特殊要求以及人们的过度采挖利用等原因, 使其野生资源濒临枯竭。目前, 国内外很多学者致力于兰科植物的保护生物学研究^[3–4]。已有关于铁皮石斛(*D. officinale* Kimura et Migo) 种子、原球茎、试管苗的低温离体保存以及温度对铁皮石斛生长与生理特性影响的研究报道^[5–8]。金钗石斛(*D. nobile* Lindl.) 种子非共生萌发等方面的研究也取得一定的成果^[9]。关于流苏石斛的繁育方面的研究报道不多, 组织培养快速繁殖方面及扦插繁殖多以茎段为外植体, 且技术尚未成熟^[10–12]。

鉴于此, 笔者通过对流苏石斛进行种子非共生萌发的研究, 探讨种子萌发的最适条件, 并对流苏石斛的繁育系统进行初探, 初步建立药用流苏石斛快速繁殖技术体系, 对于缓解药用石斛市场供需矛盾, 野生石斛多样性保护和可持续利用具有重要意义和实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来源于西双版纳热带植物园流苏石斛当年蒴果内成熟种子。

收稿日期: 2011–05–20 修回日期: 2011–06–24

基金项目: 中国科学院战略生物资源技术支撑体系专项项目(CZBZX–1)。

作者简介: 余乐(1982–), 男, 助教, 从事野生兰花离体保存的研究。E-mail: yule19821106@163.com。

1.2 试验方法

1.2.1 原球茎诱导培养 (1) 在 KC 固体培养基中添加不同质量浓度的 6-BA 和 NAA 形成不同的组合, 观察不同生长调节剂对流苏石斛种子非共生萌发的影响, 10 个重复(10 瓶), 以确定最适合的生长调节剂组合:

KC + 0 - 2 mg·L⁻¹ 6-BA + 0 - 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 值 5.8 ± 0.1, 培养材料放置于(25 ± 1) °C, 光照度为 2 000 lx, 光照周期为 12 h·d⁻¹。

(2) 将培养材料放置于不同温度下, 观测温度对流苏石斛非共生萌发的影响, 10 个重复(10 瓶), 以确定最适合的萌发温度:

15 - 30 °C 和 25/30 °C 的变温, KC + 2% 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 值 5.6 ± 0.1, 光照度为 2 000 lx, 光照周期为 12 h·d⁻¹。

1.2.2 种子无菌接种 取野生流苏石斛未开裂的蒴果, 先用自来水洗掉蒴果表面污渍, 放在超净工作台上, 将其浸入 75% 乙醇 30 s 后, 再用 0.1% HgCl₂ 灭菌 8 - 10 min, 无菌水冲洗 2 - 3 次。将消毒过的蒴果置于滤纸上并吸干其表面水分, 再用解剖刀将其果皮切开, 最后将种子均匀播撒于诱导种子萌发的培养基上。每天观察原球茎的诱导以及芽分化状况。以原球茎变绿记为起始诱导天数, 整瓶变绿为诱导结束时间, 将材料取部分放置显微镜下, 观测其生长状况, 10 个重复, 取平均值。

1.2.3 原球茎的快繁培养 将生长健壮, 增殖分化的原球茎全数转接于培养基中, 观察原球茎的生根情况。

KC + 2 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L⁻¹ NAA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 值 5.8 ± 0.1, 培养材料放置于(25 ± 1) °C, 光照度为 2 000 lx, 光照周期为 12 h·d⁻¹。

2 结果与分析

2.1 不同生长调节剂配比对流苏石斛原球茎诱导的影响

利用 SPSS 13.0 软件包对试验数据进行方差分析和多重检测(SSR 法)。结果表明: 在不添加任何生长调节剂的情况下对流苏石斛进行非共生萌发, 也能诱导产生原球茎, 但是种子形成原球茎所需的时间较长(推迟了 7 - 12 d), 并且诱导率较低。采用相同浓度的 KC + 0.5 或 1 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ NAA, 缩短了原球茎的诱导时间, 诱导率高达 90% 以上。同时发现, 高浓度(2.0 mg·L⁻¹) 6-BA 有利于原球茎的诱导以及芽的分化, 原球茎的诱导率为 93.7% - 96.1%, 芽的分化率为 89.7% - 95.2% (表 1)。

表 1 不同生长调节剂配比对流苏石斛种子萌发的影响¹⁾

Table 1 Effects of different hormones combinations on the germination of *D. fimbriatum* seeds

6-BA + NAA mg · L ⁻¹	接种数/瓶	原球茎诱导 率/%	原球茎诱导 时间/d	原球茎分 化率/%	原球茎分化 时间/d
0.0 + 0.0	10	86.3 ± 2.227a	14 - 26	67.7 ± 0.529a	51 - 67
0.5 + 0.1	10	89.7 ± 0.529b	10 - 21	81.3 ± 0.916c	42 - 58
0.5 + 0.2	10	88.1 ± 0.984ab	8 - 19	73.7 ± 0.529d	41 - 59
0.5 + 0.5	10	90.1 ± 1.040b	8 - 17	83.1 ± 0.624e	35 - 47
1.0 + 0.1	10	94.3 ± 0.871c	10 - 16	89.0 ± 1.594f	37 - 47
1.0 + 0.2	10	89.3 ± 0.264b	12 - 16	87.0 ± 0.300g	30 - 46
1.0 + 0.5	10	90.3 ± 1.200b	9 - 16	81.3 ± 1.216bc	29 - 47
2.0 + 0.1	10	93.7 ± 0.608c	8 - 16	89.7 ± 0.642bf	16 - 22
2.0 + 0.2	10	96.1 ± 3.364c	7 - 14	95.2 ± 0.173g	15 - 21
2.0 + 0.5	10	94.7 ± 0.360c	9 - 16	93.0 ± 0.321h	15 - 23

¹⁾ 数据后附小写字母表示经多重检测达 0.05 显著水平。

2.2 不同温度对流苏石斛种子萌发的影响

15 °C 条件下培养的流苏石斛种子 2 个月后, 没有发生任何变化。培养在 20 °C 下的种子, 诱导产生的原球茎体积较小, 呈嫩绿色, 诱导时间相对 25、30 和 25/30 °C 变温的培养条件下较长, 需要 8 - 28 d。在 25 °C 下, 种子萌发情况较其它培养温度好, 原球茎颜色呈绿色, 粒大。可认为 25 °C 时, 适合流苏石斛种子的非共生萌发(表 2)。

表2 不同温度对流苏石斛种子萌发的影响¹⁾Table 2 Effects of different temperature on the germination of *D. fimbriatum* seeds

温度/℃	接种数/瓶	原球茎诱导时间/d	原球茎诱导率/%	原球茎诱导情况
15	10	—	—	不萌发,保持原来黄色状态
20	10	9-28	91.4 ± 0.818a	萌发良好,原球茎嫩绿色,粒小
25	10	7-15	98.3 ± 0.529b	萌发整齐,原球茎呈绿色,粒大
30	10	8-20	83.1 ± 1.493c	多数萌发,原球茎呈嫩绿色,粒小
25/30	10	8-24	93.7 ± 2.615a	萌发良好,原球茎呈嫩绿色,粒小

¹⁾ 数据后附小写字母表示经多重检测达0.05显著水平。

2.3 原球茎的生根培养

流苏石斛原球茎在初代培养阶段时,幼苗已有部分生出细根。幼苗转接于新鲜培养基培养15-21 d时,根系发达,生根数为3-6根,根长3-5 cm。根上附有少许白色刚毛,没有出现未生根的现象,长势良好。

3 讨论

野生石斛兰自然条件下种子的萌发与真菌是密切相关的,从野生石斛根中可分离出内生真菌约25种^[13]。兰花种子极为细小,每粒种子长1-2 mm,直径0.1-0.2 mm,重量只有0.3-6.5 μg,且种子内的胚多半不成熟或发育不完全,因而难以在自然条件下萌发。无菌条件下,植物生长调节物质对石斛种子的萌发起着重要的促进作用。研究表明:25℃,KC固体培养基+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1-0.5 mg·L⁻¹ NAA时,流苏石斛种子的萌发率为93.7%-96.1%,原球茎的分化率为89.7%-95.2%,效果最好。原球茎经转接继代培养后生根率为100%。

流苏石斛种子非共生萌发的研究作为快繁体系的初期阶段,为真正建立流苏石斛快繁体系以及为保护野生石斛兰种质资源与可持续利用提供了依据。

参考文献

- [1] 刘强,殷寿华,黄文,等.流苏石斛濒危原因及资源保护[J].亚热带植物科学,2007,36(4):45-47.
- [2] 包雪声,顺天生,陈立钻,等.中国药用石斛[M].上海:上海医科大学出版社,2001:63-64.
- [3] Kull T, Kindlmann P, Hutchings M J. Conservation biology of orchids: introduction to the special issue [J]. Biological Conservation, 2006, 129(1):1-3.
- [4] Ruiz-Zapata T, Arroyo M T K. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous forest in Venezuela [J]. Biotropica, 1978, 10: 221-230.
- [5] 林伟强,边红武,王君晖,等.铁皮石斛类原球茎空气干燥法超低温保存中的脱水蛋白分析[J].园艺学报,2004,31(1):64-68.
- [6] Yamaki H C. Phenanthrenes from *Dendrobium plocatile* [J]. Phytochemistry, 2000, 53: 987.
- [7] 杜刚,杨海英,朱绍林,等.铁皮石斛种子诱导成苗试验[J].中药材,2007,30(10):1207-1208.
- [8] 艾娟,严宁,胡虹,等.温度对铁皮石斛生长及生理特性的影响[J].云南植物研究,2010,32(5):420-426.
- [9] 宋锡全,龚宁,詹孝慈,等.金钗石斛种子非共生萌发和种质保存[J].贵州师范大学学报:自然科学版,2004,22(2):13-16.
- [10] 黄勇.流苏石斛组织培养体系研究[J].安徽农业科学,2010,38(2):627-628.
- [11] 王洪云.流苏石斛研究进展[J].云南中医中药杂志,2010,31(6):64-65.
- [12] 唐德英,李学兰,段立胜.流苏石斛扦插繁殖试验[J].中药材,2009,32(1):15-16.
- [13] 郭顺星,曹文岑,高微微.铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定[J].中国中药杂志,2000,25(6):338-341.

(责任编辑:卢凤美)