

3种石斛兰种子非共生萌发和离体保存

余 乐¹ 兰芹英^{2*} 王晓静² 马双敏³ 梁国鲁¹

(¹西南大学园艺园林学院,重庆北碚400715; ²中国科学院西双版纳热带植物园; ³云南大学生命科学学院)

摘 要:以金钗石斛(*Dendrobium nobile*)、流苏石斛(*D. fimbriatum*)和报春石斛(*D. primulinum*)为研究对象,研究了其在激素浓度配比下种子萌发情况,并对流苏石斛幼苗进行离体保存。结果表明:25℃时,Knudson C (KC)+BA2mg/L+NAA0.2mg/L最利于金钗和流苏石斛原球茎诱导和幼苗分化;KC+NAA0.5mg/L时最适报春石斛原球茎诱导和幼苗分化。幼苗保存在15℃,每天12h光照(2 000lx),添加3%甘露醇(mannitol)的KC培养基中,10个月后存活率为96%。

关键词:石斛属;种子;非共生萌发;离体保存

中图分类号S682.31

文献标识码B

文章编号1007-7731(2009)08-027-03

Non-symbiotic Germination of Three Species in *Dendrobium* and In vitro Conservation at Low Temperature
Yu Le¹ Lan Qingying^{2*} Wang Xiaojing² Ma Shuangmin³ Liang Guolu¹

(¹College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Beibei, Chongqing 400715, China; ²Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences; ³School of Life Sciences, Yunnan University)

Abstract: Effect of different hormones combinations on the seed non-symbiotic germination of *D. nobile*, *D. fimbriatum* and *D. primulinum* also the in vitro conservation of *D. fimbriatum* seedlings were studied in this paper. The results showed that KC+BA2mg/L+NAA0.2mg/L at 25℃ was the best for *D. nobile* and *D. fimbriatum* protocorm growth and organogenesis; KC+NAA0.5mg/L at 25℃ was suitable for *D. primulinum*. Addition of mannitol (3.0%w/v) to the medium and incubation at low temperature (15℃) resulted in higher survival rate (96%) after 10 months of continuous storage.

Key words: *Dendrobium*; Seed; Non-symbiotic Germination; In vitro conservation

石斛属(*Dendrobium*)是兰科(*Orchidaceae*)第2大属,多年生草本附生植物,全球约1 400余种^[1],可作盆花和切花,其中金钗石斛(*D. nobile*)、流苏石斛(*D. fimbriatum*)、密花石斛(*D. densiflorum*)、束花石斛(*D. chrysanthum*)、美花石斛(*D. loddigesii*)等种类兼具药用价值^[2]。石斛兰在自然状态下繁殖困难,种子萌发率极低,传统分株繁殖周期长,效率低,加之近年来热带雨林的持续破坏以及人们的过度采挖利用等原因,已被国家列为重点保护的珍稀濒危植物^[3]。本文对3种石斛兰进行种子非共生萌发,探讨种子萌发的最适条件,并对流苏石斛的试管幼苗进行了种质保存的研究。将药用石斛的组织快繁与种质保存相结合进行研究,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 实验材料 中科院西双版纳热带植物园内的金钗、流苏和报春石斛为试材,取其人工授粉后的成熟蒴果进行种

子非共生萌发实验。流苏石斛试管幼苗作为离体保存的材料。

1.2 实验方法

1.2.1 种子非共生萌发 探讨不用激素对比对种子萌发的影响:KC+BA0-2mg/L(单位下同)+NAA0-0.5+蔗糖3%+琼脂0.7%,pH值5.8±0.1,放置于24±2℃、2 000lx(12h/d)。

1.2.2 离体保存 将1.5-2cm幼苗转接到保存培养基上,每个处理接种100株,置于50个PC试管中。保存培养基为KC+mannitol1%-5%添加:蔗糖3%、琼脂0.7%,pH值5.8±0.1。放置于15℃、光照12h/d(2 000lx)保存。

1.2.3 存活率和恢复率的检测 保存3个月起,观察记录存活率。以植株叶片和茎均变为褐黄色的作死亡计算。将存活的幼苗进行增殖培养,能正常生长和增殖的,作恢复率计算。

2 结果与分析

2.1 种子非共生萌发 植物生长调节剂是培养基中的关键

基金项目:国家自然科学基金(30571526)、中国科学院战略生物资源技术支撑体系专项项目(CZBZX-1)和科学技术部平台项目(2005DKA21006)

作者简介:余 乐(1982-),男,在读硕士,主要从事兰花离体保存研究。

* 通讯作者。

收稿日期:2009-03-13

物质,用量虽小,在组培中起着重要和明显的调节作用。试验通过在培养基中添加不同激素配比来研究植物生长调节剂对原球茎诱导和分化的影响。表1表明:不添加任何激素,石斛种子也能诱导出原球茎,但所需时间较长,并且诱导率低,诱导时间推迟了6~14d。适当浓度的激素配比适合

石斛种子的萌发,原球茎诱导与分化。

2.2 不同浓度的mannitol对流苏石斛离体保存的影响
15℃培养室内保存的流苏石斛试管苗,1%mannitol组合在保存第9个月时开始出现叶片玻璃化并掉落;5%mannitol组合严重抑制幼苗生长,第10个月时叶片几乎全数玻璃化;对照

表1 不同激素配比对流苏、报春和金钗石斛种子萌发的影响

Table 1 Effects of different hormones combinations on the germination of *D. fimbriatum*, *D. primulinum* and *D. nobile*, seeds

材料名称 Name	处理 Treatments BA + NAA (mg/L)	原球茎诱导率 (%) Protocorms induction rate	原球茎诱导时间 (d) Days of protocorms induction	原球茎分化率 (%) Protocorms organogenesis rate	原球茎分化时间 (d) Days of Protocorms organogenesis
流苏石斛 D. Fimbriatum	0.0 + 0.0	86.3 ± 2.227	14 ~ 26	67.7 ± 0.529	51 ~ 67
	0.5 + 0.1	89.7 ± 0.529	10 ~ 21	81.3 ± 0.916	42 ~ 58
	0.5 + 0.2	88.1 ± 0.984	8 ~ 19	73.7 ± 0.529	41 ~ 59
	0.5 + 0.5	90.1 ± 1.040	8 ~ 17	83.1 ± 0.624	35 ~ 47
	1.0 + 0.1	94.3 ± 0.871	10 ~ 16	89.0 ± 1.594	37 ~ 47
	1.0 + 0.2	89.3 ± 0.264	12 ~ 16	87.0 ± 0.300	30 ~ 46
	1.0 + 0.5	90.3 ± 1.200	9 ~ 16	81.3 ± 1.216	29 ~ 47
	2.0 + 0.1	93.7 ± 0.608	8 ~ 16	89.7 ± 0.642	16 ~ 22
	2.0 + 0.2	96.1 ± 3.364	7 ~ 14	95.2 ± 0.173	15 ~ 21
	2.0 + 0.5	94.7 ± 0.360	9 ~ 16	93.0 ± 0.321	15 ~ 23
	0.0 + 0.5	90.3 ± 0.200	8~12	81.3 ± 1.153	15~18
	0.5 + 0.1	75.0 ± 1.015	10~16	69.0 ± 1.572	37~47
	0.5 + 0.2	78.0 ± 1.054	10~16	67.0 ± 0.436	40~46
	0.5 + 0.5	76.0 ± 1.253	10~16	71.7 ± 0.346	39~47
	1.0 + 0.1	87.0 ± 1.992	10~17	60.0 ± 1.253	31~47
报春石斛 D. primulinum	1.0 + 0.2	85.7 ± 3.200	9~16	73.0 ± 1.758	35~47
	1.0 + 0.5	84.0 ± 0.557	8~16	77.0 ± 3.700	35~45
	2.0 + 0.1	75.7 ± 0.071	9~16	68.0 ± 3.576	35~47
	2.0 + 0.2	75.3 ± 0.265	9~18	60.3 ± 3.904	36~50
	2.0 + 0.5	71.0 ± 1.819	9~20	66.3 ± 0.755	36~53
	0.0 + 0.0	80.7 ± 0.872	19~24	71.3 ± 1.442	39~58
金钗石斛 D. nobile	0.5 + 0.1	96.0 ± 0.265	13~17	91.7 ± 0.400	38~51
	0.5 + 0.2	79.0 ± 1.015	15~17	74.3 ± 4.133	32~47
	0.5 + 0.5	87.0 ± 0.794	13~17	80.0 ± 3.404	31~49
	1.0 + 0.1	94.0 ± 1.082	15~21	87.0 ± 0.100	31~44
	1.0 + 0.2	84.3 ± 3.219	13~19	75.6 ± 1.270	32~47
	1.0 + 0.5	93.3 ± 0.346	13~18	90.3 ± 0.520	32~41
	2.0 + 0.1	81.0 ± 0.889	15~18	79.3 ± 0.458	38~53
	2.0 + 0.2	97.3 ± 0.721	15~17	95.7 ± 1.709	31~41
	2.0 + 0.5	92.1 ± 0.361	15~19	88.4 ± 3.329	33~43

在保存第7个月时,部分叶片褐化;3%mannitol组合,保持较好的生长势,叶片呈绿色。3%mannitol组合试管苗保存10个月存活率达96%,保存效果最好;而1%,5%mannitol和对照组合试管苗存活率分别为68%,40%和28%详见图1。

2.3 恢复培养 保存了10个月的试管苗生长缓慢,将存活的

试管苗转接到KC+BA 2.0+NAA0.5 培养基中进行恢复增殖培养,温度25℃,光照度2 000lx(12h/d)下培养,能正常生长,增殖和恢复率达100%。

3 讨论

石斛种子细若粉尘,(下转69页)

4.2 **成穗率高** 由于前期分蘖能力强,栽插25d过后,就达到20万/667m²。栽后38d,出现高峰苗期为27.22万/667m²。通过烤田,控制无效分蘖,最终成穗21.6万/667m²,成穗率达80%。

4.3 **结实率高** 测产得出:南粳45总粒数148.9粒,实粒数141.5粒,结实率95%。

5 高产栽培技术要点

5.1 **培育叶蘖同伸壮秧** 要求秧苗平均单株2叶以上分蘖二三个,在育秧技术上,秧田要施足基肥,提高秧田整地质量。同时重点抓住2个措施,一是适时播种,根据高产需要,5月10日左右播种,秧龄30d,6月10日前移栽结束;二是稀播、匀播,要充分利用芽鞘节位分蘖,促进早生快发,培育多蘖壮秧。秧田播种量严格控制在15kg/667m²以下,在秧苗2叶1心时施好断奶肥,促进分蘖,提高秧苗素质。

5.2 **合理密植,适时移栽** 南粳的移栽规格,一是宽行密植,以26.7cm行距,15cm株距,确保实际移栽密度在1.66万穴/667m²;二是每穴移栽5.5个蘖苗,利于个体与群体及穗、粒、重三者协调发展,攻大穗、提高结实率。移栽时秧龄25-

30d,6月10日栽插。

5.3 **肥水管理** 产量750kg/667m²以上的南粳45,大田需纯N量为25-30kg/667m²,N、P、K比例为1:0.45:0.7。基肥应占总肥量的30%,栽后利用肥水促早发;分蘖肥占30%,栽后7-10d追施;穗肥占40%,分倒4叶、倒2叶2次施,并且以15-15-15三元复合肥为主,结合适量尿素和氯化钾。

南粳45在分蘖阶段以间隙湿润灌溉为主,但切忌断水,要求在栽后25d左右,主茎叶龄11.5-12叶时达到预定穗数苗时,及时轻搁田控制过多的无效分蘖发生,使苗数平稳上升;在主茎14.5-15叶,到达高峰苗时,开沟烤田,最高苗数控制在28万/667m²以内,实现保蘖促壮秆的目的。肥水协调攻大穗,此时苗数要缓慢下降,以利于提高成穗率,促进秆壮穗大。在孕穗至灌浆期注意保持浅水层,以后干干湿湿,收获前7d断水,确保后期秆青籽黄,活熟到老。

5.4 **病虫害防治** 南粳45病虫害危害情况与杂交粳稻基本相仿,前期要预防好条纹叶枯病;中、后期防治螟虫、纹枯病;抽穗前10d、见穗时用药控制稻曲病的发生。

(徐爱民编,马伟芝校)

(上接28页)一个蒴果内种子数以万计。由于种子缺乏胚乳,自然条件下需与真菌共生才能萌发,繁殖力极低(不足5%)^[4],对其非共生萌发的研究具有重要意义。研究表明:25℃是三种石斛兰的最适培养温度,金钗石斛和流苏石斛种子非共生萌发最适培养条件为Knudson C (KC) +BA2mg/L+NAA0.2mg/L;报春石斛则为 KC+NAA0.5mg/L。

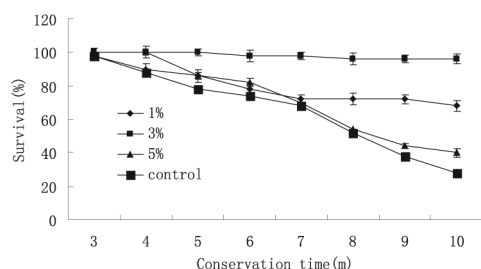


图1 不同mannitol浓度对流苏石斛存活率的影响
Fig.1 Effects of different mannitol on survival of *D. fimbriatum* seedlings

保存时间的长短与材料保存前的生长状态,培养基成分以及培养温度、光照条件等因素有关。本研究表明:离体保存流苏石斛,通过降低保存温度,添加抑制剂,能很好地抑制生长,延长保存时间,提高存活率。在15℃下,添加不同浓度的mannitol对幼苗生长有抑制作用。以浓度为3% mannitol最为适合,保存10个月存活率为96%。其结果同兰芹英等报道的蒙自凤仙花在12℃及3%mannitol的条件下保存最好^[5]相同。mannitol降低了细胞的膨压,增加了细胞的渗透势,使水分和养分吸收受阻^[6],导致地上部分和地下部分生长受阻,减少营养消耗,从而提高了存活率。

在世界范围内兰花野生资源不断流失的形势下,世界

上很多科学家正致力于兰科植物的保护研究^[7]。与此同时,中国野生兰花资源濒临枯竭,亟需保护^[8]。

本试验将三种石斛种子非共生萌发与流苏石斛试管幼苗离体保存相结合。研究结果为保护野生石斛兰种质资源与可持续利用提供了依据。由于造成野生石斛兰濒危的因素较多,我们还需对其生境及试管苗野外回归性状做进一步研究。

参考文献

- [1] Lavarack B, Harris W, Stocker G.. *Dendrobium and its relatives* [M]. Timber Press. 2002. 14.
- [2] Handa S S. *Orchids for drugs and chemicals. Biology, Conservation and Culture of orchids* [M]. Chicago: Affiliated East-West Press Private Limited. 89-100.
- [3] 刘 强, 殷寿华, 黄 文, 殷建涛. 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 .
- [4] Vellupillai M, Swamp S, Chong J H. Histological and protein changes during early stages of seed germination in the Orchid *Dendrobium Erumenatum* [J]. Horticulture Science, 1997, 7(26): 941.
- [5] 兰芹英, 殷寿华, 何惠英等. 蒙自凤仙花的离体保存 [J]. 西北植物学报, 2004, 24 (1): 146-148.
- [6] 黄菊辉. 生姜种质资源的离体繁殖和保存 [J]. 中国农业科学, 1995, 28 (2): 24-30.
- [7] Tiui Kull, Pavel Kindlmann, Michael J. Hutchings and Richard B. Primack. Conservation biology of orchids: Introduction to the special issue [J]. Biological Conservation, 2006, 129(1): 1-3.
- [8] Luo Y B, Jia J S, Wang C L. A general review of the conservation status of Chinese orchids [J]. Biodiversity Science, 2003, 11(1): 70-77.

(方 达编, 张桂林校)