

# 白芨种子的无菌萌发过程观察和组培快繁研究

张 燕, 黎 斌, 李 汝 娟, 李 思 锋

(陕西省植物研究所, 西安植物园, 陕西 西安 710061)

**摘 要:**以白芨种子为培养材料,对白芨种子无菌非共生萌发过程中原球茎发育进行了研究;并以白芨组培苗的原球茎和叶片为外植体,进行白芨组织培养快速繁殖技术研究。结果表明:在白芨的种子发育过程中,种胚发育成幼苗有2种方式,1种是小球体经原球茎发育成小苗;第2种是小球体伸长成根状茎后发育成小苗。组培苗的原球茎经切割后在诱导培养基上培养,可产生增殖分化,形成丛芽。原球茎诱导的最适培养基为 1/2MS+6-BA 5.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,增殖倍数为 2.71。以叶片为外植体,未获得组培苗。

**关键词:**白芨;无菌萌发;快速繁殖

**中图分类号:**S 682.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0158-03

白芨(*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.)属兰科(Orchidaceae)白芨属多年生草本植物,花期4~5月,花大色艳,地下块茎肥厚肉质,数个相连接,以干燥块茎入药,具有收敛止血、清热解毒、消肿生肌之功效<sup>[1]</sup>。白芨是兰科植物中既有较高观赏价值又有药用价值的花卉,具有较高的经济价值。近年来的研究发现,白芨的主要成分白芨胶(白芨多糖)具有抗氧化、抗菌消炎、促凝血、促进上皮细胞修复等功效,在化妆品、食品、保健品等领域具有广阔的开发应用前景<sup>[2]</sup>。由于白芨的药用、观赏和经济价值,其野生资源遭到过度采挖,加之其种子萌发率极低,自然繁殖困难,所以野生资源较稀少,是我国的一种珍稀濒危保护植物。

采用组织培养技术,对白芨进行快速繁殖,是获得大量优质种苗的途径之一。现利用白芨种子及种胚诱导产生的原球茎、茎尖和叶片等进行离体培养,得到了大量的试管苗,为探索快速规模化生产白芨种苗提供理论依据,从而使这一花卉资源得以开发利用,丰富现有的花卉种类和数量。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为白芨成熟未开裂蒴果(蒴果采自西安植

物园引种植物区),以及由白芨种胚诱导组培苗的原球茎和叶片。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌方法 首先用流水冲洗蒴果约30 min,用洗衣粉水刷洗蒴果表面,用蒸馏水冲洗2~3遍。在超净工作台上先用75%酒精消毒1 min,再用10%次氯酸钠溶液浸泡10 min,期间不停的摇动,使其消毒彻底,无菌水冲洗4~6遍,无菌滤纸吸干表面水分待用。在无菌条件下剖开蒴果,用镊子夹取蒴果外壳,将种子轻轻抖落到培养基表面。

1.2.2 白芨种子无菌萌发 基本培养基采用MS(除特殊说明外),均添加蔗糖30 g/L和琼脂粉6.5 g/L。培养基按试验设计在灭菌前添加不同的生长调节剂或有机物。培养基高温灭菌前调pH至5.4,121℃下灭菌15 min,每处理4次重复。白芨萌发培养基:(1)MS;(2)MS+NAA 1.0 mg/L;原球茎、叶片诱导培养基见表1。白芨生根培养基MS+NAA 1.0 mg/L。置于光强2 000~2 500 lx,光周期16 h/8h,温度(25±2)℃的条件下培养。

1.2.3 种胚形态及种胚突破种皮过程观察 接种剩余种子在Nikon ECLIPSE 55i光学显微镜10倍物镜下观察种子胚形态和发育状况,每个蒴果观察20个视野并统计数据,以有胚率表示,结果取平均值,有胚率=(有胚的种子数/总种子数)×100%。

1.2.4 白芨的组培快繁 将种子无菌萌发诱导的原球茎及叶片切割后(原球茎纵切,叶片切割长度在0.5 cm左右),分别接种到诱导培养基上,观察其诱导分化结果。

### 1.3 项目测定

用TTC法测定白芨种子活力:活种子的胚在呼吸作用过程中进行氧化还原反应,而死种子则无此反应。

**第一作者简介:**张燕(1979-),女,硕士,助理研究员,现主要从事珍稀濒危植物保护与开发利用等研究工作。E-mail: zhangyan\_790603@163.com.

**基金项目:**陕西省科技计划资助项目(2011k01-21);陕西省农业科技创新资助项目(2010NKC-05);陕西省科学院科技计划资助项目(2009K-06)。

**收稿日期:**2012-10-17

当 TTC 渗入活种子胚细胞内作为氢受体而被脱氢辅酶(NADH<sub>2</sub> 或 NADPH<sub>2</sub>)上的氢还原时,无色的 TTC 转变为红色的三苯基甲脘(TTF);如果种胚死亡或种胚生活力衰退,则不能染色或染色较浅。

## 2 结果与分析

### 2.1 种子的有胚率分析

成熟的白芨蒴果的颜色为黄绿色,呈长卵圆形(图 1、2),果实平均长度 3.87 cm,平均宽度 0.8 cm。白芨的种子由 1 层透明的种皮和乳白色的胚组成,呈纺锤形,无胚乳,几乎没有贮藏营养物质,可见残留的胚柄(图 3、4)。显微观察发现视野下有些种子只有种皮没有胚,这是由于试验所采集的蒴果未完全成熟,白芨种子胚的发育首先是种皮发育,而后出现胚<sup>[3]</sup>。经 TTC 染色,发现种子活力 99.03%(图 5、6)。

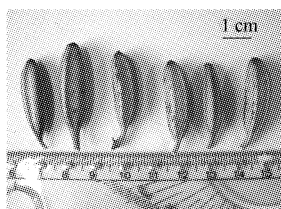


图 1 白芨蒴果的宽度

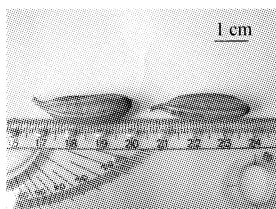


图 2 白芨蒴果的长度

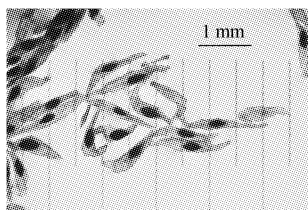


图 3 白芨种子的大小

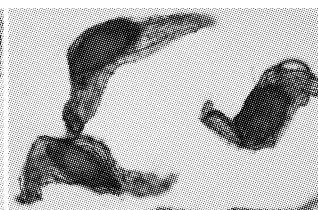


图 4 白芨种子的形态

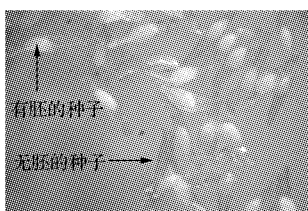


图 5 白芨的有胚种子和无胚种子

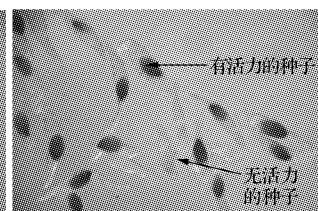


图 6 白芨种胚的活力 (TTC 染色)

### 2.2 不同培养基条件下白芨幼苗的发育过程

白芨种子接种到萌发培养基上 1 周左右,种胚开始膨大,无明显颜色变化。接种 2 周,种胚开始萌发形成小圆球体,圆球体个体较小。培养 3 周左右,原球茎基部分化出白色丛毛状突起,其中(1)号培养基种胚萌发率达 50%(图 7), (2)号培养基上种胚萌发率接近 40%(图 8)。对白芨胚胎发育进行了显微观察,结果表明,白芨种胚发育过程中,种胚转绿后突破种皮。种子萌发后并不出现胚根,只是胚逐渐膨大,从种子的一端突破种皮,形成裸胚。



图 7 白芨种胚的萌发 (原球茎途径)

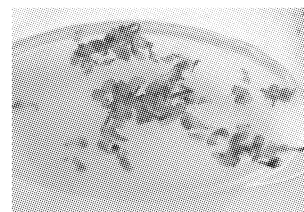


图 8 白芨种胚的萌发 (根状茎途径)

白芨种胚在不同培养基上,主要以 2 种途径发育成小苗,1 种是种胚转绿膨大形成小球体,在小球体顶端长出第 1 片叶,随后小球体增大伸长形成原球茎,第 2 片子叶长出,原球茎基部长出丛毛状突起(图 9、11)。第 2 种途径是种胚膨大形成小球体,小球体先形成根状茎,根状茎顶端逐渐转绿分化出芽,形成叶片(图 10、12)。

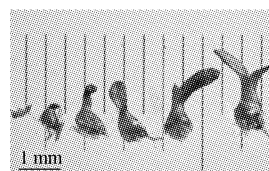


图 9 白芨幼苗发育途径 (原球茎途径)

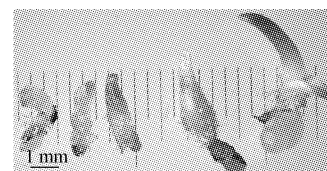


图 10 白芨幼苗发育途径 (根状茎途径)

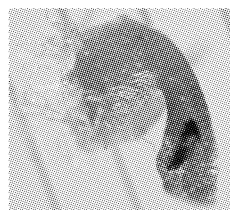


图 11 原球茎基部长出丛毛状突起

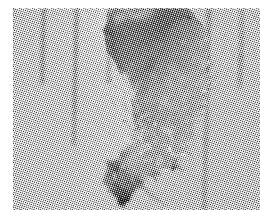


图 12 根状茎基部长出丛毛状突起

### 2.3 原球茎的诱导

白芨种子接种 2 周后,种子开始萌发,形成绿色小圆球体,随着培养时间的延长,基部逐渐膨大,颜色逐渐变绿,1 个月左右圆球茎的直径达 2 mm 左右。外植体接种到含有外源激素的培养基中,培养 20 d 后,产生浅绿色的愈伤组织,将此愈伤组织转到诱导培养基中继续培养,愈伤组织逐渐变绿(图 13)、增大,30 d 左右产生不定芽的分化,以后小芽逐渐伸长生长,数量也逐渐增多(图 14、15)。培养 45 d 后,不同配方的培养基在相同的时间内,都能进行增殖,但增殖倍数不同(图 15)。

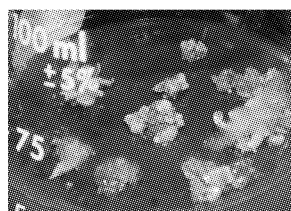


图 13 原球茎诱导出愈伤组织



图 14 愈伤组织分化出芽



由表1可知,除1/2MS+NAA 1.0 mg/L 培养基中没有原球茎的增殖分化外,其它培养基中均有增殖的原球茎与分化芽并存的现象。原球茎的增殖以1/2MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 1.0 mg/L 的表现最好,增殖倍数达到2.1。1/2MS+GA<sub>3</sub> 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 和1/2MS+KT 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 次之。将白芨的无菌叶片接种到叶诱导培养基上,随着培养时间的延长,叶片逐渐失绿褐化死亡,诱导未获得成功。

表1 白芨的诱导与分化(1/2MS)

激素种类及浓度/mg · L <sup>-1</sup>				增殖分化情况			
GA <sub>3</sub>	KT	6-BA	NAA	愈伤组织诱导率/%	愈伤组织形态	诱导分化率/%	增殖倍数
1.0	—	—	1.0	100.00	块大色绿、质地疏散	96.00	1.68
—	1.0	—	1.0	66.67	块小色绿、质地致密	95.74	1.54
—	—	1.0	1.0	85.71	块小色绿、质地疏散	95.00	1.37
0.2	—	—	1.0	40.00	块大色绿、质地致密	57.00	1.25
—	0.2	—	1.0	100.00	块大色绿、质地致密	73.00	1.80
—	—	0.2	1.0	100.00	块大色绿、质地致密	85.70	2.10
—	—	—	1.0	100.00	块大色绿、质地疏散	0	0

#### 2.4 叶片的诱导

将白芨的无菌叶片切割后接种到诱导培养基上,随着培养时间的延长,叶片逐渐失绿褐化死亡,诱导未获得成功。

#### 2.5 生根培养

在丛生芽长到3~4 cm时,将其切成单芽,去除基部附带的琼脂及叶鞘,转接到生根培养基中进行生根诱导培养,40 d后即可长出4~6条幼根,生根率达100%(图16)。生根的同时,幼苗不断增高,叶片数目逐渐增多。



图15 不定芽逐渐长大

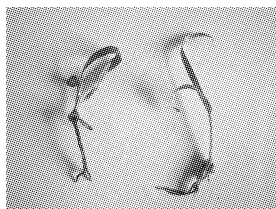


图16 白芨幼苗诱导生根

### 3 结论与讨论

利用种子萌发进行白芨繁殖,在短时间里可以获得大量合格的小苗,是一种快速有效的繁殖方法。白芨的种子为黄褐色,呈纺锤体,一端较尖、闭合,另一端微钝,具种孔,种胚饱满,清晰可见。涂美智等<sup>[4]</sup>、Arditti等<sup>[5]</sup>研究认为种孔有利于各种营养物质的进入,进而有助于萌发。与独蒜兰等野生兰科种子的胚相比,白芨成熟的种胚更加饱满,积累的营养成分更多,这可能也是其种子比较容易萌发的一个原因。

该试验种子取样3次间隔10 d后摘的种子(胚成熟度较高)其萌发所需时间比提前摘的种子短,在播种后1周即突破种皮开始萌发,这与张建霞等<sup>[3]</sup>报道的相同。表明白芨种子萌发中,成熟的种子比未成熟种子效果好,但时间长以后种子在各种培养基上均能萌发。

白芨原球茎的诱导和分化成芽等过程可在同一种培养基上完成,但其生长发育情况在不同的培养基上有明显差异,这点已在课题组以前的研究中得到证实<sup>[6]</sup>。通过无菌播种获得圆球体后,如不及时将其转移到诱导培养基上,原球茎将直接发育成苗,影响分化率。培养基中激素浓度和种类对种胚的无菌萌发和丛生芽的分化均有非常大的影响,是组培快繁技术的关键。

#### 参考文献

- [1] 扬春澍. 药用植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:326-327.
- [2] 刘光斌,黄忠,黄长于,等. 天然植物白芨胶的功能及在化妆品中的应用[J]. 日用化学品科学,2005,28(8):22-24.
- [3] 张建霞,付志惠,李洪林,等. 白芨胚发育与种子萌发的关系[J]. 亚热带植物科学,2005,34(4):32-35.
- [4] 涂美智,李晖. 蝴蝶兰授粉适期与果荚成熟度对种子发芽的影响[J]. 中国园艺,1987,33(3):190-200.
- [5] Arditti J, Michaud J D, Healey P L. Morphometry of orchid seeds II. Native California and related species of Calypso, Cephalanthera, Corallorhiza and Epipactis[J]. Armer J Bot, 1980, 67(3):347-360.
- [6] 张燕,黎斌,李思锋. 不同培养基上白芨的种子萌发与幼苗形态发生[J]. 西北植物学报,2009,29(8):1584-1589.

## Study on Observation of Aseptic Germination of *Bletilla striata* Seeds and Rapid Propagation of *Bletilla bulbocodioides*

ZHANG Yan, LI Bin, LI Ru-juan, LI Si-feng

(Xi'an Botanic Garden, Shaanxi Institute of Botany, Xi'an, Shaanxi 710061)

**Abstract:** Taking the seeds of *Bletilla bulbocodioides* as material, the protocorm-like-body development in the aseptic germination of *Bletilla* seeds and tissue culture and rapid propagation of *Bletilla* were studied using protocorm and leaves as explants. The results showed that during the process of seed germination, two kinds of globules growth into seedling were discovered: the globules grew into seedlings through their protocorms; the globules grew first into rhizome, then into seedling. The optimum medium for PLB induction was 1/2MS + 6-BA 5.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L, and the proliferation multiple was 2.71. The tissue culture plantlets were not obtained when using the leaves as explants.

**Key words:** *Bletilla*; aseptic germination; rapid propagation