

铁皮石斛人工种子包衣技术研究

曾颖苹, 朱乾坤, 王万军

(西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

摘要:以铁皮石斛未萌发原球茎、萌发原球茎为繁殖体,利用蔗糖、淀粉、ABA、NAA、活性炭、多菌灵、海藻酸钠设计了36种人工胚乳并研究它们对铁皮石斛人工种子萌发及生长状态的影响,筛选出适宜的繁殖体和胚乳配方,在此基础上进行包衣制作。结果表明:以萌发原球茎为繁殖体的人工种子萌发率和成活率较高。适宜的人工胚乳组合为蔗糖3.0%、ABA 1.0 mg/L、活性炭浓度0.5%、多菌灵3.0%、海藻酸钠3.0%。在铁皮石斛人工种子外层制作包衣,自然条件下可获得较高的萌发率和成活率。

关键词:铁皮石斛;人工种子;包衣;萌发率

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)17-0155-04

人工种子是将植物离体培养中产生的体细胞胚或能发育成完整植株的分生组织(芽、愈伤组织、胚状体等)包埋在含有营养物质和具有保护功能的外壳内,在适宜条件下能够发芽出苗的颗粒体^[1]。1996年,郭顺星等^[2]报道了以原球茎为材料的铁皮石斛人工种子制作流程;2000年,张铭等^[3]也对以原球茎为材料的铁皮石斛人工种子固形包埋系统进行了研究;2011年张桂芳等^[4]以原球茎为繁殖体,建立了铁皮石斛人工种子制作方法,并考察了胚乳、种皮组分等对人工种子萌发和成苗的影响,为铁皮石斛的繁育提供了一条新途径。

铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall ex Lindl.)为兰科石斛属多年生附生草本植物,又名黑节草,具有独特的药用价值,铁皮石斛在自然条件下萌发率与成活率极低,生存条件极为苛刻,再加上人为挖掘,导致自然资源短缺,即使在无菌条件下培养出无菌苗也很难进行大规模的种植,市场供应严重不足。目前,对铁皮石斛人工种子已有较多的研究,但人工种子用于自然栽培存在很多问题,比如贮藏、运输极为不便,严重影响大规模生产^[5-7]。该试验在前人报道人工种子基础上进行了包衣制作,使其具有抗菌、保水能力,从而探索在自然条件下的萌发与生长情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该试验所用的包埋材料为铁皮石斛组织培养过程中形成的未萌发原球茎以及萌发原球茎。萌发原球茎处理:将原球茎接种在1/2MS₀,5.5%琼脂,3%蔗糖的培养基上,对其进行诱导分化培养,50 d后,分割诱导得到的萌发原球茎,选取健壮、长约0.5 cm左右的萌发原球茎,作为包埋繁殖体。培养条件为(25±2)℃;光照时间为12 h/d;光照强度20~30 μmol·m⁻²·s⁻¹。未萌发原球茎处理:将原球茎接种在1/2MS+0.5 mg/L NAA,5.5%琼脂,3%蔗糖的培养基上进行增殖,30 d后选取未分化成苗、健壮、个体大小基本一致的未萌发原球茎作为包埋繁殖体。培养条件同萌发原球茎处理。

1.2 试验设计

1.2.1 人工胚乳配方设计 人工胚乳成分为“1/2MS+激素+抗菌剂+吸附剂+碳源+海藻酸钠,pH 5.8~6.0”。配方设计分2步进行:(1)在碳源(蔗糖或淀粉或蔗糖+淀粉)基础上分别添加激素(NAA、ABA或二者组合),共有9种组合;(2)在碳源、激素组合基础上分别添加抗菌剂(多菌灵)或吸附剂(活性炭)或抗菌剂(多菌灵)+吸附剂(活性炭),共有27种组合;总计36种胚乳配方。配方中各相关成分的取值为各种文献报道的最佳浓度的平均值,分别为蔗糖3%、淀粉1%、NAA 0.2 mg/L、ABA 1.0 mg/L、活性炭0.5%、多菌灵0.3%、海藻酸钠3%。分别称取上述成分,混合均匀后用蒸馏水定容,调pH(5.8~6.0)后分装到三角瓶或培养瓶中,121℃高压灭菌15~20 min,其中,ABA需过滤灭菌并在胚乳配方成分高压灭菌后再加入。

1.2.2 人工种皮设计 3%海藻酸钠+2% CaCl₂+

第一作者简介:曾颖苹(1982-),女,在读硕士,现主要从事植物组织培养等研究工作。

责任作者:王万军(1962-),男,博士,教授,现主要从事植物生物技术等研究工作。

收稿日期:2012-05-24

0.05% CuCl_2 + 0.05% CaCl_2 + 0.05% NiCl_2 [8]。

1.2.3 人工包衣设计 将硫酸锌、多菌灵、吡虫啉、水胺硫磷、硫酸锰配制成浓度分别为 0.3%、0.3%、0.2%、0.1%、1% 的混合溶液;将“珍珠岩:蛭石:活性炭:混合液=20:50:5:25”做为人工种子包衣,混合均匀后高压灭菌。高压灭菌条件同 1.2.1。

1.3 试验方法

1.3.1 人工种子、包衣种子的制作 在超净工作台上进行操作,将未萌发原球茎,萌发原球茎 2 种繁殖体放进包埋剂中,用滴珠法,每次用吸管吸入 1 个繁殖体,放入凝固剂浓度溶液中进行离子交换反应,经过 (15 ± 2) min 反应时间,将包埋好的人工种子放在 $1/2\text{MS} + 0.4 \text{ mg/L NAA} + 5.5\%$ 琼脂 + 2% 蔗糖的培养基上培养,在此基础上涂裹包衣成分后同样的操作即人工包衣种子,每个处理为 28 粒种子,重复 3 次。

1.3.2 人工种子、包衣种子萌发试验 无菌萌发:将不同胚乳的人工种子放在 $1/2\text{MS} + 0.4 \text{ mg/L NAA} + 5.5\%$ 琼脂 + 2% 蔗糖的培养基上培养,每个处理为 28 粒人工种子,重复 3 次。培养条件为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$;光照时间为 12 h/d;光照强度 $20 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。2 d 后分别观察人工种子的萌发、次生、成苗及成活状况。人工包衣种子无菌萌发同。抗菌萌发:在自然条件下,处理后的人工种子放入加有抗菌剂以及充足水分的广口瓶环境中 [9],置于室温下萌发。人工包衣种子抗菌萌发同。

1.4 统计分析

以材料突破种皮 3 mm 为萌发标准,以萌发后生长状态统计次生或是成苗数,接种后 50 d 并能在培养基上成活为成活标准。每瓶接种 7 粒人工种子,每处理接种 4 瓶,重复 3 次。统计并计算萌发率、次生率、成苗率、苗成活

率。其中:萌发率=萌发数/播种数;次生率=次生数/播种数;成苗率=成苗数/播种数;成活率=成活数/播种数。

2 结果与分析

2.1 不同人工胚乳对铁皮石斛人工种子萌发的影响

人工种子在培养基上 15 d 左右陆续开始萌发,30 d 左右萌发数基本稳定,未萌发的人工种子由于缺乏水分由白化逐渐褐化,50 d 左右包埋丸逐渐变干,失去光泽。种子萌发的营养来自胚乳,因此胚乳配方在人工种子萌发中起着关键作用。由图 1 可知,用萌发原球茎包埋的人工种子萌发率和成活率明显高于未萌发原球茎,可能是由于包埋的未萌发原球茎体积比萌发原球茎小, CaCl_2 在一定程度上有影响;萌发原球茎和未萌发原球茎在配方 4、17、20、22、31 中萌发率较好,分别为 83.33%、70.24%、73.81%、81.79%、79.76%,以及 64.29%、60.48%、63.21%、65.00%、62.26%。

试验表明蔗糖是人工种子萌发的主要影响因素,是胚乳中主要的营养成分。活性炭促进人工种子萌发,活性炭是较好的吸附剂,可以有效地减少营养成分的泄漏。ABA 文献报道是发芽抑制剂,但在该试验中 ABA 处理表现为促进人工种子发芽的效应,并且比 NAA 促进作用好,结果显示,ABA 与 NAA 的激素组合反而减弱了激素本身的效应。在人工种子中适量添加多菌灵有利于种子成活,防止菌染。

2.2 不同人工胚乳对铁皮石斛人工种子萌发后成苗及次生的影响

人工种子萌发后,在包埋丸中根据胚乳提供的营养有不同的生长状态。材料萌发后有的次生有的成苗。从图 2、图 3 可以看出,材料为萌发原球茎的种子萌发后大多成苗(图 4A~D),也有极少部分次生原球茎,材料

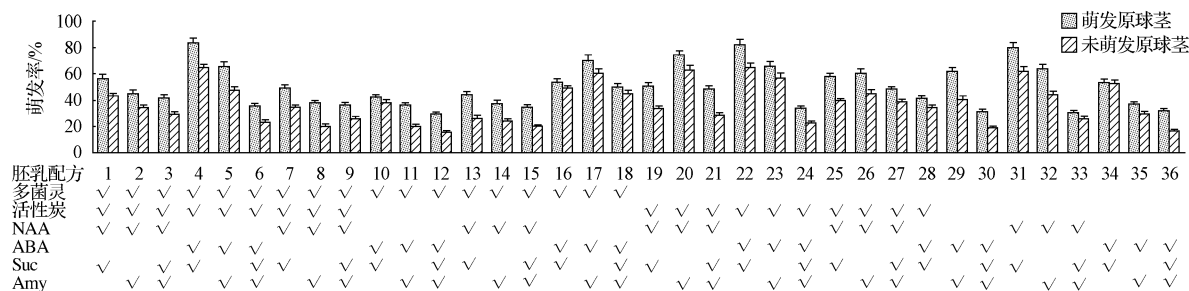


图 1 用不同人工胚乳包埋的铁皮石斛人工种子 50 d 萌发率

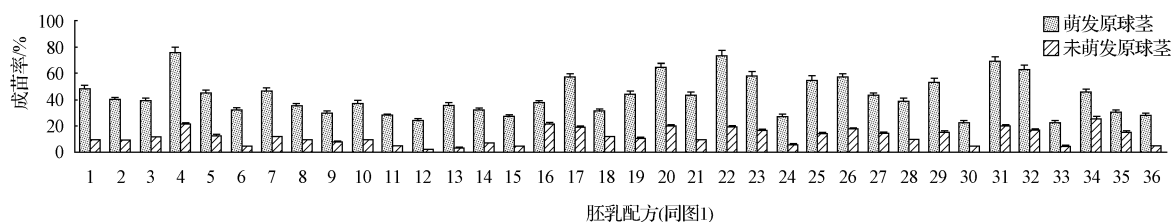


图 2 用不同人工胚乳包埋的铁皮石斛人工种子 50 d 成苗率

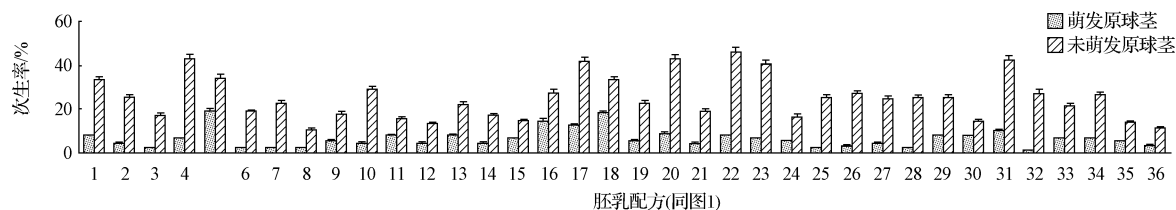


图3 用不同人工胚乳包裹的铁皮石斛人工种子 50 d 次生率

为未萌发原球茎的种子萌发后多次生原球茎(图 4E~H),极少数成苗。萌发原球茎包裹的人工种子中只有配方 4 萌发后生长状态最好(图 4D),有大量根出现,其它萌发率比较好的配方,长出的苗多次生苗甚至次生原球茎,无根,有的畸形,有的根部粗大,不成杆。未萌发原

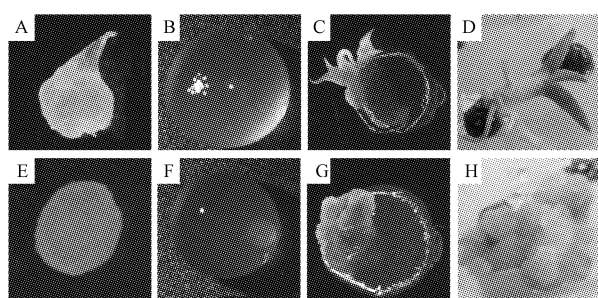


图4 铁皮石斛人工种子的萌发与生长情况

注:A;萌发原球茎;B~D;萌发原球茎包裹丸萌发过程;B:0 d;C:20 d;D:50 d。E;未萌发原球茎;F~H;未萌发原球茎包裹丸萌发过程;F:0 d;G:20 d;H:50 d。

球茎包裹的人工种子萌发后次生成堆,最后脱离包裹丸。

人工种子萌发后生长状态的不一致,主要可能是因为操作时材料处理受伤所致。图 2、3 表明,萌发原球茎处理时受伤包裹的人工种子萌发状态可能次生原球茎;未萌发原球茎处理后包裹的人工种子萌发状态可能为苗,主要是因为未萌发原球茎本身所处的生长状态决定的。人工种子播种的目的是为了萌发成苗,所以该试验以萌发原球茎包裹制作人工种子萌发为最佳效果。

2.3 不同人工胚乳对铁皮石斛人工种子萌发后成活的影响

人工种子的成活率与胚乳能提供的营养和水分成正比。萌发 50 d 后,由于包裹丸逐渐变干,营养成分泄露,不能保证苗或原球茎继续生长的条件而死亡。在胚乳中添加活性炭在一定程度上能锁住胚乳营养成分,能够使人工种子萌发后更好的生长。多菌灵有很好的防腐功能,降低菌染率。

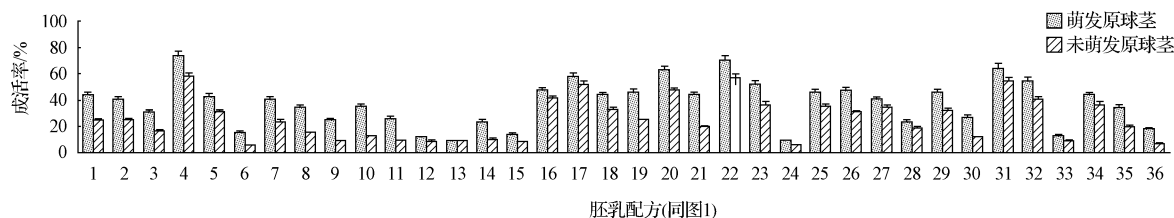


图5 用不同人工胚乳包裹的铁皮石斛人工种子 50 d 成活率

2.4 人工种子、人工包衣种子的无菌萌发

通过观察萌发和萌发后生长状态,该试验筛选出配方 4 制作人工种子并外加包衣,以提高其硬度(图 6A)。无菌条件培养并统计 50 d 的萌发率和成活率。在无菌条件下,人工种子包衣后萌发率与成活率都比未进行包衣的萌发率与成活率高,分别为 88.10%、75.00%(图 8);人工种子随着贮藏时间的增加,萌发率和成活率越低^[10],贮藏 30 d 以后虽然降至 4.76%、3.57%但也比未经处理的高(图 7)。

2.5 人工种子、人工包衣种子的抗菌萌发

包衣种子就是在种子的表面上包一层种衣剂的薄膜,内含杀虫剂、杀菌剂、微肥和植物生长激素等成分。包衣种子具有防治地下害虫,减少污染,促进作物生长,提高萌发率和成活率^[11]。为了形成对比,该试验无包衣

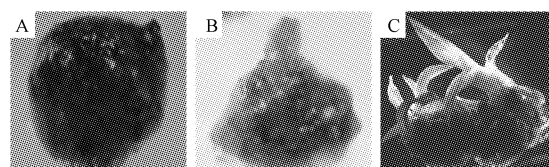


图6 铁皮石斛包衣人工种子的萌发与生长过程

注:A:0 d;B:20 d;C:50 d。

和有包衣人工种子分别在无菌和外界条件(加抗菌剂)进行萌发试验,分别统计无菌 50 d 和外界 30 d 的萌发结果,3 次重复。由图 8 可知,无包衣在无菌下萌发率和成活率分别为 83.33%、73.81%;外界条件下分别为 11.90%、3.57%;经加包衣后无菌下萌发率和成活率分别为 86.90%、75.00%;外界条件下分别为 29.76%、13.10%。因此包衣处理能达到预期的效果。

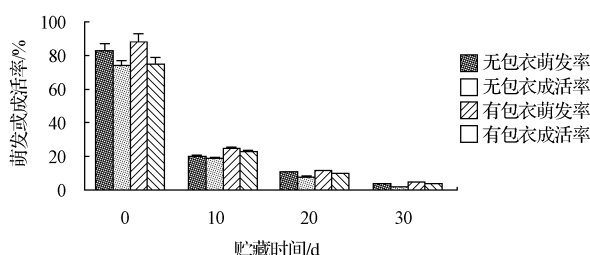


图7 贮藏不同时间的铁皮石斛包衣人工种子 50 d 萌发率与成活率

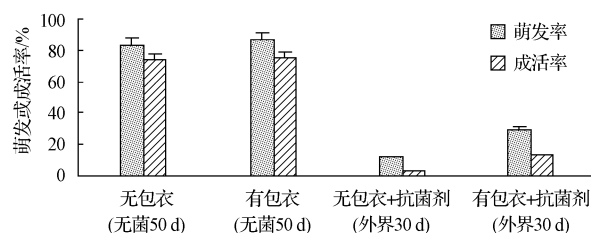


图8 无包衣和有包衣铁皮石斛人工种子的无菌与外界抗菌萌发

3 结论

该试验铁皮石斛人工种子的制作采取的是滴珠法,研究的是人工胚乳组分、人工种皮、人工包衣对人工种子萌发和成活,以及萌发后成苗或是次生的影响。在人工胚乳中添加海藻酸钠和蔗糖的基础上分别添加活性炭、多菌灵和激素 ABA,均能提高人工种子的萌发率和成活率。且人工种子的萌发率与成活率与包埋繁殖体在包埋丸中的位置紧密相关,包埋繁殖体出现在包埋丸正中的几率很小,出现在正中时,2 种繁殖体萌发时间均比繁殖体在层边的时间晚,越晚萌发的人工种子成活率就越低。大多萌发原球茎通过自身长大冲破包埋丸,而未萌发原球茎则是通过次生出多个原球茎体积变大,使得包埋丸裂开。在无菌条件下,铁皮石斛人工种子萌发

率较高,可达到 83.33%,萌发后成苗率为 76.19%,萌发后成活率达到 73.81%;铁皮石斛人工种子适宜的包埋繁殖体为萌发原球茎。此外,在低温贮藏 30 d 后,铁皮石斛人工种子仍有 7.14% 的萌发率,成活率 2.38%;一般情况下,铁皮石斛人工种子在有菌条件下萌发率为 0,利用多菌灵 3 g/L 为防腐剂,在自然条件下,铁皮石斛人工种子萌发率可达到 11.90%,成活率为 3.57%。通过涂裹人工种子外层添加包衣可以分别提高人工种子在无菌和有菌条件下的萌发率和成活率,分别为 29.76% 和 13.10%。有包衣的人工种子贮藏 30 d 萌发率和成活率为 4.76%、3.57%。这为铁皮石斛人工种子进一步的研究打下了基础。

参考文献

- [1] 周丽艳,高书国,毕艳娟,等.甘薯腋芽人工种子的研究[J].种子,2003(3):37-38.
- [2] 郭顺星,张集慧,徐锦堂.铁皮石斛人工种子制作流程及发芽研究[J].中草药,1996,27(2):105-107.
- [3] 张铭,魏小勇,黄华荣.铁皮石斛人工种子固形包埋系统的研究[J].园艺学报,2001,28(5):435-439.
- [4] 张桂芳,黄松,刘宏源,等.铁皮石斛人工种子制作及影响因素研究[J].中草药,2011,42(9):1812-1816.
- [5] 苑鹤,林二培,朱波,等.铁皮石斛人工栽培居群的遗传多样性研究[J].中草药,2011,42(3):566-569.
- [6] 陈晓梅,郭顺星,孟志霞.真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响[J].中草药,2008,39(3):423-426.
- [7] 詹忠根.铁皮石斛根尖诱导丛生芽研究[J].中草药,2006,37(6):928-931.
- [8] 薛建平,张爱民,葛红林,等.半夏的人工种子技术[J].中国中药杂志,2004,29(5):402-405.
- [9] 陈守才,郑学勤,赖康.香蕉人工种子包埋材料与方法的实验研究[J].热带作物学报,1993,14(1):39-42.
- [10] 秦自清,赵婷,邱婧.霍山石斛人工种子包埋繁殖体和萌发[J].生物工程学报,2008,24(5):803-809.
- [11] 周应军,王海潮,周东礼,等.种衣剂及种子包衣技术的应用[J].陕西农业科学,1999(2):238-241.

The Coating on Artificial Seeds of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl.

ZENG Ying-ping, ZHU Qian-kun, WANG Wan-jun

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031)

Abstract: The artificial seeds of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. were produced with protocorm-like bodies and 36 kinds of prescription of artificial endosperm composed of sucrose, starch, ABA, NAA, activated carbon, carbendazim, sodium alginate. The results showed that the germination and survival rate of artificial seeds with the germinated protocorm-like bodies were higher than with the ungerminated pLBs. Appropriate prescription of artificial endosperm was composed of 3.0% sugar, 1 mg/L ABA, 0.5% activated carbon, 3.0% carbendazim and 3.0% sodium alginate. Synthetic artificial seeds after coated, the germination and survival rate of the synthetic artificial seeds of *Dendrobium candidum* got higher under natural conditions.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl; artificial seeds; coating; germination rate