

[引著格式] 高中南, 余磊磊, 周京龙, 等. 白芨种子共生及非共生萌发的研究进展 [J]. 长江大学学报(自科版), 2017, 14 (14): 58~61.

白芨种子共生及非共生萌发的研究进展

高中南, 余磊磊, 周京龙, 周燚 (长江大学农学院, 湖北 荆州 434025)

[摘要] 综述了白芨 (*Bletilla striata*) 种子共生萌发的过程与机制、种子的采集与保存、种子的消毒与预处理、非共生萌发的培养基、培养条件及组培苗移栽技术等的研究进展, 并对白芨种子萌发研究及白芨工业化生产进行了展望。

[关键词] 白芨 (*Bletilla striata*); 共生萌发; 非共生萌发

[中图分类号] Q949.71+8.43

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-1409 (2017) 14-0058-04

DOI:10.16772/j.cnki.1673-1409.2017.14.013

白芨 (*Bletilla striata*) 别名朱兰, 为兰科 (Orchidaceae) 地生型多年生草本球茎植物。花期主要在春季, 具有很高的药用及园林价值。主要用于收敛止血、消肿生肌, 是我国民间传统的珍贵中药材之一^[1], 市场需求量很大。近些年来, 在我国白芨被过度采挖, 且生长环境被严重破坏, 野生白芨资源急剧下降, 濒临灭绝, 白芨已被我国列为重点保护生物类群。分株繁殖是白芨栽培常用的方法^[2], 但分株繁殖周期长, 效率低, 繁殖力有限, 满足不了产业化栽培的需要。白芨亦可采用直播繁殖, 但其种子细小如粉且无胚乳, 一个果荚常含上万粒种子, 数量极多, 野生条件下很难萌发, 且萌发过程中通常需要共生真菌为其提供营养, 种子萌发率非常低^[3]。要满足大量栽培的需要, 种子萌发是关键所在。笔者对近年来白芨种子萌发相关研究进展进行综述, 以为加快白芨产业化步伐提供参考。

1 共生萌发的研究

共生萌发是指在共生菌侵染下种子萌发的过程。白芨种子细小如粉且无胚乳和子叶, 其胚无法为种子萌发过程提供足够养分, 且种子必须从外界获取萌发所需的营养元素和生长因子^[4]。

1.1 真菌对白芨种子萌发的促进作用

19世纪人们证实了兰科植物中存在着共生菌, 并证实共生菌能促进兰科种子萌发。同时表明, 在野生环境下, 白芨种子只有被其共生真菌侵染才能萌发。1992年郭顺星等^[5]研究白芨共生萌发特性, 发现白芨在常规环境下能顺利发芽, 为兰科植物中易萌发的种子类型。种子与真菌拌种播种, 可明显加快种子萌发过程中原球茎子叶分化及假根形成。真菌培养后的提取液能促进白芨萌发和生长, 表明该菌代谢产物可能含有促进白芨生长的活性养料。真菌拌种和提取液播种效果相似。

1.2 染菌萌发过程中细胞超微结构变化

1990年徐锦堂等^[6]研究了白芨共生萌发细胞中微小结构的生长过程。该研究表明, 白芨为兰科植物中易萌发种类。胚的大型薄壁细胞中富含淀粉及脂类等贮藏物质, 是种子在常规条件下萌发的主要营养来源。种子与真菌拌种播种, 被合适的真菌侵染, 发芽势会升高, 能明显促进原球茎的分化。观察萌发过程中细胞结构发现, 真菌首先穿过种皮细胞到达种胚, 从胚柄处进入胚细胞, 然后散布在胚柄端的几层胚细胞中。胚细胞被真菌侵入后, 细胞器和细胞质渐渐变没, 质膜内陷生成的囊状体包裹并吸收菌丝中的养分。菌丝经过白芨细胞壁过程中, 尖端多半会膨涨变大, 依赖其与细胞质作用生成的压力在白

[收稿日期] 2017-02-26

[基金项目] 湖北省农业创新基地项目 (2010CBB03801); 湖北省科技厅重点基金项目 (2015000384)。

[作者简介] 高中南 (1991-), 男, 硕士生, 研究方向为植物病害与生物防治。通信作者: 周燚, zhoyi@yangtzeu.edu.cn。

芫细胞中穿行。此外少量菌丝的细胞壁会在侵染后显著变厚，用于加厚的营养元素来源于白芫种胚细胞质，这些加厚的菌丝最后会被全部消解，为白芫种子萌发和生长提供养分。真菌即将侵入但还未侵入的白芫细胞显示出很旺盛的代谢活力。

白芫种子染菌萌发中，种子对不同真菌侵入后的反应并非完全一致，适宜的真菌在胚的一定范围细胞中存在，形成彼此营养平衡的共生关系，有利于种子萌发及其后的生长。有些真菌或植物致病菌可使整个白芫种胚充满菌丝，导致种子死亡。

1.3 真菌促进白芫种子萌发的机制

在白芫种子萌发的过程中，白芫种胚中养分往往不够，侵入的真菌可为它提供养分和生长因子等。入侵的真菌不仅能为种子萌发提供所需的营养，而且共生真菌能产生抑制其他微生物生长的活性物质，可大大减少种子被杂菌污染的几率，进而为白芫种子萌发及生长提供良好的环境条件^[7~9]。

2 非共生萌发的研究

白芫非共生萌发是指利用组织培养技术，在人工培养基上不外加真菌侵染使白芫种子萌发。非共生萌发能在短时间内得到大批白芫幼苗，是目前成本低、既快速又有效的繁殖方法之一^[10~13]。白芫在自然环境或人工培养条件下生长速度都非常慢，繁殖系数也很低。利用组织培养技术促进白芫种子的大量萌发，可以解决分株繁殖系数低、成本高的弊端，并且能在短期内得到大批生长健全的小苗，是一种经济高效的繁殖方式。

2.1 白芫种子的采集与保存

白芫种胚的成熟度决定着非共生萌发的萌发率，种胚的年龄到20周时开始采收最好，这时种子含胚的几率最大，萌发率接近100%，萌发所需的时间为1周^[14]。最好在白芫种子成熟后但蒴果还未开裂之前进行采集^[15]。

温度和种子含水量是影响种子寿命的主要因素。白芫种子在5℃条件下保存为宜。新鲜白芫种子在5℃下储藏最为合适，该温度下存放60d后，种子才开始缓慢减少萌发率，即使150d后种子的萌发率仍接近50%。在5℃和-18℃条件下储存干燥种子，3个月内种子萌发率几乎一样，储存在-18℃的种子的萌发率稍高一点，表明冷冻对干燥的种子的萌发率基本无影响^[16]。

2.2 白芫种子的消毒与预处理

未开裂的白芫蒴果常用的消毒方法如下：先使用70%酒精消毒30s，再用0.1%升汞进行消毒15min，或根据实际试验的情况确定消毒时间。也可用2.5%次氯酸钠溶液代替升汞进行消毒。消毒后再用无菌水冲洗3遍，并用无菌滤纸把水吸干^[17]。然后在无菌条件下切开果荚，取出种子，将种子均匀接种到已灭菌的培养基上，实验所用的刀和镊子等都需要经过消毒处理。陈超等^[18]研究发现，接种到培养基中的种子数量越多，种子萌发会越迅速，这体现出群体效应。但不宜过密，过密则会得到负面效果。

开裂的白芫蒴果宜用次氯酸钠代替升汞消毒。因为次氯酸钠对细小白芫种子伤害更小，且消毒效果也好。

2.3 非共生萌发的培养基

根据前人的研究，现收集整理部分白芫非共生萌发及生根壮苗培养基配方（表1）。目前比较常用的培养基有MS、改进的MS、KC、N6和RE等。这些培养基一般还加入2%~3%的蔗糖、0.8%左右的琼脂固化，pH还不确定，大多研究认为5.8~6.5较合适。培养基中一般还加入一定浓度的NAA，能提高种子萌发率和萌发速度；关于其中加入6-BA的作用，还存在一定的争议。目前，关于白芫种子萌发最适培养基配方也没有一致的结论。多数研究在培养基中加入了不同的添加剂，常用的添加剂有椰子汁、香蕉汁、菠萝汁、土豆汁等^[19]，它们是一类成分复杂的天然复合物，可有效促进种子萌发。一般培养基中还会加入一定量活性炭。一般认为，活性炭能提供暗环境，促进不定根的诱导；还能吸附培养基中酚类等有毒有害物质，有效地防止褐变；也能吸附培养基中的生长调节物^[20,21]。

表1 白芨种子非共生萌发培养基配方

阶段	培养基配方	文献来源
种子萌发	1/2 MS+1.0mg/L 6-BA+1%活性炭	[22]
	1/2 MS+0.8mg/L NAA+0.2mg/L 6-BA+100g/L 马铃薯	[23]
	1/2 MS+1.0mg/L 6-BA+10%椰汁	[24]
	1/2 MS+1.0mg/L NAA+1.6mg/L 6-BA	[31]
丛生芽增殖	MS+1.0mg/L 6-BA+0.15mg/L NAA	[22]
	MS+1.0mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA+8mg/L 硝酸银+50g/L 马铃薯	[23]
	MS+1.0mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA	[24]
	MS+1.0mg/L 6-BA+2.0mg/L 2,4-D+0.5mg/L TDZ	[25]
	1/2 MS+5.0mg/L 6-BA+0.2mg/L NAA	[26]
生根壮苗	1/2 MS+30g/L 蔗糖+20%椰汁	[27]
	1/2 MS+0.8mg/L NAA+0.2mg/L 6-BA+100g/L 马铃薯	[23]
	MS+0.8mg/L NAA+1.0mg/L 6-BA	[27]
	1/2 MS+1.0mg/L NAA+2.0g/L 活性炭+1.0mg/L GA ₃	[28]

2.4 培养条件

兰科植物种子萌发通常采用暗培养或光照强度为 1200~2000lx 的环境中培养^[29,30]。但李雨晴等^[31]通过研究发现, 黑暗下培养会降低白芨种子的发芽率。培养的温度通常为 25℃左右。光照时间通常为 12h 左右。

2.5 组培苗的移栽

种子萌发后, 待幼苗长至 2cm 左右时, 将幼苗转移至生根培养基中诱导生根, 待幼苗长至 3~5cm 时, 打开培养瓶瓶盖放在室内自然光下炼苗 3d 左右^[32], 然后取出幼苗, 将根部附着的培养基清洗干净, 再移栽至育苗基质中, 基质为腐质土与蛭石按一定比例混合配制, 使用前要先消毒。移栽后适度遮阴, 并保持一定的湿润。

3 问题与展望

白芨具有很高的药用价值和经济价值, 虽其种子属于兰科中易萌发的类型, 但白芨的工业化生产问题仍未解决。

白芨种子共生萌发虽然行之有效, 但白芨体内分离的真菌不一定是其种子萌发的共生菌, 且共生菌的筛选需要很长时间, 共生萌发也较缓慢。不过一旦筛选出效果较好的共生菌, 就可进行大规模育苗。通过共生萌发形成的幼苗, 成活率也更高。现阶段有关白芨共生菌的研究文献还不够多, 也没有效果非常好的共生菌被筛选出来。因此, 亟需研究人员筛选出效果较好的种子萌发共生菌。

现阶段研究得较多的是白芨的非共生萌发, 非共生萌发操作简便, 可在短时期内生产出很多白芨幼苗, 但非共生萌发的幼苗移栽的成活率相对较低, 且白芨蒴果即使在 5℃条件下存放一段时间后也会开裂, 开裂后种子的消毒不易把握, 消毒过长种子易死; 消毒不完全, 培养基和种子易被杂菌污染, 污染不仅会浪费种子, 还会降低白芨幼苗产量。李慧敏等^[33]研究发现, 含有假鳞茎的白芨组培苗存活率非常高, 认为假鳞茎的诱导形成是提高组培苗存活的关键。此外, 非共生萌发的最适培养基也没有统一的配方。如何改进培养基配方和培养条件进一步提高萌发率、改进消毒方法减少污染率、改进移栽技术提高幼苗成活率仍需进一步研究。

2种萌发方法都有不足之处, 基于此, 有研究者提出了原地共生萌发法。白芨原地共生萌发法是指将白芨种子装在特殊的袋子中, 然后埋到白芨原来的野生生长环境中, 一段时间后察看白芨种子萌发与否, 并检测细胞是否被真菌侵入^[34]。该技术在国外已被用于兰科植物种群保育, 维持兰科植物种群发展, 但国内还未广泛运用。

[参考文献]

- [1] 曹春林. 中药鉴定学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 139.
- [2] 卢思聪. 中国兰与洋兰 [M]. 北京: 金盾出版社, 1998.
- [3] 董芳. 几种兰科植物菌根真菌的筛选及种子萌发条件的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [4] 何炜, 杨晓红, 戴木兰, 等. 兰科菌根共生效应研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (17): 7206~7207, 7226.
- [5] 郭顺星, 徐锦堂. 白芨种子萌发和幼苗生长与紫萁小菇等4种真菌的关系 [J]. 中国医学科学院学报, 1992, 14 (1): 51~54, 79~80.
- [6] Guo Shun-xing, Xu Jin-tang. Studies on the changes of cell ultrastructure in the course of seed germination of *Bletilla striata* under fungus infection conditions [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1990, 32 (8): 594~598, 661~662.
- [7] 戎国标, 王祖涛, 杨柳, 等. 适应于营养积累和防止真菌侵染的白芨块茎结构 [J]. 黑龙江农业科学, 2012, (8): 121~125.
- [8] 吴静萍, 钱吉, 郑师章. 兰花菌根分泌物成分的初步分析 [J]. 应用生态学报, 2002, 13 (7): 845~848.
- [9] 陈瑞蕊, 林先贵, 施亚琴. 兰科菌根的研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9 (1): 97~101.
- [10] 杨俊慧, 孟庆军, 李建东, 等. 利用组织培养法繁殖白芨 [J]. 山东科学, 2002, 15 (1): 13~16.
- [11] 余朝秀, 李枝林, 王玉英. 野生白芨组培快繁技术研究 [J]. 西南农业大学学报 (自然科学版), 2005, 27 (5): 36~39.
- [12] 付志惠, 张建霞, 李洪林, 等. 白芨种子萌发与快速繁殖技术的研究 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24 (1): 80~82.
- [13] 石云平, 李锋, 凌征柱. 白芨组织培养与快速繁殖技术研究 [J]. 广西农业科学, 2009, 40 (11): 1408~1410.
- [14] 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.
- [15] 袁宁, 何俊蓉, 何锐, 等. 白芨组培快繁育苗技术研究 [J]. 西南农业学报, 2009, 22 (3): 781~785.
- [16] 赵仁全, 罗光琼, 张秀月, 等. 贮藏温度对白芨种子寿命的影响 [J]. 贵州农业科学, 2007, 35 (4): 104~105.
- [17] 田英翠, 袁雄强. 白芨组织培养快繁技术研究 [J]. 江苏农业科学, 2006, (4): 75~77.
- [18] 陈超, 王桂兰, 乔永旭, 等. 蝴蝶兰无菌播种方法的比较研究 [J]. 北方园艺, 2006, (1): 35~36.
- [19] 赵漫丽, 黄春球, 李明静, 等. 添加剂对白芨组培的影响 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2011, 26 (6): 821~827.
- [20] 刘根林, 梁珍海, 朱军. 活性炭在植物组织培养中的作用概述 [J]. 江苏林业科技, 2001, 28 (5): 46~48.
- [21] Weatherhead M A, Burdon J, Henshaw G G. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media [J]. Zeitschrift Für Pflanzen-physiologie, 1978, 89: 141~147.
- [22] 叶静, 郑晓君, 管常东, 等. 白芨的无菌萌发与组织培养 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2010, 32 (S1): 422~425.
- [23] 余磊磊, 周京龙, 高中南, 等. 野生白芨再生体系的建立及抗性筛选 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45 (1): 43~46.
- [24] 王楷, 李玥, 张云峰, 等. 白芨种子的高效萌发及其无性繁殖体系的构建 [J]. 云南师范大学学报 (自然科学版), 2014, 34 (4): 71~78.
- [25] 石云平, 赵志国, 唐凤鸾, 等. 白芨愈伤组织诱导、增殖与分化研究 [J]. 中草药, 2013, 44 (3): 349~353.
- [26] 张燕, 黎斌, 李汝娟, 等. 白芨种子的无菌萌发过程观察和组培快繁研究 [J]. 北方园艺, 2013, (3): 158~160.
- [27] 鲁光耀, 杨仙, 蒋瑞彬, 等. 白芨组培快速繁殖体系研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2015, 39 (5): 383~390.
- [28] 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.
- [29] 黄磊, 贺筱蓉, 郑立明, 等. 春兰种子非共生萌发的研究 [J]. 种子, 2003, (6): 41~42.
- [30] 曾宋君, 陈之林, 段俊. 带叶兜兰的无菌播种和离体快速繁殖 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42 (2): 247.
- [31] 李雨晴, 杨嘉伟, 王康才, 等. 白芨种子无菌萌发特性 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43 (4): 253~255.
- [32] 汪计珠, 丁家宜, 边可庚. 白芨的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1982, (2): 37.
- [33] 李慧敏, 杨冠海, 李明静, 等. 白芨瓶内假鳞茎诱导研究 [J]. 南方农业学报, 2013, 44 (10): 1607~1612.
- [34] 柯海丽, 宋希强, 谭志琼, 等. 兰科植物种子原地共生萌发技术及其应用前景 [J]. 林业科学, 2007, 43 (5): 125~129.

[编辑] 余文斌