

鼓槌石斛未成熟种子无菌萌发 与小苗组培快繁的研究

陈文¹, 王延春¹, 刘国民², 罗越华², 陈川华², 洪海斌²

(1. 海南省农业科学研究院, 海南, 海口 571100;

2. 海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海南, 海口 570228)

摘要 本文报道鼓槌石斛未成熟种子在离体培养下发育成苗及离体快繁的研究结果。在附加 1.0 mg/L BA 和 0.5 mg/L NAA 的 MS 培养基上, 鼓槌石斛未成熟种子接种后最初一个星期内, 发育较慢, 以后明显较快, 至接种后 2w 时, 种胚的长度或直径增加到接种前的 1.5 倍~2.0 倍; 至接种后 3w 时也有 10%~15% 的种胚突破种皮, 形成裸露的种胚(原球茎体); 至接种后第 4w 时, 可以观察到裸露的种胚开始萌芽, 首先出现盾片子叶, 以后第 1, 第 2 和第 3 片幼叶逐渐依次形成。从接种到第 1 片幼叶(真叶)形成时, 约需 80d。在初代培养基上未观察到根的形成, 这可能与初代培养基中追加有 1.0 mg/L BA 有关。由于同一蒴果中的种子是发育不同步的, 故种胚、原球茎体以及幼苗的发育也是不同步的。培养物(无根幼苗及原球茎体)转接到成分与初代培养基完全相同的新鲜培养基上进行继代培养时, 原球茎体及无根幼苗的基部会增殖形成新生的原球茎体, 继而发育成幼苗; 少部分原球茎体在发育成苗之前脱分化形成颗粒状愈伤组织。这种愈伤组织可以增殖形成新的愈伤组织; 或分化出芽点, 继而发育成幼苗; 或分化出原球茎体, 继而再发育成幼苗。生根壮苗培养过程中试验了 5 种基本培养基, 其适应性按顺序依次为 H > 1/3 MS > 1/2 MS > SJ-1 > MS。

关键词: 鼓槌石斛; 无菌发芽; 组培快繁

中图分类号 S567.239 **文献标识码** A **文章编号** 1003-6563(2008)01-0045-07

STUDY ON STERILE GERMINATION AND IN-VITRO RAPID PROPAGATION OF *DENDROBIUM CHRYSOTOXUM* LINDL.

CHEN Wen¹, WANG Yan-chun¹, LIU Guo-min², LUO Yue-hua², CHEN Chuan-hua², HONG Hai-cheng²

(1. Hainan Academy of Agriculture Science, Haikou, 571100; 2. Key Laboratory of Tropical Biological Resources, MOE, Hainan University, Haikou, 570228)

ABSTRACT This paper deals with the development of the seed embryo and plantlet formation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. under the in-vitro culture of the un-matured seed and with the rapid propagation of *Den. chrysotoxum* via tissue culture. On the MS medium supplemented with 1.0mg/L BA and 0.5 mg/L NAA, the development of the un-matured seeds was slow in the first week after inoculation. Latter the development of the

收稿日期: 2007-08-22

基金项目: 海南省自然科学基金指导性项目(批准号: 80542)

作者简介: 陈文, 男, 1969年生, 海南海口市人, 助理研究员, 农学学士。主要从事生物技术和植物遗传育种工作; 现任海南省农科院科研处副处长; 主持或参与项目研究 13 项, 获海南省科技进步二等奖 3 项, 1997 年获海南省第三届青年科技奖。通讯作者: 刘国民, 男, 1955 年生, 教授, 农学博士。主要从事代茶饮料植物种质资源和植物细胞与组织培养研究。罗越华, 农学博士。

seed embryo speeded up distinctly, which the length and the diameter of the seed embryo inoculated for two weeks were 1.5 times ~2.0 times as that before inoculation. When cultured for 3 weeks, about 10% to 15% of the seed embryos broken out the seed coats to form the naked embryos. Up to the 4th week after inoculation, a few of naked seed embryos were observed to begin germination: at first the seed leaf appeared, then the first, the second and the third young leaves formed successively. It took 80 d or so from the inoculation to the formation of the first leaf. No root emergence was observed on the initial medium, which might due to the supplement of 1.0 mg/L BA to the medium. Because the development of the seed embryos is unsynchronous, the development of protocorm-like bodies and the young seedlings are unsynchronous. When they were transferred onto the fresh medium (with the same complements as the initial medium) for subculture, then the newly-formed protocorm-like bodies would develop into the plantlets. A few of protocorm-like bodies were dedifferentiated to form the granular callus before they develop into seedlings. This kind of callus might be proliferated to form new callus, or differentiated to form bud spots and then develop into young seedlings, or dedifferentiated to form the protocorm-like bodies developing into plantlets. 5 kinds of the basic media were tested for the rooting culture and promoting plantlets of *Den. chrysotoxum* Lindl. and the adaptability is in the sequence of $H > 1/3MS > 1/2MS > SJ-1 > MS$.

KEY WORDS *Dendrobium chrysotoxum* Lindl; sterile germination; rapid propagation via tissue culture.

1 引言

鼓槌石斛(*Dendrobium chrysotoxum*)在我国主要分布于云南、广西、四川等省(区)^[1,2],它既是重要的观赏植物^[3],同时又是商品中药材石斛的重要原植物之一.虽然《中华人民共和国药典》所收录的5种石斛(分别为环草石斛 *D. loddigesii* Rolfe., 马鞭石斛 *D. fimbriatum* Hook. var. *oculatum* Hook., 黄草石斛 *D. chrysanthum* Wall., 铁皮石斛 *D. candidum* Wall. et Lindl. 和金钗石斛 *D. nobile* Lindl.),其中并不包括鼓槌石斛^[4],但由于其明显的药用功效,实际上,鼓槌石斛作为中药材在我国民间一直出现于商品石斛中.现代医学大量的研究以及中医药界长期的临床实践均已证明,鼓槌石斛具有滋阴清热,生津益胃,润肺止咳等多种功效^[2,5-8].由于市场需求量大,近年来鼓槌石斛的野生资源已趋于濒危.因此,通过植物组织培养对鼓槌石进行离体快繁,对兰科植物种质资源保育和药用石斛产业化栽培均具有重要意义.本文报道以未成熟鼓槌石斛种子进行无菌萌发,并对其无菌小苗进行组培快繁的研究结果.

2 材料与方法

2.1 材料

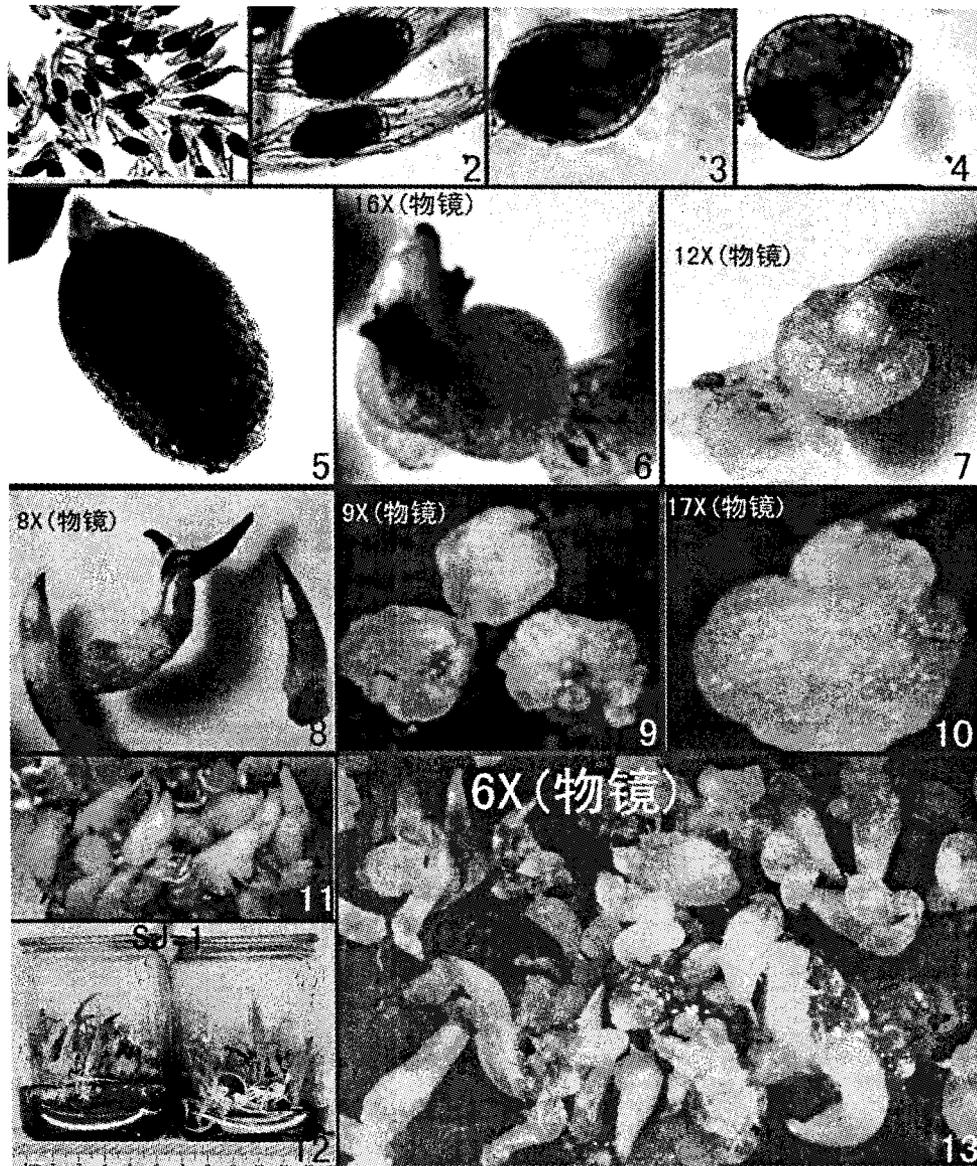
鼓槌石斛尚未成熟的蒴果(图版2:2),采自云南省江城县康平乡;取其中未成熟种子作为外植体进行离体培养.

2.2 方法

2.2.1 材料的表面消毒及接种操作

取摘鼓槌石斛植株上的蒴果果实,用自来水将灰尘、泥土洗净,用手术刀削掉表皮上一些腐烂的或枯萎的外果皮;然后用5%洗洁精清洗5min,并不断摇动;将洗洁精倒去,用自来水冲干净洗洁精;在超净工作台上用75%乙醇将蒴果材料浸泡3min;后倒去乙醇灭菌液,再用0.15%升汞将蒴果材料浸泡15min,并用无菌镊子将材料不断翻动;倒去升汞灭菌液,用无菌水将材料冲洗4~5遍,沥干水放置备用.

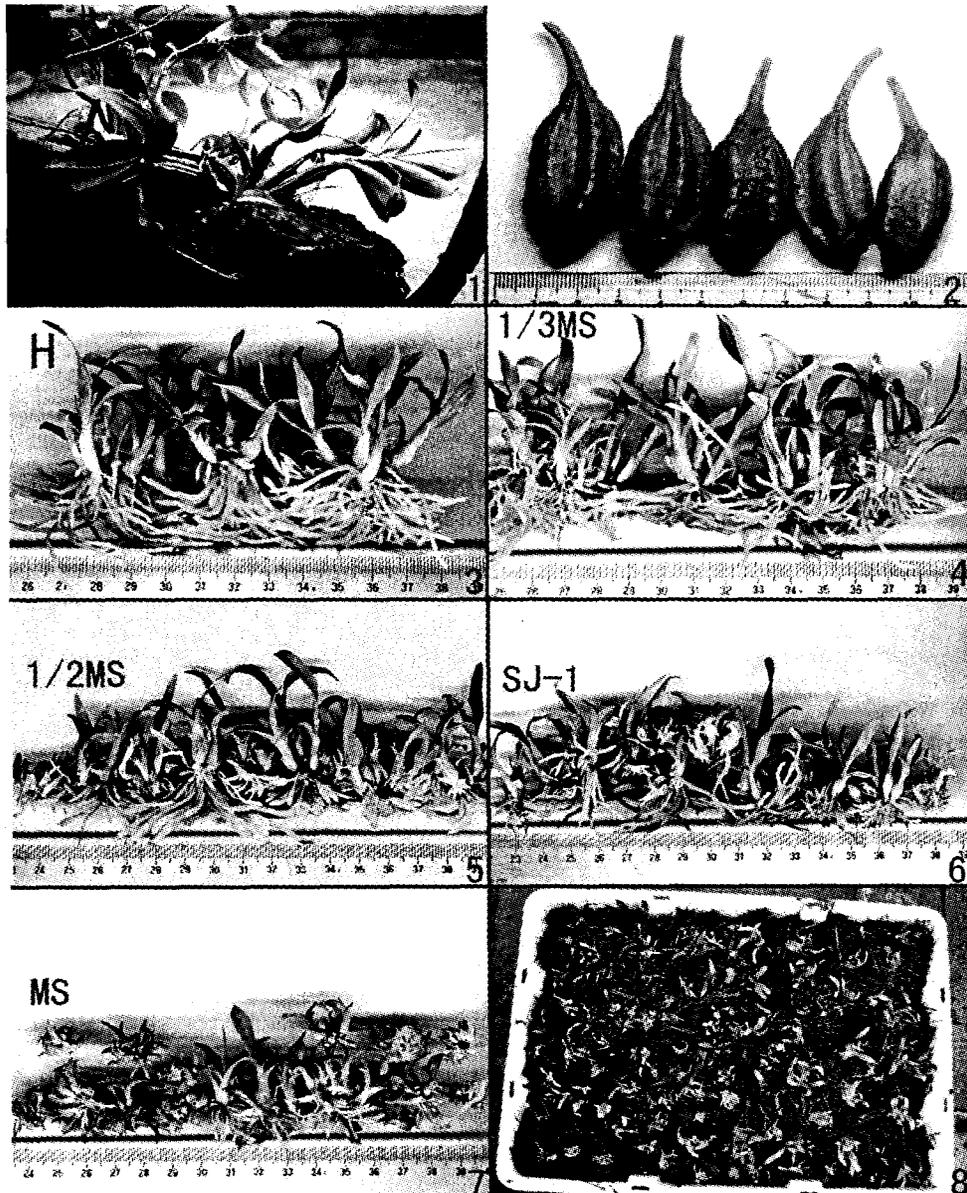
在超净工作台上,将经过表面消毒的鼓槌石斛蒴果放在无菌培养皿内,先用无菌解剖刀将其从中间纵切成两半,再横切成4块,最后丛切分为大小基本相同的8小块.用无菌镊子夹出其中的一个切块在培养瓶瓶口上方轻轻摇动,使每瓶的种子均匀分布在培养基表面;如有种子不易脱落,可用无菌解剖刀轻轻割下.



图版 1 鼓槌石斛的繁育

Plate 1 Propagation and culture of *Dendrobium chrysotoxum*

1. 培养前未成熟种子(10×物镜下);2. 培养前未成熟种子(40×物镜下,示种子发育程度不一,大小有别);3. 培养2周后的种子,示种胚已明显膨大(40×物镜下);4. 培养28d时,部分种胚已突破种皮,成为裸露的种胚(40×物镜下);5. 种胚已开始萌动;6、7. 原球茎萌发成苗的初期,其中6为16×物镜下,7、为12×物镜下;8. 幼苗初期形态(8×物镜下);9. 少部分原球茎脱分化形成颗粒状愈伤组织,再由愈伤组织分化出小苗,图中的愈伤组织已产生绿色芽点(9×物镜下);10. 一块颗粒状愈伤已产生小芽(17×物镜下);11. 成堆的种子刚刚萌芽成小苗(在扫描仪上直接扫描);12. 转接在SJ-1培养基进行了65d生根壮苗培养的瓶苗(在扫描仪上直接扫描);13. 种子刚刚萌发成幼苗,由于种子的发育不完全同步,幼苗的萌发过程以及以后的发育亦不完全同步(6×物镜下).



图版2 鼓槌石斛植株, 蒴果及培养基

Plate 2 The seedling, capsule of *Dendrobium chrysotoxum* and culture medium for it

1. 鼓槌石斛野生植株; 2. 用于组培的未成熟蒴果, 在离体条件下取其中的未成熟种子进行离体培养; 3~7. 在不同基本培养基上经过 60d 生根壮苗培养后的组培苗(已洗净培养基), 其中 3 为 H 基本培养基, 4 为 1/3MS 培养基, 5 为 1/2MS 培养基, 6 为 SJ-1 培养基, 7 为 MS 培养基. 8. 组培苗移栽在“1/3 碎椰糠 + 2/3 粗油棕叶鞘纤维”的栽培基质上.

2.2.2 培养条件

在本实验的各个培养阶段, 实验材料均置于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和 2000 lx 光照条件下(日光灯照明)培养, 每天提供 12 ~ 14 h 照明.

2.2.3 培养基的配制及灭菌方法

本实验所采用的各个配方的培养基, 均按照植物组织培养的常规方法配制和灭菌^[9].

2.2.4 培养基的配方

2.2.4.1 初代用于种子无菌发芽培养基

MS + 肌醇 100 mg/L + 烟酸 0.5 mg/L + 盐酸硫胺素 1.0 mg/L + 盐酸吡哆素 0.5 mg/L + 甘氨酸 2.0 mg/L + BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 琼脂 0.8 % + 蔗糖 2.5 % ; pH = 5.8.

2.2.4.2 增殖培养基

增殖培养基的配方与初代诱导培养基的成份完全相同,详见 2.2.4.1 节.

2.2.4.3 显微镜观察与照相记录

用 Motic B5 数码生物显微镜照相记录未成熟种子接种前、接种后至种胚刚萌动时的发育过程;用 Motic 数码体视显微镜照相记录幼苗发育过程以及愈伤组成形成和愈伤组织分化成苗的过程;不同生根培养基的培养效果以及各处理的生根苗形态用 hp scanjet 3570c 扫描仪直接扫描记录.

2.2.4.4 不同基本培养基对鼓槌石斛组培苗生根壮苗培养的影响

为了试验不同种类和不同无机盐浓度对鼓槌石斛组培苗生根壮苗培养的影响,试验了 MS、1/2MS、1/3MS、H 和 SJ-1 等 5 种基本培养基.除了基本培养基不同之外,培养基的其他成份及 pH 值条件完全相同(见表 1).

表 1 用于鼓槌石斛生根壮苗培养的不同基本培养基

Table 1 Different basic media used for rooting and plantlet - promoting culture of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl

处理编号 No.	基本培养基 Basic Media	其他营养条件及理化条件 Other nutreintal , physical and chemical conditions
A	MS	
B	1/2 MS	肌醇 100 mg/L + 烟酸 0.5 mg/L + 盐酸硫胺素 2.0 mg/L + 盐酸吡哆素 1.0 mg/L + 甘氨酸 2.0 mg/L + 蔗糖 2.5% + 活性炭 0.25% + NAA 1.0 mg/L + 琼脂 1.2%; pH = 6.0.
C	1/3 MS	
D	H	
E	SJ-1	

2.2.4.5 组培苗的移栽与苗圃管理

当生根壮苗培养基上的鼓槌石斛植株株高达 8cm ~ 10cm 时即可准备出瓶移栽.移栽前先将培养瓶瓶盖打开,于散射光条件下驯化 2d ~ 3d.然后将瓶苗用竹筷或镊子轻轻取出,洗净培养基后移栽到由 1/3 碎椰糠和 2/3 粗油棕叶鞘纤维组成的栽培基质上.移栽后浇透一次定根水,再喷施 400 倍络氨铜杀菌剂及小苗和基质均粘有药液,然后覆盖塑料膜罩保湿.以后每隔 3d 揭开膜罩浇水一次,以保持苗床湿润为度.用双层 70% 遮阳网搭阴棚防晒,将膜罩内温度控制在 35℃ 以下.移栽后第 20d 去掉膜罩,每天喷一次水保持床土湿润.40 d 后,将苗床上已发出新根的植株移入盛有水苔及粗椰纤维(1:1)组成的栽培基质的营养生本中,以后按兰花组培苗常规管理方法继续进行苗圃管理^[24].

3 结果与分析

3.1 离体培养下种胚的发育及成苗过程

本实验所采用的蒴果尚未完全成熟,种皮尚为绿色;由于是从野生植株上采果,种胚的准确胚龄不详.接种之间,在显微镜下可观察到,同一蒴果中的种胚发育是不同步的,(图版 1:1,2).种子接种到初代培养基上后,最初一个星期内发育动态不是很明显;但接种培养了 2w 时,可观察到多数种胚已明显膨大,其长度或直径较接种前增加 1.5 倍 ~ 2.0 倍(图版 1:3);至接种后第 28d 观察,已发现有不少种胚(约占 10% ~ 15%)已突破种皮,形成裸露的种胚或称原球茎体(图版 1:4);至接种后的第 4w 时,可以观察到少量裸露种胚开始萌芽,最初是从生长点长出盾片即单子叶(图版 1:5);然后从盾片的对侧长出第一片幼叶(图版 1:7)继而按顺序长出第二、第三……叶(图版 1:5、6、7、8).从接种至长出第一片真叶,大约经历 80d 左右.可能是由于本研究采用的初代培养基中含有 1.0mg/L BA 的缘故,在我们的实验条件下,未能从初代培养基上的幼苗中观察到根的形成.

如果接种时,种子分散不够均匀,则可以观察到成堆的种子发育成幼苗(图版 1:11).值得指出的是,由

表 2 不同基本培养基用于鼓槌石斛组培苗生根培养效果的影响

Tab.2 Effect of different basic media on the rooting culture of the in-vitro plantlets of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl

处理编号 No.	基本培养基 Basic media	生根培养效果 Effect for rooting culture	适应性排序 Sequence of adapt.
A	MS	无根或个别植株仅有少量短少的根根系很不发达;丛生芽多,但很弱,株高一般只有 1.0 cm ~ 1.5 cm,长势很差.	5
B	1/2MS	根系比较发达,茎较粗,茎基直径 0.5 cm ~ 0.6 cm;有丛生芽发生,但长势欠佳.	3
C	1/3MS	根系发达,茎较粗,茎基直径可达 0.6 cm ~ 0.8 cm;株高 3.8 cm ~ 4.0 cm;植株生长较旺盛.	2
D	H	根系非常发达,平均每丛苗(4 株 ~ 5 株)有根 50 ~ 60 条,根长达 4 cm ~ 5 cm;植株粗壮,茎基直径可达 0.8 cm 左右. 培养效果为 5 种处理中最好者.	1
E	SJ-1	根系不甚发达,根少且短小;虽有较多丛生芽,但植株非常矮小,不均匀,而且长势很差.	4

于同一蒴果中的种子,其发育是不同步的,故由此导致幼苗的发育也是不完全同步的,在体视显微镜下可以清楚地观察到初代培养基上的无根幼苗的形态和大小各异,有些种子的发育甚至还处在原球茎体的阶段(图版 1:13).

3.2 繁殖培养的效果

未成熟种子接种在含有 1.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA 的初代培养基上培养 90d 时,幼苗并不形成根系;虽然整个培养基表面被绿色的幼苗所覆盖,但这些无根幼苗或原球体由于拥挤或营养不够充足,已开始发黄或死亡. 此时,如果把这些培养物分散并转接到新配制的组成成份与培养基完全相同的增殖培养基上,则会继续生长与增殖,原球体表面或无根的基部表面会产生一些新生的小原球体,继而发育成幼苗. 有少部分原球体会分化形成质地比较致密的颗粒状的愈伤组织,这种愈伤组织在增殖培养基上有 3 种增殖途径:①继续增殖,产生新的愈伤组织;②由愈伤组织分化出芽点,继而发育成小苗(图版 1:9、10);③由愈伤组织分化出原球茎,继而萌芽成苗. 总之,通过继代培养,可以在短期内(50d ~ 60d)使鼓槌石斛的无根幼苗以及愈伤组织和原球茎增殖 10 倍左右.

3.3 不同基本培养基用于生根壮苗的效果

前面述及,在我们给定的初代培养基上或增殖培养基上形成的幼苗是无根的,虽然数量很多,但由于没有根系,而且植株非常矮小(0.8 cm ~ 1.0 cm),不能出瓶移栽. 为了使鼓槌石斛组培苗形成良好的根系并使植株长到足够的大小,以便出瓶移栽,必须将其转移到适宜的生根壮苗培养基上. 在筛选适宜的生根壮苗培养基的过程中,操作者去掉了初代培养基中原有的细胞分裂素类激素(BA),将 NAA 的浓度由 0.5mg/L 提高到 1.0 mg/L. 并加入了 0.25% 的活性炭(有利于兰科植物生根);在其他各种成份完全一致条件下,试验了 5 种基本培养基用于鼓槌石斛生根壮苗培养的效果,结果如表 2 和图版 2:3 ~ 7 所示. 从表 2 和图版 2 可以看出,基本培养基的种类以及无机盐的浓度显著地影响到鼓槌石斛苗的根系发育几植株生长状况. 在供试的 5 种基本培养基中,以无机盐浓度中等的 H 培养基培养效果最佳,不仅根多,根粗,而且植株非常健壮. 培养 40d 时每丛苗(4 株 ~ 5 株)有根 50 ~ 60 条,根长达 4cm ~ 5cm;组培苗的茎基已明显膨大,直径可达 0.8 cm 左右,株高可达 4.5 cm 左右(图版 2:3). 1/3MS 的处理其效果比 H 略差(图版 2:4). 如果仅考虑 MS 无机盐大量元素的浓度,则明显是降低 MS 中大量元素的浓度有利于鼓槌石斛的生根与壮苗,即 1/3MS > 1/2MS > MS(图版 2:4,5,7). SJ-1 的培养效果较 MS 稍好,但实际上也是很理想的,仅促使部分苗形成矮小的根系;虽有较多丛生芽,但植株非常矮小,不均匀,而且长势很差(图版 2:6). 培养效果最差的要数 MS 培养基,仅有极个别植株形成为数极少的根,根系不发达. 丛生芽虽很多,但很弱,株高只有 1.0 cm ~ 1.5 cm,而且长势很差(图版 2:8). 总之,5 种供试基本培养基对于鼓槌石斛生根壮苗培养的适应性可以按 H >

1/3 MS > 1/2 MS > SJ - 1 > MS 的顺序排序。

3.4 组培苗移栽存活率

将根系发达的鼓槌石斛组培苗洗净培养基,并按 2.2.4.4 介绍的方法移栽到由 1/3 碎椰糠和 2/3 粗油棕叶鞘纤维组成的栽培基质上,经过 3m 精细管理,小苗存活率达 98.6%。

4 讨论

4.1 关于培养基中无机盐浓和基本培养基种类与组培苗根系发育的影响

植物组织培养领域中多数研究者均认为,降低无机盐的浓度有利于生根,而且根多而粗壮,发根也较快^[9]。在我们的工作中,鼓槌石斛的生根培养亦符合这一规律,即将 MS 大量元素降低至仅有全量的 1/3 时,明显地促进鼓槌石斛组培苗生根,而且发根多,发根早,根系壮。但基本培养基的种类显著地影响根系的发育;H 的效果最好,SJ - 1 次之,MS 的效果最差。因此,在进行兰科植物的生根壮苗培养时,基本培养基的选用宜在几种无机盐浓度很低或较低的基本培养基中进行筛选,以便提高工作效率。

4.2 关于初代培养基(无菌发芽培养基)中外源激素对兰科植物种子萌发成苗的影响

不少研究者认为,兰科植物的种子无菌萌发不需要在培养基中加入外源激素。有的试验甚至显示,外源激素对兰科植物种子的无菌萌发有抑制作用。但我们在初代培养基中追加有 1.0 mg/L BA 和 0.5 mg/L NAA,鼓槌石斛的种子 80% 以上均能萌发成苗,但根系的形成则受到抑制,在我们给定的激素条件下,未观察到有根系的完整植株,均是无根的绿色小苗。但在这种激素条件下,原球茎和愈伤组织的增殖较快。由于目前尚未作对比试验,无激素条件,以及不同种类,不同配比的激素对鼓槌石斛种无萌发成苗的影响,尚需做进一步的研究才能确定。

4.3 关于鼓槌石斛未成熟种子离体培养过程中的成苗途径

我们的试验结果表明,鼓槌石斛的未成熟种子在进行离体培养过程中,主要是通过种胚的不断发育膨大,并突破种皮,形成裸露的种胚(或称原球茎体),进而萌发成小苗。但在含有 1.0 mg/L BA 和 0.5 mg/L NAA 的外源激素条件下进行继代培养时,少数种胚在萌发成苗之前,可以脱分化而产生颗粒状的愈伤组织,这种愈伤组织可以不断的增殖未更多的愈伤组织,或分化出不定芽,或形成新的原球茎体。因此,愈伤组织的形成并发育成幼苗原球茎体可以在生产上应用于鼓槌石斛组培苗的加速繁殖。这种过程与叶秀萍等(1988)在同属植物黑节草(*Den. candidum* Wall ex Lindl.)的未成熟种子离体培养过程中观察到的结果有相似之处。但如何通过外源激素浓度和种类的进一步调整促使更多的种胚脱分化形成愈伤组织继而通过愈伤组织分化成苗或繁殖出更多原球茎体,则尚需进行更进一步的研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 19 卷)[M]. 北京: 科学出版社,1999
- [2] 杨虹,王峥涛,徐璐珊等. 鼓槌石斛化学成分的研究[J]. 中国医科大学学报, 2002,33(5):367-369
- [3] 武安全主编. 中国云南野生花卉[M]. 北京: 中国林业出版社,1999
- [4] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(2000 年版第一部)[M]. 北京: 化学工业出版社,2000
- [5] 马国祥,徐国钧,徐璐珊等. 鼓槌石斛及其化学成分的研究[J]. 药学学报, 1994,29(10):763-766
- [6] 马国祥,徐国钧,徐璐珊等. 鼓槌石斛化学成分的抗肿瘤作用[J]. 中国药科大学学报, 1994,25(3):188-189
- [7] 王天山,陆跃鸣,马国祥,等. 鼓槌石斛中化学成分对 K562 肿瘤细胞株生化抑制作用体外实验[J]. 天然产物研究与开发. 1997, 9(2):1-3
- [8] 李满飞,徐国钧,平田义正,丹羽正武. 中药石斛类多糖的含量测定[J]. 中草药,1990,21(10):10-12