

闽产石仙桃无菌播种与组培快繁技术研究初报

温秀萍,林青青,杨成梓,于虹敏

(福建中医药大学 药学院,福建 福州 350122)

摘要:为构建石仙桃无菌播种与组培快繁技术,对石仙桃的无菌播种与快繁技术进行了相关研究。结果表明:石仙桃种子最佳消毒溶液为 0.1% 升汞,处理时间为 8 min;种子萌发最佳基本培养基为 N_6 培养基, $N_6 + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 激素组合的培养基对种子萌发也同样合适;不同植物激素组合对石仙桃幼苗生长影响无显著性差异, $N_6 + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 效果较好;在 $N_6 + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 香蕉培养基上生根率达 85%,通过植物组织培养技术,成功构建了石仙桃种子的非共生萌发和快繁技术体系。

关键词:石仙桃;种子;无菌播种;快繁技术

中图分类号:R282.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)08-0019-03 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.08.0019

石仙桃(*Pholidota chinensis* Lindl.)为兰科石仙桃属植物石仙桃的假鳞茎或全草,又名石上莲、石橄榄(广州)、石穿盘(广西)、石莼肉(福建)、果上叶、千年矮、小扣子兰(文山)、大吊兰、浮石斛、川甲草、马榴根(湖南)。石仙桃主要分布于福建、广东、广西、贵州、云南等省,药材产于广东、福建等地^[1-3],其气微,味甘淡,具有养阴、清肺、利湿、消痰的功能,临床上用于多种疾病。

石仙桃种子量大而小,无胚乳,且多数发育不完全,在自然状态下需要共生菌才能成苗,所以自然繁殖率极低^[4],因此选用无菌播种成为种子萌发的首选。目前尚无石仙桃的种苗繁殖和人工栽培报道,因此及时建立石仙桃离体快繁技术,对于解决市场需求,实现石仙桃的人工栽培及规模化生产具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

石仙桃采集于福建省永泰县青云山大峡谷,将带果植株体一起采回实验室进行栽培种植,经福建中医药大学药学院杨成梓教授鉴定为石仙桃,取其成熟蒴果作为试验材料。

1.2 方法

试验于 2014 年 8 至 12 月在福建中医药大学

药学院组培室进行。

1.2.1 试验材料的无菌处理 取成熟的野生蒴果,用自来水冲洗 15 min,然后在超净工作台上用 75% 的酒精浸泡 30 s,用无菌水冲洗 3~5 次,然后分别用 0.1% 升汞,2% 次氯酸钠,10% 过氧化氢溶液处理^[5],处理时间分别为 6、8、10 min,接着用无菌水冲洗 6~8 次,放入无菌滤纸上将水吸干,用解剖刀将蒴果剖开,把种子均匀铺在不同的固体培养基上,每个处理重复 3 次,统计种苗的污染率及原球茎诱导率。

1.2.2 种子萌发 采用单因素比较法,考察 MS、1/2MS、 N_6 、 B_5 和 KC 五种基本培养基对种子无菌播种的影响,每个处理接种 2 瓶,重复 3 次。观察不同基本培养基对种子无菌播种的影响^[6]。

采用正交设计法,在 N_6 基本培养基上对 6-BA 和 NAA 进行 2 因素 3 个水平(0、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)处理^[7]。每个处理接种 2 瓶,重复 3 次。观察 6-BA 和 NAA 两种激素水平组合对种子萌发的影响,统计种子萌发率。

1.2.3 继代培养 选用 N_6 基本培养基,将初代培养的小苗接种到继代壮苗培养基上培养,2 因子(6-BA 和 NAA)3 水平(0.5、1.0、1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)进行正交设计。

1.2.4 生根培养 将高约 3.5 cm 左右的无根石仙桃苗体,接种到 $N_6 + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 香蕉泥的培养基中,观察石仙桃苗的生根情况。

以上培养基均加入 25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉,pH 5.4~5.8,高压灭菌 20 min;培养条件

收稿日期:2015-01-12

基金项目:福建省教育厅 A 类科技资助项目(JA14165);福建中医药大学校管课题资助项目(X2013013)

第一作者简介:温秀萍(1984-),女,福建省福州市人,硕士,研究实习员,从事药用植物资源与种质选育研究。E-mail:375706654@qq.com。

通讯作者:杨成梓(1972-),男,硕士,副教授,从事中药品种资源与品质评价研究。E-mail:tiebaojin@163.com。

参考石仙桃属植物相关文献^[8]:温度(25±2)℃,日光灯下光照 12 h·d⁻¹(部分在诱导阶段选用暗培养),光照强度为 1 200~1 500 lx。

2 结果与分析

2.1 不同消毒液及灭菌时间对无菌播种的影响

选择合适的消毒剂和消毒时间进行种子的无菌处理,可以减少种子的污染和材料的损失,提高原球茎的诱导率。从表 1 可以看出,在相同培养下,3 种消毒液均能控制种子的污染,而且随着处理时间的延长,污染率均有所降低,但是原球茎的诱导率也相应降低。使用 2%次氯酸钠和 0.1%升汞溶液消毒 10 min 污染率最低,而原球茎诱导率最高的是使用 0.1%升汞溶液消毒 8 min,诱导率为 80%。综合考虑,石仙桃蒴果适用 0.1%升汞溶液处理 8 min 的灭菌处理。

表 1 不同消毒液及灭菌时间对无菌播种的影响

Table 1 Effect of different disinfectant and sterilizing time on the aseptic sowing			
消毒液 Disinfectant	处理时间/min Treatment time	污染率/% Pollution rate	原球茎诱导率/% Induction rate of protocorm
0.1%升汞	6	20	62
	8	15	80
0.1% Mercuric chloride	10	12	65
	6	20	70
2%次氯酸钠 2%NaClO	8	19	68
	10	12	55
10%过氧化氢 10%H ₂ O ₂	6	30	65
	8	25	55
	10	15	48

2.2 不同基本培养基对种子萌发的影响

由表 2 可以看出,石仙桃种子在 N₆ 基本培养基上最先萌发,诱导率达到 100%,诱导的原球茎色绿,量多而壮,因此种子萌发以 N₆ 基本培养基最佳,其次为 KC 培养基,诱导率为 90%,诱导的原球茎色绿,整体长势较好,MS 和 1/2MS 基本培养基的诱导率基本相同。

2.3 不同激素组合对种子萌发的影响

石仙桃种子在 9 种不同激素组合 N₆ 培养基上萌发情况详见表 3,从中可看出,随着激素 6-BA 和 NAA 浓度的升高,种子萌发率也逐渐增高,说明激素 6-BA 和 NAA 均能促进种子萌发。其中以 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹ 配

比时,种子萌发率最高,其次是 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹ 组合。因此,适宜石仙桃种子萌发的激素组合为 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹。

表 2 不同基本培养基对种子萌发的影响

Table 2 Effect of different basic medium on seed germination			
培养基 Medium	萌发期/d Germination stage	平均萌发率/% Average germination rate	个体长势 Growth
MS	39	70	原球茎色绿、多
1/2MS	35	75	原球茎色绿、多
N ₆	25	100	原球茎色绿、成团
B ₅	47	25	原球茎少而弱
KC	27	90	原球茎色绿、长势好

表 3 不同 6-BA 和 NAA 组合对种子萌发的影响

Table 3 Effect of different concentration hormone combination of 6-BA and NAA on seed germination		
6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	平均萌发率/% Average germination rate
0.1	0.1	40
0.1	0.5	52
0.1	1.0	62
0.5	0.1	48
0.5	0.5	60
0.5	1.0	75
1.0	0.1	56
1.0	0.5	70
1.0	1.0	85

2.4 光暗条件下石仙桃种子萌发情况

将接种于 N₆ 基本培养基上的石仙桃种子,分成两组各 10 瓶,设置日光灯照射 12 h·d⁻¹和暗培养两种培养条件,分别培养并观察培养情况。结果发现石仙桃种子在两种条件下培养均能萌发且萌发率都较高,其中,暗培养条件下的萌发期长,且原球茎色偏暗黄,转入自然光或日光灯下一段时间后原球茎色逐渐转绿。说明石仙桃种子萌发可以不用进行暗培养。

2.5 继代培养

将初代培养的小苗转接到不同激素浓度配比的 N₆ 培养基上进行培养并观察培养情况。从表

4 可以看出,不同浓度的 6-BA 和 NAA 对石仙桃小苗的增殖效果有明显的区别,每种培养基小苗逐渐长出新芽,形成根状茎;当 6-BA 浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时先大量增殖分化小芽,然后再分化为小苗,随着 6-BA 浓度的增加,培养基上小苗分化速度快且整齐。由此可见 NAA 有利于芽分化并增殖,浓度为 6-BA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合的培养基适宜芽分化与小苗增殖。

表 4 不同 6-BA 和 NAA 组合对原球茎增殖的影响

Table 4 Effect of on different concentration hormone combination of 6-BA and NAA on protocorm-like body		
6-BA/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	增殖率/% Proliferation rate
0.5	0.2	56
0.5	0.5	62
0.5	1.0	65
1.0	0.2	68
1.0	0.5	70
1.0	1.0	76
1.5	0.2	80
1.5	0.5	93
1.5	1.0	80

2.6 生根培养

将增殖分化培养基上生长的小苗接种到 $\text{N}_6+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + $75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉 + 2% 蔗糖 + 琼脂粉 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上进行生根培养。每 7 d 观察 1 次,发现培养 42 d 左右,组培瓶底部可见有根系,每株有 2~3 条的根系,约 1 cm 左右,从而获得完整小苗。

3 结论与讨论

外植体表面灭菌应选择合适的消毒剂,以达到满意的灭菌效果,本研究使用 0.1% 升汞溶液对石仙桃种子进行消毒,且消毒 8 min 的效果最佳,这与石仙桃同属植物的相关报道基本一致^[9]。0.1% 升汞的表面杀菌能力最强,也最为常用,但它有残毒,对外植体的伤害也最大,比较不容易去除,因此,试验需要用无菌水冲洗 6~10 次以达到去残毒效果。

石仙桃无菌播种最佳基本培养基为 N_6 , $\text{N}_6+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 激素组合的培养基对种子萌发也同样合适,表明激素能促进种子萌发,诱导胚发育成原球茎,加快个体形成完整植株过程^[9]。

石仙桃继代培养最佳培养基为 $\text{N}_6+1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,有利于原球茎分化并进行壮苗,接种到培养基 $\text{N}_6+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + 香蕉泥 $75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,易于小苗生根,生根率达到 85%,石仙桃较状的对石仙桃的壮苗生根最为合适。

种子萌发是一个复杂的植物生理过程,在自然状态下,石仙桃种子需要共生菌才能成苗,试验条件下适宜的营养以及培养环境能够促进种子萌发。基本培养基添加不同浓度植物生长调节剂 6-BA 和 NAA 组合,诱导原球茎增殖与小苗分化,促进小苗生长。国内有关石仙桃的种苗繁殖和人工栽培报道较少,本研究初步建立了石仙桃无菌播种与快繁技术方法,为建立一套完整的石仙桃离体快繁技术体系奠定基础。石仙桃组培苗和野生的生长环境不同,其体内药效成分及药理活性等方面的研究有待进一步开展。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977;600.

[2] 福州头痛定糖浆临床研究协作组. 头痛定糖浆对神经机能性头痛的疗效观察[J]. 福建医药杂志,1985,7(6): 28.

[3] 翁水旺. 石仙桃的研究进展[J]. 中国现代中药,2006,8(6): 35-36.

[4] Arditti J, Ghani A K A. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications [J]. New Phytol, 2000, 145: 367-421.

[5] 胡凯, 张立军, 白雪梅, 等. 植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(3): 680-681.

[6] 卢思聪, 薛秀玲. 建兰与多花兰杂交胚培养中植物激素的应用[J]. 种子, 1982, 4(2): 31.

[7] 王熊. 兰花快速无性繁殖的研究及花芽分化的探讨[J]. 植物生理学报, 1984, 10(4): 392-394.

[8] Liu B C, Huang Y Z, Zhao Y Q, et al. A preliminary report on aseptic seeding and rapid propagation of *Pholidota cantonensis* Rolfe[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29(5): 461-464.

[9] 王国兴. 兰属植物茎的初探[J]. 园艺学报, 1989, 16(4): 314-315.