

## 铁皮石斛人工种子制作及影响因素研究

张桂芳<sup>1</sup>, 黄松<sup>1</sup>, 刘宏源<sup>2</sup>, 刘星华<sup>2</sup>, 朱彩霞<sup>1</sup>, 赖小平<sup>1\*</sup>

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

2. 广东永生源生物科技有限公司, 广东 饶平 515736

**摘要:** 目的 建立铁皮石斛人工种子制作方法, 并考察相关影响因素, 为铁皮石斛的繁育提供一条新途径。方法 以铁皮石斛原球茎为包埋体制作人工种子, 考察胚乳、种皮组分对人工种子萌发和成苗的影响。结果 以 MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+3 g/L AC+30 g/L 海藻酸钠+3 g/L 百菌清为基本胚乳, 在 2% CaCl<sub>2</sub> 中反应 15 min 是铁皮石斛人工种子制作的较佳条件, 胚乳中分别添加 15 g/L 木薯淀粉和 10 g/L 保水剂能明显提高人工种子的萌发率和成苗率, 种皮中添加 10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub> 和 10 g/L 纳米 TiO<sub>2</sub> 均能明显提高萌发率, 但添加 10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub> 成苗率最高。结论 建立了铁皮石斛人工种子制作方法, 获得了较高的萌发率和成苗率。

**关键词:** 铁皮石斛; 人工种子; 纳米材料; 胚乳; 种皮

中图分类号: R282.4 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1812-05

## Manufacture and influencing factors for artificial seeds of *Dendrobium officinale*

ZHANG Gui-fang<sup>1</sup>, HUANG Song<sup>1</sup>, LIU Hong-yuan<sup>2</sup>, LIU Xing-hua<sup>2</sup>, ZHU Cai-xia<sup>1</sup>, LAI Xiao-ping<sup>1</sup>

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Guangzhou Yongshengyuan Biotechnology Limited Company, Raoping 515736, China

**Abstract: Objective** To provide a new manufacturing method for the artificial seeds of *Dendrobium officinale*. **Methods** The artificial seeds were manufactured by taking protocorms of *D. officinale* as the materials entrapped with the consideration of the effects of testa components and artificial endosperm on the germination and seedling of the artificial seeds. **Results** The better conditions of the artificial seeds are manufactured in the fundamental artificial endosperm made by MS + 0.5 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA + 3 g/L AC + 30 g/L sodium alginate + 3 g/L chlorothalonil mixture reacted in 2% CaCl<sub>2</sub> for 15 min; For the higher germination and seedling rate, 15 g/L cassava starch and 10 g/L water retaining agent can be added into the artificial endosperm components, respectively; For the higher germination rate, 10 g/L nano-SiO<sub>2</sub> (better planting rate) and 10 g/L Nano-TiO<sub>2</sub> can be added into the artificial testa, respectively. The highest seedling rate was obtained by adding 10 g/L nano-SiO<sub>2</sub>. **Conclusion** A manufacturing method of the artificial seeds of *D. officinale* has been established for the higher germination and seedling rates.

**Key words:** *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; artificial seeds; nano materials; endosperm; seed coat

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科石斛属植物, 是我国传统名贵中药, 自然条件下生长缓慢、自身繁殖能力极低, 由于长期掠夺性采挖, 致使野生资源严重枯竭。目前关于铁皮石斛人工栽培的报道较多<sup>[1-3]</sup>, 成为研究热点。人工种植铁皮石斛首先面临的的就是种苗的来源问题。铁皮石斛种子极小、无胚乳, 自然条件下需与某些真菌

共生才能萌发, 很难用实生苗栽培; 而传统的分株、扦插等繁殖方式繁殖率低, 利用组织培养虽然能在一定程度上解决快繁问题, 但试管苗生产周期长、成本高、移栽驯化过程长、脱瓶存活率低。人工种子技术为珍稀紧缺的铁皮石斛药材产业化提供了一条新的途径, 使得无菌生长的原球茎可以直接播入土壤, 与试管苗相比, 减少了移栽驯化过程, 生产

收稿日期: 2010-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001601); 广东省自然科学基金资助项目(9451040701003210); 国家科技支撑计划(2011BA101B02)

作者简介: 张桂芳(1980—), 女, 河南开封人, 博士, 讲师, 从事中药资源研究与开发利用工作, 主持或参与广东省自然科学基金、国家自然科学基金及广东省社会发展领域重点项目等省部级以上课题 10 项, 主编或参编著作 4 部, 发表学术论文 10 余篇。

Tel: (020)35855285 E-mail: zhanggf1026@yahoo.com.cn

\*通讯作者 赖小平 Tel: (020)39358045 E-mail: lxp88@gzhtcm.edu.cn

周期短,从而大大降低试管苗培育和移栽驯化中的风险<sup>[4]</sup>。本研究以铁皮石斛原球茎为包埋繁殖体制作人工种子,并考察胚乳、种皮组分对种子萌发和成苗的影响,为铁皮石斛人工种子实用化和产业化发展提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

药材引种自云南省文山县的铁皮石斛,经广州中医药大学刘军民教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo,开花时进行人工授粉,将授粉后 100 d 的成熟未开裂果实作为外植体。

### 1.2 方法

**1.2.1 种子无菌萌发** 铁皮石斛蒴果经常规消毒后切开,用接种针将粉末状胚接种到 MS 培养基表面,两周后,种子萌发形成原球茎。

**1.2.2 原球茎增殖** 将原球茎接种于增殖培养基 MS+1.0 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 中,培养基添加蔗糖 30 g/L、椰子汁 10%、纳米 TiO<sub>2</sub> 10 g/L,培养 30 d 后观察增殖情况。

以上培养基 pH 值 5.4~5.6,培养温度 (25±2) °C;光照时间 10 h/d,光照强度 2 000~3 000 lx。

**1.2.3 铁皮石斛人工种子制作** 筛选长 2.0~4.0 mm、宽 2.0~4.0 mm 的原球茎为包埋体。以 MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+3 g/L 活性炭 (AC)+30 g/L 海藻酸钠+3 g/L 百菌清为基本人工胚乳,添加 5~40 g/L 木薯淀粉、10~60 g/L 保水剂,以海藻酸钠为人工种皮基质,采用滴注法,在超净台上将原球茎浸入含有海藻酸钠的胚乳中,5 min 后用吸管将包有原球茎的半凝胶状态海藻酸钠滴到添加 20 g/L 壳聚糖、5~15 g/L 纳米 TiO<sub>2</sub> 或 SiO<sub>2</sub> 的 2% CaCl<sub>2</sub> 溶液中,确保每颗人工种子只包裹一个原球

茎,经过 15 min 离子交换,自动固化成粒,取出用蒸馏水冲洗干净,置于滤纸上吸去表面水分,获得铁皮石斛人工种子。

**1.2.4 人工种子的萌发** 将人工种子播种在含 7.5 g/L 琼脂胶的培养瓶里进行萌发试验,观察其 30 d 萌发率和 60、90 d 成苗率。

**1.2.5 统计分析方法** 以突破种皮 2 mm 为萌发标准,以萌发的整株幼苗完全突破种皮,并能在琼脂胶上成活为成苗标准。每组处理 10~15 粒人工种子,每处理接种 3 瓶,重复 3 次。计算萌发率和成苗率。

成苗率=成苗数/播种数

萌发率=萌发数/播种数

正交试验结果采用综合加权评分法,即以一个综合指标 (overall desirability, OD) 将各个指标进行综合考察,以综合指标进行直观分析。其中铁皮石斛人工种子中萌发率 (A) 与成苗率 (B) 作为主要参考指标,分别赋予 A、B 系数,计算公式为  $OD = (0.6 \times A_i/A_{max} + 0.4 \times B_i/B_{max}) \times 100$ ,其中 A<sub>i</sub> 为各组试验的萌发率, A<sub>max</sub> 为最高萌发率; B<sub>i</sub> 为各组试验的成苗率, B<sub>max</sub> 为最高成苗率。其他结果采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析,组间差异显著性采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较检验。

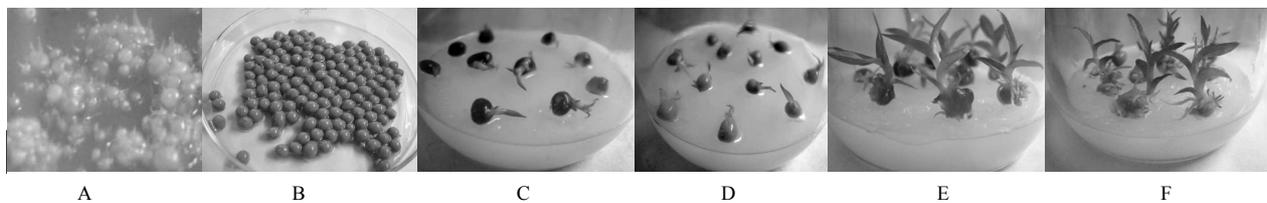
## 2 结果与分析

### 2.1 原球茎增殖及种子萌发情况

原球茎培养 3 d 后的增殖情况和人工种子萌发情况见图 1。

### 2.2 不同影响因素对人工种子包埋效果和萌发的影响

考察海藻酸钠用量 (A)、BA 与 NAA 质量浓度比例 (B)、离子交换时间 (C)、活性炭用量 (D) 4 个因素对人工种子萌发率的影响,因素水平见表 1,正交试验结果见表 2。



A-原球茎增殖 B-人工种子 C、D-人工种子 30 d 萌发状况 (C 人工种皮添加 10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub>、D 添加 10 g/L 纳米 TiO<sub>2</sub>) E、F-人工种子 90 d 成苗状况 (E 人工种皮添加 10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub>、F 添加 20 g/L 壳聚糖+10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub>)

A-protocorm proliferation B-artificial seeds C and D-germination status of artificial seeds 30 d afterwards (C shows the artificial testa added with nano SiO<sub>2</sub> by 10 g/L and D with nano TiO<sub>2</sub> by 10 g/L respectively) E and F-planting status of artificial seeds 90 d afterwards (E shows the artificial testa added with nano SiO<sub>2</sub> by 10 g/L and F with nano SiO<sub>2</sub> by 10 g/L and chitosan by 20 g/L)

图 1 铁皮石斛人工种子制作和萌发

Fig. 1 Manufacturing and germination for artificial seeds of *D. officinale*

表 1 不同影响因素的 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交设计

Table 1 Different influential factors of L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) orthogonal design

水平	因素			
	A/(g·L <sup>-1</sup> )	B/(mg·L <sup>-1</sup> )	C/min	D/(g·L <sup>-1</sup> )
1	20	0.5:0.5	10	1
2	30	1.0:0.5	15	2
3	40	2.0:0.5	20	3

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Orthogonal test result and analysis

试验号	A	B	C	D	萌发率/% 成苗率/% 综合评分		
					(A)	(B)	(OD)
1					13.7	10.4	66.1
2	1	2	2	2	27.9	17.7	76.2
3	1	3	3	3	30.1	20.7	78.9
4	2	1	2	3	55.5	39.0	100.0
5	2	2	3	1	48.3	30.2	91.8
6	2	3	1	2	40.0	25.5	85.7
7	3	1	3	2	20.3	17.9	73.3
8	3	2	1	3	29.7	23.7	80.5
9	3	3	2	1	29.0	22.0	79.2
K <sub>1</sub>	211.2	239.4	232.3	237.2			
K <sub>2</sub>	277.5	248.5	255.4	236.1			
K <sub>3</sub>	233.0	243.8	244.0	259.4			
R	66.2	9.1	23.1	23.2			

由表 2 结果可以看出, 4 因素对铁皮石斛人工种子萌发和成苗均有影响, 最主要因素是 A、C 和 D, 稍次要因素是 B, 综合考虑可选择处理 4 为人工种子较佳的制作条件, 此时的萌发率和成苗率分别达到 55.5% 和 39.0%。海藻酸钠用量对包埋形成的种子质量影响较大, 用 20 g/L 海藻酸钠制作的种子, 种皮极薄, 颗粒不圆, 形状各异。当海藻酸钠为 40 g/L 时, 种子虽然颗粒均匀, 大小整齐, 但大多一侧微凸, 且随着用量的增加逐渐严重。当海藻酸钠大于 40 g/L, 种子变硬。30 g/L 海藻酸钠包埋制成的人工种子大小均匀, 硬度适中, 效果较好。在胚乳中添加 3 g/L 活性炭对人工种子的萌发有利, 可能是活性炭有较好的吸附和解吸附特性, 一方面可能吸附了某些对人工种子萌发不利的物质, 另一方面有利于营养物质持续不断地供应。

### 2.3 人工胚乳中添加木薯淀粉对人工种子萌发和成苗的影响

以 MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+3 g/L

AC+30 g/L 海藻酸钠+3 g/L 百菌清为基本人工胚乳, 分别添加 0、5、15、30、40 g/L 木薯淀粉后的萌发率和成苗率见表 3。木薯淀粉量为 0~15 g/L 时人工种子的萌发率和成苗率随其量的增加而提高, 达到 15 g/L 时萌发率可达 62.8%; 高于 15 g/L 时人工种子制作困难, 黏度太大, 难以形成球状胶粒, 且萌发率随其量的升高而下降, 当达到 40 g/L 时萌发率显著低于对照组, 可能是由于其黏度过大, 包埋厚度不均匀, 种皮太薄与太厚都不利于人工种子萌发和成活, 所以木薯淀粉量以 15 g/L 为最佳。人工胚乳中添加木薯淀粉能提高其萌发率和成苗率, 这与张铭等<sup>[5]</sup>和黄绍兴等<sup>[6]</sup>的研究结果一致, 原因可能是木薯淀粉分子有较多的亲水基团, 有利于基质保持水分并增加团粒结构, 其多孔状的结构可以改变海藻酸钙胶囊的致密结构, 从而增加胶囊的透气性、保水性和吸水性, 也可能是种胚分泌一些胞外酶来利用木薯淀粉, 促进人工种子萌发。

表 3 人工胚乳中加入木薯淀粉对人工种子萌发和成苗的影响

Table 3 Effect of artificial endosperm added with cassava starch on germination rate and seedling of artificial seeds

木薯淀粉/(g·L <sup>-1</sup> )	萌发率/%	成苗率/%
0	55.5±7.58 bA	39.0±6.64 abAB
5	58.0±6.00 abA	41.9±4.90 aAB
15	62.8±1.70 aA	47.6±2.60 aA
30	58.7±2.70 abA	40.9±5.00 aAB
40	41.1±4.20 cB	30.6±7.50 bB

Duncan's 新复极差法, 不同字母表示两均数间差异显著, 小写字母表示 α=0.05 显著水平, 大写字母表示 α=0.01 显著水平, 表 4 同 Capital letters and lower case letters columns represent significant difference among treatments at 0.01 and 0.05 levels respectively by Duncan test, Table 4 is same

### 2.4 人工胚乳中添加保水剂对人工种子萌发和成苗的影响

以 MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+0.3 g/L AC+30 g/L 海藻酸钠+3 g/L 百菌清为基本人工胚乳, 分别添加 0、10、20、40、60 g/L 的保水剂后萌发率和成苗率见表 4。

添加低浓度的保水剂有助于提高人工种子的萌发率和成苗率, 其中以 10 g/L 为最佳, 萌发率和成苗率比对照组分别提高了 7.8%、11.3%, 随着保水剂浓度的升高, 成苗率反而降低, 增加到 40 g/L 时, 萌发率显著低于对照组, 增加到 60 g/L 时, 萌发率和成苗率分别比对照组降低了 22.3%、10.5%, 可见

表 4 人工胚乳中添加保水剂对人工种子萌发和成苗的影响  
Table 4 Effect of artificial endosperm added with water retaining agent on germination rate and seedling of artificial seeds

保水剂/(g·L <sup>-1</sup> )	萌发率/%	成苗率/%
0	55.5±7.58 aA	39.0±6.64 bBC
10	63.3±8.16 aA	50.3±6.54 aA
20	59.8±5.32 aA	47.2±6.55 aAB
40	40.0±7.58 bB	38.2±5.53 bC
60	33.2±5.05 bB	28.5±6.97 cD

人工胚乳中添加保水剂的适宜量为 10~20 g/L。保水剂是利用强吸水树脂制成的一种具有强吸水保水能力的高分子聚合物，且具有重复吸水的功能，吸水后膨胀为水凝胶，然后缓慢释放水分供人工种子萌发，当保水剂用量过多时，吸水后造成局部含水量过多，影响人工种子的透气性，甚至造成原球茎腐烂死亡，故过高浓度的保水剂不利于人工种子的萌发和成苗。

2.5 不同人工种皮基质对人工种子萌发和成苗的影响

表 5 不同人工种皮对人工种子萌发和成苗的影响

Table 5 Effect of different artificial testa on germination and seedling rates of artificial seeds

组别	人工种皮类型	萌发率/%	60 d 成苗率/%	90 d 成苗率/%
A	基质 (对照)	62.8±2.31	47.6±4.51	52.7±9.77
B	20 g/L 壳聚糖	66.6±3.50	46.0±5.31	48.1±4.79
C	10 g/L 纳米 TiO <sub>2</sub>	78.0±7.06	57.3±9.70	53.8±4.25
D	10 g/L 纳米 SiO <sub>2</sub>	83.9±3.91	64.4±4.44	68.1±3.13
E	20 g/L 壳聚糖+5 g/L 纳米 TiO <sub>2</sub>	63.6±3.61	56.2±3.23	56.0±4.03
F	20 g/L 壳聚糖+10 g/L 纳米 TiO <sub>2</sub>	69.8±6.48	50.2±3.17	51.8±5.08
G	20 g/L 壳聚糖+15 g/L 纳米 TiO <sub>2</sub>	75.3±4.00	48.0±7.23	53.4±3.44
H	20 g/L 壳聚糖+5 g/L 纳米 SiO <sub>2</sub>	72.9±2.96	51.1±18.23	50.9±8.89
I	20 g/L 壳聚糖+10 g/L 纳米 SiO <sub>2</sub>	71.5±3.84	59.9±7.91	65.7±4.73
J	20 g/L 壳聚糖+15 g/L 纳米 SiO <sub>2</sub>	74.1±3.05	54.1±4.11	57.4±5.14

3 讨论

本研究采用滴注法制作铁皮石斛人工种子，并考察人工胚乳、人工种皮组分对人工种子萌发和成苗的影响。在人工胚乳中添加海藻酸钠和活性炭的基础上分别添加木薯淀粉和保水剂，均能提高人工种子的萌发率和成苗率。添加纳米材料特别是 10 g/L 的纳米 SiO<sub>2</sub> 能显著促进人工种子的萌发率和成苗率，90 d 成苗率达 68.1%，为铁皮石斛人工种子的实用化提供了科学依据。郭顺星等<sup>[8]</sup>采用海藻酸钠包埋系统制作铁皮石斛人工种子，然而海藻酸钠

以 MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+10 g/L 保水剂+15 g/L 木薯淀粉+3 g/L AC+30 g/L 海藻酸钠+3 g/L 百菌清为人工胚乳，人工种皮基质进行 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 10 种处理，见表 5。从表 5 可知，不同人工种皮基质以添加 10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub> 的 D 组 30 d 萌发率最高，达 83.9%，其次是添加 10 g/L 纳米 TiO<sub>2</sub> 的 C 组，萌发率达 78.0%。添加 10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub> 的 D 组和添加 20 g/L 壳聚糖+10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub> 的 I 组人工种皮基质的 90 d 成苗率分别达到了 68.1%、65.7%，比对照组提高了 15.4%、13.0%。与对照组相比，加入壳聚糖后，人工种子不会出现粘连现象，原因可能是海藻酸钠分子链上有大量的羧基，壳聚糖分子链上有大量的伯氨基，通过正、负电荷吸引形成了聚电解质膜，消除了粘连现象。但添加壳聚糖后成苗率比较差，这与张明生等<sup>[7]</sup>的报道不太一致，原因可能是壳聚糖与海藻酸钠形成的聚电解质膜影响了种皮的透气性，而加入具有多孔结构和良好生物相容性的纳米材料正好可以弥补这一缺点，从而提高成苗率。

包埋系统保水性差，在空气中会迅速风干，难以应用。张铭等<sup>[5]</sup>在对铁皮石斛原球茎质量控制研究的基础上，试验了人工种子的凝胶包埋系统，凝胶包埋系统虽然有制作方便、萌发率较高的优点，但其保水性亦差、易染菌而难以大规模应用。而且这些研究仅限于考察人工种子萌发率，均未考察成苗率，在实验中发现，萌发率和成苗率仍存在一定的差距，以成苗率考察人工种子制作是否成功较为确切。

目前，在人工胚乳或人工种皮中添加特殊材料来促进其萌发、成苗或延长人工种子的贮藏时间已

成为研究的重点。海藻酸钠是制作人工种子最普遍的包埋介质,具有成胶容易、使用方便、无毒、价廉等优点,但存在保水性差,在空气中会迅速风干,且干燥到一定程度不能吸水回胀的问题<sup>[5]</sup>。同时用海藻酸钠包埋的人工种子,其营养成分极易渗漏,胶体表面黏滞,难以撒布种植<sup>[9]</sup>。在本实验中,随着海藻酸钠浓度的升高,包埋成的铁皮石斛人工种子萌发率降低,这就是因为“种皮”通透性不好,妨碍了人工种子的萌发。本研究发现添加 10 g/L 纳米 SiO<sub>2</sub> 的人工种皮基质能明显提高铁皮石斛人工种子的萌发率和成苗率,原因可能是纳米材料独特的空间效应产生了一些新的功能<sup>[10-13]</sup>,通过影响人工种皮的透气性、提高吸收能力、促进原球茎生长发育及抗菌作用等促进铁皮石斛人工种子萌发和成苗。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 郭仲琛,桂耀林. 植物体细胞胚胎发生和人工种子 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [5] 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.
- [6] 黄绍兴,黄美娟,朱 澂. 木薯淀粉对人工胚乳性能及对人工种子发芽率的影响 [J]. 生物工程学报, 1995, 11(1): 39-44.
- [7] 张明生,李 花,阚世超,等. 金线莲人工种子制作技术及萌发研究 [J]. 种子, 2007, 26(11): 50-53.
- [8] 郭顺星,曹文岑,张集慧. 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.
- [9] 陈德富,陈喜文,程炳嵩. 人工种子几个问题的探讨 [J]. 山东农业大学学报, 1995, 26(2): 249-256.
- [10] 陆长梅,张超英,温俊强,等. 纳米材料促进大豆萌芽、生长的影响及其机理研究 [J]. 大豆科学, 2002, 21(3): 168-171.
- [11] Hong F S, Zhou J, Liu C, *et al.* Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on photochemical reaction of chloroplasts of spinach [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2005, 105(3): 269-279.
- [12] 王荔军,王运华,益 林,等. 纳米结构 SiO<sub>2</sub> 与植物真菌病害发生的关系 [J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 592-597.
- [13] 刘 刚,张 鹏,徐瑞芬. 纳米 TiO<sub>2</sub> 粉体抗菌、抗病毒性能研究 [J]. 功能材料, 2005, 7: 33-37.