园 艺 学 报 2001, 28 (5): 435～439
Acta Horticulturae Sinica

铁皮石斛人工种子固形包埋系统的研究

张 铭[1] 魏小勇[2] 黄华荣[1]
([1] 浙江大学生命科学学院, 杭州310012; [2]广州中医药大学, 广州510405)

摘 要: 应用粘土和蛭石粉作基质包埋铁皮石斛种胚来制作人工种子。试验结果表明: 当粘土 蛭石粉 MS 培养液为 2∶1∶2 时萌发率可达 56.8 %。在此系统中单独添加 1.0 %活性炭或同时添加 1.0 %活性炭和 0.5 %淀粉制作的铁皮石斛人工种子, 平均萌发率分别达 76.7 %和 80.3 %, 分别比对照提高了 18.4 %和 24.2 %。还研究了壳聚糖等作外种皮以及原球茎的失水率对铁皮石斛人工种子萌发及贮藏的影响。

关键词: 铁皮石斛; 人工种子; 固体包埋
中图分类号: S 68 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-353X (2001) 05-0435-05

植物体细胞胚人工种子 (plant artificial seed) 的概念[1]自提出后, 现已发展到运用多种系统包埋种胚、顶芽、小鳞茎等制作人工种子进行快速繁殖[2]。铁皮石斛 (*Dendrobium candidum*) 是我国传统的名贵药用植物, 近年来市场需求量不断增加, 但其生境苛刻, 自然生长繁殖相当缓慢, 加之过度采挖, 已成为濒危植物[3]。利用组织培养技术能在一定程度上解决快繁问题, 但其试管苗生产周期长, 成本高, 移栽也不易成活, 且不便储藏和运输, 从而限制了铁皮石斛的规模性生产[4,5]。1992 年 Sharma 等[6]研制了大包鞘石斛 (*D. wardianum* Warner) 的人工种子, 1996 年郭顺星等[7]报道了铁皮石斛人工种子制作流程。为加速铁皮石斛商品化生产, 我们在对铁皮石斛原球茎质量控制研究的基础上[8], 已试验了人工种子的凝胶包埋系统[9]。凝胶包埋系统虽然有制作方便, 萌发率高的优点, 但其保水性差, 易染菌而难以实用化。本研究应用蛭石和粘土作固形包埋基质, 辅以活性炭、淀粉[10]、壳聚糖[11]等制作成人工种子, 并研究了其萌发、生长、储藏等条件, 为铁皮石斛人工种子实用化提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

云南野生铁皮石斛的成熟蒴果经洗洁精洗涤, 75 %酒精和 0.1 % $HgCl_2$ 表面消毒, 无菌剥离的种胚用 MS 液体培养基悬浮, 接种在含有 0.5 mg/L NAA 的改良 N_6 固体培养基上, 置 25 ± 1 ℃恒温培养 30 d, 2000 lx 全天光照, 然后转入含有 0.5 mg/L ABA 的 MS 培养液内振摇培养 (100 r/min), 每 10 d 更换培养液 1 次。30 d 后用 6 目尼龙网筛选择长 ×宽约为 0.5 ～1.5 mm × 2.0 ～3.4 mm 的种胚原球茎备用。

1.2 方法

收稿日期: 2001 - 06 - 18; **修回日期**: 2001 - 09 - 05
基金项目: 浙江省科委资助项目 (K9615013)

1.2.1 海藻酸钠凝胶包埋系统 将原球茎浸入用 MS 培养基配制的 4 %海藻酸钠溶液中。用滴管滴入 2 %$CaCl_2$ 溶液中进行固化，控制每滴包含一个原球茎，30 min 后用培养液漂洗 15 min，即得人工种子。萌发标准为突破种皮 2 mm，萌发率（%）=（萌发数/播种数）×100。成苗转化以同时具有根和叶为标准，成苗率（%）=（苗数/播种数）×100。

1.2.2 固形基质包埋系统 粘土的掘取与处理按文献[12]的方法进行，100 目过筛。蛭石自然风干、粉碎，8 目网筛过筛，得 0.15～1.00 mm 蛭石粉。其中有机质和可溶性盐分的去除方法与粘土处理方法相同。按质量比例混合粘土、蛭石和 MS 培养液制成基质，再置入种胚制成人工种子，然后播种于 MS 固体培养基上。每次处理约 100 粒，重复 3 次。(25 ±1) ℃，2000 lx 全天连续光照（以下试验若无说明均按此处理）。30 d 后统计萌发率。

1.2.3 添加活性炭和淀粉处理 固形基质配比为粘土∶蛭石∶MS 培养液 = 2∶1∶2，分别加入 0～1.5 %活性炭（MS 培养液中先浸泡 2 h）制作人工种子。在添加 1 %活性炭的基础上再添加 0～1.2 %淀粉（浙江菱湖食品化工厂生产）制作人工种子，进行萌发试验。失水率测定按白宝璋[13]方法进行。

1.2.4 壳聚糖、滑石粉作外膜 海藻酸钠包埋的人工种子，采用 Ling-Fong Tay 等[14]的方法涂复壳聚糖外种皮。固形基质包埋的人工种子直接置于 1 %壳聚糖溶液中，再用 0.02 mol/L NaOH 溶液固化，蒸馏水冲洗，进行萌发试验。

1.2.5 低温及干燥处理 将原球茎称量质量，置三角瓶中加棉塞，于恒温（25 ±1 ℃），恒湿（RH 40 %～60 %）箱内干燥。每天取样称量质量，计算失水率。失水率（%）=［(脱水前质量 - 脱水后质量）/脱水前质量］×100。然后将样品分成二份，一份直接用固形基质进行包埋制成人工种子作萌发试验，另一份置于 4 ℃冰箱中贮藏，30 d 后取出制成人工种子并作萌发试验。30 d 后统计萌发率，50 d 后统计成苗率。

2 结果与分析

2.1 固形基质包埋系统对人工种子萌发率的影响

由表 1 可见，不同比例粘土和蛭石粉包埋的人工种子，萌发率差异显著。当基质全部为粘土时，无论其含水量多少，萌发率均为零，因为基质粘度大，致密不透气，可能导致种胚呼吸受阻而不能萌发。当粘土中添加不同比例的蛭石粉以改善基质的物理结构后，增加了透气性，其萌发率也相应提高。在粘土与蛭石粉的比例为 2∶1 时，人工种子的萌发率最高可达 56.8 %。当蛭石粉含量继续增加时，其萌发率又随之逐渐下降，可能是蛭石粉比例的提高，造成基质疏

表 1 不同固形基质包埋制作的人工种子的萌发率

Table 1 Germination rate of the artificial seed made from different solid coating materials

固形基质 MS 含量 MS content of solid coating materials (%)	粘土∶蛭石 Clay∶Vermiculite							
	1∶0	2∶1	3∶1	4∶1	1∶1	1∶2	1∶3	1∶4
20	0 h	3.4 gh	0 h	0 h	13.0 f	2.3 h	2.4 h	2.8 gh
30	0 h	39.0 b	12.5 f	3.0 gh	14.0 ef	17.0 def	4.0 gh	3.0 gh
40	0 h	56.8 a	21.7 cd	5.0 gh	25.0 c	15.0 ef	8.0 g	1.2 h
50	0 h	42.4 b	18.3 de	5.0 gh	21.0 cd	13.0 f	0 h	0 h
60	0 h	1.4 h	1.2 h	1.3 h	2.4 h	1.5 h	0 h	0.5 h

注：新复极差检验，不同字母表示处理平均数之间在 $\alpha = 0.05$ 水平差异显著。下同。Note: The results with the same letter within each column are not significantly different at 5 % level by Duncan's new multiple range test. The same below.

松，成粒性降低，也影响了水分和养分的供应。

固形基质中含水（MS）量对人工种子萌发有明显影响，含水 30 %～50 %的人工种子成粒性较好，萌发率也高，其中粘土∶蛭石为 2∶1 时，含水 40 %的基质萌发率达56.8 %。经统计学分析，该组合与其他组合差异显著，以下试验均以此作为基本固形基质。

2.2　活性炭和淀粉添加物对人工种子的影响

为改善人工种子萌发期间的养分供应，我们在基本固形基质中添加不同比例的活性炭，测定萌发率和成苗率。由表 2 可见，在铁皮石斛人工种子的包埋基质中加入一定比例的活性炭对种子的萌发仅稍有促进作用，但对成苗却有明显的促进作用，例如在添加 1 %活性炭时，种子萌发率为 76.7 %，而成苗率达 55.2 %，比对照组的 27.7 %提高了将近一倍。这一结果说明人工种子在成苗过程中需要稳定的养分供给，活性炭具有较好的吸附和解吸附特性，因而有利于营养物质持续不断地供应，有利于人工种子的成苗。

表 2　活性炭对铁皮石斛人工种子萌发率和转化率的影响

Table 2　Effect of active charcoal on germination rate and conversion rate of *D. candidum* artificial seed

基质中活性炭含量 Activated charcoal content (%)	萌发率 Germination rate (%)	成苗率 Conversion rate (%)
0	58.3 bc	27.7 cd
0.2	51.7 c	33.7 cd
0.5	64.2 b	37.3 c
0.8	65.0 b	49.0 b
1.0	76.7 a	55.2 a
1.2	56.7 bc	47.0 b
1.5	60.0 bc	30.7 d

注：基质为粘土∶蛭石∶MS = 2∶1∶2

Note: Coating materials is clay∶vermiculite∶MS (2∶1∶2).

在添加 1 %活性炭的基本基质中再加入不同比例的淀粉，在一定范围内人工种子的萌发率随淀粉含量的增加而提高，当淀粉达 0.5 %时，萌发率可达 80.3 %（表 3），可能是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，也有可能是种胚分泌一些胞外酶来利用淀粉，促进萌发。试验表明，加有淀粉的人工种子的失水率仅是未加淀粉的人工种子的二分之一，是海藻酸钠系统失水率的二十几分之一（表 4）。

表 3　淀粉对铁皮石斛人工种子萌发率的影响

Table 3　Effect of starch on germination rate of *D. candidum* artifical seed

基质中淀粉含量 Starch content (%)	萌发率 Germination rate (%)
0.25	69.7 ab
0.50	80.3 a
0.75	63.6 abc
1.20	45.5 c
0	56.1 bc

注：基质为粘土∶蛭石∶MS = 2∶1∶2，加活性炭 1 %。

Note: Coating materials is clay∶vermiculite∶MS (2∶1∶2) with 1 % activated charcoal.

表 4　不同包埋基质的铁皮石斛人工种子失水率比较

Table 4　Comparison of water loss of different coating materials

包埋基质 Coating materials	失水率 Water-loss rate (%)
粘土∶蛭石∶MS = 2∶1∶2，+1 %活性炭 Clay∶Vermiculite∶MS = 2∶1∶2，+ 1 % activated charcoal	20.60 c
粘土∶蛭石∶MS = 2∶1∶2，+1 %活性炭 + 0.5 %淀粉 Clay∶Vermiculite∶MS = 2∶1∶2，+1 % activated charcoal + 0.5 % starch added	10.90 c
4 %海藻酸钠 + 2 %$CaCl_2$ 4 % sodium alginate + 2 %$CaCl_2$	243.30 a

2.3　壳聚糖外膜对铁皮石斛人工种子萌发的影响

壳聚糖外膜对海藻酸钠凝胶包埋系统和固形基质系统制备的铁皮石斛人工种子萌发影响见表 5。海藻酸钠外包壳聚糖后，人工种子不再粘连。由表 5 可见，虽然 10 d 的萌发率有所下降，但 30 d 的萌发率和成苗率都有明显提高。而壳聚糖包裹固体基质 30 d 的萌发

率仅为1.2 %，大大低于对照，这可能与壳聚糖在固体基质外需碱性条件成膜，导致基质pH升高有关。故固形基质外膜材料的选择和涂复工艺还有待进一步探索。

表5 壳聚糖外膜对铁皮石斛人工种子萌发的影响

Table 5 Effect of chitosan coat on germination rate of D. candidum artificial seeds

种子类型 Seed type	萌发率 Germination rate (%) 10 d	30 d	50 d后的成苗率 Conversation rate after 50 d (%)
4 %海藻酸钠 + 2 %$CaCl_2$ + 壳聚糖外膜 4 % Sodium alginate + 2 %$CaCl_2$ + Chitosan	7.5 b	85.0 a	70.8 a
固形基质 + 壳聚糖外膜 The solid encapsulating media + Chitosan	0 c	1.2 d	0 d
4 %海藻酸钠 + 2 %$CaCl_2$(对照1) 4 % Sodium alginate + 2 %$CaCl_2$(Control 1)	25.0 a	73.4 c	56.4 b
固形基质(对照2) The solid encapsulating media (Control 2)	24.5 a	80.0 b	43.5 c

2.4 不同干燥程度对铁皮石斛人工种子萌发及其贮藏的影响

体细胞胚干化处理有助于提高胚活力和人工种子的抗逆性[15]，液体培养基中培养的种胚原球茎的含水量达90 %以上，恒温脱水后，其失水率、萌发率以及4 ℃贮藏30 d后的萌发率和成苗率见表6。

表6 干燥处理及低温贮藏对铁皮石斛人工种子萌发率和成苗率的影响

Table 6 Effect of lose water and low temperature store on D. candidum artificial seed

干化时间 Drying time (d)	失水率 Water loss rate (%)	萌发率 Germination rate (%)	成苗率 Conversion rate (%)	贮藏30 d后 After 30 d store 萌发率 Germination rate (%)	成苗率 Conversion rate (%)
0	0	89.30 a	70.30 cd	10.30 cd	1.20 e
1	8.15	87.40 a	72.20 c	9.80 cd	3.20 d
2	20.30	88.30 a	70.30 cd	8.30 d	3.40 d
3	32.00	84.50 a	68.40 d	6.40 d	1.20 e
4	42.50	86.40 a	80.20 b	50.40 a	44.40 b
5	57.30	85.30 a	84.40 a	53.30 a	49.40 a
6	66.20	56.30 b	40.30 e	30.50 b	28.30 c
7	70.40	38.50 c	12.40 f	14.00 c	4.00 d
8	74.60	0 d	0 g	0 e	0 e

种胚原球茎在脱水过程中，颜色由黄绿色变成黄色，最后变成黄褐色，体积缩小。从表6可见，随着干化时间的增加，其萌发率和成苗率都随之下降。但干化处理4 d失水率42.5 %的种胚制成的人工种子在贮藏30 d后，其萌发率和成苗率都迅速增高；干化处理5 d、失水率为57.3 %的人工种子贮藏30 d后，萌发率和成苗率分别为53.3 %和49.4 %，比对照组高5倍和40倍。然而当失水率达74.6 %时，种胚完全丧失萌发能力。说明种胚原球茎经一定程度的干化处理，能明显增强其抗逆性。干化再结合4 ℃低温处理可望解决人工种子短期贮藏问题。

3 小结

海藻酸钠凝胶包埋系统具有生物活性、无毒、成本低、工艺简单等优点。我们曾用此包埋系统制得铁皮石斛人工种子，3周后萌发率达88.2 %[9]，然而海藻酸钠包埋系统保

水性差, 在空气中会迅速风干, 而且干燥到一定程度不能再吸水回胀; 同时, 用海藻酸钠包埋的人工种子, 其营养物质极易渗漏, 胶体表面粘滞, 难以撒布种植, 也极易染菌, 难以实际应用。本试验的结果表明铁皮石斛原球茎可以应用粘土、蛭石粉等固形基质包埋制作人工种子, 并达到与凝胶包埋系统相近的萌发率和成苗率, 在固形基质内添加 1 %的活性炭和 0.5 %的淀粉, 能明显提高人工种子的萌发率; 在制作人工种子前种胚作脱水处理, 能有效提高贮存后的萌发率和成苗率。固形基质取材容易, 价格低廉, 制作工艺简单, 吸附营养和保水性能良好, 再作适当改进有望达到实用化。

参考文献:

1 Murashige T. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: Thorpe T ed. Frontiers of plant tissue culture. University of Calgary Alberta, Canada: The International Association for Plant Tissue Culture, 1978. 15～26
2 李修庆. 植物人工种子研究. 北京大学出版社, 1990. 3～28
3 魏小勇, 张 铭, 黄华荣. 铁皮石斛药用研究进展. 中草药, 2000, 30 (增刊): 189～191
4 曾宋君, 程式君, 张京丽, 等. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究. 园艺学报, 1998, 25 (1): 75～80
5 胡 忠, 何静波. 黑节草种苗的大量培养. 植物杂志, 1979, (3): 6～7
6 Sharma A. Regenaration *Dendrobium wardcamum* warner (Orchidase) from synthetic seeds. India Journal of Experimental Biology, 1992, 30 (8): 747～748
7 郭顺星, 曹文芩, 张集慧, 等. 铁皮石斛人工种子制作流程及发芽研究. 中草药, 1996, 27 (2): 105～107.
8 张 铭, 朱 峰, 魏小勇, 等. 铁皮石斛种胚萌发和原球茎质量控制. 浙江大学学报 (理学版), 2000, 27 (1): 92～94.
9 朱 峰. 铁皮石斛人工种子研究: [硕士学位论文]. 杭州: 杭州大学, 1997. 1～29
10 黄绍兴, 黄美娟. 木薯淀粉对人工胚乳性能及对人工种子发芽率的影响. 生物工程学报, 1995, 11 (1): 39～44
11 胡文玉, 周良栋. 壳聚糖涂膜对苹果的保鲜效应 (简报). 植物生理学通讯, 1998, 34 (1): 17～19
12 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析. 上海: 上海科学技术出版社, 1978. 38～42
13 白宝璋, 汤学军主编. 植物生理学测试技术. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 18～23
14 Ling-Fong Tay. Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. Biotechnology and Bioengineering, 1993, 42 (4): 249～254
15 Vigneron T. Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria digitata* L. Lamouroux by encapsulation dehydration. Cryo - Letter, 1997, 18 (2): 93～98

A Study on the Solid Encapsulating System of the Artificial Seed of *Dendrobium candidum*

Zhang Ming[1], Wei Xiaoyong[2], and Huang Huarong[1]

([1] *College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou* 310012; [2] *Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou* 510405)

Abstract: This paper describes the study on the *Dendrobium candidum* artificial seed prepared by using the clay and vermiculite powder as the encapsulating media. The results showed that the germination rate reached 56.8 %, when the proportion of clay ∶vermiculite ∶water was 2 ∶1 ∶2. When this system was added with only 1.0 % activated charcoal, or 1.0 % activated charcoal and 0.5 % starch, the corresponding average germination rates of the artificial seeds increased to 76.7 % and 80.3 %. The treatments enhanced the germination rate by 18.4 % and 24.2 % respectively, compared to the control. Both the effect of other seed coat materials used, such as chitosan, and the effect of protocorm-like bodies' water-loss rate on the rate of the artificial seed germination and storage were also studied.

Key words: *Dendrobium candidum*; Artificial seed; Solid encapsulatine