

齿瓣石斛种子保存和萌发形态 发育过程研究

崔秋华¹, 孙永玉¹, 李昆^{1*}, 段明伦², 周志美³, 黄传响⁴

(1.中国林业科学研究院 资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 2.云南省龙陵县林业局, 云南 龙陵 678300; 3.云南省保山市森林资源管理总站, 云南 保山 678000; 4.四川省攀枝花花林业局, 四川 攀枝花 617000)

摘要: 石斛属植物种子小, 无胚乳, 自然条件下, 需与真菌共生才能萌发, 萌发率极低。以齿瓣石斛的种子为研究对象, 研究不同贮存条件对种子萌发率和活力的影响, 并对种子萌发中的形态发育过程进行观察, 试验结果表明, 齿瓣石斛种子细小, 解剖镜下观察呈纺锤形, 由1层透明的种皮和1个种胚组成; 种子比较适宜贮存温度是0~5℃, 贮存1个月时种子萌发率和染色率较高, 随着时间的延长, 种子萌发率和染色率逐渐降低; 种子接种后, 吸水膨胀逐渐转绿, 形成椭球体, 椭球体以2条途径发育成幼苗, 一是原球茎途径, 二是根状茎途径。

关键词: 齿瓣石斛; 种子; 贮存条件; 形态发育

中图分类号: S723 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2012)03-0533-04

Seed Preservation and Germination Process of Morphological Development of *Dendrobium devonianum*.Paxt

CUI Qiu-hua¹, SUN Yong-yu¹, LI Kun^{1*}, DUAN Ming-lun²,
ZHOU Zhi-mei³, HUANG Chuan-xiang⁴

(1.Research Institute of Resource Insects,CAF, Kunming 650224,China; 2.Forest Bureau of Longling County of Yunan Province, Longling 678300,China; 3.Forestry Resources Station of Baoshan Forestry Bureau of Yunan Province, Baoshan 678000, Chin; 4.Panzhihua Forestry Bureau of Sichuan Province,Panzhihua 617000,China)

Abstract: *Dendrobium* plant seeds, small, no endosperm, under natural conditions, can germinate when symbiotic with fungi and the germination rate is very low. Seeds of *Dendrobium devonianum* were used to study the effects of different storage conditions on seed germination and vigor, and the morphological development of the seed was observed. The results showed that: the seeds of *Dendrobium devonianum* were small, under anatomical microscope, they were spindle-shaped and consisted of a layer of transparent seed coat and one embryo. 0-5℃ in refrigerator was suitable for storage, after storage for one month, the seed germination rate and staining rate were higher. The seed germination rate and staining rate decreased gradually with time prolonged. After inoculation, the seed swelled gradually and turned green, and formed an ellipsoid. The ellipsoid then developed into seedlings in two ways, one way of original bulb, and the other of rhizome.

Key word: *Dendrobium devonianum*.Paxt; seed; storage conditions; morphogenesis

齿瓣石斛 (*Dendrobium devonianum*.Paxt) 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 多年生草本植物, 常附生于温暖湿润的树林中的树干或岩石上, 多分布于云南、贵州、广东、广西等热带和亚热带地区, 喜温暖湿润、通风良好的环境, 是我国低纬度地区的林下药用植物资源, 具有较高的药用价

收稿日期: 2011-12-14 修回日期: 2012-02-13

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2011BAD3880105、2011BAD38880404)

作者简介: 崔秋华(1984—), 女, 硕士生, 主要从事种苗培育研究, E-mail: qiuhuaacui2012@126.com; *通讯作者: 李昆, 研究员, E-mail: caflkun@163.com。

值。有报道称药用成分与铁皮石斛相接近,其多糖含量还稍高于铁皮石斛^[1]。

石斛属植物种子小,无胚乳,在野外需要与真菌共生才能萌发^[2],发芽率极低,其分株繁殖效率也很低,目前兰花种子人工繁殖一般采用非共生的无菌萌发方式^[3],可以在短时间内得到快速繁殖,齿瓣石斛也不例外。无菌播种之前,需要对种子活力进行测定,以避免播种材料不当造成人力和财力的浪费。通过染色反应来确定种子的生理活性,在兰花保育和离体培养中是十分重要的环节^[4],在实际应用中,一般采用 TTC 染色法^[5-6]。近些年来,由于人类的滥采乱挖和石斛赖以生存环境的恶化,加上自身繁殖速度极其缓慢,其野生资源已面临枯竭而成濒危物种。目前,齿瓣石斛种子的贮存条件和萌发中的形态发育过程这方面研究还未有报道。本文通过研究齿瓣石斛种子的贮存条件和萌发中的形态发育过程,可为开展胚萌发和杂交育种奠定了实践基础,并为齿瓣石斛种子的无菌萌发提供选择依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为齿瓣石斛野生植株的未开裂蒴果,采自云南省龙陵县小黑山自然保护区(24°15'~24°51'N, 98°38'~99°10'E,)的常绿阔叶林中,主要伴生植物有西南桦(*Betula alnoides*)、滇青冈(*Cyclobalanopsis glauca*)等。

1.2 方法

1.2.1 种子采收及预处理 于2010年11月末在云南省龙陵县小黑山自然保护区采收蒴果,放到牛皮纸袋内,避免受挤压,带回实验室,用软毛刷轻轻扫去表面的灰尘,用洗衣粉清洗干净,流水冲洗30 min,备用。

1.2.2 种子形态学观察 取处理好部分的蒴果,放于培养皿中,用解剖刀轻轻划开,露出种子,然后将种子置于尼康 SMZ1500 体视解剖显微镜下,观察种子的形态,测量种子的纵径、横径和胚长。

1.2.3 种子贮存方法 将处理好的部分蒴果放于牛皮纸袋内,置于3种温度条件下作贮存处理:a: -20 °C; b: 0~5 °C; c: 室温条件,重复3次,贮藏时间为1、3、5个月,因为贮存时间过长蒴果易开裂种子分散出来不利于灭菌,污染率大,种子萌发率低,对于种子保存意义不大,贮藏期间1、3和5个月后随机取样作种子发芽测定和活力测定。

(1)种子发芽测定采用无菌播种。将处理好的种子转移到超净工作台内,体积分数为75%的酒精灭菌30 s,无菌水冲洗4次,质量分数为0.1%的HgCl₂灭菌15 min,无菌水冲洗6次,滤纸吸干多余的水分,在培养皿中切开蒴果,露出种子,同一个蒴果中,取出部分种子用于无菌播种,余下的种子用于TTC染色。培养基采用作者前期做过的种子无菌萌发培养基筛选实验所得出的适宜培养基:MS+20 g/L蔗糖+7 g/L琼脂,用于无菌播种的种子接种到该萌发培养基上,置于温度25 °C,光强2 000 lx,光周期为12 h的条件下培养,接种后统计每瓶的播种数量,80 d后统计萌发率。

(2)种子活力测定采用TTC染色法。用0.1%的TTC溶液测定种子活力,染色时间为0.5 h,3次重复。着色后,在尼康光学显微镜下观察种子染色情况,随机选取3个视野,分别计算每个视野的种子总数,有活力种子数和败育种子数。凡是胚染成有光泽的鲜红色,为有生活力的种子;凡是完全不染色或染成无光泽的淡红色或灰白色,为败育或无活力种子数。

1.2.4 种子萌发中的形态发育过程观察 种子采用贮存1个月后的种子,种子萌发率高,接种后,前20 d种胚吸水膨胀,变化小,每隔10 d取1次样,用尼康 SMZ1500 体视解剖显微镜进行种胚发育动态观察;接种20 d后,种胚萌发,生长加快,变化明显,每隔5 d取1次样,观察胚突破并脱离种皮形成原球茎和发育成幼苗的过程,并拍照保存。

1.2.5 数据计算方法与分析工具 种子萌发成功的判定标准是:叶原基出现,且幼叶长到0.5 cm。实验数据用SPSS(13.0)和Excel(2007)软件进行分析处理。

$$\text{种子萌发率} = \frac{\text{种子萌发成功数目}}{\text{供试种子数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{染色率} = \frac{\text{有活力种子数}}{\text{种子总数}} \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 齿瓣石斛种子形态学观察

齿瓣石斛的果实为蒴果,呈梭形,随着果实的发育由绿色渐变为紫红色,果皮厚。未成熟的种子呈团状,与内果皮粘连在一起,乳白色,成熟后种子逐渐分散开,乳黄色,呈粉末状,细小,解剖镜下观察呈纺锤形(图版1, a),种皮薄,胚位于种子的中央,种子长径约0.37 mm,横径约0.06 mm,种胚长约0.16 mm,结构十分简单,由1层透明的种皮和1个种胚组成,无胚乳,几乎没有贮藏的营养物质,可观察到残留的胚柄,因此在自然条件下很难萌发,并且幼苗生长缓慢。种皮内含有大量的空气^[7]不易吸收水分,易于随风和水流传播。

2.2 贮存条件、时间与种子活力的关系

表1 贮存条件和时间对齿瓣石斛种子活力的影响

Tab. 1 Effects of Storage conditions and time of *Dendrobium devonianum* on seed vigor

贮存条件 Storage conditions	贮存时间/月 Storage time	萌发率/% Germination	TTC 染色率/% TTC dyeing rate
-20 ℃ -20 Refrigerator storage	1	87	90
	3	72	80
	5	32	39
0~5 ℃ 0-5 ℃ refrigerator storage	1	92	95
	3	81	87
	5	63	72
室温 Store at room temperature	1	80	86
	3	41	50
	5	12	20
新种子 New seed	新采集	75	80

种子生活力是指种子发芽的潜在能力或种胚具有的生命力,它是检验种子质量高低的一项可靠指标。因此,同一种子样品中,真实的生活力一般大于或等于发芽率。由表1可知,由萌发率测的种子活力与TTC染色测定的种子活力相接近。就贮存时间来看,齿瓣石斛种子贮存1个月时,较新采集时的种子活力高,可能原因是种子存在后熟现象,贮存3个月时,种子活力逐渐下降,贮存5个月时,种子萌发率下降幅度较大。3种贮存方式,0~5 ℃贮存效果较好,贮存1个月后,种子萌发率为92%,种子染色率为95%,贮存5个月时,萌发率在60%以上;其它2种贮存方式,种子萌发率和染色率下降幅度较大,贮存效果较差。由此可知,0~5 ℃贮存是齿瓣石斛种子贮存的最佳方式。

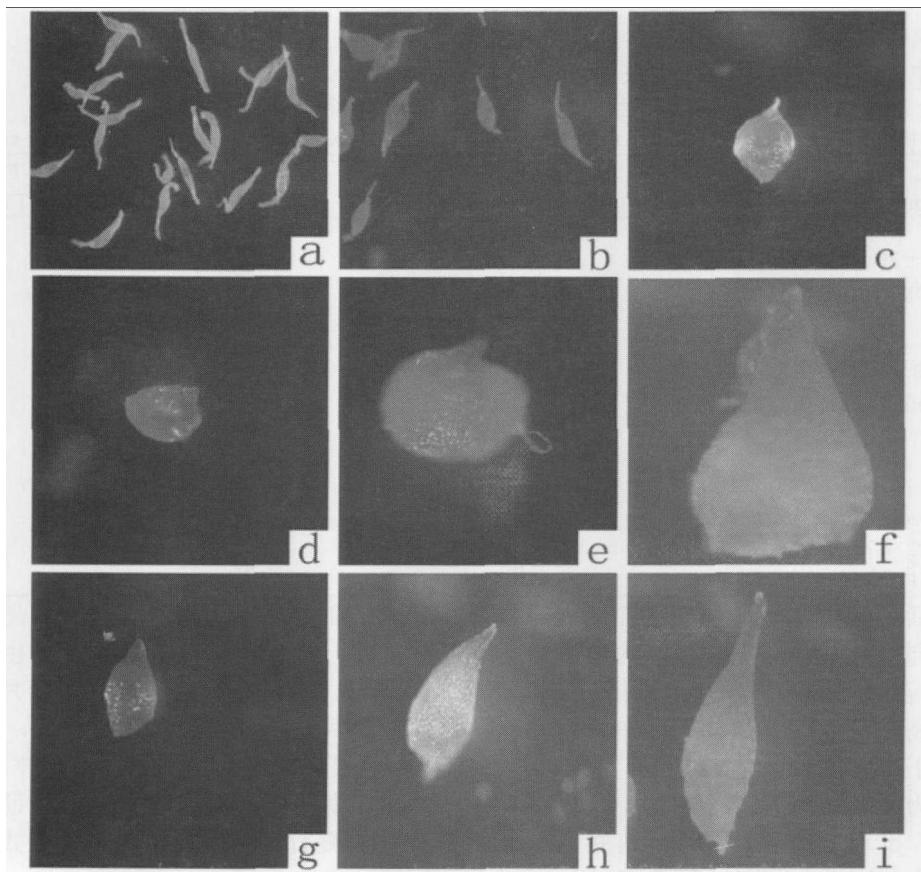
2.3 种胚萌发中的形态发育过程观察

齿瓣石斛种子无菌播种10 d后(图版1, b),胚吸收水分开始膨胀转绿,可看到绿色的胚外面包裹着一层透明的种皮,胚呈长椭球形;20 d后(图版1, c),胚进一步膨胀,绿色逐渐加深,近似椭球体,胚的两端呈不对称,一端较另一端有凸起出现,部分种皮逐渐消失。椭球体以2条途径发育成幼苗;一是原球茎途径,25 d后(图版1, d),胚突破种皮,种皮逐渐消失,裸露的胚近似圆球形,此时原球茎形成,顶端凸起明显;30 d后(图版1, e),原球茎体积进一步增大,顶端有叶原基出现,呈指状突起,指端颜色转变成绿色,较原球茎其他部位深,离指端越远,绿色越浅;35 d后(图版1, f),原球茎纵向生长加快,叶原基在原球茎顶端逐渐增大,开始形成第一幼叶,原球茎形态学下端呈乳白色,并伴有乳白色的根发生,幼苗逐渐形成;二是根状茎途径,随着椭球体伸长加快(图版1, g,h,i),椭球体顶端绿色逐渐加深,呈深绿色,形成叶原基,下部颜色渐渐变浅,呈乳白色,形成根茎,分化出白色的根,进一步生长,发育成幼苗。

3 结论与讨论

兰花种子在自然条件下发芽率很低,影响其萌发的因素有种皮的机械阻力和透水性差、种胚发育不全、贮藏的营养物质过少以及可能存在抑制物质等^[8-10],石斛种子也不例外,齿瓣石斛种子粉末状,无胚乳,解剖镜下观察,种子呈纺锤形,结构简单,由1层透明的种皮和1个种胚组成,因此,自然条件下萌发率极低。

成熟兰科植物的种子采集后一般保存在 4℃^[11-13],但随着保存时间的延长种子萌发率有所下降^[13],有研究表明,*Cypripedium macranthos* var. *rebunense* 的种子在播种前置于 4℃ 的黑暗环境中,有助于打破种子休眠,提高萌发率^[12],本研究得出齿瓣石斛种贮存 1 个月后,较新采集的种子萌发率和种子染色率高,随着保存时间的延长,3 种保存方式种子萌发率普遍降低,这与上述研究结果一致,可能原因是石斛的种子存在后熟现象。0~5℃ 贮存优于室温和 -20℃ 贮存,1 个月后,种子萌发率和染色率较高,5 个月后种子萌发率和染色率仍在 60% 以上,因此,此条件比较适合于齿瓣石斛种子的保存。如何延长石斛种子的保存时间提高其萌发率,还有待于进一步研究。



a:播种前,种子呈纺锤形,胚外面包裹着一层透明的种皮;b:播种 10 d 后,胚吸水膨胀,胚呈现黄绿色;c:播种 20 d 后,胚进一步膨胀,同时种皮逐渐消失,胚绿色逐渐加深;d,e,f:胚发育成幼苗的原球茎途径,分别为播种 25, 30, 35 d 后;g,h,i:胚发育成幼苗的根状茎途径,分别为播种 25,30,35 d 后。

a:Before germination, showing spindle-shaped seed,embryo outside wrapped with a layer of transparent testa;b:After germination 10 days,swelling embryo, and showing yellow-green;c:After germination 20 days,embryo to expand further, while the gradual disappearance of the seed coat,embryo green gradually increase;d,e,f Growth way from protocorm,germination after 25,30,35days respectively; g,h,i:Growth way from rhizome,germination after 25,30,35days respectively.

图版 1 齿瓣石斛种子萌发中的形态发育过程

Plate1 Shape growth process of seed germination of *Dendrobium devonianum*

齿瓣石斛无菌播种后,种子吸水膨胀逐渐变绿,形成椭球体,椭球体以 2 种方式发育成幼苗,一种是原球茎方式,椭球体体积逐渐增大,形成原球茎,并进一步发育成幼苗,另一种是根状茎途径,椭球体伸长形成根茎,顶端形成叶原基,下部分化出白色的根,进一步生长,发育成幼苗这和杨宁生^[14]报道的结果基本一致。石斛胚及幼苗发育的深层研究,可以为兰花的组织培养中选择合适的培养基提供参考。但对石斛胚胎学及种子发育的微观研究,目前所做的工作很少。尤其是杂交种子以及亲本自交种子的系统研究,它将为杂交育种以及种子无菌培养提供细胞水平的参考。

(下转第 555 页)

4 结论

添加功能性寡糖组合 GT1 和 GT2 均能极显著提高稻草的干物质、有机物、NDF、ADF 降解率,两种功能性寡糖之间差异不显著;添加功能性寡糖组合对稻草粗蛋白降解率无显著影响,稻草的有机物与干物质、NDF、ADF 降解率之间呈强相关。稻草的有机物与粗蛋白降解率之间相关性不高。

参考文献:

- [1] 瞿明仁,凌宝明,卢德勋,等.灌注果寡糖对生长绵羊瘤胃发酵功能的影响[J].畜牧兽医学报,2006,37(8):779-784.
- [2] 戈婷婷.不同组合的功能性寡糖(NDOs)对锦江黄牛体外发酵的影响[D].南昌:江西农业大学,2011.
- [3] AFRC. Agricultural and food research council. Report No.9[M]//Nutritive Requirements of Ruminant Animal: Protein.CAB International, 1992:1-48.
- [4] 冯仰廉.反刍动物营养学[M].北京:中国农业出版社,2004:305-308
- [5] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].2版.北京:中国农业出版社,2003:42-54.
- [6] 崔利宏.牧草收割期和日粮精粗比对绵羊瘤胃内营养物质降解的影响[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.
- [7] 张学峰,瞿明仁,王立阁,等.大豆寡糖对瘤胃微生物区系的影响[J].动物营养学报,2008,20(3):355-359.
- [8] 刘兵,瞿明仁,张学峰,等.瘤胃灌注大豆寡糖对绵羊消化道内营养物质流通与消化的影响[J].畜牧兽医学报,2008,39(7):915-922.
- [9] Gibson G R,Roberfroid B M. Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics[J].Nutrition, 2004,17(2): 259-275.
- [10] Roberfroid M B.Chicory fructo-oligosaccharides and the gastrointestinal tract[J].Nutrition,2000,16:677-679
- [11] 郭勇庆.牛蒡果寡糖对绵羊生产性能、营养物质消化代谢影响研究[D].河北:河北农业大学,2010.
- [12] Mwenya B, Zhou X, Santoso B, et al.Effects of a probiotic vitacogen and β , 1-4 Galacto- oligosaccharides supplementation on methanogenesis and energy and nitrogen utilization in dairy cows[J].Asian-Aust J Anim Sci,2004,17(3):349-354.
- [13] 刁其玉.饲料营养成分在瘤胃和小肠降解规律的研究[D].北京:中国农业科学院,2000.

(上接第 536 页)

参考文献:

- [1] 郑志新,李昆.云南龙陵齿瓣石斛化学成分分析测定及栽培方式选择[J].安徽农业科学,2008,36(4):1426-1427.
- [2] 孙永玉,李恒安.齿瓣石斛的无菌播种和组织培养[J].植物生理学通讯,2009,45(10):1017-1018.
- [3] Peterson R L,Uetake Y ,Zelmer C. Fungal symbioses with orchid procoms[J].Symbiosis,1998,25:29-55.
- [4] Vladmir V,St-arnaud M,DEN IS B,et al. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination[J].Annals of Botany,2000,86:79-86.
- [5] Pritchard H W.Determination of orchid seed viability using fluorescein diacetate[J].Plant Cell and Environment,1985,8:727-730.
- [6] FAST European terrestrial orchids (symbiotic and asymbiotic methods)[G].ARDITTIJ Orchid biology: Reviews and perspectives II .Ithaca, N Y:Comstock Publishing Associates,1982:326-329.
- [7] 吴应祥.中国兰花[M].2版.北京:中国林业出版社,1994.
- [8] 丁峰.蝴蝶兰无菌播种快繁技术[J].江苏农业科学,2005,33(4):79-80.
- [9] 卜朝阳,蒋慧萍,满若君.蝴蝶兰花梗离体培养及叶片诱导类原球茎研究[J].江苏农业科学,2008,36(3):147-150.
- [10] 祝鹏芳,陈长卿.中国兰的无菌播种与茎尖培养[J].北方园艺,1997,21(1):47-48.
- [11] 伍建榕,韩素芬,朱有勇,等.地生兰组培快繁技术研究[J].北方园艺,2008,32(5):202-205.
- [12] Hanako S, Yasunori K. Microp ropagation of *Cypripedium acranthos* var. *rebutense* through protocorm- like bodies derived from mature seeds[J].Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2004,78:273-276.
- [13] 曾宋君.石斛兰无菌播种与组织培养[J].花卉园地,2005,22(11):9-11.
- [14] 杨宁生,杨柏云,钟青萍.蕙兰(*Cymbidium faberi rolfe*)种子无菌培养的研究[J].江西科学,1994,12(2):80-84.