

## 独蒜兰种子快速萌发培养研究

王跃华<sup>1</sup>, 陈芳<sup>1</sup>, 覃顺旺<sup>1</sup>, 曾心语<sup>2</sup>, 文俊壹<sup>2</sup>, 袁杰<sup>2</sup>

(1. 成都大学食品与生物工程学院, 四川成都 610106; 2. 成都列五中学, 四川成都 610056)

**摘要** [目的]以独蒜兰种子为试验材料,探索其种子萌发的最佳培养条件。[方法]通过用不同浓度的次氯酸钙进行浸种处理,采用 NAA、6-BA 和活性炭 3 因素 3 水平的正交试验探讨其对独蒜兰种子萌发的影响,并观察独蒜兰种子萌发生长过程。[结果]采用 0.05 mol/L 的次氯酸钙浸种处理独蒜兰种子 10 min 后,将其接入 B<sub>5</sub>+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.3 mg/L+活性炭 1.0 g/L+20.0 g/L 蔗糖培养基中,培养 50 d 后统计种子萌发率为 100%。[结论]该研究为独蒜兰植物大规模栽种生产提供科学依据。

**关键词** 独蒜兰;种子;萌发;培养条件

中图分类号 S682.31 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)01-0187-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.01.050

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

**Study on the Rapid Germination and Cultivation of *Pleione bulbocodioides* Seeds**

WANG Yue-hua, CHEN Fang, QIN Shun-wang et al (School of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106)

**Abstract** [Objective] Taking *Pleione bulbocodioides* seeds as experimental materials, the best culture conditions of seed germination were explored. [Method] The effects of different concentrations of calcium hypochlorite on *Pleione bulbocodioides* seeds germination, and the growth process of *Pleione bulbocodioides* seeds germination were studied by orthogonal test of NAA, 6-BA and activated carbon. [Result] After soaking seeds with 0.05 mol/L calcium hypochlorite for 10 min, the germination rate was 100.00% after 50 days in B<sub>5</sub>+NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.3 mg/L+activated carbon 1.0 g/L+20.0 g/L sucrose medium. [Conclusion] This study provides a scientific basis for large-scale planting and production of *Pleione bulbocodioides* plant.

**Key words** *Pleione bulbocodioides*; Seed; Germination; Culture condition

独蒜兰(*Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe)是兰科独蒜兰属多年生半耐寒附生或地生珍稀植物<sup>[1]</sup>,主要分布于我国的贵州、四川和云南等地,其假鳞茎半埋于苔藓或枯枝落叶分解的有机质层中<sup>[2]</sup>。2020年《中国药典》(一部)中记载,独蒜兰植物的干燥假鳞茎为药材山慈菇<sup>[3]</sup>。山慈菇药材具有清热解毒、消肿散瘀的功效<sup>[4]</sup>;内服可治肝癌、乳腺癌和子宫癌等,外用可治疮毒、蛇虫咬伤、皮肤烫伤和烧伤等。另外,独蒜兰作为兰科植物,以其花形奇异、花色多样而具有极高的观赏价值<sup>[5]</sup>,已列入《中国珍稀濒危保护植物名录》中,是我国特有的Ⅱ级珍稀濒危保护植物。独蒜兰植物种子细小、无胚乳结构,其种皮的透气和透水性也不太好,因此导致独蒜兰种子在自然界中萌发率极低。笔者主要利用生物技术,从多个方面开展了提高独蒜兰种子萌发条件的研究。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 独蒜兰植物蒴果采于四川省都江堰市龙池镇,经四川师范大学生命科学院马丹炜教授鉴定为兰科独蒜兰属独蒜兰(*Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe)植物。

**1.2 方法**

**1.2.1 独蒜兰种子消毒处理。**选取未开裂的独蒜兰植物蒴果,经清洗阴干后,放在超净工作台上用75%乙醇消毒1 min,无菌水冲洗2次,再用0.1%氯化汞消毒10 min,无菌水冲洗3次后,吸干蒴果表面的水分,用手术刀纵向对半切开蒴果后将种子抖落到无菌瓶中待用。

**1.2.2 不同浓度次氯酸钙浸种处理。**将上述消毒后的独蒜兰种子浸泡在次氯酸钙浓度为0、0.01、0.05、0.10、0.15、0.20 mol/L 中处理10 min后,再用无菌水洗2次后接入MS+20.0 g/L 蔗糖培养基中,50 d后统计独蒜兰种子萌发率。

**1.2.3 正交试验设计。**以B<sub>5</sub>+20.0 g/L 蔗糖为基础培养基,添加NAA、6-BA和活性炭3因素,各因素设3个水平,具体试验设计见表1。50 d后统计独蒜兰种子萌发率,确定种子萌发的最佳条件。

表1 正交试验水平和因素

Table 1 Orthogonal test level and factors

水平 Level	A (NAA/mg/L)	B (6-BA/mg/L)	C(活性炭) Activated carbon/g(L)
1	0	0	0
2	0.5	0.3	1.0
3	1.0	0.6	2.0

**1.2.4 培养条件。**培养温度(20±2)℃,光照强度为500~800 lx,光照时间24 h/d,培养50 d后统计萌发率(以种子突破种皮为萌发标准):萌发率=(突破种皮的种子数/接入培养基中的种子总数)×100%,并观察记录独蒜兰种子萌发生长过程。

**1.3 数据处理** 试验数据处理采用Microsoft Office Excel 2016和SPSS 23.0软件里的Duncan分析数据的差异显著性。

**2 结果与分析**

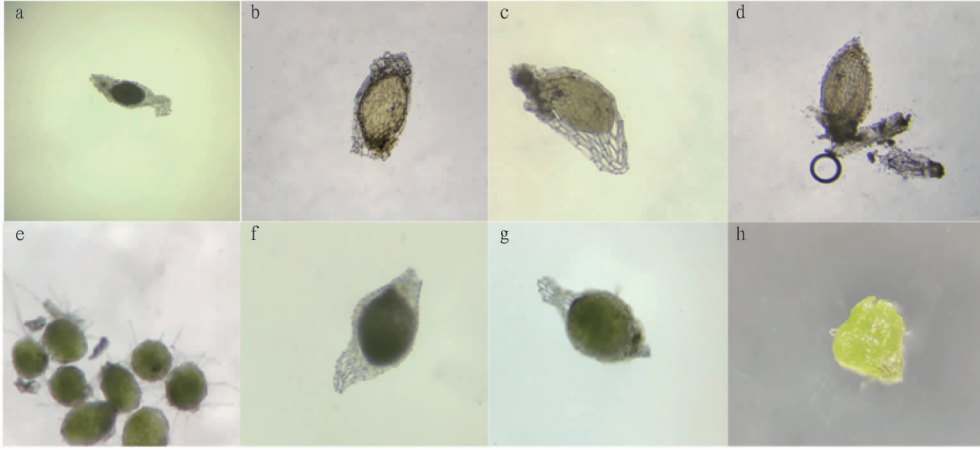
**2.1 独蒜兰种子的萌发过程** 独蒜兰植物种子呈一端稍尖的纺锤形、体积较小,种子长0.5~1.0 mm,中部膨大处有一椭圆状褐色的胚,直径为0.5~0.6 mm;独蒜兰果实成熟后,其内的种子胚尚处于原胚阶段,为一团还未分化的胚性细胞

**基金项目** 四川省科技厅重点研发项目(2020YFS0496)。**作者简介** 王跃华(1963—),女,山东青岛人,教授,硕士,从事药用植物生物技术研究。**收稿日期** 2021-04-30

组成,种子无胚乳结构(图 1a)。将消毒后的独蒜兰种子接入培养基后,种子快速吸水膨胀,随着胚的不断长大,其胚柄逐渐退化,在依靠珠孔端的大细胞为营养物质的渗透提供了一个切入口<sup>[6]</sup>。

通过试验观察发现,独蒜兰种子突破种皮萌发形成原球茎通常有 2 种不同方式;第一种方式是独蒜兰种子在培养 10 d 后,种胚体积明显长大且颜色开始变成黄色(图 1b),随

着培养时间增长到 15 d 后,黄色膨大的种胚从种子的一侧开始涨破种皮(图 1c),培养 20 d 后观察发现大部分种皮已出现脱落(图 1d),培养 30 d 后可见形成原球茎(图 1e)。第 2 种方式是独蒜兰种子在培养 15 d 后,种胚明显吸水膨大后颜色逐渐变成绿色(图 1f),培养 20 d 后可见膨大的绿色种胚已开始涨破种皮(图 1g),培养 30 d 后可见绿色的原球茎形成(图 1h)。



注: a. 培养前(10×10); b. 培养 10 d 后种胚膨大变黄(10×10); c. 培养 15 d 后突破种皮(10×10); d. 培养 20 d 后大部分种皮脱落(10×10); e. 培养 30 d 后形成原球茎(4×10); f. 培养 15 d 后种胚膨大变绿(10×10); g. 培养 20 d 后涨破种皮(10×10); h. 原球茎(3×10)

Note: a. Before culture (10×10); b. After 10 days of culture, the seed embryo swells and turns yellow (10×10); c. After 15 days of culture, it breaks through the seed coat (10×10); d. After 20 days of culture, most of the seed coat falls off (10×10); e. After 30 days of culture, protocorm is formed (4×10); f. After 15 days of culture, the seed embryo swells and turns green (10×10); g. After 20 days of culture, it swells broken seed coat (10×10); h. Protocorm (3×10)

图 1 独蒜兰种子萌发过程

Fig. 1 Germination process of *Pleione bulbocodioides* seeds

**2.2 不同浓度的次氯酸钙浸种处理对种子萌发的影响** 用不同浓度次氯酸钙浸种处理种子 10 min 后,接入 MS+20.0 g/L 蔗糖培养基中,培养 50 d 后统计独蒜兰种子萌发率结果见表 2。如表 2 所示, A1 作为对照组,不用次氯酸钙进行浸种处理,50 d 后统计独蒜兰种子的萌发率最低,仅为 53.00%,由此可见,采用适宜浓度的次氯酸钙浸种处理独蒜兰种子,对种子的萌发具有明显的促进作用。在 A2~A3 处理组中,当次氯酸钙浓度由 0.01 mol/L 升高到 0.05 mol/L 时,独蒜兰种子萌发率也呈现出逐渐升高的趋势;当采用浓度为 0.05 mol/L 的次氯酸钙处理种子时,其种子萌发率最高,为 82.67%;但当使用的次氯酸钙浓度再进一步升高时,

表 2 不同浓度的次氯酸钙处理对种子萌发的影响

Table 2 Effects of different concentrations of calcium hypochlorite treatment on seed germination

处理 Treatment	浓度 Concentration//mol/L	萌发率 Germination rate//%
A1	0	53.00±3.61 d
A2	0.01	72.33±3.06 bc
A3	0.05	82.67±2.52 a
A4	0.10	78.33±2.52 a
A5	0.15	73.33±1.53 b
A6	0.20	68.00±2.65 c

种子的萌发率也呈现出一定的下降,如 A6 组中,当次氯酸钙浓度升高到 0.20 mol/L 时,独蒜兰种子萌发率下降为 68.00%。

分析其原因,主要是因为独蒜兰植物种子的种皮透气性和透水性不太好,不利于种子萌发前期的吸水和呼吸代谢;该试验通过采用适宜浓度的次氯酸钙进行浸种处理,不仅能消除独蒜兰种子表面的病菌和其他对种子萌发有抑制的物质<sup>[7]</sup>,还能改善种皮的透水性,并激发种子内部酶活性,进一步增强种胚的呼吸作用<sup>[8]</sup>;另有报道,采用适宜浓度的次氯酸钙处理种子,还能使种子从休眠状态转为萌发状态<sup>[9]</sup>。但是,次氯酸钙具有较强的氧化性,所以在处理独蒜兰种子时,选择适宜浓度是非常重要的。如果采用过高浓度的次氯酸钙处理独蒜兰种子,会伤到独蒜兰种子种胚,从而也会影响到种子的萌发效果。

**2.3 多因素处理对独蒜兰种子萌发的影响** 根据正交试验设计研究了 NAA、6-BA 和活性炭 3 个因素对独蒜兰种子萌发的影响,试验结果见表 3 和表 4。从表 3 可以看出,编号 4 即采用 NAA 浓度 0.5 mg/L、6-BA 浓度 0 mg/L、活性炭浓度 1.0 g/L 时,独蒜兰种子的萌发率最高,为 97.84%。通过观察发现,大多数独蒜兰种子萌发形成原球茎的过程:种胚体积变大、颜色变为淡黄色后突破种皮形成原球茎。通过极差分析,3 个因素对独蒜兰种子萌发的影响从大到小依次为 A>

B>C,即 NAA 的影响最大,6-BA 次之,活性炭影响最小。

表 3 多因素处理对种子萌发的直观分析

Table 3 Visual analysis of multi-factor treatment on seed germination

编号 No.	A	B	C	萌发率 Germination rate//%
1	1	1	1	92.64±0.56 b
2	1	2	2	93.09±0.73 b
3	1	3	3	85.33±1.73 c
4	2	1	2	97.84±1.47 a
5	2	2	1	96.14±0.27 ab
6	2	3	3	86.45±1.71 c
7	3	1	3	73.10±2.71 e
8	3	2	2	79.14±1.39 d
9	3	3	1	65.75±4.72 f
$k_1$	90.35	87.88	84.84	
$k_2$	92.88	89.46	85.42	
$k_3$	70.66	78.58	83.63	
R	22.22	10.88	1.79	

表 4 方差分析

Table 4 Variance analysis

来源 Source	偏差平方和 Deviation sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
修正模型 Modified model	0.106	6.000	0.018	51.467	0.019
截距 Intercept	6.446	1.000	6.446	18 818.712	0.000
A	0.089	2.000	0.044	129.546	0.008**
B	0.017	2.000	0.008	24.118	0.040*
C	0.001	2.000	0.000	0.736	0.576
误差 Error	0.001	2.000	0.000		
总计 Total	6.553	9.000			

注: \* 表示差异显著( $P<0.05$ ); \*\* 表示差异极显著( $P<0.01$ )

Note: \* means significant difference ( $P<0.05$ ); \*\* means extremely significant difference ( $P<0.01$ )

该研究通过在培养基中添加适量的 NAA 和 6-BA 有利于提高种子的萌发率,这与郭艳芳<sup>[10]</sup>、曾武清等<sup>[11]</sup>的研究结果相似。说明适宜浓度的植物生长调节剂 6-BA 和 NAA 可以显著提高独蒜兰种子萌发率和促进原球茎的快速生长。

### 参考文献

- [1] 李春华,李柯澄.独蒜兰温室生产[J].中国花卉园艺,2017(6):23-27.
- [2] 张燕,李思锋,黎斌.独蒜兰的生物学特性及栽培技术[J].陕西农业科学,2010,56(1):267-268.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2020年版一部[S].北京:化学工业出版社,2020:34.
- [4] 刘婷婷,于栋华,刘树民.山慈菇的本草考证及现代研究进展[J].中国药房,2020,31(24):3055-3059.

进一步根据各水平的均值大小,筛选出了独蒜兰种子萌发的最佳组合为  $A_2B_2C_2$ ,即 NAA 0.5 mg/L+6-BA 0.3 mg/L+活性炭 1.0 g/L;经过对独蒜兰种子萌发试验的进一步验证,培养 50 d 后其种子的萌发率可达到 100%。

由表 4 可知,因素 A 具有极显著性,因素 B 具有显著性。通过方差分析(表 4)可以看出,影响独蒜兰种子萌发的主要影响因素为 NAA,其次是 6-BA,活性炭对其影响最小,此结果与极差分析的结果一致。

### 3 小结

独蒜兰是兰科植物中重要的药用植物,其种子体积小、无胚乳结构,种皮的透气性和透水性不好,所以独蒜兰种子在自然条件下极难萌发。随着人们对其化学成分和药理作用的不断深入了解,其需求量也与日俱增;但由于独蒜兰植物本身的繁殖能力和对栽种环境的苛刻要求,使得其野生资源极其稀少;因此,提高独蒜兰种子的萌发率也是解决独蒜兰植物大规模栽种生产的关键环节。

- [5] 郎楷永.四川省兰科植物资源[J].植物杂志,1988(6):6-8.
- [6] LI Y Y, MENG Z X, ZHANG Y, et al. Embryology of *Anoectochilus roxburghii*: Seed and embryo development[J]. Botanical studies, 2019, 60(1): 1-9.
- [7] 赵荣梅,刘丽,郭巧生.外源物质对桔梗种子发芽影响的研究[J].中国中药杂志,2006,31(12):966-968.
- [8] 戎聪敏.不同条件下药剂浸种对油菜发芽率及幼苗长势的影响[D].武汉:华中农业大学,2013.
- [9] 谭玲玲,胡正海.不同浸种处理对桔梗种子萌发和幼苗生长的影响[J].中草药,2013,44(4):468-472.
- [10] 郭艳芳.巧克力文心兰离体培养优化及抗病基因克隆与表达分析[D].福州:福建农林大学,2018.
- [11] 曾武清,陈柳婵,曾瑞珍,等.丽影和红韵蝴蝶兰快速繁殖试验[J].广东农业科学,2017,44(8):55-60.