

卡德丽亚兰种子非共生萌发及萌发过程中 原球茎发育的细胞学研究

丁 兰, 王 丽, 李 淮, 祁林林, 李 娟

(西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070)

摘 要: 对卡德丽亚兰种子非共生萌发条件及萌发过程中原球茎发育进行了研究。结果表明, 低离子浓度培养基(KC、RE)利于卡德丽亚兰种子萌发; 适宜种类和浓度的激素(1.0 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 或 1.0 mg/L KT 和 0.1 mg/L NAA)对种子萌发有良好的促进作用。细胞学研究表明: 卡德丽亚兰种子萌发过程的本质是未分化胚细胞团通过细胞的不断分裂形成原球茎, 原球茎出现极性, 随之分化形成芽端分生区, 最终形成实生苗。

关键词: 卡德丽亚兰; 非共生萌发; 原球茎发育; 细胞学研究

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)06-0909-04

Study on asymbiotic germination of *Cattleya* hybrid seed and development of protocorms during germinating

DING Lan, WANG Li, LI Huai, QI Lin-Lin, LI Juan

(Department of Biology, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: This paper presented the optimum culture conditions for the asymbiotic germination of the seeds of *Cattleya* hybrid and the development process of protocorms during germinating was also investigated. Mediums with lower ionic concentrations, such as KC and RE, were suitable for seed germination. KC medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA or 1.0 mg/L KT and 0.1 mg/L NAA was the optimal choice. Cytological observation indicated that the embryonic cells of the seeds developed into protocorms through cell division, then differentiated into leaf primordium, buds and finally integral seedlings.

Key words: *Cattleya* hybrid; asymbiotic germination; protocorm development; cytology

兰花为珍稀观赏花卉, 以它奇特的花形, 绚丽多变的花色, 素雅的芳香, 优美的叶形, 深受人们的喜爱。兰科植物的种子极小, 每个荚果可产生 1~100 万粒种子, 但绝大多数种类的种子不具胚乳和子叶, 萌发率极低。在自然条件下种子需与适合的真菌共生, 从真菌吸收营养物质方可萌发(徐锦堂, 1993)。这使兰花的大量繁殖在很大程度上受到了限制。非共生萌发法的创立使兰花种子在人工培养基上不用任何真菌使其得以萌发成为可能, 这项技术既简化了

萌发程序, 又提高了萌发率, 成苗不需探询生根问题, 为兰花产业的发展开辟了新途径。因此, 兰花种子的非共生萌发在兰花工业生产中显得尤为重要, 已在兰花工业化生产中得到了广泛的应用(丁兰等, 2000)。

卡德丽亚兰(*Cattleya*)原产于南美洲, 是洋兰中花最大, 色彩最艳丽的种类, 为名贵的切花和盆花。有关其组织培养及工业化生产技术, 已有系统研究(丁兰等, 2001, 2002, 2003)。有关兰花种子萌发以及原球茎(protocorms)发育的研究较多集中在蝴蝶兰、

收稿日期: 2006-10-16 修回日期: 2007-03-27

基金项目: 甘肃省教育厅科研基金(991-21); 西北师范大学二期创新工程[Supported by the Research Foundation of Education Department in Gansu Province(991-21); the Innovation Project Foundation of Northwest Normal University]

作者简介: 丁兰(1964-), 女, 四川德阳人, 教授, 博士, 研究方向为植物细胞工程, (E-mail, dinglan@nwnu.edu.cn)。

惠兰、兜兰等属(Nishimura, 1991; Gilles 等, 1997; Kit-saki 等, 2004; Hanako 等, 2004; 伍成厚等, 2005), 而卡德丽亚兰种子非共生萌发及原球茎发育的研究在国内外还未见相关报道。本文进一步探讨卡德丽亚兰种子非共生萌发的优化培养条件, 并且在显微及亚显微水平对其种子的非共生萌发过程进行了系统的细胞学研究, 为揭示兰花种子非共生萌发的机制及应用于工业化生产提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 种子萌发

卡德丽亚兰杂种(Cattleya BLC Rampant Ridge "Sunday Wise Girl" × Bryee Cangon "Splendiferious") 荚果取于兰州兰花公司。成熟未开裂荚果用 0.1% 升汞消毒 15 min, 无菌水冲洗 3 次, 在无菌条件下切开荚果, 取出种子, 播种于不同培养基上, 培养基 pH5.5, 蔗糖 2.0%, 琼脂 0.8%。种子播种后置于 22±2 °C, 9 μmol · m⁻² · s⁻¹ 散射光下培养。

表 1 不同基本培养基对卡德丽亚兰种子萌发的影响

Table 1 Effect of different media on the germination of *Cattleya* seeds

培养基 Media	1/3MS	1/2MS	MS	KC	RE	VW
萌发时间 Germination time (d)	65	65	92	53	60	65
萌发率 Germination rate (%)	72.3	70.5	49.5	78.6	75.3	70.0

1.2 半薄切片与超薄切片制作

从接种后第 1 天至第 77 天每间隔 3 d 取一次材料, 按照常规电镜样品处理, 分批迅速固定于 4% 的

戊二醛固定液中, 4 °C 保存。包埋前抽气, 再将样品在由磷酸缓冲液(pH6.8)配制的含 NaCl 的漂洗液中漂洗 3 次, 并在 15% 琼脂中预包埋, 然后将所有材料后固定在 1% 锇酸溶液, 4 °C 下 2 h, 磷酸缓冲液漂洗 3 次, 丙酮梯度脱水, Epon812 树脂包埋, 聚合成块。包埋块经修整后, 820 型旋转式半薄切片机初步定位后切片, 厚度 0.4~1.5 μm, 甲苯胺兰 O 染液染色, Olympus 显微镜镜检并照像。LKB-5 型超薄切片机切片, 厚度 40~50 nm, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, 日立-100SX 透射电子显微镜镜检并照相。

2 结果与讨论

2.1 萌发过程

卡德丽亚兰种子接种后, 原胚开始发育, 培养初期先在培养基上形成白色点状突起, 继而膨大形成卵形原球茎。原球茎的发育随培养基成分不同而有差异。在不含激素的基本培养基上, 原球茎从球形分化发育成桃形, 一端变尖形成芽, 芽长大的同时, 另一端出现根; 在含有一定种类和浓度激素的培养基上, 球形原球茎不直接分化成苗, 而是在“初生”原球茎上产生多个“次生”小原球茎, 培养一段时间后由小原球茎发育成丛芽。

2.2 不同培养因子对卡德丽亚兰种子萌发的影响

2.2.1 基本培养基对卡德丽亚兰种子萌发的影响

本实验采用了 1/3MS、1/2 MS、MS、KC、RE、VW 6 种不同基本培养基。从表 1 可以看出, KC 和 RE 培养基无论从萌发时间和萌发率均好于 MS 和 VW 培养基, 其中 KC 培养基效果最好, 而全量 MS 培养基对卡德丽亚兰种子萌发不利, 这说明低离子浓度

表 2 不同激素组合对卡德丽亚兰种子萌发的影响

Table 2 Effect of different combination of hormones on the germination of *Cattleya* seeds

培养基号 No.	激素 Hormone (mg/L)				萌发时间 Time (d)	萌发率 Germination rate (%)	生长状况 Growth status
	BA	KT	NAA	2,4-D			
1	0	0	0	0	53	79	较快成苗 Faster seedling formation
2	1.0	0	0.1	0	46	76	较慢成苗 Slower seedling formation
3	0	1.0	0.1	0	46	75	较慢成苗 Slower seedling formation
4	1.0	—	—	1.0	50	30	不分化 No differentiation
5	—	—	1.0	—	55	52	较快成苗 Faster seedling formation

培养基利于卡德丽亚兰种子的萌发。

2.2.2 激素对种子萌发的影响 将种子播种于附加有不同种类和浓度激素的 KC 培养基中, 观察其萌发时间、萌发率及原球茎的发育情况, 结果见表 2。

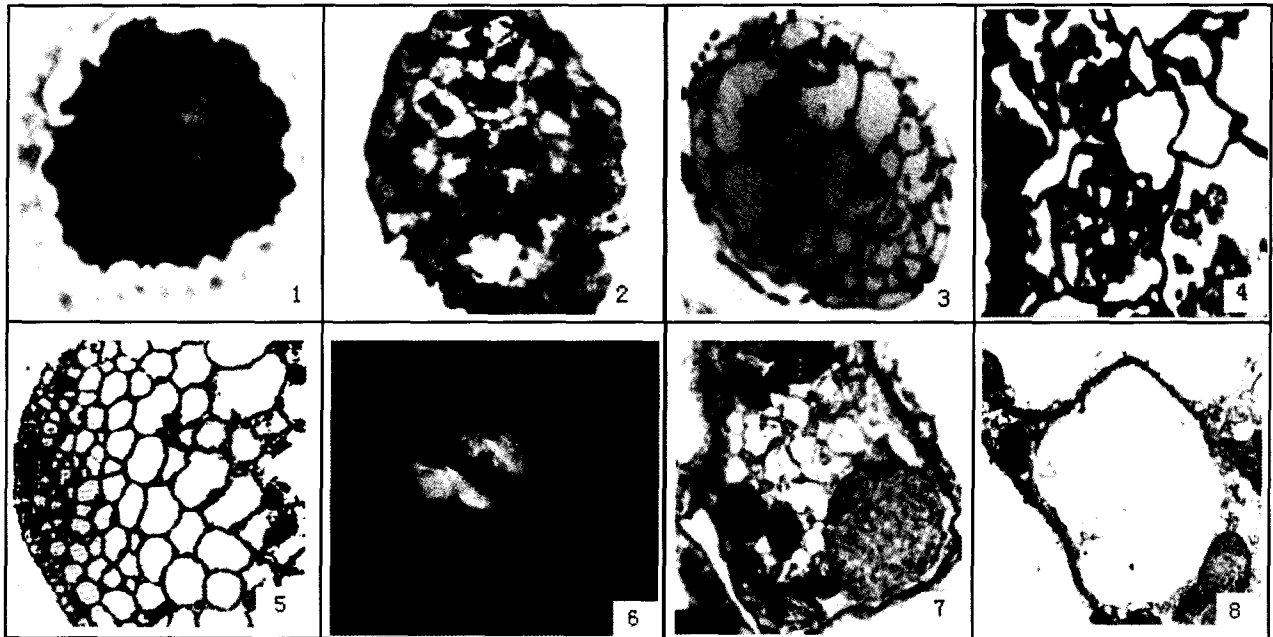
从表 2 看出, 培养基中激素的加入可促进种子提早萌发, 但对种子萌发没有显著的促进作用, 甚至, 在附加有生长素的培养基上种子萌发受到了较大程度的抑制(4 号、5 号培养基), 同时激素的加入对原球

茎进一步分化有较大影响。在对照组, 萌发种子形成的原球茎很快发育成苗; 附加有 NAA 的培养基上的种子原球茎同样成苗较快; 而在附加有 BA、KT、2,4-D 的培养基上的种子原球茎不断有小原球茎产生, 分化发育成苗较慢。尤其是 4 号培养基中的一个种子原球茎可产生多个“次生”原球茎, 较长时间停留于原球茎阶段, 随着培养时间延长, 才逐渐分化成苗。因此, 不同浓度和种类的激素对种子萌

发过程中原球茎增殖和分化起着调控作用。

2.3 实生苗培养及其移栽

将离体培养条件下萌发种子形成的原球茎或种苗转入实生苗增殖培养基(KC 附加 1.0 mg/L BA, 10%香蕉及 0.5%活性炭)中, 在该培养基中 3.0 cm 以下的实生种苗可保持 3 倍的增值率, 长于 3.0 cm 实生苗在该培养基中经 7 周培养可长至 7.0 cm, 经炼苗后可移栽入温室。



图版 I 1. 卡德丽亚兰种子胚; 2. 培养 1 d 后的种子胚细胞团; 3. 培养 6 d 后的种子胚细胞; 4. 示细胞内含物; 5. 示胚细胞团发育成原球茎; 6. 示原球茎成苗; 7. 示原球茎前端分生区细胞; 8. 原球茎后端薄壁细胞。

Plate I 1. Embryonic cells of a seed $\times 100$; 2. Embryonic cells of a seed 1 day after starting culture $\times 100$; 3. Embryonic cells of a seed 6 days after starting culture $\times 100$; 4. Inclusions of cells $\times 200$; 5. A protocorm developed from embryonic cells $\times 50$; 6. Shoots developed from protocorms $\times 3$; 7. A meristematic cell at the anterior part of the protocorm $\times 3000$; 8. A parenchyma cell at the basal part of the protocorm $\times 3000$.

2.4 原球茎发育的细胞学观察

观察表明, 卡德丽亚兰种子是由 20 多个细胞组成的椭圆形细胞团(图版 I : 1); 种子接种 1 d 后, 细胞团中各细胞小而皱缩, 胞质浓厚, 染色较深(图版 I : 2); 种子在培养基上培养 3 d 后, 原胚细胞的细胞质染色变浅, 逐渐清亮透明。随着培养时间延长, 近球形原胚细胞出现极性: 其中一端细胞开始加速分裂, 形成了细胞体积小、排列密集、细胞质浓厚, 核质比大, 具分生组织细胞特点的原胚前端生长点(图版 I : 3); 而原胚另一端的细胞分裂慢或基本不分裂, 这样形成了细胞体积逐渐增大, 液泡数量由多变少, 由小变大, 细胞薄壁化的原胚后端(图版 I : 3)。另外, 从培养 1~6 d 后的原胚细胞中可以观察到大量的深蓝色颗粒状内含物(图版 I : 4), 从以下三方

面的证据可推测所观察到的大量内含物颗粒极有可能是水解酶类的蛋白体: ①半薄切片中染料甲苯胺兰 O 的染色特点: 蛋白质及含蛋白质的混合物着蓝色或蓝紫色(张仲鸣等, 1997); ②兰科植物种子高度发育不全, 不具子叶和胚乳, 缺乏营养储备, 自然条件下需要与真菌共生方能实现萌发, 内含物可以排除是多糖、脂类等营养储备物质; ③兰科植物天麻种子与真菌共生萌发的相关研究(范黎等, 1998, 1999, 2002)已证实, 天麻种子原胚及其发育形成的原球茎细胞确实具有很高酸性磷酸酶活性, 用以降解与其共生的紫萁小菇和兰小菇的菌丝体, 作为其原球茎发育和种子萌发的营养物质。要证实这一点, 尚需进一步研究。

随着培养时间的延长, 原胚逐渐发育形成原球

茎(图版 I :5),接着原球茎开始进一步的分化,其极性表现更加明显,出现了与其它植物胚胎发育中极为相似的茎端分生区,并有叶原基类似结构出现。这是芽分化形成的起点,这种结构的出现导致了最终芽的出现(图版 I :6)与再生苗的产生。

随着原球茎形成及分化,细胞质中内含物颗粒数量逐渐变少或消失,而大量叶绿体形成(图版 I :7),原球茎后端细胞薄壁化明显,表现为细胞核小,液泡变为中央大液泡(图版 I :8)。大量叶绿体的出现,同时也标志着原球茎从异养向自养的转化。事实上,卡特丽亚兰种子非共生萌发过程中原球茎的发育模式与离体条件下由激素诱导器官组织产生的原球茎发育模式非常相似(丁兰等,2002)。

参考文献:

- 徐锦堂. 1993. 中国天麻栽培学[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社
- Ding L(丁兰),Fu TZ(付庭治). 2000. Progress of study on biotechnology of orchid(兰花生物工程进展)[J]. *J Northwest Normal Univ*(西北师范大学学报),**36**(3):111-116
- Ding L(丁兰),Liang GX(梁桂霞),Fu HL(傅华龙). 2001. Study on tissue culture and rapid propagation of *Cattleya in vitro*(卡特丽亚兰的组织培养与快速繁殖的研究)[J]. *J Sichuan Univ*(四川大学学报),**38**(1):106-110
- Ding L(丁兰),Lai JY(赖家业),Fu HL(傅华龙). 2002. Study on leaf culture *in vitro* and morphogenesis(白拉索蕾丽亚卡特丽亚兰叶片离体培养及形态发生的研究)[J]. *J Sichuan Univ*(四川大学学报),**39**(3):534-537
- Ding L(丁兰),Liu GA(刘国安),Fu HL(傅华龙). 2003. Study on growth and proliferation of shoots of *Cattleya in vitro*(卡特丽亚兰试管苗工厂化生产过程中幼苗增殖与生长特性的研究)[J]. *J Sichuan Univ*(四川大学学报),**40**(4):763-766
- Ding L(丁兰),Liu GA(刘国安),Yang H(杨红). 2003. *In vitro* conversion of *Cattleya* root tip into plantlets(卡特丽亚兰根尖离体培养获得再生植株)[J]. *J Sichuan Univ*(兰州大学学报),**39**(3):50-52
- Fan L(范黎),Guo SX(郭顺星),Xu JT(徐锦堂). 1999. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Gastrodia elata* associated with *Mycena orchidicola*(天麻种子与兰小菇共生萌发过程中超微结构变化研究)[J]. *Mycosystema*(菌物系统),**18**(4):431-435
- Fan L(范黎),Guo SX(郭顺星),Xu JT(徐锦堂). 2002. Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Gastrodia elata* (Orchidaceae) protocorms associated with *Mycena osmundicola*(天麻种子与紫萁小菇共生萌发过程中的超微结构变化研究)[J]. *J Capital Normal Univ*(首都师范大学学报),**23**(3):52-56
- Fan L(范黎),Guo SX(郭顺星),Xiao PG(肖培根). 1998. Localization of acid phosphatase in the symbiotic protocorms of *Gastrodia elata*/*Mycena orchidicola*(天麻/兰小菇共生萌发过程中的酸性磷酸酶定位)[J]. *J Shanxi Univ*(山西大学学报),**21**(3):257-262
- Gilles L,Denis B,Joachim V. 1997. Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule*(Orchidaceae)[J]. *Plant Systematics and Evolution*,**25**(1-2):53-72
- Hanako S,Yasanori K. 2004. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,**78**(3):273-276
- Kitsaki C K,Zygouraki S,Ziobora M,et al. 2004. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species(Orchidaceae)[J]. *Plant Cell Reports*,**23**(5):284-290
- Nishimura O. 1991. Comparative morphology of *Cattleya* and *Phalaenopsis*[J]. *Botanical Gazette*,**3**:534-537
- Wu CH(伍成厚),Ye XL(叶秀萍),Liang CY(梁承邺). 2005. *In vitro* seed germination in *Doritis pulcherrima*(五唇兰种子离体培养的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),**25**(2):149-151
- Zhang ZM(张仲鸣),Cui KM(崔克明),Fan YJ(樊拥军). 1997. Staining plant material section with toluidine blue O before removal of paraffin(甲苯胺蓝 O 对未脱蜡植物组织切片的染色)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报),**14**(2):58-60