

离体条件下卡德丽亚兰的形态建成

丁 兰, 李 娟, 杨 红, 祁林林

(西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070)

摘 要: 采用光学显微镜和电子显微镜技术对离体培养条件下卡德丽亚兰原球茎产生及形态建成进行了系统的细胞学观察。结果表明, 离体培养条件下卡德丽亚兰原球茎起源于母原球茎表皮、亚表皮或中央薄壁细胞, 这些细胞形成胚性细胞后, 通过不断的细胞分裂形成胚性细胞团, 胚性细胞团保持细胞分裂的同时伴随着胚性细胞的液泡化过程, 形成了由上百个薄壁细胞组成的原球茎; 原球茎通过芽端分生组织区形成, 进一步分化成芽, 其下方有输导组织形成。这一过程几乎重演了其合子胚发育及分化的过程。原球茎生长过程中其薄壁细胞通过叶绿体储存大量淀粉粒, 而在以后的形态建成中淀粉粒逐渐降解。

关键词: 卡德丽亚兰; 形态建成; 原球茎; 离体培养

中图分类号: Q944-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)03-0382-04

Morphogenesis of the protocorm of *Cattleya hybrid in vitro*

DING Lan, LI Juan, YANG Hong, QI Lin-Lin

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Formation and morphogenesis of the protocorms of *Cattleya hybrid* were investigated in cytology by light microscopy and electronic microscopy. The results indicated that the protocorms consist of numerous parenchymatous cells coming from proliferation of few embryonic cells originated from epidermal cell or subepidermal cell or parenchymatous cell of mother protocorms. While protocorm was cultured on differentiation medium, the meristematic dome was formed at its anterior end, which developed into a bud subsequently. The differentiation of the conducting tissue always occurred at the opposite end. The developmental mode of the protocorms *in vitro* is very similar to that of its zygotic embryo. A lot of starch grains were accumulated in the chloroplasts of parenchymatous cells when the protocorms grew up and the starch grains were decomposed during the process of morphogenesis.

Key words: *Cattleya*; morphogenesis; protocorm; culture *in vitro*

目前已有数十个科, 上百种植物在离体培养条件下能诱导脱分化, 并进行形态建成。但迄今为止, 离体培养条件下植物进行形态建成的机理仍未得到完全的阐明。兰科植物是较特殊的一类植物, 其合子胚的发育以及离体培养中器官的形态发生和形态建成都要经历原球茎这一特殊的发育阶段, 与其它科属植物相比为其独特性。原球茎被认为是一种具有明显形态学结构的休眠态茎, 可以把其看成是原胚进一步发育的延伸阶段(Gilles 等, 1997)。目前,

对原球茎发育的研究集中在兰科植物不同种属的种
子萌发过程(Nishimura 等, 1981; Gilles 等, 1997;
Hanako & Yasunori, 2004; Kitsaki 等, 2004; 伍成
厚等, 2005; 丁兰等, 2007), 但研究兰科植物不同外
植体脱分化过程中原球茎产生、原球茎发育及其形
态建成的过程的报道还很少(叶秀彝, 1995), 尤其是
亚显微水平上对原球茎发育的观察还未见报道。

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, 是名贵的切花和盆

收稿日期: 2008-03-21 修回日期: 2008-10-23

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项目(NWNU)[Supported by the Research Foundation of Education Committee of Gansu Province(991-21); Innovation Project of Northwest Normal University(NWNU)]

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.

花。有关卡德丽亚兰组织培养, 试管苗工业化生产技术和种子萌发过程中原球茎的发育, 本实验室已进行了系统研究和相关报道(丁兰等, 2001, 2002, 2003a, b, 2007)。本研究以卡德丽亚兰杂种幼叶为外植体, 在离体条件下成功获得原球茎, 在此基础上对离体条件下卡德丽亚兰原球茎的发生及发育进行了细胞学研究, 旨在探索原球茎发生发育的规律, 为卡德丽亚兰工厂化生产应用及揭示其形态建成的机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

卡德丽亚兰杂种 (*Cattleya* BLC Rampant Ridge "Sunday Wise Girl" × *Bryee* Cangon "Splendiferious"), 由兰州兰花研究开发公司提供。

1.2 方法

1.2.1 原球茎诱导和培养 取苗龄为 90 d 的卡德丽亚兰杂种第一片幼叶, 用清水冲洗, 用 70% 酒精擦洗 10 s, 放入 0.1% 升汞中灭菌 15 min, 用无菌水冲洗干净, 将幼叶切成 5.0 mm × 5.0 mm 的方块, 分别放入 KC 附加 6.0 mg/L BA 的培养基中培养, 待诱导出原球茎后, 将原球茎转入新鲜培养基中继续进行培养。随后将原球茎转入分化培养基中 (KC 附加 BA 2.0 mg/L)。培养温度 (25 ± 2) °C, 培养基 pH 5.5, 光照强度 21.6 μmol · m⁻² · s⁻¹, 光照时间 12 h/d。

1.2.2 光镜切片的制作及观察 每隔 3 d 取培养基上的原球茎用卡侬氏液固定 16 h, 爱氏苏木精染液整染 4 d, 用蒸馏水冲洗至无浮色, 氨水返兰, 常规石蜡脱水包埋, 切片厚度 0.5 μm, Olympus 显微镜下观察拍照。

1.2.3 超薄切片的制作及观察 每隔 3 d 取培养基中的原球茎切块, 在 4 °C 条件下用戊二醛固定 12 h, 磷酸缓冲溶液漂洗 3 次后用 1% 饿酸于室温下固定 2 h, 再用磷酸缓冲液漂洗, 经各级酒精脱水后用 Epon 812 树脂包埋, 在 37 °C、45 °C、60 °C 条件下聚合 72 h, ULTRACUTE 型超薄切片机切片, 厚度为 40~50 nm, 用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 在 JEM-100 SX 型透射电子显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 原球茎产生及发育的细胞学观察

当幼叶培养 7 周后, 幼叶外植体上有极小的球

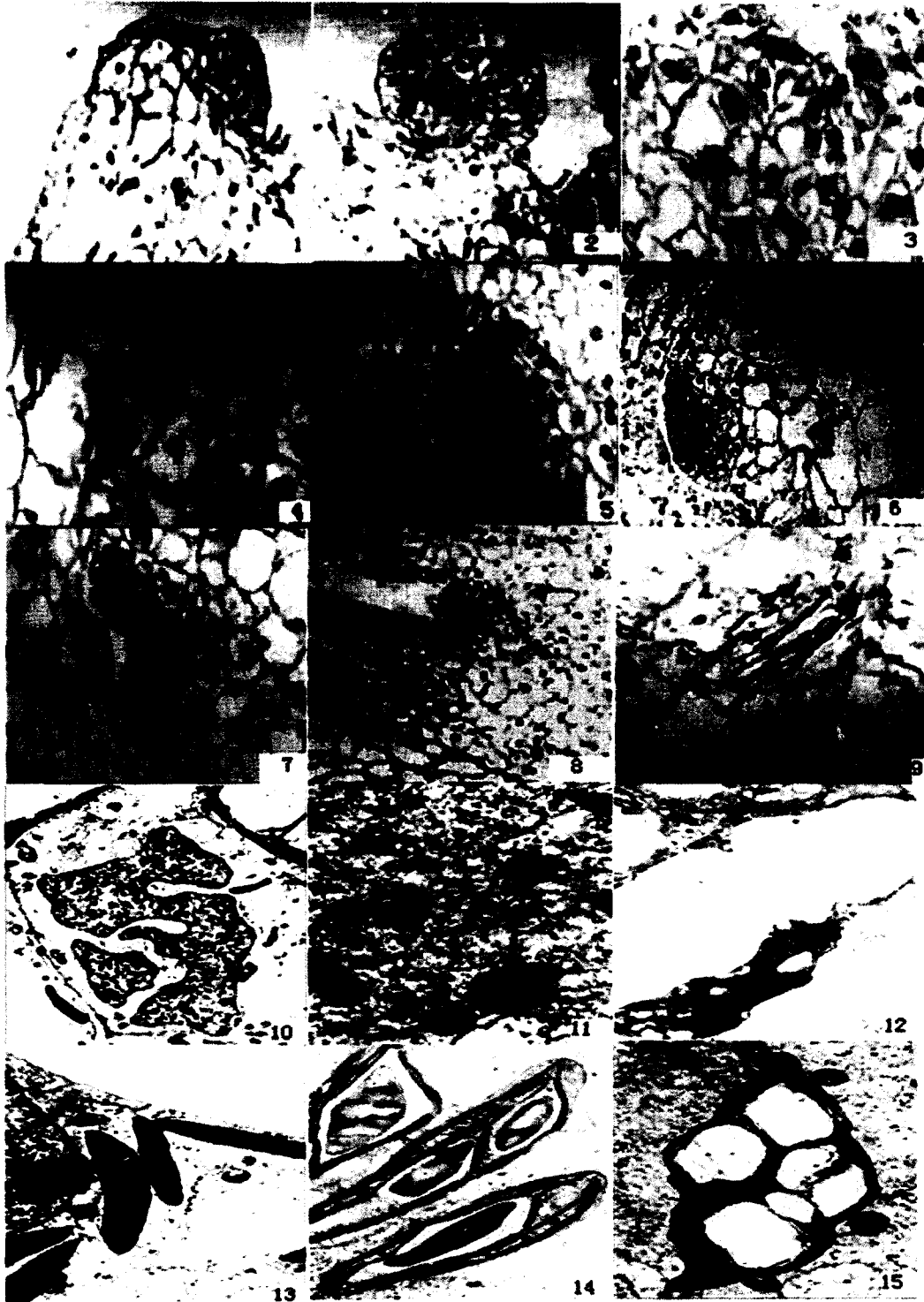
状突起产生, 继续培养后, 在外植体上形成大小不一的原球茎。原球茎转入分化培养基后, 首先原球茎的形状从近球形逐渐变长, 一端突出变尖。变尖的部分发育成芽体, 另一端有根原基突起, 进一步发育形成完整再生植株。多个原球茎可分化形成丛芽。

幼叶外植体诱导产生原球茎后, 将原球茎切离外植体, 转入新鲜培养基进行增殖培养。原球茎在新鲜培养基中培养 3 d 后即发现有的表皮细胞或表皮下几层细胞着色深, 细胞质浓厚, 核大, 共同组成胚性细胞团 (图版 I:1), 下层胚性细胞开始多向分裂的同时其表皮细胞进行垂周分裂, 随着胚性细胞团增大向外突起发育形成子原球茎 (图版 I:2); 另外在表皮下数层细胞处还发现体积小, 核大, 质浓的胚性细胞, 胚性化细胞的多个核仁清晰可见 (图版 I:3), 胚性细胞经多次分裂后形成胚性细胞团 (图版 I:4), 胚性细胞团逐渐增大, 向外突起又发育成极小的子原球茎 (图版 I:5)。随着细胞分裂, 原球茎长大, 原球茎内部细胞逐渐演变成薄壁细胞, 核质比变小, 形成中央大液泡。

原球茎转入分化培养基后, 其内部细胞经历了以下发育过程: 由几十个细胞组成的胚性细胞团产生极性, 一端细胞分裂加快, 细胞多而小, 而另一端的细胞分裂速度减慢或停止分裂, 细胞体积长大, 逐渐液泡化, 这样便形成了类似于顶端分生组织的生长锥 (图版 I:6)。锥顶细胞体积小, 排列紧密, 而远离的细胞依次变大, 随后生长锥的锥顶两边的细胞分裂加快, 出现“鸟巢”状结构, 产生叶原基 (图版 I:6; 图版 I:7), 接着发育形成芽体 (图版 I:8)。在芽体下方的纵轴向有的细胞分化形成输导组织 (图版 I:9), 并在输导组织下方薄壁细胞中出现几处旺盛分裂的细胞团, 推测可能是根的发生处。随后原球茎进一步发育便形成了再生植株。

2.2 原球茎发育过程中细胞亚显微结构的观察

电镜观察表明, 子原球茎在长大过程中仍有部分细胞保持分生能力或潜在分生能力, 其细胞核质比大, 具多个小液泡 (图版 I:10), 细胞质中内质网、线粒体、核糖体大量存在, 具有分生组织细胞典型的亚显微特征 (图版 I:11)。而原球茎的绝大部分细胞逐渐发育成细胞体积大, 具有中央大液泡的薄壁细胞 (图版 I:12), 在原球茎细胞薄壁化的过程中, 逐渐出现具有光合能力的叶绿体, 且叶绿体数量逐渐增多 (图版 I:13), 并且光合作用的产物以淀粉的形式贮存起来, 电镜下产粉质体逐渐增多, 并且质体中



图版 I 1. 来源于表皮或亚表皮细胞的胚性细胞团; 2. 胚性细胞团长大形成小原球茎; 3, 4. 起源于原球茎内部的胚性细胞和胚性细胞团; 5. 胚性细胞增殖形成胚性细胞团; 6. 示原球茎顶端分生组织区; 7. 示叶原基形成; 8. 芽的形成; 9. 示输导组织发生; 10. 原球茎中的胚性细胞; 11. 示胚性细胞中大量线粒体、内质网和核糖体; 12. 液泡化的薄壁细胞; 13. 原球茎细胞中大量叶绿体出现; 14. 叶绿体中淀粉粒形成; 15. 淀粉粒水解后的叶绿体。

Plate I 1. Embryonic cells originated from epidermal cell or subepidermal cell $\times 50$; 2. Development of embryonic cells into the protocorms $\times 50$; 3. 4. Embryonic cells originated from the inside of protocorms $\times 400$; 5. Showing proliferation of the embryonic cells $\times 50$; 6. Showing a meristematic dome at the anterior pole $\times 50$; 7. Showing formation of the leaf primordium $\times 200$; 8. Showing formation of the bud $\times 50$; 9. Showing the genesis of conducting tissue $\times 200$; 10. Embryonic cell in the protocorms $\times 3\ 000$; 11. Numerous mitochondrions, endoplasmic reticulums and ribosomes in the embryonic cell $\times 8\ 000$; 12. Vacuolized parenchyma cell $\times 3\ 000$; 13. Showing chloroplasts $\times 10\ 000$; 14. Starch grains in chloroplasts $\times 10\ 000$; 15. Showing chloroplasts in which starch grains is hydrolyzed $\times 10\ 000$.

的淀粉粒逐渐增大(图版 I:14)。在原球茎分化、发育形成芽的过程中,质体中的淀粉粒变小或消失,在质体内膜留下大的空洞(图版 I:15)。

3 讨论

卡德丽亚兰与其他兰科植物一样,其种子胚发育不完全,仅仅是由几十个细胞组成的胚性细胞团(原胚)组成,原胚基本无分化。在种子萌发过程中,原胚通过细胞不断分裂形成原球茎,随着原球茎发育长大,逐渐分化形成分生组织区和薄壁细胞区,分生区形成芽体,其相对的一端形成根,最终产生小植株,从而完成原胚的发育和分化(丁兰等,2007)。本研究表明,离体培养条件下,通过卡德丽亚兰幼叶外植体诱导原球茎进行形态建成的过程与其种子胚形成及发育极为相似,均要经过原球茎阶段,并通过与种子原胚几乎相同的原球茎发育和分化的历程后形成再生植株。离体条件下原球茎发生和发育的过程几乎重演了种子胚的演化过程:原球茎离体培养过程中,在一定浓度激素(BA)作用下,首先在一些部位形成着色深,细胞质浓厚,核质比大,代谢旺盛的胚性细胞或胚性细胞团(相当于种子原胚细胞团),胚性细胞开始多向分裂的同时表皮细胞进行垂周分裂,随着胚性细胞团增大向外突起发育形成原球茎;原球茎的一端的细胞分裂加快,形成了类似于顶端分生组织的生长锥,随后生长锥的锥顶两边的细胞分裂加快,出现“鸟巢”状结构,产生叶原基,最后发育形成芽体;原球茎另一端的细胞分裂速度减慢或停止分裂,细胞体积长大,形成中央大液泡,成为薄壁细胞,当原球茎发育到一定阶段,在芽体下方纵轴向产生输导组织,并在其下侧出现根原基。卡德丽亚兰原球茎的形态发生的起源是多元化的,可起源于原球茎表皮细胞,亚表皮细胞和原球茎内部。

兰科植物在长期进化过程中选择了种子原胚经过原球茎这一途径来继续其未分化胚的进一步发育,说明原球茎这种结构对于兰科植物原胚发育和分化具有其优越性和特殊的意义。尽管原球茎在形态发生中的具体作用尚不清楚,但我们观察到原球茎细胞中质体数量的变化以及质体中淀粉粒的储藏和降解的特点:随着原球茎的长大,以及细胞薄壁化过程,原球茎细胞中叶绿体数量增多,储存的淀粉粒数量增多,颗粒度增大;在以后的原球茎分化过程中,淀粉粒逐渐消失,分化后期淀粉粒被完全降解,在叶绿体中

形成较大的“空洞”状结构。这至少说明原球茎薄壁细胞在发育过程中具有营养储存与供应的功能。至于原球茎的其它作用尚需进一步的研究。

卡德丽亚兰组织培养过程中其形态发生与激素种类和浓度密切相关,激素控制着原球茎的发生及其发育的方向。本文供试材料卡德丽亚兰杂种幼叶产生原球茎需高浓度的细胞分裂素($BA > 6.0 \text{ mg/L}$),在该浓度条件下产生的原球茎可维持原球茎的生长而不分化,当原球茎转入含有较低浓度细胞分裂素的培养基中时,原球茎分化形成具芽和根的再生植株。

参考文献:

- 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(白拉索雷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). 2003a. 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). 2003b. *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 Lanzhou Univ*(兰州大学学报), **39**(3):50-52
- Ding L(丁兰), Wang L(王丽), Li H(李淮), et al. 2007. Study on asymbiotic germination of *Cattleya* hybrid seed and development of protocorms during germinating(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)[J]. *Guihaia*(广西植物), **27**(6):909-912
- 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, Yasunori K. 2004. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* 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(叶秀彝), 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
- Ye XL(叶秀彝). 1995. Histocytological study of *Dendrobium* hybrid propagation *in vitro*(石斛兰组织培养和细胞学观察)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **22**(1):83-87