

四种石斛兰种胚发育进程研究

李振坚¹, 于耀², 王雁¹, 彭镇华¹, 缪崑¹, 亢秀萍²

(1. 中国林业科学研究院 林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室,
北京 100091; 2. 山西农业大学 园艺学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 以玫瑰石斛、尖刀唇石斛、短棒石斛、兜唇石斛种子为材料, 进行种胚非共生萌发研究, 并对其种子形态和胚的发育进程进行了显微观察。结果表明: 处于球形胚阶段的石斛兰种子, 种胚吸胀后突破种皮, 发育至吸收毛和芽生长点出现后, 种胚形成原球体; 种子萌芽后胚尚未成熟, 只进入心形胚阶段。呈纺锤形种子的种皮两端形状不同, 一端存在结节, 呈弯曲状的尖形, 另一端种皮呈收拢的圆口形。4种石斛兰种子, 玫瑰石斛种子最长, 为两端狭长的纺锤形; 兜唇石斛种子最短, 呈两端稍细的纺锤形。玫瑰石斛、短棒石斛、尖刀唇石斛种子胚培养需要5~10 d萌发; 兜唇石斛种子和胚皆偏小, 萌发需要30 d。石斛兰种胚和种皮吸水膨胀后, 种胚向种皮的一端移动、脱出或种胚撕裂种皮中央后突破而出, 形成裸胚。玫瑰石斛种子撕裂种皮后主要从种皮中央突破; 短棒石斛、尖刀唇石斛、兜唇石斛部分种胚从种皮一端脱出, 部分种胚则从中央撑破种皮脱出。充分膨胀、变绿后萌芽的裸胚, 存在极性, 顶部芽生长点萌动, 下部出现成群散射线状吸收毛。

关键词: 石斛兰; 胚培养; 球形胚; 原球体; 吸收毛

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)03-0333-06

Seed embryo growth courses of four species of *Dendrobium* orchid

LI Zhen-Jian¹, YU Yao², WANG Yan¹, PENG Zhen-Hua¹,
MIAO Kun¹, KANG Xiu-Ping²

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. College of Horticulture, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, China)

Abstract: Morphological and anatomical microexamination of the embryo development of the seeds of *Dendrobium crepidatum*, *Den. heterocarpum*, *Den. caillipes* and *Den. aphyllum* were studied. The results showed that the embryo consisted of relatively undifferentiated cells at globular stage. Protocorms were formed after embryo swelling breaking through the seed coat, forming absorbing hairs and initiating shoot apex from the surface. After the seeds germinated, the embryos remained immature and stayed at heart-shaped embryo stage. The two ends of the spindly seed were different, one was oblique and subacute, the other was oval. The seed volume and germination time were different in species, and the spindly seed of *Den. crepidatum* was the longest with sharper points, and the seed mainly broke through the seed coat from the midst of the seed coat. *Den. aphyllum* seed was the shortest in length with two dullish spindly ends, and the seed germination needed the least 30 d which was much longer than the 5-10 d of other 3 species. In general, after full water absorption, the seed showed swelled, and the embryo seemed to come out from one end or broke through the midst of the seed coat surface, being a naked embryo. The bud growing point sprouted from the upper of the bare embryo, and many absorbing hairs grew out at the base after swelling, turning green and

收稿日期: 2009-03-29 修回日期: 2009-06-05

基金项目: 中央级公益性科研院所专项(2060302); 国家林业局“948”项目(2006-4-C07)[Supported by the Special Fund for Basic Scientific Research of Central Public-interest Scientific Institution(2060302); “948”Item of State Forestry Administration of China(2006-4-C07)]

作者简介: 李振坚(1974-), 男, 山西祁县人, 博士, 副研究员, 从事兰花种质创新与遗传改良研究, (E-mail) zhenjianli@163.com.

germinating, and protocorm formed at last.

Key words: *Dendrobium orchid*; embryo culture; the globular embryo; protocorm; the absorbing hairs

石斛属 (*Dendrobium*) 植物种类繁多, 为兰科 (Orchidaceae) 第二大属, 本属植物在全球共计有 1 200 多种。在中国云南、广西、海南等省区, 石斛兰野生种质资源丰富 (陈心启等, 1998), 观赏价值高。目前已发现的石斛兰种及变种已达 81 种 (王雁等, 2007)。在我国兰科植物中野生原种数仅次于石豆兰 (*Bulbophyllum*)。兰科植物种子结构简单, 自然界唯有与真菌共生才能萌发, 发芽率极低, 幼苗生长缓慢。石斛属植物每个果实含有数万至数十万粒种子, 种子细如粉尘, 呈纺锤形, 每粒重约 0.3~0.5 μg 。种子胚呈细小的圆形或椭圆形, 为原胚阶段, 分化不明显, 无胚乳, 由几十个细胞组成。种子胚内含有很少的糖和淀粉类养分, 绝大部分为脂质和蛋白质内含物。种子成熟时, 种皮细胞质、细胞器消失, 为失去生命力的死细胞, 只有一层透明的薄壁细胞, 有加厚的环纹。

目前对兰科胚培养的组培条件研究较多, 但对石斛兰甚至兰科植物胚学的研究较少, 兰花种子萌发的解剖学研究仅局限于墨兰 (*Cymbidium sinense*)、蕙兰 (*C. faberi*)、卡特兰 (*Cattleya*)、虾脊兰 (*C. discolor*) 等 (王卞琼等, 2006; 李枝林等, 1995; 陈进勇等, 1998; 丁兰等, 2007); 也有关于蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 种子胚萌发的报道 (章玉平等, 2004; 郭顺星等, 1990); 对石斛属植物胚培养已有一些研究 (李晖, 1990; 张启香, 2005; 曾宋君, 1998; 陈庭, 2005; Men, 2003; 唐桂香, 2005), 但缺乏胚发育解剖学机理的研究, 也尚无胚在显微及亚显微水平的相关报道。本文通过对 4 种石斛兰种子结构、种胚萌发进程进行显微观察, 从胚学水平探讨石斛兰的萌发机理及发育特性, 为石斛兰非共生萌发机制及应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试材料: 玫瑰石斛 (*Dendrobium crepidatum*)、尖刀唇石斛 (*Den. heterocarpum*)、短棒石斛 (*Den. caillipes*)、兜唇石斛 (*Den. aphyllum*) 植株为野生原种, 采自云南, 在中国林业科学研究院玻璃连栋温室栽培 1 年以上, 于 2008 年春季进行自交, 用

同年秋季成熟的蒴果进行试验。

1.2 方法

1.2.1 显微观察 种子胚培养后, 在培养过程中, 对播种后的种子以后每隔 2 d 取样一次, 用扫描电镜对种胚动态发育进行观察。所取样用载玻片压片后在 Olympus BX51 正置荧光生物显微镜上进行显微观察, 所有图的放大倍数皆为 10×20 。

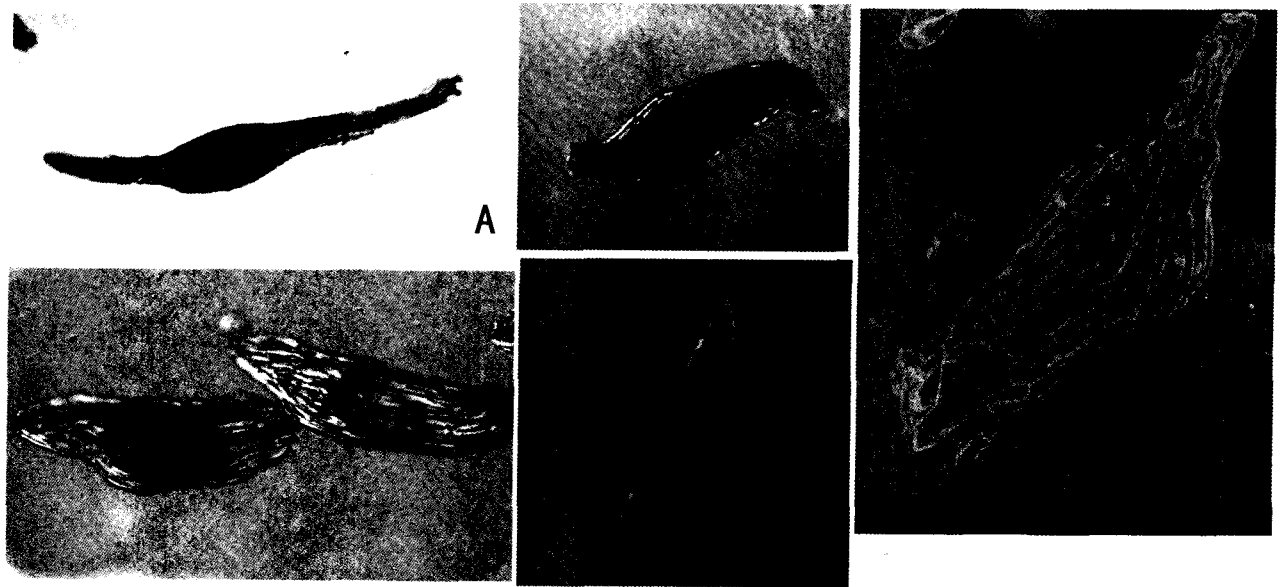
1.2.2 扫描电镜观察 种子胚培养后, 分别取萌发中的种胚, 迅速固定于 3% 戊二醛中, 间歇振荡固定 24 h 后, 用 0.1 mol/L pH7.2 的 PBS 缓冲液冲洗, 再使用 1% 锇酸溶液固定 1~2 h, 经重蒸水冲洗 30 min, 期间要注意换液 3~4 次。冲洗好的材料分别用 30%、50%、70%、80%、90%、100% 的乙醇梯度脱水, 每级 15~20 min, 最后用 100% 乙醇重复 2~3 次, 保证材料绝对无水。材料脱水后, 放入醋酸异戊酯中置换 30 min 或过夜。置换好的材料经过临界点干燥后, 要尽快用双面胶带粘于样品台上, 立即镀金处理, 避免从空气中吸水。喷涂完成后将材料置于日立 S-570 扫描电镜下观察、照相。

2 结果与分析

2.1 种子形态特征

供试石斛兰的种子均为黄褐色, 呈两端稍尖的纺锤形, 中间有一细小椭圆状的胚 (图版 I)。胚外层种皮为一层长形薄壁细胞, 细胞透明, 无内容物, 细胞壁呈纵横交错的加厚环纹。显微结构观察发现, 纺锤形状的种皮两端不同, 一端粘连较细尖, 呈弯勾状, 另一端则为松散的聚拢状, 钝圆 (图版 I: E), 种皮较为松散的这种结构有利于种胚的脱出和萌发。

4 种石斛属植物种子, 从大到小依次为玫瑰石斛、短棒石斛、尖刀唇石斛、兜唇石斛; 种胚由大到小依次为短棒石斛、尖刀唇石斛、玫瑰石斛、兜唇石斛, 短棒石斛与尖刀唇石斛种胚大小一致 (表 1)。4 种石斛兰种子宽度基本一致, 约 100 μm , 种胚宽度差异也较小, 种胚长度差异大。玫瑰石斛种子最长, 为两端狭长的纺锤形, 种皮和胚偏小 (图版 I: A); 兜唇石斛种子最短, 呈两端稍细的纺锤形 (图版 I: D)。尖刀唇石斛种子较短, 约 300 μm , 种胚长 150 μm , 种胚和种子长度比为 50% (图版 I: B)。兜唇



图版 I 四种石斛属植物种子显微结构(10×20) A. 玫瑰石斛;
B. 尖刀唇石斛; C. 短棒石斛; D. 兜唇石斛; E. 石斛兰种皮显微观察。

Plate I Seed microstructure of four species of *Dendrobium orchid* A. *Den. crepidatum*; B. *Den. heterocarpum*;
C. *Den. caillipe*; D. *Den. aphyllum*; E. Seed coat of *Dendrobium orchid* microexamination

表 1 石斛兰种子与种胚的形态指标

Table 1 Seed and embryo shape indexes in *Dendrobium orchid*

种类 Species	种子 Seed			种胚 Embryo		种胚长/种子长 Length ratio of embryo to seed (%)
	长(μm) Length	宽(μm) Width	长宽比 Length/width	长(μm) Length	宽(μm) Width	
玫瑰石斛 <i>Den. crepidatum</i>	400±100	100	4.00	150	80	37.50
短棒石斛 <i>Den. caillipe</i>	325±25	100	3.25	150	90±10	46.15
尖刀唇石斛 <i>Den. heterocarpum</i>	300	100	3.00	150	90±10	50.00
兜唇石斛 <i>Den. aphyllum</i>	250±50	90±10	2.78	100	80	40.00

石斛种皮和胚皆偏小,种子长 200~300 μm,种胚长约 100 μm。

2.2 种胚吸胀与萌发进程

石斛兰种子在培养基上易萌发,接种到培养基后开始吸水膨胀,种胚和种皮不断胀大,颜色由黄褐色变为淡黄色(图版II:1A,3A)。2~3 d 时种子就已明显膨胀,5 d 时玫瑰石斛有种胚突出种皮形成裸胚,7~10 d 时玫瑰石斛、尖刀唇石斛、兜唇石斛种胚大量萌发形成裸胚(图版II)。兜唇石斛发育则明显滞后,直到 30 d 时,种胚才脱出种皮,萌发出来。

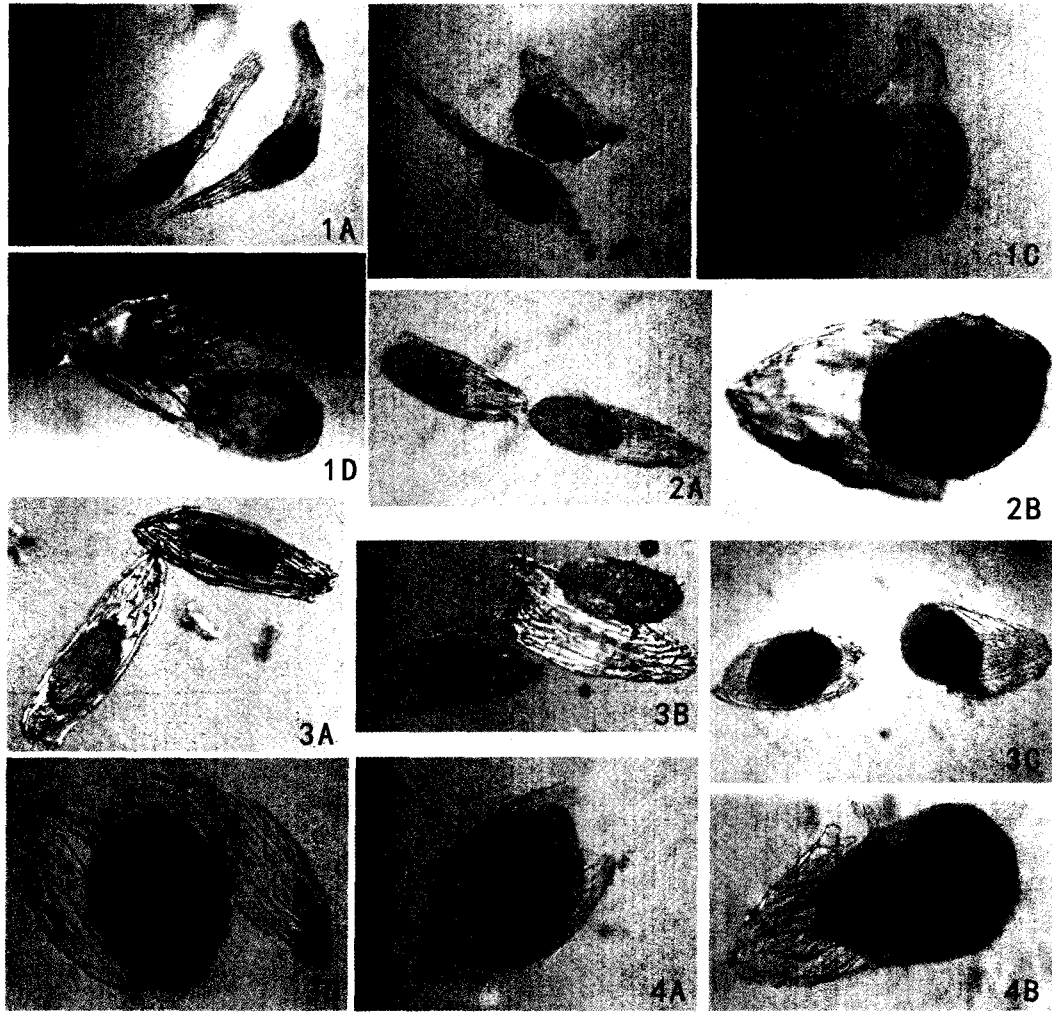
胚培养试验发现种胚萌发比较容易。种胚萌发后经过 5~7 d 膨胀,由长椭圆形转变为圆形。伴随种胚膨胀,种皮也有一定程度扩张,呈纺锤形或瓜芽形。在种胚膨胀发育中,胚细胞有叶绿体形成,胚本体颜色先变成黄色、淡绿色,后细胞团转变为绿色

(图版II:1A-1C)。部分种胚吸水后迅速膨胀,在未分化变绿前就突破种皮,形成裸胚后变绿(图版II:3B);部分种胚在种皮内形成叶绿体,然后才突破种皮(图版II:3D)。种胚发育进程还观察到,在种皮内就分化变绿的种胚,其分化速率比种皮内未变绿的种胚快,应与叶绿体光合作用有关。

胚培养首先是种皮和胚开始吸水膨胀,后随着种子和胚相对大小不同,出现种皮撕裂或向种皮的一端移动,最后脱出种皮外,形成裸胚。石斛兰种皮由一层细胞构成,在种胚膨胀的压力和种皮张力作用下,整个种皮形成圆锥形或瓜芽形,一端张开呈喇叭口状。种胚和种皮在培养基中膨胀,种胚膨胀下种皮弹性大则种皮一端打开种胚脱出,否则种胚撑破种皮。部分种胚突破种皮时,从种皮的中央撑破种皮脱出,种皮中间撕裂一道缝,或整个种皮被撑成碎片状。

种胚脱出方式与种子、种胚相对大小、形状有关。玫瑰石斛种子为狭纺锤形,主要为撕裂种皮后从种皮中间突破(图版 II:1B)。种胚相对小,在种皮中有移动的空间,种皮一端张开从种皮中脱出。

短棒石斛部分种胚从种皮一端脱出,部分种胚则撑破种皮脱出(图版 II:3B,3C)。在尖刀唇石斛和兜唇石斛中也能同时观察到类似现象(图版 II:2A,2B)。



图版 II 4种石斛属植物种子吸胀、变绿、萌发的过程(10×20) 1A. 玫瑰石斛种子吸胀(2 d); 1B. 玫瑰石斛呈淡绿色种胚突破种皮(5 d); 1C. 玫瑰石斛绿色胚撑破种皮从中央脱出(8 d); 1D. 玫瑰石斛撕裂种皮形成裸胚(10 d); 2A. 尖刀唇石斛淡绿色种胚从种皮一端脱出(7 d); 2B. 尖刀唇石斛脱出时种皮部分裂开(10 d); 3A. 短棒石斛种子吸胀后种皮和胚膨胀(3 d); 3B. 短棒石斛种胚从种皮中间撑破种皮突破时尚未变绿(8 d); 3C. 短棒石斛变绿后种胚从种皮一端脱出(10 d); 3D. 短棒石斛种皮撕裂状(15 d); 4A. 兜唇石斛种胚膨大,种皮一端撑开(30 d); 4B. 兜唇石斛胚脱出(30 d)。

Plate II The seeds of four species of *Dendrobium* orchid 1A. Swelled *Den. crepidatum* seed(2 d); 1B. Light green embryo breaking through seed coat in *Den. crepidatum*(5 d); 1C. Green embryo breaking through seed coat in *Den. crepidatum*(8 d); 1D. Embryo breaking through seed coat, being a bare embryo in *Den. crepidatum*(10 d); 2A. Light green embryo breaking through seed coat from one end in *Den. heterocarpum*(7 d); 2B. breaking though midst of seed coat in *Den. heterocarpum*(10 d); 3A. Swelled seed and embryo(3 d) in *Den. caillipe*; 3B. Embryo breaking through midst of seed coat, then turning green in *Den. caillipe*(8 d); 3C. Embryo turning green, then breaking through seed coat(10 d) in *Den. caillipe*; 3D. Bare embryo and seed coat(15 d) in *D. caillipe*; 4A. Embryo swelling and breaking through seed coat from one end(30 d) in *Den. aphyllum*; 4B. Embryo breaking through seed coat(30 d) in *D. aphyllum*.

2.3 原球体形成过程

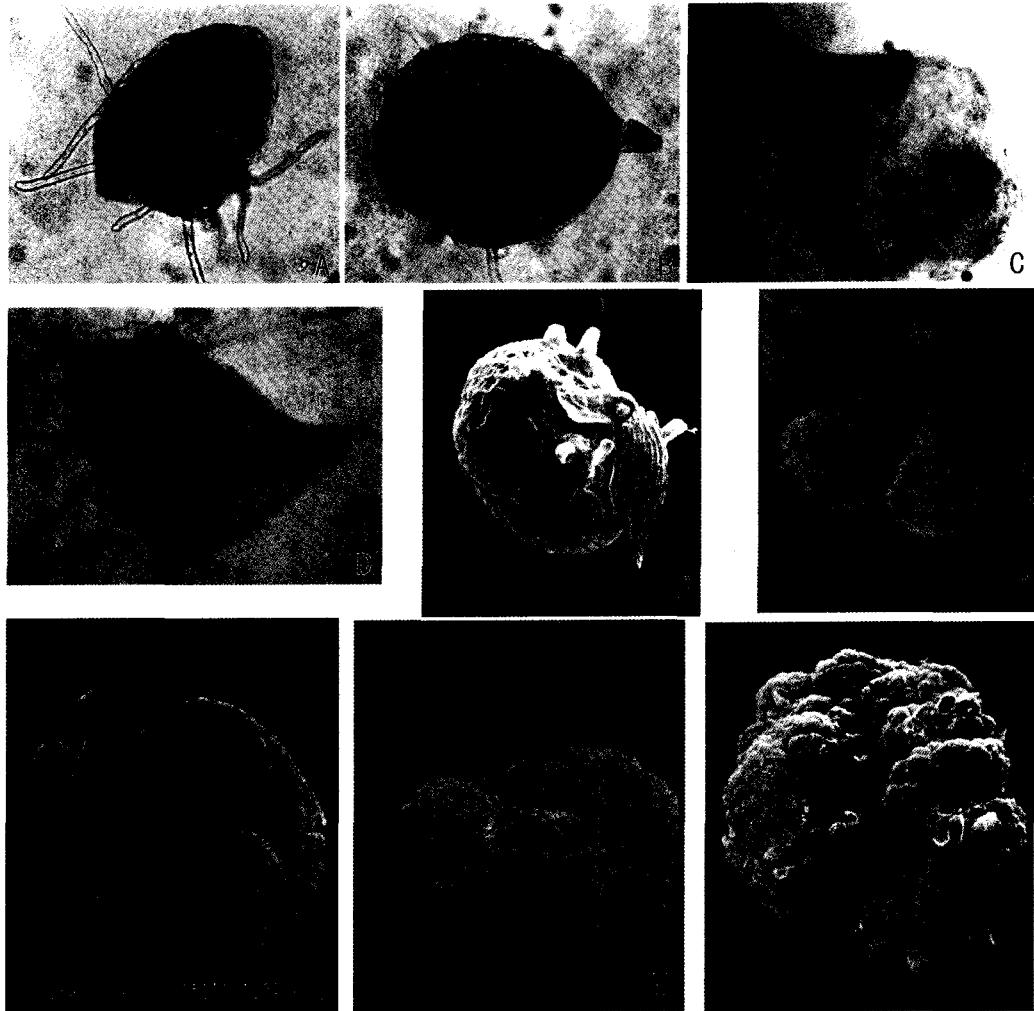
种胚在突破种皮形成裸胚后不断生长分化,种胚两端出现极性,顶端细胞不断分裂突起生成芽生长点,后半部自胚内出现群体散射状吸收毛(图版

III)。芽生长点一端颜色深绿,细胞较密,吸收毛一端色浅或有褐色,细胞较稀。吸收毛附近的细胞分裂速度慢,顶端细胞急剧分裂,细胞密度大,颜色深。分化吸收毛的一端首先脱出种皮,常造成吸收毛一

端粘连撕裂的种皮(图版Ⅲ：E)。种胚未突破种皮前膨胀过程中，种胚顺着吸收毛的方向向种皮一端移动，突破种皮时吸收毛端先突破，芽生长点端顺势

脱出(图版Ⅲ：A)。

尖刀唇石斛在胚培养 45 d 时，整个胚体下部出现群体散射状吸收毛，此时胚略呈椭圆形，芽生长点



图版Ⅲ 扫描电镜下种胚的萌发 A. 尖刀唇石斛胚下部长出吸收毛(45 d); B. 短棒石斛原球体两端分化出的芽生长点和吸收毛(47 d); C. 玫瑰石斛深绿色的芽生长点; D. 兜唇石斛原球体(50 d); E. 带残留种皮尖刀唇石斛种胚萌发出吸收毛; F. 短棒石斛吸收毛伸出胚外; G. 兜唇石斛脱掉种皮并有芽生长点出现; H. 短棒石斛芽生长点; I. 玫瑰石斛种胚分裂形成愈伤组织。

Plate III Seed embryo germination observed under scanning electron microscope A. Embryo growing absorbing hairs at one end(45 d) in *Den. heterocarpum*; B. Protocorm being shoot apex and absorbing hairs at two ends in *Den. caillipes*(47 d); C. Deep green shoot apex in *D. crepidatum*; D. Protocorm in *Den. aphyllum*(50 d); E. Embryo developing absorbing hairs with residual seed coat in *Den. heterocarpum*; F. Absorbing hairs growing outside of embryo in *Den. caillipes*; G. Shoot apex breaking through seed coat and coming out in *Den. aphyllum*; H. Shoot apex in *Den. caillipes*; I. Embryo turning to callus in *Den. crepidatum*.

尚未明显分裂形成(图版Ⅲ：A)。短棒石斛则在 47 d 时出现了吸收毛和明显突出的芽体(图版Ⅲ：B)。在胚的分化和发育中，形状、颜色相应变化，玫瑰石斛胚发育形成的原球体，芽生长点明显分裂、伸长(图版Ⅲ：C)，整个芽体转为深绿，吸收毛一端颜色变浅，整个胚发育进入心形胚阶段，原胚发育成原球体此时尚无明显的胚芽、胚根形成，未进入鱼雷胚阶段形成成熟的胚。进入心形胚阶段后，出现了吸收

毛和芽生长点，原胚发育成了原球体。兜唇石斛的心形胚向芽生长点一端延伸成尖状，另一端着生若干吸收毛(图版Ⅲ：D)。在芽顶尖处呈现出深绿色，分裂分化最旺盛。种皮已被撑裂呈碎片状，同时吸收毛自胚伸长突出。试验对心形胚进行扫描电镜显微观察，发现吸收毛是从胚内部细胞向外发育而成，并非胚表皮细胞分裂形成(图版Ⅲ：F)；芽体的发育则是表皮细胞不断分裂和伸长形成，圆形的原球体

经过不断分裂伸长形成心形、长锥形(图版Ⅲ:G, H)。吸收毛附近的细胞分裂速度慢,色浅,细胞较稀。芽生长点处的顶端细胞分裂最旺盛,细胞密度大,呈现出深绿色。试验发现,玫瑰石斛部分胚发育形成吸收毛和芽生长点,后分化形成横幼嫩植株;部分直接分化形成幼嫩植株,部分脱分化成细胞增生状,形成愈伤组织(图版Ⅲ:I),后由愈伤组织再分化形成根茎。

3 结论与讨论

兰科植物的胚培养,具有遗传保守性,在兰花的栽培和育种中有特殊的地位,兰花野生原种的种性保持和延续主要依靠种内自交后的播种繁殖。在荷兰的播种繁殖中,其致密坚硬的种皮制约着种子的萌发。而石斛兰等洋兰的种皮薄而疏松,种胚容易吸水膨胀突破种皮,种子容易萌发。本文的种子结构和胚培养试验也证明了种子播种后胚膨胀、变绿、萌发比较快。

种子接种到培养基 2~3 d 后吸水膨胀,经过 5~7 d,种胚由长椭圆形转变为近圆形,开始突出种皮,7~10 d 时,种胚大量萌发形成裸胚。石斛在胚培养 45~47 d 时,裸胚顶端细胞不断分裂突起生成芽生长点,下半部自胚内出现群体散射状吸收毛。石斛兰种子成熟后胚处于球形原胚阶段,无胚根、胚芽、胚轴的分化。在种子萌发后,吸收毛从胚里面分裂突出,另一端出现成群散射状吸收毛。胚的顶端细胞分裂分化形成芽生长点,进入心形胚阶段。在成熟种子胚培养过程中,球形胚经过种胚吸胀,突破种皮萌芽,原球体形成,发育至心形胚。

芽生长点处的顶端细胞急剧分裂,细胞密度大,颜色深,吸收毛附近的细胞分裂速度慢。试验发现,兜唇石斛的种子在 4 种石斛兰中最小,其胚萌发晚于其它 3 种,其发育滞后是否由于胚体积小或与种胚成熟度相关,还需继续研究。同时试验发现种皮的变绿和脱出并无固定模式或顺序,而与种子的结构和吸胀程度有关。膨胀后的种胚有极性存在,胚的两端也存在差异,胚从种皮固定一端脱出,分化吸收毛部位先脱出,芽生长点在后。但极性出现时间是在种子胚膨胀时或是萌发后,尚需验证。

参考文献:

- 陈心启,吉占和. 1998. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社,153-171
- 王雁,李振坚,彭红明. 2007. 石斛兰资源生产应用[M]. 北京:中国林业出版社,33-35
- Chen JY(陈进勇),Cheng JS(程金水),Zhu Y(朱莹). 1998. The morphogenesis of chinese orchid under *in vitro* seed germination (几种中国兰种子试管培养根状茎发生的研究)[J]. *J Beijing Fore Univ*(北京林业大学学报),20(1):32-35
- Chen T(陈庭),Ye QS(叶庆生),Liu W(刘伟). 2005. The orthogonal test of induction and proliferation of *Dendrobium nobile* protocorm-like bodies (PLBs) (金钗石斛类原球茎诱导及增殖的正交试验)[J]. *J South China Agric Univ*(华南农业大学学报),26(3):60-63
- 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
- Guo SX(郭顺星),Xu JT(徐锦堂). 1990. Study on seeds vitro germination of orchid(兰科植物种子无菌萌发的研究)[J]. *Seed*(种子),19(5):36-38
- Tang GX(唐桂香),Wang FD(黄福灯),Zhou WJ(周伟军),*et al.* 2005. Studies on the seed embryo germination and propagation of *Dendrobium candidum in vitro*(铁皮石斛的种胚萌发及其离体繁殖研究)[J]. *J Chin Mat Med*(中国中药杂志),30(20):1 583-1 586
- Lee N(李晖). 1990. Embryo culture of orchids(兰之胚培养)[J]. *J Chin Soc Hor Sci*(中国园艺),36(4):223-244
- Men SZ, Ming X, Wang Y, *et al.* 2003. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment[J]. *Plant Cell Rep*,21:592-598
- Wang BQ(王卞琼),Li ZL(李枝林),Liu GM(刘国民),*et al.* 2006. Study on seeds aseptic culture and embryo growth routes of several orchid(几种兰花种子无菌萌发及胚发育过程的几种途径)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),28(4):399-402
- Xu RM(徐汝民),Ye QS(叶庆生),Wang XJ(王小菁). 1995. Study on embryo development and culture of *Cymbidium sinense*(墨兰种子胚的发育和培养初步研究)[J]. *J Trop Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报),3(4):72-75
- Zeng SJ(曾宋君),Cheng SJ(程式君),Zhang JL(张京丽),*et al.* 1998. Embryo culture and propagation of *Dendrobium in vitro*(五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报),25(1):75-80
- Zhang QX(张启香),Fang YM(方炎明). 2005. Tissue culture and *in vitro* seedling and protocorm-like body examination of *Dendrobium candidum*(铁皮石斛组织培养及试管苗营养器官和原球茎的结构观察)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),25(9):1 761-1 765
- Zhang YP(章玉平),Liu CY(刘成运),Hu HJ(胡鸿钧),*et al.* 2004. A study on asymbiotic germination of *Phalaenopsis*(蝴蝶兰无菌萌发技术的研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),22(1):82-86