

## 墨兰种子胚的发育和培养初步研究

陈汝民 叶庆生 王小菁 王晓明 郭周义

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

关键词 墨兰; 种子发育; 组织培养; 原球茎

兰属 (*Cymbidium*) 植物的种子极小, 呈细条状<sup>[1]</sup>。其中墨兰 (*Cymbidium sinense*) 种子长约 1mm, 种径约 0.07mm (图版 I)。天然条件下几乎不能萌发生长, 因此墨兰主要通过分株繁殖, 增殖速度十分缓慢, 限制了优质墨兰资源的开发和利用。80 年代以来, 我国在中国兰快速繁殖方面陆续有了一些研究, 并在利用兰花种子萌发<sup>[2]</sup>和利用组织培养进行快速繁殖的研究<sup>[3,4]</sup>方面取得一些进展。现已在春兰 (*C. faberi*)、建兰 (*C. ensifolium*) 和洋兰等兰科植物中获得成功<sup>[5]</sup>。但目前对墨兰的研究尚少, 特别是对墨兰种子胚的发育和培养的研究至今尚未见详细的报道。本文以墨兰中的“企黑”和“野生兰”为材料, 探讨了墨兰种子的胚发育特点以及利用组织培养大规模生产优质墨兰的方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料的处理

供试材料为墨兰栽培种“企黑” (*C. sinense* (Andr.) Willd. cv Qi Hei)。采集其未开裂荚果消毒备用。

#### 1.2 墨兰种子培养

培养基①: 采用 1/2 MS + NAA 0.5mg L<sup>-1</sup> + 6-BA 0.1mg L<sup>-1</sup>, 并加入适量琼脂。

培养基②: 1/2 MS, 加入适量琼脂。

种子采集和培养 在无菌条件下取出墨兰荚果的种子并置于培养基①中培养。温度为 26 ± 2℃, 光照 2W/m<sup>2</sup>, 10h/d。

#### 1.3 原球茎和根状茎培养

种子在①号培养基中培养约 90d 后胚体开始发育, 形成原球茎后转移至②号培养基。30d 后原球茎逐步发育为根状茎。取各不同发育阶段的材料固定待观察。

#### 1.4 利用扫描电镜技术观察种子发育

分别取培养了 0、90、120 和 240d 的种子为材料。材料经固定、脱水、喷金后, 用 JEOL

本项目的研究得到华南师大激光生命科学研究所、华南农业大学实验中心电镜室的大力协助, 华南师大生物系郭丽容老师参与了部分工作, 特此致谢。

广东省科学基金资助项目

1995-02-27 收稿; 1995-08-14 修回

JSM-25S 型扫描电镜观察材料的表面结构。

### 1.5 利用激光共焦扫描技术观察种子发育

材料制备参照朱澂<sup>[6]</sup>的方法进行。材料用 4% 戊二醛固定 4h 后再用磷酸缓冲液冲洗两次。用系列乙醇脱水,再用 GMA (乙二醇甲基丙烯酸酯)混合液渗透固化。在 Leitz 切片机纵切或横切,切片厚度为 2 $\mu$ m。

染色用 DAPI(4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) (0.5 $\mu$ g/ml, 磷酸缓冲液配制, pH7.0) 滴染 2min, 用蒸馏水洗一次, 用 50% 甘油封片。

观察用 BIO-RAD MRC 600 型激光共焦扫描显微镜观察根状茎的组织结构。

### 1.6 利用根状茎快繁

芽分化培养基与②号培养基相同, 另加入适量椰子乳(本实验中代号为 MS2)。

生根培养基③采用 1/2 MS + IBA 1mg L<sup>-1</sup> + 活性炭 1%

培养条件是温度 26 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 光强 2W/m<sup>2</sup>, 12h。

## 2 结果和讨论

### 2.1 墨兰种子的发育

墨兰种子呈细长条状, 表皮细胞壁厚并向内凹陷, 使种子表面形成特殊的条纹。种子两端纤细, 一头略弯曲(图版 I: 1), 中间稍膨大。培养 60d 后, 种子中央部分明显增大, 培养 80-90d 后已可明显观察到种子中间部分的细胞分裂增殖, 体积明显增大(图版 I: 2,3)。继续培养 20-30d 后, 种子胚性细胞团发育增大并突破种皮(图版 II: 1), 外形成球状(本文中简称之为原球茎), 原球茎的部分表皮细胞伸长成毛状(图版 II: 2,3), 呈白色小点, 肉眼可见。在光照条件下, 胚细胞内形成叶绿体, 使细胞团从白色逐步转化为淡绿色。

原球茎逐步伸长而成为根状茎(图版 II:4)。根状茎上端无毛(图版 II: 5)。经 MS2 培养基培养后能发育产生芽(图版 I: 4)。但根状茎的下端并没有发育形成根, 而是产生许多由表皮细胞发育形成的毛状细胞。在根状茎发育的同时, 茎体部分表皮细胞增大, 形成突起(图版 I: 5), 横切面观察则呈“帽子”状(图版 I: 6), 由薄壁细胞组成。观察表明, 该突起可发育形成根状茎的侧枝, 特别是当茎顶端被切除后, 接近顶端的突起很快发育为新的芽。

从种子培养到根状茎形成约需要 120-160d, 其中假球茎生成约需 60-80d, 以后生长发育逐步加快, 从假球茎生成到根状茎形成约需要 15-20d(表 1)。由此可见, 墨兰种子的萌发主要受制于种子的后熟(即发育成原球茎的阶段)。研究发现, 即使在墨兰的荚果成熟阶段, 其种子内也只有尚未发育成胚的胚性细胞团(图版 I: 3)。需要在特定条件下完成后熟, 这是天然条件下墨兰种子难以萌发的主要原因。此外, 种子萌动还受种皮的限制, 墨兰种子的种皮厚且结构致密, 阻碍了水份的吸收和气体交换, 延滞了胚组织的发育。

### 2.2 原球茎和根状茎的发育特点

种子萌动后胚体增殖并突破种皮发育成原球茎(图版 II: 2,6)。原球茎多呈球形或椭球形, 部

表1 墨兰种子发育各阶段所需要的时间(d)  
Table 1 Days for the development of *Cymbidium sinense* seeds

种 类 Varieties	(I)	(II)	(III)
	由种子发育成原球茎 From seeds to protocorm	由原球茎发育成根状茎 From protocorm to root stock	根状茎发育产生芽 Bud formation
"企黑" "Qi hei"	68 ± 10	15 ± 5	45 ± 5
"野生兰" "Ye sheng lan"	85 ± 15	20 ± 5	45 ± 10

墨兰种子的个体发育差异很大,本统计以种子培养开始至原球茎形成高峰期作为原球茎发育所需要的时间。以原球茎形成至长度为2-3mm时为根状茎发育的起始期,以根状茎发育开始至芽产生前为根状茎发育期。

统计的数据为两批材料的平均数 Data are means of experiment of 2 groups.

分区域产生突起,而且突起处的表皮细胞伸长成毛状,并呈不规则的束状分布(图版II:4),本研究发现,原球茎突起的多寡与种子的成熟度有关,较成熟的种子,发育形成的原球茎突起多,反之则少。如图版II:1中的种子,由于成熟度低,使其后期比图版II:2,7中的种子长一倍,根状茎表面的突起也少。

此外,原球茎的突起通常较集中在一端,而另一端通常很少突起。(图版II:4,5)。

一些后期长的种子,其原球茎成畸形,并有多生长点的现象(图版II:8)。这种情况可能与原球茎内激素含量和比例有关,若人为的调节原球茎的激素含量,也能产生多生长点现象,该特点尚待研究。

根状茎通常匍匐生长(图版I:4),而且边伸长,边在茎周产生束状的突起(图版I:5),突起部分的细胞与茎部细胞的形状和大小相同,但最上层细胞体积较大,排列较齐整而成一“帽子”状(图版I:6)。当根状茎的顶端被切除后,邻近顶端的突起可发育形成新的顶端,并可发育成新的芽,这一特点为墨兰的快速繁殖提供了一条有利的途径。

### 2.3 利用“根状茎”快速繁殖

根状茎用MS2号培养基培养约30-50d后,顶端生成幼芽,待其长至5-8cm时可切下并移植于③号培养基,该培养基能有效地诱导根的生长,待根长至3-5cm以上即可炼苗和栽植。

研究表明,③号培养基对促进墨兰幼芽生根有良好的作用,不仅根数较多,而且根的生长速度优于其它培养基。诱导生根后驯化栽植的幼苗,其成活率可达90%。

### 参考文献

- 1 Puy D D, Cribb P C. The genus of *Cymbidium*, Christopher Helm. London, Timber Press, 1988
- 2 段金玉, 谢亚红. 在无茵条件下激素和种子处理对兰属七种植物种子萌发的影响. 云南植物研究, 1982, 4(2): 197, 201
- 3 王熊. 建兰和秋兰原球茎的发生及其无性系的建立. 植物生理学报, 1981, 7(2): 203-207
- 4 王熊. 兰花快速无性繁殖的研究及其花芽分化的探讨. 植物生理学报, 1984, 10(2): 391-396
- 5 吴汉珠, 王续衍, 林泰碧. 中国兰茎顶组织培养研究. 园艺学报, 1987, 14(3): 203-207
- 6 朱徽等. 用DAPI荧光显微术检测泡桐丛枝病. 植物学报, 1991, 33(7): 495-499

## 图版说明

## 图版 I

1. 培养前的墨兰种子;  $\times 100$
2. 培养 60d 的墨兰种子;  $\times 100$
3. 墨兰种子内的胚性细胞团;  $\times 500$
4. 墨兰的根状茎;  $\times 45$
5. 根状茎体表面的突起以及覆盖在突起表面的细胞;  $\times 100$
6. 根状茎体突起的切面图。突起表面有一层排列较疏松的细胞, 与下层细胞有明显的界限;  $\times 720$

## 图版 II

1. 胚性细胞团突破种皮后形成原球茎;  $\times 70$
2. 原球茎部分表皮细胞分裂伸长形成表皮毛;  $\times 100$
3. 表皮毛着生点;  $\times 200$
4. 原球茎形态学上端逐渐伸长;  $\times 70$
5. 原球茎形态学上端无毛;  $\times 150$
6. 圆球形原球茎;  $\times 70$
7. 椭圆形原球茎;  $\times 70$
8. 有两个生长点的原球茎。  $\times 100$

## Explanation of plates

## Plate I

1. *C. sinense* seed before incubation;  $\times 100$
2. *C. sinense* seed incubated for 60 days;  $\times 100$
3. Embryogenic cells in *C. sinense* seed;  $\times 500$
4. Root stock of *C. sinense*;  $\times 45$
5. Protuberances on the surface of root stock and cells covering the protuberances;  $\times 100$
6. The transection of protuberance in root stock. The protuberance having a layer of loosely arranged cells markedly separating the lower layer cells;  $\times 720$

## Plate II

1. Embryogenic cells broke through seed coat and developing into protocorm;  $\times 70$
2. Part of epidermic cells elongating and developing into epidermic hairs;  $\times 100$
3. Location of epidermic hair;  $\times 200$
4. Elongation of protocorm on upper part in morphology;  $\times 70$
5. No-hair-protocorm on upper part in morphology;  $\times 150$
6. Pseudocorm in globular shape;  $\times 70$
7. Pseudocorm in oval-globular shape;  $\times 70$
8. Pseudocorm with two growing points.  $\times 100$