

象牙白兰花种子及茎尖培养与原球茎形态发生

陈春满¹ 叶一枝² 凌绪柏³

(¹ 东莞市生物技术研究所, 东莞 523086; ² 广东博罗县石湾农业技术中心, 博罗 516125; ³ 华南热带农业大学农学院, 儋州 571737)

摘 要: 象牙白兰花授粉后 5 个月的种子开始具有较高的萌发率; 椰乳或适量激素有利于种子的萌发; 种子在萌发后胚发育形成原球茎, 原球茎经过增殖, 分化出叶片和根系, 形成完整的小植株。从播种到小植株的形成历时约 7 个月。茎尖在 MS+NAA 0.1+BA 3.0 (单位: mg L^{-1} , 下同) + 椰乳 10% 的培养基上诱导产生原球茎; 原球茎在 MS+NAA 0.1+BA 5.0 的培养基上增殖, 在无激素培养基上分化成芽; 小芽在附加 7% 香蕉汁和 3% 马铃薯汁的 1/2 MS 培养基上诱导出根而再生完整小植株。不同 pH 值、光照强度和培养方式对增殖效果有显著影响。

关键词: 兰属; 象牙白; 种子; 茎尖; 组织培养; 形态发生

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 03-0251-04

象牙白兰花 [*Cymbidium eburneum* var. *parishii* (Rchb. f.) Hook. f.] (简称象牙白) 是兰属植物中独占春的一个变种。其株型优美, 花萼花瓣纯白而唇瓣鲜黄, 花朵大且具清香, 是一种非常有开发利用价值的野生兰。近几年来由于热带雨林受破坏严重, 加上人为的乱挖乱采, 野生象牙白资源损失严重, 自然分布急剧减少。象牙白种子播种繁殖曾有报道^[1], 但茎尖无性繁殖至今尚未见报道。最近, 作者采取茎尖进行组织培养, 获得了再生植株, 并且对无菌播种的象牙白种子萌发、原球茎形成和小植株发育过程进行了形态和解剖学的观察, 为快速繁殖和开发利用野生象牙白奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为引种栽培的海南省五指山野生象牙白兰花植株。取其人工授粉后 3~7 个月的果实和 5~10 cm 长未展大叶的嫩芽。

1.2 方法

材料经表面清洗后, 放入 75% 酒精中灭菌 30 s, 再以 0.1% 升汞灭菌 7~10 min, 用无菌水冲洗 4~5 次。在无菌条件下把果实切开, 将种子均匀撒播在培养基上, 茎尖材料剥取约 5 mm³ 的生长点接种到诱导培养基上。

以花宝一号 (Hyponexl, 7-6-19) 3 g L^{-1} 、改良 VW (Vacin 和 Went, 1949, MS 的微量元素)、MS、KC (Knudson C, 1946) 为基本培养基, 根据不同培养阶段及不同试验方法, 添加不同的激素。蔗糖浓度 2%, 灭菌前调整 pH 值至 5.4~5.6。培养温度 25~28℃, 每天连续光照 12 h, 光照强度 1 000~2 000 lx。表 2~表 5 比较试验中, 每种处理接种 10~15 瓶材料, 重复试验 2 次。增殖率为两次试验的平均值 (污染瓶数不在统计范围)。象牙白类原球茎个体较小, 一般常呈丛生型密集在一起, 用数量法计算增殖率较麻烦而且容易出现偏差, 故本次试验以培养前后原球茎鲜样质量差求月增殖率。

播种后定期取样, 分别用 FAA 和戊二醛固定。每次固定 4~5 个样品 (胚或原球茎), 连续 7 次。FAA 固定后的样品用常规石蜡包埋, 切片厚度 10 μm , 铁矾—苏木精染色, 中性树胶封片, 用光学显

收稿日期: 2001-08-23; 修回日期: 2002-03-15

显微镜进行观察。用戊二醛固定的样品经清洗、脱水和喷金后用扫描电镜进行观察。

2 结果与分析

2.1 成熟度和激素对种子萌发的影响

试验结果如表 1 所示。在所有培养基上, 授粉后 3 个月内的种子均不能萌发; 4 个月的种子也仅有极个别的能够萌发; 5 个月后种子萌发率大增。这说明只有达到较高成熟度的种子才具有萌发的能力。试验中添加椰乳 (CM) 或 NAA 和 KT 均有利于种子的萌发。但不同浓度的 NAA (0.1, 0.2, 0.5, 单位: mg L^{-1} , 下同) 和 KT (1.0, 1.5, 2.0) 的三个处理间萌发率的差异不大, 这说明适合发芽的激素浓度具有较大的范围。试验结果还表明, 以花宝一号作基本培养基, 种子萌发率高于改良的 VW 培养基。

2.2 种子萌发过程胚生长发育及器官建成

在低倍显微镜下观察发现, 3 个月龄的种子由一层透明的种皮组成, 没有观察到胚的存在; 4 个月龄的种子中有一小部分可观察到透明的形状不规则的胚; 5 个月龄的种子均有胚存在, 但只有小部分的胚性细胞团达到饱满, 大部分的胚不饱满; 6 个月及以上月龄胚基本上为饱满胚。成熟象牙白种子细长, 长约 600 ~ 800 μm , 直径约 90 ~ 120 μm 。种皮透明, 其细胞壁明显加厚, 其余部分向内凹陷, 无细胞核及细胞质存在。种皮内椭圆形的胚由一团未成熟的胚性细胞团组成。其特征 (见插页 3 图版, 1) 与四季兰种子^[2]较为相似。

成熟种子在播种后 7 d 左右胚即突破种皮开始萌发, 而未成熟种子的胚则在培养基上继续生长, 体积逐渐增大, 最后由胚合点端突破种皮, 萌发形成早期原球茎 (见插页 3 图版, 2)。胚萌发后约 20 d 基部产生 1 ~ 3 条透明的毛状物, 这是由原球茎表皮细胞伸长发育形成的毛状细胞, 有人称之为假根。成熟种子在播种后 90 d 左右由胚发育而成的椭圆形原球茎成为肉眼可见的白色小点。约 120 d, 原球茎顶端凹陷, 形似心脏, 中下半部密生假根。随后, 原球茎体积继续增大, 顶部表面产生多个不规则突起。这些不规则突起继续长大形成新的原球茎 (见插页 3 图版, 3)。播种后约 180 d, 发育良好的原球茎开始进入器官分化阶段, 产生叶原基和根原基 (见插页 3 图版, 4)。当第一片真叶形成时, 原球茎内部的根原基细胞和维管束细胞也同时快速分裂, 逐渐连成一体 (见插页 3 图版, 5)。至 210 d 左右, 粗壮的根系突出表面, 形成幼嫩小植株 (见插页 3 图版, 6)。从播种到形成具有 4 片幼叶、一条幼根的小植株约需 210 d。

2.3 类原球茎的诱导及植株再生

茎尖外植体接种到附加 BA 3、NAA 0.1 和椰乳 10 % 的 MS、改良 VW、KC 三种基本培养基中, 两周后可观察到茎尖外植体膨大、变绿。一个月后, 在 MS 培养基上可见部分外植体的茎尖部位形成白色小颗粒类原球茎 (见插页 3 图版, 7)。而在改良 VW 培养基中约两个月后才发现类原球茎形成。在 KC 培养基上, 大部分的外植体褐变死亡, 没有观察到类原球茎形成。类原球茎经过培养不断增殖, 颗粒增大、变绿, 形成直径 2 ~ 3 mm 的圆形颗粒 (见插页 3 图版, 8)。类原球茎在无激素的 MS 或 1/2 MS 培养基中约 2 ~ 3 个月即进入器官分化, 形成小芽。其分化的具体过程及形成的解剖特征与种子培养中胚的发育过程相似。小芽在添加香蕉泥 7 %, 马铃薯 3 % 的 1/2 MS 培养基中 1 ~ 2 个月, 可形成具有 2 ~ 3 条小根的完整再生植株 (见插页 3 图版, 9)。

2.4 激素对类原球茎增殖的影响

表 1 培养条件对种子萌发的影响

Table 1 Effects of culture medium composition on germination rate in *Cymbidium eburneum* var. *parishii* (Rchb. f) Hook. f.

培养基 Medium (mg L^{-1})	种子成熟度 (月) Seed maturity (month)				
	3	4	5	6	7
VW	0	0	50	72	—
VW + CM 50	0	0	68	88	—
Hyponexl + CM 50	0	1	83	90	92
VW + NAA 0.1 + KT 1.0	0	3	94	93	94
VW + NAA 0.2 + KT 1.5	0	2	84	92	—
VW + NAA 0.5 + KT 2.0	0	4	91	93	—

注: 改良的 VW 培养基; 播种 3 个月后计算萌发率; 萌发率为 10 个观察点的平均值。

Note: Modified VW medium; the germination rate was the average of ten observed data; three months after sowing.

从表 2 结果可以看出, BA 浓度对类原球茎的增殖有较大影响, 5.0 mg L^{-1} 的 BA 使类原球茎呈现最高的增殖率 (224 %), 增殖效果极显著优于其它低浓度的 BA 处理。说明在 BA $0.5 \sim 5.0 \text{ mg L}^{-1}$ 范围内, 随着 BA 浓度的增加, 增殖率也相应增加。表 3 表明, MS、改良 VW 和花宝一号三种基本培养基之间有显著性差异, 其中 MS 和花宝一号的效果要优于改良 VW。三种浓度的 KT ($0.5, 1.0, 2.0$) 和基本培养基之间的交互作用差异不显著, 说明影响类原球茎增殖的 KT 浓度范围较广。这与种子萌发的激素刺激结果是一致的。

表 2 BA 对象牙白原球茎增殖效果的影响

Table 2 Effects of BA concentrations on PLBs multiplication in *C. eburneum* var. *parishii* (Rchb. f) Hook. f.

NAA (mg L^{-1})	BA (mg L^{-1})	平均增殖率 Multiplication rate (%)
0.1	0.5	94 aA
0.1	1.0	115 aA
0.1	2.0	112 aA
0.1	3.0	128 aA
0.1	5.0	224 bB

注: 1. 基本培养基为 MS; 2. 表中数据所附大写 (小写) 字母不同为 $P=0.01$ 极显著水平 ($P=0.05$ 显著水平), 下同。

Note: 1. The basic medium was MS; 2. The different capital letter attached after every data in a row indicates significance at $P=0.01$, and the different small letter indicates significance at $P=0.05$, the same below.

表 3 KT 及基本培养基对象牙白原球茎增殖效果的影响

Table 3 Effects of KT concentrations and basic medium on PLBs multiplication in *C. eburneum* var. *parishii* (Rchb. f) Hook. f.

基本培养基 Basic medium	KT (mg L^{-1})	NAA (mg L^{-1})	增殖率 Multiplication Rate (%)
MS	0.5	0.1	257 bA
	1.0	0.1	135 bA
	2.0	0.1	240 bA
VW	0.5	0.1	166 aA
	1.0	0.1	142 aA
	2.0	0.1	85 aA
Hyponex 1	0.5	0.1	226 bA
	1.0	0.1	271 bA
	2.0	0.1	200 bA

综上可知, 象牙白类原球茎的增殖以 MS 或花宝一号为基本培养基效果较好。单加 BA 或 KT 均可促进类原球茎的增殖, 但在增殖培养的初时阶段以 BA (5 mg L^{-1}) 处理效果较好, 类原球茎表现为个数多, 颗粒小, 丛生型聚集在一起, 增殖势头较旺。在 KT 的处理中, 类原球茎粒数少, 个体体积较大, 分化成芽的速度较快, 较适合于最后增殖培养阶段运用。

2.5 光照强度对类原球茎增殖的影响

表 4 表明, 光照强度为 3000 lx 时, 原球茎月平均增殖率为 394% , 显著高于 1000 lx 和 2000 lx 的增殖率。说明光照较强时光合作用效果好, 有利于类原球茎增殖。

表 4 不同光照强度对象牙白原球茎增殖率的影响

Table 4 Effects of different light intensity of illumination on PLBs multiplication in *C. eburneum* var. *parishii* (Rchb. f) Hook. f.

光照强度 Light Intensity (lx)	增殖率 * Multiplication Rate (%)
1000	239 aA
2000	216 aA
3000	394 bA

*MS+BA 5.0 mg L^{-1} +NAA 0.1 mg L^{-1} .

表 5 pH 值对象牙白原球茎增殖效果的影响

Table 5 Effects of different pH values on PLBs multiplication in *C. eburneum* var. *parishii* (Rchb. f) Hook. f.

pH	增殖率 * Multiplication rate (%)
5.0	196 deBC
5.2	274 cdB
5.4	455 bA
5.6	541 aA
5.8	303 cB
6.0	132 eC
6.2	102 eC

*Liquid culture. MS+BA 5.0 mg L^{-1} +NAA 0.1 mg L^{-1} .

2.6 pH 值对类原球茎增殖效果的影响

表 5 结果表明, 7 种不同的 pH 值条件下类原球茎的增殖率存在极显著差异。pH $5.4 \sim 5.6$ 的处理其增殖率达 $455\% \sim 541\%$, 极显著高于 pH $5.0 \sim 5.2$ 和 pH $5.8 \sim 6.2$ 处理的增殖率。pH 5.6 的处理其增殖率最高, 是象牙白类原球茎增殖的最佳 pH 值。表 5 结果也表明了液体培养的原球茎增殖率较高, 极显著高于固体培养的增殖率。在液体培养基中, 类原球茎粒数多, 颗粒大, 但组织结构较疏松, 不利于分化。因此液培时间不宜过长, 最好是液体、固体培养交替进行, 有利于类原球茎快速增殖。

3 讨论

象牙白种子在不含激素的改良 VW 培养基上能够萌发, 萌发率随着种子成熟度的提高而增加。种子萌发后, 胚发育形成原球茎而不是根状茎, 这表明象牙白具有附生类兰属兰花的特点。添加适量的椰乳或 NAA、KT 后, 种子萌发率增加, 表明外源激素对象牙白种子萌发有促进作用。

胚萌发后形成原球茎, 原球茎经过不断增殖产生多个芽。这种由一个胚产生多个芽的现象, 在亚美万代兰、墨兰等兰科植物中有过报道^[3,4]。这种现象的产生可能是种胚特性, 也可能是由于添加富含细胞激动素的椰乳和外源激素的缘故。

由种子萌发形成的原球茎 (Protocorm) 是由种子内球形胚直接发育形成的, 具有父母本的基因型。由茎尖诱导形成的类原球茎, 其发生过程有所不同: 外植体茎尖幼嫩细胞在外源激素作用下, 经脱分化无限增殖形成愈伤组织, 愈伤组织最外层的某一薄壁细胞经启动、脱分化后进行平周分裂和垂周分裂形成四细胞团, 以后四细胞团再向各个方向分裂, 形成一团胚性细胞^[5], 胚性细胞团继续发育形成类似于早期的原球胚, 最后, 原球胚发育形成原球茎, 其内部结构与由种子发育形成的原球茎相似, 称类原球茎体 (Protocorm-like bodies)。类原球茎体的形成是介于胚状体和不定芽、小鳞茎中的一种, 也是兰科植物离体无性繁殖最常见的一种方式。

参考文献:

- 1 李任珠. 经组织培养快速繁殖象牙白 (*Cymbidium eburneum*) 的研究. 海南大学学报, 自然科学版, 1995, 13 (2): 129 ~ 132
- 2 田梅生, 王伏雄, 钱南芬, 等. 四季兰种子离体萌发及器官建成的研究. 植物学报, 1985, 27 (5): 455 ~ 459
- 3 鲁雪华, 林汉章. 亚美万代兰与多花兰种子发芽过程扫描电镜的观察. 亚热带植物通讯, 1991, 20 (1): 29 ~ 34
- 4 陈汝民, 叶庆生, 王小菁, 等. 墨兰种子胚的发育和培养初步研究. 热带亚热带植物学报, 1995, 3 (4): 72 ~ 75
- 5 张丕方, 董崇楣, 李 瑶, 等. 虎头兰组织培养中原球茎的形态发生. 复旦学报 (自然科学版), 1989, 28 (4), 434 ~ 437

Seed and Shoot-tip Tissue Culture and Morphogenesis of Protocorms in *Cymbidium eburneum* var. *parishii* (Rchb. f.) Hook. f.

Chen Chunman¹, Ye Yizhi², and Ling Xubo³

⁽¹⁾ Dongguan Biotechnology Institute, Dongguan 523086, China; ⁽²⁾ Shiwan Agricultural Technology Center, Boluo 516125, China;

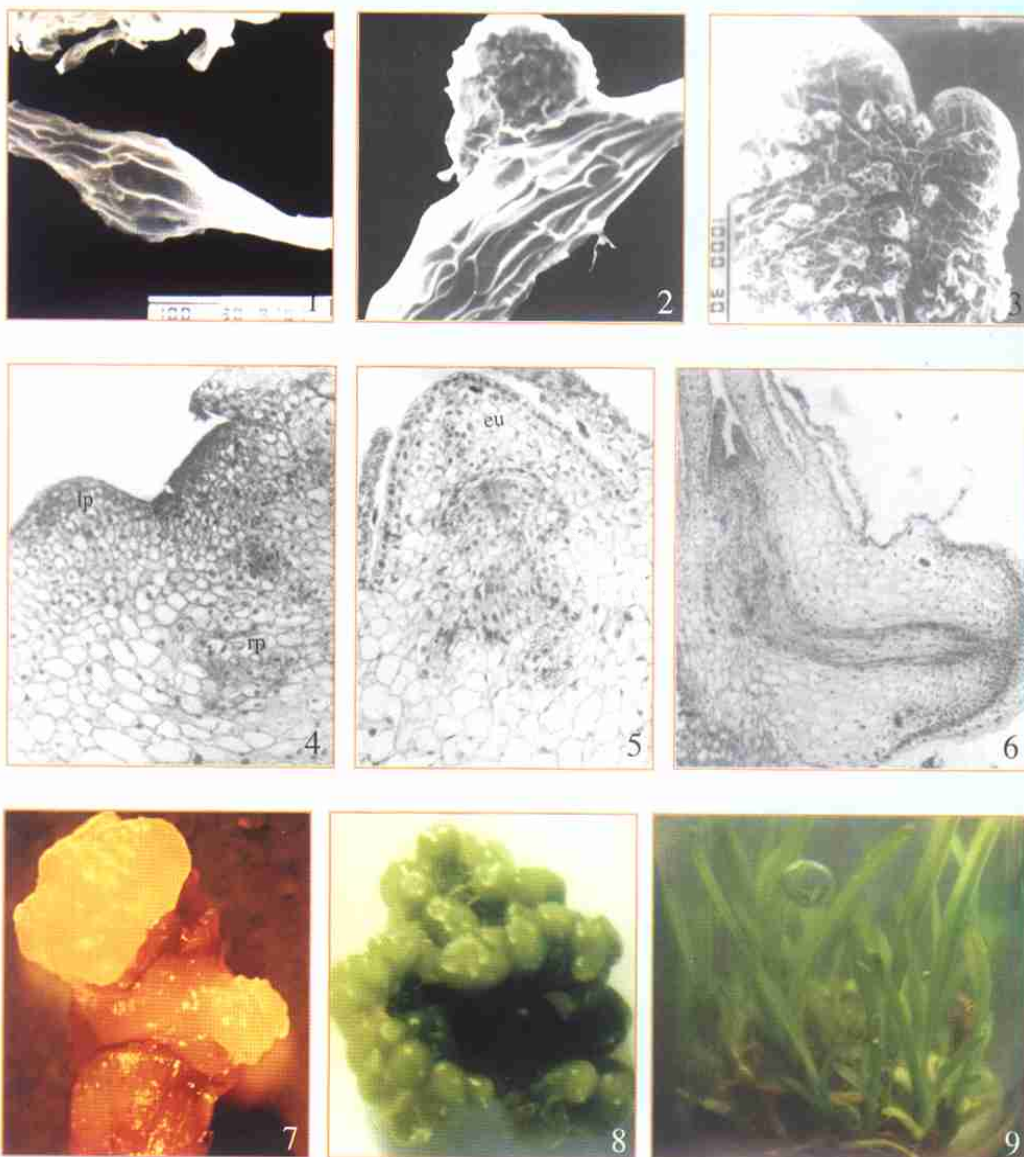
⁽³⁾ College of Agronomy, South China Tropical Agricultural University, Danzhou 571737, China)

Abstract: A propagation method of *Cymbidium eburneum* var. *parishii* (Rchb. f.) Hook. f. by in vitro culture of seeds and shoot-tips, and the morphogenesis of protocorms from the cultured seeds are described in this paper. The germination capacity of young seed was very low but became prominently higher when it reached five months old. Although seeds could germinate on basal medium, addition of coconut milk, or NAA and KT to the medium clearly stimulated the germination of seed. After germination, The embryos developed into FLBs, which latter multiplied and differentiated into leaves and roots, to form complete plantlet. It took more than seven months for seeds to develop to plantlets after sowing. Protocorm-like bodies (FLBs) were induced from shoot-tip explants in MS medium supplemented with NAA 0.1 mg L⁻¹, BA 3.0 mg L⁻¹ and coconut milk 10%. FLBs multiplied in MS medium supplemented with NAA 0.1 mg L⁻¹ and BA 5.0 mg L⁻¹. Plantlets were induced from FLBs in the media without any hormone. Roots were induced in 1/2 MS medium supplemented with 7% banana juice and 3% potato juice. The multiplication rate of FLBs were influenced by different light intensity, culture state and pH value significantly.

Key words: *Cymbidium*; *Cymbidium eburneum* var. *parishii* (Rchb. f.) Hook. f.; Seeds; Shoot-tips; Tissue culture; Morphogenesis

陈春满等：象牙白兰花种子及茎尖培养与原球茎形态发生

Chen Chunman, et al. Seed and Shoot-tips Tissue Culture and Morphogenesis of Protocorms in *Cymbidium eburneum* var. *parishii* (Rchb.f.) Hook.f.



图版说明：1.成熟种子的扫描电镜照片（ $\times 105$ ）；2.胚突破种皮萌发的扫描电镜照片（ $\times 110$ ）；3.新产生的原球茎的扫描电镜照片（ $\times 30$ ）；4.叶原基和根原基的显微照片（ $\times 97$ ）；5.第一片真叶的显微照片（ $\times 99$ ）；6.根、茎、叶完整的小植株的显微照片（ $\times 40$ ）；7.类原球茎的形成；8.类原球茎的增殖；9.再生植株；eu.真叶；lp.叶原基；rp.根原基。

Explanation for Plates: 1. A mature seed under a scanning electron microscopy ($\times 105$); 2. An embryo broke through the seed coat to germinate under a scanning electron microscopy ($\times 110$); 3. A newly formed Protocorm under a scanning electron microscopy ($\times 30$); 4. Primordiums of leaf and root under a micrography ($\times 97$); 5. The first euphylla under a micrography ($\times 99$); 6. An intact plantlet with leaves, a stem and a root under a micrography ($\times 40$); 7. PLBs formed; 8. PLBs multiplied; 9. Regenerated plantlets.