

五唇兰种子离体培养的研究

伍成厚^{1,2}, 叶秀琳¹, 梁承邨¹

(1. 中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650; 2. 漳州师范学院生物系, 福建漳州 363000)

摘要: 授粉 90 d 的五唇兰种子 95% 具球形胚, 无菌条件下播种于培养基 3 个月后种子最高萌发率达到 90%。ABA 和高浓度的 NH_4NO_3 抑制种子的萌发。NAA 和 BA 促进种子的萌发, 最适浓度为 BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的谷氨酰胺可促进原球茎生长。2000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛋白胍促进原球茎发育成苗。

关键词: 五唇兰; 种子萌发; 组织培养

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)02-0149-03

In vitro seed germination in *Doritis pulcherrima*

WU Cheng-hou^{1,2}, YE Xiu-lin¹, LIANG Cheng-ye¹

(1. South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China; 2. Dept. of Biology, Zhangzhou Normal College, Zhangzhou 363000, China)

Abstract: After pollinating for 90 days, *Doritis pulcherrima* seeds which 95% contain globular embryos were collected and sowed on medium axenically. After 3 months, the seed germination rate reached 90%. ABA and high concentration of NH_4NO_3 inhibited the germination. NAA and BA greatly improved the germination and the combination of BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was optimal. Glutamine $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ made protocorms grow well while peptone $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ promoted the formation of seedlings.

Key words: *Doritis pulcherrima*; seed germination; tissue culture

五唇兰(*Doritis pulcherrima* Lindl.)为兰科五唇兰属植物,是一种产于我国海南和一些东南亚地区的野生兰(吉占和等,1999),其花型和株型都相当好,很有开发应用的前景。Yasugi等(1983)和唐源江等(1998)曾报道了五唇兰的胚胎发育过程, Griesbach(1997)对其花呈蓝色突变体的生化基础进行了研究。近年来由于大量的人工采挖,野生五唇兰资源急剧减少。因此,对其进行大量繁殖,以使种质资源得以保存,同时对杂交育成的优良品种进行大规模的商品化生产十分必要。种子离体培养是保护兰花野生资源的重要手段之一,而目前对五唇兰种子培养的研究还很少(张菊野等,1995)。本文

对五唇兰种子的离体培养进行了研究,为育种及繁殖工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料是产于海南的野生五唇兰,材料从野外采回后种植在中国科学院华南植物研究所的温室,在开花期间进行人工授粉,每个花萼授2朵花,剪除花萼的其余部分。授粉后3个月蒴果开始变成褐色,部分绿色,未开裂,此时种子为棕黄色,已形成球形胚,番红染色后解剖镜下检查种子胚的发育情

收稿日期: 2003-12-08 修订日期: 2004-03-29

基金项目: 国家自然科学基金(30170061); 广东省重大科技专项(2003A2010401); 福建省青年科技人才创新基金项目(2004J052)资助。

作者简介: 伍成厚(1968-),男,湖南邵阳人,讲师,博士,从事园林植物遗传育种与生物技术研究。

况,有胚率为 95%。

1.2 方法

1.2.1 培养基 以 MS 培养基(Murashige 等,1962)为基本培养基,并对其 NH_4NO_3 浓度进行改良。添加不同浓度的 BA、NAA、椰子汁、蛋白胨、谷氨酰胺和 2.0% 的蔗糖和 0.8% 的琼脂粉, pH 值 5.5。

1.2.2 外植体 采集发育正常的蒴果,以 70% 酒精表面消毒 1 min 后置于 5% NaClO 溶液中 15 min,无菌水冲洗 5~6 次后在无菌条件下剖开蒴果,取中部的种子均匀撒播于各种培养基上。

1.2.3 种子培养 培养温度 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。接种后先在黑暗中培养 90 d,每个处理随机调查 100 颗种子,统计一次种子萌发率。萌发率为萌发种子颗数和有胚种子颗数的比率,公式为:萌发率=萌发颗数/(调查颗数 $\times$ 95%)。随后进行光照培养,每日光照 12 h、光照度 1 600~2 000 lx,光培养 60 d,统计成苗率。

2 结果与分析

2.1 离体培养时五唇兰种子发育成苗的过程

种子萌发初期在培养基上形成白色点状隆起,继而膨大形成原球茎(protocorm),原球茎最初呈卵形,随着体积的增大,发育成椭圆型、长条形等多种形状,表面开始形成少量的假根,上端突起形成叶原基,下端形成根原基。假根保持相当一段时间,大约在分化出根时才逐渐解体。转入光照培养后,原球茎继续生长,逐渐变成绿色,首先发育出叶,再发育出根从而长成小苗(图版 I)。从种子萌发到形成具有二片幼叶、一条幼根的幼苗共需 180 d 左右。

2.2 培养基 NH_4NO_3 浓度对五唇兰种子萌发的影响

以 MS 为基本培养基,试验了 1/12MS($137.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、1/8MS($206.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、1/4MS($412.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、1/2MS($825.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 MS($1650.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)共 5 个不同的 NH_4NO_3 浓度对五唇兰种子萌发的影响(均添加 BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。结果表明:MS 培养基的 NH_4NO_3 浓度($165.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)偏高,五唇兰种子的萌发率仅 30%。随着培养基的 NH_4NO_3 浓度降低,五唇兰种子的萌发率逐渐提高;当培养基的 NH_4NO_3 浓度降至 1/8MS($206.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时种子的萌发率最高,达到 90%。但 NH_4NO_3 浓度继续降低种子的萌发率又会下降。这说明了 NH_4NO_3 浓度对授粉 90 d 的

五唇兰种子萌发率的影响情况(图 1)。

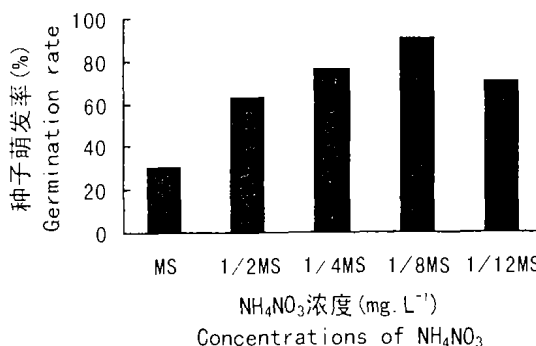


图 1 NH_4NO_3 浓度对五唇兰种子萌发的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of NH_4NO_3 on seeds germination in *Doritis pulcherrima*

2.3 激素种类和浓度对五唇兰种子萌发的影响

在培养基不添加外源激素时五唇兰的种子也可少量萌发,在分别加入 BA、NAA、ABA 等植物激素后,种子的萌发率出现明显差异。低浓度的 BA ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下)促进种子萌发,但浓度超过 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对种子萌发产生不利影响。NAA 促进种子萌发,以浓度 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 最适,超过 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导愈伤组织的形成。同时添加 BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时种子的萌发率最高,达 90%。培养基添加 ABA 后抑制五唇兰种子的萌发,即使同时加入 BA 和 NAA 也不能解除 ABA 对种子萌发的抑制作用。这说明了外源激素对五唇兰种子萌发率的影响情况(图 2)。

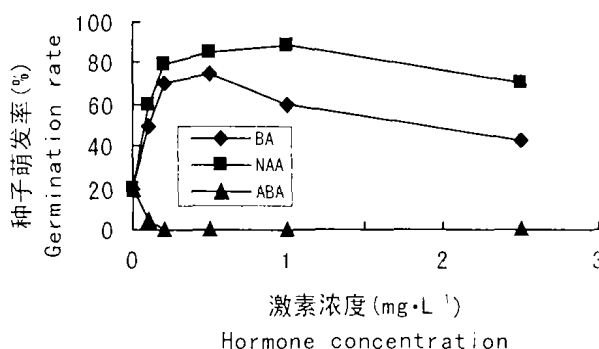


图 2 激素对五唇兰种子萌发的影响

Fig. 2 Effects of hormones on seeds germination of *Doritis pulcherrima*

2.4 有机添加物

1/8MS($206.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)培养基添加 10% 椰子

汁、400 mg · L⁻¹谷氨酰胺、2 000 mg · L⁻¹蛋白胨对五唇兰种子的萌发没有明显的影响。五唇兰的原球茎在培养基不含有有机物时成苗困难,400 mg · L⁻¹的谷氨酰胺促进原球茎生长、增大,但对成苗没有促进作用;2 000 mg · L⁻¹的蛋白胨促进原球茎成苗,而10%的椰子汁诱导原球茎基部产生愈伤组织。

3 讨论

张菊野等(1995)报道五唇兰果实需在植株上生长10.5个月,其种子在离体培养时才能萌发,而授粉6个月果实的种子在各种培养基中均不能萌发。本试验中五唇兰种子在授粉后90 d已经含有球形胚,发育正常的蒴果中有胚种子率达到95%,离体培养时种子萌发率可达到90%。五唇兰种子离体培养对采种时间为什么会有这么大的差异呢?植株栽培环境温度条件的不同可能是造成这种现象的主要原因。Yasugi(1983)和唐源江等(1998)曾研究了五唇兰胚胎发育过程,对于整个胚胎发育时间他们的试验结果有很大的差异。唐源江等(1998)报道五唇兰授粉后45 d形成合子、100 d左右种子形成球形胚;Yasugi(1983)则报道五唇兰授粉后60~65 d形成合子、90~210 d为多细胞胚胎发育阶段、210 d蒴果成熟开裂。因此,五唇兰种子离体培养采果时间的确定不能完全以授粉后的时间为依据,而是应以种子内胚的发育程度作为参考标准。

兰花种子萌发过程中需要适量的氮源已成为共识,自然界兰花种子因与真菌共生获得必要的氮源才能萌发,在离体培养时低浓度的氮源有利于种子萌发,而高浓度的氮源则起抑制作用(Arditti, 1967)。降低培养基的氮源浓度甚至是香荚兰(*Vanilla planifolia*)种子萌发的一个关键因素(Lugo-lugo, 1955)。在石斛属(*Dendrobium*)种子萌发试验中有硝态氮与氨态氮的比率影响种子萌发的报道(曾宋君等, 1998)。本试验的结果表明MS培养基的NH₄NO₃浓度偏高,不适宜五唇兰种子的萌发,只有在降低NH₄NO₃的浓度后才取得理想的培养结果。在黄花杓兰(*Cypripedium flavum*)种子离

体过程中也取得类似的结果(黄家林等, 2001)。因此,可以认为NH₄NO₃的浓度对兰科植物的种子萌发是一个重要的影响因子,低浓度的NH₄NO₃可能有利于兰科植物的种子萌发。

授粉后90 d五唇兰种子在培养基不加外源激素时也有一定的萌发率,说明此时种子的抑制物质尚未形成或含量很低。加入ABA后种子的萌发受到抑制,而且即使加入NAA和BA也不能解除这种抑制作用。未加入ABA时NAA和BA均能显著提高五唇兰种子的萌发率,可见NAA和BA的作用不是拮抗ABA,而是本身具有刺激五唇兰种子萌发的作用。在黄花杓兰的种子萌发试验中,黄家林等(2001)曾认为KT和BA等细胞分裂素的作用不是拮抗ABA,而是本身具有诱导种子萌发的作用。但他们的试验没有用ABA进行试验,本文的结果对这一设想提供了直接的证据。

参考文献:

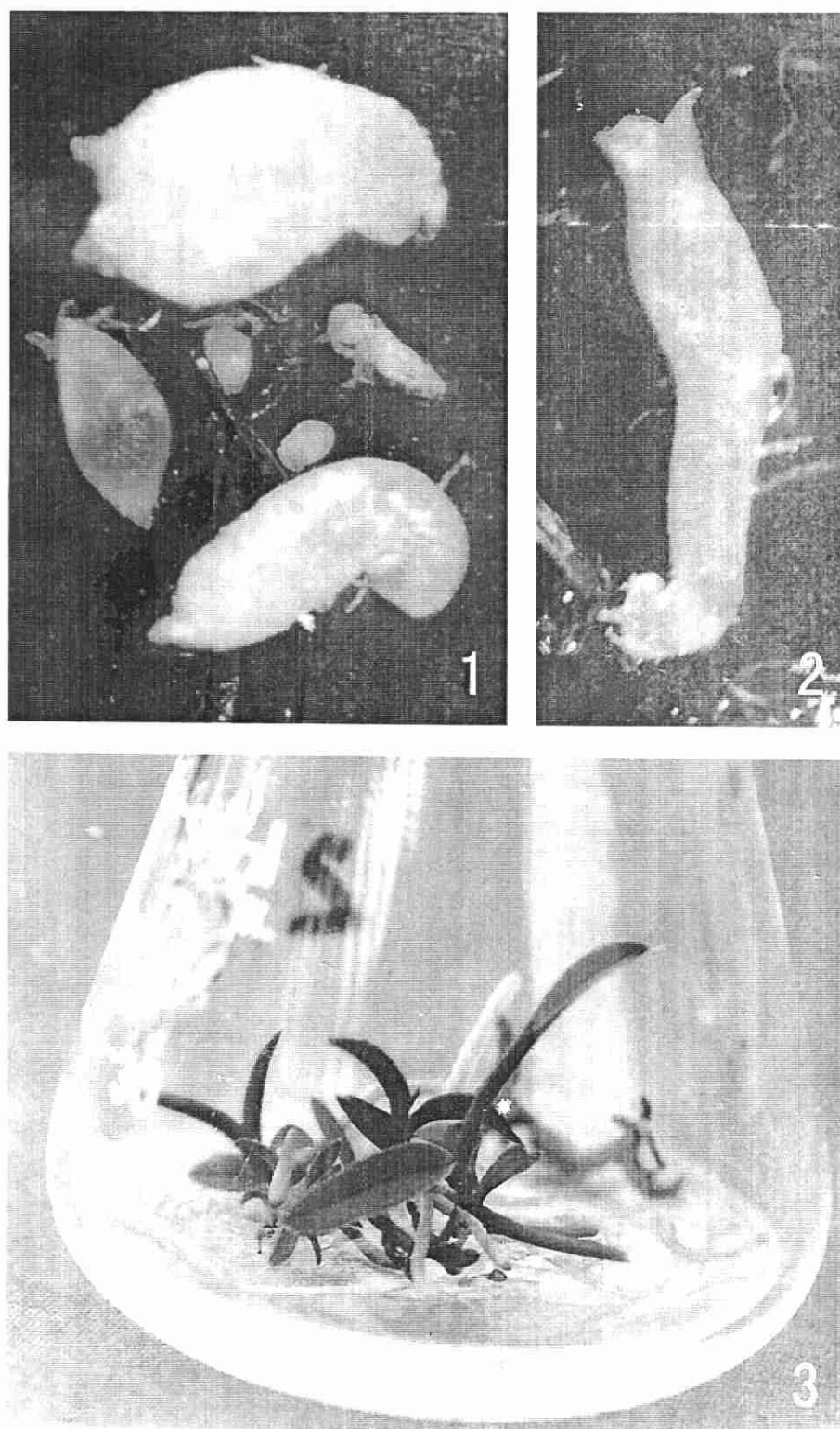
- 吉占和, 陈心启, 罗毅波, 等. 1999. 中国植物志, 第19卷[M]. 北京: 科学出版社, 276—279.
- 张菊野, 俞玲凤, 李文安. 1995. 五唇兰生物学特性及试管繁殖的研究[J]. 生物学杂志, 63(1): 20—22.
- 黄家林, 胡虹. 2001. 黄花杓兰种子无菌萌发的培养条件研究[J]. 云南植物研究, 23(1): 105—108.
- 唐源江, 叶秀萍, 陈泽谦. 1998. 五唇兰雌配子体发育和胚胎发生的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 6(4): 289—292.
- 曾宋君, 程式君, 张京丽, 等. 1998. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖的研究[J]. 园艺学报, 25(1): 75—80.
- Arditti J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seed [J]. *Bot Rev.*, 33(1): 1—97.
- Griesbach RJ. 1995. The biochemical basis for the blue flower color mutations in *Doritis pulcherrima* and *Phalaenopsis violacea* [J]. *Lindleyana*, 1997, 12(2): 64—71.
- Lugo-Lugo H. 1955. The effect of nitrogen on the germination of *Vanilla planifolia* [J]. *Amer J Bot.*, 42: 679—684.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue [J]. *Physiol Plant*, 15: 473—497.
- Yasugi S. 1983. Ovule and embryo development in *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae) [J]. *Amer J Bot.*, 70(4): 556—560.

伍成厚, 等: 五唇兰种子离体培养的研究

WU Cheng-hou, *et al.*: *In vitro* seed germination in *Doritis pulcherrima*

图版 I

Plate I



1. 五唇兰种子离体培养 90 d 形成的原球茎, $\times 6$; 2. 原球茎开始分化出叶, $\times 6$; 3. 五唇兰种子形成的试管苗。

1. Protocorms formed from seeds of *Doritis pulcherrima* cultured for 90days. $\times 6$; 2. Advanced protocorm stage with first and second leaf primordial appearing. $\times 6$;

3. Young seedlings formed from seeds of *Doritis pulcherrima*