

黄花杓兰种子无菌萌发的培养条件研究^{*}

黄家林, 胡 虹^{**}

(中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204)

摘要: 授粉 15 周后的黄花杓兰 (*Cypripedium flavum* P. F. Hunt et Summerh.) 种子经 0.5% NaClO 溶液处理后, 无菌条件下播于培养基表面, 20 周后种子最高萌发率达到 90%。KT 和 BA 促进兰花种子萌发的机理是作为一种萌发诱导物质直接起作用, 而不仅仅是拮抗 ABA 的抑制作用而促进种子的萌发。培养基, 激素和种子预处理是萌发率高低的关键, 种皮是阻碍黄花杓兰种子萌发的主要原因之一。

关键词: 杓兰; 种子萌发; 种子预处理

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2001)01-0105-04

Seed Germination Requirements of *Cypripedium flavum* in Axenic Culture

HUANG Jia-Lin, HU Hong

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: After pollinating for 15 weeks, *Cypripedium flavum* seeds were collected and bleached in 0.5% NaClO solution for 10 minutes, then sowed in media axenically. After 20 weeks, the seed germination rate reached 90%. Medium, exogenous cytokinin and bleaching is vital to the germination. The mechanism of KT and BA improving germination rate is to act as a direct germination inducer, in addition to be an inhibitor of ABA. Seed coat is one of the important factors in the germination of *Cypripedium flavum* seeds.

Key words: *Cypripedium flavum*; Germination; Seed bleaching

杓兰属 (*Cypripedium*) 植物主要分布于北半球的高寒地区。我国云南西北部、四川西南部和西藏是杓兰属植物的主要分布地区之一, 其中不少的种类属于我国的特有种, 如黄花杓兰 (*C. flavum*)、丽江杓兰 (*C. lichiangense*) 等。杓兰属植物大多数花色艳丽、花型奇特, 其唇瓣状如拖鞋, 故有“拖鞋兰”之称, 具有极高的观赏和药用价值。陆生兰特别是高寒地区陆生兰的种子萌发和组织培养难度较大, 杓兰的外植体组织培养尚未见突破性的研究。欧美地区和日本较早开始了杓兰的种子繁殖研究 (Harvais, 1973, 1982; Steele, 1996), 一些北美杓兰种类种子无菌繁殖取得了成功, 如 *C. reginae* 和 *C. californicum* 等, 并初步实现了种苗的商业化。近年来国内由于灭绝性的采挖和环境的恶化, 野

* 基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划及中国科学院昆明植物研究所创新工程资助项目

** 通讯作者

收稿日期: 2000-01-25, 2000-05-29 接受发表

生杓兰种群急剧减少。因此,保护这些珍贵的野生杓兰种质资源并更好地开发利用已势在必行。种子人工大量无菌繁殖是保护野生杓兰资源的重要手段之一,目前国内尚未见开展杓兰种子人工繁殖及其组织培养的相关研究报道。本研究利用黄花杓兰种子进行无菌萌发实验,在国内首先探讨了杓兰属植物种子人工大量繁殖的培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料

温室中栽培的黄花杓兰植株开花授粉后第 15 周,蒴果开始变成褐色,部分绿色,未开裂。采下蒴果,流水冲洗干净后置于 70% 酒精中消毒 0.5 h,剖开蒴果,将粉末状的种子装到无菌的小瓶中备用。解剖镜下检查种子胚的发育情况,有胚率为 68%。

1.2 方法

用 0.5% NaClO 溶液处理种子 10 min (种子预处理实验除外),无菌水冲洗 3 次,播于培养基表面。除培养基实验外,各实验所用的培养基为 Harvais (1982) 培养基,培养基实验中的改良型 Harvais 培养基 (简写 cHa),是在 Harvais 培养基基础之上去除 NH_4NO_3 ,添加甘氨酸 2.0 mg/L、谷氨酰胺 100 mg/L 和酪蛋白水解物 500 mg/L。除激素实验外,各实验培养基中均添加 1.0 mg/L 的 KT。除 pH 值实验外,各实验中培养基的 pH 值均为 5.4。每一实验梯度处理培养基 100 mL,分装在 4 个 50 mL 三角瓶中,每瓶约播种子 50 颗,黑暗中 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 培养,每隔 4 周统计一次种子萌发率。萌发率为萌发颗数和有胚种子的比值,公式表示为:萌发率 = 萌发颗数 / (播种数 $\times$ 68%)。

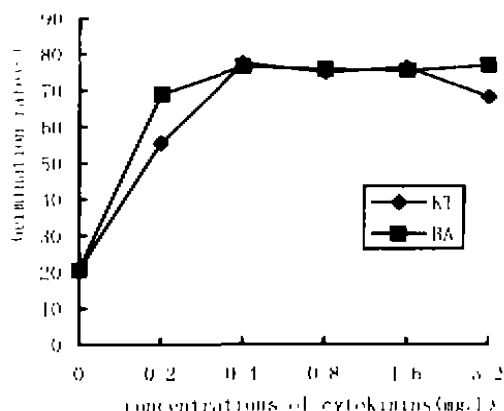


图 1 激素对种子萌发率的影响

Fig 1 The effect of cytokinins on seeds germination of *C. florum*

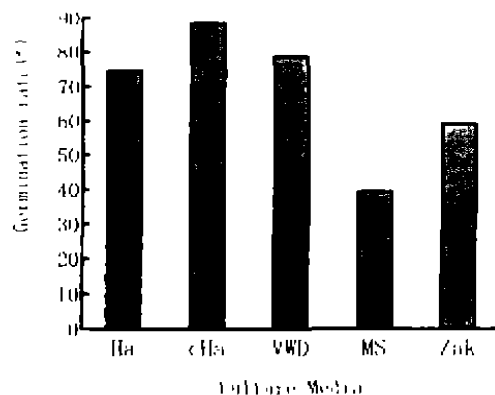


图 2 培养基对种子萌发率的影响

Fig. 2 The effect of medium on seeds germination of *C. florum*

2 实验结果

2.1 激素 对于黄花杓兰的种子无菌萌发,KT 和 BA 的添加明显提高种子的萌发率。低浓度的 KT (0.4mg/L) 和 BA (0.2mg/L) 就能达到理想的效果。但如果 KT 或 BA 添加的浓度过高,不仅浪费药品,还会使种子萌发率有所减低。总的来说,KT 和 BA 两种激素

的作用效果差不多。图 1 表示了第 16 周时两种激素对黄花杓兰种子萌发率的影响。

2.2 培养基 在 Harvais、改良型 Harvais、VWD (Van Waes 等, 1986)、MS、Zak (Arditti 等, 1982) 五种培养基中, 改良型 Harvais 培养基取得了很好的种子萌发率, 第 16 周时萌发率高达 88.4%。Harvais 和 VWD 培养基的效果也很好。MS 和 Zak 培养基不适合培养黄花杓兰的种子, MS 培养基中种子萌发率低, 而且种子萌发形成的原球茎容易死亡。Zak 培养基虽然有较高的种子萌发率, 但所形成的原球茎生长发育十分缓慢, 也容易死亡。图 2 说明了第 16 周时黄花杓兰种子在各种培养基中的萌发情况。

2.3 无机氮素 Harvais 培养基中 NH_4NO_3 的含量为 1400 mg/L。如此高浓度的 NH_4NO_3 是否有利于黄花杓兰种子的萌发? 本实验证明了少量的 NH_4NO_3 有利于黄花杓兰种子的无菌萌发, 适宜的浓度范围是 100 ~ 400 mg/L。当浓度超过 800mg/L, 种子的萌发就会受到抑制。图 3 说明了第 16 周时 NH_4NO_3 浓度对种子萌发的影响。

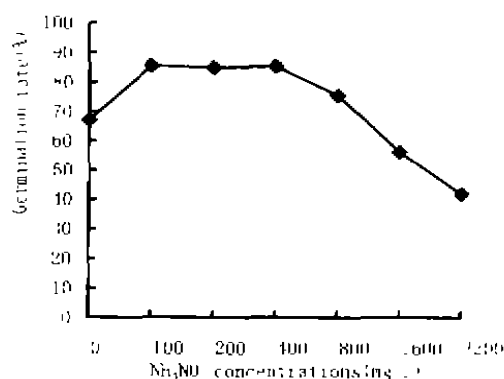


图 3 硝酸氮浓度对种子萌发率的影响

Fig.3 The effect of NH_4NO_3 concentration on seeds germination of *C. flavum*

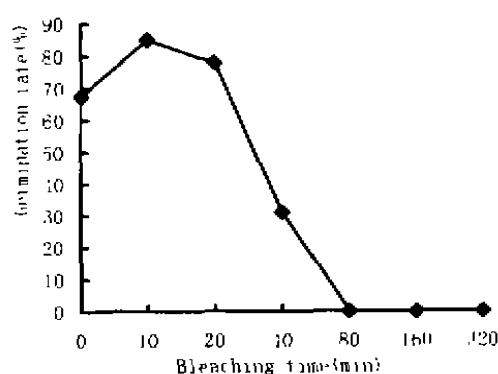


图 4 种子预处理时间对种子萌发率的影响

Fig.4 The effect of bleaching on seeds germination of *C. flavum*

2.4 附加物 实验中, Harvais 培养基中分别添加了 5% 的椰乳, 土豆和香蕉。这三种附加物的添加对黄花杓兰种子萌发没有明显的影响, 效果最好的椰乳也仅比对照高出 10 个百分点, 但附加物的添加有利于原球茎以后的生长发育。

2.5 pH 值 微酸性的基质比较适合黄花杓兰种子的萌发。实验中, pH 值高于 6.7 和低于 4.9 的情况下种子的萌发率都会有明显的降低, 但 pH 值在两者之间的基质上种子萌发率变化不大。

2.6 种子预处理 用 0.5% NaClO 溶液处理黄花杓兰种子, 处理时间对种子萌发率有很大的影响。在 10 min 处理下, 萌发率比对照提高 15 个百分点, 而时间超过 20 min 后, 种子萌发率急剧下降, 处理时间达到或超过 80 min, 种子就完全失去活力。如图 4 所示。

3 分析与讨论

杓兰种子无菌萌发实验中, 种子的成熟度是种子萌发快慢的一个关键问题。在授粉后某一个时期, 种子已经具有萌发能力, 但种子内萌发抑制物质还没有形成。采用这一时期的种子作为材料进行无菌萌发, 种子萌发整齐, 萌发速度快。如果采种时间过早, 种子就

不能萌发, 如果采种时间太晚, 种子内形成了萌发抑制物质, 种子萌发就比较困难。各种构兰种子的最适采种时间各不相同, 大多数构兰种类的最适采种时间大约在授粉后第 8 周 (De 等, 1993)。对于黄花构兰, 本实验采用了授粉后第 15 周的蒴果, 从实验情况来看, 这是一个比较合适的采种时间。

Steele (1995) 认为 KT 等细胞分裂素在促进构兰种子萌发过程中的作用是拮抗种子中 ABA 的抑制作用, 使种子脱离休眠状态, 从而促进种子的萌发。一般成熟的构兰种子种皮呈褐色, 胚中有萌发抑制物质的存在, 所以萌发比较困难, 需要经过低温处理和较长时间的种皮处理后才能萌发。本实验所用的黄花构兰种子种皮颜色极浅, 几乎近白色, 接种后 3 周就开始萌发, 这说明了种子内部还没有形成或存在极少的萌发抑制物质, 即种子在未进入休眠状态时已被采用为实验材料。种子在低浓度的 KT 和 BA 的作用下萌发率成倍的提高。说明了 KT 和 BA 促进构兰种子萌发的机理不仅仅是拮抗 ABA 的作用, 而更重要的是作为一种萌发诱导物质直接起作用。在黄花构兰种子萌发中, 外源细胞分裂素起到了明显促进萌发的作用, 但高浓度激素的使用会使种子萌发形成的原球茎容易死亡, 并影响以后原球茎的正常发育。因此, 在黄花构兰种子无菌繁殖如何使用激素, 还需要进一步的研究和探讨。

兰花种子的种皮是阻碍种子萌发的主要因素之一, 通过机械和化学处理方法破损种皮可以明显提高种子的萌发率。Harvais (1982) 认为种皮的破损有利于种皮内的胚充分接触到空气、水和养分, 从而促进种子的萌发, 本实验中黄花构兰种子在 0.5% 的 NaClO 溶液中处理 10 min 萌发率明显提高, 有力支持了这一观点。用化学试剂特别是强腐蚀性的化学试剂如 NaClO 处理种子时, 处理时间的掌握特别重要, 时间过长就会使种子失去活力甚至死亡。

实验中, 改良型 Harvais 培养基得到了很高的种子萌发率, 说明有机氮比无机氮更有利于黄花构兰种子的萌发。对于黄花构兰种子萌发, 附加物和 pH 值的影响并不明显, 但对构兰胚胎以后的生长发育产生影响。适宜的附加物和 pH 值使黄花构兰原球茎生长迅速, 实生苗粗壮, 有利于实生苗的移栽成活。总的来说, 本研究探索了一条比较适合黄花构兰种子萌发的方法, 那就是采用授粉后第 15 周的黄花构兰种子作为材料, 用 0.5% 的 NaClO 溶液处理种子 10 min, 播于 Harvais 改良型培养基表面, 黑暗中 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 培养。培养基添加 0.4mg/L 的 KT 或者 0.2mg/L 的 BA, pH 值调至 5.2 ~ 6.4 之间。如果种子活力较好, 实验将会取得满意的种子萌发率。

〔参考文献〕

- Arditti J, Clement G, Fast G, et al. 1982. Orchid Biology: Reviews and Perspectives, II [M]. New York: Cornell University Press, 243
- Harvais G. 1973. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture [J]. *Can J Bot*, 51: 327 ~ 332
- Harvais G. 1982. An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically [J]. *Can J Bot*, 60: 2547
- De Pauw M A, Remphrey W R. 1993. In vitro germination of three *Cypripedium* species in relation to time of seed collection, media, and cold treatment [J]. *Can J Bot*, 71: 879 ~ 885
- Steele W K. 1996. Large scale seedling production of North American *Cypripedium* species. In: C. Allen (ed.), North American Native Terrestrial Orchid Propagation and Production [M]. Germantown Maryland: North American Native Terrestrial Orchid Conference, 11 ~ 26
- Van Waes J M, Debergh P C. 1986. In vitro germination of some western European orchids [J]. *Physiol Plant*, 67: 253 ~ 261