

蝴蝶兰未受精胚珠离体培养的研究

伍成厚^{1,2,3*} 潘一山¹ 罗开梅¹ 叶秀焱^{2*} 梁承邨²

(¹漳州师范学院生物系, 福建漳州 363000; ²中国科学院华南植物园, 广东广州 510650; ³广州市园林科学研究所, 广东广州 510405)

摘要: 以蝴蝶兰大孢子母细胞时期的胚珠为外植体进行了离体培养的研究。结果表明, 在 VW + BA 0.2 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + 蔗糖 2.0% + 植物凝胶 0.3% 中蝴蝶兰的大孢子母细胞可以发育至二核胚囊; 在 VW + BA 0.2 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + 蔗糖 2.0% + 植物凝胶 0.3% + 椰子汁 10% 中大孢子母细胞可以发育至四核胚囊或形成胚性细胞团, 这些胚性细胞团有可能发育成单倍体植株。

关键词: 蝴蝶兰; 胚珠; 胚性细胞团; 组织培养

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 04-0891-04

In Vitro Culture of Unfertilized Ovules in *Phalaenopsis*

Wu Chenghou^{1,2,3*}, Pan Yishan¹, Luo Kaimei¹, Ye Xiulin^{2*}, and Liang Chengye²

(¹Department of Biology, Zhangzhou Normal College, Zhangzhou, Fujian 363000, China; ²South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510650, China; ³Guangzhou Institute of Landscape and Garden, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: The effects of medium composition on the in vitro culture of unfertilized ovules of a *Phalaenopsis* hybrid were studied. The results showed that the megasporocytes of the hybrid were capable of undergoing meiosis to form bi-nucleate embryo sacs in vitro by ovule cultures on the medium of VW + BA 0.2 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + sucrose 2.0% + phytigel 0.3%. On the medium of VW + BA 0.2 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + sucrose 2.0% + phytigel 0.3% + coconut milk 10%, the megasporocytes would develop into 4-nucleate embryo sacs or embryogenic cell masses. These embryogenic cell masses may develop into haploid plants.

Key words: *Phalaenopsis*; Ovule; Embryogenic cell masses; Tissue culture

1 目的、材料与方法

未受精子房或胚珠离体培养, 不仅是继花药培养之后单倍体育种的又一条可行途径^(1,2), 而且开辟了植物组织培养与被子植物胚胎学研究的新领域——在离体条件下对大孢子、雌配子体的发育及其胚胎发生进行研究与控制⁽¹⁾。

兰科蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis*) 植物经过长期杂交育种培育出许多具有观赏价值的品种, 其组织培养的研究主要是种子培养⁽³⁾和花梗的快速繁殖^(4,5), 未受精胚珠离体培养的研究尚未见报道^(6,7)。作者以蝴蝶兰杂交种 (*Phalaenopsis* hybrid) 为材料, 进行了未受精胚珠离体培养的研究, 描述了蝴蝶兰大孢子母细胞的离体发育过程⁽⁷⁾。本文报道培养基成分对试验结果的影响, 为进一步建立蝴蝶兰单倍体育种体系提供参考。

试材为中国科学院华南植物园温室栽培的蝴蝶兰杂交种 (*Phalaenopsis* hybrid)。在 2000 年 12 月 ~ 2003 年 3 月开花期间进行人工授粉, 采集授粉 44 d 发育正常的子房 (此时胚珠已经分化内、外

收稿日期: 2005-11-15; 修回日期: 2006-04-27

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

* 通讯作者 Author for correspondence

珠被, 胚囊处于大孢子母细胞时期)^[8], 常规消毒后, 在超净工作台内取中部带有少量子房壁的胚珠作为外植体。基本培养基为 MS、N₆、B₅、VW 培养基。蔗糖浓度 2% ~ 6%, 植物凝胶 0.3%, 单独或组合加入 0 ~ 2.0 mg · L⁻¹ 的 NAA、BA, 椰子汁 0 ~ 10%, 水解酪蛋白 0 ~ 400 mg · L⁻¹, 蛋白胨 0 ~ 2 000 mg · L⁻¹, pH 5.0 ~ 6.0。暗培养, 温度 (26 ± 0.5) °C。材料采用石蜡切片法制片、观察。

2 结果分析与讨论

2.1 基本培养基对蝴蝶兰未受精胚珠发育的影响

在 MS 和 N₆ 培养基上, 子房壁的细胞大量增生、突起, 不利于蝴蝶兰未受精胚珠的发育。胚珠离体培养 4 d 即由乳白色转变为浅黄色至黄褐色。珠被细胞的细胞质很快消失, 细胞核中的染色质凝集并随后溶解, 只剩下细胞壁。由于珠被细胞很快解体, 大孢子母细胞不能继续发育。在 B₅、VW 这两种培养基上, 体细胞组织增生较少, 胚珠褐化速度较慢, 较长时间呈乳白色, 珠被细胞解体较迟, 胚囊能进一步发育。在 B₅ 培养基上, 培养 4 d 胚珠的大孢子母细胞能发育至二分体, 但随后也解体退化。在 VW 培养基上, 胚珠的大孢子母细胞能经二分体 (图版, 1、2) 发育至二核胚囊 (图版, 3)。

2.2 BA、NAA 对蝴蝶兰未受精胚珠发育的影响

植物生长调节剂对蝴蝶兰未受精胚珠离体发育是非常必需的 (表 1)。在培养基未添加植物生长调节剂时, 蝴蝶兰胚珠离体培养 4 d, 约 97.0% 的胚珠解体, 培养 13 d 胚珠全部解体。培养基单独添加 0.1 ~ 0.2 mg · L⁻¹ 的 NAA 或 BA 均能降低珠被细胞解体的程度。但 NAA 和 BA 浓度较高时不利于胚珠的发育。当 NAA 浓度达到 1.0 mg · L⁻¹ 时, 子房壁产生大量白色、松散的愈伤组织, 胚珠解体退化。BA 的浓度增高到 1.0 mg · L⁻¹ 时, 胚珠也迅速褐化, 胚囊很快解体。

单独添加 NAA 或 BA, 大孢子母细胞只能启动减数第 1 次分裂形成二分体; 只有同时添加 NAA 0.2 mg · L⁻¹ 和 BA 0.2 mg · L⁻¹ 时才能继续进行减数第 2 次分裂, 形成二核胚囊。

2.3 蔗糖浓度和 pH 值对蝴蝶兰未受精胚珠发育的影响

蔗糖浓度较低 (2%), 珠被细胞解体较迟, 胚囊能进一步发育; 蔗糖浓度为 4% 和 6% 时, 珠被细胞解体速度逐渐加快。由于珠被细胞解体后胚囊难以继续发育, 因此在进行蝴蝶兰未受精胚珠的离体培养中, 蔗糖浓度以 2% 为宜。

培养基 pH 值为 5.3 或 5.6 时, 珠被细胞解体较慢, 胚囊能发育至二核或四核胚囊 (图版, 4、5);

当 pH < 5.3 或 pH > 6.0 时, 珠被细胞均加快解体, 胚囊仅能发育至二分体随即退化。

2.4 有机添加物对蝴蝶兰未受精胚珠发育的影响

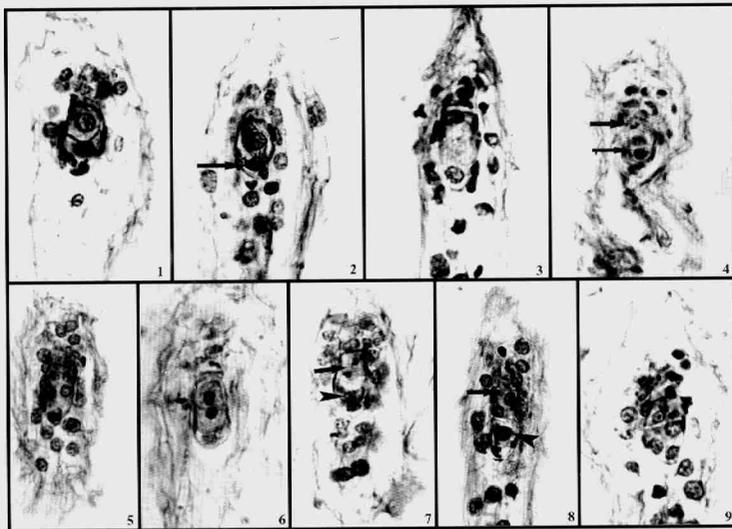
培养基中添加水解酪蛋白 400 mg · L⁻¹ 或蛋白胨 2 000 mg · L⁻¹ 对蝴蝶兰未受精胚珠的发育没有促进作用, 胚囊发育至二分体时期即退化。在添加 10% 椰子汁后, 约 30% 的胚珠能发育至二核胚囊 (图版, 3) 或四核胚囊 (图版, 5), 但与体内胚囊不同的是这些胚囊不能正常液泡化, 在胚囊中部

表 1 离体培养 13 d 植物生长调节剂对蝴蝶兰胚珠发育的影响
Table 1 Effect of combinations of plant growth regulators on differentiation in vitro development of *Phalaenopsis* ovules cultured for 13 days

BA (mg · L ⁻¹)	NAA (mg · L ⁻¹)	胚珠数量 Number of ovules				
		观察总数 Total ovules	大孢子母细胞 Megaspore mother cell	二分体 Dyad	二核胚囊 Bi-nucleate embryo sac	解体的胚珠 Disrupted ovules
0	0	100	0	0	0	100
	0.1	100	17	2	0	81
	0.2	100	25	0	0	75
	1.0	100	29	2	0	69
	2.0	100	0	0	0	100
0.1	0	100	14	1	0	85
	0.1	100	13	0	0	87
	0.2	100	5	0	0	95
	1.0	100	14	1	0	85
	2.0	100	0	0	0	100
0.2	0	100	12	1	0	87
	0.1	100	26	3	0	71
	0.2	100	23	3	2	72
	1.0	100	10	0	0	90
	2.0	100	0	0	0	100
1.0	0	100	10	0	0	90
	0.1	100	6	1	0	93
	0.2	100	5	1	0	94
	1.0	100	26	2	0	72
	2.0	100	0	0	0	100

没有形成中央大液泡,而形成的子核游离于胚囊内,不是位于胚囊的两端。

添加 10% 椰子汁时,约有 5% 的胚囊发育途径发生了改变。在二分体后期珠孔端的 1 个二分体细胞不退化(图版,6)而合点端的另一个细胞就进行第 2 次分裂(图版,7),从而在 1 个胚囊内形成 3 个细胞(图版,8),这些细胞多次分裂,最终在 1 个胚囊内形成了细胞团(图版,9),这些细胞具有较大的细胞核和很浓的细胞质,呈现胚性细胞的特征。这些胚性细胞团有可能进一步诱导单倍体植株,从而为兰科植物的育种开辟一条新的途径。



图版说明:珠孔端向下 1. 二分体, $\times 550$; 2. 二分体,珠孔端的 1 个细胞已经退化(\uparrow),合点端的细胞体积增大,成为功能大孢子, $\times 550$; 3. 二核胚囊, $\times 550$; 4. 二核胚囊正在进行分裂(\uparrow), $\times 550$; 5. 四核胚囊, $\times 550$; 6. 两个细胞相等的二分体, $\times 550$; 7. 示二分体珠孔端的细胞不退化(Δ),合点端的另一个二分体细胞正在分裂(\uparrow), $\times 550$; 8. 示 1 个胚囊内形成的 3 个细胞(\uparrow , Δ), $\times 550$; 9. 示胚囊内形成的胚性细胞团, $\times 550$ 。

Explanation of plates: The micropylar ends downward 1. Dyad, $\times 550$; 2. Dyad, showing the cell (\uparrow) at micropylar end has degenerated and the chalazal one continues to enlarge, $\times 550$; 3. Binucleate embryo sac, $\times 550$; 4. Binucleate embryo sac in dividing (\uparrow), $\times 550$; 5. 4-nucleate embryo sac, $\times 550$; 6. Dyad, showing the two cells as the same size, $\times 550$; 7. Dyad, showing the chalazal cell (Δ) is dividing and the micropylar one (\uparrow) does not degenerate, $\times 550$; 8. Three cells (\uparrow , Δ) formed in an embryo sac, $\times 550$; 9. Embryogenic cell masses formed in an embryo sac, $\times 550$.

参考文献:

- 周 燯, 杨弘远. 未传粉子房与胚珠的离体培养. 武汉大学学报(自然科学版), 1982 (3): 61-72
Zhou C, Yang H Y. In vitro culture of unpollinated ovaries and ovules in angiosperms. J. Wuhan Univ. (Nat. Sci.), 1982 (3): 61-72 (in Chinese)
- Mukhambetzhano S K. Culture of unfertilized female gametophytes in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 48: 111-119
- 曾宋君, 彭晓明, 张京丽, 赵逢群. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖. 武汉植物学研究, 2000, 18 (4): 344-346
Zeng S J, Peng X M, Zhang J L, Zhao F P. A study on tissue culture and rapid propagation of *Phalaenopsis* hybrids. Journal of Wuhan Botanical Research, 2000, 18 (4): 344-346 (in Chinese)

- 4 陈之林, 叶秀舜, 梁承邺. 蝴蝶兰花葶的离体培养. 园艺学报, 2003, 30 (2): 242 ~ 244
Chen Z L, Ye X L, Liang C Y. In vitro culture of the inflorescence of *Phalaenopsis*. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30 (2): 242 ~ 244 (in Chinese)
- 5 李 军, 柴向华, 曾宝瑛, 张秀珊, 王细燕, 詹海洋, 朱饱卿. 蝴蝶兰组培工厂化生产技术. 园艺学报, 2004, 31 (3): 413 ~ 414
Li J, Chai X H, Zeng B D, Zhang X S, Wang X Y, Zhan H Y, Zhu B Q. Mericlone production of *Phalaenopsis*. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (3): 413 ~ 414 (in Chinese)
- 6 Arditi J, Pridgeon A M. Orchid biology: reviews and perspectives, Vol. 7. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1997. 31 ~ 72
- 7 伍成厚. 兰科 (Orchidaceae) 植物未受精胚珠离体培养及其胚胎学的研究: [博士论文]. 广州: 中国科学院华南植物研究所, 2003. 37 ~ 45
Wu C H. In vitro culture and embryological studies on unfertilized ovules in Orchidaceae; [Ph. D. Dissertation]. Guangzhou: South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, 2003. 37 ~ 45 (in Chinese)
- 8 伍成厚, 梁承邺, 叶秀舜. 低温对蝴蝶兰胚珠发育的影响. 热带亚热带植物学报, 2004, 12 (2): 129 ~ 132
Wu C H, Liang C Y, Ye X L. The effects of low temperature on ovule development of *Phalaenopsis*. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2004, 12 (2): 129 ~ 132 (in Chinese)

基质栽培仙客来矿质营养吸收规律的研究

汤少红¹ 石伟勇^{1*} 余琼芳² 张荣盛² (¹浙江大学环境与资源学院, 环境修复与生态健康教育国家重点实验室, 浙江杭州 310029; ²浙江森禾种业股份有限公司, 浙江杭州 310020)

Studies on Macronutrient Absorption in *Cyclamen* Cultivated in Soilless Medium

Tang Shaohong¹, Shi Weiyong^{1*}, Yu Qiongfang², and Zhang Rongsheng² (¹College of Environmental and Resource Sciences, Ministry of Education Key Lab of Environmental Remediation and Ecosystem Health, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China; ²Zhejiang Senhe Seed Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310020, China)

关键词: 仙客来; 干物质; 矿质营养; 吸收

中图分类号: S 682.2⁺62 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2006) 04-0894-01

近几年, 仙客来 (*Cyclamen persicum*) 设施栽培产业在我国迅速发展, 但由于引进的国外品种在我国栽培条件下缺乏相应的技术研究, 导致仙客来生产优质品率低、生产成本低。因此, 探讨设施栽培条件下仙客来的营养吸收规律, 对制定优质仙客来生产的施肥技术具有指导意义。

本试验以日本的 NP 系列 F₁ 代 NP3 品种为试材。2002 年 12 月下旬播种于 288 穴育苗盘, 2003 年 3 月底移苗到 50 孔穴盘, 2003 年 5 月上旬换盆定植于泥炭: 珍珠岩: 蛭石 = 5: 1: 1 (pH 6.0, EC 0.8 mS/cm, 速效 N 161.88 mg/kg, 速效 P 29.73 mg/kg, 速效 K 110 mg/kg), 试验规模为 6 000 盆, 田间管理按浙江森禾种业公司技术体系最优化措施进行。从 2003 年 6 月 25 日开始采样到 2003 年 12 月 5 日盛花期, 每隔 30 d 左右取 1 次, 每次 20 株。仙客来用蒸馏水冲洗干净, 将根、球茎、叶分开, 称其鲜样质量。在 105℃ 下杀青 30 min, 60℃ 烘至恒重, 称量。干样磨碎过筛后用 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮, 采用扩散法、钒钼黄比色法、火焰光度法、原子吸收分光光度法分别测定氮、磷、钾、钙、镁含量。根据各生育期的干样质量和植株单位干样质量的矿质元素含量, 计算出植株矿质元素的积累量和各生育期养分积累率。

结果表明, 在浙江杭州, 仙客来在 10 月份生长进入旺期, 干物质积累量最大; 仙客来对矿质营养元素的吸收每株平均 N 为 0.99 g, P 为 0.17 g, K 为 0.97 g, Ca 为 0.26 g, Mg 为 0.12 g。植株干物质质量 (x) 与矿质元素的积累量 (y) 的回归方程为 $y = 0.0419 + 0.0608x$, $r = 0.9938^{**}$ 。仙客来在越夏前 (5 月上旬到 7 月上旬) 生长逐渐加快, 养分吸收增加, 但越夏期间 (7 月中旬到 9 月下旬) 生长缓慢, 对矿质营养元素的吸收较少。越夏后, 生长迅速, 对矿质营养元素的吸收积累出现高峰, 其中 N、P、Ca、Mg 的吸收高峰出现在 10 月份, 养分积累率分别为 42.85%、39.38%、55.17%、66.97%; K 的吸收高峰出现在 11 月份, 积累率为 44.02%。仙客来植株体内 N、P、K、Ca、Mg 积累量的比值, 越夏前为 59: 22: 60: 20: 10, 越夏后为 88: 22: 82: 17: 10; 盛花期为 82: 14: 81: 21: 10。因此, 可根据仙客来植株的干物质积累量来确定其各生育期矿质元素的需求量, 从而确定仙客来各生育期需要肥料的比例和用量。

收稿日期: 2005-10-19; 修回日期: 2006-03-21

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wyshi@zju.edu.cn)