

霍山石斛种子萌发及原球茎发育的解剖结构观察

张 凤, 朱 艳^①, 许 娜, 宋裕丞, 秦民坚^①

(中国药科大学中药学院 中药资源系 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009)

Observation on anatomical structures of seed germination and protocorm development of *Dendrobium huoshanense*

ZHANG Feng, ZHU Yan^①, XU Na, SONG Yucheng, QIN Minjian^① (Department of Resources Science of Traditional Chinese Medicines, School of Traditional Chinese Pharmacy, State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(3): 115-117

Abstract: Changes in anatomical structures of longitudinal section during processes of seed germination and protocorm development of *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng were observed. The results show that embryo of *D. huoshanense* seed breaks through seed coat after water swelling, and protocorm is formed by four morphological changes of proembryo, globular embryo, heart-shaped embryo and torpedo-shaped embryo after culturing for 30 d. Apical meristem of protocorm can be evidently divided into tunica layer L1, tunica layer L2, and corpus layer L3 from outside to inside, and its development follows the "tunica-cornus theory". Structure of protocorm has polarity, and the end away from embryo suspensor is able to differentiate leaf primordium, then develops into cotyledon, meanwhile, the other end grows many white villous rhizoids, and protocorm stage enters rhizome stage with increasing of vascular bundles inside it; when the rhizome gradually becomes larger, vascular bundles in rhizome extend to the basal part and form vascular bundles in root, and develop into 3-5 adventitious roots, then form an intact plant.

关键词: 霍山石斛; 种子萌发; 原球茎发育; 解剖结构

Key words: *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng; seed germination; protocorm development; anatomical structure

中图分类号: Q949.71⁺8.43; Q944.5; Q945.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)03-0115-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.03.16

霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng) 根茎具有益精强阴、生津止渴和补虚羸等功效^[1], 被批准实施地理标志产品保护^[2]。为解决霍山石斛种子在自然条件下萌发困难和繁殖周期长等难题, 已成功建立其离体快繁体系并工厂化生产^[3], 并对其植株营养器官的解剖结构^[4]及采用茎段诱导类原球茎的发育过程^[5]进行了研究。为进一步明确霍山石斛种子萌发和幼苗生长发育的原理, 作者采用植物组织培养和石蜡切片技术, 对霍山石斛种子萌发及原球茎发育过程中细胞和组织结构的变化进行了解剖观察, 以期为霍山石斛的组培繁育机制和细胞组织学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试霍山石斛成熟未开裂的蒴果采自安徽省霍山县太平畈乡王家店村, 经中国药科大学中药学院秦民坚教授鉴定, 凭

证标本存放于中国药科大学中药学院中药资源系。

1.2 方法

1.2.1 种子萌发和取样 将蒴果用洗衣粉水(5 g 洗衣粉加入 300 mL 水)浸泡 15 min, 流水冲洗 30 min; 置于无菌条件下, 用体积分数 75% 乙醇浸泡振荡 45 s, 无菌水润洗 2 次; 再用体积分数 30% NaClO 溶液浸泡振荡 15 min, 无菌水润洗 5 次; 吸干蒴果表面水分, 横向切开, 将种子接种于萌发培养基(1/2MS, 含 0.2 mg · L⁻¹ NAA、30.0 g · L⁻¹ 蔗糖和 5.6 g · L⁻¹ 琼脂粉, pH 6.0); 于温度(23±2) °C、光照时间 11 h · d⁻¹、光照度 1 500~2 000 lx 条件下培养。每 5 d 取样 1 次, 各取样 8~10 份; 不同取样期种子均用 FAA 固定, 备用。

1.2.2 原球茎发育和取样 待种子长至 0.5~1.0 cm 的原球茎后, 转入增殖壮苗培养基(1/2MS, 含 0.2 mg · L⁻¹ NAA、1.0 mg · L⁻¹ 6-BA、1.0 g · L⁻¹ 活性炭、30.0 g · L⁻¹ 蔗糖和 5.6 g · L⁻¹ 琼脂粉, pH 6.0); 5~8 个为 1 簇, 每瓶接种 6~8 簇; 于温度(23±2) °C、光照时间 12 h · d⁻¹、光照度 2 000~2 500 lx

收稿日期: 2017-11-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(3010020037)

作者简介: 张 凤(1991—), 女, 安徽宿州人, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源与质量评价的研究。

^①通信作者 E-mail: cpuzy@126.com; minjianqin@163.com

条件下培养。分别取培养 10、30 和 45 d 以及约 50 d 的具叶片和不定根的幼苗,各取样 8~10 份;去除叶片,沿茎基部切成 7 mm 小段,不定根切成 5 mm 小段,用 FAA 固定,备用。

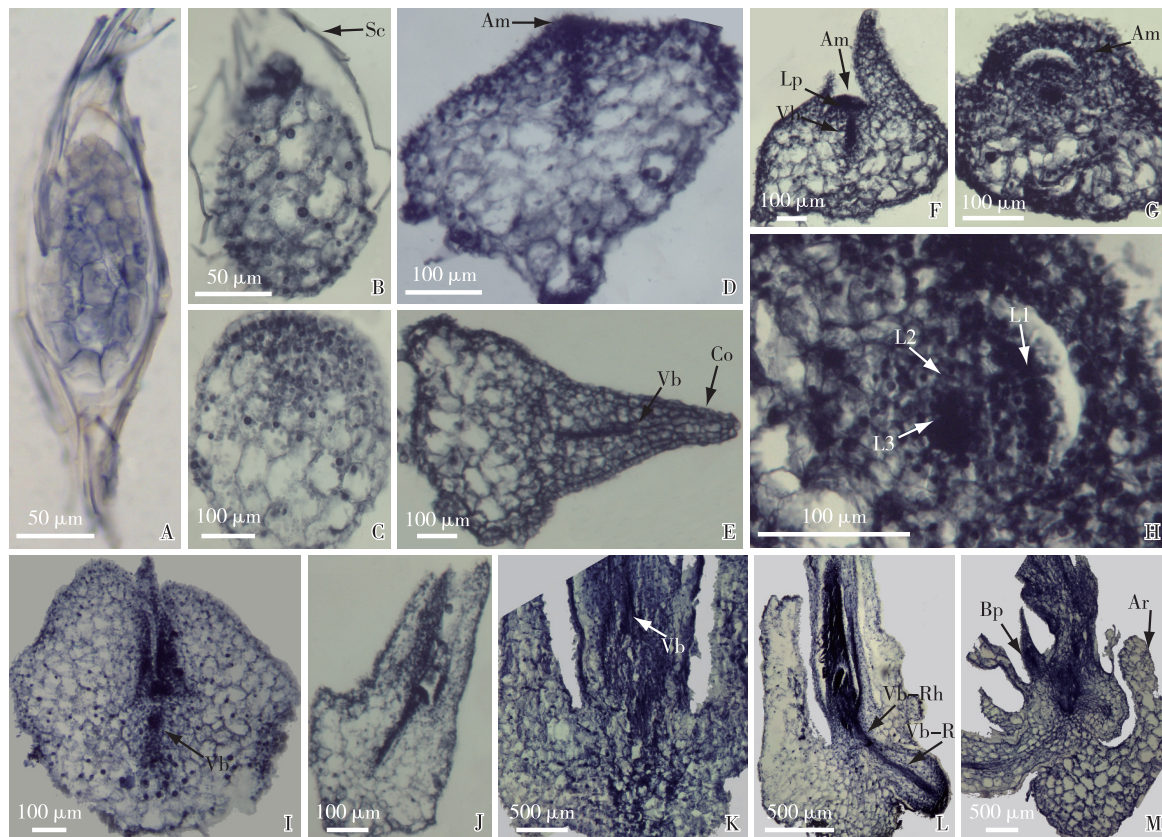
1.2.3 制片和观察 采用石蜡切片法^[6]制片,纵切,每个样本至少 40 个载玻片。采用 1X71 光学显微镜(日本 Olympus 公司)观察,选择结构清晰、染色效果较好的视野拍照。

2 结果和分析

2.1 种子萌发过程中细胞和组织结构的变化

结果(图 1)显示:霍山石斛种子具种皮和种胚,无胚乳。种皮由 1 层透明的薄壁细胞组成,无内含物;种胚呈椭圆形,表面为 1 层体积小且排列紧密的细胞,内含物较多(图 1-A)。培养 5 d 后,种胚体积明显增大,内含物被消耗,细胞结构逐

渐清晰,一端突破种皮(图 1-B);继续培养,种胚一端出现极性,细胞增大,分裂缓慢;另一端分化出较多体积小、细胞质浓的细胞,体现分生细胞的特点;这些细胞不断增殖分化逐渐向外凸起,向种皮合点端靠近,并随种胚体积进一步扩大。培养 8~10 d 后,种胚突破种皮形成原球茎(图 1-C);种胚发育成圆球体(即球形胚);合点端细胞发育形成体积小、细胞质浓的顶端分生组织细胞,而另一端细胞体积较大。培养约 15 d 后,原球茎顶端的原分生组织进一步分化出叶原基,叶原基细胞排列致密,细胞质浓,外层细胞小且排列规则,中间细胞体积较大;球形胚发育形成心形胚(图 1-D)。培养 20 d 后,叶原基发育为子叶,细胞不断分化,体积变大,形成幼叶;心形胚发育形成鱼雷形胚(图 1-E)。培养 30 d 后,叶原基基部细胞分裂旺盛,向外继续分裂,向内分化出 1 束明显的维管束;表皮始终为 1 层体积小且排列紧密、细胞核大的细胞,中间及基



Sc: 种皮 Seed coat; Am: 顶端分生组织 Apical meristem; Co: 子叶 Cotyledon; Vb: 维管束 Vascular bundle; Lp: 叶原基 Leaf primordium; L1, L2: 原套层 Tunica layer; L3: 原体层 Corpus layer; Vb-Rh: 根状茎维管束 Vascular bundle in rhizome; Vb-R: 根维管束 Vascular bundle in root; Ar: 不定根 Adventitious root; Bp: 芽点 Bud point.

A-F: 分别为萌发 0、5、10、15、20 和 30 d 的种子纵切面 Longitudinal section of seed at 0, 5, 10, 15, 20, and 30 d of germination, respectively; G: 原球茎顶端分生组织 Apical meristem of protocorm; H: 原套-原体结构 Tunica-corpora structure; I: 具 2 枚叶的原球茎 Protocorm with 2 leaves; J: 具 3~5 枚叶的原球茎 Protocorm with 3~5 leaves; K: 根状茎的多束维管束 Many vascular bundles in rhizome; L: 根状茎和根的维管束 Vascular bundles in rhizome and root; M: 具不定根的植株 Plant with adventitious roots.

图 1 霍山石斛种子萌发及原球茎发育过程中纵切面解剖结构变化

Fig. 1 Changes in anatomical structures of longitudinal section during processes of seed germination and protocorm development of *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng

部的薄壁细胞体积较大;维管束周围围绕着分生组织细胞(图1-F),使维管束不断向基部延伸,最终连接根和叶。

2.2 原球茎发育过程中细胞和组织结构的变化

结果(图1)显示:霍山石斛原球茎顶端分生组织的纵剖面(图1-G)由外到内明显分为3层,即原套L1层、原套L2层和原体L3层(图1-H)。原套L1层的细胞规则且排列紧密、细胞体积大、细胞核大,形成表皮层;原套L2层的细胞排列有序,细胞形态与原套L1层和原体L3层细胞有差异,且细胞大小介于两者之间;原体L3层由多层细胞组成,细胞排列不规则、体积小、细胞质浓、细胞核较原套L1层小;整体上看,原套L1层和原套L2层与原体L3层的细胞垂直呈环状“T”形。

随原球茎顶端分生组织细胞在各方向不断生长分裂,在原体细胞下部形成新的叶原基;当原体L3层的多层细胞体积不断增大进入原套L1层时,叶原基即分化成子叶。继续培养,原球茎顶端子叶继续生长分化形成幼叶,同时,顶端分生区细胞向内分化形成维管束(图1-I);维管束周围包裹着排列紧密、体积小、细胞质浓、细胞核大的分裂细胞,构成原形成层。在幼叶不断增大的过程中,靠近基部的细胞体积变大转化为居间分生组织,原形成层细胞的代谢能力逐渐增大,细胞分裂旺盛,同时不断分化形成薄壁细胞(图1-J);维管束细胞分裂增多并向基部延伸,形成多束维管束,此时,由原球茎阶段进入根状茎阶段(图1-K);此阶段,茎顶端分生区由体积小、细胞核大、细胞质浓且排列紧密的基本分生组织细胞组成,这些细胞不断分裂使根状茎伸长增粗。将无菌苗转入增殖壮苗培养基后,根状茎基部逐渐膨大,根状茎内维管束向基部延伸形成根维管束;根维管束周围近基部细胞的细胞质浓、细胞核较大、液泡缩小,逐渐分化形成根原基细胞,并随根原基的不断分化和伸长,形成不定根(图1-L)。在生长过程中,霍山石斛根状茎基部及节间不断萌发出芽点,其表皮或皮层细胞不断分裂形成细胞质浓、分裂能力较强的侧生分生区,可直接分化成芽或继续延伸生长成为根状茎的分支,形成丛生根状茎后再继续分化出芽(图1-M)。

3 讨 论

霍山石斛种子发育成苗经过种胚、原球茎、根状茎和完整植株4个阶段,其发育过程大致遵循兰科(Orchidaceae)植物种子发育的基本规律。大部分兰科植物种子成熟时种胚仍处于原胚阶段,存在分化不完全现象,在自然条件下极难萌发^[7]。而霍山石斛种子在兰科植物中较为特殊,种胚具退化子叶^[7]、胚细胞中含有供其自身生长的营养物质,加之特殊的种皮结构,借助组织培养技术使其易于萌发。观察结果显示:霍山石斛种子萌发时不形成胚根,而是种胚和种皮先吸水膨胀,待种胚体积膨大突破种皮发育成原球茎,其远离种胚极性的一端密生白色绒毛状假根,可吸收培养基中营养物质供原球茎的生长发育,此萌发过程与石斛属(*Dendrobium* Sw.)种

类^[8]和独蒜兰[*Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe]^[9]等相似。通过原球茎增殖培养可迅速获得大量生长能力较强的试管苗,此过程也是霍山石斛离体快繁的关键。

霍山石斛组织培养形成的根状茎有别于自然条件下产生的根状茎,自然条件下其根状茎增殖缓慢、出芽少,而组培条件下其根状茎的节间或基部均可分化出芽或增殖形成丛生根状茎,且分支多、增殖快。节间处分化的芽能够迅速分化出不定根,与母株分离后即为新植株;而丛生根状茎也可伸长生长,通过分株繁殖新植株;营养茎端在生长过程中不断分化出新的叶原基并发育成新叶,可以通过控制生长条件调控侧生器官叶和芽的生长发育。霍山石斛原球茎的这些繁殖特性均有利于其离体快繁。

霍山石斛原球茎性状较稳定,在其发育过程中顶端分生组织细胞的分裂方式和伸长方向各异,不同位置的细胞增殖速率也不同,形态差异明显,通过“原套-原体学说”^[10]能较合理地解释霍山石斛原球茎顶端分生组织的形态结构变化过程。霍山石斛原球茎中原套部分的细胞通常不止1层,可分为原套L1层和L2层,但在不同生长发育时期原套L2层细胞的形态结构存在差异,故原套细胞层数及区分原体的临界点仅通过石蜡切片很难准确界定。此外,在霍山石斛原球茎顶端分生区划分、细胞分裂和增殖的分子机制等方面缺乏深入了解,有待利用多学科手段进行深入研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 92.
- [2] 国家质量监督检验检疫总局. 关于批准对霍山石斛实施地理标志产品保护的公告[EB/OL]. (2007-09-03) [2017-11-18]. <http://www.ipknow.cn/fagui/show-6379.html>.
- [3] 包雪声, 顺庆生, 王新生, 等. 霍山石斛[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2012: 52-57.
- [4] 黎明, 刘保国, 卫红, 等. 霍山石斛营养器官的解剖学研究[J]. 河南农业科学, 2004(11): 58-61.
- [5] 金青, 马绍鋈, 蔡永萍, 等. 霍山石斛类原球茎诱导及其发育过程研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(10): 1525-1530.
- [6] 叶宝兴, 毕建杰, 孙印石. 植物细胞与组织研究方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 45, 54-63.
- [7] ARDITI J. Factors affecting the germination of orchid seeds[J]. The Botanical Review, 1967, 33(1): 1-97.
- [8] 李振坚, 于耀, 王雁, 等. 四种石斛兰种胚发育进程研究[J]. 广西植物, 2010, 30(3): 333-338.
- [9] 张燕, 李思锋, 黎斌. 独蒜兰种子无菌萌发过程观察和萌发培养基筛选[J]. 西北农业学报, 2010, 19(1): 136-139.
- [10] WEGNER J. A theoretical approach to the genesis of cell layer arrangements in undifferentiated tissues[J]. Plant Science, 2000, 153(2): 177-183.

(责任编辑: 郭严冬)