

春兰种子无菌播种萌发过程及其影响因素

王 芬¹, 徐步青¹, 刘幸佳¹, 夏国华², 崔永一¹

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江农林大学 林学基础实验教学中心, 浙江 临安 311300)

摘要: 研究了不同化学试剂预处理和暗培养时间对春兰 *Cymbidium goeringii* 种子初始萌发时间及萌发率的影响, 并从形态学角度观察了种子萌发的过程。无菌条件下, 分别采用氢氧化钠和次氯酸钠对春兰种子进行预处理, 将不同处理及未处理种子置于相同培养基上不同暗培养时间 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 d 下进行培养, 暗培养后转入光照下继续培养。结果表明: 暗培养以后进行光照培养是春兰种子萌发启动所必须的, 全光照或全黑暗条件下种子均未萌发, 暗培养 30 d 的种子在光照条件下培养约 35 d 时开始萌发, 初始萌发所需时间最短; 化学试剂预处理对种子萌发率的影响显著, 氢氧化钠和次氯酸钠处理组种子萌发率均高于对照组。化学试剂预处理与暗培养时间对种子的萌发率存在交互作用, 暗培养 150 d 的氢氧化钠预处理种子萌发率最高为 79.2%。春兰种子萌发过程包括以下几个状态: 未萌发状态种子、胚吸水膨胀、原球茎、根状茎。图 3 表 1 参 16

关键词: 植物学; 春兰; 无菌播种; 萌发率; 化学试剂预处理; 暗培养时间

中图分类号: Q945; S682.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2013)01-0136-05

Asymbiotic seed germination of *Cymbidium goeringii*

WANG Fen¹, XU Buqing¹, LIU Xingjia¹, XIA Guohua², CUI Yongyi¹

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Forestry Basic Experiment Teaching Demonstration Center, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The influence of different reagents and dark treatment time on initial seed germination time and germination rate of *Cymbidium goeringii* were studied, and the seed germination process was observed. Under aseptic conditions, the seeds treated with chemical NaOH and NaClO were placed in dark culture for 0, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 d cultivation followed by after dark culture then further culture for light. Results showed that seeds did not germinate with only dark or no dark treatments. For seed germination rate, the NaOH and NaClO treatments had a strong impact with the NaOH treatment being as high as 79.2%. For seed germination there was an interaction with reagent treatment and dark incubation time. Also, seeds with 30 d dark treatment began to germinate after about 35 d of light cultivation, and their initial germination time was shortest. The germination process of *C. goeringii* included the following states: original un-germinated seeds, swelling of the embryo, original bulb, green growth, and extension of the rhizome from the original bulb. Thus, this experiment showed that darkness and light were necessary for initial seed germination. [Ch, 3 fig. 1 tab. 16 ref.]

Key words: botany; *Cymbidium goeringii*; aseptic seeding; germination rate; reagent treatment; darkness time

春兰 *Cymbidium goeringii* 属兰科 Orchidaceae 多年生草本, 作为地生兰的重要品种之一, 不仅具有较高的观赏价值, 而且具有一定的药用价值。近年来随着人们物质文化水平的提高, 对春兰需求量也在

收稿日期: 2012-01-09; 修回日期: 2012-03-20

基金项目: 浙江省新苗人才计划项目(2010R412052); 浙江省温州市科技局国际合作项目(H20080049)

作者简介: 王芬, 从事园林植物良种繁育研究。E-mail: xwffsf@126.com。通信作者: 崔永一, 教授, 博士, 从事园林植物与观赏园艺学研究。E-mail: orchidcui@163.com

增加。春兰种子结构简单，成熟时为原胚阶段，无胚乳，自然状态下萌发率低，常规分株繁殖又不利于其优种选育和推广，组培技术的迅速发展使得其大量繁殖成为现实^[1]。目前，春兰的组培研究主要集中在茎尖、侧芽和根状茎诱导及其无菌材料的增值分化上，对春兰种子无菌播种及其影响因素研究较少^[2-4]。兰科植物种子无菌播种可大大提高其萌发率，并能够在短期内获得大量幼小植株，且组培苗健壮均匀，移栽成活率高，是现阶段经济有效的快速繁殖方法，也是工厂化育苗的重要途径之一。兰科植物种子进行无菌播种时剪破种皮、氢氧化钠预处理或在培养基中添加植物激素 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)均可提高种子萌发率已有相关报道^[5]。对春兰种子萌发过程中形态变化，暗培养时间对种子萌发率的影响研究较少。本实验在无菌条件下，研究了化学试剂预处理和暗培养时间对野生春兰种子萌发的影响，探讨影响春兰种子初始萌发时间和萌发率的因素，通过解剖镜观察并记录种子萌发过程中的形态学变化。

1 材料方法

1.1 材料

研究材料为采自浙江大明山种龄约为 150 d 的春兰蒴果。

1.2 方法

春兰蒴果采摘后，洗洁精刷洗干净，自来水流水冲洗 2 h，置于超净工作台内，无菌滤纸吸干表面水分待用。超净工作台内先将蒴果用体积分数为 75% 的乙醇浸泡，再用体积分数为 0.1% 的氯化汞(Hg-Cl₂)表面灭菌 20 min，无菌水冲洗干净后用无菌滤纸吸干水分待用。刀片剖开蒴果，将种子取出分为 3 等份，分别置于 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠(NaOH)，0.2 mol·L⁻¹ 次氯酸钠(NaClO)及无菌水中浸泡 10 min 进行预处理，无菌水清洗 3 次后将种子均匀播种在培养基(1/2MS +0.5 mg·L⁻¹ 6-BA +1.5 mg·L⁻¹ NAA+30 g·L⁻¹ 蔗糖+6.8 g·L⁻¹ 琼脂+1.0 g·L⁻¹ 活性炭)表面，每瓶播种量尽量相同。不同试剂处理的种子分别置于不同暗培养时间(0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 d)下处理，暗培养后转入光照下(光照强度 18~27 mol·m⁻²·s⁻¹)继续培养，5 瓶·处理⁻¹，重复 3 次。培养温度 25 ℃，光照时间为 12 h·d⁻¹。

种子萌发过程的形态学观察：采用德国 Leica S8 APO 体式解剖镜观察，种子播种初期隔 10 d 观察 1 次，开始萌发后隔 2 d 观察 1 次，观察并记录种子在萌发过程中的变化。记录种子出现萌动的时间和种子的萌发率。萌发率统计时以形成白色或绿色的肉眼可见的突起为准。

初始萌发时间，即种子播种至开始萌发的时间以天(d)计。萌发率统计自种子播种至 180 d 时种子的萌发率；统计萌发率时，各瓶取 5 个单位面积(1 cm × 1 cm)样方，在 Leica S8 APO 体式解剖镜观察统计，重复 3 次。种子的萌发率=(单位面积内萌发种子数/供试种子总数)×100%。

采用 SPSS 11.5 软件进行数据处理，其中萌发率为百分数需经过平方根的反正弦后进行多重比较和方差分析。

2 结果与分析

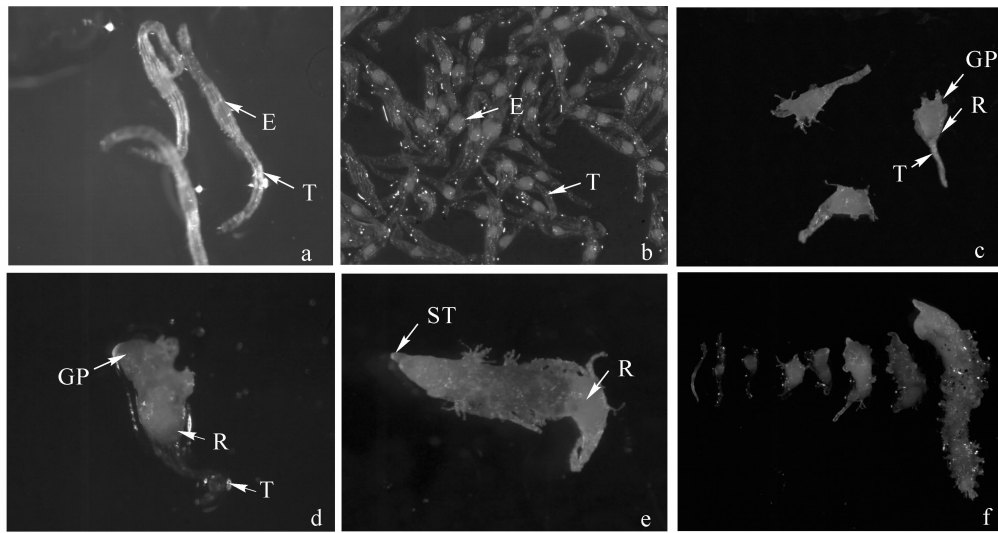
2.1 春兰种子萌发的形态学特征

春兰种子成两端稍尖的纺锤状，种皮白色透明有褐色纵条纹，中心有一细小椭圆形透明胚(图 1a)。经过一段时间的培养，种子吸水膨胀变大呈现白色(图 1b)。光照下培养 1 周后种皮一端破裂，种胚一端成圆球形，胚膨胀发育中细胞有叶绿体生成，胚由白色变成淡绿色形成原球茎状态(图 1c)。6~10 d 后原球茎延长生长，有生长点形成(图 1d)。20 d 后绿色原球茎延长形成明显的绿色根状茎，胚根发育明显，根状茎表面有白色透明绒毛，可吸收水分及营养物质(图 1e)。春兰种子的萌发经历了以下几个状态：未萌发状态、胚吸水膨胀状态、绿色原球茎状态、原球茎延长生长形成根状茎(图 1f)。

2.2 化学试剂预处理和暗培养时间对种子萌发的影响

2.2.1 化学试剂预处理和暗培养时间对种子初始萌发时间的影响 种子初始萌发时间是反应种子萌发启动快慢的指标。结果表明：氢氧化钠预处理种子和次氯酸钠预处理种子在相同暗处理时间时与对照种子初始萌发所需时间基本一致；全光照或全暗培养条件下，种子均未萌发；暗培养 30 d 的种子在光照条件下培养约 35 d 时开始萌发；暗培养 60, 90, 120 和 150 d 的种子均在光照条件下培养约 10 d 时开始萌发(图 2)。由此可见：化学试剂对春兰种子萌发启动快慢影响不大，春兰种子的萌发对暗培养时间长

短较敏感，同时又必须需要光照培养来促进其发育和根状茎的形成。



a. 未萌发种子(×30); b. 胚吸水膨胀(×20); c. 原球茎(×20); d. 原球茎延长生长(×50); e. 根状茎(×30); f. 种子萌发过程(×10)。T. 种皮; E. 胚; R. 胚根; GP. 生长点; ST. 茎尖。

图1 春兰种子无菌萌发过程

Figure 1 Process of the *Cymbidium goeringii* seed germination

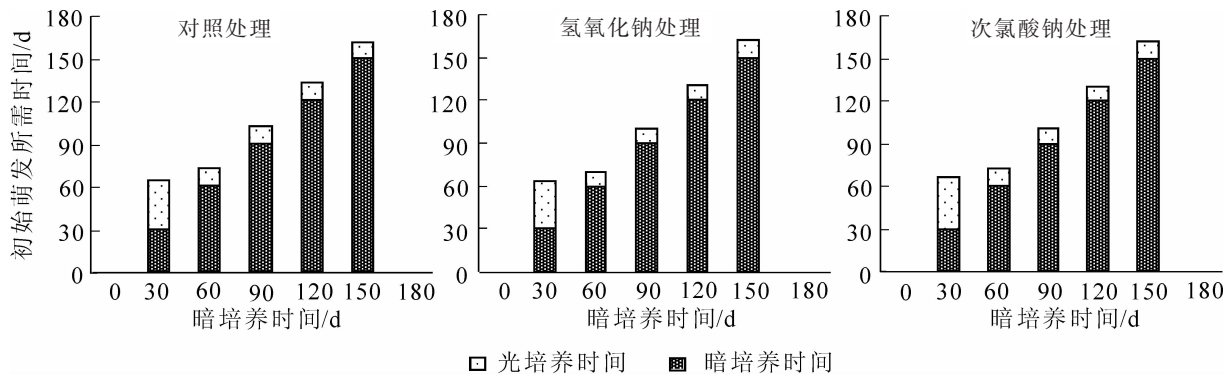


图2 化学试剂预处理和暗培养时间对春兰种子初始萌发时间的影响

Figure 2 Effect of reagents and darkness on the seed initial germination time of *Cymbidium goeringii*

2.2.2 化学试剂预处理和暗培养时间对种子萌发率的影响 春兰种子暗培养处理完成后进行光照培养，种子播种 180 d 时统计萌发率。结果表明：相同暗培养时间下，化学试剂预处理对春兰种子萌发率影响有显著差异(表 1)。氢氧化钠预处理种子萌发率高于次氯酸钠处理组(图 3)。暗培养 150 d，氢氧化钠预处理种子萌发率最高，分别为次氯酸钠处理组和对照组的 3.2 倍和 6.1 倍；暗培养 120 d，氢氧化钠预处理种子萌发率为 70.1%，次氯酸钠预处理种子萌发率为 23.2%，对照组仅为 11.0%；暗培养 90 d，氢氧化钠预处理种子萌发率分别是次氯酸钠处理组和对照组 3.0 倍和 5.8 倍。暗培养 60 d，氢氧化钠预处理种子萌发率为 36.8%，为对照组的 5.3 倍，次氯酸钠预处理种子萌发率为 23.2%，为对照组的 2.2 倍；暗培养 30 d，氢氧化钠预处理种子萌发率为 14.0%，次氯酸钠预处理种子萌发率为 12.1%，而对照组仅为 6.0%。全光照全暗培养条件下种子均未萌发。相同化学试剂处理时，暗培养

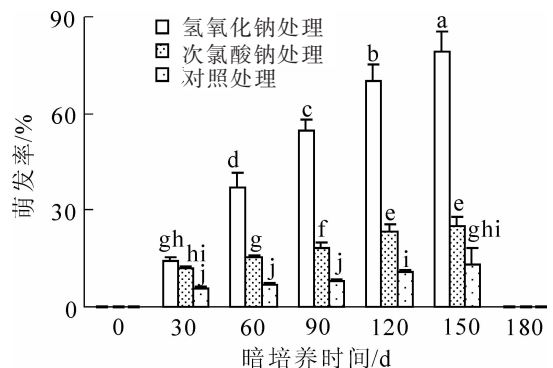


图3 化学试剂和暗培养时间对春兰种子萌发率的影响

Figure 3 Effect of reagents and darkness on seed germination rate of *Cymbidium goeringii*

时间对种子萌发率有显著影响(表 1)。暗培养 30~150 d, 随着暗培养时间的延长, 种子萌发率提高(图 3)。氢氧化钠预处理的春兰种子, 暗培养 150 d 萌发率为 79.2%, 暗培养 30 d 种子萌发率仅为 14.0%; 次氯酸钠预处理的春兰种子, 暗培养 150 d 种子萌发率为 25.2%, 而暗培养 30 d 种子萌发率仅为 12.1%。通过方差分析表明: 试剂处理和暗培养时间对种子萌发率存在交互作用, 并显著提高了种子的萌发率(表 1)。

表 1 试剂和暗培养时间对春兰种子萌发率影响的方差分析表

Table 1 Analysis of variance table of effect of reagents and darkness on seed germination rate of *Cymbidium goeringii*

差异源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
试剂	1.74	2	0.87	14 021.74	0.00
暗培养时间	2.26	6	0.38	6 091.43	0.00
试剂×暗培养时间	1.36	12	0.11	1 826.82	0.00
误差	0.01	84	6.19E-05		
总变异	9.03	105			

3 小结与讨论

兰科植物种子的萌发除受种子内部生理和培养基条件的影响外, 还受到诸多外部环境因素的影响, 如温度、湿度和暗培养等。不同兰花种子萌发对暗处理要求不同, 一些种子必须先经历暗培养才能萌发, 暗处理能有效提高其种子无菌播种的萌发率, 如暗培养是部分兜兰属 *Paphiopedilum* 植物种子萌发的必须条件, 对种子进行暗培养有利于种子萌发率的提高以及幼苗早期的生长^[6]。对鹅毛玉凤兰 *Habenaria dentata* 的研究结果^[7]表明, 在黑暗培养 20 d 后再置光照条件下培养, 种子的萌发率最高达 82.0%。而有些兰科植物种子的萌发不一定需要暗培养, 如林丹妮等^[8]研究表明云南火焰兰 *Renanthera imschootiana* 种子无菌播种时光照培养和暗培养对种子萌动的影响差异不显著, 但暗培养 3 周后对种子后期发育不利。本实验结果表明: 暗培养后进行光照培养是春兰种子萌发启动的必须条件, 尽管暗培养较短时间后进行光照培养种子萌发启动所需时间最短, 但最终萌发率并不高。而较长时间的暗培养后进行光照培养, 虽然萌发启动较慢但萌发率较高, 因此, 适宜春兰种子萌发的条件为 150 d 暗培养后进行光照培养。不同种子萌发所需要的暗处理时间不同, 主要是由于种子体内含有红光吸收型光敏色素(Pfr)和远红光吸收型光敏色素(Pfr), 种子的萌发或休眠均取决于萌发时种子内所建立起来的 Pfr 含量和 Pfr/(Pr+Pfr) 比值^[9]。春兰种子萌发需要较长时间的暗培养同时需要光照培养, 这可能是由于春兰种子萌发时要求较低水平的 Pfr, 因此需要较长时间的暗培养, 而光照培养有利于种子的发育和根状茎的形成。

化学试剂预处理可提高地生兰种子的萌发率。如黄家林等^[10]发现, 黄花杓兰 *Cypripedium flavum* 种子经过 5 g·L⁻¹ 次氯酸钠溶液处理, 萌发率可高达 90%; 段金玉等^[11]用 0.1 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液浸泡寒兰 *Cybidium kanran* 和套叶兰 *Hippeophyllum sinicum* 种子 10~30 min, 萌发率为 20%, 比对照组高 9 倍以上。本实验结果表明: 氢氧化钠预处理春兰种子萌发率最高为 79.2%, 是对照组的 6.0 倍。化学试剂预处理可促使种子萌发, 一方面可能是化学药液可以改变种子种皮的通透性, 使得水和养分能被胚利用, 从而提高种子的萌发率^[12-15]; 另一方面可能由于化学药液是种子萌发抑制物质的良好溶剂, 经过化学药液处理的种子, 抑制物质溶解在药液中, 从而解除抑制作用促进了种子的萌发^[16]。

春兰种子萌发过程从形态学角度观察分为以下几个状态: 未萌发状态种子、胚吸水膨胀、原球茎、绿色原球茎延长生长最后到根状茎。为更系统了解种子萌发过程, 可从细胞生物学的角度进行探讨萌发过程中种子细胞结构变化。

参考文献:

[1] 周辉明, 尚伟. 国兰无菌萌发的研究进展[J]. 江西农业学报, 2010, 22(10): 56-57.

ZHOU Huiming, SHANG Wei. Research progress in aseptic germination of Chinese orchids [J]. *Acta Agric Jiangxi*, 2010, 22(10): 56-57.

- [2] 石乐娟, 张放, 张是良, 等. 植物生长调节剂对线艺春兰根状茎的增殖与分化的影响[J]. 园艺学报, 2006, **33** (4): 887 - 890.
SHI Lejuan, ZHANG Fang, ZHANG Shiliang, *et al.* Effects of plant growth regulators on the rhizome's multiplication and differentiation in *Cymbidium goeringii* with verge line pattern leaves [J]. *Acta Horti Sin*, 2006, **33** (4): 887 - 890.
- [3] 赵建娜. 几种兰科植物组织培养及菌根真菌的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
ZHAO Jianna. *Preliminary study on several orchid tissue culture and mycorrhizal fungi* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2009.
- [4] 刘璐璐, 柴明良, 徐晓薇, 等. γ 射线辐照对春兰根状茎生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 核农学报, 2008, **22** (1): 23 - 27.
LIU Lulu, CHAI Mingliang, XU Xiaowei, *et al.* Effect of γ -rays irradiation on growth and antioxidant enzyme activities of rhizomes in *Cymbidium goeringii* [J]. *Acta Agric Nucl Sin*, 2008, **22** (1): 23 - 27.
- [5] 黄磊, 贺筱蓉, 郑立明, 等. 春兰种子非共生萌发的研究[J]. 种子, 2003 (2): 40 - 41.
HUANG Lei, HE Xiaorong, ZHENG Liming, *et al.* Seed germination of *Cymbidium goeringii* in asymbiotic culture [J]. *Seed*, 2003 (2): 40 - 41.
- [6] 陈之林, 叶秀彝, 梁承邨, 等. 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管培养[J]. 园艺学报, 2004, **31** (4): 540 - 542.
CHEN Zhilin, YE Xiulin, LIANG Chengye, *et al.* Seed germination in vitro of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum* [J]. *Acta Horti Sin*, 2004, **31** (4): 540 - 542.
- [7] 陈娅娅. 鹅毛玉凤花菌根真菌研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
CHEN Yaya. *Studies on the Mycorrhizal Fungi of Habenaria dentata* [D]. Guiyang: Guizhou University, 2008.
- [8] 林丹妮, 陈之林, 段俊, 等. 云南火焰兰种子无菌萌发和试管育苗[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, **16** (1): 83 - 88.
LIN Danni, CHEN Zhilin, DUAN Jun, *et al.* Seed germination in vitro of *Renanthera imschootiana* Rolfe [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2008, **16** (1): 83 - 88.
- [9] 杨期和, 宋松泉, 叶万辉, 等. 种子感光的机理及影响种子感光性的因素[J]. 植物学通报, 2003, **20** (2): 238 - 247.
YANG Qihe, SONG Songquan, YE Wanhui, *et al.* Mechanism of seed photosensitivity and factors influencing seed photosensitivity [J]. *Chin Bull Bot*, 2003, **20** (2): 238 - 247.
- [10] 黄家林, 胡虹. 黄花杓兰种子无菌萌发的培养条件研究[J]. 云南植物研究, 2001, **23** (1): 105 - 108.
HUANG Jialin, HU Hong. Seed germination requirements of *Cypripedium flavum* in axenic culture [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2001, **23** (1): 105 - 108.
- [11] 段金玉, 谢亚红. 无菌条件下激素和种子处理对兰属 10 种植物种子萌发的影响[J]. 云南植物研究, 1982, **4** (2): 197 - 201.
DUAN Jinyu, XIE Yahong. Effects of hormone and seed treatment on seed germination of *Cymbidium* [J]. *Acta Bot Yunnan*, 1982, **4** (2): 197 - 201.
- [12] INGRID N V, ANDREA F M. Influence of IAA, TDZ and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi., a medicinal orchid [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2011, **104**: 147 - 155.
- [13] CHITTA R D, AOLEMLA P. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: a multipurpose orchid [J]. *Plant Biochem Biotechnol*, 2011, **20** (1): 90 - 95.
- [14] 卜朝阳, 何荆洲, 闭志强, 等. 豆瓣兰的无菌播种与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2010, **46** (12): 1259 - 1260.
BU Zhaoyang, HE Jingzhou, BI Zhiqiang, *et al.* Asepsis sowing and in vitro propagation of *Cymbidium serratum* [J]. *Plant Physiol Commun*, 2010, **46** (12): 1259 - 1260.
- [15] 项燕, 於风安, 彭镇华. 墨兰离体快繁研究[J]. 林业科学研究, 2003, **16** (4): 434 - 438.
XIANG Yan, YU Feng'an, PENG Zhenhua. Tissue culture of *Cymbidium sinensis* [J]. *For Res*, 2003, **16** (4): 434 - 438.
- [16] 范成明, 李枝林, 何月秋. 兰花组织培养及分子生物学研究进展[J]. 园艺学报, 2003, **30** (4): 487 - 491.
FAN Chengming, LI Zhilin, HE Yueqiu. Advances on orchid tissue culture and molecular biology [J]. *Acta Horti Sin*, 2003, **30** (4): 487 - 491.