

铁皮石斛的离体开花*

王光远^{①,②} 许智宏^{①,②**} 蔡德发^② 蔡南海^③

(①中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032; ②国立新加坡大学分子和细胞生物学研究所, 新加坡 0511; ③洛克菲勒大学植物分子生物学实验室, 美国纽约 10021-6399)

摘要 铁皮石斛(*Dendrobium candidum*), 为一种野生兰科植物, 在栽培条件下, 从种子萌发到开花通常需要3~4 a。研究了多种植物激素和多胺对该种石斛组织培养中花芽形成的影响, 结果表明在培养基中加入合适浓度的亚精胺(spermidine)或BA(6-苄基腺嘌呤), 或同时加入NAA(蔡乙酸)和BA均可诱导原球茎或由之形成的无根小苗在3~6个月开花, 频率在31.6%~45.8%。当将原球茎在加有ABA(脱落酸)的培养基上预培养后再移到加有BA的培养基上, 花芽形成的频率可提高到平均达82.8%(个别实验中可达100%), 这种诱导提早开花的现象也与实验材料的发育阶段(原球茎、无根小苗、已生根的小苗)有关, 通常发生在根的形成受到完全或部分抑制的情况下。

关键词 铁皮石斛 组织培养 开花 植物激素 多胺

花的形成是高等植物所特有的一种生理现象。在多数情况下, 植物必须达到某种成熟阶段时才能开始花的形成。虽然植物生理学家对于开花诱导及花芽的起始形成已进行了不少研究, 但至今在这一领域所积累的知识仍十分有限(参看Bernier的综述^[1,2])。

植物组织培养技术已用于多种植物离体开花的研究^[1~4]。在兰科植物中, 已报道可诱导离体开花的植物种有: 建兰(*Cymbidium ensifolium*), 春兰(*C. goeringii*)^[5], *C. nipponicum* (Muzuno, Hiyama 和 Higuchi, 未发表)和文心兰(*Oncidium varicosum*)^[6]。本研究选用中国传统的药用兰科植物铁皮石斛(*Dendrobium candidum*, 图1(a))作为实验材料, 该种植物在通常的栽培条件下, 由种子到开花需要3~4 a时间。我们试图建立一种重复性好的兰花的离体开花系统, 以研究组织培养中植物激素或其他生长调节物质在花芽形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 植物材料

铁皮石斛的种子无菌培养在附加0.3 mg/L NAA和2%蔗糖的MS琼脂培养基上, 以诱导形成原球茎。获得的原球茎在MS或1/2 MS培养基(\pm 0.3 mg/L NAA)上于光照下(12 h

1995-10-05 收稿, 1996-01-28 收修改稿

* 本文大部分实验完成于国立新加坡大学分子和细胞生物学研究所

** 联系人, 中国科学院, 北京市三里河路52号, 北京100864

1 000~1 500 lx)继代培养。如果不及时进行继代培养,培养的原球茎中约有 50%可以在 2 个月内长成无根小苗(shoot)或具根的完整小植物(plantlet)^[7]。

1.2 离体开花的诱导

用于本实验的植物材料有 3 类:原球茎、无根小苗和具根的完整小植物。比较了不同的植物激素(BA, NAA 或 ABA)和多胺(亚精胺、精胺、腐胺)的影响。植物激素和多胺的水溶液(pH 调到 5.4)用 0.22 μm 孔径的 Millipore 过滤膜除菌,得到的无菌溶液在需要时加入培养基。

在转移到成花培养基后的 5 个月内记载形成花芽的植物材料总数,成花频率指在这一段观察时间内形成花芽的原球茎簇(clump)、无根小苗或小植物的百分率。培养的光照条件:16 h, 2 000 lx; 温度:光照下 25~27°C / 暗中 21~23°C。

2 结果

2.1 多胺对离体成花的影响

石斛的原球茎(图 1(b))培养在不同的培养基上以比较植物激素和多胺对离体成花的影响。表 1 说明在 MS 培养基中加入 2 mmol/L 亚精胺促进花的形成(比较 MS0 和 MSSpd),成花频率可达 31.6%,这比在 0.5 或 4 mmol/L 下要高得多(在后面的 2 个浓度下,仅在少数实验中才形成花,频率在 2%~4%)。与 MS0 对照相比(见表 1,图 1(c))在 MSSpd(2 mmol/L)培养基上长成的小植物生长较快,节间较长,花芽通常着生在顶端(图 1(d)),开花可持续约 30 d,花的形态也正常(图 1(d)),可产生正常的花粉(图 1(e))。当亚精胺的浓度升高到 6~8 mmol/L 时,没有花形成。在 8 mmol/L 时,苗或小植物的生长也受到抑制。也试验了精胺和腐胺对离体成花的作用,虽然这两种多胺也促进成花,但效果没有亚精胺明显,且形成的花不少在形态上表现出异常,如花瓣(包括唇瓣)的变化。

表 1 不同培养基对铁皮石斛组织培养中开花的影响^{a)}

| 处理 | 在 150 d 内形成花的百分率 | | | | 平均值 ± SE |
|---------------------|------------------|------|------|-------|-------------|
| | I | II | III | IV | |
| MS0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MSN | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MSSpd (0.5 mmol/L) | 0 | - | - | - | - |
| MSSpd (2 mmol/L) | 36.1 | 26.4 | 33.3 | 30.1 | 31.6 ± 4.4 |
| MSSpd (4 mmol/L) | 4.0 | - | - | - | - |
| MSBN | 16.1 | 19.3 | 23.4 | 22.3 | 20.3 ± 3.3 |
| MSBNSpd(0.5 mmol/L) | 50.6 | 24.7 | 35.6 | 33.2 | 36.0 ± 10.8 |
| MSBNSpd (2 mmol/L) | 7.0 | - | - | - | - |
| MSBA | 66.3 | 31.8 | 37.8 | 47.4 | 45.8 ± 15.1 |
| MSABA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MSABA→BA | 93.3 | 60.0 | 77.8 | 100.0 | 82.8 ± 15.4 |

a) 表中实验材料为原球茎,所有实验在 500 mL 三角瓶中进行,内盛 80 mL 培养基,每瓶接种 10 块原球茎组织,每个处理 5~6 个重复,在接种后 5 个月内统计形成花芽的百分率。I~IV 为 4 次实验的结果。表中 MS0: 无激素的 MS 培养基; MSN: MS 培养基附加 0.3 mg/L NAA; MSSpd: MS 培养基附加亚精胺(括号内为浓度); MSBN: MS 培养基附加 0.5 mg/L BA 和 1.5 mg/L NAA; MSBNSpd: MSBN 培养基附加亚精胺(括号内为浓度); MSBA: MS 培养基附加 2 mg/L BA; MSABA: MS 培养基附加 1 mg/L ABA; MSABA→BA: 原球茎在 MSABA 培养基上培养 15~20 d 后,将形成的苗转移到 MSBA 上。



图 1 铁皮石斛的离体开花

(a)铁皮石斛的成年开花植株,由种子萌发到开花通常需要3~4 a; (b)实验中所用的继代培养的原球茎;(c)在MS0培养基上的对照植株,通常无花芽形成(在实验的5个月内);(d)在附加2 mmol/L 亚精胺的MS培养基上形成正常的花;(e)由离体形成的正常的花的花粉;(f)在附加亚精胺的培养基上形成花序(箭头所示);(g)在附加2 mg/L BA的培养基上形成的无根苗的叶腋内形成花芽;(h)原球茎在附加1 mg/L ABA的MS培养基上培养20 d后,随后将形成的苗移到加有2 mg/L BA的培养基上,形成大量的花序

2.2 植物激素对离体成花的影响

在MS培养基中附加0.5 mg/L BA和1.5 mg/L NAA(MSBN)也可促进成花,平均频率为20.3%(见表1)。在MSBN上形成的小植物与在MS0上的比较,茎较粗,节间短。在这些小植物顶端形成的花通常不正常,也不能正常开放。当MSBN培养基中再加入0.5 mmol/L

亚精胺(MSBNSpd, 0.5 mmol/L), 成花频率增加到 36% (表 1)。除了在顶端形成单个花芽的情况之外, 在 MSBNSpd 培养基上也常见形成具几个分枝的花序(图 1(f))。有时可见由原球茎再生的具几个节的短茎上直接形成花芽。然而, 在 MSBNSpd(0.5 mmol/L) 和 MSSpd(2 mmol/L) 培养基上培养的材料之间在成花频率上并无显著的差异。当 MSBN 中的亚精胺浓度提高到 2 mmol/L 时, 成花频率明显下降(表 1)。

在培养基中单加 2 mg/L BA(MSBA) 时, 无根小苗形成的分枝明显增加, 每株苗可形成多至 20 多个分枝, 它们通常较粗、仍然无根。成花频率可达 45.8%, 花芽出现在侧芽的部位(图 1(g))。虽然培养在附加 ABA(0.5~1.5 mg/L) 培养基(MSABA) 上的原球茎形成的苗并不能产生花芽, 并在 4 个月的培养过程中逐渐转黄, 如果原球茎先在加有 ABA 的培养基上预培养 15~20 d, 随后在转移到附加 2 mg/L BA 的 MS 培养基(MSBA) 上继续培养时, 则成花频率最

高(82.8%, 见表 1)。在这一情况下, ABA 促进花序的形成, 增加花的数目(图 1(h))。因为形成许多花芽, 多数花芽较小, 不少形成的花也异常^[7]。

作为对照, 在 MS0 和 MSN 培养基上的原球茎在大多数实验中培养 5 个月后并没有形成花(图 1(c), 表 1), 但偶尔在 MSN 培养基上可有少数形成花(频率在 1%~2%)。各处理中出现花芽的时间迟早不同(图 2)。在 MSBNSpd(0.5 mmol/L) 培养基上, 转移 45 d 后即出现花芽, 而在 MSSpd(2 mmol/L) 上则需 60 d, 在 MSBN, MSBA, MSABA→BA 等上则需 75 d。

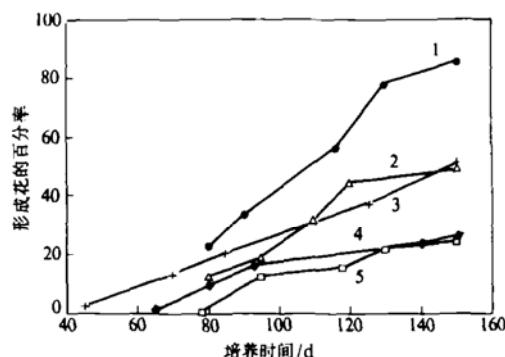


图 2 在不同培养基上花形成的时间进程

实验材料为原球茎, 数据由原球茎转移到成花培养基上 150 d 内的不同时间统计获得。1 为 MSABA→BA, 2 为 MS-BA, 3 为 MSBNSpd, 4 为 MSSpd, 5 为 MSBN。不同培养基的成分见表 1

2.3 成花诱导培养基对原球茎、无根小苗和完整小植物的不同影响

培养的原球茎、无根小苗和完整小植物对开花诱导处理的反应不同。当以原球茎作为起始材料时, 形成的小植物较小, 但花芽出现时间较早(45 d)。当以无根小苗作为起始材料时, 至少要 2 个月才能形成花, 花芽形成频率低于原球茎或与之相仿(见表 2)。当以完整小植物作为起始材料时, 形成花芽所需的时间最长, 成花频率也最低; 且在不同的单株植物之间, 形成花芽的时间差异也很大, 这可能反映了它们的不同的生理状态。

表 2 铁皮石斛原球茎、无根小苗和完整小植物在成花诱导培养基上的不同反应^{a)}

| 培养材料 | 诱导花形成的培养基 | | |
|-------|---------------------|-----------------------|----------|
| | MSSpd(2 mmol/L) / % | MSBNSpd(0.5 mmol) / % | MSBN / % |
| 原球茎 | 30.5 | 36.7 | 20.0 |
| 苗(无根) | 23.3 | 27.0 | 17.6 |
| 小植物 | 6.7 | 5.3 | 2.7 |

a) 所用的培养基详见表 1 的说明。表中数字为在成花诱导培养基上培养 150 d 时统计的花芽形成的百分率

3 讨论

植物生理学和遗传学的研究已表明开花过程受到多因子的调控, 影响植物开花的主要环境因子, 如光周期、温度和水的供给等在很大程度上均是通过影响植物的内源激素及同化产物的合成及流向而发生作用^[2]。在多种植物组织培养系统中已报道, 通过单加 BA, 或以生长素与细胞分裂素配合使用, 可以促进花芽形成^[1~4,8]。在本研究中, 单加 BA 抑制根的生长, 但明显促进花的形成(2 mg/L 时, 成花频率达 45.8%)。同时加入 NAA 和 BA 也有促进作用, 但没有单加 BA 时显著。单加生长素则抑制花的形成(作者未发表资料)。在利用外源激素处理两种杂种石斛植株的研究中也发现 BA 对开花的促进作用, 而生长素则对 BA 具有拮抗作用^[9]。在白芥中已发现, 长日诱导条件下处理 16 h 后在顶芽中生长素含量下降, 生长素与细胞分裂素的比例下降^[10]。显然, 这两类激素之间的某种程度的平衡对于调控多种生长发育过程是十分重要的, 在培养的烟草外植体的成花研究中也证明了这一点^[11]。

ABA 促进开花在 *Chenopodium*^[12], *Perilla*^[13] 等植物中已有报道, 但在 *Kalanchoe* 中仅增加在短日条件(成花诱导)下培养的每个外植体上形成的花的数目, 而对成花外植体的百分率没有影响^[8]。在本研究中发现, 如果先将原球茎在加有 0.5~1.5 mg/L ABA 的培养基上培养 15~20 d, 再转到 MSBA 培养基上, 可以得到很高的成花率(平均 82.8%, 有些试验中达 100%)。我们并发现培养基中加入 6% 甘露醇或葡萄糖, 结果也使芽形成的时间提早, 成花率增加(作者未发表结果)。很可能是在这一情况下, 高浓度的渗透压调节物质导致内源 ABA 的增加。多种植物在逆 D 境条件下提早开花, 可能也与内源 ABA 的增加有关。本实验的结果说明内源 ABA 的增加在花诱导的早期阶段中可能起有重要的作用。

多胺在植物发育(包括花的形成)中具有各种作用。利用烟草花茎薄层组织系统(*floral thin-layer*, FTL)已表明在花芽诱导培养基上培养的 FTL 外植体中亚精胺的含量增加^[14]。而且, 在营养芽诱导培养基中加入亚精胺导致在外植体上形成许多花芽。问题在于烟草的 FTL 外植体本身在生理上已处于成花状态。本研究中所用实验材料则处于非成花状态, 而多胺也表现出促进成花的作用。在文献中有实验表明多胺可与细胞分裂素协同作用控制一些生理过程, 如细胞分裂周期^[15]。本研究中多胺与 BA 均可促进成花, 表明两者的作用存在某种关系。

在利用完整植物所进行的开花诱导实验中, 已注意到根作为细胞分裂素生物合成主要场所的作用。本研究中发现多数成花实验中, 根的形成完全或部分受到抑制。在枣椰的组织培养中, 也发现花序形成只有在根的形成完全抑制时才发生^[1]。这些情况似与上面所述的用完整植物进行的实验结果不同, 原因可能是培养基中通常使用的是活性很强的细胞分裂素 BA, 在诱导开花的最适浓度下足以完全抑制根的形成, 但这并不意味着在完整植物中根在开花诱导中没有作用。因此, 在本研究中, 三类不同的起始实验材料(原球茎、无根小苗、有根的完整小植物)的差异, 同样也不足以说明根本身对花芽形成起抑制作用, 而只能说明有根的小植物作为一个完整的植物体, 由于其自身的调节作用, 对外源激素处理的敏感性显然比原球茎和无根小苗要低。

虽然我们的结果表明植物激素(生长素、细胞分裂素和 ABA)和多胺涉及兰花的花芽形成过程, 多胺与激素之间的关系仍不清楚。在离体成花的一些条件下, 如: 加入腐胺, 在 MSBN 培养基上培养, 或 ABA 处理(图 1(h)), 形成的花常表现出形态上的畸型。这些结果说明对于

花的发端(flower initiation)与花的发育(flower development)需要不同的内源和外源条件。本研究为进一步探讨与开花有关的因素提供了一个有用的实验系统。同时,由于它大大缩短了诱导第1次开花所需的时间,这在兰花的育种上有着潜在的价值。

致谢 河南省农业科学院实验中心提供铁皮石斛的蒴果,以及国立新加坡大学分子和细胞生物学研究所的 K. L. Lok 先生协助本研究中的大部分摄影工作,作者深表谢意。

参 考 文 献

- 1 Ammar S, Benhadis A, Tripathi B K. Floral induction in date palm seedling (*Phoenix dactylifera* var. *Deglet Nour*) cultured *in vitro*. Can J Bot, 1990, 65:137~142
- 2 Chang W C, Hsing Y I. *In vitro* flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). Nature (London), 1980, 284:341~343
- 3 陆文梁, 郭仲聚, 王雪洁. 风信子外植体直接分化花芽的研究——I. 花芽和营养芽形态发生的控制. 中国科学, B辑, 1986, (5):491~500
- 4 Pang J L, Liang H M, Liu F Y. Direct formation of male and female flowers from excised cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Chinese J Bot, 1993, 5:185~188
- 5 Wang X. Studies on ontogenesis and flower induction of *Cymbidium* *in vitro*. Proc of the Nagoya Intern. Nagoya Japan: Orchid Show '90, 1990, 77~82
- 6 Kerbaux G B. *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum* mericlones(Orchidaceae). Plant Science Letters, 1984, 35:73~75
- 7 王光远, 刘培, 许智宏, 等. 石斛离体培养中ABA对诱导花芽形成的影响. 植物学报, 1995, 37:374~378
- 8 Dickens C W S, Van Staden J. The *in vitro* flowering of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz. II. The effects of growth regulators and gallic acid. Plant Cell Physiol, 1990, 31:757~762
- 9 Goh C J, Yang A L. Effects of growth regulators and decapitation on flowering of *Dendrobium* orchid hybrids. Plant Science Letters, 1978, 12:287~292
- 10 Sotta B, Ldjeune P, Maldiney R, et al. Cytokinin and auxin levels in apical buds of *Sinapis alba* following floral induction. in: Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants (eds. Kaminek M, et al.). The Hague: SPB Academic Publ, 1992, 377~379
- 11 Peeters A J M, Gerards W, Barendse G W N, et al. *In vitro* flower bud formation in tobacco: Interaction of hormones. Plant Physiol, 1991, 97:402~408
- 12 Krekule J, Kohli P K. The condition of the apical meristem of seedlings responsive to a promotive effect of abscisic acid on flowering in the short day plant. *Chenopodium rubrum* Z Pflanzenphysiol, 1981, 103:45~51
- 13 Purse J G. Phloem exudate of *Perilla crispa* and its effect on flowering of *P. crispa* shoot explants. J Exp Bot, 1984, 35: 227~238
- 14 Kaur-Sawhney R, Tiburcio A F, Galston A W. Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. Planta, 1988, 173:282~284
- 15 Dubroff F B. Polyamines-Functions and relationships with ethylene and cytokinins. In: Flores H E, et al eds. Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology and Interactions. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1990. 256~266