

文章编号: 1001-1498(2007)04-0537-05

大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*) 试管苗基部切块诱导类原球茎研究*

吴开云^{1,2}, 黄敏仁^{1**}, 王明麻¹

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要:以大花蕙兰试管苗基部切块为外植体,以MS培养基为基本培养基,培养诱导类原球茎(PLB),研究不同激素配比以及外植体来源基因型对PLB诱导的影响。低水平的2,4-D和较高水平的6-BA对于试管苗基部切块诱导PLB具有显著的促进作用。当2,4-D浓度高于 $0.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,PLB诱导受到显著抑制。不同基因型有不同的最佳激素组合。NAA对特定基因型诱导PLB有效。以试管苗基部切块组织培养方式诱导大花蕙兰PLB是可行的,为转基因研究提供了植株再生技术基础。

关键词:大花蕙兰;原球茎;PLB;植株再生

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** A

Micropropagation of *Cymbidium hybridum* by Inducement of PLB from Cuted Base of in vitro Plantlets

WU Kai-yun^{1,2}, HUANG Min-ren¹, WANG Ming-xiu¹

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: PLB (protocom-like body) is successfully induced from the cuted tissue of plantlet-base of *Cymbidium hybridum* in vitro, in a simulative manner like microtuber. The effects of different concentrations of 2,4-D, 6-BA, and NAA on the PLB formation of *C. hybridum* were investigated in different level of concentration. The results showed that the effects of 2,4-D and 6-BA on the frequency of PLB formation of *C. hybridum* differed extremely significantly. 2,4-D on lower level was a important stimulative to induce PLB, but the inducing of PLB would be restrained when the concentration of 2,4-D was above $0.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The frequency of PLB formation increased basically with the increase of concentrations of 6-BA. The frequency of PLB formation was also related to the genotype, NAA was a important stimulative factor for some special genotype of *C. hybridum*. The experiment strategy to inducing PLB in simulative manner of bulb is feasible.

Key words: *Cymbidium hybridum*; protocom; PLB; plant regulator

大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum* Hort), 又称虎头兰、西姆比兰, 属于兰科 (Orchidaceae) 兰属 (*Cymbidium*) 植物。大花蕙兰株型相对高大飘逸, 花型大而丰

润, 花序繁茂, 色彩华丽且层次丰富多变, 容易营造热烈开朗的环境气氛, 是市场潜力最大的兰花之一。

国内外现有关大花蕙兰试管苗培育方面的研

收稿日期: 2007-02-05

基金项目: 浙江省自然科学基金项目“利用天麻抗真菌蛋白 GFP 基因遗传转入改良热带兰抗病性研究”(Y305684)

作者简介: 吴开云 (1963—), 男, 江苏江都人, 副研究员, 在读博士研究生。

* 李杰博士为本试验提供大花蕙兰品种材料; 诸葛强老师、王光萍老师为本研究提供了热情帮助, 特此致谢!

** 通讯作者

究,基本上是利用茎尖^[1]、茎段^[2]、新芽^[3]、假鳞茎切块、根段^[4,5]或直接以类原球茎^[6]作为外植体,通过诱导丛生芽或类原球茎实现快繁的目的。类原球茎(protocoma-like body, PLB)诱导是兰科植物重要的繁殖方式之一,具有繁殖效率高、易于生根等优点。PLB是由分生组织的薄壁细胞脱分化,形成胚性细胞,经球状胚发育而来^[7]。Chen J T^[8]、谷祝平^[9]、祝建^[10]等认为兰花类原球茎来源于体细胞胚,因此在兰花基因工程育种方面具有重要价值。利用成年株分蘖芽、花茎或直接以假鳞茎茎尖作为外植体诱导 PLB 则有外植体来源有限、成本高、效率低的缺点。PLB 增殖诱导还存在变异积累和分化能力退化的问题^[11,12]。

本研究拟利用 PLB 成批诱导产生的、健壮的大花蕙兰试管苗作为丰富的外植体来源。以大花蕙兰试管苗基部切块作为外植体,结合不同处理水平的外源激素组合,进行植物外源激素对大花蕙兰 PLB 发生影响的研究,以期获得一种有效的适合于转基因的大花蕙兰再生技术。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的大花蕙兰品种由江苏省兰花工程研究中心李杰博士提供,有 4 个商品化品种,分别用 CMM、PET、CW I CAH 表示。其中 CMM(梦露)开中轮花,萼瓣粉红,唇瓣带暗红色“V 形斑点; CW I(幻影)开中大轮花,萼瓣绿色,唇瓣红色; CAH(夕阳)开中大轮花,萼瓣红色,唇瓣红色带黄色边; PET(彼得)开中轮花,萼瓣黄色,唇瓣红色“V 形斑块。基本培养基为 MS 培养基。使用的激素有细胞分裂素 6-BA、生长素 NAA、2,4-D。

1.2 外植体取样

取高约 5~6 cm 健壮的试管苗,切除根部,剥去外围较老的叶片,再切去上部叶片部分,只留下高约 5 mm 的基部,并纵切为 2 个瓣,在无菌条件下,植入含有不同激素配比的 MS 培养基,30 d 后开始观察和调查 PLB 诱导效果。

1.3 基本培养基与培养条件

基本培养基配方为:MS + 8.0 g · L⁻¹琼脂 + 30 g · L⁻¹蔗糖。培养温度为 25 ± 2 °C,环境相对湿度 60%~80%,黑暗诱导 20 d 后,继续弱光培养 10 d (50 lx),再进入正常光培养阶段(2 500 lx)。平均培养 40 d 后调查诱导结果;并用含有 6-BA_{0,2}、NAA_{0,1}

的 MS 培养基继代,继代培养 30 d 后调查后续效应。

1.4 试验设计与计算方法

采用多因素完全区组试验设计,选择 6-BA、2,4-D、NAA 作为外源激素。3 种外源激素水平的梯度设置分别是:6-BA 为 0.00、0.50、1.50、4.50 mg · L⁻¹; 2,4-D 为 0.00、0.02、0.06、0.20、0.60、2.00 mg · L⁻¹; NAA 为 0.00、0.20 mg · L⁻¹。其中 NAA 与 2,4-D 同属于生长素类,仅设置 0.00、0.20 两个梯度作为参考。每个基因型为 48 个激素处理组合,结合 4 个基因型(CMM、PET、CW I CAH),总共 192 种处理组合,每个组合处理重复 3 次。

PLB 诱导率 FO I (frequency of inducement) = 发生体胚(愈伤组织)的外植体数 / 接种外植体数,以瓶为单位计算平均数。统计数据录入计算机用 SPSS 程序作方差分析和显著性检验。

繁殖系数 PM (propagation multiple) = 新发生的 PLB 总数 / 每瓶接种消耗的试管苗数。其中“每瓶接种消耗的拟鳞茎数”为实际等于“总的接种外植体数 / 试管苗基部平均切块数”。以瓶为单位计算平均数,统计数据录入计算机用 SPSS 程序分析。

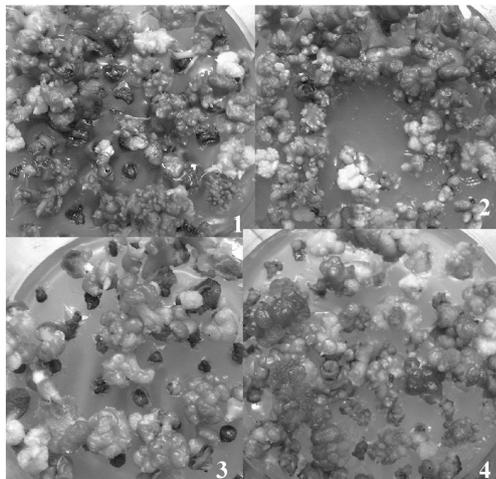
诱导结果以外植体产生 PLB 为标准,愈伤状增生或单芽延长均不计,计算其诱导率。PLB 颗粒状多,浅绿色为生长良好。记录产生聚积的 PLB 团数,PLB 总个数和产生 PLB 的外植体的个数,以便统计繁殖系数。

上述试验均以 200 mL 的培养瓶接种,每瓶培养基 50 mL,每瓶接种外植体 50 个,每个处理 3 次重复。

2 结果与分析

外植体在含有 6-BA、2,4-D 和 NAA 不同激素水平的 MS 培养基中,经过 1 周黑暗诱导和 25 d 弱光条件下的恒温培养,外植体上开始长出大小不一的浅绿色颗粒状组织,即 PLB。表 1 列出本实验中部分诱导效果较好的或有代表性的培养基的激素浓度。

直接观测发现,经过 1 个多月的培养,不同处理呈现单一 PLB、单一鳞芽或不同程度的桑葚状 PLB 聚集等情况(图 1)。还有一些处理出现外植体褐化死亡或 PLB 呈现畸形松软等情况。在继代培养中,单一鳞芽或单一 PLB 一般直接发育成苗;而桑葚状 PLB 聚集团则逐步发育成簇生的小苗,或继续增殖形成较大规模的桑葚状 PLB 聚集团。图 1 中依次反映了 CMM、PET、CW I CAH 等 4 个基因型在各自最适激素配比水平下,PLB 形成后桑葚状聚集的情况。



1.CMM; 2.PET; 3.CWI; 4.CAH

图 1 不同基因型大花蕙兰拟球茎诱导的桑葚状 PLB 聚集

表 1 部分培养基的激素浓度 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

处理号	2,4-D	6-BA	NAA
3	0.20	0.00	0.00
9	0.06	0.50	0.00
14	0.02	1.50	0.00
19	0.00	4.50	0.00
21	0.06	4.50	0.00
30	2.00	0.00	0.20
37	0.00	1.50	0.20
45	0.60	4.50	0.20

2.1 MS添加不同浓度激素对试管苗基部切块诱导 PLB 的影响

培养到 40 d 后统计 PLB 的诱导率和繁殖系数。大花蕙兰试管苗基部切块接种在含有不同激素水平

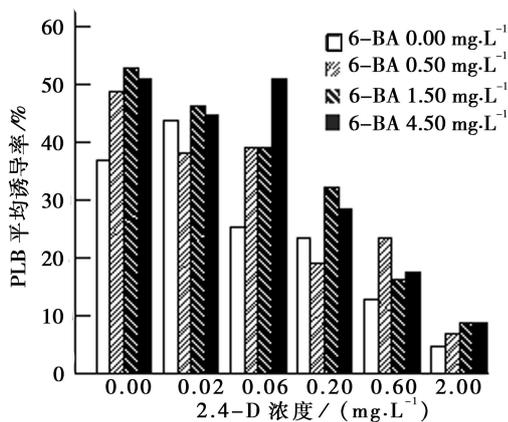


图 2 不同激素组合处理大花蕙兰试管苗基部切块诱导 PLB 的诱导率

2.2 不同基因型大花蕙兰对试管苗基部切块诱导 PLB 的影响

本试验选用了 4 个基因型 (品种) 大花蕙兰作为试管苗基部切块诱导 PLB 实验的材料。4 个品种 48

组合的 MS 培养基上培养,诱导 PLB 的效果存在明显的差异,结果见图 2、3。各种处理组合的平均诱导率为 4.70% ~ 52.90%, 平均繁殖系数 0.10 ~ 9.50, 即 1 棵试管苗的基部切块平均诱导 0.10 ~ 9.50 个 PLB。

从图 2 可以发现,大花蕙兰试管苗基部切块在不同激素组合的 MS 培养基上均能不同程度地发生 PLB 诱导。在 2,4-D 浓度较低的情况下,PLB 诱导率较高;随着 2,4-D 浓度逐渐增加,PLB 诱导率依次降低;当 2,4-D 达到 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,PLB 诱导率相当于相邻的 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理水平的一半。值得注意的是,2,4-D 浓度为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PLB 平均诱导率比浓度为 $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的略低。图 2 还反映了不同 6-BA 浓度对试管苗基部切块诱导 PLB 的影响。在各个特定的 2,4-D 浓度下,随着 6-BA 浓度的递增,PLB 诱导率基本上呈现从低到高的变化趋势,并且在 6-BA 浓度达到 $1.50 \sim 4.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,PLB 诱导率呈现到达高峰然后略有下降的趋势。

不同激素处理水平下,PLB 繁殖系数的变化更为明显。从图 3 可以看出,当 2,4-D 浓度为 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,PLB 诱导受到明显的抑制;2,4-D 达到 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,PLB 诱导受到严重的抑制,基本上不产生 PLB 诱导。

NAA 仅设置了 2 个梯度水平,对 PLB 诱导效果未发现明显的差异。

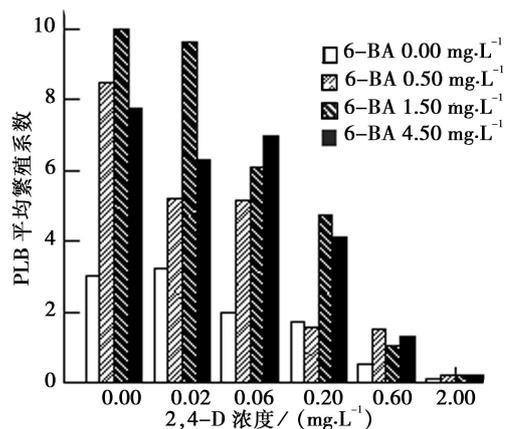
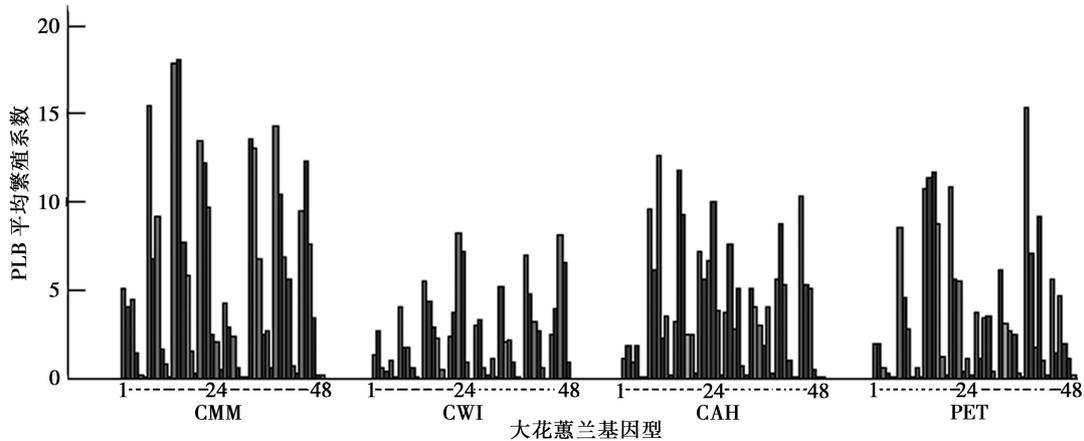


图 3 不同激素组合处理大花蕙兰试管苗基部切块诱导 PLB 的繁殖系数

个激素组合的外植体发生 PLB 的情况存在明显差异。图 4 中的每个峰值分别反映了 48 个不同激素水平组合的平均繁殖系数的变化。从图 4 可以发现,CW 的诱导率和繁殖系数均明显低于其它 3 个基因型,总平均繁殖系数为 $\text{CMM} > \text{CAH} > \text{PET} >$

CW I,而总平均诱导率为 $CMM > PET > CAH > CW I$ (图略)。



注: 1.....24.....48为次级横坐标,表示培养基处理号依次为 1~48

图 4 不同基因型大花蕙兰及激素组合对试管苗基部切块诱导 PLB 繁殖系数的影响

2.3 不同处理因素的方差分析

方差分析结果(表 2)表明,2,4-D 和 6-BA 不同处理水平对 PLB 诱导效果达到了极显著差异($p < 0.01$);基因型之间的 PLB 诱导效果也达到极显著差异,表明不同的品种适合使用不同的激素配比水

平。NAA 在 $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 个梯度水平上的 PLB 平均诱导率和平均繁殖系数均未达到显著差异。重复处理之间有一定的差异,但未达到显著水平。

表 2 不同激素组合和基因型对 PLB 诱导率和 PLB 繁殖系数影响的方差分析

方差来源	自由度	PLB 诱导率				PLB 繁殖系数			
		型方差 SS	均方 MS	F 值	p 值	型方差 SS	均方 MS	F 值	p 值
2,4-D	5	118 793.37	23 758.67	150.59**	0.000	3 848.596	769.719	91.981**	0.000
6-BA	3	7 033.22	2 344.41	14.86**	0.000	978.414	326.138	38.973**	0.000
NAA	1	27.70	27.70	0.18**	0.675	37.707	37.707	4.506*	0.034
基因型	3	25 762.78	8 587.59	54.43**	0.000	723.605	241.202	28.823**	0.000
重复	2	1 590.12	795.06	5.04**	0.007	15.018	7.509	0.897**	0.408
误差	561	88 512.47	157.78			4 694.600	8.370		
合计	576	755 966.65				18 565.540			

注: *表示达到 $=0.05$ 显著水平; **表示达到 $=0.01$ 极显著水平。

根据表 2 的 F 值检验,影响 PLB 诱导率的最主要因子是 2,4-D,其次是基因型,然后是 6-BA。对 PLB 繁殖系数主要影响因子依次是 2,4-D、6-BA、基因型。

3 结论与讨论

试验结果表明,激素对大花蕙兰试管苗基部切块诱导 PLB 具有重要作用。从总体统计水平上看,2,4-D $0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的 PLB 诱导率和 PLB 繁殖系数均最高;但从具体的激素组合诱导效果看,PLB 诱导率和 PLB 繁殖系数变化趋势不完全一致。各个基因型有不同的最佳激素组合,所对应的 PLB 繁殖系数最高的 4 个处理号的 2,4-D 水平为 $0.00 \sim 0.$

$06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这种现象表明不同激素因子之间,以及激素与基因型之间存在复杂的交互作用。繁殖系数的高低反映了 PLB 增殖和聚集的程度,因此繁殖系数更能反映不同处理水平在诱导 PLB 效果上的差别。总的来说,低浓度的 2,4-D 对 PLB 诱导有促进作用,当 2,4-D 浓度增加到 $0.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,出现对 PLB 的抑制趋势;在 2,4-D 适合的情况下,PLB 繁殖系数随 6-BA 浓度的提高而增加,但当 6-BA 增加到 $4.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,开始出现对 PLB 的抑制趋势;NAA 在有限的 2 个梯度水平上的平均诱导效果差异不显著,但对于具体的基因型 PET 有明显促进作用,如果提高 NAA 水平,可能在平均诱导效果上出现显著差异。通过观察还发现,在不含 6-BA 的情况

下, PLB基本上单个发生,而且 PLB表面附生绒毛,在含有细胞分裂素 6-BA 或生长素 NAA 的培养基中, PLB表面没有附生绒毛,但 2,4-D 对附生绒毛没有明显影响。

基因型之间对于激素的反应有着不同程度的差别。CMM 比其它基因型更容易诱导 PLB,在 6-BA $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2,4-D $0.00 \sim 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 激素条件下即可获得较好的诱导效果。CW I 诱导 PLB 相对比较困难,需要较高水平的 6-BA 和 2,4-D; 当 6-BA $4.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2,4-D $0.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.00 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CW I 诱导 PLB 效果最好。CAH 需要较低的 6-BA 和较高的 2,4-D。适当的生长素 NAA 对 PET 诱导 PLB 有显著促进作用。

本试验采用完全区组试验设计,每个基因型设置了 48 个不同激素水平组合,比正交试验多设置了 24 个组合。由于激素之间的交互作用比较强,完全区组设计更容易直接发现适合特定基因型的最佳激素水平组合。结果表明,最适合 CMM、CW I、CAH 和 PET 的 PLB 诱导培养基分别为第 14、21、9 和 37 号培养基,相应的激素水平分别为 2,4-D_{0.02} + 6-BA_{1.50} + NAA_{0.00}、2,4-D_{0.06} + 6-BA_{4.50} + NAA_{0.00}、2,4-D_{0.06} + 6-BA_{0.50} + NAA_{0.00} 和 2,4-D_{0.00} + 6-BA_{1.50} + NAA_{0.20}。

大花蕙兰试管苗基部包含极短的茎和顶端生长点,叶基部组织非常幼嫩,细胞处于分裂旺盛时期,生理上与球根类植物的鳞茎有一定的相似性。本试验选择健壮的试管苗基部的切块进行 PLB 诱导,正是利用了其在生理上的优势。本方法克服了外植体来源限制,避免了 PLB 反复继代诱导存在的变异积累的风险,可以作为大花蕙兰转基因研究的植株再生技术基础。

参考文献:

- [1] da Silva J A T, Chan M T, Sanjaya, *et al* Priming abiotic factors for optimal hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) PLB and callus induction, plantlet formation, and their subsequent cytogenetic stability analysis [J]. *Scientia horticulturae*, 2006, 109 (4): 368 ~ 378
- [2] 郑迎冬,杨承勇,蒋林. 大花蕙兰的茎段培养 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2000, 13 (1): 19 ~ 22
- [3] 马华升,王伟科,王佳,等. 培养基、激素和添加物对大花蕙兰原球茎诱导增殖的影响 [J]. 浙江农业科学, 2005 (6): 452 ~ 456
- [4] Hasegawa A, Ohashi H, Goi M. Effects of BA, rhizome length, mechanical treatment and liquid shaking culture on the shoot formation from rhizome in *Cymbidium faberi* Rolfe [J]. *Acta Hort*, 1985, 166 (1): 25 ~ 40
- [5] 徐宏英,赵玉明,谢海军,等. 大花蕙兰组培快繁影响因素分析 [J]. 园艺学报, 2002, 29 (2): 183 ~ 185
- [6] Huan L V T, Takamura T, Tanaka M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid* [J]. *Plant Science*, 2004, 166 (6): 1443 ~ 1449
- [7] 胡恒康,高永根,张启香. 大花蕙兰原球茎的诱导、增殖及其解剖结构研究 [J]. 金陵科技学院学报, 2005, 21 (4): 85 ~ 87
- [8] Chen J T, Chang C, Chang W C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium Gower Ramsey* and subsequent plant regeneration [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 19 (2): 143 ~ 149
- [9] 谷祝平,高金城,李柏年,等. 大花蕙兰茎尖培养的扫描电镜观察研究 [J]. 西北植物学报, 1990, 10 (2): 128 ~ 131
- [10] 祝建,张军,石红军,等. 墨兰组织培养中原球茎的形态解剖研究 [J]. 华南农业大学学报, 2000, 21 (4): 47 ~ 50
- [11] Nayak N R, Rath S P, Patnaik S. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation [J]. *Scientia Horticulturae*, 1997, 71 (3-4): 243 ~ 250
- [12] Nayak N R, Sahoo S, Patnaik S, *et al* Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl (Orchidaceae) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2002, 94 (1): 107 ~ 116