

秋水仙素离体诱导大花蕙兰多倍体试验

杨丽娟¹, 高素萍¹, 邹宗兰², 陈 果³

(1. 四川农业大学 林学院园艺学院, 四川 雅安 625014 2. 阳春园艺有限公司, 四川 郫县 611700 3. 成都市百花潭公园, 四川 成都 610072)

摘 要: 在离体培养条件下, 以大花蕙兰“红宝石”原球茎为材料, 比较了秋水仙素浸泡法和混培法在不同浓度、不同处理时间诱导大花蕙兰体细胞染色体加倍的效果。结果表明: 无论是用秋水仙素溶液浸泡处理还是将秋水仙素加入培养基中混培处理, 均可诱导大花蕙兰多倍体的产生。但以后者混培法效果较好, 在秋水仙素浓度为 3‰, 处理 15 d 的条件下, 诱导率最高达 30%。对变异株进行细胞学观察后发现, 染色体为 $2n=4x=80$, 为四倍体; 而二倍体对照染色体为 $2n=2x=40$ 。

关键词: 大花蕙兰; 秋水仙素; 多倍体

中图分类号: S 682.2⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0051-03

大花蕙兰(*Cymbidium hybrid*)是兰科(Orchidaceae)兰属中的一部分大花附生种类及其杂交种, 是世界上栽培最普及的洋兰之一。我国于 20 世纪 80 年代开始从国外引进大花蕙兰, 对大花蕙兰的组织培养技术进行了不少探索研究, 一些品种建立了脱毒快繁体系^[1-4], 但有关多倍体的诱导国内尚未见报道。多倍体植物普遍具有器官巨大性、抗性强、新奇变异等特征, 是花卉育种中重要的种质资源^[5]。试验以大花蕙兰二倍体“红宝石”为材料, 利用秋水仙素进行多倍体诱导^[6,8], 创造大花蕙兰多倍体新种质资源, 为尽快培育具有自主知识产权的大花蕙兰新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

二倍体大花蕙兰“红宝石”(C. Ruby Shower ‘Murasakin Okimi’)由四川农业大学园林苗圃提供, 取其侧芽作为诱导外植体, 灭菌后接种到培养基上诱导原球茎, 以原球茎作为多倍体诱导的材料。

1.2 多倍体的诱导

1.2.1 浸泡法 将增殖培养 20 d 的具有旺盛分生能力的原球茎, 在无菌条件下切割为 0.5 cm^3 的小块, 放入 0.5‰、1‰、3‰、5‰的秋水仙素溶液中浸泡 24、48、72 h 后取出, 无菌水冲洗 3~5 次, 转入不含秋水仙素的培养基 $1/2\text{MS}+6\text{-BA } 1.0\text{ mg/L}+\text{NAA } 0.3\text{ mg/L}+\text{AC } 1.5$

$\text{mg/L}+\text{椰汁 } 100\text{ mL/L}$ 中进行分化培养。以未经秋水仙素处理的原球茎为空白对照, 培养温度 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$, 光照强度 $1\,000\sim 2\,000\text{ lx}$, 每日光照 10~12 h, 观察其形态变化。每处理原球茎数为 90 块(每块由 6~8 个单个原球茎组成)。

1.2.2 混培法 将增殖培养 20 d 的具有旺盛分生能力的原球茎, 在无菌条件下切割为 0.5 cm^3 的小块, 转入含有秋水仙素浓度分别为 0.5‰、1‰、3‰、5‰的培养基 $1/2\text{MS}+6\text{-BA } 1.0\text{ mg/L}+\text{NAA } 0.3\text{ mg/L}+\text{AC } 1.5\text{ mg/L}+\text{椰汁 } 100\text{ mL/L}$ 中, 分别处理 7、15、30 d, 每处理原球茎数为 90 块。处理完毕后转入不含秋水仙素的分化培养基 $1/2\text{MS}+6\text{-BA } 1.0\text{ mg/L}+\text{NAA } 0.3\text{ mg/L}+\text{AC } 1.5\text{ mg/L}+\text{椰汁 } 100\text{ mL/L}$ 中进行分化培养。以未经秋水仙素处理的原球茎为空白对照。

1.3 多倍体的稳定

选择形态变异明显的不定芽和原球茎, 继续在 $\text{MS}+6\text{-BA } 1.0\text{ mg/L}+\text{NAA } 0.1\text{ mg/L}+\text{AC } 1.5\text{ mg/L}+\text{椰汁 } 100\text{ mL/L}$ 培养基上培养, 重新诱导长出丛生芽, 从中选择变异明显的植株进行鉴定, 对鉴定为多倍体的植株进行扩繁, 以获得纯合的多倍体植株^[9]。

1.4 倍性鉴定

形态鉴定: 以外部形态作为初步判断, 观察植株根、茎、叶是否有明显膨大或变异。染色体鉴定: 对有明显变异的植株, 当根生长到 2~3 cm, 切取生长旺盛、洁白的根尖, 采用改良苯酚品红染色法制片, 在显微镜下观察并照像, 观察其染色体数目的变化, 根据染色体数判断其倍性^[10]。

2 结果与分析

从试验结果可以看出, 未经秋水仙素处理的原球茎无染色体倍性变异出现, 说明即使在离体培养条件下发

第一作者简介: 杨丽娟(1984-), 女, 在读硕士, 从事园林植物培育的研究。E-mail: yangflower1220@126.com。

通讯作者: 高素萍(1966-), 女, 博士, 教授, 现主要从事城市生态及园林植物应用研究工作。E-mail: gsp65@126.com。

基金项目: 四川省“十一五”育种攻关资助项目。

收稿日期: 2009-01-16

生染色体倍性变异的频率极低, 要获得染色体倍性变异必须经过人为干预。

经细胞染色体鉴定表明, 采用秋水仙素溶液浸泡处理法和秋水仙素加入培养基处理法都可获得一定频率的多倍体细胞。二倍体细胞染色体数为 $2n=2x=40$ (图 2), 而四倍体细胞染色体数为 $2n=4x=80$ (图 3)。诱变后对大花蕙兰幼苗进行观察发现: 大部分诱变植株与对照植株相比表现为分化晚, 真叶长出后表现畸形、扭曲、肥厚、颜色深绿等。

2.1 浸泡法的诱导效果

秋水仙素浸泡法处理大花蕙兰“红宝石”原球茎的

表 1 浸泡处理对大花蕙兰“红宝石”多倍体诱导的影响

Table 1 The inducing effects of immersing of PLBS of Murasakin Okim ⁷						
秋水仙素 Concentration of colchicine/ %	处理时间 Time of soaking/ h	接种数 Number of inoculation/ 个	死亡数 Number of death	死亡率 Rate of death/ %	变异数 Number of inducing/ 个	变异率 Rate of inducing/ %
CK	—	90	0	0.0	0	0.0
0.5	24	90	0	0.0	0	0.0
	48	90	0	0.0	0	0.0
	72	90	4	4.4	3	3.3
	72	90	3	3.3	2	2.2
1	24	90	3	3.3	2	2.2
	48	90	7	7.8	6	6.7
	72	90	10	11	19	21.1
	72	90	4	4.4	13	14.4
3	24	90	4	4.4	13	14.4
	48	90	8	8.9	21	23.3
	72	90	15	16.7	18	20.0
	72	90	11	12.2	12	13.3
5	24	90	11	12.2	12	13.3
	48	90	19	21.1	8	8.9
	72	90	37	41.1	10	11.1
	72	90	37	41.1	10	11.1

如表 2 所示, 秋水仙素混培法对原球茎的诱导效果因处理浓度和时间的不同而异。0.5%的秋水仙素对原球茎伤害最小, 但诱变效果较差, 即使延长处理时间也无法得到加倍植株。随着秋水仙素处理浓度的增加, 诱变效果逐渐增强, 在附加 3%秋水仙素的培养基中处理

表 2 不同浓度秋水仙素混培原球茎的结果

Table 2 The inducing effects of adding coldhicles in medium for PLBS of ‘ Murasakin Okim ⁷						
秋水仙素 Concentration of colchicine/ %	处理时间 Time of soaking/ d	接种数 Number of inoculation/ 个	死亡数 Number of death	死亡率 Rate of death/ %	变异数 Number of inducing/ 个	变异率 Rate of inducing/ %
CK	—	90	0	0.0	0	0.0
0.5	7	90	0	0.0	0	0.0
	15	90	0	0.0	0	0.0
	30	90	2	2.2	0	0.0
	30	90	2	2.2	2	2.2
1	7	90	0	0.0	2	2.2
	15	90	2	2.2	6	6.7
	30	90	5	5.6	25	27.8
	30	90	2	2.2	9	10.0
3	7	90	2	2.2	9	10.0
	15	90	4	4.4	27	30.0
	30	90	8	8.9	14	15.6
	30	90	3	3.3	5	5.6
5	7	90	3	3.3	5	5.6
	15	90	13	14.4	14	15.6
	30	90	17	18.9	7	7.8
	30	90	17	18.9	7	7.8

结果如表 1 所示, 部分原球茎产生了多倍体变异。当秋水仙素浓度为 0.5%时, 只有处理 72 h 的发生 3.3%的变异。当秋水仙素浓度 1%、处理 72 h 和浓度 3%、处理 48 h 诱变率比较高, 分别为 21.1%、23.3%。秋水仙素浓度 3%处理时, 整体变异率最高, 可视为原球茎诱导多倍体的适宜处理浓度。经秋水仙素处理的原球茎在转入分化培养基后前期生长缓慢, 这种现象随着处理浓度的升高或时间的延长而加剧, 相同浓度下处理时间与原球茎死亡率成正相关。当秋水仙素浓度 5%时, 死亡率较高, 最高达 41.1%, 对原球茎的伤害最大。

2.2 混培法的诱导效果

15 d 和 1%的培养基中处理 30 d, 原球茎的诱导率最高分别达 30%和 27.8%。但过高的秋水仙素浓度会对丛芽产生较大的毒害作用, 在含 5% 秋水仙素的培养基中处理 15、30 d 后, 原球茎的死亡率达 14.4%和 18.9%。即使已发生加倍的植株生长也非常缓慢。

2.3 多倍体的鉴定

2.3.1 外部形态 大花蕙兰“红宝石”四倍体试管苗比

二倍体苗生长旺盛, 叶片宽大而肥厚, 表面粗糙, 颜色深绿, 茎秆粗壮。叶片比二倍体大而厚, 甚至叶形都发生

了显著的变化,叶形由狭长变为钝圆。将对照和变异的植株在形态上作对比,如图 1 所示。



图 1 大花蕙兰“红宝石”四倍体(左)、二倍体(右)试管苗的比较
Fig. 1 The comparison of plants of tetraploid and diploid of ‘Murasakin Okimi’



图2
二倍体 2n=2x=40

图 2 大花蕙兰“红宝石”二倍体染色体

Fig. 2 The chromosome of diploid of ‘Murasakin Okimi’



图3
四倍体 2n=2x=80

图 3 大花蕙兰“红宝石”四倍体染色体

Fig. 3 The chromosome of tetraploid of ‘Murasakin Okimi’

2.3.2 染色体鉴定 选择外部形态变化明显的试管苗,取其分裂旺盛茎尖进行染色体观察,发现除了一小部分为四倍体之外,变异植株中大部分为嵌合体,其中染色体数为 2n=40(图 2)、2n=80(图 3),还有少数存在一些非整倍体。混倍体类型的植株,其形态也表现为嵌合体的形态特征,如:茎扭曲,叶片卷曲、变形等。

3 讨论

试验中发现,经过不同浓度秋水仙素的处理后,原球茎的分化时间明显比对照长,且秋水仙素的浓度越高,处理时间越长,分化就越晚。说明,秋水仙素对原球茎的分化及幼苗的生长均有一定的抑制作用。

秋水仙素浸泡处理法与混培处理法比较而言,秋水仙素溶液浸泡处理法对原球茎的伤害较直接,而且要经过多次的转移和冲洗,增加了受污染的几率。所以秋水仙素溶液浸泡处理法不论在操作还是在加倍效果上均不如秋水仙素加入培养基处理法。

在染色体观察鉴定过程中,在变异植株中观察发现部分细胞染色体数为非整倍体,对其产生的原因及影响有待进一步的研究。对产生的嵌合体,需进一步分离纯化。现已有部分四倍体材料练苗移栽成活,将进一步在田间对其性状进行观察,并开展田间的一系列试验及对比测试,期望筛选出大花、奇花、抗病性好等优良商品性状的品系,获得具有自主知识产权的大花蕙兰新品种。

参考文献

[1] 李杰,黄敏仁,王明麻,等.大花蕙兰不同基因型组培繁殖系数的差异性[J].南京林业大学学报(自然科学版),2005,29(1):98-100.
[2] 徐宏英,蒋玉明,谢海军,等.大花蕙兰组织快繁影响因素分析[J].园艺学报,2000,29(2):183-185.
[3] 朱根发,蒋明殿.大花蕙兰的组织培养和快速繁殖技术[J].广东农业科学,2004(4):36-38.
[4] 吴晓露,姜敦云,崔月花,等.大花蕙兰的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2002,28(2):141.
[5] 张蜀宁,孙敏红.多倍体育种在园艺作物中的应用[J].江苏农业科学,2004(1):68-72.
[6] 常青云,朱莉思,曹鑫,等.多因素对秋水仙素诱导多倍体效率的影响[J].安徽农业科学,2007,35(31):9863-9866.
[7] 王娜,刘孟军,代丽,等.秋水仙素离体诱导冬枣和酸枣四倍体[J].园艺学报,2006,32(6):1008-1012.
[8] 吴红芝,张锡庆,郑思乡,等.彩色马蹄莲多倍体的诱导[J].园艺学报,2008,35(3):443-446.
[9] 陈薇,王守铄.铁皮石斛茎段离体快繁[J].植物生理学通讯,2002,38(2):145.
[10] 朱徽.植物染色体及染色体技术[M].北京:科学出版社,1996.

Primary Studies on Polyploid Induction of *Cymbidium hybrid* In Vitro

YANG Li-juan¹, GAO Sur-ping¹, ZOU Zong-lan², CHEN Guo³

(1. Forestry and Horticulture College, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014, China; 2. Sichuan Provincial Yangchun Horticulture Co. Ltd, Pixian, Sichuan 611700 China; 3. Baihuatan Park of Chengdu, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: The PLBS of *C. Ruby Shower* ‘Murasakin Okimi’ were treated with colchicines for two different condition *in vitro*. The results showed that polyploidy callus was obtained by colchicines soaking or by adding colchicines into the medium. The latter method was better than the former one. The best result for inducing tetraploid was by adding colchicines 300 mg/L into the medium treated for 15 days, the inducing rate was up to 30%. The chromosome number of the tetraploid was 2n=2x=40, while that of diploid was 2n=4x=80.

Key words: *Cymbidium hybrid*; Colchicine; Polyploid