

秋石斛同源四倍体诱导与鉴定

李秀兰*, 安 东

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘 要: 为了创制秋石斛同源四倍体新种质, 以秋石斛同株异花授粉种子为材料, 用组织培养方法, 通过种子非共生萌发与原球茎诱导, 在原球茎发育的原胚期, 以低浓度混合诱变剂进行多倍体诱导。结果用 0.01%秋水仙素 + 5 mg · L⁻¹ 氨基灵处理 8 ~ 10 d, 四倍体 (2n = 4X = 76) 诱变率达 90% 以上, 未发现嵌合体。与二倍体对照比较, 四倍体植株粗壮, 叶色深绿, 叶片宽厚。

关键词: 秋石斛; 同源四倍体; 种子; 原球茎; 原胚期; 氨基灵

中图分类号: S 682.2; Q 813.1⁺2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 08-1239-04

Induction and Identification of Autotetraploids in *Dendrobium*

L I Xiu-lan* and AN Dong

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: In this paper, the polyploids were induced by low concentration of colchicin and oryzalin solution at early developing embryo in order to research and produce a new sort of gemplasm of autotetraploid in *Dendrobium hybrida* orchids. During the process, the cross-pollinated seeds in the same plant were utilized as materials to obtain the PLBs through seed non-symbiotic germination and induction which applied in the process of tissue culture. The results revealed that the rate of tetraploid was over 90% when treated with 0.01% colchicine and 5 mg · L⁻¹ oryzalin during 8 - 10 days. Moreover mosaic was not found in the doubling materials in the whole experiment. Compared with diploid, the tetraploid plantlets have always been more stout, the leaf are dark green and wide-thick.

Key words: *Dendrobium hybrida*; autotetraploid; seed; protocorm-like body (PLB); early developing embryo; oryzalin

秋石斛 (*Dendrobium hybrida*) 为兰科石斛属多年生附生草本植物, 以原产澳大利亚昆士兰地区的蝴蝶石斛 (*D. phalaenopsis* Fitzg.) 为主要亲本杂交而成, 属蝴蝶石斛系 (*Phalaenopsis* type), 又称蝶花型石斛兰 (中国林业科学研究院花卉研究与开发中心, 2007)。秋石斛花期长, 花姿优雅, 花多, 枝长, 目前主要以商业化切花和盆花生产为主, 是石斛兰中最具观赏价值的种群。

石斛属是一个具有多倍性的属 (程式君等, 1985)。通常多倍化植物表现为根、茎、叶、花、果实等器官的巨大性。四倍体可以直接育成稳定品种, 同时也可以进行杂种优势利用 (李树贤, 2003)。李涵等 (2005) 用秋水仙素对二倍体齿瓣石斛 (*D. devonianum*) 试管丛生芽进行诱导, 成功获得了多倍体植株。目前有关秋石斛同源四倍体研究尚未见报道。作者以秋石斛系 ‘索尼娅’ 为材料进行了多倍化诱导研究, 报道如下。

收稿日期: 2009 - 01 - 08; 修回日期: 2009 - 06 - 22

基金项目: 国家 ‘863’ 计划项目 (2006AA100109); 天津市科技计划项目 (07ZCKFNC01200)

* E-mail: lix1401@nankai.edu.cn; Tel: 13821814059

致谢: 本研究承蒙陈瑞阳教授多方指导, 特此致谢!

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为秋石斛系的‘索尼娅’(*D. hybrida* ‘Sonia’), 购于三益集团山东兖州基地, 栽种在天津市蓟县本课题试验基地(图版, 1)。在秋石斛开花后 1~2 周内进行同株异花授粉, 授粉后 6 个月(2005 年 12 月 16 日—2006 年 6 月 22 日)取下蒴果进行种子培养。

1.2 方法

1.2.1 种子非共生萌发与原球茎诱导 取蒴果果荚, 先用流水冲洗干净, 75%酒精表面擦拭, 然后 75%酒精洗 30 s, 0.1% HgCl_2 表面消毒 6~8 min, 无菌蒸馏水浸洗 3 次。剖开果荚, 种子接入 1/2MS 液体培养基中, 在 25℃ 条件下进行种子非共生萌发。避光培养 1 周, 然后转入光照培养, 培养室每天光照 12 h, 光强度 1 500 lx, 定期观察种子萌发情况。培养至 6 周时转换一次培养基, 即 1/2MS + 蔗糖 25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 花宝 2 号 (N P K=20 20 20) 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。种子一旦开始萌发, 随时观察原球茎发育状态, 为下一步多倍体诱导提供最佳发育时期的原球茎材料。

1.2.2 同源多倍体诱导 取发育 4 周、6 周和 8 周的原球茎, 分别转入含秋水仙素 (0.01%) + 氨基磺灵 (5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 1/2MS 液体培养基中, 处理时间为 2、5、8 和 10 d, 总共 12 个处理, 在 23~25℃ 条件下进行染色体加倍, 然后将其转入不含任何诱变剂的新鲜 1/2MS 液体培养基中继续培养, 2 周后统计其成活率, 并进行编号。成活的原球茎经 4 周培养以后, 直接转入 MS + 蔗糖 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 卡拉胶 7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 香蕉汁 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 活性炭 0.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的固体培养基中, 进行复壮和分化培养。

1.2.3 染色体倍性鉴定 每个处理均随机取样 50 粒(株), 采用植物染色体标本制备的去壁低渗法(陈瑞阳等, 1979)进行倍性鉴定。

2 结果与分析

2.1 种子非共生萌发与原胚期原球茎的形成

秋石斛种子接种于 1/2MS 液体培养基中培养 2 周后开始膨胀, 4 周时萌发率接近 100% (图版, 2)。秋石斛成熟种子在非共生萌发培养过程中除少数种胚不发育外, 多数种胚都能发育, 图版 2 箭头所示为种胚形成球形胚后, 开始从种壳中脱落。球形胚发育到 6 周, 在显微镜下可以清晰地看到胚细胞变大成为薄壁细胞, 而且有部分球形胚表面伴有突起(图版, 3), 但尚未分化。培养到 8 周, 球形胚从种壳中完全脱落, 成为裸露的绿色原球茎, 但仍尚未分化, 形成原胚期原球茎(图版, 4)。

2.2 原球茎发育时期与成活率

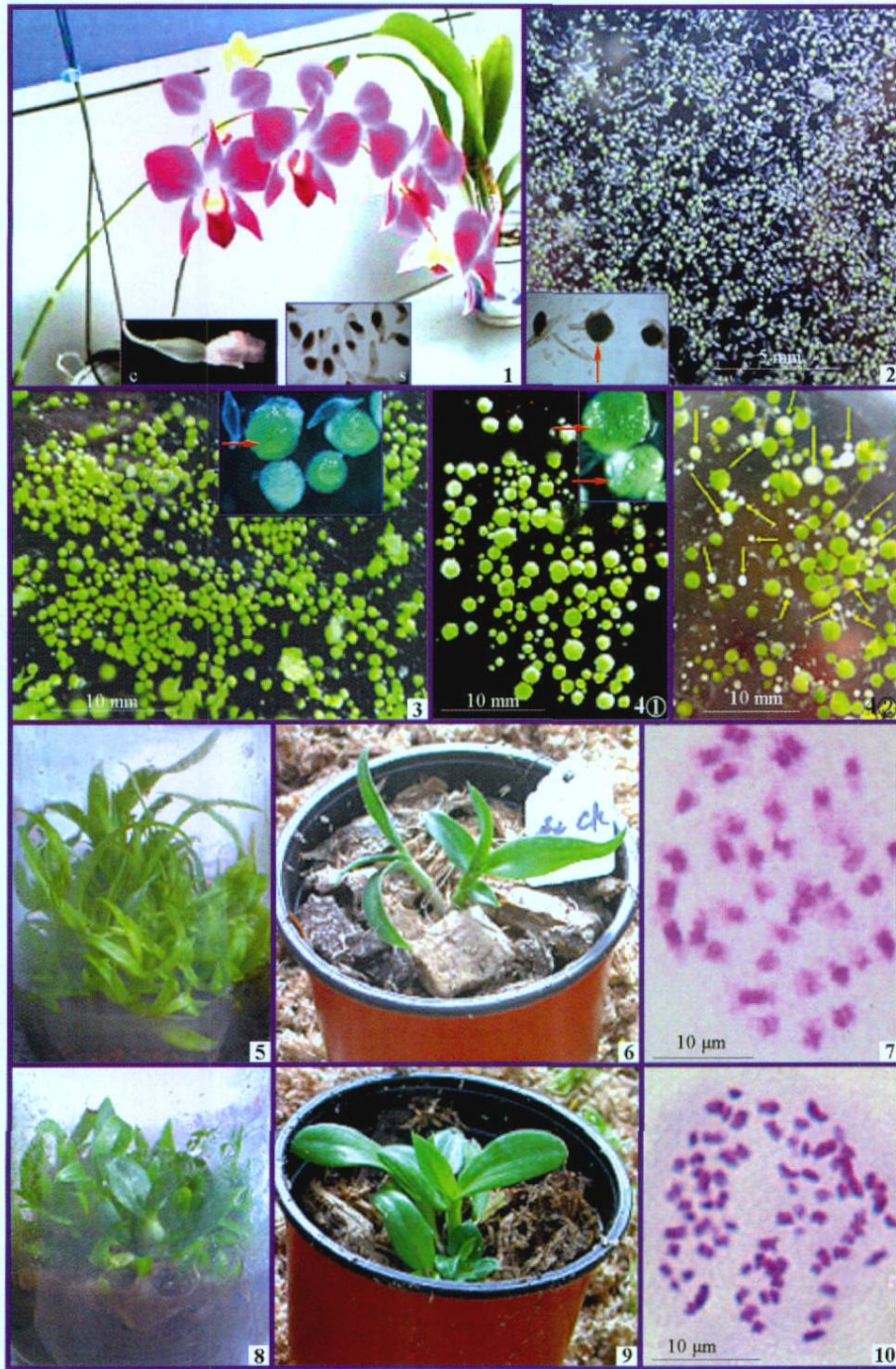
在相同的诱变处理条件下, 原球茎成活率与原球茎发育时期密切相关(表 1)。发育 4 周的原球茎诱变处理 2 d, 成活率为 42%, 诱变处理 5~10 d, 成活率为零; 发育 6 周的原球茎, 成活率在 46%~100%; 发育 8 周的原球茎, 成活率为 58%~100%。因此, 选择发育 6~8 周的原球茎进行多倍体诱变处理可以得到足够可供选择的群体。

2.3 原球茎发育时期与多倍体诱变频率

秋石斛多倍体诱变频率与原球茎发育时期密切相关(表 1)。发育 4 周的原球茎未能诱导成功多倍体, 发育 6 周和 8 周的原球茎都能诱导出多倍体。其中以发育 6 周和 8 周原球茎诱导 10 d 的诱变频率最高, 同源四倍体频率达到 100%。

2.4 倍性鉴定与同源四倍体形态观察

鉴定结果表明: 秋石斛二倍体对照植株为 $2n=2x=38$ (图版, 5~7), 同源四倍体植株为 $2n=4x=76$ (图版, 8~10)。与二倍体相比, 同源四倍体植株外形粗壮, 叶片增厚, 叶色深绿, 叶形和叶片大小与二倍体有明显差异。四倍体的农艺性状表现出了多倍体典型的根、茎、叶的巨大性。



图版说明：1. 二倍体秋石斛花、蒴果（c）和种子（s）；2. 培养4周的萌发种子（箭头所示为从种壳中脱落的球形胚）；3. 发育6周的原球茎（箭头所示为种壳脱落原球茎）；4. 发育8周原球茎：加倍处理前的原球茎，加倍处理后的原球茎（箭头所示为白化致死原球茎）；5. 二倍体瓶苗；6. 二倍体移栽苗；7. 二倍体染色体， $2n=2x=38$ ；8. 四倍体瓶苗；9. 四倍体移栽苗；10. 四倍体染色体， $2n=4x=76$ 。

Explanation of plates: 1. Flower, capsule (c) and seeds (s) of diploid *D. hybrida* 'Sonia'; 2. Seed germinated by tissue culture at 4 weeks (The arrow indicates spherical embryo fell from seed coat); 3. The PLBs of developmental 6 weeks (The arrow indicates that PLBs appear surface projection); 4. The PLBs of developmental 8 weeks: PLBs before doubling, PLBs after doubling (The arrow indicates albino and dead PLBs); 5. Tissue-culture container seedling of diploid control; 6. Diploid transplants; 7. Diploid chromosomes, $2n=2x=38$; 8. Tissue-culture container seedling of tetraploids; 9. Tetraploids transplants; 10. Tetraploid chromosomes, $2n=4x=76$.

表 1 0.01%秋水仙素 + 5 mg · L⁻¹ 氨基灵诱导秋石斛种子原球茎结果

Table 1 The results of those PLBs induced by colchicin (0.01%) and oryzalin (5 mg · L⁻¹) solution in different times

原球茎萌发时间 /w Development time of PLBs	加倍时间 /d Doubling times	接种数 PLB numbers	成活数 A live numbers	成活率 /% A live rate	同源四倍体数 Autotetraploid numbers	同源四倍体诱变率 /% Rate induced autotetraploids
4	2	50	21	42	0	0
	5	50	0	0	0	0
	8	50	0	0	0	0
	10	50	0	0	0	0
6	2	50	50	100	0	0
	5	50	41	82	26	63.4
	8	50	31	62	29	93.5
	10	50	23	46	23	100.0
8	2	50	50	100	0	0
	5	50	50	100	9	18.0
	8	50	45	90	41	91.1
	10	50	29	58	29	100.0

3 讨论

利用原球茎进行多倍体诱变是获得兰科植物多倍体新种质的有效途径。以兰花原球茎为材料进行多倍体诱导国内外已有报道 (Kim et al , 1997; Kim & Kim, 2003; 邓樱 等, 2008), 但采用原胚期原球茎进行秋石斛多倍体诱导尚未见报道。本项研究在原球茎分化的初期进行多倍体诱导, 由于加倍的都是处于尚未分化的母细胞阶段的原始细胞, 加倍后原胚继续生长, 发育成多倍体原球茎, 由多倍体原球茎再分化成多倍体幼苗, 因此, 一旦加倍成功, 可以获得足够数量的多倍体群体, 以满足选种的需要。这是以种子和生长点进行多倍体诱变方法无法达到的。

References

Chen Rui-yang, Song Wen-qin, Li Xiu-lan 1979. A new method for preparing mitotic cheomosomes from plant Acta Botanica Sinica, 21 (3): 297 - 298. (in Chinese)

陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 1979. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法. 植物学报, 21 (3): 297 - 298

Cheng Shi-jun, Hu Zhi-heng, Li Xiu-lan, Chen Rui-yang 1985. A preliminary study on the chromosomes of *Dendrobium* in China Acta Horticulturae Sinica, 12 (2): 119 - 124. (in Chinese)

程式君, 胡志衡, 李秀兰, 陈瑞阳. 1985. 国产石斛属染色体研究初报. 园艺学报, 12 (2): 119 - 124.

Deng Ying, Zhou Ye, Chen Jimin 2008. Methods of polyploid induction of *Cymbidium* with colchicine Subtropical Plant Science, 37 (2): 38 - 40. (in Chinese)

邓 樱, 周 晔, 陈继敏. 2008. 秋水仙素诱导兰属 ‘素心黄’ 多倍体的方法研究. 亚热带植物科学, 37 (2): 38 - 40

Flower Research and Development Center, Chinese Academy of Forestry. 2007. *Dendrobium*. Beijing: Chinese Forestry Publishing House (in Chinese)

中国林业科学研究院花卉研究与开发中心. 2007. 石斛兰. 北京: 中国林业出版社.

Kim M, Kim Jae-Yeong 2003. Chromosome doubling of a *Cymbidium* hybrid with colchicine treatment in meristem culture Proceedings of NDC: 37 - 40.

Kim M S, Won J Y, Song C H, Eun J S, Lee D W. 1997. Polyploidy induction of *Cymbidium kanran* by treatment of colchicine *in vitro* Journal of Horticulture Science, 39 (1) : 73 - 76

Li Han, Zheng Si-xiang, Long Chun-lin 2005. Induction of polyploid of *Dendrobium devonianum*. Acta Botanica Yunnanica, 27 (5): 552 - 556. (in Chinese)

李 涵, 郑思乡, 龙春林. 2005. 齿瓣石斛多倍体的诱导初报. 云南植物研究, 27 (5): 552 - 556

Li Shu-xian 2003. Several problems on autopolyploid breeding in plants Acta Bot Boreali-Occident Sin, 23 (10): 1829 - 1841. (in Chinese)

李树贤. 2003. 植物同源多倍体育种的几个问题. 西北植物学报, 23 (10): 1829 - 1841.