

大花蕙兰组培快繁技术研究

钱 张

(安徽省枞阳县林业局, 安徽枞阳 246702)

摘要 大花蕙兰多为杂交品种, 种子繁殖无法保持其品种特性, 且分株能力弱, 因而繁殖系数低, 繁殖速度慢, 故特采用组培技术以提高大花蕙兰的繁殖率。在初代培养过程中, 以 MS 为基本培养基, 附加 0.5mg/L BA+1.5mg/L NAA 作为诱导原球茎培养基, 培养效果最佳。在继代培养中, 以 MS 为基本培养基, 附加 0.5mg/L BA+1.0mg/L NAA 作为原球茎增殖培养基, 3~4 周后, 增殖数可以达到 64.5。另外, 培养基中附加 0.5~1.0g/L 活性炭, 对吸附培养基中的杂质和在培养过程中分泌的醌、酚类物质以及防止外植体褐变, 有显著效果。

关键词 大花蕙兰; 组织培养; 快速繁殖

大花蕙兰是指原产于印度、缅甸、泰国、越南和我国南部等地区的兰属(*Cymbidium*)中的一些附生性较强的大花种和主要以这些原种为亲本获得的人工杂交种。由于它们与蕙兰(*C. faberi*)较相似而花朵硕大, 故称为“大花蕙兰”。

当前, 国内外对大花蕙兰的栽植与开发都很重视。北京、广州、大连和昆明等城市已分别从国外引入大花蕙兰成品苗植株, 开展批量栽培生产, 而按传统技术繁殖大花蕙兰, 繁殖系数很低, 重点发展名优品种, 迫切需要组培快繁。本研究旨在瞄准市场需求及国内大花蕙兰盆花生产的薄弱环节, 利用组织培养技术进行名、优新品种种苗的快速繁殖生产, 努力探索试管苗的成苗栽培技术, 以便生产大批遗传性稳定的优良品种, 供规模化生产之用, 从而进一步丰富我国兰花花卉资源, 促进盆花商品化生产, 以达到提高经济效益之目的。

1 材料与方法

1.1 无菌材料的获得

将大花蕙兰 8~10cm 的幼芽从母体上采下, 同时选取 2~3cm 长的幼根。先用自来水流水冲洗 1h, 用 75% 的酒精浸泡 30s 后再置于 0.1% 升汞溶液中消毒 8min, 然后用无菌水冲洗 5 次, 用消毒滤纸吸干表面水分, 剥除外围小叶, 切取 0.3~0.5cm 长的茎尖, 幼根切成 0.5~0.8cm 长的根段。

1.2 培养条件

以 MS 为基本培养基, 添加细胞分裂素 BA、生长素 NAA 两种成分, 每种附加成分设置不同的浓度水平, 按正交设计配制 9 种诱导培养基。

9 组原球茎诱导培养基配方: ①MS+BA 0.1mg/L+NAA 0.5mg/L; ②MS+BA 0.1mg/L+NAA 1.0mg/L; ③MS+BA 0.1mg/L+NAA 1.5mg/L; ④MS+BA 0.5mg/L+NAA 0.5mg/L; ⑤MS+BA 0.5mg/L+NAA 1.0mg/L; ⑥MS+BA 0.5mg/L+NAA 1.5mg/L; ⑦MS+BA 1.0mg/L+NAA 0.5mg/L; ⑧MS+BA 1.0mg/L+NAA 1.0mg/L; ⑨MS+BA 1.0mg/L+NAA 1.5mg/L。

设计 9 组原球茎增殖培养基配方: ①MS+BA 0.5mg/L+NAA 0.1mg/L; ②MS+BA 0.5mg/L+NAA 0.5mg/L; ③MS+BA 0.5mg/L+NAA 1.0mg/L; ④MS+BA 1.0mg/L+NAA 0.1mg/L; ⑤

MS+BA 1.0mg/L+NAA 0.5mg/L; ⑥MS+BA 1.0mg/L+NAA 1.0mg/L; ⑦MS+BA 1.5mg/L+NAA 0.1mg/L; ⑧MS+BA 1.5mg/L+NAA 0.5mg/L; ⑨MS+BA 1.5mg/L+NAA 1.0mg/L。

每升加入蔗糖 30g, 琼脂 7g。加热融化后调节 pH 值为 5.6~5.8, 分别装入三角瓶中。培养室内温度为 25~28℃, 光照 12h, 光照强度为 1 000~1 500Lx。

2 结果与分析

2.1 原球茎的诱导

不同浓度的 BA、NAA 对于诱导原球茎的影响效果不一样, 设计 BA 的浓度分别为 0.1mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L, NAA 的浓度为 0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L, 正交实验每一处理接种 15 个根段外植体, 重复 2 次, 4 周后观察记录(见表 1)。

表 1 不同浓度的 BA、NAA 处理组合对原球茎诱导的影响

处理序号	BA//mg/L	NAA//mg/L	诱导出原球茎数
1	0.1	0.5	27.0
2	0.1	1.0	31.5
3	0.1	1.5	31.5
4	0.5	0.5	30.5
5	0.5	1.0	35.3
6	0.5	1.5	37.0
7	1.0	0.5	30.5
8	1.0	1.0	34.5
9	1.0	1.5	33.0

以根段和茎尖为外植体接种于起始培养基(原球茎诱导培养基)上, 接种 1 周左右幼芽茎尖基部开始膨大, 2 周后逐渐产生黄绿色、小的瘤状愈伤组织即原球茎, 原球茎继续生长, 在其周围形成更多的原球茎, 接种 2 周左右幼根切口处开始膨大, 3 周后逐渐形成淡绿色, 小的瘤状原球茎和幼芽诱导的原球茎一样, 随着原球茎的生长在其周围形成更多的原球茎, 此进程需要 1 个月左右。

比较处理观察后的数据可见 BA、NAA 对大花蕙兰原球茎的诱导有极其显著的作用, 能明显增进外植体形成原球茎。处理 6 的诱导原球茎的数量最多; 处理 1 诱导原球茎的数量最少。

由处理 1、处理 2、处理 3 来看, BA 浓度较小为 0.1mg/L 时, NAA 浓度的增加对诱导原球茎的数量没有变化; 由处理 4、处理 5、处理 6 来看, BA 的浓度增加到 0.5mg/L 时, NAA 浓度的增加使原球茎的诱导数量明显增加, 由 30.5 增加到 37.0; 而当 BA 的浓度继续增加到 1.0mg/L 时, NAA 浓度的增加反倒会抑制原球茎的诱导。

作者简介 钱张(1971-), 男, 林业工程师, 现供职于枞阳县林业局, 兼县国有将军庙林场场长, 长期从事基层林业技术服务与推广工作。

收稿日期 2007-07-30

由此可见,原球茎的诱导是BA、NAA共同作用的结果,选择合适的浓度至关重要。BA、NAA的最佳浓度分别为0.5mg/L和1.5mg/L,最佳诱导原球茎培养基为MS+BA 0.5mg/L+NAA 1.5mg/L。

2.2 原球茎的增殖

原球茎的增殖关系到大花蕙兰繁殖速度的快慢、增殖系数的高低,以MS为基本的培养基,将BA浓度设置为0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L, NAA的浓度设置为0.1mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L。正交实验以找出适宜的增殖分化培养基,每一处理接种15个切割后的原球茎,重复2次,培养4周后观察记录(见表2)。

表2 BA、NAA不同浓度对原球茎增殖的影响

处理序号	BA//mg/L	NAA//mg/L	原球茎增殖数	增殖倍数
1	0.5	0.1	50.0	3.33
2	0.5	0.5	52.5	3.50
3	0.5	1.0	64.5	4.30
4	1.0	0.1	52.0	3.47
5	1.0	0.5	61.0	4.07
6	1.0	1.0	54.5	3.63
7	1.5	0.1	47.0	3.13
8	1.5	0.5	50.5	3.67
9	1.5	1.0	45.5	3.03

将上述原球茎切成3mm左右的小块,接种于原球茎增殖培养基上,每3~4周继代1次,增殖系数可达4.3,即3mm的原球茎数量可增殖4.3倍。在原球茎增殖量方面,本研究以每个接种物上所形成的原球茎个数作为计算依据,就原球茎增殖量的计算来说是最为合理的。但是由于原球茎的发育状态不一致,有的原球茎处于发育晚期,体积较大,有的原球茎处于发育早期,体积较小,但在计算增殖量方面是相同的,这样在客观上不可避免地会出现误差。同时,使用肉眼计数时,也会出现人为的误差。

由处理1、处理2、处理3可以看出,BA的浓度为0.5mg/L时,NAA由0.1mg/L的浓度增加到1.0mg/L,原球茎增殖数由50.0增到64.5,增殖倍数由3.33增到4.30,增殖的幅度比较大;由处理4、处理5、处理6可以看出,BA的浓度增加为1.0mg/L时,NAA的浓度增加为0.5mg/L时,原球茎增殖数增加,但当NAA的浓度增加到1.0mg/L时,原球茎增殖数反而下降,说明了高浓度的NAA对原球茎的增殖有抑制作用。

由处理7、处理8、处理9可以看出,BA的浓度增加为1.5mg/L时,对原球茎的抑制作用比较明显,处理7、处理8、处理9的原球茎增殖数要小于前6组数据,尤其当BA、NAA浓度都达到最高的时候,抑制作用更为明显,原球茎的增殖数降低到最小。因此,适宜的BA、NAA浓度才会对于原球茎的增殖起到良好的促进作用,浓度偏高或者偏低都不利于原球茎的增殖,最佳原球茎增殖培养基为MS+BA 0.5mg/L+NAA 1.0mg/L。

在原球茎的增殖过程中,培养物接种3~4d后便开始分泌出一种红色多酚氧化物于培养基中,逐渐地整个培养基也变成红色,培养物的切口处因而变为褐色,此时培养物的

生长会受到一定程度的抑制,如果在培养基中加入0.5~1.0g/L的活性炭,可以吸附有害物质,对细胞的生长有利,这些被吸附的有害物质包括琼脂中包含的物质,培养物在培养过程中分泌的醌、酚类红色物质以及蔗糖在高压消毒时产生的羟基糠醛。

3 讨论

3.1 原球茎增殖的计算方法

由于本试验中所使用的大花蕙兰原球茎培养物不同于愈伤组织或一般的胚性愈伤组织,其增殖在早期形成少量愈伤组织外,这些愈伤组织随后分化形成原球茎。因此,对于原球茎的增加以质量或体积来计量都不是很合理,另一方面以质量或体积来计算原球茎的增殖在实际操作中难度较大,而且增加了污染的可能性。试验表明,原球茎的增殖量是以每个接种物经培养1个月后所形成的原球茎的个数的平均值来计算的。

3.2 不同切割方式对原球茎增殖的影响

不同切割方式对原球茎增殖的影响也不同。试验采用随机分切、纵切、碾压、井字型切割法。经20d培养后观察:随机分切法虽操作快捷,但有大量切割过于碎小的培养块死亡;纵切法操作需细致、费时,但原球茎增殖数多、大小一致;碾压和井字型切割(底部不分开)原球茎增殖时间可缩短、可加快继代,但单个继代原球茎增殖倍数减少。原球茎切块细小、稀疏的培养瓶内群体生长较慢,而切块较大且密集的培养瓶内群体生长十分健壮,表现类似于群体生长效应。因此切割时不可过细,直径要在2mm以上,每瓶接种15个培养块,可使瓶内营养得以充分利用。原球茎的继代应保持在12~15代以内,因为继代次数过多,原球茎分生能力降低,长势弱化,诱导的试管苗质逐渐变弱,故应及时的更换、诱导新的原球茎,以保持其健壮正常的生活力。

3.3 BA在原球茎诱导和增殖中的作用

BA在兰花组织培养中无疑具有非常重要的作用,特别是在原球茎诱导方面。许多研究表明,原球茎的诱导需要较高的BA质量浓度,如BA可达到10mg/L甚至更高,但BA对原球茎的增殖是否需要同样高质量浓度的BA,不同的研究者得到了各不相同的研究结果。一些研究表明,原球茎的增殖并不需要高质量浓度的BA,高质量浓度的BA可抑制原球茎的分化,这与BA在细胞分裂素中活性较强有关,BA用量较大,过快地促进细胞分裂,反而对大花蕙兰的原球茎增殖不利。

3.4 NAA在原球茎增殖中的作用

NAA对大花蕙兰原球茎增殖的促进作用明显好于BA。在0.1~0.5mg/L范围原球茎的增殖指数逐渐提高,NAA 0.5~1.0mg/L范围原球茎增殖较快,原球茎的状态颜色正常。

4 结论

大花蕙兰多为杂交品种,种子繁殖无法保持其品种特

(下转第19页)

表1)。

3 讨论

3.1 SAM法产生SSR位点的频率

本研究获得的含SSR位点的测序片段中,二核苷酸(CA/AC)_n和(GT/TG)_n的重复位点最多,与Hayden M.J.所获得的结果一致,但在许多报道中,(GA)_n重复广泛存在于植物基因组中,如Rivera R等在椰子SSR标记开发研究中,得到的二核苷酸重复占所有位点重复的64%,其中二核苷酸重复有三类:GA/CT、CA/GT、GC/CG,比例分别为40%、23%和1%。Viruel M.A.等在荔枝SSR标记开发中得到最多的SSR重复位点也是(CT)_n/(GA)_n,占71.5%。出现这样不同的结果,原因可能是所用的方法不同而致。笔者发现,在一些报道中,用含不同的SSR序列的寡核苷酸作为探针进行杂交筛选,最后所得到的重复单元类型大部分与探针所含的SSR序列相同,表明了不同的重复单元出现的频率也受外源因素的影响。但可以肯定的是,二核苷酸重复出现的频率普遍都高于三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸重复。

3.2 SAM法分离SSR序列及多态性SSR标记效率

本研究参照Hayden和Sharp的SAM法分离SSR序列,总共分离克隆了50个DNA片段,最后得到20个含有SSR序列并相互不重复的片段,设计了23对引物,其中22对表现多态性。从测序算起,实际阳性克隆效率为42%,产生多态性SSR标记的效率约为44%。李明芳等同样用SAM法在荔枝SSR引物开发中,所获得的阳性克隆达93%。两个研究所得的实际阳性克隆效率差异较大,可能有2个原因:一是两种材料之间的差异性。虽然微卫星重复序列广泛分布在基因组之间,但其含量、类型及重复的长度在不同的材料中存在差异,即使在同一物种的群体中也会存在差异;另一个是选择的5'锚定兼引物不相同。相比之下,用SAM法得到的阳性克隆效率均比用经典构建和筛选小插入片段基因组文库的方法,或者是STMS法所得到的高很多。如Tokuko等用经典的方法最后只在6000个克隆中得到3个含SSR序列的阳性克隆,占0.05%。Rajora O.P.等用STMS法在4028个克隆中最后得到阳性克隆71个,效率为1.8%。同样,也有报道用STMS法对不同的芭蕉属植物中进行SSR标记的开发,如Buhariwalla HK等和Kaemmer D等他们都用含微卫星序列的探针进行杂交、筛选,最后获得阳性克隆的效率分别为4%和2.8%,产生多态性SSR标记的效率分别为43.6%和9.4%。

4 结论

由以上所获得的结果表明,本研究中所采用的开发SSR标记的方法不仅简便、效率高且成本低。此外,而本研

究利用SAM法所获得的引物对与前两者都不同,主要是在本研究中发现,5'锚定引物的简并性,导致该引物与设计的特异引物配对后,部分引物对在进行检测时,扩增得到的条带不清晰且稳定性较低。因此,为了增加扩增的稳定性,本研究也首次在原来的方法中加以改进,就是在设计每条特异引物的序列中,再分别设计合适的特异引物来取代5'锚定引物,使每对引物都成为特异的标记,这些特异的标记在检测中表现出的特异性和稳定性均比与5'锚定引物配对的高,而且条带的清晰度也有所增强。

5 参考文献

- [1] 杜道林,苏杰,周鹏,等.香蕉33个品种的RAPD研究[J].植物学,2001,43(10):1036-1042.
- [2] 易干军,余晓英,霍合强,等.粉蕉、大蕉和龙牙蕉的AFLP分类研究[J].园艺学报,2002,29(5):413-417.
- [3] 杨进.SSR分子标记技术在植物遗传多样性研究上的应用[J].中国农业通报,2006,22(7):90-94.
- [4] TOKUKO UJINO, TAKAYUKI KAWAHARA, YOSHIHIKO TSUMURA, et al. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species[J]. Heredity, 1998, 81(4): 422-428.
- [5] HUANG H B, SONG Y Q, HSEI M, et al. Development and characterization of genetic mapping resources for the Turkey (Meicagris gallopavo) [J]. The Journal of Heredity, 1999, 90(1): 240-242.
- [6] RAJORA O P, RAHMAN M H, DAYANANDAN S. Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species [J]. Mol Gen Genet, 2001, 264(6): 871-882.
- [7] BUHARIWALLA H K, L. JARRET R, JAYASHREE B, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana* [J]. Molecular Ecology Notes, 2005(5): 327-330.
- [8] KANCMER D, FISCHER D, JARRET R. L, et al. Molecular breeding in the genus *Musa*: a strong case for STMS marker technology [J]. Euphytica, 1997, 96(1): 49-63.
- [9] HAYDEN M J, SHARPP J. P. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(8): 44.
- [10] PATERSON AH, BRUBAKER C L, WENDEL J. F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* Spp) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. Plant Mol Bio Rep, 1993, 11(2): 122-127.
- [11] RIVERA R, EDWARDS K J, BARLER J. H. A, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *cocos nucifera* L [J]. Genome, 1999, 42(4): 668-675.
- [12] VIRUEL M. A., HORMAZA J. I. Development, characterization and variability analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae) [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108(5): 896-902.
- [13] YAI SH W F, PEREZ DE LAVEGAM. Isolation of (GA)_n Microsatellite Sequences and Description of a Predicted MADS-box Sequence Isolated from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Genetics and Molecular Biology, 2003, 26(3): 337-342.
- [14] HUTOKSHI K, CROUCH H. J., ROBERT L, et al. Segregation at Microsatellite loci in Haploid and Diploid Gametes of *Musa* [J]. Crop Sci, 1998, 38(1): 211-277.
- [15] 李明芳, 郑学勤. 荔枝SSR标记的研究 [J]. 遗传, 2004, 26(6): 911-916.
- [16] 张军, 武耀廷, 郭旺珍, 等. 棉花微卫星标记的PAGE/银染快速检测 [J]. 棉花学报, 2000, 12(5): 267-269.

(上接第16页)

性,且分株能力弱,因而繁殖系数低,繁殖速度慢。因此,我们采用组培技术提高大花蕙兰的繁殖率。在初代培养过程中,以MS为基本培养基,附加0.5mg/L BA+1.5mg/L NAA,作为诱导原球茎培养基,培养效果最佳。在继代培养中,以

MS为基本培养基,附加0.5mg/L BA+1.0mg/L NAA作为原球茎增殖培养基,3~4周后,增殖数可以达到64.5。另外,培养基中附加0.5~1.0g/L活性炭,对吸附培养基中的杂质和在培养过程中分泌的醌、酚类物质以及防止外植体褐变,有显著效果。