

秋水仙素诱导黑喉石斛多倍体研究^①

王爱华, 吴青青, 杨 澜, 许红娟, 陈之林

贵州省园艺研究所, 贵阳 550006

摘要: 以黑喉石斛原球茎为材料, 探讨了秋水仙素不同处理对黑喉石斛多倍体诱导的影响. 流式细胞仪测定结果表明, 适宜四倍体诱导的秋水仙素质量分数在 0.01%~0.03% 之间, 适宜八倍体诱导的秋水仙素质量分数在 0.05%~0.10% 之间, 处理时间均为 2~3 d; 获得的多倍体在形态、气孔和染色体数目上有明显变化; 八倍体与四倍体相比, 发育更加迟缓, 多表现为整株分叉.

关键词: 黑喉石斛; 秋水仙素; 多倍体; 原球茎

中图分类号: Q943

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)01-0055-06

石斛属(*Dendrobium*)植物既是我国传统中药材, 更是名贵的观赏花卉. 近年来, 石斛产业发展迅猛, 产品一直处于供不应求的状态, 且需求有逐年增加趋势. 因此, 培育优质、高产石斛新种质十分紧迫和必要. 多倍体因器官巨大、株型奇特、抗逆性强等特征而被育种家们青睐, 已成为目前种质创新研究的热点和重点领域之一. 现已获得铁皮石斛^[1]、齿瓣石斛^[2]、粗舌石斛^[3]、金钗石斛^[4]、春石斛及秋石斛杂交种^[5-6]的多倍体. 黑喉石斛(*Den. ochreatum*)嫩茎开花的特性有别于其他石斛品种, 即在新芽长成后便立即开花, 不需经过冬季的低温处理, 大大缩短了开花时间, 使之更具有特殊价值, 是石斛育种的珍贵材料. 目前对于黑喉石斛的研究国内还未见报道. 本研究以黑喉石斛的原球茎为材料, 采用秋水仙素进行多倍体诱导, 以期对石斛种质资源创新提供新材料.

1 材料与方法

1.1 材 料

黑喉石斛蒴果采自贵州省园艺研究所花卉温室大棚, 经体细胞染色体鉴定为二倍体, $2n=2x=38$. 将种子无菌萌发 7 周后形成的原球茎作为实验材料.

1.2 多倍体植株诱导

将原球茎浸入含不同质量分数的秋水仙素的液体培养基(1/2MS+30 g/L 蔗糖+0.5 mg/L NAA)中(对照不加秋水仙素), 进行不同时间的悬浮培养(表 1), 培养条件为: 温度(25±2)℃, 摇床转速 100 r/min. 原球茎在液体培养后经 100 目筛子过筛, 用无菌水冲洗 3 遍, 用灭菌滤纸吸干水分, 再接种于育苗培养基(1/2MS 0.2 g+花宝 1 号 1.5 g+花宝 2 号 1.5 g+Peptone 1.0 g+肌醇 0.1 g+1g/L 活性炭+30 g/L 白糖+4 g/L 琼脂+0.5 mg/L NAA)上进行分化培养, 每处理接种 60 株, 重复 3 次, 培养瓶置于光照培养室中培养, 光培室的温度为(25±2)℃, 光照强度为 2 000 lx, 每日光照 12 h, 培养 60 d 继代 1 次.

^① 收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(31160400); 贵州省科技计划项目(黔科合 NY 字(2012)3032 号); 贵州省科学技术厅贵州省农业科学院科学技术联合基金项目(黔科和 J 字 LKN(2013)20 号).

作者简介: 王爱华(1982-), 女, 河北邯郸人, 助理研究员, 硕士, 主要从事细胞生物学研究.

通信作者: 陈之林, 副研究员, 博士.

表 1 不同秋水仙素处理对黑喉石斛植株形态的影响

秋水仙素的质量分数/%	培养时间/d	叶长/mm	叶宽/mm	叶型指数	株高/cm	茎粗/mm
0.005	1	19.67±0.58efg	2.00±0.00j	9.78±0.25ab	3.27±0.06bcd	3.20±0.17efg
	2	20.33±1.15cdef	2.33±0.12i	8.46±0.47c	3.20±0.10bcde	3.17±0.23efg
	3	18.00±1.00gh	3.23±0.12e	5.41±0.10e	2.90±0.17def	4.17±0.29cd
0.010	1	22.33±0.58bc	2.63±0.06h	9.17±1.22bc	3.90±0.10a	3.00±0.00fg
	2	20.00±2.00defg	2.67±0.21h	7.43±0.20d	2.87±0.21ef	3.17±0.15efg
	3	15.33±0.58ij	3.97±0.06cd	3.87±0.11g	2.43±0.12g	6.00±1.00a
0.030	1	25.00±1.00a	2.70±0.20gh	9.20±1.09bc	3.50±0.26b	2.67±0.12g
	2	15.33±0.58ij	3.13±0.15e	4.91±0.08e	2.63±0.06fg	3.97±0.06d
	3	13.33±0.58j	3.77±0.21d	3.57±0.32g	1.97±0.06h	5.23±0.40b
0.050	1	22.00±1.00bcd	3.05±0.05ef	7.17±0.27d	3.07±0.38cde	3.03±0.06fg
	2	18.67±2.89fg	4.00±0.00bc	4.80±0.64ef	2.90±0.35def	3.77±0.25de
	3	14.67±1.15ij	4.30±0.10a	3.27±0.08g	2.07±0.15h	4.33±0.29cd
0.100	1	21.00±1.00bcde	2.90±0.10fg	7.22±0.49d	3.30±0.10bc	3.33±0.29ef
	2	16.33±0.58hi	4.20±0.10ab	4.01±0.35fg	2.63±0.32fg	4.23±0.25cd
	3	16.33±1.53hi	4.30±0.10a	3.83±0.31g	2.60±0.10fg	4.67±0.29c
对照		23.00±1.00ab	2.27±0.21i	10.40±0.11a	2.97±0.21cdef	3.27±0.06efg

注：同列内相同字母表示经邓肯氏多重极差检验在 0.05 水平上差异不具有统计学意义。

1.3 多倍体鉴定

1.3.1 形态观察

待诱导植株分化并长成大苗，取其中 10 株，用游标卡尺测量叶长、叶宽、株高和茎粗，取平均值。叶型指数=叶长/叶宽。

1.3.2 气孔观察

分别用无色透明的指甲油涂抹形态明显变异的植株和对照植株的叶片下表皮，待指甲油干燥后，撕取下表皮制片，然后置于 Leica 显微镜下观察气孔的长度、宽度和密度。气孔长度和宽度取所观察的 30 个细胞的平均值，气孔及形态数据均使用 DPS 和 Excel 软件进行统计。

1.3.3 DNA 倍性分析

1.3.3.1 样品制备

采用 Partec CyStain UV Precise T 试剂盒，取约 0.5 cm² 的幼叶于直径 55 mm 的玻璃培养皿上，加 400 μL 萃取液，使用尖锐的刀片先纵后横用力切割样品，并浸泡 2~5 min，之后将样本及液体用 50 μm 微孔滤膜过滤到样品管中，再加入 1 600 μL DNA 染色液，避光染色 2~5 min。

1.3.3.2 数据获取与分析

采用德国 Partec 公司的 CyFlow space 流式细胞仪，电压为 220 V，UV LED 激光波长为 365 nm，粒子流速为 1.0 μL/s，每个样本至少计数 10 000 个，重复 10 次，DNA 含量分布曲线由 FloMax 软件自动生成。以二倍体植株做对照，通过 DNA index 确定植株倍性，统计不同倍性所占的比率。

1.3.4 染色体压片分析

切取秋水仙素处理的植株根尖(长约 5 mm)，在常温下置于 0.7 mmol/L 放线菌酮中预处理 4 h，洗涤后的根尖先放入 Canoy 固定液中室温固定 15~20 h，然后置于 1 mol/L 的浓盐酸中，在室温下解离 5 min 后再在 60 ℃ 恒温下解离 8 min，冲洗后用超纯水低渗 20 min，最后置于载玻片上，加入 1~2 滴苯酚品红染色 10 min 后制片并摄像。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素处理对植株形态的影响

不同秋水仙素处理对黑喉石斛植株形态的影响见表 1, 与对照相比(图 1(a)), 随着秋水仙素质量分数的升高及培养时间的加长, 叶型指数变小, 叶色深绿, 叶片背面翻卷、粗糙(图 1(b)), 植株生长缓慢, 株高下降, 茎粗增加, 对照的叶型指数、茎粗及株高分别为 (10.40 ± 0.11) , (3.27 ± 0.06) mm 和 (2.97 ± 0.21) cm. 叶型指数最小为 3.27 ± 0.08 , 即 0.050%秋水仙素培养 3 d 的处理; 茎粗最大为 (6.00 ± 1.00) mm, 即 0.010%秋水仙素培养 3 d 的处理; 株高最低为 (1.97 ± 0.06) cm, 即 0.030%秋水仙素培养 3d 的处理. 当质量分数超过 0.050%、培养时间大于 2 d 时, 出现少量畸形苗, 表现为整株出现分叉现象(图 1(c)).

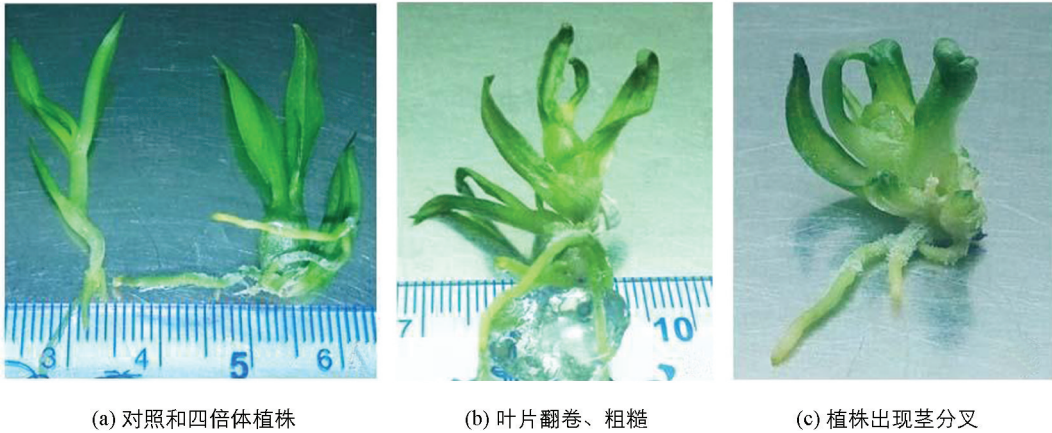


图 1 秋水仙素对植株形态的影响

2.2 气孔观察

根据表 2 数据, 变异株保卫细胞长度、宽度和气孔密度较二倍体植株的差异均具有统计学意义, 保卫细胞长度、宽度明显增大, 长和宽分别增长 25.14%和 41.00%, 形态也有所变化, 长宽比减少 10.64%, 气孔密度降低 41.98%(图 2).

表 2 黑喉石斛二倍体与变异株气孔比较

植株	气孔长度/ μm	气孔宽度/ μm	长宽比	气孔密度/ (个 $\cdot\text{mm}^{-2}$)
二倍体	$34.89 \pm 2.80\text{b}$	$37.03 \pm 1.58\text{b}$	$0.94 \pm 0.08\text{a}$	$81.02 \pm 4.10\text{a}$
变异株	$43.66 \pm 3.34\text{a}$	$52.21 \pm 2.50\text{a}$	$0.84 \pm 0.06\text{b}$	$47.01 \pm 3.64\text{b}$

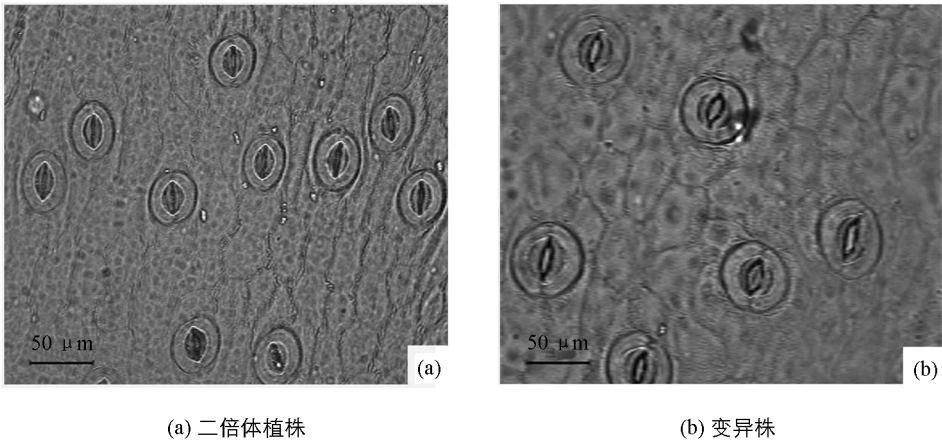


图 2 黑喉石斛二倍体和变异株气孔比较($\times 40$)

2.3 DNA 倍性分析

各处理流式细胞仪倍性分析结果见表 3, 高质量分数和长时间诱导可得较高变异率. 四倍体比率最高

为 80%，即 0.010%秋水仙素培养 3 d 的处理；八倍体比率最高为 70%，即 0.100%秋水仙素培养 2 d 的处理，同时混倍体也大量存在. 当质量分数超过 0.050%、培养时间大于 2 d 时，八倍体比率显著增加. 综合分析可知，适宜四倍体诱导的秋水仙素质量分数在 0.010%~0.030%之间，适宜八倍体诱导的秋水仙素质量分数在 0.050%~0.100%之间，处理时间均为 2~3 d. 二倍体(2x)与人工诱导的四倍体(4x)、八倍体(8x)植株叶片细胞的流式图结果见图 3.

表 3 各处理流式细胞仪倍性分析结果

质量分数/ %	时间/ d	检测株数	二倍体及比率/ 株(%)	四倍体及比率/ 株(%)	八倍体及比率/ 株(%)	混倍体及比率/ 株(%)	变异率 /%
0.005	1	10	8(80)	0(0)	0(0)	2(20)	20
	2	10	6(60)	2(20)	0(0)	2(20)	40
	3	10	4(40)	3(30)	0(0)	3(30)	60
0.010	1	9	0(0)	0(0)	0(0)	9(100)	100
	2	9	0(0)	6(60)	0(0)	3(30)	100
	3	10	0(0)	8(80)	0(0)	2(20)	100
0.030	1	10	4(40)	2(20)	2(20)	2(20)	60
	2	10	0(0)	4(40)	2(20)	4(40)	100
	3	10	0(0)	7(70)	2(20)	1(10)	100
0.050	1	10	0(0)	6(60)	2(20)	2(20)	100
	2	10	0(0)	2(20)	5(50)	3(30)	100
	3	10	0(0)	0(0)	5(50)	5(50)	100
0.100	1	10	0(0)	0(0)	6(60)	4(40)	100
	2	10	0(0)	0(0)	7(70)	3(30)	100
	3	10	0(0)	0(0)	6(60)	4(40)	100

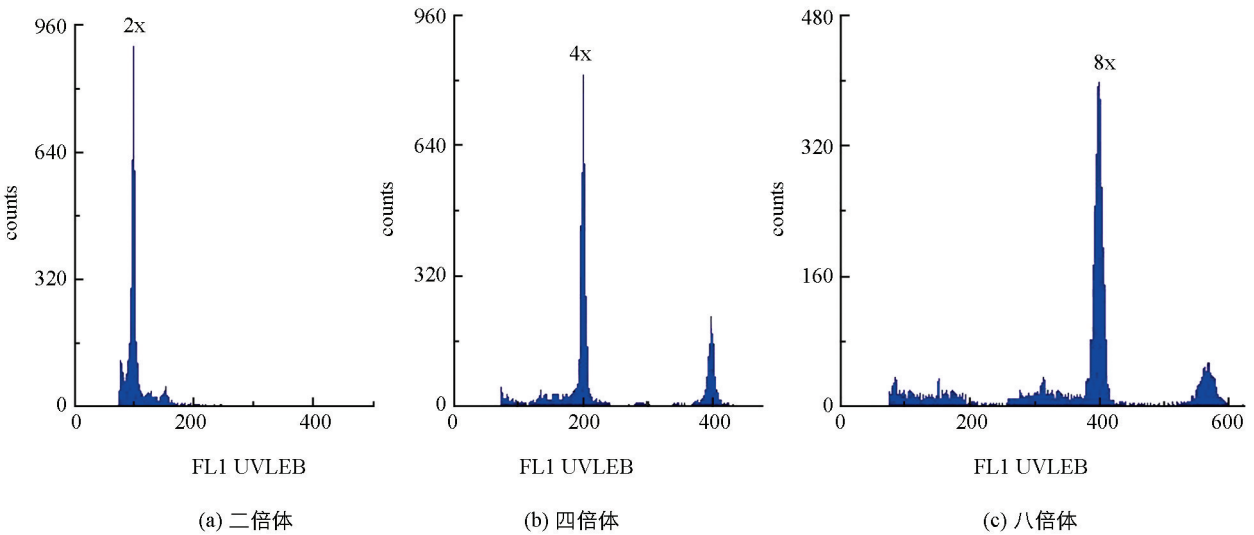


图 3 黑喉石斛叶片二倍体、四倍体和八倍体流式图

2.4 根尖压片结果

对经流式细胞仪筛选出的四倍体、八倍体和对照二倍体植株根尖生长点染色体压片鉴定后发现，对照的二倍体黑喉石斛染色体数目 $2n=2x=38$ 条，四倍体和八倍体染色体数目发生改变，其染色体数目变化范围分别为 $2n=4x=76$ 和 $2n=8x=152$ (图 4)，故经秋水仙素处理后的植株应为诱导产生的四倍体植株和八倍体植株.

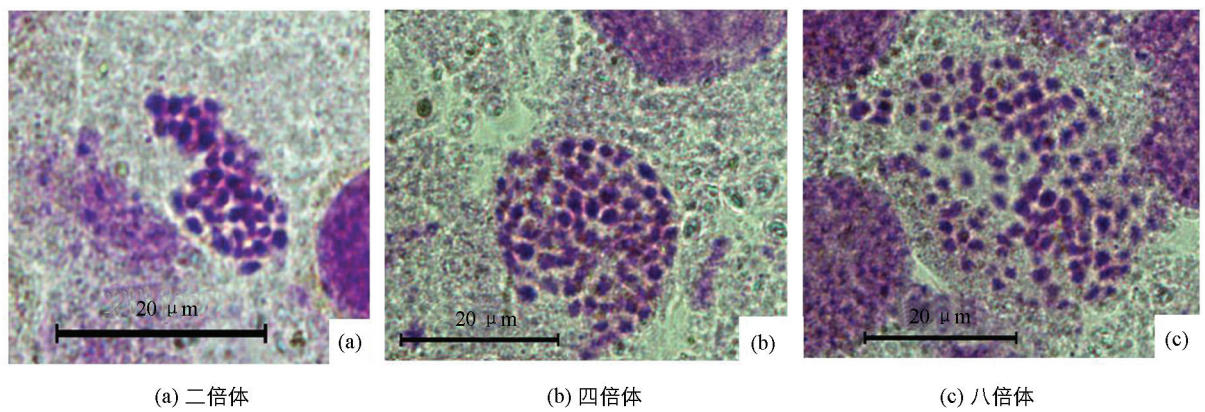


图 4 黑喉石斛二倍体、四倍体和八倍体根尖细胞分裂中期染色体(×100)

3 讨 论

石斛属植物的多倍体在自然界及离体培养中广泛存在^[7-8], 具有古老的物种进化潜力, 既具有短期效果(细胞、器官大小及基因表达的变化), 也具有长期(进化)的影响^[9-11]. 筛选自然发生的多倍体进行杂交选育, 发生频率低, 选育周期长, 而本实验以黑喉石斛原球茎为实验材料, 可以获得足够数量的多倍体, 以满足选种需要, 且黑喉石斛嫩茎开花的特点大大缩短了育种周期. 因此, 本实验结果在杂交育种及种质遗传转化体系研究上皆具有重大价值.

秋水仙素的质量分数和处理时间是影响多倍体产生的重要因素, 形成不同物种多倍体所需的最佳质量分数和处理时间存在差异. Sarathum 等人^[3]报道指出 0.075% 的秋水仙素处理 14 d 时, 可以获得 43.1% 的四倍体植株; Vichiato 等人^[4]报道指出金钗石斛四倍体产生的适宜质量分数和时间是 0.1% 和 96 h; 詹忠根等人^[12]报道指出质量分数为 0.05%、处理天数为 10 d 时, 可以获得较多的铁皮石斛四倍体植株. 一般而言, 适合兰科植物的秋水仙素质量分数在 0.05~0.1% 之间^[13], 而处理时间的长短取决于实验材料及处理方法. 黑喉石斛对秋水仙素较为敏感, 处理时间为 2~3 d, 0.010%~0.030% 的秋水仙素质量分数适宜于黑喉石斛四倍体诱导, 而稍高的秋水仙素质量分数(0.050%~0.100%)能诱导出黑喉石斛八倍体. 多倍体器官巨大、产量高、抗逆性强, 但是并不意味着倍数越大越好, 本实验中八倍体相较于四倍体, 发育更加迟缓, 株型奇特, 多表现为整株分叉.

黑喉石斛多倍体形态及气孔观察与已有报道一致^[1-2], 均表现出叶色深绿、叶片粗糙、株高下降、茎粗增大、气孔变大和密度变小等特征. 对本实验筛选出的四倍体和八倍体植株可育成稳定品种, 然后进行杂种优势利用, 然而多倍体形成初期并不稳定^[14], 除了生长缓慢^[15]、严重不育外, 还存在回复成二倍体的可能性, 因此有必要对其进行扩繁稳定和育苗移栽, 有目的地筛选出生长较快、抗逆性强的多倍体植株, 形态及倍性筛选也应延续几个世代.

参考文献:

- [1] 唐娅梅, 张臣良, 苏 兵, 等. 铁皮石斛多倍体诱导与鉴定研究 [J]. 北方园艺, 2010(17): 147—149.
- [2] 李 涵, 郑思乡, 龙春林. 齿瓣石斛多倍体的诱导初报 [J]. 云南植物研究, 2005, 27(5): 552—556.
- [3] SARATHUM S, HEGELE M, TANTIVIWAT S, et al. Effect of Concentration and Duration of Colchicine Treatment on Polyploidy Induction in *Dendrobium scabrilingue* L [J]. Europ J Hort Sci, 2010, 75(3). S: 123—127.
- [4] VICHATO M R D M, VICHATO M, PASQUAL M, et al. Tetraploidy Induction and Identification in *Dendrobium nobile* L. (Orchidaceae) [J]. Revista Ciencia Agronomica, 2007, 38(4): 385—390.
- [5] 郑宝强, 张 莹, 王 雁, 等. 春石斛的多倍体诱导 [J]. 园艺学报, 2009, 36(9): 1381—1384.
- [6] 李秀兰, 安 东. 秋石斛同源四倍体诱导与鉴定 [J]. 园艺学报, 2009, 36(8): 1239—1242.
- [7] 程式君, 胡志衡, 李秀兰, 等. 国产石斛属染色体研究初报 [J]. 园艺学报, 1985, 12(2): 119—124, 145.
- [8] TEIXEIRA da SLLVA J, GIANG D T T, DOBOBRÁNSZKI J, et al. Ploidy Analysis of *Cymbidium*, *Phalaenopsis*,

- Dendrobium* and *Paphiopedillum* (Orchidaceae), and *Spathiphyllum* and *Syngonium* (Araceae) [J]. *Biologia*, 2014, 69(6): 750—755.
- [9] ADAMS K L, WENDEL J F. Polyploidy and Genome Evolution in Plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 135—141.
- [10] COMAI L. The Advantages and Disadvantages of Being Polyploidy [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 836—846.
- [11] JACKSON S, CHEN Z J. Genomic and Expression Plasticity of Polyploidy [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(2): 153—159.
- [12] 詹忠根, 徐 程. 秋水仙素诱导铁皮石斛多倍体研究 [J]. *浙江大学学报(理学版)*, 2011, 38(3): 321—325.
- [13] GRIESBACH R J. Colchicine Induced Polyploidy in *Phalaenopsis* Orchid [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1981, 1(1): 103—107.
- [14] 何韩军, 杨跃生, 吴 鸿. 药用植物多倍体的诱导及生物学意义 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 1000—1006.
- [15] 王 莹, 李晓林, 梁国鲁, 等. 天然四倍体红江橙与其二倍体的植株形态学和遗传组成比较 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2015, 37(9): 37—41.

Study on Polyploid of *Dendrobium ochreatum* Induced by Colchicine

WANG Ai-hua, WU Qing-qing, YANG Lan,
XU Hong-juan, CHEN Zhi-lin

Horticultural Research Institute of Guizhou Province, Guiyang 550006, China

Abstract: Effects of the various colchicine treatments on polyploidy induction of *Den. ochreatum* were carried out in the current work. The results measured by flow cytometry showed that the most efficient condition of *Den. Ochreatum* for inducing tetraploids seemed to be treated with 0.01%—0.03% colchicine and octoploids with 0.05%—0.1% colchicine all for 2—3 days. The polyploidies were different from normal diploids in morphology, stoma and chromosome numbers. Compared with tetraploid, octoploid developed more slowly, and more showed bifurcation.

Key words: *Dendrobium ochreatum*; colchicine; polyploidy; protocorm

责任编辑 潘春燕

