

细胞分裂素对蝴蝶兰体细胞胚诱导及大分子代谢研究

刘福平, 陈移亮

(福建省亚热带植物研究所, 福建 厦门 361006)

摘 要: 以含 6-BA、2, 4-D 培养基诱导蝴蝶兰外植体。6-BA 可从嫩茎切块诱导出胚性愈伤组织, 细胞富含淀粉粒, 而 2, 4-D 或 2, 4-D 加 6-BA 诱导得到的愈伤组织不能分化。6-BA 易于从嫩叶切片诱导胚性愈伤组织, 进行体细胞胚发生过程的显微观察。在 6-BA 诱导嫩叶切片外植体期间, DNA 含量前期平缓上升, 第 25 d 后急剧上升。RNA 含量开始诱导就上升, 第 11~ 18 d 达到高峰。水溶性蛋白含量上升启动稍晚, 在第 25 d 达到高峰。

关键词: 蝴蝶兰; 细胞分裂素; 体细胞胚; 大分子代谢

中图分类号: Q 813 1

文献标识码: A

Effect of cytokinin on the induction and macromolecules metabolic kinetics of somatic
embryogenesis in *Phalaenopsis* sp.

LIU Fuping, CHEN Yiliang

(Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian 361006, China)

Abstract: Two ex-plants from test tube seedling of *Phalaenopsis* sp. were cultured on the media containing 6-BA and 2, 4-D. From the stem ex-plant, embryogenic callus (EC) with large amounts of starch granules in cell could be induced with the presence of 6-BA. On the other hand, the callus induced with 2, 4-D or with both 2, 4-D and 6-BA were unable to differentiate. EC could also be induced efficiently from the leaf ex-plant cultured on the medium containing 6-BA. Histological observation and metabolic analysis conducted during somatic embryogenesis showed that, in leaf ex-plant, the DNA content increased slowly initially and sharply on the 25th day of induction. The RNA content increased when induction began, and reached a peak on the 11- 18th day. The soluble protein content started to change later than RNA and peaked on the 25th day.

Key words: *Phalaenopsis* sp; cytokinin; somatic embryogenesis; macromolecules metabolic kinetics

兰科植物的种子为一团未分化的胚性细胞, 萌发成原球茎才具胚胎结构。兰科植物离体培养所诱导的类原球茎 (PLB) 是体细胞胚的表现形式, 这在蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*)^[1]、大花惠兰 (*Cymbidium*)^[2]、文心兰 (*Oncidium*)^[3]、白拉索蕾丽亚卡特丽亚兰 (*Brassolaelia cattleya*)^[4] 等都有提及。大部分植物尤其是单子叶植物必须以 2, 4-D (或与细胞分裂素协同) 诱导胚性愈伤组织, 然后降低或去除培养基 2, 4-D 胚性细胞才能继续发育^[5]。周俊彦等^[6] 归纳以细胞分裂素作为唯一外源激素诱导体胚发生的十几种双子叶或单子叶植物, 但他同时也指出如进一步提高这些植物的体细胞胚发生能力则依赖添加外源生长素。

依照已有的研究报道, 兰科植物类原球茎诱导

及增殖细胞分裂素起到关键作用, 外源生长素 NAA 仅起协同促进作用, 极少用到 2, 4-D。在蝴蝶兰^[7- 11]、大花惠兰^[3]、卡特兰 (*Cattleya*)^[12]、白拉索蕾丽亚卡特丽亚兰^[4]、石斛兰 (*Dendrobium*)^[10, 12]、文心兰^[10, 12]、万代兰 (*Vanda*)^[10] 等著名热带兰的类原球茎诱导和增殖中, 单一应用细胞分裂素 (6-BA) 就取得理想效果, 为细胞分裂素与植物体细胞胚诱导的关系提供了研究系统。本研究以外源 6-BA、2, 4-D 或互相组合诱导蝴蝶兰外植体, 较系统地观察体细胞胚发生过程。并从与体细胞胚诱导过程生理变化密切相关的生物大分子物质即核酸、蛋白质的动态变化, 初步了解细胞分裂素与植物体细胞胚诱导的生理基础。

收稿日期: 2007- 02- 13 初稿; 2007- 03- 28 修改稿

作者简介: 刘福平 (1963-), 男, 副研究员, 研究方向: 植物生理学。

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (C0410040)

1 材料与方法

1.1 离体培养

蝴蝶兰组培瓶苗取自本所组培室。以嫩茎（抽叶约 3 cm 长的类原球茎体膨大部分）切块和瓶苗嫩叶切片为外植体，嫩茎切块外植体每瓶放置 10 块，嫩叶切片外植体每瓶 20 片，每种处理 5 瓶以上，基本培养基为 1/2MS + CW（椰子汁）20%（V/V）+ 蔗糖 2%（W/V），另加外源激素 6-BA 或 2, 4-D 或其组合，培养光照 1 500 lx，12 h · d⁻¹，温度 24~ 26℃。

1.2 组织细胞学观察

常规石蜡切片。愈伤组织切片高碘酸—席夫试剂（PAS）染色，观察淀粉粒。叶片外植体诱导期间所得愈伤组织、发育中的类原球茎切片铁矾—苏木精染色。

1.3 大分子代谢动态分析

DNA、RNA 含量测定按朱自平等^[13]介绍方法。水溶性蛋白含量测定按考马斯亮蓝显色法。取样时间从培养之日算起分别为 0 d、4 d、11 d、18 d、25 d、32 d。

2 结果与分析

2.1 6-BA 与 2, 4-D 对不同外植体的诱导

2.1.1 嫩茎切块外植体 嫩茎切块外植体诱导结果见表 1，培养基中添加不同质量浓度 6-BA 培养 2 个月，均可诱导愈伤组织，愈伤组织外观典型，颜色鲜艳，坚硬，表面粗糙（图 1-1），转入原配方即含 6-BA 10.0 mg · L⁻¹（单位下同）的培养基和无激素培养基几乎都可发育出丛生类原球茎（图 1-2），只是分别在转入后约 24 d 和约 51 d 才观察到，所以 6-BA 诱导外植体得到胚性愈伤组织（EC）。秦凡等^[7]认为蝴蝶兰体细胞胚发生主要受 6-BA 用量的影响，但 6-BA 对体细胞胚的持续发育并不是十分重要。王怀宇^[9]、谭文澄等^[10]、杨美纯等^[11]报导从茎尖或叶片诱导类原球茎，仅以外源 6-BA 诱导，早期幼嫩类原球茎十分密集，转入低量或不含细胞分裂素培养基类原球茎才能发育完整。所以，由愈伤组织分化出类原球茎，外源细胞分裂素并非必需，抑或是愈伤组织在诱导期间就富集细胞分裂素，发生激素驯化作用（habituation）所致。

表 1 6-BA 与 2, 4-D 对不同外植体的愈伤组织诱导率（单位：%）

Table 1 The callus induction rates (%) from different ex-plants on the media containing BA and 2, 4-D

外植体		6-BA (mg · L ⁻¹)				2, 4-D (mg · L ⁻¹)				2, 4-D + 6-BA (mg · L ⁻¹)	
		诱导生成物	3 0	5 0	10 0	13 0	诱导生成物	0 5	1 0	2 5	诱导生成物
嫩茎	EC	28	56	58	—	NEC	10	18	0	NEC	13 17
嫩叶	EC	23	93	96	19		0	0	0		0 0

注：2, 4-D 1.0+ 6-BA1.0, 2, 4-D1.0+ 6-BA3.0。

嫩茎切块外植体在含 2, 4-D 或 2, 4-D 加 6-BA 培养基诱导的愈伤组织，颜色较暗，松软。伍成厚等^[14]从蝴蝶兰子房切段、花梗切段在 2, 4-D 1.0 加 6-BA 0.1 培养基诱导的愈伤组织呈白色、疏松，认为是非胚性愈伤组织（NEC）。陈进勇等^[15]从中国兰种子萌发的原球茎诱导出愈伤组织，其中一类为疏松愈伤组织，淡黄色，在固体培养基上逐渐白化死亡，另一类为致密愈伤组织，深绿色，分化率高于疏松愈伤组织。鉴于在单子叶植物中，由 2, 4-D 诱导的胚性愈伤组织需转入无激素或降低生长素培养基才能使胚性细胞继续发育^[5]，本实验将由 2, 4-D 或 2, 4-D 加 6-BA 诱导的愈伤组织分别转入无激素、2, 4-D 0.5、2, 4-D 1.0 + 6-BA1.0 和 6-BA 5.0 等 4 种培养基，均不能诱导出体细胞胚而逐渐死亡。

植物体细胞胚发生中伴随淀粉粒消长，胚性愈伤组织积累淀粉为体细胞胚发生提供能量^[5]。陈进勇等^[15]发现兰花愈伤组织中淀粉多在薄壁细胞中出现，其含量的消长过程与器官形态发生有密切关系。本试验中由 6-BA 诱导的“成熟”愈伤组织薄壁细胞中易观察到淀粉粒（图 2-1），说明代谢水平较高，有足够能量发生体细胞胚。而由 2, 4-D 或 2, 4-D 加 6-BA 诱导的愈伤组织没观察到淀粉粒，应为非胚性愈伤组织。

2.1.2 以嫩苗叶片切块为外植体 蝴蝶兰叶片切块在含 2, 4-D 培养基褐变死亡。在含 6-BA 培养基外植体愈伤组织诱导情况见表 1。

叶片外植体培养期间表面扩张，第 11 d，叶片四角就出现胚性细胞（图 2-2），其中有胚性母细胞，细胞质浓，核明显较大（图 2-3），也有分裂

形成三细胞原胚 (图 2- 4)。图 2- 5、2- 6 示培养第 18 d 观察到的多细胞原胚, 有内起源发生 (图 2- 5) 和近表皮起源发生 (图 2- 6), 图 2- 7 为培养第 25 d 观察到的球形胚, 有一粗胚柄与母体组织相连。图 2- 8 为梨形胚, 有一数细胞的胚柄, 该梨形胚属单细胞起源。图 2- 9 为香蕉形胚, 最后发育成熟 (图 2- 10), 即类原球茎。

蝴蝶兰叶片接种于 6 - BA 培养基, 诱导不同天数转入无激素 (不加外源激素和 CW) 培养基培

养结果见表 2, 外植体于 6 - BA 培养基培养 15 d、23 d 后转接, 愈伤组织诱导率比培养 28 d 后转接的 (诱导率达 96%) 低很多, 即使转入后再培养 3 个月, 外植体愈伤组织诱导率也低很多, 说明叶片经 6 - BA 诱导 28 d 对获得最高诱导率是必需的。叶片转入无激素培养基或始终在 6 - BA 为 10 0 mg · L⁻¹ 下培养, 点状的类原球茎 (图 1- 3) 几乎都可继续发育、抽叶、长根 (图 1- 4)。

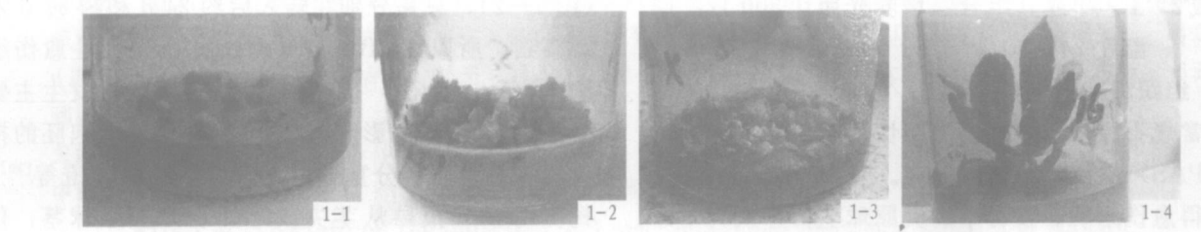


图 1 细胞分裂素对蝴蝶兰类原球茎诱导结果

Fig 1 Effect of cytokinin on PLB induction in *Phalaenopsis*

1- 1: 胚性愈伤组织; 1- 2: 类原球茎丛; 1- 3: 由叶外植体萌生幼嫩类原球茎; 1- 4: 瓶苗

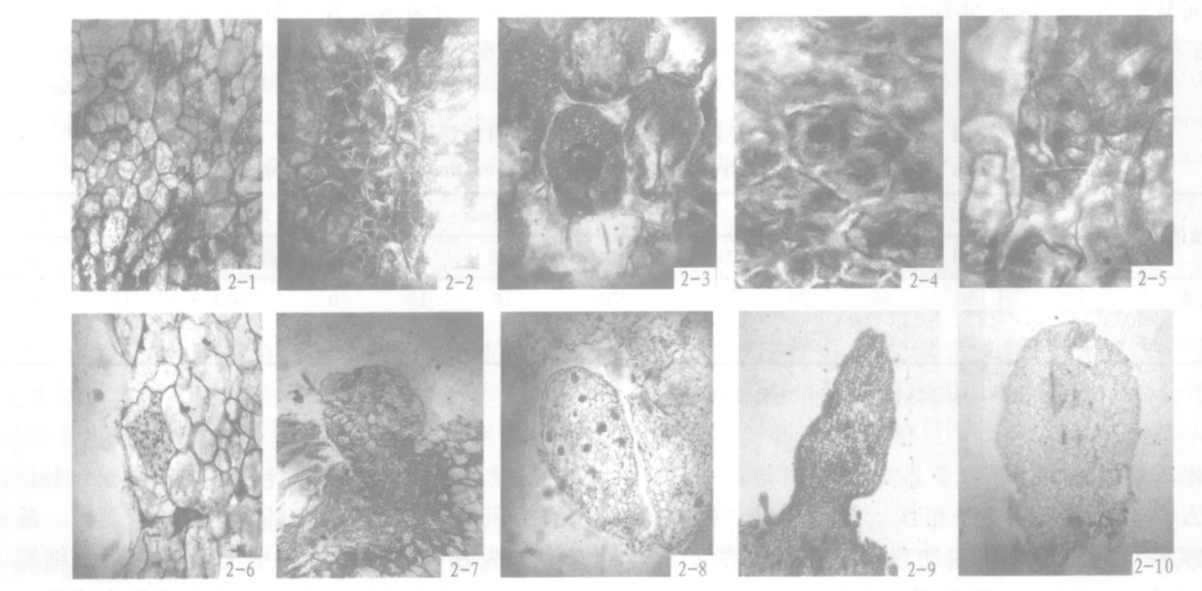


图 2 蝴蝶兰体细胞胚发生的组织细胞学观察

Fig 2 Histological observation of the somatic embryogenesis in *Phalaenopsis*

2- 1: 胚性愈伤组织细胞富含淀粉粒; 2- 2: 胚性细胞群; 2- 3: 胚性母细胞; 2- 4: 三细胞原胚; 2- 5: 内起源的多细胞原胚; 2- 6: 近表皮起源的多细胞原胚; 2- 7: 球形胚, 有一粗胚柄与母体组织相连; 2- 8: 梨形胚, 通过数细胞的胚柄与母体组织相连; 2- 9: 香蕉形胚; 2- 10: 成熟胚

2.2 6 - BA 诱导胚性愈伤组织的大分子代谢动态
如上所述, 叶片外植体经 6 - BA 诱导 28 d 就获得最高诱导率, 其后 6 - BA 并非必需, 所以取诱导的前 32 d 培养物进行生物大分子含量分析。
6 - BA 诱导叶片外植体期间 DNA 含量变化见

图 3, 以每克鲜重外植体为单位的 DNA 含量变化曲线或以每片叶外植体为单位的 DNA 含量变化曲线相似。培养的第 0~ 11 d, DNA 含量增加相对平稳, 说明此时细胞分裂并不旺盛。培养第 11 d 后 DNA 含量上升加快, 第 18 d 肉眼可观察到外植体

切口端明显膨大，这是细胞分裂加速的结果，显微观察正是胚性细胞形成、分裂旺盛时期。在培养第 25 d DNA 含量开始急剧上升，可观察到外植体切口端明显膨大，出现愈伤组织，显微观察是球形胚时期。此外，在整个诱导期间，以每克鲜重外植体

为单位的 DNA 含量增加幅度较以每片叶外植体为单位的 DNA 含量增加幅度稍小，这与外植体吸收培养基成分及光合作用代谢积累使整个外植体重量增加有关。

表 2 6-BA 诱导叶片外植体不同天数后转入无激素培养基的 EC 诱导情况

Table 2 Effect of induction by 6-BA for different lengths of time on the EC induction rate of leaf explant transferred to the medium without hormone

于 6-BA 培养基		转入无激素培养基后					
培养天数(d)	诱导率(%)	培养天数(d)	诱导率(%)	培养天数(d)	诱导率(%)	培养天数(d)	诱导率(%)
15	0	25	0	65	20	124	50
23	0	25	60	65	60	124	52
28	96	25	97	65	96	124	97

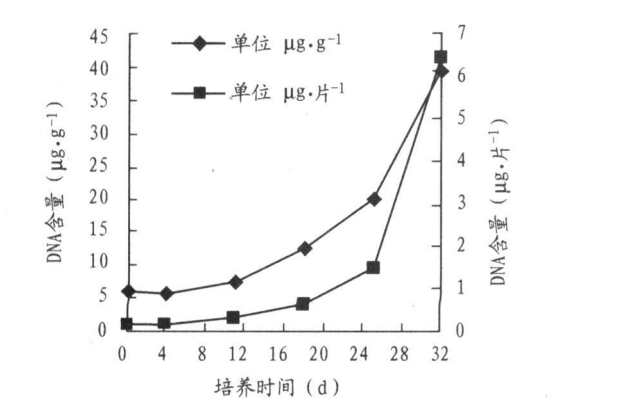


图 3 6-BA 诱导外植体期间 DNA 含量变化

Fig 3 Changes in DNA contents during 6-BA induction

诱导期间 RNA 含量与水溶性蛋白含量的关系见图 4，RNA 含量从诱导一开始就较快上升，在第 11~18 d 达到高峰，随后明显转折下降（可能是 RNA 片断降解，为下一轮转录的物质基础），水溶性蛋白含量在诱导第 4 d 才出现较快上升，在第 25 d 达到高峰，随后转折下降，即 RNA 代谢动态稍超前于水溶性蛋白，可能是由于外植体细胞内的 RNA 转录、蛋白质翻译存在着一个时间差。生物大分子合成具有顺序性，先是 RNA 合成，接着伴随蛋白质大量合成，然后是 DNA 合成。图 3 显示，DNA 含量在培养的第 11 d 后才加快上升，第 25 d 后急剧上升，均落后于 RNA 含量与水溶性蛋白含量变化。

3 讨 论

大部分植物尤其单子叶植物必须以 2, 4-D（或与细胞分裂素协同）诱导胚性愈伤组织，蝴蝶

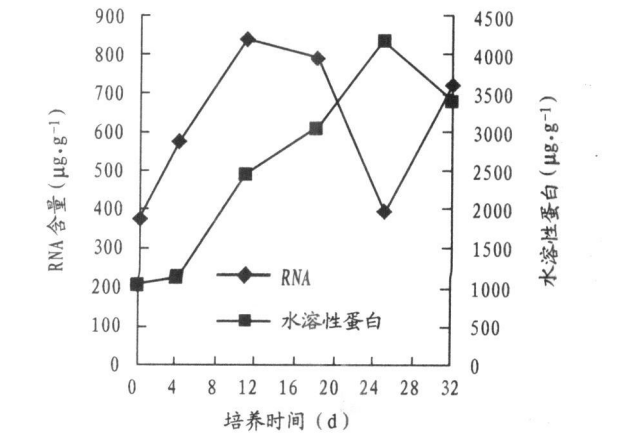


图 4 6-BA 诱导外植体期间 RNA、水溶性蛋白含量变化

Fig 4 Changes in RNA and soluble protein contents during 6-BA induction

兰的类原球茎（体细胞胚）诱导和增殖技术比较成熟，培养基中单一应用外源细胞分裂素（6-BA）就取得理想效果，本试验还发现由 2, 4-D 或 2, 4-D 加 6-BA 诱导蝴蝶兰的嫩茎切块得到的愈伤组织不表现胚性。植物组织培养中激素起到关键的作用，植物的体细胞胚发生是内、外源激素作用的结果，所以进一步探讨蝴蝶兰外植体内源激素水平及与外源激素的相互作用，可望对激素与植物体细胞胚发生的关系得到较全面了解。生物大分子物质的动态变化，对于植物的分化发育起着重要作用，关于兰花离体培养形态发生的大分子生化物质代谢动态研究较少，本文对在细胞分裂素作为唯一外源激素情况下体细胞胚诱导期间的大分子物质代谢动态进行了初步探讨，其分子生物学机制还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] ISHII Y. et al Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis* [J]. *Plant Cell Report*, 1997, 17 (6/7): 446 – 450.

[2] 谷祝平, 严廷进. 大花蕙兰茎尖组织培养及其形态建成的研究 [J]. 实验生物学报, 1989, 22 (2): 149– 155.

[3] 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: 143– 149.

[4] 丁兰, 赖家业, 傅华龙. 白拉索蕾丽亚卡特丽亚兰叶片离体培养及形态发生的研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2002, 39 (3): 534– 537.

[5] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.

[6] 周俊彦, 郭扶兴. 细胞分裂素类物质在植物体细胞胚胎发生中的作用 [J]. 植物生理学通讯, 1996, 32 (4): 247– 253.

[7] 秦凡, 周吉源. 不同植物生长调节剂对蝴蝶兰快速繁殖的影响 [J]. 武汉植物学研究, 2003, 21 (5): 452– 456.

[8] 曾宋君, 彭晓明, 张京丽, 等. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖 [J]. 武汉植物研究, 2000, 18 (4): 344– 346.

[9] 王怀宇. 蝴蝶兰的快速无性繁殖 [J]. 园艺学报, 1989, 16 (1): 73– 77.

[10] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 237– 267.

[11] 杨美纯, 周歧伟, 许鸿源, 等. 外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎状体发生的影响 [J]. 广西植物, 2000, 20 (1): 42– 46.

[12] SAIPRASAD G V S et al. Propagation of three orchid genera using encapsulation of protocorm like bodies [J]. *In vitro Cell Dev, Biol, –Plant*, 2003, 39: 42– 48.

[13] 朱治平, 沈瑞娟, 唐锡华. 高等植物胚胎发育生物学研究 . 水稻胚胎发育过程中的生化变化 [J]. 植物生理学报, 1980, 6 (2): 141– 147.

[14] 伍成厚, 叶秀舜, 梁承邺. 蝴蝶兰愈伤组织诱导研究 [J]. 亚热带植物科学, 2004, 33 (4): 29– 31.

[15] 陈进勇, 程金水, 朱滢. 几种中国兰种子试管培养愈伤组织发生的研究 [J]. 北京林业大学学报, 1998, 20 (4): 76– 79.

(责任编辑: 翁志辉)