

玉花兰绿芽分化及生根的组织培养条件研究

金花¹, 朴炫春¹, 廉美兰^{1*}, 杨金凤¹, 朴美英²

(1. 延边大学农学院园艺系, 吉林龙井 133400; 2. 吉林省龙井市老头沟农业技术推广站, 吉林龙井 133400)

摘要 以玉花兰的根状茎为外植体, 研究了引起玉花兰根状茎绿芽分化的各种因素。结果表明: Hyponex-2 培养基有利于玉花兰绿芽的分化, 而且诱导芽数多, 生长良好。6-BA 促进绿芽的形成, 且在浓度为 4 mg/L 时效果最佳; 选择根状茎的上部作为外植体时, 绿芽分化较好; 在绿芽分化阶段, 采用 400 lx 的光照条件培养比较适宜; Hyponex-2 培养基中添加浓度为 1.0 mg/L 的 NAA 有利于根的诱导, 同时也能促进地上部的生长发育。

关键词 玉花兰; 组织培养; 根状茎; 绿芽; 生根

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)02-00376-02

Study on Culture Conditions of Shoot Differentiation and Rooting of *Cymbidium niveo-maginatium*

JIN Hua et al (Department of Horticulture, Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract Factors in rhizome differentiation of *Cymbidium niveo-maginatium* were studied in this paper. The results showed that shoot formation was favorable in Hyponex-2 (N:P:K=20:20:20) medium and mass shoots were found in this medium. Moreover, BA 4 mg/L in Hyponex-2 medium and 400 lx of light intensity promoted shoot formation of *Cymbidium niveo-maginatium*. During rooting stage, NAA 1.0 mg/L was suitable for rooting and shoot growth.

Key words *Cymbidium niveo-maginatium*; Tissue culture; Rhizome; Shoot; Rooting

玉花兰(*Cymbidium niveo-maginatium*)种子常规播种难以萌发, 故一般以分株繁殖为主, 然而 1 株健壮的兰花每年只能长出 1 至数个芽, 繁殖系数低^[1]。同时由于长期无性分株繁殖, 带病毒植株逐年增多, 导致品种退化, 影响了兰花地观赏价值和经济价值^[2]。利用植物组织培养技术可有效地克服病毒积累, 大大提高繁殖系数, 近年来植物组培技术已成为兰花生产的主要技术手段^[3]。为此, 笔者以玉花兰的根状茎作为试材, 探讨根状茎分化绿芽和绿芽生根的影响因子, 旨在为玉花兰扩繁体系的完善提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 取玉花兰即将开裂的蒴果在浓度为 75% 的酒精中浸泡 1 min, 再用浓度为 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒 15 min 后, 用无菌水冲洗 5~6 次, 在超净工作台上剖开蒴果, 均匀播种于 1/2 MS 固体培养基中。90 天后形成原球茎, 将形成的原球茎接种于 MS+NAA 0.5 mg/L 的固体培养基中, 在温度为(25±2)℃, 相对湿度为 70%, 光照强度为 1 600 lx, 每天光照 16 h 条件下培养, 进一步诱导根状茎。待根状茎长至 3~4 cm 时, 将其切成 1 cm 长, 作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 绿芽分化 将 50 ml 的培养基注入 200 ml 的柱状瓶中, 用铝箔纸封住瓶盖后, 在温度为 120℃, 压力为 1.2 kg/cm² 的条件下高压灭菌 15 min。将根状茎切成 1 cm 长接种。

1.2.1.1 培养基种类试验 将根状茎接种于 MS(Murashige-Skoog)、KC (Knudson C)、VW (Vacin&Went)、Hyponex-1 (Hyponex 3 g [N:P:K=7:6:19]+peptone 4 g) 和 Hyponex-2 (Hyponex 3 g [N:P:K=20:20:20]+peptone 4 g) 等 5 种不同培养基中, 各种培养基中均附加 6-BA 5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L, pH 值均为 5.0。

1.2.1.2 6-BA 浓度试验 基本培养基为 Hyponex-2 培养基,

并加入蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L (pH 值为 5.0), 6-BA 浓度处理为 2、4、6、8 mg/L, 以未加 6-BA 处理为对照。

1.2.1.3 光照强度试验 将根状茎外植体接种于 Hyponex-2+BA 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L (pH 值为 5.0) 培养基中, 在光照强度分别为 0、400、1 600 lx 的条件下培养。

1.2.1.4 根状茎接种部位 将根状茎按上部(生长点)、中部、底部分别切成 1 cm 长, 分别接种于绿芽分化培养基中 Hyponex-2+BA 4 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.0 g/L (pH 值为 5.0) 培养。

1.2.2 生根培养 在 Hyponex-2+BA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+7.0 g/L 琼脂+1.0 g/L 活性炭 (pH 值为 5.0) 培养基中, 分别加入浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L NAA, 对照未加任何生长调节剂。将已诱导出 1 到数个绿芽的根状茎分别接入 200 ml 的柱状瓶(培养基量为 50 ml) 进行培养。

1.2.3 培养条件 所有试验处理均接种 5 瓶作为重复, 每瓶 6 个外植体。培养温度为(25±2)℃, 相对湿度为 70%, 光照强度为 1 600 lx, 每天光照 16 h。培养 60 d 后进行调查。

数据分析利用 SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) 程序, 采用邓肯氏新复极差法进行比较。

2 结果与分析

2.1 绿芽分化

2.1.1 培养基种类的筛选(表 1)。从表 1 可以看出, 培养基的种类对玉花兰绿芽分化数、绿芽鲜物重和干物重均有影响。从根状茎诱导出的绿芽数在 Hyponex-2 培养基中为 4.4 个, 显著多于其他培养基处理, 其次是 MS 培养基处理(3.7 个), 最少的是 KC 培养基处理, 仅发生 1.9 个绿芽。在 Hyponex-2 中, 绿芽的鲜物重及干物重显著好于其他处理,

表 1 不同培养基对玉花兰绿芽分化和生长的影响

培养基种类	绿芽分化数 个/外植体	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体
MS	3.7 b	30.8 b	4.5 b
KC	1.9 c	23.3 c	3.6 d
VW	2.1 c	30.5 b	3.8 cd
Hyponex-1	2.4 c	33.6 b	4.3 bc
Hyponex-2	4.4 a	47.5 a	5.6 a

注: 同列不同小写字母表示在 0.05 水平上有差异。下表同。

基金项目 国家自然科学基金委资助项目(30560094); 国家教育部重点项目(205035)。

作者简介 金花(1979-), 女, 吉林龙井人, 硕士, 从事组织培养研究。
* 通讯作者。

收稿日期 2006-10-17

在 KC 培养基中绿芽生长最差,其鲜物重仅为 Hyponex-2 培养基处理的 50%。

将已诱导的绿芽按大小分类后,调查绿芽分化率,发现所有培养基中绿芽分化率均达到 100%,但各处理中所诱导出的绿芽大小不同(图 1)。Hyponex-2 培养基中,中型(0.2~0.4 mm)绿芽分化率最高,而大型(≥ 0.4 mm)和小型(≤ 0.2 mm)发生率低;MS 培养中,小型绿芽最多,其诱导率为 63.6%,而大型的仅为 2.3%;VW 中,大型绿芽所占比重较大,然而这些绿芽却有黄化现象发生。

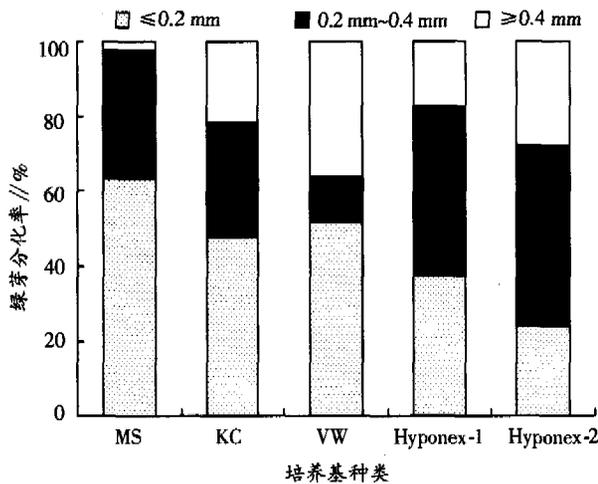


图 1 不同培养基种类对绿芽分化率的影响

2.1.2 6-BA 对绿芽分化的影响。在 Hyponex-2 培养基中添加不同浓度的 6-BA, 结果发现不同浓度的 6-BA 对绿芽分化数、绿芽鲜物重、干物重及干物质含量都有影响(表 2)。从表 2 可以看出,绿芽分化数在 6-BA 0~4 mg/L 时,随着浓度升高呈增加的趋势,而且不添加 6-BA 不形成绿芽,但 6-BA 浓度高于 6.0 mg/L 时绿芽数有下降的趋势;在 6-BA 浓度低于 6 mg/L 时,绿芽的直径也随浓度的增加而增加,但浓度为 4、6、8 mg/L 处理之间在 0.05 水平上无差异。在 6-BA 浓度为 4、6、8 mg/L 处理间绿芽的鲜物重在 0.05 水平上无差异,显著优于 2 mg/L 的 6-BA 处理,干物重和干物质含量则是浓度为 4 mg/L 的 6-BA 处理最佳。在培养过程中,当 6-BA 浓度过高时(8 mg/L),绿芽出现部分肥大现象。

表 2 6-BA 对玉兰花绿芽分化及生长的影响

6-BA mg/L	绿芽分化数 个/外植体	绿芽直径 mm	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体	干物率 %
0	-	-	-	-	-
2	1.8 c	3.3 b	28.4 b	4.0 bc	14.1
4	3.4 a	3.9 ab	43.6 a	6.8 a	15.5
6	3.1 ab	4.3 a	50.2 a	4.8 bc	9.4
8	2.5 bc	3.7 ab	50.3 a	4.9 b	9.8

注:“-”表示因无绿芽分化而未调查。

2.1.3 光照强度对玉兰花发芽分化与生长的影响(表 3)。由表 3 可知,所有光照处理分化出来的绿芽大小均在 2~3 cm。在黑暗中根状茎的头部肿胀、发白,不宜形成绿芽;而在 1 600 lx 光照下所诱导出来的绿芽虽然在数量、鲜物重和干物重都显著优于黑暗条件和 400 lx 处理,但诱导出的绿芽发黑,分布不整齐,几乎所有的绿芽都集中在根状茎的前端,不利于生长;而在 400 lx 光照中培养根状茎所诱导出的绿芽鲜嫩、饱满,出芽整齐,生长比较良好。

2.1.4 根状茎不同部位对绿芽分化的影响(表 4)。从表 4 可

表 3 光照强度对玉兰花绿芽分化与生长的影响

光照强度 //lx	绿芽分化数 个/外植体	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体
0	0.7 b	70.67 c	9.60 c
400	5.2 a	159.58 b	14.10 b
1 600	5.2 a	187.38 a	30.35 a

表 4 根状茎不同部位对绿芽分化及生长的影响

根状茎部位	绿芽数 个/外植体	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体
上部	3.8 a	166.5 a	20.3 a
中部	1.8 b	90.1 b	10.9 b
底部	1.2 b	61.9 b	7.7 b

以看出,在含生长点的根状茎上部所诱导的绿芽数为 3.8 个,明显多于中部(1.8)和底部(1.2),绿芽鲜物重和干物重为中部的 1.8 和 1.9 倍,是基部的 2.7 和 2.6 倍,其效果非常显著。

2.2 生根培养(表 5、6)由表 5 可知:随着 NAA 浓度的增加,诱导出的根的数量及长度也随之增加。当 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时所诱导的根数、大小均达到最高值,分别为 1.3 个和 6.8 mm;当 NAA 浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/L 时,根数显著优于对照,而此 3 个处理间在 0.05 水平上无差异。对于根的鲜物重及干物重,在添加 NAA 处理显著大于对照,但不同浓度 NAA 处理间在 0.05 水平上无差异。从生根率来看,在不加 NAA 的情况下也能生根,但是根的发生率偏低,仅为 44%,根的发生率随 NAA 浓度呈增高的趋势,NAA 浓度为 1.0 和 2.0 mg/L 时根的发生率可达 89%。

表 5 NAA 浓度对玉兰花根的诱导与根生长的影响

NAA mg/L	根数 个/外植体	根长 mm	根鲜物重 mg/外植体	根干物重 mg/外植体	生根率 %
0	0.5 b	4.9 b	12.0 b	1.5 b	44.0
0.5	1.2 b	5.5 b	39.5 ab	3.1 ab	77.8
1.0	1.3 a	6.8 a	52.9 a	5.6 a	89.1
2.0	1.0 a	6.8 a	39.5 ab	3.9 ab	88.9

由表 6 可知,从绿芽中长出植物体时 NAA 浓度对植物体数的增加不起作用,NAA 浓度超过 1.0 mg/L 时反而对植物体数有抑制作用;NAA 对株高的促进效果明显,但 NAA 浓度为 0.5~2.0 mg/L 时,浓度的高低对株高不起作用。NAA 不影响地上部鲜物重,而对于干物重,NAA 浓度为 1.0 和 2.0 mg/L 时为最好。

表 6 生根培养中不同浓度 NAA 对地上部生长的影响

NAA //mg/L	苗数 个/外植体	株高 //mm	鲜物重 mg/外植体	干物重 mg/外植体
0	3.7 a	4.6 b	259.8 a	30.9 b
0.5	3.4 ab	5.5 ab	337.6 a	31.4 b
1.0	3.2 ab	6.8 a	309.8 a	44.6 a
2.0	2.5 b	6.7 a	302.2 a	44.0 a

3 结论与讨论

玉兰花的组织培养是有效的解决其繁殖系数低,不能进行规模化生产的重要途径。该试验对影响玉兰花根状茎绿芽分化的一些因素进行了研究,发现玉兰花在绿芽分化过程中,在 Hyponex-2 培养基中,不论是绿芽分化的数量,还是生长状态都显著优于其他培养基处理。因此,选用 Hyponex-2 培养基适宜于玉兰花绿芽分化培养。在 Hyponex-2 培养基中添加 4 mg/L 的 6-BA 有利于玉兰花根状茎的绿芽的分化。在 400 lx 的光照下,不但促进根状茎绿芽的诱

(下转第 379 页)

用长、宽、厚的 IPG 胶条,在胶条水化过程中上样,上样量可以达到 5~10 mg^[8]。

近年来,基于 2DGE 电泳的各项技术均有很大提高,针对 2DGE 本身固有的缺点均提出了相应的解决办法。为经典的比较蛋白质组学研究提供了方法学上的保证。

1.3 蛋白质质谱研究进展 质谱技术(MS)与电泳技术联用已成为当今比较蛋白质组学研究大规模自动化鉴定蛋白质组的主要方法。其基本原理在于将样品分子离子化后,根据离子间的质荷比(m/z)的差异来分离并确定分子量。质谱技术是目前在鉴定蛋白质的多种方法中发展最快、最具潜力的技术,具有高灵敏度、高准确性、自动化等特点。近 10 年来,其灵敏度提高了 1 000 多倍。20 世纪 80 年代末出现的电喷雾电离质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)不仅灵敏度高而且检测范围宽,从而使传统的质谱技术发生了革命性的变革。在此基础上又发展了 MALDI-TOF-TOF、MALDI-Q-TOF、ESI-MS/MS 等质谱技术。使比较蛋白质组学的研究极大地完善。另外,表面增强激光解吸离子化—飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术在比较蛋白质组学研究中也得广泛应用。

质谱鉴定技术的不断完善与提高使蛋白质的鉴定工作趋于程序化、自动化,使比较蛋白质组学研究精确化、简单化。

1.4 生物信息学 蛋白质信息组学在蛋白质组分析中起着重要作用,是蛋白质组学研究水平的标志和基础。蛋白质组数据库被认为是蛋白质组学知识的储存库,包含所有鉴定的蛋白质信息,如蛋白质的顺序、核苷酸顺序、双向凝胶电泳、三维结构、翻译后的修饰、基因组及代谢数据库等。蛋白质组信息学主要包括蛋白质组研究结果的公布、查询及应用等。相应蛋白质数据库及分析软件的出现大大提高了蛋白质组分析的效率,使蛋白质快速鉴定成为可能^[9]。将差异蛋白质位点进行鉴定,可分析已知蛋白质的结构、性质、功能,亦可丰富现有蛋白质数据库。生物信息学特别是蛋白质组信息学的快速发展与完善是比较蛋白质组学的有力保障。

2 在营养代谢病研究中的应用前景

随着人类基因组测序工作的完成及其他生物基因组测序工作的迅速发展,蛋白质组学研究必将成为今后基因组时代的主要研究内容,而比较蛋白质组学研究作为蛋白质组学研究的重要组成部分也必将成为自然科学研究的热点

之一。细胞表达的蛋白质在细胞周期的特定时期、分化的不同阶段、不同的生理和病理状态下,组成和含量是有差异的。比较蛋白质组学就是着眼于这种差异,动态反映生物体系所处的状态,提供细胞、组织或肌体在特定状态下精确的分子描述,从而更有利于揭示生命现象的本质和规律。目前,比较蛋白质组学研究已经广泛应用到诸多领域,如疾病早期诊断、疗效监测、探讨发病机制、肿瘤标志物筛选、药物靶点筛选、菌株筛选、胚胎发育、形态发生、转录调控、细胞的信号调节、能量代谢、增殖分化、生理病理等,筛选出许多重要的相关蛋白,为理解肌体生命活动奠定基础。

营养代谢病主要是由于营养物质(糖、脂、蛋白质、维生素、微量元素等)代谢紊乱引起的一类疾病。在该类疾病的发生发展过程中,涉及营养物质代谢的相关酶、辅酶等的蛋白质表达谱必定会发生改变^[10]。因此,比较研究该类疾病蛋白质差异表达情况对阐明营养代谢病的发病机理,寻找特异性诊断及治疗药物具有重要意义。营养代谢病比较蛋白质组学方面的研究在今后的一段时间里将成为该类疾病研究的重要内容,将为该类疾病的研究提供大量的试验数据及方向。比较蛋白质组学技术在营养代谢病研究中必将得到广泛应用,并拥有美好前景^[11]。

参考文献

- [1] GYGI S P, ROCHON Y, FRANZA B, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(3): 1720.
- [2] 何大澄, 肖雪媛. 差异蛋白质组学及其应用[J]. *北京师范大学学报: 自然科学版*, 2002, 38(4): 558-562.
- [3] JENSEN P K, PEDEN K K. Mass spectrometric detection for capillary isoelectric focusing separations of complex protein mixtures[J]. *Electrophoresis*, 2000(21): 1372.
- [4] HERBERT B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(4/5): 660-663.
- [5] 孙言伟, 姜颖, 贺福初. 差异蛋白质组学的研究进展[J]. *生命科学*, 2005, 17(2): 137-140.
- [6] 张群业, 陈竺. 差异表达蛋白质组学中的常用技术[J]. *国外医学遗传学分册*, 2004, 27(2): 64-68.
- [7] 孙薇, 贺福初. 差异蛋白质组学研究技术新进展[J]. *化学通报*, 2005(6): 401-407.
- [8] 陈主初, 肖志强. 疾病蛋白质组学[J]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 14-37.
- [9] STUPKA E. Large scale open bioinformatics data resources[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2002, 4(3): 265-274.
- [10] 李幼生, 黎介寿. 营养、营养基因组学和营养蛋白质组学[J]. *肠外与肠内营养*, 2004, 11(5): 129-131.
- [11] 蒋与刚, 房恒通. 蛋白质组学技术及其在营养学研究中的应用[J]. *国外医学卫生学分册*, 2005, 32(5): 309-313.

(上接第 377 页)

导,而且其生长情况也非常良好。该结果与钟士传等人在关于大花蕙兰的组织培养研究中的结果相同^[4]。丁兰等人报道,降低细胞分裂素浓度或适量增高生长素浓度能促进绿芽分化,尤其在无生长调节剂的培养基上,圆球茎分化率极高,很快均匀分化出苗和根^[4]。这与该试验的结果有所不同。玉兰花已经分化的绿芽在转入生根培养基后,虽然在无生长调节剂培养基上也能生根,但发生率较低,地上部的生长也不佳,而添加 1.0 mg/L 的 NAA 的处理有利于根的诱导及

地上部的发育。至于其他细胞分裂素,如激动素、噻苯隆、玉米素等的影响还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 卢思聪. 兰花栽培入门[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 罗林会, 曹小路, 董毅. 兰花植物组织快繁研究[J]. *遵义科技*, 2003, 31(3): 13-15.
- [3] 钟士传, 郑亚琴, 王侠礼, 等. 大量元素、生长调节剂和糖对大花蕙兰组织培养的影响[J]. *中国农学通报*, 2000, 16(3): 48-50.
- [4] 丁兰, 梁桂霞, 傅华龙. 卡特丽亚兰的组织培养与快速繁殖的研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2001, 38(1): 106-110.