

切割方式和外植体大小对蝴蝶兰叶片诱导类原球茎的影响

黄磊^{1,2}, 陈之林¹, 吴坤林¹, 段俊^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:以蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)试管播种苗的叶片为外植体, 以 1/2MS + 10% 椰乳 + NAA 0.1 mg L⁻¹ + TDZ 1.0 mg L⁻¹ + 0.5% 琼脂为诱导培养基, 研究了切割方式和外植体大小对类原球茎(protocorm-like body, PLB)诱导的影响。结果显示, 叶片经横切 2 刀和纵切 2 刀后, 叶片 PLB 诱导率和每叶片诱导出的 PLB 数量均极显著提高, PLB 形成时间极显著缩短, 且横切处理的效果比纵切的更好; 叶片经横切成三分片段、六分片段和十二分片段后, 3 种片段的 PLB 诱导率均极显著高于未切处理(对照), PLB 形成时间均极显著短于对照, 且六分片段的 PLB 诱导率极显著高于其它两种片段。这些表明, 切割方式和外植体大小均对 PLB 的诱导有显著影响。

关键词:蝴蝶兰; 叶片; 切割; 外植体; PLB

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)03-0261-06

Effects of Cutting and Explant Size on PLB Induction from *Phalaenopsis amabilis* Leaves

HUANG Lei^{1,2}, CHEN Zhi-lin¹, WU Kun-lin¹, DUAN Jun^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The leaves of *Phalaenopsis amabilis* were used as explants, cultured 1/2MS medium supplemented with 0.1 mg L⁻¹ α -naphthyl acetic acid (NAA), 1.0 mg L⁻¹ thidiazuron (TDZ), 10% coconut milk (CM)(v/v) to induce PLB (protocorm-like body), the effects of cutting and explant size on PLB induction were studied. The results showed that the leaves were cut transversely or longitudinally twice, both induction rate and average PLB number per leaf increased significantly, and the time of PLB formation decreased significantly. The effect of cutting transversely was better than that of cutting longitudinally. When the leaves were divided transversely into three, six and twelve segments, respectively, the PLB induction rates increased significantly and the time of PLB formation decreased significantly compared to the control. The PLB induction rate of six-divided segments was significantly higher than that of the three- and twelve-divided segments. These results showed that cutting and explant size could affect PLB induction from leaves of *P. amabilis* significantly.

Key words: *Phalaenopsis*; Leaf; Cutting; Explant; PLB

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)是全球最具商业价值的兰花之一。目前, 从蝴蝶兰的离体器官如茎尖、叶片和花梗节间切段等外植体诱导类原球茎(PLB, Protocorm-like body), 然后通过类原球茎的增殖分化获得植株是实现其快速繁殖的一条重要途径^[1]。

以叶片作为外植体, 可减轻对母株的伤害, 而且叶片数量多, 取材不受季节的影响, 所以叶片是较理想的外植体。

建立高效的离体叶片 PLB 诱导体系, 对于蝴蝶兰组培快繁、遗传转化和体细胞胚胎发生机制的

研究具有重要意义。前人已对蝴蝶兰叶片诱导 PLB 及其影响因素进行了不少研究,但主要集中在激素和有机添加物等培养基成分及其组合等方面^[2-8]。本文报道切割处理和外植体大小等因素对蝴蝶兰叶片诱导 PLB 的影响,为提高蝴蝶兰叶片的 PLB 诱导效率提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为本实验室保存的白花蝴蝶兰 (*Phalaenopsis amabilis*) 试管播种苗。选取形态大小基本一致的幼苗顶端已伸展开的幼叶为材料进行处理。叶片长约 2.5~3 cm, 宽约 1~1.5 cm。

1.2 切割处理

对叶片采取两种方式的切割处理:1. 在叶片一侧沿垂直主脉方向横切 2 刀, 切口约占叶宽的 4/5; 2. 从叶片基部沿平行主脉方向纵切 2 刀, 切口约为叶长的 5/6。切割后叶片仍连接为整体(图版 I: 1~2)。以不进行任何处理的叶片为对照(图版 I: 6)。

1.3 不同大小外植体的获得

对叶片仅进行横切处理, 将其切割成沿主脉方向等长且完全分离的片段, 以每个片段作为外植体, 各片段按叶尖到基部顺序编号。该处理又分三分片段、六分片段和十二分片段 3 种方式, 每种片段沿主脉方向的长度分别约为 1 cm、0.5 cm 和 0.25 cm(图版 I: 3~5)。

1.4 培养方法

所有处理均为 20 片叶, 接种于 1/2 MS(大量元素减半) + 10% 椰子乳 + NAA 0.1 mg L⁻¹ + TDZ 1.0 mg L⁻¹ + 0.5% 琼脂的培养基, 叶正面向上。培养温度为 25℃, 光照强度为 35 μmol m⁻² s⁻¹, 光照时

间为 16 h d⁻¹, 培养时间为 50 d。

记录 PLB 形成时间, 统计 PLB 总数、诱导出 PLB 的叶片数和每叶片诱导出的 PLB 数、诱导出 PLB 的片段数和每片段诱导出的 PLB 数、死亡的叶片数和片段数, 并按照下列公式计算:

PLB 诱导率 = 诱导出 PLB 的叶片(片段)数/接种的叶片(片段)数 × 100%。

死亡率 = 死亡的叶片(片段)数/接种的叶片(片段)数 × 100%。

平均诱导 PLB 数 = 诱导的 PLB 总数/诱导出 PLB 的叶片(片段)数 × 100%。

试验重复 3 次, 取平均值, 结果采用 SPSS 软件进行分析。

2 结果和分析

2.1 切割方式对叶片诱导 PLB 的影响

从表 1 可以看出, 经过 50 d 培养, 横切 2 刀和纵切 2 刀处理的叶片的 PLB 诱导率分别为对照的 10.4 倍和 9.2 倍, 与对照比较差异均达到极显著水平;但这两种处理间差异不显著;横切 2 刀处理和纵切 2 刀处理的每叶片诱导的 PLB 数分别为对照的 4.7 倍和 3.1 倍, 与对照差异均达极显著水平, 且这两种处理间的差异也达显著水平;横切和纵切两种处理的单叶片最大 PLB 数分别为对照的 4.4 倍和 4.2 倍, 差异均达极显著水平;横切 2 刀和纵切 2 刀的 PLB 形成时间比对照分别提前 11 和 7.3 d, 差异均达到极显著水平, 且两处理之间的差异也达到显著水平(表 1)。对照和切割处理的叶片死亡率都很低, 没有显著差异。整个培养过程中, PLB 数量增加近似 S 形曲线, 但经切割处理的 PLB 数量增加速度比对照的快(图 1)。这说明切割处理对叶片的 PLB 诱导率和形成时间有明显影响, 且横切比纵切的效果更好。

表 1 切割对 PLB 诱导的影响

Table 1 Effects of cutting treatments on PLB induction

处理 Treatments	PLB 诱导率 PLB induction rate (%)	死亡率 Death rate (%)	平均 PLB 数 Average PLB number	PLB 形成时间 PLB formation time (d)	单叶片最多诱导 PLB 数 Max. PLB inducted per leaf	愈伤组织 Callus
对照 Control	6.7 ± 2.9bB	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.8Bc	27.0 ± 2.0aA	5 ± 1aA	-
横切 2 刀 Cutting transversely twice	70.0 ± 5.0aA	3.3 ± 2.9	13.2 ± 2.5Aa	16.0 ± 1.0cB	22 ± 3bB	+
纵切 2 刀 Cutting longitudinally twice	61.7 ± 7.6aA	3.3 ± 2.9	8.8 ± 2.2Ab	19.7 ± 1.5bB	21 ± 2bB	++

数据后的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。Data followed different small and capital letters indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively. -: 没有 No; +: 很少 A few; ++: 有少量 Some。下表同 The same as following Tables.

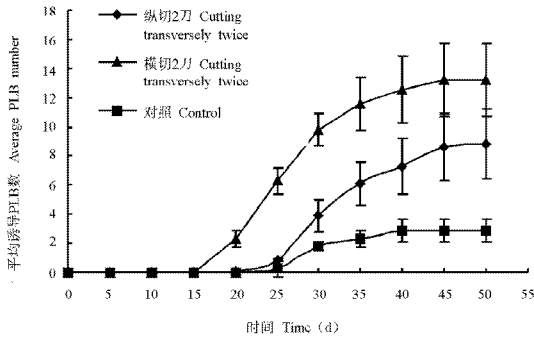


图 1 切割方式对叶片诱导 PLB 的影响

Fig. 1 Effects of cutting on PLB introduction

2.2 外植体大小对 PLB 诱导的影响

叶片经横切分成三分片段和六分片段后, 二者表现出相似的诱导效果, PLB 诱导率均极显著高于对照, 且表现出从叶尖部到叶基部逐渐升高的趋势(表 2)。叶片经横切成十二分片段后, 靠近叶尖部

位的 4 个片段的 PLB 诱导率最高, 其它片段的 PLB 诱导率均较低(表 2), 表明同一叶片不同部位的 PLB 诱导能力存在极显著差异。

叶片经横切成小片段后, 部分片段在培养过程中出现死亡的现象。在三分片段中, 各片段间的死亡率没有显著差异(表 2); 在六分片段中, 第一片段的死亡率最低, 第三片段和第四片段的死亡率最高(表 2); 在十二分片段中, 第一片段的死亡率最低, 第六片段到第十二片段的死亡率均极显著高于其它片段, 第七第八片段死亡率最高, 总体说来, 当叶片切割的片段超过 3 片, 越靠近叶尖部位的片段死亡率越低, 越靠近叶中部的片段死亡率越高。

由表 2 可知, 随着外植体大小的变化, 外植体的 PLB 诱导率和死亡率呈现一定的变化规律, 从前有一对对照到三分片段再到六分片段, 随着外植体

表 2 叶片大小对 PLB 诱导的影响

Table 2 Effects of leaf size on PLB induction

片段 Segments	PLB 诱导率 PLB induction rate (%)	死亡率 Death rate (%)	PLB 形成时间 PLB formation time (d)	平均 PLB 数 Average PLB number
对照 Control	6.7 ± 2.9cC	0 ± 0	27.0 ± 2.0aA	2.8 ± 0.8bB
三分片段 Three-divided	1 28.3 ± 2.9bB	3.3 ± 2.9	22.3 ± 0.6bB	2.6 ± 0.5bB
	2 35.0 ± 5.0abAB	3.3 ± 2.9	21.0 ± 1.0bB	5.3 ± 1.0aA
	3 40.0 ± 5.0aA	3.3 ± 2.9	21.7 ± 0.6bB	5.2 ± 0.9aA
平均 Average	35.0 ± 2.9bB	3.3 ± 1.7cB	22.0 ± 1.0bB	4.4 ± 0.4aA
六分片段 Six-divided	1 33.3 ± 5.8cC	11.7 ± 2.9b	21.0 ± 1.0bB	2.7 ± 0.7cB
	2 40.0 ± 5.0cC	15.0 ± 5.0ab	20.3 ± 0.6bB	5.0 ± 0.5abA
	3 53.3 ± 7.6bB	20.0 ± 5.0a	21.0 ± 1.0bB	5.1 ± 0.2abA
	4 60.0 ± 5.0bAB	20.0 ± 5.0a	20.0 ± 1.0bB	5.2 ± 0.6abA
	5 70.0 ± 5.0aA	18.3 ± 5.8ab	20.3 ± 0.6bB	5.8 ± 0.4aA
	6 71.7 ± 5.8aA	18.3 ± 2.9ab	20.0 ± 1.0bB	5.6 ± 0.5aA
平均 Average	54.7 ± 6.2aA	17.2 ± 4.2bB	20.0 ± 1.0bB	4.8 ± 0.2aA
十二分片段 Twelve-divided	1 46.7 ± 5.8aAaA	18.3 ± 2.9cBB	21.7 ± 0.6bB	3.1 ± 0.4bB
	2 46.7 ± 7.6aA	33.3 ± 7.6bcAB	20 ± 1bB	4.7 ± 0.6aA
	3 35 ± 10abAB	33.3 ± 7.6bcAB	20.7 ± 1.1bB	4.6 ± 0.4aA
	4 36.7 ± 15.3abAB	33.3 ± 7.6 bcAB	20.0 ± 1.0bB	4.6 ± 0.2aA
	5 23.3 ± 15.3abABC	40 ± 8.7abAB	20.3 ± 0.6bB	4.9 ± 0.4aA
	6 23.3 ± 10.4AbBcC	48.3 ± 12.6abA	20.3 ± 1.2bB	5.1 ± 0.3aA
	7 18.3 ± 10.4bcBC	58.3 ± 12.6aA	19.7 ± 0.6bB	4.7 ± 0.5aA
	8 20 ± 10bcBC	56.7 ± 10.4aA	21.0 ± 1.0bB	4.8 ± 0.4aA
	9 20.0 ± 8.7bcBC	51.7 ± 15.3abA	20.0 ± 1.0bB	4.7 ± 0.5aA
	10 21.7 ± 7.6bcABC	50.0 ± 10.0abA	19.7 ± 0.6bB	4.5 ± 0.2aA
	11 21.7 ± 10.4bcABC	53.3 ± 12.6aA	20.3 ± 1.2bB	4.5 ± 0.3aA
	12 20.0 ± 10.0bcBC	51.7 ± 10.4abA	20.0 ± 1.0bB	4.8 ± 0.3aA
平均 Average	28.3 ± 8.8bB	44.5 ± 9.7aA	20.0 ± 1.0bB	4.6 ± 0.3aA

的缩小, PLB 诱导率增加, 但是从六分片段到十二分片段, PLB 的诱导率出现了明显的下降。从对照到十二分片段, 随着外植体面积的递减, 其死亡率递增, 特别是十二分片段的死亡率比六分片段增加了 27.3%, 从六分片段到十二分片段的 PLB 诱导率骤然下降, 主要是由于片段死亡率的大幅提高引起的。这表明, 在一定限度内, 外植体面积减小能提高 PLB 诱导率。

三分片段、六分片段和十二分片段的 PLB 诱导率都极显著高于对照, PLB 形成时间也都极显著短于对照(表 2), 表明将较大的叶片切割成较小的片段, 比采用整个叶片作为外植体诱导 PLB 的效率高得多。

3 讨论

3.1 切割方式与外植体 PLB 诱导的关系

前人对蝴蝶兰类原球茎的增殖研究表明, 切割可以刺激类原球茎在其表面沿伤口面形成新的 PLB, 显著提高 PLB 的增殖率^[9]; 苹果(*Malus pumila*) 离体叶片的体细胞胚胎发生的研究表明, 切割提高了外植体直接体细胞胚胎发生率和单位外植体体细胞胚胎产量, 并且横切的处理效果好于纵切^[10]。本实验以蝴蝶兰叶片为材料也得到了类似的结果。切割能诱导叶片外植体形成 PLB 可能有几方面的原因, 一是切割作为一种机械损伤, 可以作为非生物诱导子发挥作用, 诱导植物细胞产生一系列反应^[11], 创伤信号通过细胞内一系列的信号转导过程, 特别是 MAPK (mitogen-activated protein kinase, 促分裂原活化蛋白激酶) 级联信号转导途径^[12], 激活细胞内与细胞分裂相关的基因表达, 从而促进伤口附近细胞分裂而形成 PLB; 二是由于切割增加了伤口长度和表面积, 从而增加了 PLB 发生的概率; 三是由于外植体主要通过伤口(切割面)从培养基中吸收激素、有机和无机营养等物质成分, 切割增加了伤口面积从而使外植体能从培养基中吸收更多的激素和营养等物质, 最终促进 PLB 的形成和生长, 至于横切处理的效果好于纵切的原因还需进一步研究。

3.2 外植体大小和部位与其 PLB 诱导的关系

本研究表明, 当蝴蝶兰叶片被切割成片段后, 在一定范围内(如切割成三分片段和六分片段), 可极大地提高 PLB 诱导率, 但当片段过小时, 如十二分片段, 会导致片段死亡率急剧增加, 反而使

PLB 诱导率降低, 说明在以蝴蝶兰叶片为外植体诱导 PLB 时, 将叶片切割成适当大小的片段有助于 PLB 的诱导, 片段过大或过小均显著影响其诱导率, 这与前人对黄瓜(*Cucumis sativus*)子叶^[13], 木奈(*Prunus salicina* var. *cordata*)幼胚^[14]、南方红豆杉(*Taxus chinensis*)幼茎^[15]、大蒜(*Allium sativum*)蒜瓣^[16]等的研究结果类似, 表明在植物组织培养时, 外植体大小是影响其脱分化的重要因素。本研究还发现, 当蝴蝶兰叶片被切割成若干片段后, 不同形态学部位的片段的 PLB 诱导率不同, 当叶片切割成三分和六分片段时, 越靠近叶尖部位的片段, PLB 诱导率越低, 越靠近叶基部位的片段, PLB 诱导率越高, 这与前人对蝴蝶兰^[8]和大花蕙兰(*Cymbidium hybrida*)^[17]叶片的研究结果相似, 可能是由于不同形态学部位的叶片片段的生理状态不同造成的^[18]。蝴蝶兰属单子叶植物, 一般来说, 单子叶植物的叶片基部保持生长能力^[19], 在同一叶片中, 越靠近叶片基部的细胞分裂能力越强, 越靠近叶尖部位的细胞分裂能力越弱, 而细胞的分裂能力又与其脱分化形成 PLB 的难易程度有关。但是, 当叶片切割成十二分片段时, 不同片段 PLB 诱导率与三分片段和六分片段的不一致, 而与片段死亡率基本一致, 说明当叶片切割成过小的片段时, 片段死亡率成了影响片段 PLB 诱导率的主要因素。

当叶片切割成若干片段后, 在培养的过程中, 片段会出现死亡的现象, 并且当切割的片段超过 3 片时, 不同部位片段的死亡率不同, 靠近叶尖的片段死亡率较低, 靠近叶中部的片段死亡率较高。可能有几方面的原因: 第一, 由于蝴蝶兰的叶片近似椭圆形, 当把叶片切割成较小的片段时, 位于叶中部的片段在切割时形成的切割面最大, 因而受到的创伤程度也最大, 靠近叶尖的片段在切割时形成的切割面相对较小, 因而受到的创伤程度也相对较小, 尤其是位于叶尖的第一片段只有一个切口(伤口), 受到的创伤程度最低, 而创伤程度又与片段的死亡之间有直接关系; 第二, 不同形态学部位的叶片片段的生理状态即成熟度不同^[18]可能也是导致不同片段间死亡率不同的原因之一, 至于具体原因值得进一步研究。

参考文献

- [1] Li C H(李成慧), Cai B(蔡斌), Chan L L(单丽雨), et al. Application of orthogonal design in protocorm induction from leaves of *Phalaenopsis* [J]. J Yangzhou Univ (Agri Life Sci) (扬州大学学报:

- 农业与生命科学版), 2004, 25(2): 76-78.(in Chinese)
- [2] Chen J T, Chang W C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis* [J]. Biol Plant, 2006, 50(2): 169-173.
- [3] Cui G R(崔广荣), Hou X L(侯喜林), Zhang Z X(张子学), et al. Efficient somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis in vitro* culture and histological observations [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2007, 34(2): 431-436.(in Chinese)
- [4] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994, 6(2): 271-282.
- [5] Myint K T, Chung M Y, Chung J D, et al. Propagation via *in vitro* culture of leaf tissue of *Phalaenopsis* seedlings [J]. J Korean Soc For Hort Sci, 2001, 42(1): 1-5.
- [6] Park S Y, Murthy H N, Paek K Y. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves [J]. *In vitro* Cell Develop Biol Plant, 2002, 38(2): 168-172.
- [7] Myint K T, Kim C K, Chung M Y, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from thin-sectioned leaf explants of *Phalaenopsis* hybrid [J]. Hort Environ Biotechn, 2006, 47(6): 344-348.
- [8] Li J(李杰), Huang M R(黄敏仁), Wang M X(王明麻), et al. Plantlets regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis* [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci)(南京林业大学学报: 自然科学版), 2005, 29(3): 28-32.(in Chinese)
- [9] Xu X W(徐晓薇), Cai M L(柴明良), Yao L J(姚丽娟), et al. Research on PLB propagation and dedifferentiation of *Phalaenopsis* [J]. Zhejiang Agri Sci(浙江农业科学), 2006(4): 401-403.(in Chinese)
- [10] Da K D(达克东), Zhang S(张松), Mi R F(米瑞芙), et al. Wounding induced efficient direct somatic embryogenesis in apple leaves [J]. Acta Agri Nucl Sin(核农学报), 2001, 15(5): 290-293. (in Chinese)
- [11] 元英进, 葛志强. 植物细胞培养工程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 109-112.
- [12] Song D H(宋东辉), Song F M(宋凤鸣), Zheng Z(郑重). Function of MAP kinases in plant signal transduction pathway networks [J]. J Zhejiang Univ (Agri Life Sci)(浙江大学学报: 农业与生命科学版), 2004, 30(2): 119-126.(in Chinese)
- [13] Nawab A, Robert M S, Walter E S. Regeneration of *Cucumis sativus* from cotyledons of small explants [J]. Hort Sci, 1991, 26(7): 925-927.
- [14] Chen G X(陈桂信), Xie W L(谢文龙), Pan D M(潘东明), et al. Induction of embryonic calli from the young embryos of *Nai (Prunus salicina* Lindl. var. *cordata* J. Y. Zhang et al.) [J]. Acta Agri Univ Jiangxi (江西农业大学学报), 2006, 28(1): 44-49.(in Chinese)
- [15] Wang D Q(王德强), Wang X L(王晓玲). Study on induction of callus of *Taxus chinensis* var [J]. J Hefei Univ Techn (Nat Sci) (合肥工业大学学报: 自然科学版), 2005, 28(4): 394-397. (in Chinese)
- [16] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 1-15.
- [17] Wu K Y(吴开云), Huang M R(黄敏仁), Wang M X(王明麻). Protocorm-like body induced from leaf-segments of *in vitro*-seedlings of *Cymbidium hybridum* [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2007, 5(3): 341-346.(in Chinese)
- [18] Wang Y(王艳), Sun Z X(孙仲序), Xia Y(夏阳). Study of regeneration from leaves of apple *in vitro* [J]. J Shandong Agri Univ (Nat Sci)(山东农业大学学报: 自然科学版), 2004, 35(2): 196-200.(in Chinese)
- [19] 潘瑞焱. 植物生理学 [M]. 第 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2001: 1-229.

图版说明

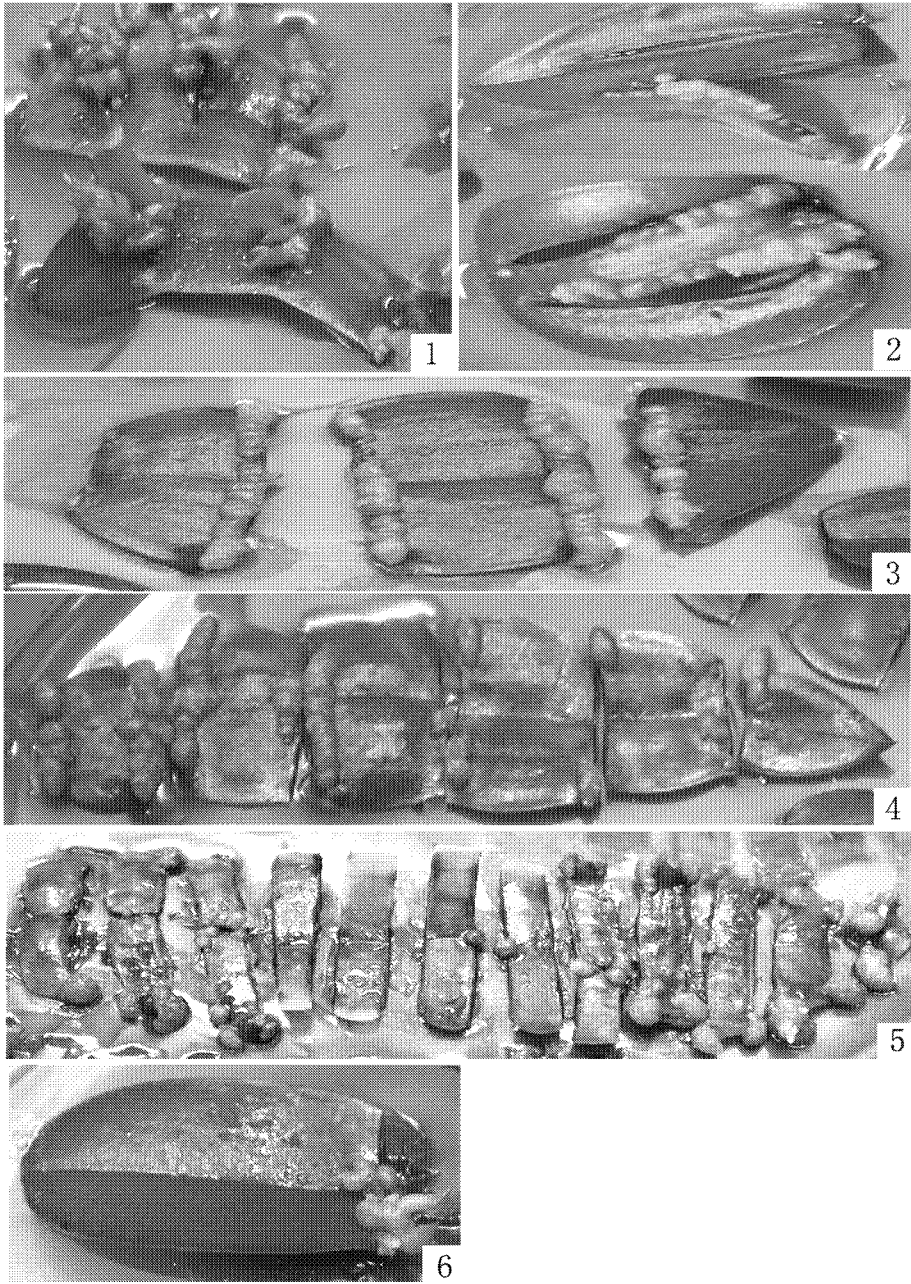
图版 I

1. 横切 2 刀; 2. 纵切 2 刀; 3. 三分片段; 4. 六分片段; 5. 十二分片段; 6. 对照。

Explanation of plate

Plate I

1. Cutting transversely twice; 2. Cutting longitudinally twice; 3. Three-divided segments; 4. Six-divided segments; 5. Twelve-divided segments; 6. Control.



黄磊等: 图版 I

HUANG Lei, et al.: Plate I