

蝴蝶兰高效再生体系与遗传转化体系的建立

盛 慧

(哈尔滨市农业科学院 生物中心,黑龙江 哈尔滨 150029)

摘要:为建立蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)再生体系和遗传转化体系,对蝴蝶兰进行人工授粉,成熟后将胚播种于诱导培养基上诱导原球茎或不定芽。探讨外源调节剂的种类及浓度,并筛选卡那霉素浓度以及除菌剂的种类及浓度。结果表明:当 6-BA 浓度为 5 mg·L⁻¹,NAA 浓度为 1 mg·L⁻¹时,原球茎的诱导效率最高。当 6-BA 浓度为 1.5 mg·L⁻¹,同时添加 0.5 g·L⁻¹活性炭和 40 mL·L⁻¹椰汁时,壮苗效果最佳。卡那霉素的筛选浓度为 4 mg·L⁻¹,除菌剂的种类为阿莫西林克拉维酸钾(7:1),除菌浓度为 100 mg·L⁻¹。

关键词:蝴蝶兰;再生体系;遗传转化

中图分类号:S682 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2017)04-0009-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.04.0009

蝴蝶兰又名蝶兰,为兰科蝴蝶兰属多年生草本植物,因其花色艳丽,造型独特,深受人们喜爱,是世界上栽培面积较大的洋兰品种之一,素有洋兰皇后的美称,是花卉市场上紧俏的花卉品种。蝴蝶兰是单茎性气生兰,几乎没有侧枝,难以进行自身的无性繁殖。工厂化的蝴蝶兰小苗大都是利用花梗下的休眠芽得到无菌苗,而后利用健壮的无菌苗作为外植体进行大量扩繁。本研究拟通过授粉后的种子直接诱导原球茎,将成熟的原球茎切割后继续培养,诱导不定芽的产生,建立高效再生体系,并确立卡那霉素的筛选浓度和除菌剂的种类及浓度,建立完整的遗传转化体系,为进一步开展蝴蝶兰转基因工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选用台湾蝴蝶兰作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 原球茎的诱导 蝴蝶兰开花 4~6 d 内,用镊子取粘性好且鲜黄色花粉进行授粉。3~5 个月后,将授粉成功的果荚取下,无菌条件下播种于诱导培养基上。以 1/2 MS 作为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA、TDZ 和 NAA,分析不同培养基比对原球茎诱导率的影响(见表 1)。

1.2.2 原球茎增殖 将诱导出的原球茎转接到增殖培养基中。增殖培养基同样以 1/2 MS 作为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA 和 NAA,观

察统计原球茎增殖情况(见表 2)。

表 1 不同激素比对诱导效率的影响

Table 1 Effect of different hormone proportion on induction efficiency

序号 No	激素种类及浓度/(mg·L ⁻¹) Kind and concentration of hormone		
	6-BA	TDZ	NAA
1	3	0	1
2	5	0	1
3	7	0	1
4	0	3	1
5	0	5	1

表 2 不同激素比对原球茎增殖效果的影响

Table 2 Effects of different hormone proportion on proliferation of protocorm

序号 No.	激素种类及浓度/(mg·L ⁻¹) Kind and concentration of hormone	
	6-BA	NAA
1	1	0.5
2	3	0.5
3	5	0.5

1.2.3 不定芽分化及壮苗培养 待原球茎长至一定数量且颜色加深时,将其在培养皿中进行分割。分割后的原球茎转接到分化培养基上继续培养,直到分化出大量不定芽。分化培养基可选用原球茎增殖效果最佳的培养基。待不定芽长至 3~4 cm 时,将其转入到壮苗培养基中,壮苗培养基同样选用 1/2 MS 作为基本培养基,适当降低细胞分裂素的浓度,同时添加 0.5 g·L⁻¹活性炭和

收稿日期:2017-02-27
作者简介:盛慧(1976-),女,辽宁省宽甸县人,博士,高级农艺师,从事植物分子育种研究。Email: shenghui415@aliyun.com.

40 mL·L⁻¹椰汁。

1.2.4 生根培养 待再生植株长至6~8 cm时,从基部切下,转移至生根培养基中进行生根培养。生根培养基同样添加0.5 g·L⁻¹活性炭和40 mL·L⁻¹椰汁,并适当提高琼脂含量。

1.2.5 卡那霉素浓度筛选 原球茎分割后,将其接种在含有不同浓度卡那霉素分化培养基上,观察不定芽分化情况,30 d后统计结果。卡那霉素浓度初定为:0、1、3、5和10 mg·L⁻¹。

1.2.6 除菌剂种类及浓度筛选 根据其它物种除菌剂筛选经验,选定头孢唑林钠和阿莫西林作为除菌剂。将共培养后的原球茎放在无菌水中清除表面菌液,在一定浓度的除菌液中浸泡30 min,而后接种在分化培养基上,分化培养基中可添加选定浓度的除菌剂。

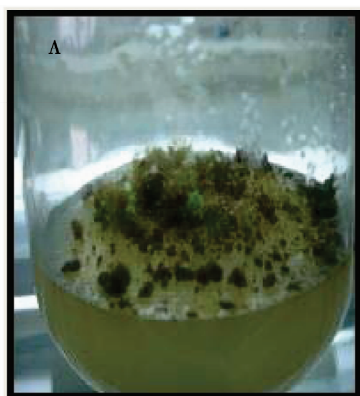
2 结果与分析

2.1 原球茎诱导

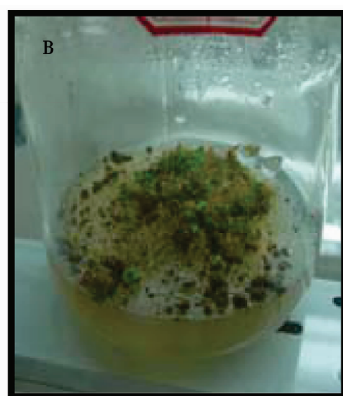
种子成熟的程度直接关系到原球茎的诱导时间。一般情况下,4个月是最佳接种期。试验发现,6-BA和NAA的组合要好于TDZ和NAA的组合。并且,当6-BA浓度为5 mg·L⁻¹,NAA浓度为1 mg·L⁻¹时,原球茎的诱导效率最高,诱导出的时间最短(见图1A)。

2.2 原球茎增殖

诱导出的原球茎放入增殖培养基中培养,20 d后统计增殖情况。试验发现,适当降低6-BA和NAA浓度有利于原球茎增殖(见图1B)。确定增殖培养基为:1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+3 mg·L⁻¹ 6-BA,30% Suc,0.8% Agar。



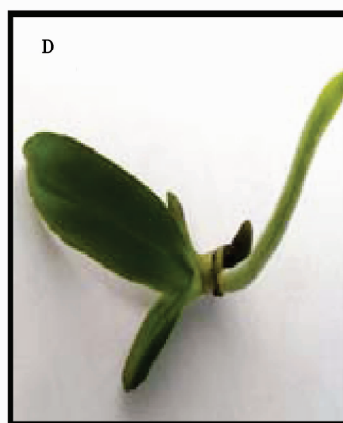
原球茎诱导



分化及壮苗



原球茎增殖



生根培养

图1 原球茎诱导、原球茎增殖、分化及壮苗和生根培养

Fig. 1 Original bulb induce,original bulb proliferation,differentiation and seedling,rooting culture

2.3 不定芽分化及壮苗培养

原球茎在增殖培养基上培养30 d左右便有不定芽产生,将不定芽连同底端的原球茎继代到

新的培养基上,7 d继代一次。待不定芽长至3~4 cm时,将其从原球茎上取下,分接到1/2MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA,30% Suc,1.0% Agar上进行

壮苗培养(见图 1C)。

2.4 生根培养

试验确定生根培养基为:1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 g·L⁻¹ 活性炭+40 mL·L⁻¹ 椰汁,15% Suc,1.2% Agar(见图 1D)。

2.5 卡那霉素浓度筛选

试验发现,当卡那霉素浓度为 0~3 mg·L⁻¹ 时均有不定芽产生,当浓度为 5 mg·L⁻¹ 以上时,没有不定芽分化。再次设定卡那霉素浓度为 3.5、4.0 和 4.5 mg·L⁻¹,发现当浓度为 4.0 mg·L⁻¹ 时,只产生少量不定芽,故确定卡那霉素最终筛选浓度为 4.0 mg·L⁻¹。

2.6 除菌剂浓度确定

试验选用不同浓度的阿莫西林克拉维酸钾和不同浓度的头孢唑啉钠作为除菌剂,以有无菌落产生的最低浓度为准。试验发现,当头孢唑啉钠为 200 mg·L⁻¹ 时有少量菌落产生,最终选定 100 mg·L⁻¹ 阿莫西林克拉维酸钾作为除菌剂。

3 结论与讨论

蝴蝶兰大都采用组织培养手段进行扩繁,常用的外植体为原球茎或类原球茎^[1-2],近期蝴蝶兰的增殖过程多采用丛生芽直接诱导。为增加蝴蝶兰的观赏性,有关蝴蝶兰转基因的研究也越来越多^[3-5]。在蝴蝶兰转基因研究中,为避免嵌合体的产生,柴明良等^[6]采用多代选择的策略,逐代进行 GUS 验证,以确保选择程序的合理性。于璇^[7]以

蝴蝶兰类原球茎和组培苗叶片为受体材料,深入探讨了外植体的侵染液浓度和侵染时间,以及侵染添加物质等对蝴蝶兰遗传转化过程产生的影响,并利用农杆菌介导法成功地将目的基因导入蝴蝶兰中。潘才博^[8]以蝴蝶兰种子幼胚无菌体系为受体,对 ACS 反义基因的遗传转化进行非常深入地研究,并对 ACS 基因进行了克隆。本研究探讨不同外源调节剂对诱导效率和壮苗效果的影响,分析影响不定芽褐化的培养条件,确立卡那霉素的筛选浓度、除菌剂的种类和浓度,建立高效蝴蝶兰再生体系和遗传转化体系,为蝴蝶兰转基因研究打下基础。

参考文献:

- [1] 彭娇,崔金腾,王爱香,等.基于再生不定芽的蝴蝶兰继代扩繁体系建立[J].中国农学通报,2015(4):162-166.
- [2] 李成慧,蔡斌.蝴蝶兰不定芽途径快繁技术研究[J].安徽农业科学,2012(20):10368-10369.
- [3] 张和臣,董晓宇,王利民,等.以蝴蝶兰种子萌发的原球茎为受体的遗传转化体系构建[J].河南农业科学,2016(8):107-111.
- [4] 肖文芳,李佐,尤毅,等.蝴蝶兰转基因研究进展[J].广东农业科学,2012(24):168-170.
- [5] 满若君,李杨瑞,卜朝阳.蝴蝶兰的组织培养和遗传转化体系的研究进展[J].广西农业科学,2007(1):6-10.
- [6] 柴明良,金斗焕.农杆菌介导的蝴蝶兰基因转化系统的建立[J].园艺学报,2004,31(4):537-539.
- [7] 于璇.蝴蝶兰类原球茎农杆菌介导的转基因体系构建[D].临安:浙江农林大学,2015.
- [8] 潘才博.蝴蝶兰 ACS 反义基因的遗传转化及 ACS 基因的克隆研究[D].福州:福建农林大学,2007.

Establishment of Efficient Regeneration System and Genetic Transformation System of *Phalaenopsis*

SHENG Hui

(Biological Center of Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150029)

Abstract: In order to establish the regeneration system and genetic transformation system of *Phalaenopsis amabilis*, *Phalaenopsis amabilis* was used for artificial pollination, after maturation, the embryos were seeded on the induction medium to induce protocorm or adventitious buds. The type and concentration of exogenous regulators were explored, and the concentration of kanamycin and the type and concentration of the fungicide were screened. The results showed that when the concentration of 6-BA was 5 mg·L⁻¹ and NAA was 1 mg·L⁻¹, the induction efficiency of protocorm was the highest. When the concentration of 6-BA 1.5 mg·L⁻¹, while adding 0.5 g·L⁻¹ activated carbon and 40 mL·L⁻¹ coconut, the best effect of strong seedlings. The results showed that the concentration of kanamycin was 4 mg·L⁻¹, the type of fungicide was amoxicillin clavulanate (7:1), and the concentration was 100 mg·L⁻¹.

Keywords: *Phalaenopsis*; regeneration system; genetic transformation