

秋水仙素诱导杜鹃兰原球茎产生多倍体

吴彦秋, 叶睿华, 吕享, 王汪中, 张明生*, 刘剑东

贵州大学生命科学学院, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳550025

摘要: 以杜鹃兰原球茎为材料进行多倍体诱导研究。采用二因素随机区组试验对杜鹃兰原球茎进行诱变处理, 考查不同质量分数的秋水仙素及不同处理时间对杜鹃兰原球茎的生长及其分化成苗的影响, 比较正常植株和变异植株的形态特征, 并对二者的染色体倍性进行鉴定分析。结果表明, 秋水仙素对杜鹃兰原球茎有一定的毒害作用, 原球茎的存活率随秋水仙素质量分数及处理时间的增加而明显降低, 不同处理的多倍体诱导率不同, 最高诱导率达20%。多倍体试管苗植株粗壮, 叶片质地较硬, 假鳞茎变大, 根粗短且数量少。

关键词: 杜鹃兰; 原球茎; 秋水仙素; 化学诱导; 多倍体

杜鹃兰 [*Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino.] 属兰科杜鹃兰属珍稀药用植物, 以其干燥假鳞茎入药。其假鳞茎含有生物碱、黄酮类、苷元、萜类等药用成分, 内用具有抗肝癌、乳腺癌、子宫癌等功效, 外用可治疮毒、蛇虫咬伤、皮肤烫伤或烧伤等 (Zhang等2006)。然而, 因其有性生殖困难, 无性繁殖率低, 导致其野生资源濒临枯竭。近年来通过人工授粉获得种子, 且在人工控制种子萌发、原球茎诱导增殖及分化成苗等方面有所突破 (Zhang等2010; 毛堂芬等2007), 为其化学诱变奠定了基础。将秋水仙素与组织培养结合进行药用植物的多倍体诱导是一种重要的育种方法 (Predieri 2001)。加倍后的药用植物, 通常较正常植株根、茎、叶均偏大、产量提高、抗逆性增强、药用活性成分比例提升 (张爱民等2005)。利用该方法已获得铁皮石斛 (Vichiato等2007; 詹忠根和徐程2011)、蝴蝶兰 (崔广荣等2009)、墨兰 (王木桂等2011)、金线莲 (王丽芳等2010)、卡特兰 (Mello e Silva等2000)、大花蕙兰 (周珊珊等2015) 等多倍体。但未见杜鹃兰此方面的研究报道。本研究以人工授粉收获的杜鹃兰种子进行无菌萌发产生的原球茎为试验材料, 研究不同质量分数的秋水仙素及不同处理时间对杜鹃兰多倍体诱导的影响, 考查秋水仙素处理后杜鹃兰原球茎的生长、分化及成苗后的生长势与染色体倍性的关系, 以期为建立杜鹃兰多倍体育种技术提供理论依据, 为探索提高杜鹃兰药材产量和药用成分含量的有效途径奠定基础。

材料与方法

1 材料

以本实验室人工授粉获得的杜鹃兰 [*Cremastra*

appendiculata (D. Don) Makino.] 种子材料, 经组织培养诱导产生原球茎。

2 方法

2.1 外植体处理及培养

将种子萌发的原球茎分别浸入添加0.05%、0.10%、0.15% (质量分数) 秋水仙素的液体培养基 MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖20 g·L⁻¹ (pH 5.8) 中处理1、3和5 d, 对照处理不含秋水仙素。每个处理原球茎接种量为30个·瓶⁻¹, 重复3次。振荡培养条件为温度25°C, 光照强度25 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间12 h·d⁻¹, 摇床转速75 r·min⁻¹。

将上述处理后的原球茎用无菌水清洗后, 接种到1/2MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 1.0 mg·L⁻¹+活性炭0.5 g·L⁻¹+蔗糖20 g·L⁻¹+琼脂6.0 g·L⁻¹培养基 (pH 5.8) 上进行继代培养, 每个处理接种3皿, 每皿接种10个原球茎, 重复3次, 培养条件为温度(25±2)°C, 光照强度25 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间12 h·d⁻¹, 跟踪观察原球茎的生长情况。培养6周后, 统计原球茎存活率, 以存活率表示秋水仙素的处理效应。

2.2 原球茎分化培养及试管苗根尖细胞染色体鉴定

将上述培养6周后存活的原球茎接种到1/4MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+活性炭0.5 g·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂5.5 g·L⁻¹培养基 (pH 5.8) 上进行分化培养, 直至发育为完整植株 (试管苗)。待试管

收稿 2016-10-28 修订 2017-01-10

资助 国家自然科学基金(81360613和81660627)、国家重点研发计划(2016YFC0502604)、贵州省高层次创新型人才培养计划(黔科合人才[2015]4031号)、贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合平台人才[2016]5624)和贵州省教育厅创新群体重大研究项目(黔教合KY字[2016]023)。

* 通讯作者(E-mail: mszhang@guz.edu.cn)。

苗根长至1~2 cm时,各处理随机取30株试管苗,于超净台上剪取约0.5 cm长的根尖进行染色体鉴定,并统计多倍体诱导率。

染色体鉴定方法如下。

预处理:将剪下的根尖放置冰水中36 h后,取出用1% α -溴处理3 h。

固定:将预处理后的根尖用蒸馏水洗净,浸入卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1, *V/V*)中置于4°C冰箱固定12~24 h。

解离:经固定后的根尖用蒸馏水洗净,用刀片将其尖端分生区切成0.5 mm长的片段,置入2%纤维素酶和果胶酶混合液中于37°C下解离20 min,再用蒸馏水冲洗干净。

制片:取解离后的根尖置于载破片上,加一滴醋酸洋红,盖上盖玻片,结合显微观察轻轻敲打根尖上部的盖破片,直至根尖细胞染色体散开后,再烘烤、冷却、压片。

镜检、拍照:压好的装片以Olympus-BX53显微镜镜检,将85%以上具有恒定一致的染色体数作为该处理植株的染色体数目,用Cellsens Standard摄像系统拍摄染色体图像。

2.3 多倍体试管苗形态观测

分别选取普通二倍体和上述经鉴定加倍成功的多倍体试管苗,进行植株形态观测比较,主要指标包括株高、假鳞茎直径、生根数、根长等。

3 统计分析

存活率(%)=(处理后正常生长的原球茎数/处理时原球茎总数) \times 100%。

变异率(%)=(变异植株数/总植株数) \times 100%。

多倍体诱导率(%)=(多倍体植株数/鉴定植株总数) \times 100%。

运用Excel 2010和SPSS 17.0对试验结果进行统计学分析。

实验结果

1 秋水仙素处理对杜鹃兰原球茎生长的影响

不同质量分数的秋水仙素和处理时间对杜鹃兰原球茎的成活率有明显的影响。因秋水仙素的毒性较大,处理后的原球茎在培养过程中均出现不同程度的褐化及死亡现象。原球茎增殖形成的新的原球茎存活率随秋水仙素质量分数的升高而显著降低(表1)。其中,当秋水仙素的质量分数为

表1 秋水仙素处理对杜鹃兰原球茎生存的影响

Table 1 Influence of protocorms surviving by colchicine treatment

秋水仙素质量分数/%	原球茎存活率/%		
	1 d	3 d	5 d
0	100.0 \pm 0.0 ^a	86.7 \pm 10.0 ^{abc}	90.0 \pm 5.8 ^{ab}
0.05	75.5 \pm 3.9 ^{bcd}	70.0 \pm 6.7 ^{cde}	65.6 \pm 5.1 ^{de}
0.10	53.3 \pm 3.3 ^{efg}	60.0 \pm 10.0 ^{def}	46.6 \pm 5.8 ^{gh}
0.15	40.0 \pm 3.3 ^{ghi}	34.4 \pm 5.1 ^{hi}	24.4 \pm 1.9 ⁱ

表中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),表2同此。

0.15%、处理时间为5 d时,原球茎的存活率最低(约24.4%)。培养6周后,对照组原球茎呈乳白色或淡绿色(图1-A),处理组存活的部分原球茎呈深绿色(图1-B)。继续分化培养发现,处理组(图1-D)成活的少数原球茎较对照组(图1-C)颜色更深、长势更好,这可能是因为经秋水仙素处理后,染色体成功加倍的原球茎中遗传物质在转录水平上表达量增加,细胞内物质代谢增强。

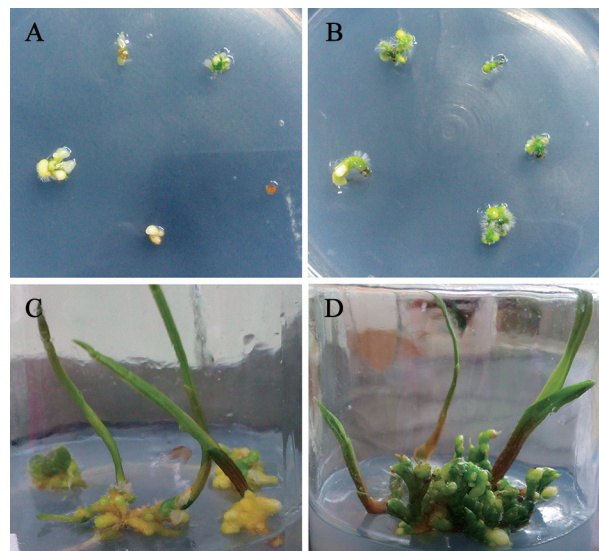


图1 秋水仙素对杜鹃兰原球茎生长的影响

Fig.1 Influence of protocorms growth by colchicine treatment

A、C: 对照组; B、D: 处理组。

2 秋水仙素处理对植株细胞染色体组的影响

剪取经秋水仙素处理和未经秋水仙素处理的植株根尖,进行染色体加倍鉴定。结果表明,正常植株根尖细胞的染色体数目为 $2n=2x=42$,与杨涤清和朱燮桴(1984)报道一致。而用秋水仙素处理后,染色体加倍成功的植株,其染色体数目为 $2n=4x=84$,属四倍体(图2)。除处理11和处理12外,经

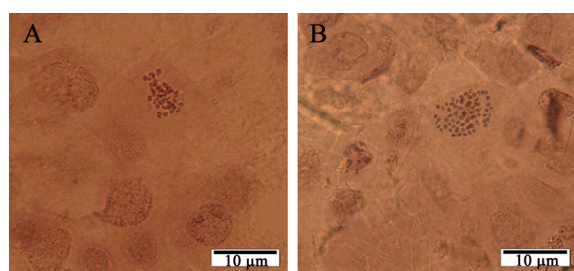


图2 秋水仙素处理的植株根尖细胞染色体变化
Fig.2 Chromosome changes of root tip cells by colchicine treatment

A: 二倍体植株根尖细胞染色体数, $2n=2x=42$ (对照); B: 四倍体植株根尖细胞染色体数, $2n=4x=84$ (处理)。

秋水仙素处理的杜鹃兰原球茎分化发育形成的再生植株, 其细胞中染色体加倍诱导率随秋水仙素质量分数及处理时间的增加逐渐上升(图3, 图中的处理号同表2)。其中, 秋水仙素质量分数为0.15%, 处理时间为1 d (处理10)时, 染色体加倍诱导率最高, 为20%。而秋水仙素质量分数为0.05%, 处理时间为1 d (处理4)时, 诱导率最低, 这可能是因为短时间内, 低质量分数的秋水仙素难以渗透到杜鹃兰原球茎的细胞中。

3 杜鹃兰多倍体和二倍体的形态比较

多倍体植株与正常植株相比, 二者的形态特征具有明显差异(图4和表2)。正常植株叶片表面平滑、颜色较浅, 单株植株只有1片叶(图4-A₁), 根细长且数量较多; 多倍体植株较正常植株矮而粗, 单株叶片较多(图4-A), 前期原球茎生长和分化以

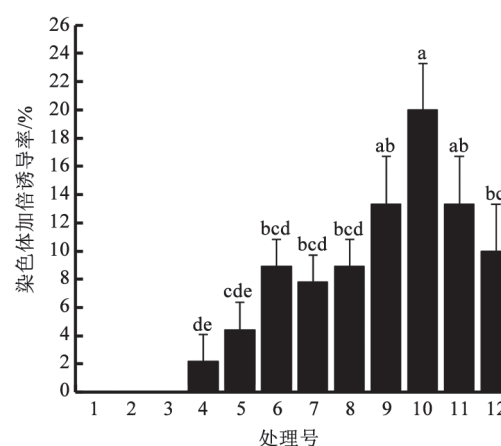


图3 不同处理对再生植株细胞染色体加倍的效果
Fig.3 Effects of different treatments to double chromosomes in plantlets cells

图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

及植株根的生长均较慢, 可能因秋水仙素的毒害作用所致。多倍体杜鹃兰植株叶片多且质地较硬、颜色加深呈深绿色, 假鳞茎异常膨大(图4-B), 根状茎粗而长(图4-C), 芽分化异常[正常植株(图4-D₁)是从簇状原球茎中分化出多个芽点, 而多倍体植株(图4-D)是从单个假鳞茎生出多个芽], 根粗短且数量少。

讨 论

植物组织培养技术与化学诱变育种技术相结合, 在作物遗传改良方面, 具有易获得试验材料、节省人工和时间、不受外界环境限制、变异率高

表2 秋水仙素不同的质量分数和处理时间对杜鹃兰原球茎分化成苗的影响

Table 2 Effects of regenerated plantlet formation from protocorms by colchicine with different mass fraction and treated time

处理号	秋水仙素质量分数/%	处理时间/d	株高/cm	假鳞茎直径/cm	根数	根长/cm
1	0	1	14.00±0.27 ^a	0.70±0.16 ^b	10.4±1.3 ^{ab}	5.03±0.41 ^a
2		3	13.50±0.21 ^{ab}	0.75±0.20 ^{ab}	10.6±1.2 ^a	4.82±0.19 ^a
3		5	13.11±0.49 ^{bc}	0.81±0.34 ^{ab}	10.3±2.2 ^{ab}	4.70±0.23 ^a
4	0.05	1	12.40±0.19 ^{cd}	0.78±0.14 ^{ab}	5.7±2.0 ^c	3.50±0.32 ^b
5		3	12.08±0.20 ^{de}	0.84±0.16 ^{ab}	5.1±1.6 ^c	2.91±0.19 ^{bc}
6		5	11.90±0.41 ^{de}	0.89±0.08 ^{ab}	5.0±1.8 ^c	2.70±0.19 ^{cd}
7	0.10	1	11.72±0.11 ^{de}	0.83±0.11 ^{ab}	4.9±1.3 ^c	1.90±0.13 ^{de}
8		3	11.31±0.49 ^{ef}	0.90±0.21 ^{ab}	5.2±1.1 ^c	2.43±0.21 ^{cd}
9		5	11.24±0.22 ^{ef}	0.92±0.10 ^{ab}	5.5±1.3 ^c	2.53±0.18 ^{cd}
10	0.15	1	5.93±0.15 ^h	1.00±0.05 ^{ab}	5.1±1.0 ^c	1.55±0.33 ^e
11		3	10.52±0.18 ^{fg}	1.10±0.12 ^{ab}	5.4±1.4 ^c	2.80±0.20 ^{bc}
12		5	10.12±0.23 ^g	1.20±0.08 ^a	6.2±1.2 ^{bc}	3.00±0.48 ^{bc}

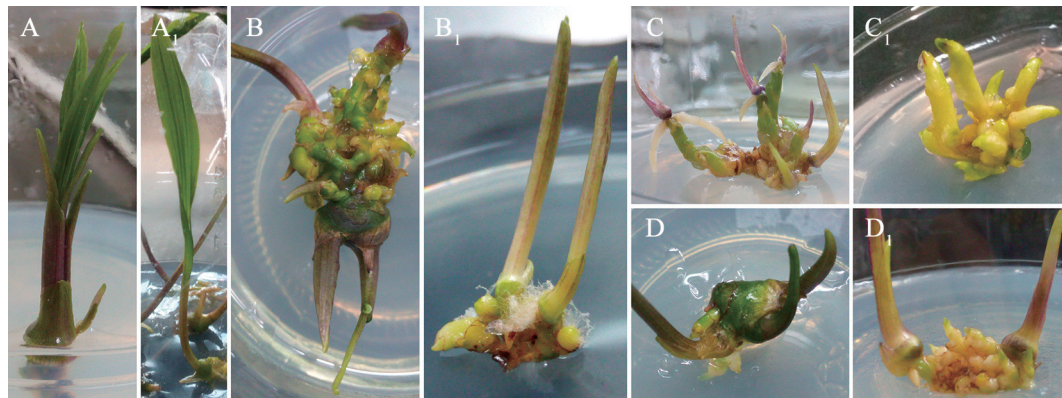


图4 秋水仙素处理对杜鹃兰植株形态的影响

Fig.4 Influence of colchicine treated on plant morphology of *Cremastra appendiculata*

A: 单株多叶; B: 异常膨大的假鳞茎; C: 粗而长的根状茎; D: 异常分化的芽; A₁、B₁、C₁、D₁: 未处理材料。

等优点, 因此具有很大的发展优势(刘进平和郑成木2004; 夏英武1997; 董颖苹等2005)。诱变产生的多倍体植株因其染色体成倍增加, 导致细胞核、细胞及组织器官相继增大, 同时诱发基因的剂量效应和互作效应以打破其生理生化功能的动态平衡, 使植物体的形态特征、发育规律、育性和抗性等一系列的变化(Zhao等2001; Men等2003; Li等2006; 张丹丹等2016), 人们用此特点可从中获得有益性状。

正确选择诱变方法是试验成功与否的关键。影响植物染色体加倍成功(诱导率)的化学诱变因素主要有外植体种类、诱变剂的质量分数及处理时间等(刘文革和阎志红2005; 詹忠根和徐程2011)。幼嫩的组织(如种胚)是较好的诱导材料, 也可采用原生质体、愈伤组织等离体组织材料(张莹2008)。本试验选取杜鹃兰种子萌发的原球茎作为诱变材料, 其细胞分裂较旺盛, 易于吸收秋水仙素, 诱导率相对较高。与其他化学诱变剂相比, 秋水仙素诱导细胞染色体加倍的效果较好, 但由于秋水仙素的毒性较大, 且不同植株对秋水仙素诱变的敏感性不同。因此, 利用秋水仙素诱导不同植物之前必须进行处理浓度和时间的筛选, 否则会抑制植株的生长, 导致死亡率过高。张莹等(2009)采用浸泡法处理石斛, 结果发现其死亡率随秋水仙素浓度及处理时间的增加逐渐上升, 当秋水仙素浓度增加到 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 处理时间上升到24 h时, 死亡率最高(50%), 而本研究中杜鹃兰原球茎的死亡率更高, 达到75.5%。崔广荣等(2010)采用液体

培养方式对蝴蝶兰类原球茎进行秋水仙素处理, 通过筛选秋水仙素的适宜浓度及处理时间, 成功获得了多倍体植株, 最高诱变率达30%, 且嵌合体数很少。本试验也证明了秋水仙素的质量分数和处理时间是影响诱导率的主要因素, 优化秋水仙素的质量分数及处理时间, 既可减小对杜鹃兰原球茎组织细胞的毒害作用, 又能确保原球茎分化成苗。

参考文献

- Cui GR, Zhang ZX, Hu NB, Zhang CY, Hou XL (2010). Tetraploid of *Phalaenopsis* induction via colchicine treatment from protocorm-like bodies in liquid culture. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)*, 36 (1): 49–55 (in Chinese with English abstract) [崔广荣, 张子学, 胡能兵, 张从宇, 侯喜林(2010). 蝴蝶兰类原球茎液体培养中用秋水仙素诱导多倍体. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 36 (1): 49–55]
- Cui GR, Zhang ZX, Zhang CY, Hu NB, Sui YH, Li JQ (2009). Colchicine chemical induction during somatic embryogenesis from leaf segments of *Phalaenopsis* test tube plantlets. *Sci Agric Sin*, 42 (9): 3368–3373 (in Chinese with English abstract) [崔广荣, 张子学, 张从宇, 胡能兵, 隋益虎, 李杰勤(2009). 秋水仙素对蝴蝶兰试管苗叶切片胚状体发生期的化学诱变. *中国农业科学*, 42 (9): 3368–3373]
- Dong YP, Lian Y, He QC, Xu H (2005). Application of plant chemical mutagenesis technology in breeding and development. *Seed*, 24 (7): 54–58 (in Chinese) [董颖苹, 连勇, 何庆才, 徐涵(2005). 植物化学诱变技术在育种中的运用及其进展. *种子*, 24 (7): 54–58]
- Li TX, Wang JK, Bai YF, Lu ZH (2006). Diversity suppressor subtractive hybridization array for profiling genomic DNA polymorphisms. *J Integr Plant Biol*, 48 (4): 460–467
- Liu JP, Zheng CM (2004). Induced mutation in connection with *in vivo*

- tro culture for crop breeding. Acta Agric Shanghai, 20 (1): 19–22 (in Chinese with English abstract) [刘进平, 郑成木(2004). 诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用. 上海农业学报, 20 (1): 19–22]
- Liu WG, Yan ZH (2005). *In vitro* induction of autotetraploids in plants. Chin Bull Bot, 22 (Supple): 29–36 (in Chinese with English abstract) [刘文革, 阎志红(2005). 植物离体组织染色体加倍诱导同源四倍体. 植物学通报, 22 (增刊): 29–36]
- Mao TF, Liu T, Liu ZY, Zhu GS, Huang YH (2007). Rapid propagation of *Cremastra appendiculata* *in vitro*. J Chin Med Mater, 30 (9): 1057–1059 (in Chinese with English abstract) [毛堂芬, 刘涛, 刘作易, 朱国胜, 黄永会(2007). 杜鹃兰离体快繁技术研究. 中草药, 30 (9): 1057–1059]
- Mello e Silva PAKX de, Callegari-Jacques S, Bodanese-Zanettini MH (2000). Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* L. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Cienc Rural, 30 (1): 105–111
- Men SZ, Ming XT, Liu RW, Wei CH, Li Y (2003). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid. Plant Cell Tiss Org, 75: 63–71
- Predieri S (2001). Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tiss Org, 64: 185–210
- Vichiato MRD, Vichiato M, Pasqual M (2007). Tetraploidy induction and identification in *Dendrobium nobile* L. (Orchidaceae). Rev Cienc Agron, 38 (4): 385–390
- Wang LF, Huang J, Lin X (2010). Polyploidy in *Anoectochilus roxburghii* induced by colchicine *in vitro*. Acta Agric Zhejiang, 22 (6): 760–763 (in Chinese with English abstract) [王丽芳, 黄建, 林霞(2010). 秋水仙素离体诱导金线莲多倍体的研究. 浙江农业学报, 22 (6): 760–763]
- Wang MG, Zeng RZ, Xie L, Gao XH, Zhang ZS (2011). *In vitro* polyploid induction and its identification in *Cymbidium sinense*. Chin Agric Sci Bull, 27 (2): 132–136 (in Chinese with English abstract) [王木桂, 曾瑞珍, 谢利, 高许花, 张志胜(2011). 墨兰多倍体的离体诱导和鉴定. 中国农学通报, 27 (2): 132–136]
- Xia YW (1997). Crop Mutation Breeding. Beijing: China Agriculture Press, 24–30 (in Chinese) [夏英武(1997). 作物诱变育种. 北京: 中国农业出版社, 24–30]
- Yang DQ, Zhu XF (1984). The chromosome numbers of 12 species in Orchidaceae from China. Acta Phytotax Sin, 22 (3): 252–255 (in Chinese with English abstract) [杨涤清, 朱燮桴(1984). 十二种国产兰科植物的染色体数目. 植物分类学报, 22 (3): 252–255]
- Zhan ZG, Xu C (2011). Study on colchicoid of *Dendrobium officinale* induced by colchicines. J Zhejiang Uni (Sci Edn), 38 (3): 321–325 (in Chinese with English abstract) [詹志根, 徐程(2011). 秋水仙素诱导铁皮石斛多倍体研究. 浙江大学学报(理学版), 38 (3): 321–325]
- Zhang AM, Chang L, Xue JP (2005). Progress in research on inducing the polyploid of medicinal plants. Chin J Chin Mater Med, 30 (9): 645–649 (in Chinese with English abstract) [张爱民, 常莉, 薛建平(2005). 药用植物多倍体诱导研究进展. 中国中药杂志, 30 (9): 645–649]
- Zhang DD, Wang WH, Li G, Sui JM, Qiao LX, Wang JS, Jiang DF (2016). Chemistry mutagenesis *in vitro* and characteristics of mutants in sweet potato. Plant Physiol J, 52 (3): 343–348 (in Chinese with English abstract) [张丹丹, 王维华, 李冠, 隋炯明, 乔利仙, 王晶珊, 姜德锋(2016). 甘薯化学离体诱变及突变体的性状表现. 植物生理学报, 52 (3): 343–348]
- Zhang MS, Peng SW, Wang W (2010). Macro research on growth and development of *Cremastra appendiculata* (D. Don.) Makino (Orchidaceae). J Med Plant Res, 4 (18): 1837–1842
- Zhang MS, Wu SJ, Jie XJ, Zhang LX, Jiang XH, Du JC, Qi JL, Liu Z, Yang YH (2006). Effect of endophyte extract on micropropagation of *Cremastra appendiculata* (D. Don.) Makino (Orchidaceae). Propag Ornament Plant, 6 (2): 83–89
- Zhang Y (2008). Establishment of plant regeneration system and the study of polyploidy induction of *Dendrobium* (Master's thesis). Beijing: Chinese Academy of Forestry (in Chinese with English abstract) [张莹(2008). 石斛再生体系的建立及多倍体诱导的初步研究(硕士论文). 北京: 中国林业科学研究院]
- Zhang Y, Wang Y, Li ZJ (2009). Primary study on polyploid of *Dendrobium* hybrid induced by colchicines. J Nucl Agric Sci, 23 (3): 413–417 (in Chinese with English abstract) [张莹, 王雁, 李振坚(2009). 秋水仙素诱导石斛多倍体的初步研究. 核农学报, 23 (3): 413–417]
- Zhao W, Ye Q, Tan X (2001). Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. J Nat Prod, 64 (9): 1196–1200
- Zhou SS, Xie L, Wang CH, Zhou YL, Zeng RZ, Guo HR, Wang MG, Zhang ZS (2015). Effects of environmental stress on proliferation and differentiation of protocorm-like bodies of different ploidy *cymbidium* hybridum. Plant Physiol J, 51 (8): 1265–1272 (in Chinese with English abstract) [周珊珊, 谢利, 王辰辉, 周玉亮, 曾瑞珍, 郭和蓉, 王木桂, 张志胜(2015). 环境胁迫对不同倍性大花蕙兰类原球茎增殖和分化的影响. 植物生理学报, 51 (8): 1265–1272]

Colchicine induce polyploid from protocorm of *Cremastra appendiculata*

WU Yan-Qiu, YE Rui-Hua, LÜ Xiang, WANG Wang-Zhong, ZHANG Ming-Sheng*, LIU Jian-Dong

School of Life Sciences, Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: The protocorms of *Cremastra appendiculata* were treated with colchicine for ployploid induction. The effects on the growth and shoot regeneration of *C. appendiculata* protocorms by colchicine treatment with different mass fraction and processing time were examined. The morphological characters of the normal and variant plantlets were compared, and the chromosome ploidy of root tip cells were identified. The results showed that toxicity of colchicine was larger for the protocorms of *C. appendiculata*, and the survival rate of protocorms were decreased obviously with the increase of mass fraction of colchicines and treated time. The induction rates of polyloid were different for different treatments, the highest induction rate was 20%. Morphologically, the polyploid plantlets were stouter than normal plantlets, with harder leaves, bigger pseudobulbs, fewer and shorter roots.

Key words: *Cremastra appendiculata*; protocorm; colchicine; chemical induction; polyploid

Received 2016-10-28 Accepted 2017-01-10

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 81360613 and 81660627), the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2016YFC0502604), the Project of High-level Innovative Talents in Guizhou (Grant No. 2015-4031), the Innovation Talents Team Construction of Science and Technology in Guizhou (Grant No. 2016-5624) and the Major Research Project of Innovation Group in Guizhou (Grant No. 2016-023).

*Corresponding author (E-mail: mszhang@guz.edu.cn).