

王玉英,李光宏,李志敏,等. 野生黄蝉兰多倍体诱导初报[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):132-134.

野生黄蝉兰多倍体诱导初报

王玉英¹, 李光宏², 李志敏², 李枝林^{1,3}

(1. 云南农业大学园林园艺学院花卉研究所, 云南昆明 650201; 2. 大理兰国花业发展有限公司, 云南大理 671003;
3. 生物多样性与云南特色农业协同创新中心, 云南昆明 650201)

摘要:以野生黄蝉兰无菌苗的丛生芽为供试材料, 分别用浓度为 0.008%、0.010%、0.030%、0.060%、0.120%、0.150%、0.200% 的秋水仙素对其处理 24、48、72 h。结果表明, 以 0.06% 秋水仙素处理 72 h 的诱导效果最佳, 诱导变异率达 62.5%, 死亡率为 22.5%; 多倍体黄蝉兰材料在形态上出现叶色深绿、植株粗壮和叶片增厚等优良性状, 同时气孔和染色体数目都有明显变化, 可作为新材料加以利用。

关键词:野生黄蝉兰; 秋水仙素; 多倍体诱导

中图分类号: S682.310.36 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0132-03

黄蝉兰(*Cymbidium iridioides* D. Don)为兰科兰属大花亚属的植物。根据陈心启等的分类, 大花亚属包括黄蝉兰、虎头兰、碧玉兰、长叶兰、沉香虎头兰、文山红柱兰等^[1]。黄蝉兰属附生, 假鳞茎椭圆形至狭卵形, 长 4~11 cm、宽 2~5 cm, 总状花序, 具 3~17 朵花; 花苞片近三角形, 长 2~3 mm; 花梗和子房长 4.0~4.5 cm; 花较大, 直径达 10 cm, 有香气; 花期 8—12 月, 果期 11 月。它产于我国西南山区高海拔处, 如云南贡山、福贡、盈江、腾冲、龙陵、德钦、临沧、云县、景东、勐海、建水、元阳、绿春、屏边、麻栗坡、砚山等地, 附生于海拔 750~2 500 m 的常绿阔叶林中的树上或岩石上, 分布于我国西藏东南部(察隅)、四川西南部以及尼泊尔、不丹、锡金、印度东北部、缅甸北部。它与虎头兰的最大区别是花期不同, 虎头兰一般在 1 月左右开花, 黄蝉兰花形较虎头兰严整, 花色、花朵与虎头兰相似^[2]。该类兰以其花色调不同又可分为黄蝉兰、青蝉兰、红蝉兰和朱砂蝉兰, 较适合作育种亲本

或切花材料, 具有较高的应用价值和开发价值。

兰花生长周期长, 繁殖系数低, 在育种过程造成了相当程度的阻力。近年来, 利用多倍体育种已培育出许多兰花新品种。通常多倍体植物具有植株粗壮、花朵硕大、花色艳丽、叶质增宽增厚、适应性增强及次生代谢物积累量高等特点。秋水仙素诱变的多倍体有四倍体、六倍体、八倍体等^[3]。目前, 已有春兰^[4]、沉香虎头兰^[5]、墨兰×大花蕙兰的 F₁ 代^[6]、素心黄^[7]、寒兰^[8]、杂交兰根状茎^[3]、大花蕙兰红宝石原球茎^[9]和野生碧玉兰^[10]等兰属植物多倍体诱导的报道, 而野生黄蝉兰的倍性育种尚未见报道。本研究建立在组织培养的基础上, 通过秋水仙素诱导形成多倍体植株, 以期为黄蝉兰多倍体育种提供科学依据和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生黄蝉兰收集于云南省文山州马关县, 并在云南农业大学花卉研究所兰花资源圃中驯化栽培 2 年以上; 选用前期研究培养出的种子无菌萌发试管苗, 以后代遗传性状稳定的丛芽作为供试材料。试验于 2010 年在云南农业大学花卉研究所实验室内进行。

1.2 方法

1.2.1 多倍体的诱导 配制浓度为 0.008%、0.010%、0.030%、0.060%、0.120%、0.150%、0.200% 的秋水仙素溶液, 高压灭菌。取健康、长势相对一致的新生丛生芽, 在无菌

的比较[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(6): 1508-1510.

[3] 汪越胜, 盖钧镒. 中国春播大豆熟期组地理分布的研究[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(3): 24-27.

[4] 杨琪, 王金陵. 大豆品种表现型与配合力的相关分析[J]. 中国油料, 1994, 16(1): 60-62.

[5] 汪越胜, 汪鸣, 阚显照, 等. 长江中下游大豆熟期组归属及地理分布[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2000, 21(4): 13-16.

[6] 郝瑞莲. 夏大豆主要农艺性状的灰色关联度分析[J]. 大豆通报, 2002(2): 11-12.

[7] 张富厚, 郑跃进, 王黎明. 河南省夏大豆主要农艺性状的灰色关联度分析[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 4842-4843.

收稿日期: 2013-11-16

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30160074); 科技部成果转化项目(编号: 2012GB2F300423); 云南省自然科学基金重点项目(编号: 2002C0003P); 云南省重点新产品开发项目(编号: 2012BB008)。

作者简介: 王玉英(1980—), 女, 云南大理人, 博士, 讲师, 主要从事植物资源的利用和创新研究。E-mail: wyysxp@126.com。

通信作者: 李枝林, 教授, 主要从事观赏植物资源利用及创新研究。E-mail: lzl-yn@sohu.com。

综合各品种收获期、籽粒大小、产量等相关因素, 通选 526 和九天 701 比较适合设施大棚栽培, 可以利用这 2 个品种进一步深入研究设施栽培技术, 达到收获更早、产量更高、品质更优的目的。另外, 鲜食大豆育种时, 可优先考虑单株荚质量、百粒质量等性状的选择, 以期获得高产。

参考文献:

[1] 唐明霞, 袁春新, 陈惠, 等. 真空渗糖对冷冻菜用大豆部分玻璃化转变温度和硬度的影响[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(3): 685-687.

[2] 陈华涛, 陈新, 顾和平, 等. 不同基因型菜用大豆品质构成因子

条件下浸泡在经灭菌的秋水仙素溶液中,分别处理 24、48、72 h。处理后用无菌水冲洗 3~4 次,在无菌的滤纸上吸干水分,转入最佳复壮培养基(1/2MS + 2.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 8% 香蕉泥,pH 值 5.8)上,于(25±1)℃下光照培养,处理 40 d 观察苗体的死亡情况,处理 90 d 观察苗体的变异情况,每隔 50 d 转接 1 次,进行相关统计。

1.2.2 多倍体的鉴定

1.2.2.1 形态学观察 根据多倍体植株与二倍体植株在叶形、叶色、株形、株色、生长势上呈现出的差异,对变异植株进行初选。对黄蝉兰叶的长与宽进行测量,各检测 20 株。

1.2.2.2 气孔鉴定 气孔大小与植株倍性呈正相关,气孔密度与植株倍性呈负相关,以该特性作为多倍体初步鉴定的方法之一。取二倍体植株和变异植株叶片,平均分成上、中、下 3 个部分,撕取叶片下表皮,在显微镜下观察。采用目镜测微尺测定气孔的长径、短径,用椭圆面积近似公式($S = \text{长径} \times \text{短径}$)计算气孔的面积,各检测 30 个。

1.2.2.3 染色体鉴定 兰科植物具有粗大的根系,根被厚厚的海绵状的白色根被所覆盖,中央有 1 个维管组织的髓部。根据该特点采用以下制片方案。

取材时间和取材部位:根据经验,09:50—10:15 取材染色体中期分裂较旺盛。取材部位为健壮植株刚刚长出根的幼嫩根尖组织。(1)预处理液的比较。将取出的长度为 0.5 cm 的根尖放入口径为 5 cm 的小瓶中,分别加入 0.002 mol/L 8-羟基喹啉和 0.1% 秋水仙素 2 种预处理液,于常温下预处理 7 h 左右,洗涤后转入 Carony's 液(乙醇与乙酸体积比 3:1)中,置于冰水中固定半小时,取出瓶后放入 60℃ 1 mol/L HCl 中水解 6 min。水解时间过长,细胞质不着色,染色体染色较浅,只有在水解时间适宜时才可获得染色体呈深红色或紫红色,细胞质无色或只有极浅淡的红色^[11]。(2)染色。用蒸馏水清洗 3~5 次解离过的材料(如果清洗不干净,则染色效果较差,影响拍摄效果),按材料的多少,加入一定量的卡宝品红液,直到淹没瓶中的根尖,约半小时后可压片。(3)压片。采用常规压片法,取处理过的根尖于载玻片上,滴 1 滴卡宝品红液,盖上盖玻片,用解剖针轻敲大团根尖,使其分散,再用叠好的滤纸按住盖玻片的对角,用橡皮头轻敲团状物,使细胞均匀分散,将滤纸放在盖玻片上,用拇指紧按住滤纸一端,另一拇指垂直地按住盖玻片,以使细胞平整。(4)镜检。将做好的切片放于 B203/B203LED 型双目生物显微镜下观察染色体分散情况,记录并摄像。

2 结果与分析

2.1 不同秋水仙素浓度和处理时间诱变黄蝉兰的效果

变异指标以气孔增大为标准。由表 1 可知,0.008%~0.200% 秋水仙素处理 24~72 h 均能不同程度地诱导出黄蝉

表 1 不同秋水仙素浓度和处理时间对黄蝉兰多倍体诱导的影响

浓度 (%)	处理时间 (h)	处理苗数 (个)	死亡数 (个)	死亡率 (%)	变异数 (个)	变异率 (%)
0	24	40	0	0	0	0
	48	40	0	0	0	0
	72	40	0	0	0	0
0.008	24	40	0	0	1	2.5
	48	40	0	0	2	5.0
	72	40	2	5.0	2	5.0
0.010	24	40	1	2.5	9	22.5
	48	40	0	0	10	25.0
	72	40	3	7.5	12	30.0
0.030	24	40	6	15.0	10	25.0
	48	40	6	15.0	13	32.5
	72	40	7	17.5	14	35.0
0.060	24	40	7	17.5	19	47.5
	48	40	8	20.0	20	50.0
	72	40	9	22.5	25	62.5
0.120	24	40	10	25.0	19	47.5
	48	40	13	32.5	20	50.0
	72	40	17	42.5	21	52.5
0.150	24	40	19	47.5	19	47.5
	48	40	20	50.0	19	47.5
	72	40	22	55.0	16	40.0
0.200	24	40	22	55.0	15	37.5
	48	40	24	60.0	16	40.0
	72	40	26	65.0	13	32.5

兰多倍体。黄蝉兰对一定范围内秋水仙素的浓度较敏感,浓度为 0.010%~0.060% 时,随着浓度的增加,丛芽的死亡率出现了递增现象,变异率也升高;当浓度>0.060% 时,死亡率大幅度增加,与其他浓度相比多倍体的诱导效果更佳,但在后期的继代培养中发现,这部分变异苗长势相当滞后。秋水仙素具有较强的毒性,植物在高浓度和长时间处理下,诱导效果虽然会在一定程度上比低浓度、短时间的处理好,但细胞受到的毒害程度也会相应加深,甚至会导致植株死亡。因此,利用秋水仙素对植物进行多倍体诱导时,筛选适当时间及浓度以获得最好的诱导效果和最低的死亡率显得尤为重要。综合考虑,以 0.060% 秋水仙素处理 72 h 的诱导效果最佳,此时死亡率为 22.5%,变异率高达 62.5%。

2.2 多倍体鉴定结果

2.2.1 形态学观察结果 由表 2 可知,黄蝉兰变异植株的叶片数、叶长和叶宽分别较二倍体植株极显著增加 20.2%、80.4%、42.3% ($P<0.01$)。二倍体植株叶片长势正常,叶色淡绿、全缘;而多倍体变异植株叶色深绿,部分叶片呈现中部较宽、叶型扭曲、叶尖分叉、叶片肥厚和叶缘有锯齿的特点。说明经不同浓度秋水仙素处理过的黄蝉兰组培苗叶片形态变异效果明显,叶片形态指标作为本研究检验变异苗的最初手段是可行的。

表 2 黄蝉兰二倍体与多倍体植株叶片外部形态比较结果

植株	叶片数(张)	叶长(cm)	叶宽(cm)	叶片形态	叶片特征
二倍体	5.45±0.60	1.99±0.41	0.52±0.09	正常	叶色淡绿、全缘
多倍体	6.55±0.69*	3.59±0.80*	0.74±0.10*	叶片中部较宽、叶型扭曲,叶尖分叉、叶片肥厚	叶色深绿、叶缘有锯齿

注: * 表示在 0.01 水平差异显著。

2.2.2 气孔鉴定结果 由表 3 可知,黄蝉兰变异株叶片的气孔长径、气孔短径和面积分别极显著高于二倍体植株

21.4%、8.44%、31.6% ($P < 0.01$);二倍体植株叶片气孔单位面积数量较多、较小,而多倍体植株叶片中气孔数量较少、相对较大。2 种材料气孔差异明显,再结合前面的形态差异,已经能够初步断定出变异苗体。

表 3 黄蝉兰二倍体与多倍体植株气孔特征比较结果

植株	气孔长径 (μm)	气孔短径 (μm)	面积 (μm^2)	单位面积 气孔分布
二倍体	134.3 \pm 7.2	107.8 \pm 6.6	14 484 \pm 1 117.6	小而密
多倍体	163.1 \pm 6.9 *	116.9 \pm 6.9 *	19 061 \pm 1 293.7 *	大而稀

注同表 2。

2.2.3 染色体鉴定结果

2.2.3.1 预处理效果比较结果 由表 4 可知,0.002 mol/L 8-羟基喹啉和 0.100% 秋水仙素对黄蝉兰根尖的预处理效果存在一定差异,但不明显。预处理液的作用是使进入分裂中期的染色体不能进入分裂后期,以便积累大量处于分裂中期的染色体。0.100% 秋水仙素指数往往比对照高几倍甚至十几倍。因此,本试验采用 0.100% 秋水仙素作为预处理液。

表 4 2 种预处理液对黄蝉兰细胞分裂的效果

处理液	取材时间	细胞分裂数 (个)
0.100% 秋水仙素	09:50—10:15	19
0.002 mol/L 8-羟基喹啉	09:50—10:15	13

2.2.3.2 压片镜检结果 通过染色体压片体系的建立、对初步筛选出的变异株用常规压片法进行染色体鉴定,结果发现,经秋水仙素处理的试管苗染色体数目发生改变。黄蝉兰二倍体细胞染色体数目为 $2n = 2x = 40$,诱导后的材料除出现大量四倍体 ($2n = 4x = 80$) 细胞外,还发现 60 ~ 125 条染色体数目不等的细胞类型。对变异材料第 1 次转接后,进行染色体镜检,结果发现一个根尖细胞中染色体数目类型较多;第 2、第 3 次转接后,变异的根尖细胞中出现了大量的四倍体(表 5)。染色体压片镜检结果与外形检测、气孔检测的结果基本相符,仅存在较小差异。

表 5 黄蝉兰变异材料染色体数目分布情况

序号	染色体数目(条)	比例(%)		
		<80	80	>80
1	63(5)、65(2)、71(1)、80(2)	80.0	20.0	0.0
2	63(2)、67(3)、80(6)、125(3)	35.7	42.9	21.4
3	64(1)、67(3)、80(5)、91(1)	40.0	50.0	10.0

注:括号内的数字为细胞数目。

3 结论与讨论

秋水仙素对细胞有毒害作用,经其处理的材料前期生长缓慢,这种毒害作用随着处理浓度的增加或时间的延长而加剧,从而使细胞死亡率增加。因此,要掌握合适的处理浓度和时间才能获得最好的加倍效果。李涵等对沉香虎头兰新幼芽进行多倍体诱导,发现 0.05% 秋水仙素处理 72 h 效果最好,变异率为 74%,死亡率为 20%^[5]。李雪娇等对碧玉兰丛生芽进行多倍体诱导,发现 0.04% 秋水仙素处理 72 h 效果最好,

诱导变异率达 60%,死亡率为 30%^[10]。尹翠翠等对杂交兰 F_1 代的根状茎进行诱导,发现 0.10% 秋水仙素处理 48h 诱导效果最佳,变异率为 36%,死亡率为 8%^[3]。本研究结果表明,用 0.060% 秋水仙素处理 72 h 对黄蝉兰的诱导效果最佳,变异率高达 62.5%,死亡率仅为 22.5%,说明秋水仙素能有效诱导黄蝉兰多倍体。

在植物组织器官发育过程中,具有分裂功能的体细胞受到秋水仙素等化学处理或光、热等物理处理或自然环境的变化,都可促使部分细胞突变,这种变异细胞和未突变的正常细胞可以形成一个共同的植物生长点原基,进而形成特有的植物嵌合体现象^[12]。Norris 等在试验中发现,嵌合体中不同层次的细胞在培养过程中可以共同发育成一个生长原基,从而实现母体型嵌合体的复制,但在大多数情况下,通过组织培养进行不断分离纯化获得的嵌合体株率是很低的^[13]。不同诱导材料对秋水仙素的敏感程度有较大差异^[11]。郑思乡等用秋水仙素处理苎麻的丛生芽,获得 94% 四倍体^[14]。本研究将变异材料的丛芽进行不断的分离纯化,从而获得较高概率的四倍体植株,且在后代中表现稳定。

参考文献:

[1] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社,1997:80.

[2] 陈心启. 中国植物志:第十八卷[M]. 北京:科学出版社,1999:202.

[3] 尹翠翠,张 燕,张景华,等. 秋水仙素诱导杂交兰四倍体及倍性鉴定[J]. 核农学报,2010,24(3):518-521.

[4] 林 芬,邓国础. 春兰人工诱变的研究[J]. 湖南农业大学学报,1997,3(4):39-43.

[5] 李 涵,龙春林,郑思乡,等. 沉香虎头兰多倍体诱导及其鉴定[J]. 园艺学报,2005,32(5):853-853.

[6] 张志胜,谢 利,萧爱兴,等. 秋水仙素处理兰花原球茎对其生长和诱变效应的影响[J]. 核农学报,2005,19(1):19-23.

[7] 邓 樱,周晔,陈继敏. 秋水仙素诱导兰属“素心黄”多倍体的方法研究[J]. 亚热带植物科学,2008,37(2):38-40.

[8] Kim M, Yang W J, Hoon S C, et al. Polyploidy induction of *Cymbidium kanran* by treatment of colchicine *in vitro*[J]. Journal of Horticulture Science,1997,39(1):73-76

[9] 杨丽娟,高素萍,邹宗兰. 秋水仙素离体诱导大花蕙兰多倍体试验[J]. 中国种业,2008(12):60-61.

[10] 李雪娇,李枝林,黄丽萍. 野生碧玉兰多倍体诱导及鉴定[J]. 中国农学通报,2010,26(13):261-266.

[11] 谭德冠,庄南生,黄华孙. 组织培养与秋水仙碱诱导相结合培育植物多倍体的应用[J]. 亚热带植物科学,2005,34(1):77-80.

[12] 李明银,何云晓. 植物遗传嵌合体及其在观赏植物育种中的应用[J]. 植物学通报,2005,22(6):641-647.

[13] Norris R E, Smith R H, Vaughn K C. Plant chimeras used to establish the de novo origin of shoots[J]. Science,1983,220(4592):75-76.

[14] 郑思乡,罗慧敏,董延瑜,等. 组织培养在苎麻多倍体研究中的应用初报[J]. 湖南农业大学学报,1995,21(4):361-365.