

罗远华,方能炎,樊荣辉,等. 兰科植物多倍体诱导研究进展[J]. 江苏农业科学,2022,50(1):6-13.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.01.002

兰科植物多倍体诱导研究进展

罗远华,方能炎,樊荣辉,黄敏玲

(福建省农业科学院作物研究所/福建省农业科学院花卉研究中心/福建省特色花卉工程技术研究中心,福建福州 350013)

摘要:总结近 20 年来兰科植物多倍体诱导的研究进展,对诱导方法中诱变材料与诱变剂种类的选择、处理方法、诱变剂浓度与处理时间,鉴定方法中的形态学鉴定、细胞学鉴定、染色体计数鉴定及流式细胞术鉴定等进行了综述,从提高观赏性、克服远缘杂交障碍、提高抗逆性与次生代谢物质含量等方面阐述了兰科植物多倍体诱导的意义,并对多倍体诱导中嵌合体的分离、多倍体的繁殖等主要问题进行了讨论,以期为今后兰科植物多倍体育种提供参考。

关键词:兰科;多倍体;诱导;鉴定;嵌合体分离

中图分类号:S682.310.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)01-0006-08

兰科 (Orchidaceae) 植物是开花植物中仅次于菊科 (Asteraceae) 的第二大科,目前已确认的有 736 属 28 000 种^[1],广泛分布于除两极和干旱沙漠地区以外的区域,主要生长于热带和亚热带地区。兰科植物不仅具有极高的观赏价值,不少种类如铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*)、金线莲 (*Anoectochilus roxburghii*) 等也具有较高的药用价值^[2]。

收稿日期:2021-05-08

基金项目:福建省属公益类科研院所基本科研专项(编号:2020R1031009);福建省农业科学院科研资助项目(编号:A2017-6)。

作者简介:罗远华(1981—),男,重庆人,硕士,助理研究员,主要从事花卉栽培与育种等研究工作。E-mail:luoyh426@163.com。

通信作者:黄敏玲,研究员,主要从事花卉育种与生物技术等研究工作。E-mail:837223458@qq.com。

多倍体是指体细胞中含有 3 个或者 3 个以上完整染色体组的生物体,多倍体现象在高等植物中普遍存在,是驱动植物进化和物种形成的主要动力之一^[3-5]。多倍体育种手段比较简单,育出的品种不仅在表型性状、次生代谢物的积累以及抗逆性等方面具有较多的优点,而且还能有效克服远缘杂交不亲和等特点,因此应用较为广泛^[6]。多倍体现象在兰科植物中普遍存在^[7],但自然加倍的发生频率低,难以满足生产实践。近年来,国内外在兰科植物多倍化研究方面较为深入和广泛。到目前为止,已开展了兰科植物中至少 16 个属的人工诱导多倍体研究(表 1),部分诱导获得的多倍体已在生产中得到应用。本文主要总结了近 20 年来兰科植物多倍体诱导的研究进展,旨在为兰科植物多倍体育种提供参考。

toxicity through modulating antioxidative enzymes and enhancing organic acid anion exudation in soybean [J]. Functional Plant Biology, 2017, 44(10):961-968.

[54] Ulhassan Z, Huang Q A, Gill R A, et al. Protective mechanisms of melatonin against selenium toxicity in *Brassica napus*: insights into physiological traits, thiol biosynthesis and antioxidant machinery [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1):507.

[55] Zhu Z Q, Lee B. Friends or foes: new insights in jasmonate and ethylene co-actions [J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(3):414-420.

[56] 刘建龙. 外源褪黑素对梨果实发育、采后品质和抗轮纹病的影响及其调控机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2019.

[57] 殷丽华. 苹果属资源对苹果褐斑病的抗性机理及抗性诱导研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2013.

[58] Li C, He Q L, Zhang F, et al. Melatonin enhances cotton immunity to *Verticillium* wilt via manipulating lignin and gossypol biosynthesis

[J]. The Plant Journal, 2019, 100(4):784-800.

[59] Gao S W, Ma W Y, Lyu X N, et al. Melatonin may increase disease resistance and flavonoid biosynthesis through effects on DNA methylation and gene expression in grape berries [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1):231.

[60] Li T T, Wu Q X, Zhu H, et al. Comparative transcriptomic and metabolic analysis reveals the effect of melatonin on delaying anthracnose incidence upon postharvest banana fruit peel [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1):289.

[61] Byeon Y, Tan D X, Reiter R J, et al. Predominance of 2-hydroxymelatonin over melatonin in plants [J]. Journal of Pineal Research, 2015, 59(4):448-454.

[62] Lee K, Zawadzka A, Czarnocki Z, et al. Molecular cloning of melatonin 3-hydroxylase and its production of cyclic 3-hydroxymelatonin in rice (*Oryza sativa*) [J]. Journal of Pineal Research, 2016, 61(4):470-478.

表 1 2000—2020 年已诱导获得多倍体的主要兰科植物

属	种类	年份
开唇兰属 <i>Anoectochilus</i>	金线莲 <i>A. roxburghii</i>	2016 ^[8-9] 、2015 ^[10] 、2010 ^[11-12]
竹叶兰属 <i>Arundina</i>	竹叶兰 <i>A. graminifolia</i>	2019 ^[13]
白芨属 <i>Bletilla</i>	白芨 <i>B. striata</i>	2018 ^[14]
虾脊兰属 <i>Calanthe</i>	<i>C. discolor</i> × <i>C. sieboldii</i> 杂种 F ₁	2014 ^[15]
卡特兰属 <i>Cattleya</i>	早花卡特兰 <i>C. intermedia</i>	2000 ^[16]
兰属 <i>Cymbidium</i>	杂交兰“黄金小神童” <i>Cymbidium</i> . Golden Elf ‘Sundust’	2018 ^[17]
	墨兰“绿墨素” <i>C. sinense</i> ‘Lvmosu’ × 蕙兰“世界和平” <i>C. hybridum</i> ‘Shijieheping’ 杂种 F ₁	2018 ^[18]
	大花蕙兰 <i>Cymbidium</i> Mystery Island ‘Silk Road’/ <i>C.</i> Showgirl ‘Silky’	2015 ^[19]
	大花蕙兰“红瀑布” <i>C. hybridum</i> ‘Hongpubu’	2011 ^[20]
	大花蕙兰“日出” <i>C. hybridum</i> ‘Sunrise’	2010 ^[21]
	碧玉兰 <i>C. lowianum</i>	2010 ^[22]
	杂交兰“韩国桃花” <i>Cymbidium</i> ‘Hanguotaohua’ × 蕙兰 <i>C. faberi</i> 杂种 F ₁	2010 ^[23]
	大花蕙兰“红宝石” <i>Cymbidium</i> Ruby Shower ‘Murasakin Okimi’	2009 ^[24]
	兰属“素心黄” <i>Cymbidium</i> ‘Suxinhuang’	2008 ^[25]
	蕙兰 <i>C. faberi</i>	2008 ^[26]
	沉香虎头兰 <i>C. iridioides</i>	2005 ^[27]
	大花蕙兰 <i>C. hybrid</i>	2003 ^[28]
	火鸟石斛 <i>Dendrobium</i> Stardust ‘Fire Bird’	2020 ^[29]
石斛属 <i>Dendrobium</i>	华石斛 <i>D. sinense</i>	2017 ^[30]
	黑喉石斛 <i>D. ochreatum</i>	2017 ^[31]
	铁皮石斛 <i>D. officinale</i>	2016 ^[32] 、2013 ^[33-34] 、2011 ^[35-36]
	大苞鞘石斛 <i>D. wardianum</i>	2015 ^[37]
	<i>Dendrobium</i> ‘GattonSun Ray’	2011 ^[38]
	<i>Dendrobium</i> Snowflake ‘Red Star’ × <i>D.</i> Whiterabbit ‘Sakurahime’ 杂种 F ₁	2009 ^[39]
	秋石斛“索尼亚” <i>D. hybrida</i> ‘Sonia’	2009 ^[40]
	<i>Dendrobium</i> Utopia ‘Messenger’ × <i>Dendrobium</i> Whiterabbit ‘Sakurahime’ 杂种 F ₁	2008 ^[41]
	<i>Dendrobium</i> Snowflake ‘Redstar’ × <i>Dendrobium</i> Whiterabbit ‘Sakurahime’ 杂种 F ₁	2008 ^[42]
	齿瓣石斛 <i>D. devonianum</i>	2005 ^[43]
树兰属 <i>Epidendrum</i>	<i>Epidendrum</i> ‘Helen’s Pride’	2011 ^[38]
新堇兰属 <i>Ionopsis</i>	拟堇花兰 <i>I. utricularioides</i>	2012 ^[44]
花猫兰属 <i>Odontioda</i>	<i>Odontioda</i> ‘Emma Sander’	2011 ^[38]
文心兰属 <i>Oncidium</i>	文心兰“甜蜜蜜” <i>Oncidium</i> Wilson Topic Breeze ‘Breeze Everglades’	2013 ^[45]
	文心兰“金西” <i>Oncidium</i> ‘Kinsei’	2010 ^[46]
	<i>O. flexuosum</i>	2009 ^[47]
蝴蝶兰属 <i>Phalaenopsis</i>	<i>P. bellina</i>	2011 ^[38]
	条纹花系“霍娅淑女” <i>Phalaenopsis</i> ‘Tsuei Foa Lady’	2010 ^[48]
	迷你花系蝴蝶兰 <i>P. hybrid</i>	2008 ^[49]
鹤顶兰属 <i>Phaius</i>	鹤顶兰 <i>P. tankervilleae</i>	2013 ^[50]
独蒜兰属 <i>Pleione</i>	秋花独蒜兰 <i>P. maculata</i>	2010 ^[51]
兜兰属 <i>Paphiopedilum</i>	紫毛兜兰 <i>P. villosum</i>	2019 ^[52]
苞舌兰属 <i>Spathoglottis</i>	紫花苞舌兰 <i>S. plicata</i>	2017 ^[53]

1 兰科植物多倍体诱导

1.1 诱变材料的选择

兰科植物同其他植物一样,在诱导多倍体时应

选择分裂旺盛的组织作为诱变材料,主要有种子、胚状体、原球茎、类原球茎、根状茎、茎尖、不定芽、丛生芽、带节茎段等(表 2)。诱变材料在很大程度上决定了诱变的效率,因此须要根据种类的不同选

择适宜的诱变材料。相同材料由于诱变材料的差异也会影响诱导率,筛选适宜的诱变材料是成功获得多倍体的基础。以秋水仙素(colchicine)为诱导剂进行浸泡处理诱导铁皮石斛(*D. officinale*)多倍体研究时,张静静分别以种胚、类原球茎、带节茎段为材料,诱导率分别为 40.0%、40.0%、30.0%^[34];吴睿以原球茎和丛生芽为材料,再生植株多倍体诱导率分别为 16.7%、13.3%^[32];张青华等以类原球茎、丛生芽为材料,诱导率分别为 26.0%、48.0%^[36]。

1.2 诱变剂种类的选择

多倍体化学诱导的原理是利用抗微管药物与分裂细胞的微管蛋白结合,迫使细胞有丝分裂中断,使姐妹染色单体不能移向细胞两级,从而产生染色体组数加倍的细胞。在兰科植物多倍体诱导中,秋水仙素的应用最为广泛(表 2)。但秋水仙素诱导染色体加倍时需要较高的浓度,因此对植物材料的伤害较大,且价格较昂贵,因此育种专家们一直在尝试使用其他诱变剂。

表 2 兰科植物多倍体诱导研究进展

材料类型	种类	处理方法	诱导剂	浓度 (g/L)	时间	诱导率 (%)	参考文献
种子	虾脊兰杂种 F ₁	浸泡法	秋水仙素	0.1	7 d	81.0	[15]
	铁皮石斛	浸泡法	安磺灵	0.03	1 d	86.0	[15]
		混培法	秋水仙素	0.05	120 d	50.0	[34]
薄层细胞	紫花苞舌兰	混培法	秋水仙素	0.4	20 d	17.0	[53]
	紫花苞舌兰	滴液法	秋水仙素	3.0	30 d	27.8	[53]
种胚	铁皮石斛	浸泡法	秋水仙素	3.0	36 h	40.0	[34]
胚状体	拟堇花兰	浸泡法	秋水仙素	0.2	2 d	8.5	[44]
原球茎	华石斛	混培法	秋水仙素	1.0	8 d	22.0	[30]
		混培法	安磺灵	0.02	4 d	35.0	[30]
	秋石斛“索尼亚”	混培法	秋水仙素 + 安磺灵	0.100 + 0.005	8 ~ 10 d	90.0	[40]
	铁皮石斛	浸泡法	秋水仙素	0.000 6	30 min	16.7	[32]
		浸泡法	秋水仙素	2.0	36 h	20.0	[33]
		浸泡法	秋水仙素	0.5	10 d	50.0	[35]
	石斛“Gatton Sun Ray”	浸泡法	安磺灵	0.005	6 d	30.0	[38]
	花猫兰“Emma Sander”	浸泡法	安磺灵	0.005	6 d	20.0	[38]
	树兰“Helen’s Pride”	浸泡法	安磺灵	0.02	6 d	20.0	[38]
	蝴蝶兰	浸泡法	安磺灵	0.005	3 d	30.0	[38]
	鹤顶兰	浸泡法	秋水仙素	0.2	6 d	22.5	[50]
	大苞鞘石斛	浸泡法	秋水仙素	1.0	12 h	26.0	[37]
		混培法	秋水仙素	3.0	30 d	34.0	[37]
	黑喉石斛	浸泡法	秋水仙素	0.1 ~ 1.0	2 ~ 3 d	70.0 ~ 80.0	[31]
	墨兰杂种 F ₁	浸泡法	秋水仙素	0.3	72 h	36.0	[18]
	兰属“素心黄”	混培法	秋水仙素	0.05	3 d	16.7	[25]
	竹叶兰	浸泡法	秋水仙素	1.0	12 h	23.3	[13]
		混培法	秋水仙素	0.5	30 d	21.7	[13]
	白芨	浸泡法	秋水仙素	2.0	36 h	26.7	[14]
类原球茎	早花卡特兰	浸泡法	秋水仙素	0.5	4 d	29.0	[16]
	铁皮石斛	浸泡法	秋水仙素	2.0/3.0	48 h/12 h	40.0	[34]
		浸泡法	秋水仙素	0.4	24 h	26.0	[36]
	火鸟石斛	浸泡法	甲基胺草磷	0.01	12 h/48 h	—	[29]
	大花蕙兰“日出”	浸泡法	秋水仙素	0.5	5 d	23.7	[21]
	大花蕙兰“红宝石”	浸泡法	秋水仙素	30.0	48 h	23.3	[24]
	大花蕙兰“红宝石”	混培法	秋水仙素	10.0/30.0	40 d/30 d	27.8/30.0	[24]
	文心兰“金西”	浸泡法	秋水仙素	2.0 ~ 4.0	10 ~ 20 d	26.7	[46]

表 2(续)

材料类型	种类	处理方法	诱导剂	浓度 (g/L)	时间	诱导率 (%)	参考文献
根状茎	文心兰“甜蜜蜜”	浸泡法	秋水仙素	1.5	54 h	26.7	[45]
		混培法	秋水仙素	0.5	30 d	6.7	[45]
	蝴蝶兰“霍娅淑女”	浸泡法	秋水仙素	1.0	7 d	30.0	[48]
	秋花独蒜兰	浸泡法	秋水仙素	2.0	50 h	25.6	[51]
	大花蕙兰“Silky”	浸泡法	秋水仙素	0.05	7 d	60.0	[19]
		浸泡法	安磺灵	0.005	14 d	46.7	[19]
	大花蕙兰“Silk Road”	浸泡法	秋水仙素	0.05	7 d	16.7	[19]
		浸泡法	安磺灵	0.01	3 d	6.7	[19]
	杂交兰“黄金小神童”	浸泡法	安磺灵	0.02	48 h	52.0	[17]
	杂交兰杂种 F ₁	浸泡法	秋水仙素	1.0	48 h	36.0	[23]
茎尖	金线莲	浸泡法	二甲戊灵	0.056	8 d	44.2	[10]
	蕙兰	浸泡法	秋水仙素	5.0	48 h	13.3	[26]
不定芽	蝴蝶兰	浸泡法	秋水仙素	0.5	24 h	20.0	[49]
	紫毛兜兰	浸泡法	秋水仙素	0.02	6 d	19.9	[52]
	石斛杂种 F ₁	浸泡法	秋水仙素	0.000 6	24 h	62.9	[41]
	石斛杂种 F ₁	浸泡法	秋水仙素	0.000 6	12 h	69.1	[42]
丛生芽	铁皮石斛	浸泡法	秋水仙素	0.000 8	30 min	13.3	[32]
		浸泡法	秋水仙素	0.9	24 h	48.0	[36]
带节茎段	大花蕙兰“红瀑布”	浸泡法	秋水仙素	0.5	24 h	28.2	[20]
	碧玉兰	浸泡法	秋水仙素	0.2	72 h	60.0	[22]
	大花蕙兰“红宝石”	混培法	秋水仙素	30.0	40 d	15.6	[24]
	沉香虎头兰	浸泡法	秋水仙素	0.5	72 h	74.0	[27]
	春石斛杂种 F ₁	浸泡法	秋水仙素	0.6	12 h	69.1	[39]
	齿瓣石斛	浸泡法	秋水仙素	0.3	24 h	60.0	[43]
	铁皮石斛	浸泡法	秋水仙素	2.0	36 h	30.0	[34]
	金线莲	浸泡法	秋水仙素	0.70	24 h	43.3	[8]
		浸泡法	二甲戊灵	0.09	48 h	50.0	[8]
		浸泡法	秋水仙素	0.5	24 h	51.7	[9]
		混培法	秋水仙素	0.7	15 d	53.0	[9]
		涂抹法	秋水仙素	0.7	—	35.0	[9]
		浸泡法	秋水仙素	1.0	48 h	48.0	[11]
		浸泡法	秋水仙素	0.3	13 d	72.7	[12]

安磺灵、二甲戊灵、甲基胺草磷等与秋水仙素的作用机制一致,这些药剂甚至对植物微管蛋白的亲 and 性更高,在兰科植物中应用越来越广泛。Hwang 等比较了秋水仙素和安磺灵对大花蕙兰的诱导效果,采用 0.05 g/L 秋水仙素浸泡处理 7 d,诱导率为 60.0%;采用 0.005 g/L 秋水仙素浸泡处理 14 d,诱导率为 46.7%^[19]。Chung 等也比较了秋水仙素和安磺灵对虾脊兰杂交 F₁ 种子的诱导效果,采用 0.10 g/L 秋水仙素浸泡处理 7 d,诱导率为 81.0%;采用 0.03 g/L 安磺灵浸泡处理 1 d 的诱导率为 86.0%^[15]。滕人达比较了秋水仙素和二甲戊

灵对金线莲的诱导效果,采用 0.09 g/L 二甲戊灵浸泡处理 48 h,存活率为 56.7%,诱导率为 50.0%;而采用 0.70 g/L 秋水仙素浸泡处理 24 h,存活率为 50.0%,诱导率为 43.3%,二甲戊灵使用浓度较低,但诱导效率优于秋水仙素^[8]。除使用一种诱变剂外,还可以混用 2 种诱变剂诱导多倍体。李秀兰等采用附加了 0.1 g/L 秋水仙素与 0.005 g/L 安磺灵的培养基诱导培养 8~10 d,秋石斛四倍体诱导率达到 90% 以上^[40]。

1.3 处理方法、诱变剂浓度与时间

1.3.1 处理方法 兰科植物多倍体诱导方法有浸

泡法、混培法和涂抹法等,其中以浸泡法和混培法应用较多(表 2)。浸泡法能使诱变剂充分接触诱变材料,能减少嵌合体的发生,但对材料伤害较大,处理时间不宜过长。混培法是将诱变材料接种到添加了诱变剂的培养基中,培养一段时间后转移到常规培养基中。混培法中诱变剂浓度一般较小,对材料伤害较小,但处理时间一般较长。何碧珠等研究了不同处理方法对金线莲多倍体的诱导效果,结果表明混培法最优,浸泡法次之,涂抹法较差^[9]。卓孝康也比较了不同处理方法对大苞鞘石斛多倍体的诱导效果,1.0 g/L 秋水仙素浸泡处理 12 h 的诱导率为 26.0%,而采用 0.3 g/L 秋水仙素混培处理 30 d 的诱导率达 34.0%,但认为混培法中诱变剂使用浓度虽低,但较浸泡法处理的时间更长,经多代培养后的植株生长性状仍表现出明显的毒副作用^[37],这与夏春英的研究结果^[13]一致。

1.3.2 诱变剂浓度与处理时间 研究表明,当处理时间一定时,诱变材料的死亡率随诱变剂浓度的升高呈不断增加的变化趋势;当诱变剂浓度一定时,随处理时间的延长诱变材料的死亡率也不断上升。适宜的诱变剂浓度及处理时间是兰科植物多倍体成功诱导的关键。兰科植物多倍体诱导中,秋水仙素使用的最低浓度为 0.000 6 g/L^[39,41-42],最高使用浓度为 30.000 0 g/L^[24],使用较多的浓度范围在 0.05 ~ 2.00 g/L 之间;安磺灵使用的适宜浓度范围比较集中,主要在 0.005 ~ 0.030 g/L 之间^[15,17,19-30,38];二甲戊灵^[8,10]和甲基胺草磷^[29]应用较少,适宜浓度分别为 0.05 ~ 0.09 g/L 和 0.01 g/L。秋水仙素浸泡法处理的最短时间是 30 min^[32],最长时间是 13 d^[12],使用较多的时间范围在 12 h 至 7 d;秋水仙素混培法处理的时间范围是 3 ~ 120 d。安磺灵处理的时间范围是 48 h 至 14 d,二甲戊灵处理的时间范围是 48 h 至 8 d^[8,10],甲基胺草磷处理的时间范围是 12 ~ 48 h^[29]。因此,在实际应用中,应设置适宜的诱变剂浓度梯度和处理时间梯度,并结合诱变材料的死亡率、多倍体诱导率以及生长情况,探索适宜不同品种的最佳组合。

2 兰科植物多倍体鉴定

2.1 形态学鉴定

株高、茎粗、节间长、叶长、叶宽、叶色、根粗、叶脉等可作为鉴别兰科植物多倍体的重要形态指标。研究表明,兰属植物^[17,21,22,26-27]诱导获得的多倍

体,植株矮壮,叶片变厚、变宽,叶长、叶形指数变小,叶色深绿,但叶片易扭曲、畸形,生长缓慢;石斛属植物^[31,34,37,43,55]诱导获得的多倍体植株多矮壮,节间短、叶片加厚、叶色深绿,但叶片易折断,生长缓慢;开唇兰属植物^[8-9,11]多倍体植株更高大,茎段粗壮、节间加长、叶片变大、叶片肥厚、叶色深、根粗壮,但生长缓慢。

2.2 细胞学鉴定

兰科植物多倍体植株的气孔和保卫细胞变大^[12,41-42],单位叶面积气孔数减少^[13,50],保卫细胞内叶绿体大且颜色较深^[43],保卫细胞中叶绿体数增多^[11,30],叶绿素含量明显增加^[39]。气孔密度^[16]、气孔和保卫细胞的大小及保卫细胞内叶绿体大小与数量等可作为鉴别兰科植物二倍体和多倍体的重要指标。

2.3 染色体计数鉴定

染色体计数是最直接、最有效的植物倍性鉴定方法。兰科植物多倍体染色体数量鉴定中,主要以根尖为材料进行常规压片法鉴定,但在对金线莲的倍性鉴定时,赖红英等以茎尖为材料,鉴定出了多倍体植株的染色体数量^[10,12]。染色体计数法虽然方法步骤较简单,但对操作技术具有较高的要求。

2.4 流式细胞术鉴定

流式细胞术(flow cytometry)是 20 世纪 70 年代发展起来的用于快速测定细胞核内 DNA 含量和细胞核大小的技术,是现代生物学、医学常用的细胞分选技术^[56]。目前,流式细胞术在兰科植物基因组大小测定、染色体倍性鉴定和内多倍性研究等方面得到广泛应用^[57]。目前,利用流式细胞术在兰属^[18,28]、石斛属^[29,31,35]、开唇兰属^[8]、新堇兰属^[44]、兜兰属^[52]、蝴蝶兰属^[58]、虾脊兰属^[15]、白芨属^[14]、文心兰属^[45]、苞舌兰属^[53]等兰科植物的人工多倍体诱导鉴定中得到广泛应用,同时也应用于手参属(*Gymnadenia*)^[59]、掌裂兰属(*Dactylorhiza*)^[60-61]等兰科植物的多倍体进化研究中。

3 兰科植物多倍体诱导的意义

3.1 提高观赏性

多倍体植物的表型通常具有巨大性^[62],因此有望通过多倍体育种培育出花朵更大、花瓣变多、花色变深、花质厚重的兰花新品种。同时多倍体还具有植株粗壮、叶片宽厚、叶色浓绿等特征,从而调节株型,提高整体观赏价值。廖道龙等研究表明,随

着倍性的增加,石斛属植物的叶片呈增长、增宽、增厚,花朵直径呈增大、花瓣增厚的趋势,茎粗呈增大的变化趋势,其中四倍体的花朵直径、茎粗显著大于二倍体和三倍体^[63]。谢利等研究表明,随着倍性的增加,蝴蝶兰花朵直径逐渐增大,四倍体的花朵直径显著大于三倍体和二倍体,但花朵数量显著少于二倍体和三倍体,三倍体花朵数量最多^[64]。

3.2 克服远缘杂交障碍

在杂交之前先使某一亲本加倍成同源多倍体,可克服杂交不亲和,提高杂交结实率。远缘杂种 F_1 ,在减数分裂过程中大量的单价体会导致严重的不育,通过染色体加倍后获得的异源多倍体可恢复生育能力^[65-66]。多倍体的近亲繁殖抑制程度也低于二倍体亲本,因此能够容忍更高水平的自交^[67]。人工诱变获得的多倍体类型一般仅能作为育种中间材料,在进一步进行杂交、回交等利用时,还需保持和提高目标性状才可能选育出商业品种。值得一提的是,如获得的兰科植物多倍体具有良好的商品性,则可通过无性繁殖的途径快速固定并繁殖,直接进行市场化应用。

3.3 提高抗逆性

同源多倍体降低了突变和隐性基因纯合表现可能性以及异源多倍体中等位基因杂合性,利于其内部环境的稳定,能提高遗传多样性和适应能力,因此多倍体对不良环境具有更强的抵抗力^[67],具有强大的生长优势和良好的开发利用前景^[33]。陈晓梅研究认为,蕙兰叶绿素含量随倍性的增加而增加,相较于二倍体,四倍体蕙兰植株的耐寒性和抗旱性均提高^[26]。吴姝漪研究表明,高温胁迫下四倍体华石斛较二倍体的叶绿素含量(SPAD 值)和相对电导率变化都更平缓,且四倍体出现高温胁迫的时间更晚,推断出四倍体华石斛的耐热性更强^[30]。周珊珊等研究表明,大花蕙兰多倍体类原球茎抵御低温和高温能力强于二倍体,多倍体中抗氧化酶系(SOD、POD、CAT)活性及丙二醛含量的变化是导致多倍体抗性增强的重要原因^[68]。王园园研究表明,高温胁迫下四倍体杂交兰叶绿素含量的降幅小于二倍体,丙二醛含量及增幅也小于二倍体,而脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白含量的增幅均大于二倍体,研究证明四倍体较二倍体具有更强的抗逆性^[69]。

3.4 提高次生代谢物含量

铁皮石斛、金线莲等兰科药用植物的功效成分

主要为糖类、芪类、酚类、萜类、生物碱类、黄酮类和甾醇类等,其中主要由甘露糖和葡萄糖等单糖构成的水溶性多糖是其重要活性成分之一^[1]。兰科植物加倍后往往能提高其体内能源物质与活性成分的含量。研究表明,铁皮石斛同源四倍体中叶绿素^[54-55]、可溶性糖^[33,55]、可溶性蛋白^[33]、多糖^[32,70]的含量显著高于二倍体。多倍体金线莲的多糖、总黄酮含量均高于二倍体植株^[38]。霍山石斛四倍体的根、茎、叶中多糖、生物碱的含量均高于二倍体,二倍体和四倍体中参与多糖、萜类、聚酮类、氨基酸等代谢及激素合成与信号转导的关键基因的差异表达,可能是四倍体植株体内能源物质含量增加、活性成分提高和生长势增强的主要原因^[71]。此外,王园园比较鉴定了二倍体、四倍体杂交兰的生理指标,发现四倍体植株中可溶性糖和蛋白质含量均显著高于二倍体^[69]。

4 主要问题与展望

4.1 嵌合体的分离

多倍体诱导中无论采用何种材料与诱变方法,常伴有大量的嵌合体。诱变获得的嵌合体植株不能稳定遗传,因此需要对嵌合体进行鉴定、分离与纯化。一直以来,兰科植物嵌合体的分离与纯化极其困难。随着组织培养与多倍体育种技术的有机结合,多倍体诱导中的嵌合体问题正逐步得到解决。准确地掌握适宜不同材料的诱变剂浓度、处理时间和处理方法,在提高多倍体诱变效率的同时,采用有效的嵌合体分离方法是成功获得多倍体的关键。组织连续切割分离法是嵌合体分离常用的方法之一。李涵等采用不定芽结合组织培养技术,多倍体诱导后通过不断切割、培养产生新的个体,成功获得了部分稳定的多倍体植株材料^[17]。孙红梅等研究表明,以体细胞胚发生体系进行多倍体诱导可有效减少嵌合体形成^[72]。对于兰科植物而言,以种子诱导出的原胚期原球茎^[23]、种胚^[34]或体细胞胚胎发生获得的胚状体^[44]、类原球茎等都是处于尚未分化的母细胞阶段,进行多倍体诱导时一旦加倍成功后将发育成多倍体原球茎或类原球茎,进一步再分化便可获得大量多倍体幼苗,能提高多倍体纯合体的选择效率。

4.2 多倍体的繁殖

多倍体植株通常生长发育缓慢。尹翠翠等研究表明,加倍后的杂交兰虽然生长缓慢,但通过调

节培养基营养组成及生长调节剂的浓度,获得了正常生长的四倍体无菌苗^[23]。吴姝漪研究表明,华石斛四倍体与二倍体具有相同的增殖效果,且增殖后的四倍体幼苗生长健壮^[30]。刘静雯等系统研究并建立了铁皮石斛同源四倍体工厂化快繁工艺^[73];李丹丹研究筛选出了适宜铁皮石斛同源四倍体的栽培基质配方,为铁皮石斛同源四倍体种质的生产推广提供了技术支撑^[55]。总体而言,针对兰科植物多倍体繁育的研究还不够深入,系统研究并建立适宜的繁殖技术体系是提高多倍体利用效率的重要环节。

参考文献:

- [1] 张明泽,何春梅,王浩斌,等. 兰科药用植物活性多糖研究进展[J]. 热带亚热带植物学报,2019,27(5):611–622.
- [2] 景袭俊,胡凤荣. 兰科植物研究进展[J]. 分子植物育种,2018,16(15):5080–5092.
- [3] Jiao Y N, Wickett N J, Ayyampalayam S, et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms[J]. Nature,2011,473(7345):97–100.
- [4] Soltis P S, Marchant D B, de Peer Y V, et al. Polyploidy and genome evolution in plants [J]. Current Opinion in Genetics & Development,2015,35:119–125.
- [5] Adams K L, Wendel J F. Polyploidy and genome evolution in plants [J]. Current Opinion in Plant Biology,2005,8(2):135–141.
- [6] 雷家军,王冲. 观赏植物多倍体诱导研究进展[J]. 东北农业大学学报,2012,43(1):18–24.
- [7] Hedrén M, Fay M F, Chase M W. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae)[J]. American Journal of Botany,2001,88(10):1868–1880.
- [8] 滕人达. 金线莲多倍体诱导及杂交育种初步研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2018.
- [9] 何碧珠,杨超,朱萍,等. 金线莲多倍体诱导研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):70–74.
- [10] 赖红英,赵秀萍,林婉玉,等. 二甲戊乐灵诱导金线莲多倍体[J]. 分子植物育种,2015,13(10):2355–2361.
- [11] 蔡文燕,吴水金,潘一山. 金线莲多倍体诱导的初步研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2010,35(1):90–93.
- [12] 王丽芳,黄建,林霞. 秋水仙素离体诱导金线莲多倍体的研究[J]. 浙江农业学报,2010,22(6):760–763.
- [13] 夏春英. 竹叶兰繁育系统与快繁技术及其多倍体诱导研究[D]. 福州:福建农林大学,2019.
- [14] Han P P, Liu W X, Liang H H, et al. *In vitro* induction and identification of autotetraploid of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. by colchicine treatment [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2018,132(3):425–432.
- [15] Chung M Y, Kim C Y, Min J S, et al. *In vitro* induction of tetraploids in an interspecific hybrid of *Calanthe* (*Calanthe discolor* × *Calanthe sieboldii*) through colchicine and oryzalin treatments [J]. Plant

- Biotechnology Reports,2014,8(3):251–257.
- [16] de Mello Silva P A K X, Callegari – Jacques S, Bodanese – Zanettini M H. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques[J]. Ciência Rural,2000,30(1):105–111.
- [17] 李涵,李慧敏,陆琳,等. 杂交兰“黄金小神童”四倍体诱导技术研究[J]. 西南林业大学学报,2018,38(2):70–75.
- [18] 宋莲,杨俊旭,刘丹,等. 墨兰“绿墨素”×大花蕙兰“世界和平”F₁ 代多倍体诱导初报[J]. 广西植物,2018,38(2):188–194.
- [19] Hwang S H, Kim M S, Park S Y. Improvement of chromosome doubling efficiency in *Cymbidium hybrids* by colchicine and oryzalin treatment [J]. Korean Journal of Horticultural Science and Technology,2015,33(6):900–910.
- [20] 季必霞,陈达伟,张晨晨,等. 大花蕙兰多倍体的高效诱导[J]. 植物研究,2011,31(5):558–562.
- [21] 王木柱,曾瑞珍,谢利,等. 大花蕙兰四倍体的离体诱导和鉴定[J]. 西北植物学报,2010,30(1):56–62.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 杨丽娟. 大花蕙兰离体快繁关键技术及多倍体诱变研究[D]. 雅安:四川农业大学,2009.
- [25] 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.
- [26] 陈晓梅. 蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)离体快繁及四倍体培育研究[D]. 重庆:西南大学,2008.
- [27] 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.
- [28] 曾碧玉,朱根发,刘海涛. 兰花选育种研究进展[J]. 中国农学通报,2005,21(12):272–276.
- [29] Kondo H, Phlaetita W, Mii M, et al. Efficient chromosome doubling of an interspecific hybrid *Dendrobium stardust* ‘Fire Bird’ by treatment of amipros – methyl to protocorm – like body[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology,2020,56(6):738–749.
- [30] 吴姝漪. 华石斛多倍体诱导与鉴定评价[D]. 海口:海南大学,2017.
- [31] 王爱华,吴青青,杨澜,等. 秋水仙素诱导黑喉石斛多倍体研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2017,39(1):55–60.
- [32] 吴睿. 铁皮石斛多倍体诱导、基因表达差异检测与 EST – SSR 开发研究[D]. 南京:南京师范大学,2016.
- [33] 杨岚,师帅,向增旭. 铁皮石斛四倍体离体诱导和鉴定及生理特性研究[J]. 西北植物学报,2013,33(11):2189–2193.
- [34] 张静静. 铁皮石斛多倍体的诱导及其鉴定[D]. 杭州:浙江农林大学,2013.
- [35] 詹忠根,徐程. 秋水仙素诱导铁皮石斛多倍体研究[J]. 浙江大学学报(理学版),2011,38(3):321–325.
- [36] 张青华,李枝林,唐敏,等. 秋水仙碱诱导铁皮石斛多倍体研究初报[J]. 云南农业大学学报,2011,26(5):678–682.
- [37] 卓孝康. 大苞鞘石斛快繁体系构建及多倍体诱导[D]. 福州:

- 福建农林大学,2015.
- [38] Miguel T P, Leonhardt K W. *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130(1): 314 – 319.
- [39] 郑宝强, 张莹, 王雁, 等. 春石斛的多倍体诱导[J]. *园艺学报*, 2009, 36(9): 1381 – 1384.
- [40] 李秀兰, 安东. 秋石斛同源四倍体诱导与鉴定[J]. *园艺学报*, 2009, 36(8): 1239 – 1242.
- [41] 张莹. 石斛再生体系的建立及多倍体诱导的初步研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2008.
- [42] 张莹, 王雁, 李振坚. 秋水仙素诱导石斛多倍体的初步研究[J]. *核农学报*, 2009, 23(3): 413 – 417.
- [43] 李涵, 郑思乡, 龙春林. 齿瓣石斛多倍体的诱导初报[J]. *云南植物研究*, 2005, 27(5): 552 – 556.
- [44] 李智. 拟堇花兰再生植株叶片胚状体诱导及染色体组加倍研究[D]. 海口: 海南大学, 2012.
- [45] 赵羿鸾. 秋水仙素诱导文心兰多倍体的初步研究[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [46] 崔广荣, 张子学, 张从宇, 等. 文心兰多倍体诱导及其鉴定[J]. *草业学报*, 2010, 19(1): 184 – 190.
- [47] Unemoto L K, de Faria R T, Destro D, et al. Survival and differentiation of *Oncidium flexuosum* protocorm submitted to peracetic acid and colchicine treatment[J]. *Acta Scientiarum*, 2009, 31(3): 503 – 508.
- [48] 崔广荣, 张子学, 胡能兵, 等. 蝴蝶兰类原球茎液体培养中用秋水仙素诱导多倍体[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2010, 36(1): 49 – 55.
- [49] 刘亮. 蝴蝶兰离体培养再生体系的建立与多倍体诱导的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- [50] 李豆豆, 刘芝龙, 黄明忠, 等. 鹤顶兰四倍体植株的诱导与鉴定[J]. *园艺学报*, 2013, 40(10): 2033 – 2038.
- [51] 成倩, 唐娅梅, 张伟, 等. 秋水仙素诱导秋花独蒜兰多倍化的研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2010, 47(3): 635 – 638.
- [52] Huy N P, Tam D T T, Luan V Q, et al. *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 252: 283 – 290.
- [53] 刘帆. 紫花苞舌兰离体再生及染色体加倍研究[D]. 海口: 海南大学, 2017.
- [54] Jersáková J, Castro S, Sonk N, et al. Absence of pollinator – mediated pre-mating barriers in mixed – ploidy populations of *Gymnadenia conopsea* s. l. (Orchidaceae)[J]. *Evolutionary Ecology*, 2010, 24(5): 1199 – 1218.
- [55] 李丹丹. 铁皮石斛同源四倍体与二倍体差异性比较及栽培基质配方筛选[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- [56] 杜立颖, 冯仁青. 流式细胞术[M]. 2版. 北京: 北京大学出版社, 2014.
- [57] 李春楠, 傅巧娟, 沈国正, 等. 流式细胞术在兰科植物中的应用[J]. *核农学报*, 2020, 34(5): 973 – 981.
- [58] Chen W H, Tang C Y, Kao Y L. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm – like bodies in *Phalaenopsis* species[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2009, 98(2): 229 – 238.
- [59] Gross K, Schiestl F P. Are tetraploids more successful? Floral signals, reproductive success and floral isolation in mixed – ploidy populations of a terrestrial orchid[J]. *Annals of Botany*, 2015, 115(2): 263 – 273.
- [60] Ståhlberg D, Hedrén M. Systematics and phylogeography of the *Dactylorhiza maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia: insights from cytological, morphological and molecular data[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2008, 273(1/2): 107 – 132.
- [61] Ståhlberg D. Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s. l. (Orchidaceae)[J]. *Evolutionary Ecology*, 2007, 23(2): 295 – 328.
- [62] 孙静贤, 丁开宇, 王兵益. 植物多倍体研究的回顾与展望[J]. *武汉植物学研究*, 2005, 23(5): 482 – 490.
- [63] 廖道龙, 谢利, 曾瑞珍, 等. 石斛属植物倍性与形态学性状的相关性研究[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(10): 2023 – 2029.
- [64] 谢利, 刘芳, 易魁升, 等. 蝴蝶兰倍性与叶部和花部性状的相关性[J]. *华南农业大学学报*, 2014, 35(5): 82 – 87.
- [65] Meeus S, Šemberová K, de Storme N, et al. Effect of whole – genome duplication on the evolutionary rescue of sterile hybrid monkeyflowers[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(6): 100093.
- [66] 庄勇, 王述彬. 异源多倍体及其在作物品种遗传改良中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(26): 12498 – 12500.
- [67] Soltis P S, Soltis D E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids[J]. *PNAS*, 2000, 97(13): 7051 – 7057.
- [68] 周珊珊, 谢利, 王辰辉, 等. 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[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(8): 1265 – 1272.
- [69] 王园园. 四倍体杂交兰遗传性状分析及其抗逆性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [70] 江金兰, 叶炜, 李永清, 等. 同源四倍体铁皮石斛的生长及多糖积累[J]. *植物生理学报*, 2014, 50(4): 519 – 526.
- [71] 张成才, 高真, 罗丽娜, 等. 霍山石斛同源四倍体与二倍体活性成分及转录组比较分析[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(23): 5669 – 5676.
- [72] 孙红梅, 付麟岚, 王志平, 等. 基于体细胞胚发生的细叶百合和兰州百合多倍体诱导及鉴定[J]. *园艺学报*, 2018, 45(6): 1136 – 1146.
- [73] 刘静雯, 梁晖辉, 卢富华, 等. 铁皮石斛同源四倍体工厂化快繁工艺研究[J]. *西北植物学报*, 2018, 38(10): 1927 – 1935.