



宋丹丹,李晗玥,张湑湑,等.叶艺突变对‘小凤兰’组培快繁特性的影响[J].黑龙江农业科学,2021(7):63-68.

叶艺突变对‘小凤兰’组培快繁特性的影响

宋丹丹¹,李晗玥¹,张湑湑¹,曾瑞珍^{1,2},郭和蓉^{1,2},张志胜^{1,2}

(1. 华南农业大学 林学与风景园林学院,广州 广东 510642;2. 华南农业大学 国家植物航天育种工程技术研究中心,广州 广东 510642)

摘要:为促进‘小凤兰’突变体形成的分子机理研究,以‘小凤兰’及其叶艺突变体试管苗茎尖为外植体,采用组织培养方法研究叶艺突变对‘小凤兰’组培快繁特性的影响,并对根状茎和叶片中光合色素、可溶性糖和蛋白含量进行测定。结果表明:叶艺突变显著降低‘小凤兰’茎尖根状茎诱导率、增殖系数和苗分化率,但显著提高芽分化率。突变体试管苗株高显著小于‘小凤兰’,但株幅、叶片数和根数显著高于‘小凤兰’。叶艺突变显著降低‘小凤兰’叶片中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、类胡萝卜素、可溶性糖和蛋白含量。因此,叶艺突变能够降低‘小凤兰’组培快繁效率和试管苗叶片中光合色素含量。

关键词:兰花;叶艺突变;组培快繁;光合色素

叶艺兰(线艺兰)是指叶片上镶嵌着黄色或白色条纹和斑点的兰花^[1],具有极高的观赏价值和广阔的市场前景,越来越受到研究者的重视^[2-7]。叶艺突变明显增加兰花的观赏价值和经济价值,但对兰花的生长发育、生理生化和组培快繁特性等也有明显影响^[8-12]。研究叶艺变异对兰花组培快繁特性的影响,对更好建立叶艺兰组培快繁技术体系,加快叶艺兰产业化推广具有重要作用。

对叶艺兰的组培快繁技术已有一些研究报道^[13-17],但有关叶艺突变对兰花组培快繁特性的影响及其机理的研究报道较少。蒋彧等^[9]研究了叶艺突变对‘隆昌素’春剑根状茎增殖和分化的影响表明,叶艺突变体根状茎增殖分化能力和平均苗高均降低。迄今尚未见到叶艺突变对兰花组培快繁特性影响及其机理的系统研究报道。

‘小凤兰’是通过远缘杂交和回交选育的墨兰型杂交兰新品种,既可工厂化繁殖又可分株繁殖^[3,18],目前已进行产业化开发。在‘小凤兰’种苗工厂化生产中,获得了‘小凤兰’叶艺突变体。本研究以‘小凤兰’和‘小凤兰’叶艺突变体试管苗为材料,研究叶艺突变对‘小凤兰’组培快繁特性

的影响及其机理,为‘小凤兰’叶艺突变体高效组培快繁技术体系的建立和突变体形成的分子机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为‘小凤兰’(*Cymbidium* ‘Xi-aofeng’,代号 CX)及其叶艺突变体(代号 MCX)试管苗,‘小凤兰’试管苗由茎尖培养获得,‘小凤兰’叶艺突变体试管苗由突变根状茎经增殖扩繁和植株再生获得。

1.2 方法

1.2.1 根状茎诱导 选取生长健壮的试管苗,在超净工作台上用镊子和解剖刀切取 2~3 mm 茎尖,接种于 MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+活性炭 0.5 g·L⁻¹+10%椰汁+蔗糖 30.0 g·L⁻¹+卡拉胶 7.5 g·L⁻¹(pH 5.8~6.2)诱导培养基上。每瓶接种 4 个,8 瓶为 1 次重复,共重复 3 次。将培养瓶用封口膜封好后,装入黑色密闭塑料袋中,在温度为(26±1)℃的培养室中培养 50 d。记录诱导形成根状茎和死亡的茎尖数,计算诱导率和死亡率。

1.2.2 根状茎增殖 取继代培养的根状茎,在超净工作台上用镊子和解剖刀切成约 1 cm 长,接种于 MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+卡拉粉 7.5 g·L⁻¹+活性炭 0.3 g·L⁻¹(pH5.8~6.2)增殖培养基上在(26±1)℃、光照强度 5 μmol·m⁻²·s⁻¹、光照时间 12 h·d⁻¹的条件下培养 40 d。每瓶接 10 条,5 瓶为 1 次重复,共重复 3 次。用电子天平称量每瓶接种的根

收稿日期:2021-03-29

基金项目:广东省科技计划《兰花茎基腐病抗性鉴别与抗病杂交兰资源创新》项目(2015A030302066);广州市农业财政专项资金项目《高档盆花新品种选育研究与生产示范》(20101396);清远市科技计划项目传统墨兰品种提纯复壮和推广应用(2017A005);清远市科技计划项目建兰型杂交兰新品种选育和示范推广(DZXQY033)。

第一作者:宋丹丹(1995—),女,在读硕士,从事花卉组培快繁等研究。E-mail:1079996890@qq.com。

通信作者:张志胜(1965—),男,博士,教授,从事花卉遗传育种等研究。E-mail:zszhang@scau.edu.cn。

状茎重量和培养40 d后根状茎重量,记录褐化死亡的根状茎数,计算褐化死亡率和增殖系数。诱导率(%)=诱导出根状茎的茎尖数/接种茎尖数 $\times 100$;增殖系数=培养后鲜重/接种鲜重。

1.2.3 根状茎分化 取长约1 cm带生长点的根状茎,均匀接种于MS+6-BA 1.5 mg \cdot L $^{-1}$ +NAA 0.1 mg \cdot L $^{-1}$ +蔗糖30 g \cdot L $^{-1}$ +卡拉粉7.5 g \cdot L $^{-1}$ +活性炭0.05 g \cdot L $^{-1}$ (pH5.8~6.2)分化培养基中在温度(26 \pm 1) $^{\circ}$ C、光照强度10 μ mol \cdot m $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$ 、光照时间12 h \cdot d $^{-1}$ 的条件下培养。每瓶接种10条,5瓶为1次重复,共重复3次。培养40 d后,记录分化出芽(长度 \geq 0.5 cm)和带根苗的根状茎数以及每条根状茎分化出的芽(长度 \geq 0.5 cm)和带根苗数。计算分化率、平均芽分化数和平均苗分化数。芽分化率(%)=分化出芽的根状茎数/接种根状茎数 $\times 100$;平均芽分化数(个/条)=分化出的芽总数/接种根状茎数;苗分化率(%)=分化出苗的根状茎数/接种根状茎数 $\times 100$;平均苗分化数(根/条)=分化出的苗总数/接种根状茎数。

1.2.4 生根壮苗 将高4 cm左右的苗,均匀接种于1/2 MS+6-BA 0.1 mg \cdot L $^{-1}$ +NAA 0.5 mg \cdot L $^{-1}$ +蔗糖20 g \cdot L $^{-1}$ +卡拉粉7.5 g \cdot L $^{-1}$ +活性炭0.5 g \cdot L $^{-1}$ (pH5.8~6.2)生根壮苗培养基中在温度(26 \pm 1) $^{\circ}$ C、光照强度15 μ mol \cdot m $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$ 、光照时间12 h \cdot d $^{-1}$ 的条件下培养。每瓶接种7条苗,5瓶为1次重复,重复3次。培养40 d后,测量株高、茎粗、叶片数、根数和根长。

1.2.5 试管苗移栽 将试管苗从培养瓶中小心取出,用清水洗净根部,置于通风阴凉处晾干水分。用树皮:泥炭土:椰糠=1:1:1的混合基质种植于口径为5 cm的黑色种植袋中后放在具双层遮荫网的温室中栽培,温室温度为5~32 $^{\circ}$ C,相对

湿度为30%~90%。刚移栽的试管苗用2 500倍链霉素和800倍恶霉灵灌根,7 d内每天向叶面喷水,随后进入常规管理,观察记录试管苗生长情况,记录死亡苗数,计算成活率。褐化死亡率(%)=死亡(褐化)的根状茎数/接种根状茎数 $\times 100$ 。

1.2.6 测定项目及方法 参照史娜溶^[18]的方法测定叶绿素和类胡萝卜素的含量^[19]。Chl a=12.7 \times A₆₆₃-2.59 \times A₆₄₅;Chl b=22.9 \times A₆₄₅-4.67 \times A₆₆₃;Chl_总=8.03 \times A₆₆₃+20.31 \times A₆₄₅;Caro=(1 000A₄₇₀-3.27Chl a-104Chl b)/229。

采用蒽酮比色法^[20]测定可溶性糖含量,采用考马斯蓝染料结合法^[21]测定可溶性蛋白含量。可溶性糖(可溶性蛋白)含量(mg \cdot g $^{-1}$)=(C \cdot VT)/(1 000 \cdot VS \cdot WF),其中C为查的标准曲线值(μ g);VT为提取液总体积(mL);WF为样品鲜重/干重(g);VS为测定时加样量(mL)。

1.2.7 数据分析 采用Excel 2016进行数据计算和作图;采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析,平均数据以平均数 \pm 标准误(S.E.)表示,多重比较采用邓肯氏新复极差检验法(Duncan's multiple ranger test)。

2 结果与分析

2.1 叶艺突变对‘小凤兰’茎尖根状茎诱导的影响

由图1可知,培养8 d,‘小凤兰’茎尖启动形成根状茎,而‘小凤兰’叶艺突变体15 d才开始启动。‘小凤兰’和‘小凤兰’叶艺突变体茎尖褐化死亡率没有显著差异,但‘小凤兰’茎尖根状茎诱导率为70.37%,显著高于‘小凤兰’叶艺突变体($P<0.05$)(图1A)。培养50 d后‘小凤兰’茎尖诱导形成的根状茎粗壮,而‘小凤兰’叶艺突变体的弱小(图1B)。

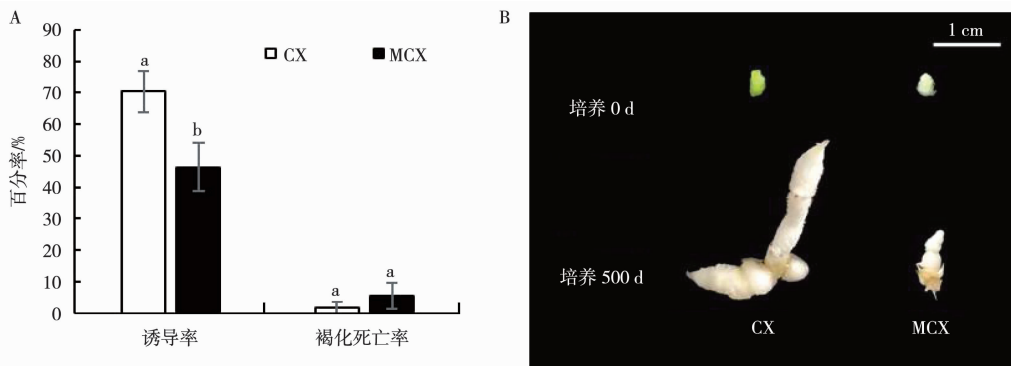


图1 叶艺突变对‘小凤兰’茎尖根状茎诱导特性的影响

注:不同小写字母代表差异显著($P<0.05$),下同。

2.2 叶艺突变对‘小凤兰’根状茎增殖的影响

由图 2 可知,‘小凤兰’叶艺突变体的增值系数为 1.81,显著低于‘小凤兰’($P<0.05$,图 2A)。培养 40 d,‘小凤兰’平均每个根状茎可长出 3.86 条新根状茎,而‘小凤兰’叶艺突变体平均可长出 2.77 条新根状茎,在光照条件下‘小凤兰’新生根状茎初为黄绿色,最终为绿色,而‘小凤兰’叶艺突变体初为浅黄绿色,最终为黄绿色。‘小凤兰’叶艺突变体新生根状茎颜色一致,未出现分离(图 2B)。

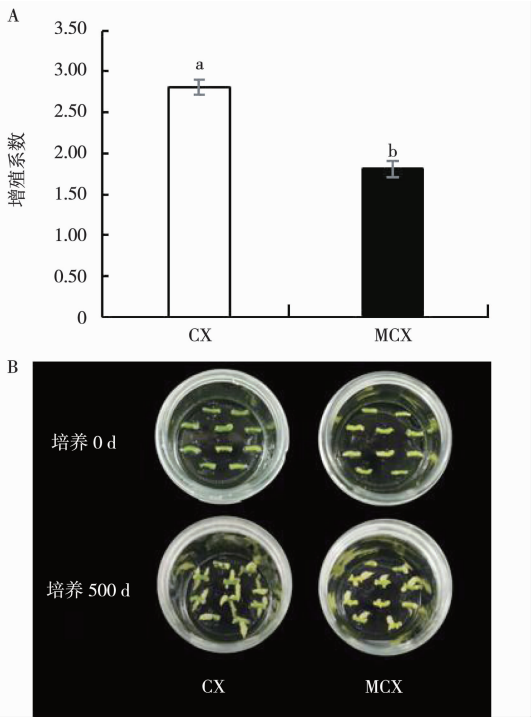


图 2 叶艺突变对‘小凤兰’根状茎增殖的影响

2.3 叶艺突变对‘小凤兰’根状茎分化的影响

由图 3 可知,‘小凤兰’叶艺突变体的芽分化率与平均芽分化分别为 85.33%和 2.35,均显著高于‘小凤兰’($P<0.05$),但苗分化率和平均苗分化数均显著低于‘小凤兰’(图 3A 和 B)。

‘小凤兰’叶艺突变体的根状茎褐化死亡率显著高于‘小凤兰’,‘小凤兰’分化出的芽苗为淡绿色,而‘小凤兰’叶艺突变体的芽苗为淡黄色,分化出的叶片均具中透缟艺,叶艺保持率 100%(图 3C 和 D)。

2.4 叶艺突变对‘小凤兰’试管苗生长的影响

由图 4 可知,‘小凤兰’叶艺突变体的株高显著低于‘小凤兰’,但株幅显著大于‘小凤兰’(图 4A、D),叶片数和根数显著多于‘小凤兰’(图 4B);叶长和根长显著小于‘小凤兰’(图 4C)。

‘小凤兰’叶艺突变体所有再生植株叶片均具中透缟艺,进一步说明该叶艺突变是稳定(图 4D)。

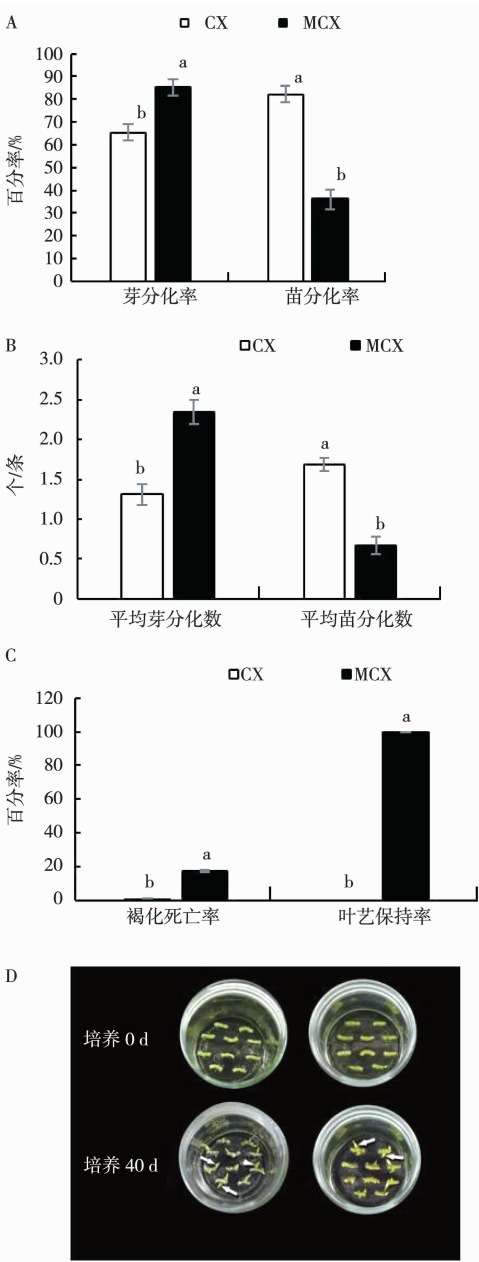


图 3 叶艺突变对‘小凤兰’根状茎分化的影响

2.5 叶艺突变对‘小凤兰’试管苗成活率的影响

由图 5 可知,移栽 60 d 后,‘小凤兰’与‘小凤兰’叶艺突变体试管苗成活率没有显著差异,但移栽 180 d 后,‘小凤兰’叶艺突变体成活率仅为 51.11%,显著低于‘小凤兰’($P<0.05$)(图 5A)。移栽后‘小凤兰’叶艺突变体生长比‘小凤兰’慢,但叶艺稳定。

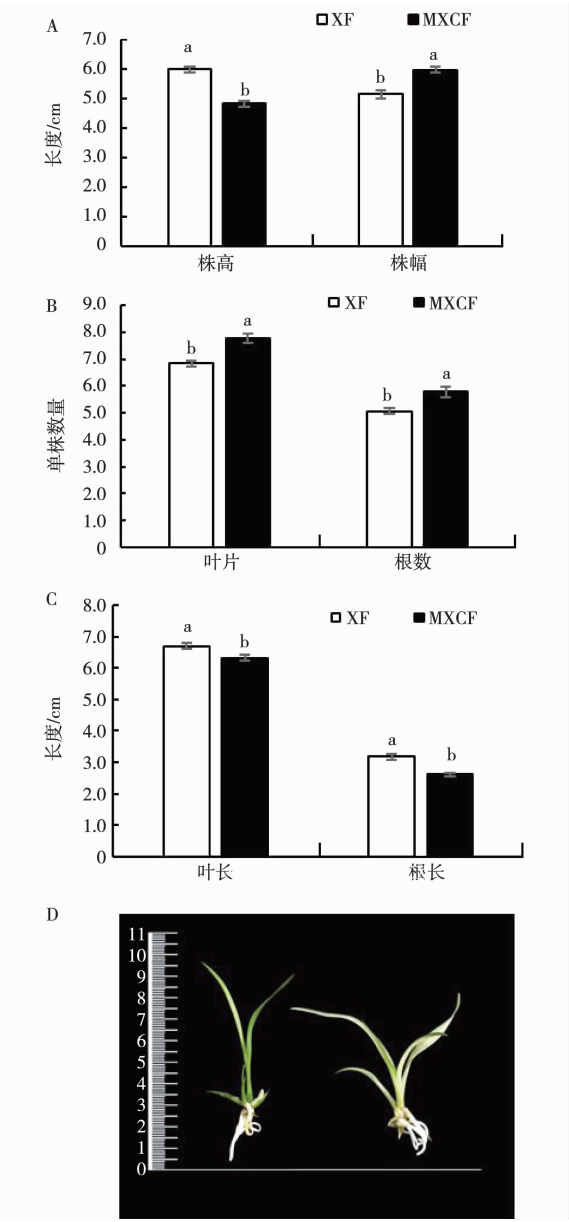


图 4 叶艺突变对‘小凤兰’试管苗生根壮苗的影响

2.6 叶艺突变对‘小凤兰’光合色素含量的影响

由图 6 可知,‘小凤兰’叶艺突变体新生根状茎、老根状茎和试管苗叶片中的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量以及类胡萝卜素含量均显著低于‘小凤兰’。

2.7 叶艺突变对‘小凤兰’可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响

由图 7 可知,‘小凤兰’叶艺突变体叶片中的可溶性糖和可溶性蛋白含量显著低于‘小凤兰’,但在新生根状茎中显著高于‘小凤兰’,在老根状茎中,两者没有显著异。

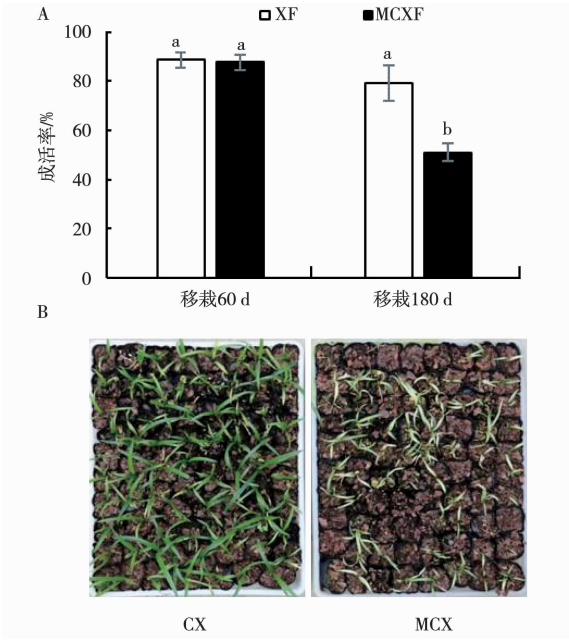


图 5 叶艺突变对‘小凤兰’试管苗成活率的影响

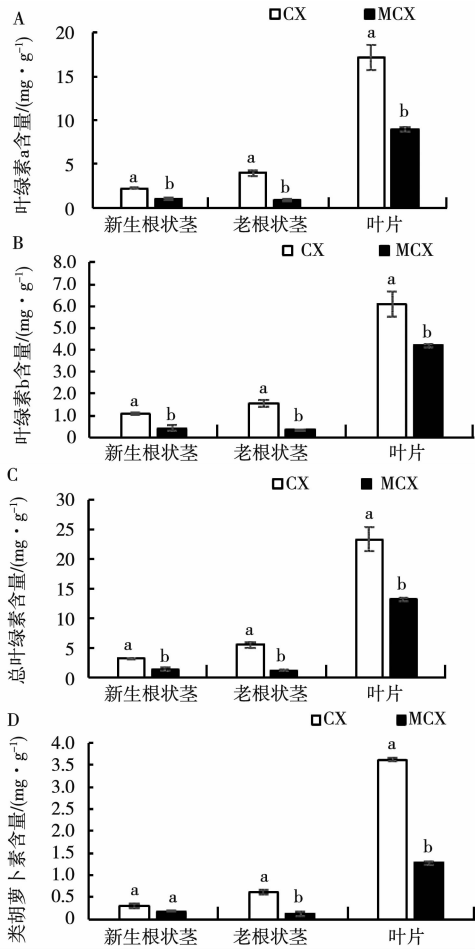


图 6 叶艺突变对‘小凤兰’光合色素含量的影响

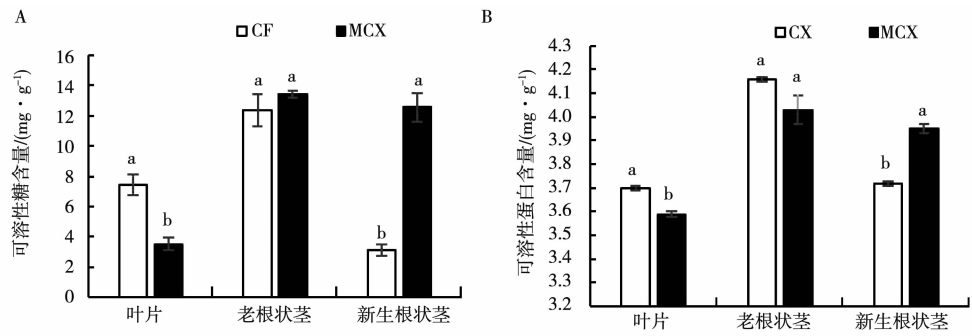


图 7 叶艺突变对‘小凤兰’可溶性糖(A)和可溶性蛋白含量(B)的影响

3 讨论与结论

叶艺突变显著增加兰花的观赏价值,但对兰花组培快繁特性也产生显著影响。蒋彧等^[9]研究表明,与‘隆昌素’相比,‘隆昌素’叶色突变体根状茎增殖和分化能力下降,试管苗长势缓慢。本研究结果表明,叶艺突变不仅显著影响‘小凤兰’根状茎的增殖和分化,对茎尖根状茎诱导、生根壮苗、试管苗移栽各个阶段也产生显著影响,叶艺突变显著降低‘小凤兰’的组培快繁效率。苏畅等^[10]认为叶艺会导致兰花植株矮化,本研究结果也表明,‘小凤兰’叶艺突变体试管苗高比‘小凤兰’小,移栽后生长比‘小凤兰’慢。

叶艺兰在组培快繁过程中通常会出现叶艺返祖现象,导致其种苗生产效率降低^[8,15,22]。本研究结果表明,‘小凤兰’叶艺突变体的中透缟艺可以通过组织培养快速繁殖稳定遗传,这一结果与石乐娟^[13]在线艺春兰‘绿云’、王玉英等^[16]在辐照获得的线艺兰新品系‘TRIR-2’中的研究结果一致。

弄清叶艺突变引起兰花组培快繁特性改变的机理有助于叶艺兰高效组培快繁技术体系的建立,进一步明确突变基因的功能。许庆全等^[23]对‘达摩’墨兰叶艺品系的光合色素含量进行测定结果发现,‘达摩’墨兰叶艺品系叶片黄色区域的总叶绿素含量和类胡萝卜素含量均显著低于绿色区域,叶艺品系黄色区域的 Caro/Chl 值均大于绿色区域。蒋彧等^[9]对‘隆昌素’春剑和其叶色突变体‘叶艺隆昌素’的生理生化指标测定结果表明,与正常植株相比,叶色突变体的叶绿素含量低,类胡萝卜素相对含量高,且叶色突变体根状茎分化成苗的过程中,叶绿素 b 的含量增加,而叶绿素 a 的

含量降低。本研究结果表明,‘小凤兰’叶艺突变体根状茎和叶片中叶绿素和类胡萝卜素等光合色素含量显著下降,引起光合作用减弱,叶片中可溶性糖和蛋白质含量降低、植株和根状茎弱小,最终导致组培快繁效率下降。兰花组培快繁效率与内源激素关系密切^[24],线艺突变是否导致内源激素的变化以及如何导致内源激素变化均有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 吴应祥. 中国兰花[M]. 2 版. 北京:中国林业出版社,1993.

[2] 张灵敏,吕文彦,张丽霞. 高粱浅绿叶突变体 sll1 的农艺性状和生理生化特性[J]. 植物生理学报, 2014, 50(9): 1401-1405.

[3] 杨靖,谢利,曾瑞珍,等. 影响‘小凤兰’根状茎增殖、分化和壮苗的因素研究[J]. 北方园艺, 2016(2): 105-109.

[4] 许庆全,杨凤玺,叶庆生,等. 墨兰‘达摩’叶艺品系光合色素含量、叶绿素荧光特性和叶绿体超微结构的比较[J]. 热带作物学报, 2017, 38(7): 1210-1215.

[5] KIM S H, KIM S W, LIM G, et al. Transcriptome analysis to identify candidate genes associated with the yellow-leaf phenotype of a *Cymbidium* mutant generated by γ -irradiation[J]. Plos One, 2020, 15(1): e228078.

[6] ZHU G, YANG F, SHI S, et al. Transcriptome characterization of *Cymbidium sinense* ‘Dharma’ using 454 pyrosequencing and its application in the identification of genes associated with leaf color variation[J]. Plos One, 2015, 10(6): e128592.

[7] YU J, WANG Q, SHEN Q Q, et al. Transcriptome analysis reveals genes associated with leaf color mutants in *Cymbidium longibracteatum* [J]. Tree Genet Genomes, 2020, 16(3): 44.

[8] 范燕萍,李慧玲,李浩健. 几种花叶线艺兰叶片斑色素组成和叶绿体超微结构研究[J]. 华南农业大学学报, 2006(2): 8-12.

[9] 蒋彧,何俊蓉,熊剑锐,等. 中国兰叶色突变体生理生化分析[J]. 北方园艺, 2015(7): 65-68.

- [10] 苏畅,李枝林,任智慧,等.辐射诱发叶艺兰形态特征和生理特性差异的研究[J].西部林业科学,2016,45(3):38-43.
- [11] 蒋璇,陶炼,何俊蓉.兰属春剑叶艺突变体叶片结构的研究[J].植物科学学报,2018,36(1):112-118.
- [12] 谢泰祥,姚荣荣,陈娟,等.建兰叶艺品种光合色素含量及叶绿素荧光特性分析[J].亚热带植物科学,2019,48(3):232-236.
- [13] 石乐娟.线艺春兰再生体系的优化及组织结构解剖学的研究[D].杭州:浙江大学,2006.
- [14] 李丽,罗君琴,聂振鹏,等.线艺兰的组织培养及植株再生研究[J].浙江农业科学,2008(6):79-681.
- [15] 邢海,孙叶芳,郑琪,等.中透艺春兰根状茎的组培快繁及艺向培养研究[J].现代农业科技,2016(8):139-140,145.
- [16] 王玉英,苏畅,李海燕,等.辐射诱变的线艺兰快繁技术体系研究[J].北方园艺,2015(23):101-103.
- [17] 曾瑞珍,黎扬辉,郭和蓉,等.兰花新品种‘小凤兰’[J].园艺学报,201643(S2):2817-2818.
- [18] 史娜溶.小麦低温敏感型紫叶色突变体 *pur1* 的转录组及其生理生化分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2019.
- [19] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [20] 张志良,瞿伟菁,李小芳.植物生理学指导[M].4版.北京:高等教育出版社,2009.
- [21] 林榕燕,吴建设,林兵,等.杂交兰尿卟啉原脱羧酶基因的克隆及其表达分析[J].核农学报,2020,34(9):1898-1905.
- [22] 李娟.墨兰工厂化繁殖技术体系的建立与优化[D].广州:华南农业大学,2013.
- [23] 许庆全,杨凤玺,叶庆生,等.墨兰‘达摩’叶艺品系光合色素含量、叶绿素荧光特性和叶绿体超微结构的比较[J].热带作物学报,2017,38(7):1210-1215.
- [24] LIU Y,ZHANG H L,GUO H R,et al. Transcriptomic and hormonal analyses reveal that YUC-mediated auxin biogenesis is involved in shoot regeneration from rhizome in *Cymbidium*[J]. Front Plant Science,2017,8:1866.

Effect of Leaf Color and Pattern Mutation on Micropropagation Characteristics of *Cymbidium* ‘Xiaofeng’

SONG Dan-dan¹, LI Han-yue¹, ZHANG Tian-tian¹, ZENG Rui-zhen^{1,2}, GUO He-rong^{1,2}, ZHANG Zhi-sheng^{1,2}

(1. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to study the molecular mechanism of the formation of *Cymbidium* ‘Xiaofeng’ mutant, using shoot tips of test-tube seedlings of *Cymbidium* ‘Xiaofeng’ and its leaf color and pattern mutant as explants, effects of leaf color and pattern mutation on micropropagation characteristics were studied by the use of tissue culture method, and the contents of photosynthesis pigment, soluble sugar and protein in leaf and rhizome were also measured. The results showed that the leaf color and pattern mutation significantly reduced the rhizome induction rate from shoot tip, rhizome proliferation coefficient and seedling differentiation rate, but significantly increased the bud differentiation rate of *Cymbidium* ‘Xiaofeng’. The height of test-tube seedling of the mutant was significantly lower than that of *Cymbidium* ‘Xiaofeng’, while plant width, the number of leaf and root were significantly higher than that of *Cymbidium* ‘Xiaofeng’. Besides, leaf color and pattern mutation significantly reduced the contents of Chla, Chlb, total Chl, Caro, soluble sugar and protein in leaves of *Cymbidium* ‘Xiaofeng’. In conclusion, leaf color and pattern mutation significantly reduced micropropagation efficiency and the content of photosynthesis pigment in leaves of *Cymbidium* ‘Xiaofeng’.

Keywords: *Cymbidium*; leaf color and pattern mutation; micropropagation; photosynthesis pigment

著作权使用声明

本刊已许可中国知网、维普网、万方数据等知识服务平台以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。本刊支付的稿酬已包含著作权使用费,所有署名作者向本刊提交文章发表之行为视为同意上述声明。

《黑龙江农业科学》编辑部