

叶秀仙, 黄敏玲, 樊荣辉, 等. 秋水仙素对文心兰离体诱变的影响 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (11): 1083-1087.

YE X-X, HUANG M-L, FAN R-H, et al. Effects of Colchicine on Mutagenesis of *Oncidium* In Vitro [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 29 (11): 1083-1087.

秋水仙素对文心兰离体诱变的影响

叶秀仙^{1,2,3}, 黄敏玲^{1,2,3*}, 樊荣辉^{1,2,3}, 吴建设^{1,2,3}, 罗远华^{1,2,3}

(1. 福建省农业科学院作物研究所, 福建 福州 350013; 2. 福建省农业科学院花卉研究中心,
福建 福州 350013; 3. 福建省特色花卉工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘要: 以秋水仙素为诱变剂, 结合组织培养技术, 对文心兰丛生芽和原球茎进行诱变试验, 并应用分子标记技术检测诱变后代的变异情况。结果表明: 培养基添加秋水仙素混合培养法是文心兰丛生芽诱变的最佳途径, 以添加 500 mg·L⁻¹的秋水仙素诱导 10 d 效果最佳, 植株变异率高达 26.7%, 变异植株类型包括植株粗壮、多叶、叶片变宽、变厚、矮化、叶片线艺等; 经 5~6 次继代培养, 部分变异株系仍保持稳定遗传性状, 其中筛选出的稳定绿叶金边、金叶绿边变异株系 RAPD 标记表明其在 DNA 水平上发生了变异, 为文心兰育种提供了新的方法和思路。

关键词: 文心兰; 离体培养; 原球茎; 秋水仙素; 化学诱变

中图分类号: S 68

文献标识码: A

Effects of Colchicine on Mutagenesis of *Oncidium* In Vitro

YE Xiu-xian^{1,2,3}, HUANG Min-ling^{1,2,3*}, FAN Rong-hui^{1,2,3}, WU Jian-she^{1,2,3}, LUO Yuan-hua^{1,2,3}

(1. Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou, Fujian 350013, China;
2. Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Science, Fuzhou, Fujian 350013, China;
3. Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: With colchicine was used as the mutagenic agent, combined with tissue culture techniques, the mutagenesis experiments for bud clump and PLB of *Oncidium* and the molecular marker technology to detect mutagenesis progeny were studied. Results showed that method of mixed medium supplemented with colchicine was the best way to mutage the *Oncidium*, and the best condition was 10d induction with 500 mg·L⁻¹ of colchicine. Plant mutation rate was as high as 26.7%, and there were different mutation forms, such as haircheded, polyphyllous, dwarfed plantlets and widened, thickened leaves, and linear, patterned leaves. Mutant strain went through 5~6 successive transfer culture, and part of them remained properties well. Among them, the variation with golden margin leaves and variation with green margin golden leaves had apparent variation compared with the original species on DNA level by RAPD markers. It suggested a new breeding methods and ideas for *Oncidium*.

Key words: *Oncidium*; culture in vitro; protocorm-like body; colchicines; chemical mutagenesis

文心兰系兰科文心兰属 *Oncidium* 植物, 其花形奇特、花姿秀美、花色亮丽, 具有很高的观赏价值, 倍受国内外花卉市场的青睐, 已成为洋兰类的新宠之一^[1-2]。文心兰品种改良的主要手段是杂交育种, 但文心兰不论种间杂交或属间杂交, 常出现杂交

不亲和, 其结实率均远低于其他兰花种类^[3-4], 故其品种改良进展十分缓慢。诱变育种是兰花育种最有效的育种途径之一^[5-7], 迄今为止, 国内外关于文心兰离体化学诱变的报道极少, 崔广荣等以文心兰类原球茎薄切片为外植体, 用秋水仙素对离体薄切片

收稿日期: 2014-08-04 初稿; 2014-09-28 修改稿

作者简介: 叶秀仙 (1977—), 女, 副研究员, 主要从事花卉组织培养技术研究 (E-mail: yxx7861@163.com)

* 通讯作者: 黄敏玲 (1960—), 女, 研究员, 主要从事花卉品种选育与生物技术研究 (E-mail: huangml618@163.com)

基金项目: 福建省科技重大专项 (2010NZ0003); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD-2-1317); 福建省自然科学基金项目 (2012J01114); 福建省花卉苗木品种引进与研发创新项目 (闽林种站 [2013] 42 号); 福建省种业创新与产业化工程项目 (2014S1477-14)

再生类原球茎过程诱导多倍体苗获得成功^[8-9]。目前,关于文心兰盆栽品种‘蜜糖’诱变育种还未见报道。本研究在参考已有的兰科植物诱变育种研究工作的基础上,利用本中心已建立的文心兰高效稳定的离体培养再生体系^[10-11],结合秋水仙素诱变技术,对文心兰丛生芽、原球茎进行了诱变处理,旨在探讨秋水仙素处理对培养材料的诱变效应,为文心兰离体诱变育种技术体系的建立作初步探讨,并为文心兰新品种选育提供实验依据,为后续新、奇、特变异植株的筛选提供育种材料。

1 材料与方法

1.1 材料

以福建省农业科学院作物研究所花卉研究中心诱导保存的文心兰盆栽品种‘蜜糖’(*Onc.* ‘Sweat Sugar’)丛生芽和原球茎无性系为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 秋水仙素浸泡法 将获得的株高为 2.0~3.0 cm 无菌试管苗上部叶片切掉,剩约 1 cm,置于不同浓度(100、300、400、500、600、1 000 mg·L⁻¹)的秋水仙素溶液中,80 r·min⁻¹分别振荡培养 24、48、72 h,用无菌水冲洗 5~6 次,再转入固体继代培养基 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹中培养。

1.2.2 秋水仙素加入培养基混培法 选择个体发育一致的原球茎(简称 PLB, 直径大小 2~3 mm)以及正常生长的无菌试管苗(株高为 2.0~3.0 cm, 切去上部叶片, 剩约 1 cm)为诱导培养材料,将其转接在分化诱导培养基 MS+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹添加不同浓度秋水仙素溶液(300、400、500、600、1 000 mg·L⁻¹)中,分别处理 7~14 d 后,转入固体继代培养基中继续培养。以上秋水仙素浓度处理代号分别为 A、B、C、D、E 表示,秋水仙素培养天数处理分别用 1、2、3 表示。

1.2.3 观察与统计 变异植株观察:以外部形态发生变化作为初步判断变异植株的依据,变异类型为植株粗壮、叶片颜色加深、叶片形状改变、线艺等类型。筛选出的变异植株进行继代培养,继续观察形态变化。

统计参数:死亡率(%)=处理后死亡材料数/处理材料数×100%

试管苗诱变率(%)=处理后变异苗数/用秋水仙素处理的苗数×100%

PLB 再生苗诱变率(%)=处理后再生苗的

变异苗数/用秋水仙素处理的再生数×100%

1.2.4 RAPD 分子标记检测 随机选取经 5~6 代继代培养再生后代仍表现稳定遗传性状的绿叶金边、金叶绿边变异株系的试管苗,每种类型 10 株,CTAB 法分别提取植株叶片 DNA^[12],以种质资源圃活体保存的母本植株为对照,应用 200 个 RAPD 随机引物(S1~S200)进行检测。采用 25.0 μL PCR 反应体系,包括 10 × Buffer 2.5 μL、2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 2 μL、5 U·μL⁻¹ Taq 酶 0.3 μL、10 μmol·L⁻¹ RAPD 随机扩增引物 1.0 μL、ddH₂O 18.2 μL、模板 DNA 1.0 μL。扩增反应程序为 94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min; 37℃复性 1 min; 72℃延伸 2 min, 40 个循环, 72℃延伸 8 min, 最后 4℃保存。电泳结束后在凝胶成像系统分析仪中观察并拍照,比较变异植株与对照植株的条带差异。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素浸泡法对文心兰试管苗的诱变效果

随着秋水仙素浸泡浓度和处理时间的延长,部分试管苗在浸泡过程中出现不同程度的伤害,主要是出现不同程度的褐化,将处理后未褐化试管苗接种到继代培养基上培养,部分死亡,剩余再生苗出现植株粗壮,叶片增宽增厚,表面出现轻微皱折,叶色浓绿,部分叶片畸形(叶片出现深裂,锯齿状),部分多叶、矮化等变异,植株生长速度明显减慢。如表 1 所示,浓度越高其死亡率越高,浓度为 300 mg·L⁻¹的秋水仙素对文心兰试管苗处理 72 h,死亡率达 60.0%,当浓度大于 300 mg·L⁻¹,处理时间达 72 h 时,死亡率均达 100.0%;秋水仙素浓度 400~600 mg·L⁻¹处理试管苗 24 h,变异率达 10.0%~23.3%,其中 500 mg·L⁻¹的秋水仙素处理 24 h,其变异率最高,达 23.3%。

2.2 秋水仙素加入培养基混合培养法对文心兰试管苗的诱变效果

秋水仙素加入培养基混合培养法对文心兰试管苗的诱变效果与浸泡法处理类似,再生苗出现植株粗壮,叶片增宽增厚,部分多叶、矮化等变异(图 1)。如表 2 所示,文心兰试管苗变异率随处理时间和浓度的变化而变化,处理时间越短,秋水仙素浓度越低,变异率越低;处理时间延长,秋水仙素浓度增加,变异率随之增加,但增加到一定浓度变异率反而降低,主要表现为兰心死亡,且伤害程度随着浓度的提高和时间的延长而加强。因此,要获得

较高的变异率，筛选适宜的处理时间和秋水仙素浓度处理组合是非常重要的。本试验结果表明，添加 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的秋水仙素处理文心兰试管苗 10 d 效果最佳，变异率最高，达 26.7%。

表 1 秋水仙素浸泡法对文心兰试管苗的诱变效果

Table 1 Effects of colchicine immersion method on mutagenesis of *Oncidium* plantlet

秋水仙素浓度 /(mg · L ⁻¹)	浸泡时 间/h	处理株 数/株	死亡株 数/株	死亡率 /%	变异株 数/株	变异率 /%
100	24	30	2	6.7	0	0
	48	30	5	16.7	1	3.3
	72	30	7	23.3	1	3.3
300	24	30	8	26.7	2	6.7
	48	30	10	33.3	3	10.0
	72	30	18	60.0	0	0
400	24	30	15	50.0	4	13.3
	48	30	21	70.0	2	6.7
	72	30	24	80.0	0	0
500	24	30	16	53.3	7	23.3
	48	30	27	90.0	0	0
	72	30	30	100.0	0	0
600	24	30	20	66.7	3	10.0
	48	30	28	93.3	0	0
	72	30	30	100.0	0	0
1000	24	30	25	83.3	1	3.3
	48	30	30	100.0	0	0
	72	30	30	100.0	0	0

注：死亡苗是指培养 30d 后叶片黄化后逐渐死亡的试管苗。下同。

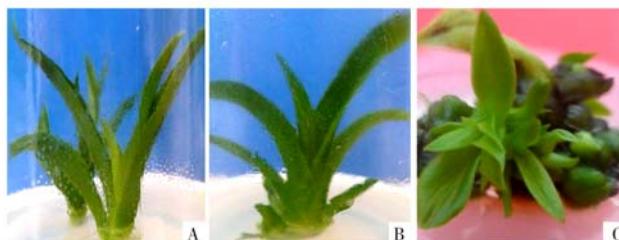


图 1 秋水仙素处理后试管苗再生植株变异体

Fig. 1 Variants of regenerated plants from plantlet treated with colchicines

注：A 为对照，B 为类多倍体变异，C 为多叶丛生变异。

2.3 秋水仙素加入培养基混培法对文心兰原球茎的诱变效果

将处理后原球茎接种到继代培养基上培养，随着秋水仙素浓度的增加及处理时间的延长，原球茎死亡率增加，具体如表 3 所示，一些原球茎能继续生长，将这些原球茎继代培养，部分新形成的原球茎比

对照大，其分化出的植株粗壮，苗茎部明显变粗，这些植株可能是多倍体^[8]。在处理后原球茎分化的植株中，除上述变异外，还发现了多叶，叶片变宽变厚、颜色加深、矮化、叶片线艺等类型，统计变异植株占分化植株的百分率。其中叶艺的表现类型比较丰富，有叶形的变化，也有叶色的变化。特别是叶色的变化较为突出，有绿叶金边型、金叶绿边型、金叶型、金绿相间型等叶色变异植株(图 2)。

表 2 秋水仙素加入培养基混培法对文心兰试管苗的诱变效果

Table 2 Effects of medium supplemented with colchicine on mutagenesis of *Oncidium* plantlet

秋水仙素浓度 /(mg · L ⁻¹)	浸泡时 间/h	处理株 数/株	死亡株 数/株	死亡率 /%	变异株 数/株	变异率 /%
300	7	30	5	16.7	1	3.3
	10	30	6	20.0	2	6.7
	14	30	10	33.3	2	6.7
400	7	30	6	20.0	1	3.3
	10	30	9	30.0	2	6.7
	14	30	15	50.0	3	10.0
500	7	30	8	26.7	3	10.0
	10	30	10	33.3	8	26.7
	14	30	15	50.0	4	13.3
600	7	30	15	50.0	2	6.7
	10	30	16	53.3	2	6.7
	14	30	18	60.0	3	10.0
1000	7	30	21	70.0	1	3.3
	10	30	24	80.0	2	6.7
	14	30	30	100.0	0	0

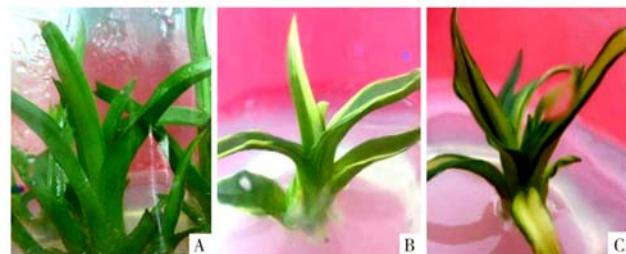


图 2 秋水仙素处理后原球茎再生植株变异体

Fig. 2 Variants of regenerated plants from PLB treated with colchicines

注：A 为对照，B 为绿叶金边变异，C 为金叶绿边变异。

如图 3 所示，秋水仙素处理后再生植株变异率明显大于对照材料，处理间的变异几率也存在着明显的差异。不同处理浓度产生变异植株的百分率大

小为 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} > 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} > 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} > 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} > 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 同一浓度不同处理时间下, 产生变异植株的几率大小随时间的延长

升高、降低或先升后降, 其中 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理 7 d 的变异率最大达 10.8%, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理 7 d 的变异率最低, 仅为 4.5%。

表 3 秋水仙素加入培养基混培法对文心兰类原球茎(PLB)的诱变情况

Table 3 Effects of medium supplemented with colchicine on mutagenesis of *Oncidium* PLB

秋水仙素浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	处理时间 /d	处理 PLB 数 /个	死亡数 /个	死亡率 /%	变异情况
300	7	50	5	10.0	少量 PLB 增大, 幼叶畸形、多叶、矮化
	10	50	10	20.0	
	14	50	12	24.0	
400	7	50	7	14.0	PLB 增大, 幼叶花叶、变宽变厚
	10	50	14	28.0	
	14	50	15	30.0	
500	7	50	22	44.0	PLB 增大, 幼叶变细、变宽变厚
	10	50	24	48.0	
	14	50	25	50.0	
600	7	50	20	40.0	PLB 增大, 幼叶变宽变厚
	10	50	23	46.0	
	14	50	26	52.0	
1000	7	50	28	56.0	PLB 增大, 幼叶变宽变厚
	10	50	29	58.0	
	14	50	38	76.0	

注: 变异情况仅描述变异植株较为突出的变异表现。

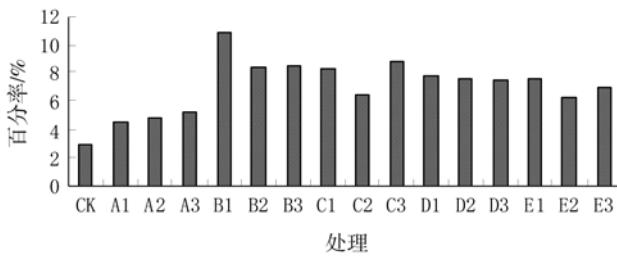


图 3 秋水仙素处理后 PLB 再生植株变异植株

Fig. 3 Variant rate of regenerated plants from PLB treated with colchicines

2.4 RAPD 分子标记检测

应用 200 个 RAPD 随机引物对诱变后再生植株和对照植株基因组进行 PCR 扩增。图 4 为 RAPD 随机引物 S37 扩增图谱。结果表明, 所有引物均能扩增出清晰的带谱。其中绿叶金边变异株型中, 引物 S37 在 1 800 bp 处出现新的特异条带; 金叶绿叶变异株型中, 引物 S37 在 650 bp 处出现新的特异条带; 并且重复性均好 (3 次重复结果一致), 说明秋水仙素处理的再生苗在 DNA 水平上发生了变异。

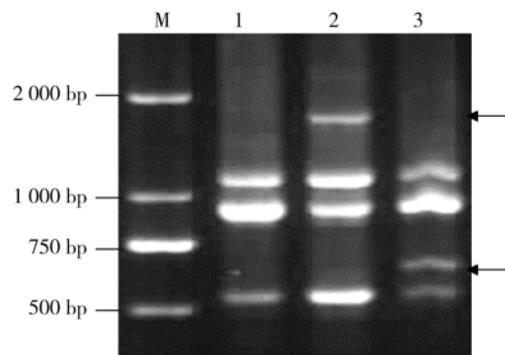


图 4 RAPD 扩增图谱

Fig. 4 Map of RAPD amplification

注: M 为 DL2000 marker, 1 为对照植株, 2 为绿叶金边变异株系, 3 为金叶绿边变异株系。

3 讨论与结论

把化学诱变育种技术与植物组织和细胞离体培养技术相结合, 对遗传变异的诱发、繁殖、改良选择技术具有独特的优势和发展潜力, 具有不受环境条件限制、节省大量人工和时间、扩大变异谱和提高变异率等优点^[13-14]。秋水仙素是诱导染色体加

倍的常用药剂，处理浓度低则处理时间长，浓度高则处理时间短。应用上可以采用多种方法如混培法、先预培养后处理法等，通常浸泡法诱导率较高^[14-17]。

本试验采用秋水仙素浸泡法和混合培养法，其中混合培养法诱导途径诱导变异植株变异率最高，达 26.7%；诱导再生后的植株都有表现为粗壮、矮化、叶片增宽增厚和叶片线艺等变异，这些变异现象在秋水仙素诱变处理墨兰和大花蕙兰杂种 F₁ 原球茎中也有发现^[18-19]，具体原因有待于进一步研究探讨。本试验中获得了大量变异植株，特别是获得叶片线艺表现丰富的变异植株，其中部分变异植株经 5、6 代的继代培养，仍然表现为稳定的变异，RAPD 标记表明其在 DNA 水平上发生了变异，这些变异植株在兰花育种中有重要观赏价值，为文心兰的育种提供了选育材料。

文心兰不同品种染色体数目差异较大，而且染色体数目与文心兰花色、花型、株型及其抗逆性等生物学性状密切相关^[20]，表明诱变产生文心兰变异植株在生产上具有较大的潜在应用价值，本试验证实了化学诱变与组织培养技术结合应用在文心兰诱变育种的可行性。本试验获得的文心兰稳定变异植株还需要进一步经过细胞学鉴定和园艺价值的观察，以便筛选出新、奇、特的变异植株，丰富文心兰品种。

参考文献：

- [1] 何松林, 十鸟三和子, 王献, 等. 不同基本培养基及培养方式对文心兰原球茎增殖的影响 [J]. 华北农学报, 2001, 16 (1): 88—91.
- [2] 何松林, 十鸟三和子. 基本培养基及凝固剂对文心兰试管苗生长发育的影响 [J]. 北京林业大学学报, 2001, 23 (1): 29—31.
- [3] 丁兰, 付庭治. 兰花生物工程研究进展 [J]. 西北师范大学学报, 2000, 36 (3): 111—115.
- [4] 叶炜, 尚伟, 夏潮水. 文心兰育种研究进展 [J]. 三明农业科技, 2008, (3): 17—19.
- [5] 邱金. 文心兰的杂交育种 [J]. 花卉, 2010, (4): 18—19.
- [6] 范成明, 李枝林, 何月秋. 兰花组织培养及分子生物学研究进展 [J]. 园艺学报, 2003, 30 (4): 487—491.
- [7] 刘玉进, 郑成木. 诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用 [J]. 上海农业学报, 2004, (1): 19—22.
- [8] 崔广荣, 上官凌飞, 张子学, 等. 文心兰类原球茎液体增殖过程中秋水仙素化学诱变 [J]. 园艺学报, 2009, 16 (9): 1385—1389.
- [9] 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.
- [10] 叶秀仙, 黄敏玲, 吴建设等. 文心兰茎尖诱导丛生芽高频率植株再生 [J]. 福建农业学报, 2009, 24 (2): 126—137.
- [11] 叶秀仙, 黄敏玲, 钟淮钦, 等. 文心兰离体再生体系建立及试管苗种质保存研究. 中国观赏园艺研究进展 2009 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2009: 193—197.
- [12] 肖军, 杨立国, 杨涛, 等. 两种提取菊花总 DNA 的方法比较 [J]. 辽宁农业科学, 2005, (1): 40—41.
- [13] 刘进平, 郑成木. 诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用 [J]. 上海农业学报, 2004, 20 (1): 19—22.
- [14] 董颖苹, 连勇, 何庆才, 等. 植物化学诱变技术在育种中的运用及其进展 [J]. 种子, 2005, 24 (7): 54—58.
- [15] 瞿素萍, 熊丽, 莫锡君, 等. 香石竹的多倍体诱导及其变异研究 [J]. 西南农业大学学报, 2004, (5): 609—612.
- [16] 何林, 张洁, 郭启高, 等. 东方百合 Tuber 多倍体诱导及其快繁研究 [J]. 西南农业大学学报, 2006, (6): 945—949.
- [17] 敬成俊, 李昌庭, 邓亚平, 等. 秋水仙素间断式诱导植物多倍体研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35 (7): 45—51.
- [18] 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.
- [19] 敬成俊, 李昌庭, 邓亚平, 等. 秋水仙素间断式诱导植物多倍体研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 25 (7): 45—51.
- [20] FELIX L P, GUERRA M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids [J]. Plant Systematics and Evolution, 2005, 254 (3): 131—148.

(责任编辑: 柯文辉)