

中国兰叶色突变体生理生化分析

蒋 彧¹, 何俊蓉¹, 熊剑锐^{1,2}, 李 萍², 卓碧萍¹

(1. 四川省农业科学院 园艺所, 农业部西南地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 四川 成都 610066;

2. 西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031)

摘 要:以中国兰春剑‘隆昌素’和其叶色突变体‘叶艺隆昌素’为试材,通过测定组培苗叶片及根状茎增殖重量、分化率及生理生化指标,研究了生理生化特性对叶色突变体增殖与分化效率的影响。结果表明:叶艺突变体根状茎增殖、分化能力及分化苗平均株高均降低。叶色突变体试管苗叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a+b 含量分别为对照的 16.71%、15.86%、16.49%,且在叶色突变体根状茎分化成苗的过程中,叶绿素 b 含量增加,而叶绿素 a 含量降低,而类胡萝卜素相对含量高。可溶性糖含量、可溶性蛋白质含量降低,丙二醛含量及相对电导率升高;活性氧清除酶系中过氧化物酶活性升高,超氧化物歧化酶活性和过氧化氢酶活性降低。可见叶色突变体的增殖与分化效率与其生理生化特性密切相关。

关键词:中国兰;叶色突变体;生理生化特性

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)07-0065-04

中国兰是我国传统名贵花卉,长期以来深受世界各国人民的喜爱。随着时代的变迁,花卉市场的开拓,对叶片上出现银色或金色的斑块或条纹的叶艺兰愈发重视,其观赏和商品价值数倍增加^[1]。鉴于中国兰叶艺性状对其商品性的重要作用,因而研究其形成机理,对人工诱发叶艺具有重要意义。关于叶艺兰的形成原因尚鲜见报道,但已有学者分析,由部分叶肉细胞缺绿引起花叶的原因是多种多样的,基因突变、营养缺乏、病毒感染或真菌寄生等均可造成局部叶片细胞的白化或黄化^[2-4]。陈少宏^[5-6]认为线艺兰中的金嘴、边;银嘴、边,部分绿艺(浅绿或黄绿底,绿色嘴或边),黑色艺(正常峦色底,墨绿色嘴或边)的出艺原因,可能是来源于生殖细胞的基因突变,是由一对或几对等位基因决定的性状,它们的艺向区别分明,不相含混,属于质量性状的遗传。在栽培实践中,上述各类线艺的性状十分稳定,一旦出现不会消失。这类线艺兰多是从野生原种中获得或可在人工杂交后代中选育,极少在栽培品种中突变获得。关于线艺兰遗传类型的观点,目前仍然是一种假说,需

要更多的科学研究为叶艺兰的发展提供可靠的理论依据。现研究了叶艺兰生理生化特性,有助于从理论上阐释叶艺产生的机理,以为叶艺兰的育种提供理论依据,并对其它科、属观叶植物人工诱发叶色变异的研究也具有参考价值,同时对‘叶艺隆昌素’的产业化开发也具有一定的参考指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为春剑‘隆昌素’根状茎及试管苗(以下称对照)和春剑‘叶艺隆昌素’根状茎及试管苗(以下称叶色突变体)。“叶艺隆昌素”是极其难得的通过兰花茎尖组织培养技术获得的叶色突变材料,属线缟及中透缟,其独特的魅力和艺术价值,自问世以来,一直是兰苑大家族的娇宠,具有较高的文化和经济价值,为四川省农业科学院园艺研究所特有材料(图 1)。

1.2 试验方法

培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+AC 0.3%。培养基 pH 6.0。白天温度 22~25℃、夜间温度 18℃左右;光照周期 14 h/d,光照强度 2 000 lx。接种 180 d 后取材料进行指标测定。

1.3 项目测定

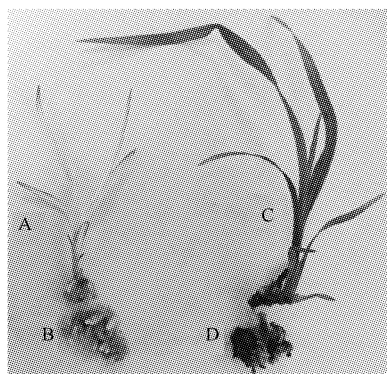
1.3.1 叶绿素和类胡萝卜素含量的测定 参照刘永军等^[7]的方法,分别测定对照和叶色突变体根状茎与试管苗叶片的叶绿素和胡萝卜素的含量,并比较差异。试验 3 次重复。

第一作者简介:蒋彧(1983-),女,博士研究生,助理研究员,现主要从事花卉生物技术等研究工作。E-mail:iamjiangyu@163.com.

责任作者:何俊蓉(1962-),女,本科,研究员,现主要从事花卉育种与栽培等研究工作。E-mail:junrh@126.com.

基金项目:四川省应用基础研究计划资助项目(2014JY0106);公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(201203071)。

收稿日期:2014-11-12



注:A.‘叶艺隆昌素’组培苗;B.‘叶艺隆昌素’根状茎;C.‘隆昌素’组培苗;D.‘隆昌素’根状茎。

Note: A. *Cymbidium longibracteatum* ‘Longchangsui’ with verge line pattern leaves seedlings *in vitro*; B. *Cymbidium longibracteatum* ‘Longchangsui’ with verge line pattern leaves rhizomes; C. *Cymbidium longibracteatum* ‘Longchangsui’ seedlings *in vitro*; D. *Cymbidium longibracteatum* ‘Longchangsui’ rhizomes.

图1 ‘叶艺隆昌素’(左)与‘隆昌素’(右)

Fig. 1 *Cymbidium longibracteatum* ‘Longchangsui’ with verge line pattern leaves(left) and normal *Cymbidium longibracteatum* ‘Longchangsui’ (right)

1.3.2 生理生化指标测定 叶片的相对电导率、可溶性糖含量、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化

表2 叶色突变体与对照叶绿素及类胡萝卜素含量

Table 2 The contents of chlorophyll and carotenoids in mutants and CK

类型 Type	w(叶绿素 a chl a) /(mg · g ⁻¹)	w(叶绿素 b chl b) /(mg · g ⁻¹)	w(叶绿素 a+b chl a+b) /(mg · g ⁻¹)	w(叶绿素 a chl a) /w(叶绿素 b chl b)	w(类胡萝卜素 carotenoids) /(mg · g ⁻¹)	w(类胡萝卜素 carotenoids) /w(叶绿素 chl)
对照叶片 Leaves of control	8.580±0.003	3.058±0.001	11.641	2.807	3.048±0.008	0.262
对照根状茎 Rhizomes of control	1.383±0.007	0.550±0.011	1.935	2.512	0.627±0.010	0.325
叶色突变体叶片 Leaves of mutants	1.434±0.018	0.485±0.009	1.920	2.952	0.631±0.019	0.330
叶色突变体根状茎 Rhizomes of mutants	0.049±0.010	0.023±0.002	0.073	2.147	0.032±0.010	0.451

从叶绿素 a/b 来看,叶色突变体叶片和根状茎分别为对照的 105.17%、85.47%。说明在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。此为叶色突变体的另一特征。

从类胡萝卜素的含量看,叶色突变体根状茎和叶片低于对照,但类胡萝卜素/叶绿素指标显示叶色突变体叶片和根状茎都相对较高,分别为对照的 125.95%和 138.77%。由此可见,类胡萝卜素相对含量高是叶色突变体的第 3 个特征。

2.3 可溶性糖含量、可溶性蛋白质含量

由图 2 可知,叶色突变体可溶性糖含量及可溶性蛋白质含量均低于对照,只有对照的 53.35%和 66.51%,说明叶色突变体有机物合成及转化能力降低。

2.4 丙二醛含量和相对电导率

由表 3 可知,叶色突变体丙二醛(MDA)含量、相对

氢酶(catalase, CAT)活性测定参照植物生理学实验教程[8]。

2 结果与分析

2.1 根状茎分化、增殖及试管苗生长

由表 1 可知,叶色突变体根状茎增殖重量、根状茎分化率及苗平均株高分别为对照的 71.05%、37.72%和 62.62%。表明叶色突变体根状茎增殖和分化能力下降,叶色突变体试管苗长势缓慢。

表1 叶色突变体与对照增殖及分化的差异

Table 1 Differences of the rhizome's multiplication and differentiation between mutants and CK

类型 Type	根状茎平均增殖重量 Average multiplication weight/g	根状茎平均分化率 Average rate of buds from rhizome/ %	苗平均株高 Average seedlings height/cm
对照 CK	11.47	51.17	9.07
叶色突变体 Mutants	8.15	19.30	5.68

2.2 叶绿素含量和类胡萝卜素含量

从表 2 可以看出,对照和叶色突变体在根状茎和叶片的色素含量方面有较大的差别。从叶片色素含量和组成来看,叶色突变体叶片的叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a+b 含量分别为对照的 16.71%、15.86%、16.49%,叶色突变体繁殖体根状茎的叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a+b 含量分别为对照的 3.54%、4.18%、3.77%。由此可见,叶绿素含量低下是叶色突变体的显著特征之一。

电导率均高于对照,分别为对照的 1.23、1.39 倍。MDA 是膜脂过氧化的最终产物,反映了细胞膜脂过氧化状况。由于试验材料为试管苗,都很幼嫩,细胞膜脂过氧化程度很低,但叶色突变体仍比对照有较强的膜脂过氧

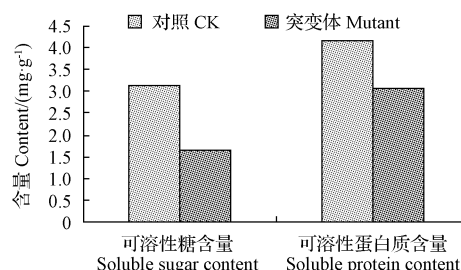


图2 叶色突变体与对照可溶性糖、可溶性蛋白质含量差异

Fig. 2 Differences in soluble sugar content, soluble protein content between mutants and CK

表 3 叶色突变体与对照 MDA 含量、
相对电导率差异

Table 3 Differences in MDA content,
relatively conductivity rate between mutants and CK

类型 Type	丙二醛含量 MDA content/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	相对电导率 Relatively conductivity rate/%
对照 Control	0.0097	0.123
叶色突变体 Mutants	0.0119	0.171

化损失,膜系统受到了一定破坏。

2.5 抗氧化酶活性

从图 3 可以看出,叶色突变体抗氧化酶系统中 SOD 活性和 CAT 活性低于对照,分别为对照的 64.18% 和 44.12%,而 POD 活性显著高于对照,为对照的 1.56 倍。说明叶色突变体抗氧化酶系统发生了破坏,氧自由基清除受到影响。

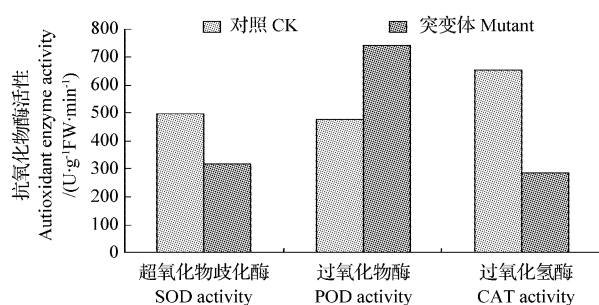


图 3 叶色突变体与对照抗氧化酶活性比较

Fig. 3 Comparison of antioxidant enzyme
activities between mutants and CK

3 讨论

植物的形态结构、增殖与分化效率与其生理功能和生长环境密切相关。该试验研究对象‘叶艺隆昌素’,其缟艺明显,严重失绿,根状茎增殖、分化效率和苗平均株高降低,与叶绿素含量、可溶性糖含量、可溶性蛋白质含量、SOD 活性、CAT 活性呈正相关,与 MDA 含量、相对电导率、POD 活性呈负相关。‘叶艺隆昌素’生理生化特性的改变反映出失绿会影响根状茎和试管苗物质合成、运输及转换能力,最终导致形态改变、生理功能异常、抗性降低、分化能力下降。但引起叶艺的主导因素尚不确定,有待进一步的研究。

近年来,叶色突变体生理生化特性逐渐引起人们的重视。在叶色黄化突变体甜瓜^[9]、水稻条斑和颖花异常双突变体^[10]等中发现,叶绿素的生物合成受阻,生理生化特性发生变化,使突变体体内活性氧代谢系统保持平衡,使得突变体免于死亡。该研究中,叶色突变体 SOD 活性和 CAT 活性均高于对照,而 MDA 含量和相对电导率也较高,可溶性糖含量和可溶性蛋白质含量下降,这与其叶绿素 b 含量缺乏可能存在一定关系。叶艺突变体 SOD 和 CAT 2 种保护酶活性作用不足以清除细胞中产生的活性氧自由基等有害物质,导致膜脂过氧化加深,细胞膜透性加剧,表现在 MDA 含量增加,相对电导率升高。该研究中,叶色突变体 POD 活性高于对照,推测可能与 POD 活性高可抑制生长素的活动,使细胞伸长减少有关^[11],该结果与叶色突变体苗生长情况吻合。可见,抗氧化酶系统失调造成的活性氧积累可能也在叶色突变体中发挥了重要作用。

参考文献

- [1] 沈心宝. 从兰花诱导叶艺说开去[J]. 中国花卉盆景, 2008(2): 14-15.
- [2] Maria A R, Alejandra M, Aline B C, et al. Spatial patterns of photosynthesis in thin and thick-leaved epiphytic orchids: unravelling C3-CAM plasticity in an organ-compartmented way[J]. Annals of Botany, 2013, 112: 17-29.
- [3] Yu Y H, Zhao J P, Chia C H, et al. Research on orchid biology and biotechnology[J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(9): 1467-1486.
- [4] Yu Y H, Wen C T, Chang S K, et al. Comparison of transcripts in *Phalaenopsis bellina* and *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) flowers to deduce monoterpene biosynthesis pathway[J]. BMC Plant Biology, 2006, 6: 14.
- [5] 陈少宏. 线艺兰初探-试论国兰的遗传变异与选育之三[J]. 广东园林, 2002(3): 44-47.
- [6] 陈少宏. 试论国兰的遗传变异与选育[J]. 广东园林, 1999(1): 34-36.
- [7] 刘永军, 郭守华. 植物生理生化实验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 26.
- [8] 路文静, 李奕松. 植物生理学实验教程[M]. 北京: 中国林业出版社, 2012: 34-110.
- [9] 邵勤, 于泽源, 李兴国, 等. 高艳娟叶色黄化突变体甜瓜叶片内部生理生化变化的研究[J]. 中国蔬菜, 2013(14): 59-65.
- [10] Cheng D X, Mabin T, Wang Y P, et al. Physiological and Biochemical characteristic of a stripe mutant with abnormal flower organ in rice[J]. Agricultural Science and Technology, 2009, 10(4): 15-18.
- [11] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985: 171-180.

Research on Physiological and Biochemical Characters of Leaf Color Mutants in Chinese Orchid

JIANG Yu¹, HE Jun-rong¹, XIONG Jian-rui^{1,2}, LI Ping², ZHUO Bi-ping¹

(1. Key Laboratory of Horticultural Crops, Biology and Germplasm Enhancement in Southwest Regions, Ministry of Agriculture, Institute of Horticulture, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu, Sichuan 610066; 2. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031)

DOI:10.11937/bfyy.201507022

水分胁迫对楠木幼苗抗逆生理特性的影响

黄晓蓉, 李玮婷, 刘刚, 徐振东, 费永俊

(长江大学 楠木种质资源评价及创新中心, 湖北 荆州 434025)

摘 要:以 1 年生楠木实生苗为试材, 研究测定了楠木在不同土壤含水量条件下相关的生理指标, 以期对楠木幼苗的培育及应用提供参考。结果表明: 由土壤干旱和水涝引起的水分胁迫都会对楠木幼苗的生理特性产生不同程度的影响, 但变化趋势大致相同, 表现为楠木幼苗的叶绿素含量降低, 丙二醛(MDA)含量明显上升, 超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性和可溶性蛋白质含量都随着胁迫时间的延长表现为先升高后降低的趋势。表明楠木幼苗对由土壤干旱和水涝引起的水分胁迫都具有一定的适应性。

关键词:楠木; 水分胁迫; 生理指标

中图分类号:S 792.24 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)07-0068-04

楠木(*Phoebe zhennan* S. Lee et F. N. Wei)属樟科楠木属的常绿大乔木, 又名楠树、桢楠, 主要分布于我国的四川、贵州、湖南和湖北各省, 为我国所特有的珍贵用材树种, 是国家Ⅱ级保护渐危种, 具有很高的经济、生态和观赏价值^[1-2]。由于长期以来楠木种质资源遭受人为破坏, 天然楠木林几近摧毁, 致使自然界楠木大多以散生为主, 存在于以壳斗科树种建群的常绿阔叶林中^[3]。我国的楠木人工培育开始较早, 长江以南各省均有楠木人工培育, 但对楠木的不同生态因子进行造林试验研究却很少, 不能做到适地适树, 从而具有很大的盲目性。

第一作者简介:黄晓蓉(1990-), 女, 湖北钟祥人, 硕士研究生, 研究方向为园林植物种质资源研究与利用。

责任作者:费永俊(1965-), 男, 博士, 教授, 现主要从事园林植物种质资源的评价与研究工作。E-mail: fyy2010@163.com.

基金项目:湖北省科技支撑计划资助项目(2013BBB24)。

收稿日期:2014-11-13

水分是决定植物生长良好与否的主要生态因子之一, 由干旱缺水和水涝引起的水分胁迫是植物受到的最常见的逆境胁迫, 直接影响到植物的生长发育和产量^[4-5]。该试验旨在通过研究楠木幼苗从干旱到水涝不同水分状态下的生理特性, 了解水分胁迫对楠木幼苗产生的影响以及楠木幼苗对此产生的反应和适应, 以期对楠木的培育及应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 1 年生楠木实生苗, 采自湖北省荆州市长江大学苗圃大田。2013 年 5 月选取生长一致的幼苗盆栽于长江大学植物园内缓苗(塑料花盆的规格为 21 cm×15 cm×18.5 cm)。盆栽基质采用 V(河沙): V(椰粉): V(珍珠岩): V(陶粒)=3: 2: 2: 1 的比例混合, 基质饱和持水量为 46%。

Abstract: The *in vitro* shoots of *Cymbidium longibracteatum* 'Longchangsus' with verge line pattern leaves and normal *Cymbidium longibracteatum* 'Longchangsus' as materials, the effect of multiplication and differentiation on the mutants were studied by the detection of the multiplication weight and differentiation rate and physiological and biochemical index determination of the leaves and rhizomes. The results showed that the rhizomes' multiplication and differentiation were lower than those of the contrasts, so was the average height. The mutants' chlorophyll a and chlorophyll b and chlorophyll a+b were 16.71%, 15.86%, 16.49% of the contrasts respectively. Chlorophyll b and carotenoids/chlorophyll were increased while chlorophyll a was decreased during the differentiation from the rhizomes to shoots. The contents of soluble sugar and protein were decreased. MDA content and the relative conductivity were increased. The activities of antioxidant enzymes, such as catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were lower while peroxidase (POD) activity were higher in the mutants than in the contrasts. The multiplication and differentiation of the mutants were closely related to the physiological characteristics.

Keywords: Chinese orchid; leaf color mutant; physiological and biochemical characters