

# 送春与多花兰杂种的非共生萌发与快速繁殖

周丽<sup>1,2</sup>, 胡春根<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学 园林学院 湖北 武汉 430070; 2. 黔西南民族师专化生系 贵州 兴义 562400)

**摘要:**用地生兰送春和附生兰多花兰进行种间杂交,对杂交种子进行非共生萌发和快速繁殖研究。结果表明:胚龄7个月、0.1 mol/L KOH 处理10 min的种子萌发率最高;种子萌发后原球茎的增殖以Z<sub>4</sub>(KC+BA 0.4 mg/L+NAA 0.6 mg/L+KT 0.2 mg/L)培养基为最好,增殖系数可达到12.8;在原球茎增殖和分化成苗过程中加入活性炭能够有效地防止切口褐化。

**关键词:**杂种;非共生萌发;胚;原球茎

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)03-0181-03

国兰是指兰属(*Cymbidium*)植物的地生种类<sup>[1]</sup>,其花香馥郁,叶姿飘逸深受人们喜爱,我国有着上千年的养兰历史,也驯化出许多名贵兰花<sup>[2]</sup>。但是,绝大多数国兰名品都是从下山兰中选择得到的自然变异或天然杂交种,很少是通过人工杂交育种得到。我国兰属的育种进展缓慢,长期以来限制了我国优质兰花资源的应用。国兰新品种培育难度大的主要原因有:自然条件下种子萌发困难;萌发后形成根状茎成苗较难;小苗移栽到开花所需的时间较长,所以育种周期长。近年来国内有一些科研单位也进行国兰杂交育种工作,有少数兰花杂交品种在国内正式登录,但未见成规模化与产业化。该研究以送春和多花兰的种间杂种为材料,探索杂种非共生萌发的最佳条件,为国兰的育种工作做一些基础的探索工作。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以送春为母本,多花兰为父本,人工授粉后得到的杂交种子及其萌发后的原球茎。两亲本的选择原则是:希望利用杂种优势使母本在花色、花朵数目、叶姿方面得到父本的一些特性。

### 1.2 方法

**1.2.1 人工授粉** 送春选花绿色,唇瓣斑点少的;多花兰选花红色,唇瓣斑点红的为亲本。授粉前选择花葶中部大蕾期的花朵,每枝花葶留2~3朵花,其余的剪除。授粉时取出父本开放第2天的花粉块放入母本开放第3~4天的蕊腔中。授粉后在挂牌上注明授粉组合,授粉时间及授粉的花朵数。加强肥水管理,定期观察果实的

发育情况。授粉于2006年3月进行。

**1.2.2 杂种萌发条件探索** 用不同胚龄的种子,采用不同的方法处理种皮,摸索杂种萌发的最佳胚龄和种皮处理方法。果实消毒:蒴果蒸馏水洗净后用75%酒精表面消毒30 s,浸入95%酒精中5 s,取出后于酒精灯上点燃,待表面酒精烧尽(不要在酒精灯上烤)。剖开果实,取出种子,用不同方法处理后播种于培养基上。种子萌发基本培养基为改良Kaudson C(钙盐用量减半)+BA 0.5 mg/L+NAA 5.0 mg/L,蔗糖3%,琼脂0.6%,CM 15%(体积比),香蕉汁10%,pH=5.65。培养温度(25±1℃),光强2 000 lx,光照时间16 h/d。培养基还加有蔗糖3%,琼脂0.6%,AC 0.04%,香蕉汁10%,CM 15%(体积比),pH=5.65。

**1.2.3 原球茎的快速繁殖** 用直径大于3 mm的原球茎横切后接种于增殖培养基上,每个处理6个重复。接种后每15 d统计一次每瓶的原球茎数,共统计到第60天。试验结果录入Excel中,以每个处理的每瓶平均原球茎数计算标准差,作出柱形图,用SAS V8软件进行单因素方差分析。

表1 原球茎增殖的培养基

处理	基本培养基	激素组合/mg·L <sup>-1</sup>		
		BA	NAA	KT
Z <sub>1</sub>	改良 KC	0.5	0.5	—
Z <sub>2</sub>	改良 KC	0.5	1.0	—
Z <sub>3</sub>	改良 KC	1.0	0.5	—
Z <sub>4</sub>	改良 KC	0.4	0.6	0.2
Z <sub>5</sub>	改良 KC	0.2	0.6	—

## 2 结果与分析

### 2.1 胚龄对杂种萌发的影响

授粉后3个月的种子,外观呈浅白色粉尘状,在显微镜下可见白色的种皮,种皮上的网格状增厚不明显,但胚也不明显,播种后不能产生原球茎;授粉后5个月的种子,外观稍带浅黄色,显微镜下可见种皮呈浅黄色,

第一作者简介:周丽(1978-),女,硕士,讲师,现主要从事名贵观赏植物、药材及兰科植物的快速繁殖工作。E-mail:zhoulizxx@yahoo.com.cn.

收稿日期:2008-10-16

有较小的胚位于种皮中央,播种后 120 d 产生,较少的原球茎;授粉后 7 个月的种子,外观呈浅黄色,在显微镜下可见到种皮呈褐色,种皮上有明显的网格状增厚,胚较大且胚柄明显,播种后在 56 d 就能看到有小米粒大的原球茎产生,能够有理想的萌发效果;授粉后 9 个月的种子,外观呈黄色,显微镜下可见种皮呈深褐色,种皮较厚,胚大小与 7 个月时差不多但胚为褐色,播种后 80 d 有原球茎产生但萌发率只有 40%左右。

表 2 不同胚龄杂种胚对胚萌发的影响

胚龄	送春×多花兰	
	萌发起始时间/d	萌发率/%
3 个月	—	0
5 个月	120	少数
7 个月	56	90
9 个月	80	40

2.2 种皮处理方法对杂种萌发的影响

种皮不处理的种子启动萌发所需要的时间长,萌发率低;用 0.1 mol/L KOH 处理种皮时间以 10 min 最好,启动萌发时间早,萌发率最高;如果用 0.1 mol/L KOH 处理 20 min 则因为处理时间过长,种子长期处于碱性条件下,启动萌发得慢,萌发率最低;采用手术刀切割种皮的方法随机性太强,虽然可提早萌发,但是萌发率并不高。所以采用 0.1 mol/L KOH 处理种皮 10 min 是最佳的处理方法。

表 3 种皮处理方法对萌发的影响

处理	接种瓶数/瓶	萌发启动时间/d	萌发率/%
不处理	6	113	10
0.1 mol/L KOH 5 min	6	70	25
0.1 mol/L KOH 10 min	6	60	85
0.1 mol/L KOH 20 min	6	130	5
切割	6	58	18

2.3 原球茎增殖

萌发后形成的原球茎在萌发培养基上不能很好的生长,如长时间不转入增殖培养基还易褐化死亡。所以,及时将萌发后的小原球茎切割后转接到增殖培养基上进行增殖培养是得到更多小苗的前提条件。

方差分析结果表明,5 个处理对原球茎增殖的显著性差异,其中 Z<sub>4</sub>的增殖效率最高,增殖系数达 12.8,Z<sub>5</sub>的最低。在原球茎增殖的研究中发现,由于生长素与细胞分裂素的比例不同,外植体的生长表现不同,当细胞分裂素与生长素比值为 1 或更高时(比如在 Z<sub>1</sub>、Z<sub>3</sub>、Z<sub>4</sub>培养基中)被横切的原球茎表现能够连续增殖出更多的原球茎,当细胞分裂素与生长素的比值低于 1 时(比如在 Z<sub>2</sub>、Z<sub>5</sub>培养基中),原球茎的增殖系数小,较早的分化出根和叶,形成健壮小苗。从图 1 可见,接种后 15 d 原球茎增殖数量少,接种后 30~45 d 原球茎增殖数量最多,在 Z<sub>2</sub>、Z<sub>5</sub>培养基中原球茎仅在接种后 15 d 增殖数目多,接种 25 d 后原球茎的数目没有增加而是分化长出叶和根。

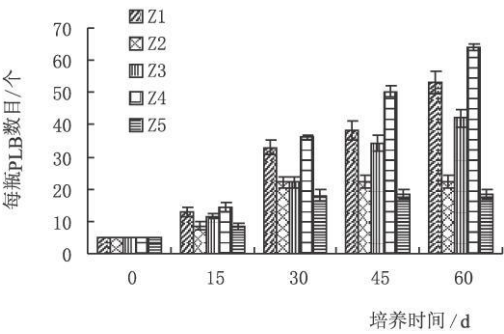


图 1 培养时间对 PLB 增殖的影响

从表 4 中可见,5 种培养基中 Z<sub>1</sub>、Z<sub>3</sub>、Z<sub>4</sub> 是适于原球茎增殖的,其中以 Z<sub>4</sub>的增殖系数最高,可以在短期内得到大量的原球茎;Z<sub>2</sub>、Z<sub>5</sub> 适于原球茎分化成苗,在这类培养基上适当降低细胞分裂素用量或增加生长素用量做成生根培养基,可使接种的原球茎顺利成苗。

表 4 增殖培养基在不同培养时间的增殖系数

培养基	增殖系数			
	培养 15 d	培养 30 d	培养 45 d	培养 60 d
Z <sub>1</sub>	2.60±0.21ab	6.6±0.45b	7.67±0.59b	10.6±0.68b
Z <sub>2</sub>	1.73±0.29c	4.4±0.32c	4.50±0.41d	4.20±0.41d
Z <sub>3</sub>	2.33±0.16b	4.4±0.34c	6.87±0.47c	8.40±0.53c
Z <sub>4</sub>	2.83±0.28a	7.2±0.18a	10.07±0.33a	12.8±0.22a
Z <sub>5</sub>	1.67±0.21c	3.6±0.33d	3.63±0.29e	3.60±0.29e

注: p<0.05 差异显著。

2.4 原球茎分化、壮苗与移栽

增殖后的原球茎切割后在生根培养基上分化成健壮小苗。切割后的原球茎有一定面积的伤口容易褐化,将培养基中活性碳的用量增加能够有效的防止褐化。试验表明,在相同的培养基中若不加活性碳,在外植体切口处产生大量的酚类物质,这些酚类物质被氧化后形成褐色物,使得原球茎在分化出根后在假鳞茎和根部上端受到褐化物的毒害,移栽后成活率低,褐化严重时还不能形成健壮的小苗。

当小苗长到具 4~6 枚长 10 cm 以上的叶片时可进行移栽,试管苗出瓶前在室温下练苗 2 周,出瓶后用 0.01%高锰酸钾浸泡 3 min,阴凉处晾干表面水分,用灭菌后充分浸水的水苔拧干后栽培。1 周内不浇水,保持空气湿度 80%~90%,通风,成活率可达 90%以上。

3 讨论

一般热带附生兰种子萌发较易,萌发后形成原球茎,成苗快,但地生兰种子萌发较难,种子萌发后形成根状茎,成苗困难,成苗至开花需要的时间长。该杂交组合中以附生兰多花兰为父本与地生兰送春杂交,杂种的萌发率较高,杂种胚在萌发过程中形态结构类似于原球茎和根状茎的复合体,大大提高了成苗率。

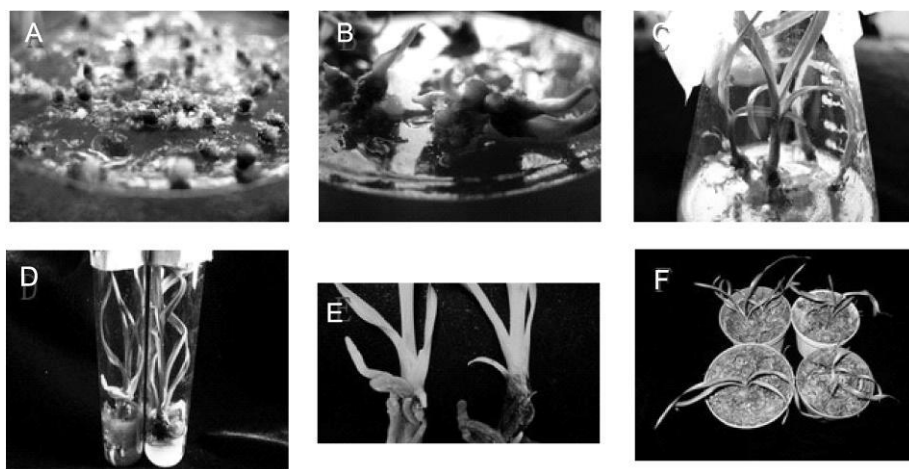
胚龄对杂种的萌发影响很大。在兰科等缺少胚乳的植物中,常常存在特殊的结构,代替胚乳的作用,以保证胚发育的营养来源。兰科的胚柄结构特化,如吸器表现具吸收营养的功能,但胚柄是一个短命的构造,在种子发育的后期常常停止生长退化<sup>[3]</sup>。该研究表明:早期时胚发育不足萌发率低,授粉7个月时胚发育充分,胚柄的活力好,能很快发挥吸收作用,能提早萌发且萌发率高,是进行非共生萌发的最佳时期,授粉9个月后,种子充分成熟,胚柄功能退化,萌发抑制物质积累,所以萌发时间推迟且萌发率降低。种皮处理以0.1 mol/L KOH处理10 min最好,播种后60 d就启动萌发,萌发率最高可达85%。

萌发后的原球茎要及时转到增殖培养基上培养才能顺利增殖并分化成苗,否则容易褐化死亡。较小的原

球茎虽然不切割,但是在转接过程中会受到镊子的刺伤,培养一段时间后在伤口周围会形成更多的新生原球茎;较大的原球茎横切后在原来胚柄端的切面上能产生大量新的原球茎,增殖率最高。培养过程中原球茎的伤口周围容易褐化,在增殖培养基和生根培养基中加入活性炭能够很好抑制褐化,有利于原球茎的增殖和生根成苗。

### 参考文献

- [1] 刘仲健,陈心启,茹正忠. 中国兰属植物[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 1.
- [2] 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 1-10.
- [3] 胡适宜. 被子植物生殖生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 218-229.



附图 种子萌发后各阶段

A: 种子萌发后形成原球茎; B: 原球茎增殖; C: 试管苗; D、E: 活性炭防止生根时的褐化; F: 试管苗移栽。

## Asymbiotic Germination and Rapid Propagation of Hybrid of *Cymbidium cyperifolium* var. *szechuanicum* and *C. floribundum*

ZHOU Li<sup>1,2</sup>, HU Chun-gen<sup>1</sup>

(1. Huazhong Agricultural University, College of Horticulture and Forestry Science, Wuhan, Hubei 430070, China; 2. Southwest Guizhou Teachers College for Nationalities, Xingyi, Guizhou 562400, China)

**Abstract:** Interspecific hybridization was carried out between terrestrial orchid *Cymbidium cyperifolium* var. *szechuanicum* and epiphytic orchid *C. floribundum*, to study on the asymbiotic germination and rapid propagation of hybrid seeds. The results showed that Seven-month-embryo-aged-seeds had the highest germination rate, when treated with 0.1 mol/L KOH for 10 min. After germination, the best medium for PLBs propagation was Z4 (KC+BA 0.4 mg/L + NAA 0.6 mg/L+KT 0.2 mg/L), the rate of PLBs proliferation could reach 12.8. Adding activated carbon to medium prevented the cut browning in the process of PLB's multiplication and differentiation.

**Key words:** Hybrid; Asymbiotic germination; Embryo; Protocorm-like body