

有性三倍体杂交兰‘黄荷兰’的快速繁殖

徐仕英¹, 李映雪¹, 吴 忱¹, 朱 娇¹, 郭和蓉^{1,2}, 曾瑞珍^{1,2}

(1. 华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东 广州 510642;

2. 华南农业大学 广东省植物分子育种重点实验室, 广东 广州 510642)

摘 要:以‘黄荷兰’试管苗为试材,采用组织培养快速繁殖方法,研究了影响有性三倍体杂交兰‘黄荷兰’根状茎诱导、增殖、分化、生根壮苗和试管苗移栽的因素,以期建立‘黄荷兰’种苗工厂化生产技术体系。结果表明:横切茎尖的起始脱分化时间早于纵切,诱导率高于纵切。切割长度、外源激素、光照强度和有机附加物对根状茎的增殖影响显著,将根状茎切割成长 0.50 cm 接种到 MS+6-BA 1.00 mg·L⁻¹+NAA 0.20 mg·L⁻¹+土豆 80.00 g·L⁻¹+蔗糖 30.00 g·L⁻¹+卡拉粉 7.00 g·L⁻¹+AC 0.30 g·L⁻¹培养基中培养 40 d,根状茎增殖系数为 3.18。外源激素对根状茎的分化影响显著,将根状茎掰成长 1.00 cm 接入 MS+6-BA 1.00 mg·L⁻¹+NAA 0.20 mg·L⁻¹+蔗糖 20.00 g·L⁻¹+卡拉粉 7.00 g·L⁻¹+AC 0.02 g·L⁻¹培养基中培养 40 d,芽分化率和苗分化率分别为 60.00%和 57.50%。将 4 cm 高的苗转入 1/2MS+6-BA 0.10 mg·L⁻¹+NAA 0.50 mg·L⁻¹+蔗糖 20.00 g·L⁻¹+卡拉粉 7.00 g·L⁻¹+AC 0.50 g·L⁻¹中培养 50 d,平均株高和根数分别为 7.32 cm 和 3.56 条。4 月和 10 月用水草移栽,试管苗成活率分别为 98.67%和 99.67%。上述研究结果说明,利用组织培养快速繁殖技术工厂化生产‘黄荷兰’种苗是可行的。

关键词:杂交兰;有性多倍体;根状茎;快速繁殖

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2019)09-0069-08

兰花(*Cymbidium*)是中国的传统名花,具有广阔的市场前景^[1]。种苗生产是兰花产业的核心技术,兰花种苗生产主要采用组织培养快速繁殖技术进行。因此研究兰花组织培养快速繁殖技术对促进兰花种苗工厂化生产和产业发展具有重要意义。多倍体育种是兰花育种的重要方法^[2],目

前许多商业化的大花蕙兰品种都是多倍体^[3],而有关国兰和杂交兰多倍体育种也有一些研究报道^[4-6]。因此深入研究多倍体的组培繁殖特性对进一步明确多倍化对兰花组培快繁特性的影响,促进兰花种苗工厂化生产具有重要作用。

已有研究表明,倍性是影响兰花组培快繁效率的重要因素。XIE 等^[7]研究结果表明,与同源二倍体相比,同源四倍体大花蕙兰增殖率与二倍体没有显著差异,但同源三倍体增殖率显著低于同源二倍体和四倍体;不同倍性大花蕙兰芽分化率差异显著,二倍体最高、四倍体次之,三倍体最低,但根分化率差异不显著。王园园^[8]研究结果表明,同源四倍体杂交兰根状茎分枝性显著弱于二倍体。迄今,尚鲜见有关有性三倍体杂交兰组培快繁特性和技术的研究报道。

‘黄荷兰’(Hybrid *Cymbidium* ‘Huanghe’)是采用二倍体杂交兰‘大风兰’(Hybrid *Cymbid-*

第一作者简介:徐仕英(1993-),女,硕士研究生,研究方向为花卉组培快繁。E-mail:1512402834@qq.com.

责任作者:曾瑞珍(1971-),女,硕士,副研究员,硕士生导师,现主要从事花卉遗传育种等研究工作。E-mail:zengrz@scau.edu.cn.

基金项目:广东省科技计划资助项目(2015A020209101, 2017B020201010);广州市科技计划项目产学研协同创新重大专项资助项目(201604020065);广州市农业局资助项目(1610519, 1710212);清远市科技计划资助项目(2017A005)。

收稿日期:2019-01-15

ium Maureen Carter ‘Dafeng’)和二倍体‘鹤之华墨兰’(Cymbidium sinense ‘Hezhihua’)杂交选育的有性三倍体($2n=60$)杂交兰新品系(图 1-a, c, d)。该品系株型紧凑,凤尾形叶,花大、黄色、荷型、香气浓郁,市场前景广阔。该研究以试管苗茎尖为外植体,研究影响‘黄荷兰’根状茎诱导、增殖、分化、生根壮苗和试管苗移栽等因素,为建立‘黄荷兰’种苗工厂化生产技术体系、加快产业化进程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为从‘大风兰’和‘鹤之华墨兰’杂交组合中选出的有性三倍体($2n=60$)‘黄荷兰’试管苗(图 1-b, c, d)。

1.2 试验方法

1.2.1 根状茎诱导

选取生长状况良好的组培苗(图 1-b),在超净工作台上用镊子和解剖刀分离茎尖,纵切或横切(图 1-g)后接种于 MS+6-BA $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +椰子汁(CW) 5.00% +蔗糖 $30.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +活性炭(AC) $0.50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH (5.8 ± 0.2) ,下同)培养基上,在温度为 $(26\pm1)^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下培养。每瓶接种 3 个外植体,10 瓶为 1 次重复,重复 3 次。观察记录起始脱分化时间,40 d 后统计诱导形成根状茎的外植体数,计算诱导率。

1.2.2 根状茎增殖

外源激素 6-BA 对根状茎增殖的影响:将根状茎切成约 0.50 cm 长,接种到含不同外源激素的 MS+蔗糖 $30.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +AC $0.30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增殖培养基上,在光照条件下培养。外源激素 NAA 浓度为 $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,6-BA 浓度设 7 个处理:0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对照组不添加任何激素。

光照对根状茎增殖的影响:将根状茎切成约 0.5 cm 长,接种于 MS+蔗糖 $30.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +AC $0.30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 MS+蔗糖 $30.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +AC $0.30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上,分别在光照和黑暗条件下培养。

切割长度对根状茎增殖的影响:将根状茎切成约 0.50 、 1.00 、 1.50 cm 长,分别接种于 MS+6-BA $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +AC $0.30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上,在光照条件下培养。

有机物添加对根状茎增殖的影响:将根状茎切成约 0.50 cm 长,接种于分别添加 $80.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉、 20.00% 椰子汁和 $80.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 土豆的 MS+蔗糖 $30.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +AC $0.30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上,在光照条件下培养,对照组不添加任何有机附加物。

以上每处理 3 次重复,每重复 5 瓶,每瓶约 2.00 g 根状茎(记录具体质量,图 1-i)。接种后在温度 $(26\pm1)^{\circ}\text{C}$,光照强度 $(1\ 000\pm100)\text{ lx}$ 、光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 或黑暗条件下培养,40 d 后,称量每瓶根状茎鲜质量,计算增殖系数。

1.2.3 根状茎分化

外源激素 6-BA 对根状茎分化的影响:将根状茎切成约 1.00 cm 长(图 1-l),接种于添加不同外源激素的 MS+蔗糖 $20.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +AC $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上。外源激素 NAA $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,6-BA 设 7 个浓度处理:0.00、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对照组不添加任何激素。

有机附加物对根状茎分化的影响:将根状茎切成约 1.00 cm 长,接种于分别添加 20.00% 椰子汁、 $80.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 土豆的 MS+6-BA $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $20.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +AC $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上,对照组为不添加任何有机附加物。

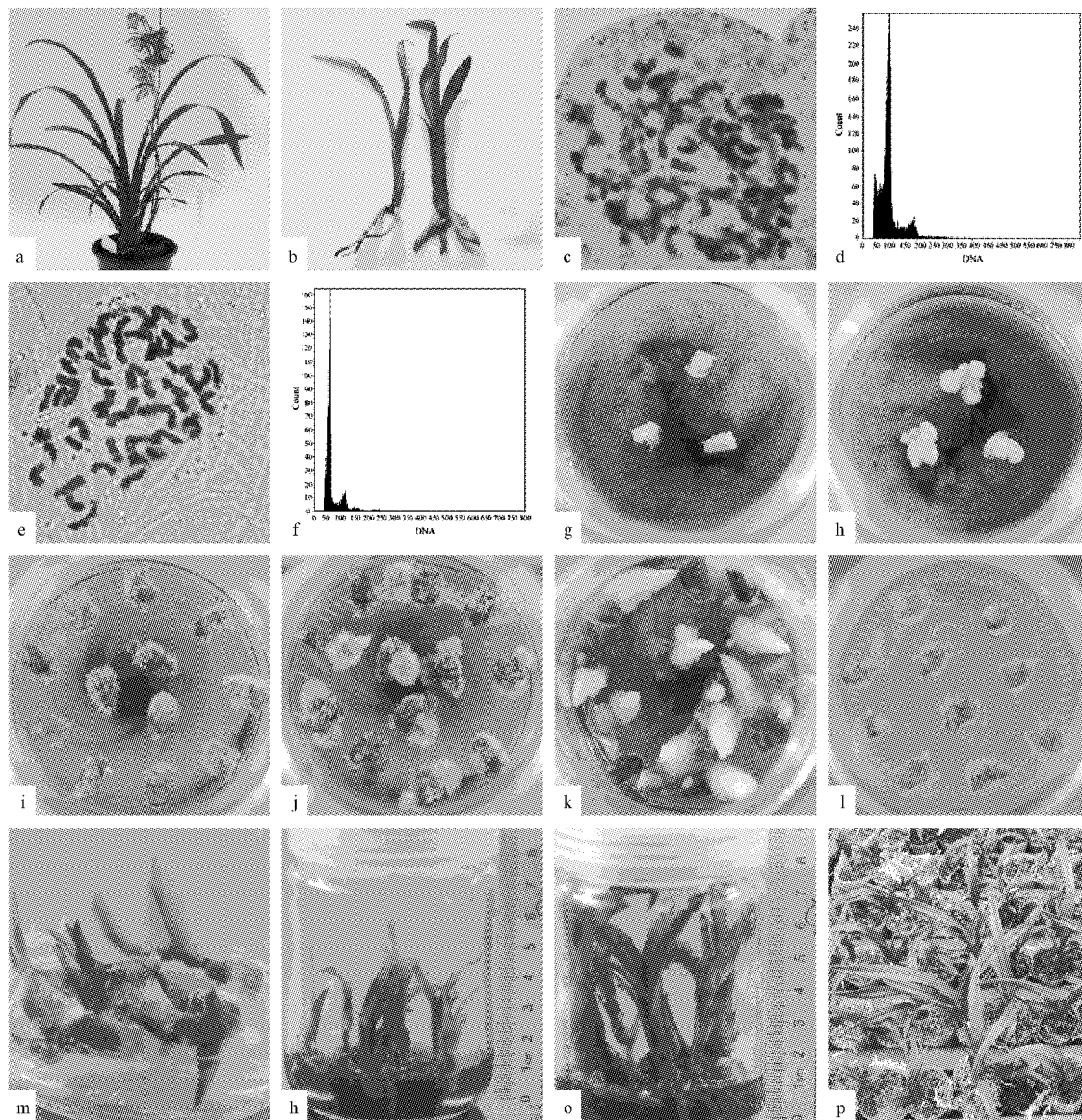
以上每处理 3 次重复,每重复 4 瓶,每瓶 10 条根状茎,接种后在温度 $(26\pm1)^{\circ}\text{C}$,光照强度 $(2\ 000\pm100)\text{ lx}$,光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 下培养。40 d 后,统计分化出芽和苗的根状茎数和每条根状茎上的芽苗数,计算芽分化率、苗分化率、平均芽分化数和苗分化数。

1.2.4 生根壮苗

将高 4.00 cm 左右的幼苗(图 1-n)接入附加不同外源激素或 20.00% 椰子汁的 $1/2\text{MS}$ +6-BA $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $20.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +卡拉粉 $7.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +AC $0.50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上,外源激素共设 11 个处理(表 1)。每处理设 3 次重

复,每重复4瓶,每瓶8苗。接种后在温度 $(26 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照强度 $(2\,000 \pm 100)\text{ lx}$,光照时间

$12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 下培养。50 d后测量苗高、最长叶片长、叶宽、根数、最长根长及根粗。



注:a.开花植株;b.同组合二倍体对照(左)和‘黄荷兰’(3x,右)的试管苗;c,d.试管苗根尖细胞染色体数($2n=60$)和流式细胞图;e,f.二倍体对照根尖细胞染色体数($2n=40$)和流式细胞仪图;g.培养0 d的茎尖;h.培养40 d后的根状茎;i.增殖0 d的根状茎;j.光照条件下增殖40 d的根状茎;k.黑暗条件下增殖40 d的根状茎;l.分化0 d的根状茎;m.分化40 d的根状茎和芽;n.生根壮苗培养0 d的苗;o.生根壮苗培养50 d的苗;p.移栽60 d试管苗。

Note:a. Flowering plant; b. Diploid contrast (left) and *Cym.* ‘Huanghe’ (right) seedling; c, d. Chromosomes in root tip cell ($2n=60$) and flow cytometric DNA histograms of *Cym.* ‘Huanghe’ seedling; e, f. Chromosomes in root tip cell ($2n=40$) and flow cytometric DNA histograms of diploid contrast; g. Shoot tip cultured for 0 d; h. Rhizome formed after cultured for 40 d; i-k. Proliferation culture; i. Rhizome cultured for 0 d; j. Rhizome after cultured for 40 d in light condition; k. Rhizome after cultured for 40 d in dark condition; l-m. Differentiation culture; l. Rhizome cultured for 0 d; m. Rhizome and regenerated shoots after cultured for 40 d; n-o. Rooting and seedling strengthening culture; n. Shoot cultured for 0 d; o. Seedlings after cultured for 50 d; p. Seedlings after transplantation for 60 d.

图1 ‘黄荷兰’的倍性及组培快繁

Fig. 1 Ploidy level and microropagation of hybrid *Cymbidium* ‘Huanghe’

表1 ‘黄荷兰’生根壮苗培养基

Table 1 Medium for rooting and strengthening of *Cymbidium* ‘Huanghe’ seedling

处理 Treatment	NAA /(mg·L ⁻¹)	CW /%	处理 Treatment	NAA /(mg·L ⁻¹)	CW /%	处理 Treatment	NAA /(mg·L ⁻¹)	CW /%
Z0	0.00	0	Z4	0.40	0	Z8	2.00	0
Z1	0.10	0	Z5	0.50	0	Z9	2.50	0
Z2	0.20	0	Z6	1.00	0	Z10	3.00	0
Z3	0.30	0	Z7	1.50	0	Z11	0.50	20.00

1.2.5 试管苗移栽

在2017年1—10月进行试管苗移栽。移栽时将试管苗洗净晾干,用树皮:泥炭土:椰糠=1:1:1的混合基质或水草,种植于6 cm×6 cm的白色种植袋中,每袋1苗,放置于31 cm×50 cm的筛中,每筛40苗,放在环控温室中栽培,栽培条件为20~30℃,光照强度8 000~10 000 lx,相对湿度70%~90%。60 d后统计存活的苗数,计算成活率。

1.3 项目测定

诱导率(%)=诱导生根数/接种茎尖数×100;增殖系数=培养后质量/培养前质量;芽分化率(%)=分化处出芽的根状茎数/接种的根状茎数×100;苗分化率(%)=分化处出苗的根状茎数/接种的根状茎数×100;平均芽分化数(个)=分化出芽的总数/接种的根状茎数;平均苗分化数(个)=分化出苗的总数/接种的根状茎数;成活率(%)=成活株数/移栽时株数×100。

1.4 数据分析

采用Excel 2010和SPSS 22.0软件进行统计分析,平均数据以平均数±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 rangel test)。

2 结果与分析

2.1 切割方式对‘黄荷兰’根状茎诱导的影响

切割方式对‘黄荷兰’根状茎的诱导影响显著,横切(图1-h)的诱导率(98.89%)显著高于纵切,起始脱分化时间(10.22 d)早于纵切(表2)。表明横切有利于‘黄荷兰’根状茎的诱导。

2.2 影响‘黄荷兰’根状茎增殖的因素

2.2.1 外源激素

外源激素对‘黄荷兰’根状茎增殖影响显著

(图2-a),在不添加激素时(CK),根状茎增殖系数为2.53,在NAA浓度为0.20 mg·L⁻¹时,随着6-BA浓度的增加,增殖系数随之增大,当6-BA为1.00 mg·L⁻¹时增殖系数最高,为2.71,随6-BA浓度进一步增加,增殖系数随之降低。表明适宜‘黄荷兰’根状茎增殖培养基为MS+6-BA 1.00 mg·L⁻¹+NAA 0.20 mg·L⁻¹+蔗糖30.00 g·L⁻¹+卡拉粉7.00 g·L⁻¹+AC 0.30 g·L⁻¹。

表2 ‘黄荷兰’根状茎的诱导

Table 2 Rhizome induction of *Cymbidium* ‘Huanghe’

处理 Treatment	诱导率 Induction rate /%	起始脱分化时间 Initial time of dedifferentiation/d
横切 Transverse cutting	98.89±1.11a	10.22±0.21a
纵切 Longitudinal cutting	87.78±1.11b	13.34±0.43b

注:同列相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著, $P<0.05$ 。下同。

Note: Different letters within the same column mean significant difference, the same letters indicate no significant difference, $P<0.05$. The same as below.

2.2.2 光照强度

光照条件下培养新形成的根状茎为绿色(图1-j),而在黑暗条件下的为白色(图1-k)。在不添加任何外源激素的培养基上,光照强度对‘黄荷兰’根状茎增殖影响不显著,而在添加NAA 0.20 mg·L⁻¹和6-BA 1.00 mg·L⁻¹培养基上,光照强度对‘黄荷兰’根状茎增殖影响显著(图2-b)。表明在添加外源激素的培养基上,光照有利于‘黄荷兰’根状茎增殖。

2.2.3 切割长度

切割长度对‘黄荷兰’根状茎增殖影响显著(图2-c),当切割长度为0.50 cm(图1-i)时,根状茎增殖系数最高,为2.71,随着切割长度增长,增殖系数逐渐降低。表明‘黄荷兰’根状茎增殖适宜的切割长度为0.50 cm。

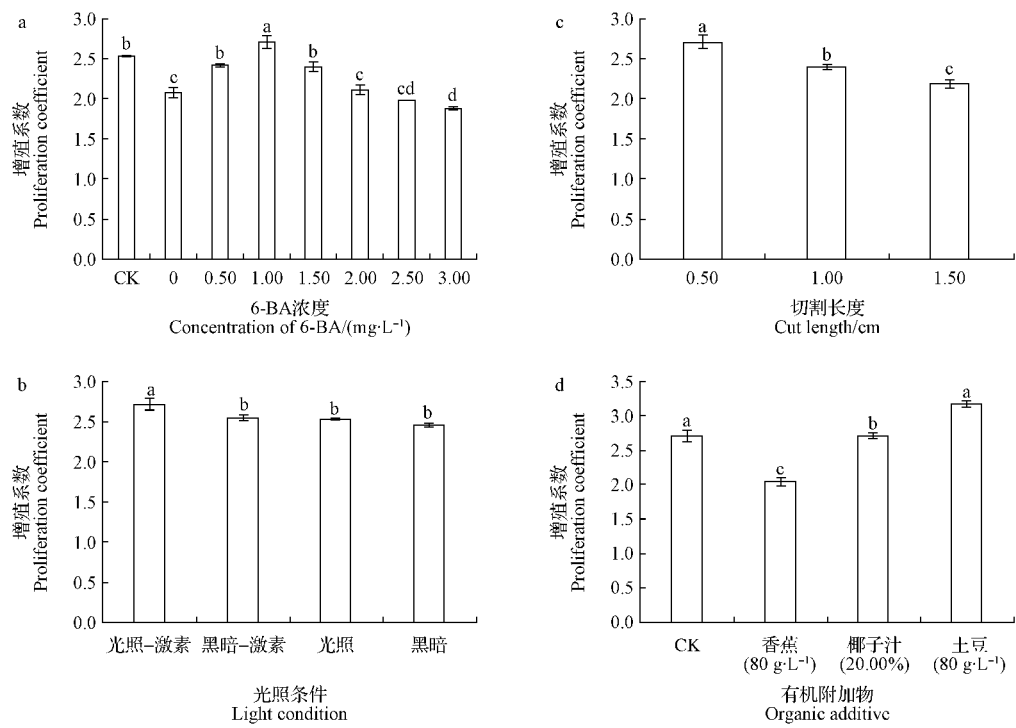


图 2 ‘黄荷兰’根状茎增殖的影响

Fig. 2 Factors influencing on rhizome proliferation of *Cymbidium* ‘Huanghe’

2.2.4 有机附加物

有机附加物对‘黄荷兰’根状茎的增殖影响显著(图 2-d),添加 80.00 g · L⁻¹土豆显著促进根状茎增殖,增殖系数为 3.18。添加 20.00%椰子汁对根状茎增殖无显著性影响,而添加 80.00 g · L⁻¹香蕉则显著抑制根状茎的增殖。

2.3 影响‘黄荷兰’根状茎分化的因素

2.3.1 外源激素

外源激素对‘黄荷兰’根状茎分化影响显著

(表 3),在无外源激素和只添加 NAA 0.20 mg · L⁻¹培养基上,芽分化率分别为 83.33%和 96.67%,苗分化率分别为 1.67%和 2.33%。在添加 6-BA 0.50 mg · L⁻¹和 NAA 0.20 mg · L⁻¹培养基上(图 1-m),苗分化率和平均苗分化数均最高,分别为 85.00%和 1.10 个,表明 MS+6-BA 0.50 mg · L⁻¹+NAA 0.20 mg · L⁻¹+蔗糖 20.00 g · L⁻¹+卡拉粉 7.00 g · L⁻¹+AC 0.02 g · L⁻¹适合‘黄荷兰’通过一步分化途径生

表 3 ‘黄荷兰’根状茎分化的影响

Table 3 Factors influencing on rhizome differentiation of *Cymbidium* ‘Huanghe’

6-BA /(mg · L ⁻¹)	NAA /(mg · L ⁻¹)	芽分化率 Bud differentiation rate/%	苗分化率 Seedling differentiation rate/%	平均芽分化数 Average number of bud differentiated	平均苗分化数 Average number of seedling differentiated
0.00	0.00	83.33±3.33b	1.67±0.83d	0.84±0.03de	0.02±0.01c
0.00	0.20	96.67±0.83ab	2.33±0.17d	0.97±0.01cd	0.04±0.01c
0.50	0.20	14.17±3.00d	85.00±3.82a	0.14±0.03f	1.10±0.03a
1.00	0.20	60.00±10.10c	57.50±6.61b	0.69±0.15e	0.58±0.08b
1.50	0.20	57.50±8.04c	45.00±8.66c	0.67±0.13e	0.51±0.11b
2.00	0.20	94.17±1.67ab	7.50±1.44d	1.14±0.04c	0.08±0.02c
2.50	0.20	100.00±0.00a	0.00±0.00d	1.69±0.12b	0.00±0.00c
3.00	0.20	100.00±0.00a	0.00±0.00d	2.00±0.06a	0.00±0.00c

产种苗。在 MS+6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 卡拉粉 $7.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + AC $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上,‘黄荷兰’根状茎芽分化率和苗分化率分别为 60.00% 和 57.50%,总分化率最高(117.50%)。随着 6-BA/NAA 比例的进一步提高,芽分化率进一步提高,苗分化率逐步降低,表明 6-BA/NAA 比值高有利于芽分化,不利于根分化。

2.3.2 有机附加物

有机附加物对‘黄荷兰’根状茎的分化培养影响显著(表 4)。添加 20.00% 椰子汁,对芽分化率和平均芽分化数无显著影响,但苗分化率和平均苗分化数显著降低。添加 $80.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 土豆,芽分化数和芽分化率显著提高,而苗分化率和平均根分化数显著降低,表明其中添加 $80.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 土豆有利于芽分化,但不利于根分化。

表 4 有机附加物对‘黄荷兰’根状茎分化的影响

Table 4 Effect of organic additive on rhizome differentiation of *Cymbidium* ‘Huanghe’

有机附加物 Organic additive	芽分化率 Bud differentiation rate/%	苗分化率 Seedling differentiation rate/%	平均芽分化数 Average number of bud differentiated	平均苗分化数 Average number of seedling differentiated
0.00	60.00±10.10b	57.50±6.61a	0.69±0.15b	0.58±0.08a
20.00% 椰子汁 Coconut juice	73.33±3.00b	7.50±1.44b	0.74±0.03b	0.08±0.01b
80.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 土豆 Potato	90.83±3.00a	9.17±3.00b	0.97±0.01a	0.11±0.04b

2.4 生根壮苗

NAA 浓度对‘黄荷兰’生根壮苗影响显著(表 5),当培养基中添加 6-BA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Z5)时,试管苗的苗高、叶长和生根数均达到最大值(图 1-o),分别为 7.32 cm、

9.26 cm、3.56 条。培养基中添加椰子汁(Z11)对生根壮苗没有促进作用。表明 $1/2\text{MS} + 6\text{-BA}$ $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 卡拉粉 $7.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + AC $0.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基适宜‘黄荷兰’生根壮苗培养。

表 5 影响‘黄荷兰’生根壮苗的因素

Table 5 Factors influencing on rooting and strengthening of *Cymbidium* ‘Huanghe’ seedlings

处理 Treatment	苗高 Seedling height /cm	叶片数 Number of leaves per seedling	叶长 Leaf length /cm	叶宽 Leaf width /cm	生根数 Number of roots per seedling	根长 Root length /cm	根粗 Root diameter /mm
Z0	5.84±0.08de	3.20±0.13ab	6.48±0.25ef	0.64±0.02b	2.60±0.01f	2.63±0.06c	2.11±0.04a
Z1	6.04±0.06cde	3.09±0.10abc	6.55±0.24ef	0.68±0.01ab	2.77±0.12f	3.04±0.10abc	2.09±0.00a
Z2	6.23±0.06bcd	2.92±0.19abc	6.76±0.12cdef	0.68±0.01ab	2.87±0.02ef	3.08±0.11abc	2.43±0.05a
Z3	6.40±0.35bc	2.80±0.07c	6.83±0.49cde	0.68±0.02ab	3.07±0.08de	2.96±0.35bc	2.39±0.03a
Z4	6.59±0.08a	3.26±0.15a	7.39±0.29cd	0.68±0.01ab	3.25±0.08bcd	2.97±0.15bc	2.26±0.02a
Z5	7.32±0.11a	2.88±0.12bc	9.26±0.05a	0.68±0.01ab	3.56±0.07a	2.97±0.03bc	2.23±0.34a
Z6	7.17±0.03a	3.06±0.06abc	8.16±0.03b	0.68±0.00ab	3.17±0.12cd	2.92±0.04bc	2.13±0.01a
Z7	6.38±0.19bc	2.88±0.12bc	7.46±0.38c	0.63±0.02b	3.21±0.03bcd	2.74±0.05bc	2.28±0.17a
Z8	5.93±0.15cde	2.99±0.04abc	6.62±0.08ef	0.64±0.00b	3.29±0.05abcd	3.22±0.28ab	2.07±0.13a
Z9	5.61±0.22ef	2.82±0.01c	6.23±0.13ef	0.73±0.05a	3.39±0.06abc	3.55±0.18a	2.39±0.04a
Z10	5.26±0.08f	2.83±0.06c	6.03±0.08f	0.64±0.04b	3.48±0.06ab	3.51±0.05a	2.16±0.07a
Z11	5.90±0.21cde	3.14±0.11abc	6.67±0.17def	0.70±0.04ab	3.19±0.20bcd	2.85±0.13bc	2.44±0.08a

2.5 试管苗移栽

移栽时间对‘黄荷兰’试管苗成活率影响显著,4 月和 10 月移栽成活率最高,达 95% 以上,其次为 1 月,7 月移栽成活率最低。水草种植(图 1-p)的成活率均高于混合基质(表 6)。因此‘黄荷兰’适宜用水草在 4 月和 10 月移栽。

3 结论与讨论

‘黄荷兰’是采用二倍体杂交兰和二倍体墨兰杂交选育而成的兰花新品种系,该品系的染色体数目为 $2n=60$,为有性三倍体。该研究结果表明,以试管苗茎尖为材料,‘黄荷兰’根状茎最高诱

表6 影响‘黄荷兰’试管苗移栽成活率的因素

Table 6 Factors influencing the transplantation survival rate on the plantlets of *Cymbidium* ‘Huanghe’

时间 Time	成活率 Survival rate/%	
	混合基质 Mixed matrix	水草 Moss
1月 January	90.22±0.45b	94.44±1.24b
4月 April	95.55±0.97a	98.67±0.38a
7月 July	81.33±0.38c	86.22±1.18c
10月 October	95.78±0.22a	99.67±0.33a
平均值 Average	90.72±1.78	94.75±3.05

导率为98.89%，增殖系数为3.18，芽分化率为100.00%，一步苗分化率为85.00%，4 cm小苗壮苗50 d后苗高7 cm以上。上述指标已达到工厂化生产种苗的要求，说明利用组织培养快速繁殖技术工厂化生产‘黄荷兰’种苗是可行的。

不同杂交兰中间繁殖体类型不同。国兰和大花蕙兰杂交选育的一代杂交兰中间繁殖体为类原球茎^[9-11]，而一代杂交兰和国兰再杂交选育的二代杂交兰以及国兰和国兰杂交选育的国兰新品种中间繁殖体一般为根状茎^[12-14]。该研究结果也表明，由杂交兰‘大风兰’和墨兰杂交，选出的有性三倍体后代‘黄荷兰’中间繁殖体为根状茎。植物生长调节剂对兰花根状茎的增殖和分化影响显著^[12-18]。杨靖等^[13]研究发现，6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹有利于‘小凤兰’根状茎增殖（增殖率为165.18%，增殖系数为3.15），而6-BA 2.00 mg·L⁻¹+NAA 0.20 mg·L⁻¹有利于‘小凤兰’根状茎分化（分化率为99.22%）。徐礼谱^[14]研究结果表明，6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹有利于‘玉香兰’根状茎增殖（增殖系数为1.96），而6-BA 1.50 mg·L⁻¹+NAA 0.50 mg·L⁻¹有利于‘玉香兰’根状茎芽分化（芽分化率90.00%）。该研究表明，‘黄荷兰’根状茎在NAA 0.20 mg·L⁻¹+6-BA 1.00 mg·L⁻¹时增殖系数最高（2.71）；在6-BA 1.00 mg·L⁻¹+NAA 0.20 mg·L⁻¹时芽分化率和苗分化率分别为60.00%和57.50%，总分化率最高（117.50%），这与杨靖等^[13]和徐礼谱^[14]的研究结果均不一致，这可能是由于‘小凤兰’和‘玉香兰’是二倍体，而‘黄荷兰’是有性三倍体或育种亲本不同导致的。徐礼谱^[14]发现添加15.00%椰子汁能促进‘玉香兰’根状茎增殖，而杨靖等^[13]认为20.00%椰子汁对‘小凤兰’根状茎增殖有抑制作用，刘祥等^[19]也认为添加椰子汁对莲瓣兰与墨兰

杂交后代根状茎增殖无促进作用。该研究结果表明，培养基添加20%椰子汁降低‘黄荷兰’根状茎增殖率，与杨靖等^[13]和刘祥等^[19]的结果一致，但与徐礼谱^[14]的结果不一致，这可能是由于添加物浓度不同所致。

多倍化是导致植物性状发生改变的重要原因。LAVANIA等^[20]比较了6个不同种香茅属(*Cymbopogon*)植物的同源四倍体与二倍体发现，与二倍体相比，有的四倍体生物产量高，有的则降低。江金兰等^[21]研究表明铁皮石斛同源四倍体原球茎和植株的鲜质量和干质量均极显著低于二倍体。彭成力^[22]研究结果发现红掌多倍体的愈伤组织块增殖率和芽分化率均低于二倍体。XIE等^[7]研究结果表明，与同源二倍体相比，同源四倍体大花蕙兰增殖率与二倍体没有显著差异，但同源三倍体增殖率显著低于同源二倍体和四倍体。不同倍性大花蕙兰芽分化率差异显著，二倍体最高，四倍体次之，三倍体最低，但根分化率差异不显著。王园园^[8]研究结果表明，二倍体和同源四倍体杂交兰根状茎分枝性显著弱于二倍体。该研究结果表明，三倍体‘黄荷兰’的增殖率（170.91%）和分化率（117.50%）均高于同组合的二倍体（增殖率为115.10%和分化率为103.33%），说明有性多倍化可以提高兰花的组培快繁效率。

参考文献

- [1] 张志胜. 兰花遗传育种[M]. 2版. 北京: 中国林业出版社, 2010: 298-325.
- [2] 王木桂, 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.
- [3] 朱根发, 吕复兵, 王碧青, 等. 大花蕙兰品种的染色体数目分析[J]. 园艺学报, 2006, 32(2): 417-421.
- [4] 王玉英, 李光宏, 李志敏, 等. 野生黄蝉兰多倍体诱导初报[J]. 江苏农业科学, 2014(4): 132-134.
- [5] 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, 32(2): 70-75.
- [6] 王木桂, 曾瑞珍, 谢利, 等. 墨兰多倍体的离体诱导和鉴定[J]. 中国农学通报, 2011, 27(2): 132-136.
- [7] XIE L, ZHOU S S, WANG M G, et al. Creation and micro-propagation of polyploids in *Cymbidium hybridum*[J]. Acta Horticulturae, 2017, 1167: 107-114.
- [8] 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.
- [9] 宋莲, 王玉英, 张宇欢, 等. 墨兰绿墨素与大花蕙兰世界和平杂交种组培快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(24): 41-43.

- [10] 胡蕾,申婷. 杂交兰的组织培养与快繁技术[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(2): 259-260, 264.
- [11] 谢利,马晓娟,郭和蓉,等. 杂交兰类原球茎增殖中芽分化的控制和快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2014, 50(2): 209-213.
- [12] 左利娟,李志强,郑志勇,等. 杂交兰根状茎的增殖与分化成苗技术[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 54-56.
- [13] 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.
- [14] 徐礼谱. 玉兔兰组培快繁技术研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [15] 陈文喜,何丹丹,廖浩如,等. 影响墨兰×兔耳兰根状茎芽分化的因素[J]. 中国农学通报, 2010, 26(9): 65-69.
- [16] OGURA-TSUJITA Y, OKUBO H. Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kanran*[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2006, 42(6): 614-616.
- [17] TAO J, YU L Q, KONG F, et al. Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(69): 15639-15646.
- [18] GAO R, WU S Q, PIAO X C, et al. Micropropagation of *Cymbidium sinense* using continuous and temporary airlift bioreactor systems [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(1): 117-124.
- [19] 刘祥,孙东玲,卓素卿,等. 杂交莲瓣兰根状茎增殖和分化技术研究及分子鉴定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(17): 156-160.
- [20] LAVANIA U, SRIVASTAVA S, LAVANIA S, et al. Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation [J]. The Plant Journal, 2012, 71: 539-549.
- [21] 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.
- [22] 彭威力. 红掌多倍体资源创建及性状鉴别[D]. 广州: 华南农业大学, 2014.

Micropropagation of Sexual Triploid Hybrid *Cymbidium* ‘Huanghe’

XU Shiyong¹, LI Yingxue¹, WU You¹, ZHU Jiao¹, GUO Herong^{1,2}, ZENG Ruizhen^{1,2}

(1. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

Abstract: In order to establish the technical system of micropropagation of sexual triploid hybrid *Cymbidium* ‘Huanghe’, the test-tube seedlings were employed to investigate the factors influencing on induction, proliferation and differentiation of rhizome, seedling strengthening and transplantation by using of tissue culture rapid propagation method. The results showed that the initial dedifferentiation time of shoot tip with transverse cutting was earlier and the induction rate was higher than that with longitudinal cutting. The length of rhizome, combination of exogenous hormone, light intensity and organic additives had significant effects on rhizome proliferation, and when rhizomes with 0.50 cm in length were inoculated on MS+6-BA 1.00 mg · L⁻¹+NAA 0.20 mg · L⁻¹+potato 80.00 g · L⁻¹+sucrose 30.00 g · L⁻¹+AC 0.30 g · L⁻¹ and cultured at 26 °C under 1 000 lx light intensity for 40 days, the proliferation coefficient was the highest (3.18). Combination of exogenous hormone significantly affected rhizome differentiation, and when rhizomes in 1.00 cm length were inoculated on MS+6-BA 1.00 mg · L⁻¹+NAA 0.20 mg · L⁻¹+sucrose 20.00 g · L⁻¹+AC 0.02 g · L⁻¹ and cultured at 26 °C under 2 000 lx light intensity for 40 days, the bud and seedling differentiation rates were 60.00% and 57.50%, respectively. When seedlings with 4.0 cm high were inoculated on 1/2MS+6-BA 0.10 mg · L⁻¹+NAA 0.50 mg · L⁻¹+sucrose 20.00 g · L⁻¹+AC 0.50 g · L⁻¹ and cultured at 26 °C under 2 000 lx light intensity for 50 days, the average seedling height and mean number of root were 7.32 cm and 3.56, respectively. The transplantation survival rate of seedlings in April and October was 98.67% and 99.67%, respectively by using of moss as culture substance. The above results demonstrate that it was feasible to produce seedlings of *Cymbidium* ‘Huanghe’ by the use of tissue culture rapid propagation technology.

Keywords: hybrid *Cymbidium*; sexual polyploid; rhizome; micropropagation