

# 寒兰与蕙兰杂交种胚快繁体系的建立

孙芳<sup>1</sup>, 牛田<sup>1</sup>, 李承秀<sup>2</sup>, 张林<sup>2</sup>, 王厚新<sup>2</sup>, 王长宪<sup>2</sup>

(1. 山东农业大学 林学院, 山东 泰安 271018; 2. 泰山林业科学院, 山东 泰安 271000)

**摘要:**为加快杂交兰快繁体系的建立,以蕙兰‘新上海’(♂)与寒兰‘寒香梅’(♀)杂交种胚获得的根状茎为外植体,采用不同浓度 NAA 和 6-BA 配比组合,研究其对杂交兰增殖与分化的影响。结果表明:杂交根状茎在 MS+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA 的基本培养基中增殖效果最好,增值倍数达到 3.08。在培养基 MS+0.1 mg/L NAA+5 mg/L 6-BA 的培养基上分化产生的不定芽数量最多。1/2MS+1.0 mg/L NAA+0.2%AC 培养条件下,不定根得到很好诱导。激素配比可以很好的加快杂交兰的快速繁殖。

**关键词:**杂交兰;根状茎;增值倍数;分化率

**中图分类号:**S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0124-03

蕙兰(*Cymbidium faberi* Rolfe)又名九子兰、一茎九花,地生,叶直立性强、边缘有粗锯齿,叶脉明显,有透明感<sup>[1]</sup>。蕙兰‘新上海’特色为三瓣圆头、狭长,分窠,羊角兜捧心,舌长不卷,苞叶绿色。常有梅形水仙瓣开出。寒兰(*Cymbidium kanran* Makino)叶 3~7 枚丛生,边缘光滑或近顶部有细锯齿,略带光泽。蕙兰是我国栽培最久和最普及的兰花之一;由于受到传统的影响,在大陆比较重视春兰、蕙兰、墨兰和建兰,对寒兰的研究较少,大量从原产地引种栽培是在 1962 年以后开始<sup>[2]</sup>。寒兰‘寒香梅’的特色是花瓣特厚,舌头起兜,每朵花有 1 个护瓣托住花秆,香味特浓。

杂交是兰科植物育种最重要的方式<sup>[3]</sup>,通过杂交的方法,试图将二者的优良特性统一遗传给后代,培养出观赏价值更高的新品种<sup>[4]</sup>。传统的繁殖方式繁殖系数很低,严重影响了国兰产业化发展<sup>[5]</sup>。朱根发等<sup>[6]</sup>利用墨兰与大花蕙兰杂交获得原球茎进行试验,通过正交设计选择出了最适合杂交后代根状茎快速繁殖的培养条件;周全等<sup>[7]</sup>采用种子萌发获得的根状茎为材料,通过正交设计选择出了最适合温州素心春兰繁殖的方法。成都同心兰园的郭卫红在国兰组培快繁方面的技术已经很成熟;而朱根发对国兰的研究也居多,他们的研究成果对以后国兰的快速发展有很大的作用。现采用‘新

上海’和‘寒香梅’杂交获得的根状茎作为外植体,采用全面设计的方法,以期探究出使其达到最大增殖与分化效果的条件,为国兰快繁体系的建立以及国兰的产业化生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料由泰山林业科学院中韩兰花育种中心提供,以蕙兰‘新上海’为父本,寒兰‘寒香梅’为母本的杂交种胚获得的根状茎作外植体,选择生长状态一致,长度在 1.0 cm 左右的根状茎进行试验。

### 1.2 试验方法

1.2.1 不同植物生长调节剂对根状茎增殖的影响 试验在 MS 基本培养基上进行,采取 NAA 与 6-BA 不同浓度配比的组合进行试验,NAA 的激素浓度梯度水平为:0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L,6-BA 为 0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L。采用全面试验的方法进行培养。每处理在添加 MS 基本营养元素之外都加 20 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂+2 g/L 活性炭+100 g/L 椰汁。培养基最终用 NaOH 或者 HCl 处理,使 pH 为 5.6±0.2。每处理 3 次重复,每瓶接种 8 个根状茎,将接种好的组培瓶置于(25±2)℃、光照时间 12 h/d、光照强度 2 000 lx 下培养,2 个月之后统计增殖结果。根状茎增值倍数=新长的根状茎数/接种总数。

1.2.2 不同植物生长调节剂对根状茎分化的影响 将根状茎接种在添加不同激素 NAA、6-BA 浓度配比的 MS+20 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂上进行培养,采用全面设计方法,选择出分化幼芽效果最好的激素组合。NAA 浓度梯度为 0.1、0.2、0.5 mg/L,6-BA 浓度梯度为 2、3、5 mg/L。培养基最终用 NaOH 或者 HCl 处理,调整 pH 为 5.6±0.2。每处理 3 次重复,每瓶接种 8 个根状茎,

**第一作者简介:**孙芳(1987-),女,山东潍坊人,在读硕士,研究方向为园林植物遗传育种。E-mail:yufang12221987@126.com.

**责任作者:**王长宪(1959-),男,山东平阴人,硕士,研究员,现主要从事园林植物遗传育种等方面的研究工作。E-mail:changxian-wang@163.com.

**基金项目:**国家公益性行业科研专项资助项目(201004080)。

**收稿日期:**2012-08-27

将接种好的组培瓶置于 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 12 h/d、光照强度 2 000 lx 下培养,2 个月之后统计分化结果。根状茎分化率=分化出幼苗数/接种总数。

1.2.3 生根壮苗培养 将分化出的大于 2 cm 长的不定芽接种到生根培养基中,每瓶培养基中接 10 株不定芽。生根培养基为 1/2MS+1.0 mg/L NAA+0.2% AC+2% 蔗糖。将处理好的培养基置于 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 12 h/d、光照强度 2 000 lx 条件下培养。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 Excel、SPSS 18.0 等统计软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物生长调节剂对杂交根状茎增殖的影响

将根状茎接种在不同处理的固体培养基上培养 20 d 时,少量培养瓶中可以肉眼观察到增殖出的白色、绿色的幼嫩根状茎;40 d 左右,各处理均可以看到增殖出的根状茎。相同条件下继续培养,60 d 之后统计增殖出的全部根状茎数。根状茎接种到不同浓度的培养基上培养,21 d 时观察到有少量的培养瓶中出现乳白色、绿色新增出的根状茎;40 d 左右所有的培养瓶中均可以看到新增出的根状茎。继续培养,在增殖培养时间到 60 d 时统计新增长的根状茎数目,计算出相应的增殖倍数(表 1),添加的激素对根状茎增殖的影响见图 1、2。由图 1 可知,随着 NAA 浓度的增大,根状茎增殖数先增大后减小,当 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时,重复处理的根状茎增殖平均数最多,达到 18.83 个;由图 2 可知,随着 6-BA 浓度的增大,根状茎增殖数逐渐减小,当 6-BA 浓度为 0.1 mg/L 时,根状茎平均增殖数最大,达到 18.00 个。当 NAA 1.0 mg/L+6-BA 0.1 mg/L 时,增殖效果最好,增殖倍数达到 3.08(表 1)。

表 1 不同条件下根状茎培养 60 d 增殖状况统计

Table 1 Propagation of rhizome in different conditions after 60 days cultivation

处理编号	NAA /mg·L <sup>-1</sup>	6-BA /mg·L <sup>-1</sup>	接种根状 茎数	增殖根状 茎数	增殖倍数
1	0.5	0.1	24	38	1.58
2	0.5	0.2	24	49	2.04
3	0.5	0.5	24	62	2.58
4	0.5	1.0	24	50	2.08
5	1.0	0.1	24	74	3.08
6	1.0	0.2	24	52	2.17
7	1.0	0.5	24	57	2.38
8	1.0	1.0	24	43	1.79
9	1.5	0.1	24	54	2.25
10	1.5	0.2	24	55	2.29
11	1.5	0.5	24	44	1.83
12	1.5	1.0	24	42	1.75
13	2.0	0.1	24	50	2.08
14	2.0	0.2	24	55	2.29
15	2.0	0.5	24	44	1.83
16	2.0	1.0	24	38	1.58

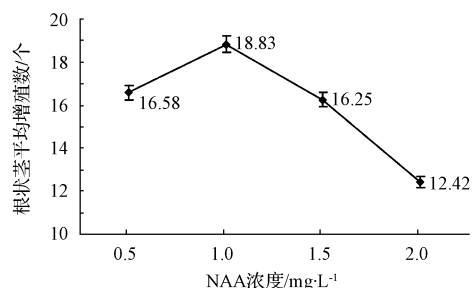


图 1 不同浓度 NAA 对根状茎增殖的影响

Fig. 1 Effect of NAA on the influence of rhizome

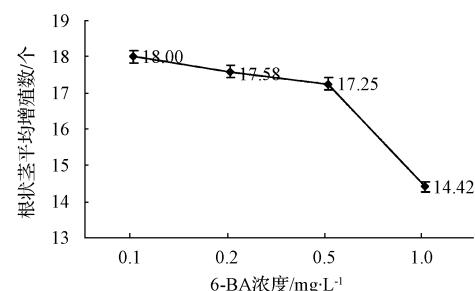


图 2 不同 6-BA 浓度对根状茎增殖的影响

Fig. 2 Effect of 6-BA on the influence of rhizome

### 2.2 植物生长调节剂对杂交根状茎分化的影响

各培养基上接种的根状茎在 30 d 左右已经分化出幼小的幼苗,45 d 之后,多数根状茎已经部分分化出不同数量的幼苗,60 d 后结果见表 2,对分化结果进行方差分析见表 3。结果表明,NAA 浓度梯度对根状茎分化的影响不显著( $P=0.055>0.05$ ),而 6-BA 对蕙兰与寒兰杂交后代根状茎的分化影响极显著( $P=0.002<0.01$ ),NAA 和 6-BA 组合对根状茎分化效果呈显著性差异( $P=0.015<0.05$ )。当培养基为 0.1 mg/L NAA+5 mg/L 6-BA 时分化效果最好,此时所有接种的根状茎均分化出幼苗。

表 2 不同处理下根状茎 60 d 后的分化情况统计

Table 2 Differentiation of rhizome in different conditions after 60 days cultivation

处理 编号	NAA /mg·L <sup>-1</sup>	6-BA /mg·L <sup>-1</sup>	接种根状 茎数/个	出芽根状 茎数/个	分化出芽 数/个	平均出芽 数/个	分化率 /%
1	0.1	2	24	20	59	2.95	83.3
2	0.1	3	24	22	62	2.82	91.7
3	0.1	5	24	24	90	3.75	100.0
4	0.2	2	24	23	60	2.61	95.8
5	0.2	3	24	21	56	2.67	87.5
6	0.2	5	24	22	61	2.77	91.7
7	0.5	2	24	23	82	3.42	95.8
8	0.5	3	24	22	58	2.63	91.7
9	0.5	5	24	23	63	2.74	95.8

### 2.3 不定芽生根结果

将符合规格的不定芽接种到生根培养基中,培养 40 d 观察到每不定芽都有不同数量的白色或者绿色不定根产生。诱导率达到 100%。继续培养,当诱导出的不定根粗

表3 在NAA、6-BA作用下根状茎分化方差分析

Table 3 Analysis of various table for the differentiation of rhizome

源	Ⅲ型平方和	df	均方	F	P
校正模型	123.852	8	15.481	8.038	0.039
截距	11 449.481	1	11 449.481	5 944.923	0.000
6-BA	36.074	2	18.037	9.365	0.002
NAA	52.074	2	26.037	13.519	0.055
NAA×6-BA	35.704	4	8.926	4.635	0.015
误差	34.667	18	1.926	—	—
总计	11 608.000	27	—	—	—
校正的总计	158.519	26	—	—	—

注:  $R^2=0.460$ (调整  $R^2=0.220$ )。

壮,叶片变厚、浓绿时,达到壮苗效果,可以进行练苗。

### 3 讨论

不同品种的兰花在组培室最适合的基本培养基也不尽相同,不同培养阶段外植体最适合的培养基也不一定完全相同<sup>[8]</sup>。常用作基本培养基的有MS、W、VW、KC、Hypones等,以及根据相应的情况对这些培养基进行一定的改良,而形成的改良培养基。有试验表明,春兰以1/2MS培养基最适合<sup>[9]</sup>,蕙兰以含无机盐量大的MS培养基最适合,寒兰以MS培养基最适合<sup>[10]</sup>,建兰也可以在MS培养基上快速生长<sup>[11]</sup>。由此可见MS是普遍适合国兰根状茎快繁的一种培养基。不过也有试验证明MS不是最适合寒兰、蕙兰、建兰等的生长的培养基。生长调节剂是外植体增殖与分化的重要物质,其种类以及浓度成为根状茎增殖与分化的主导因子<sup>[12]</sup>。另外在国兰组织培养过程中还有许多诸如活性炭、蔗糖、有机添加物(马铃薯汁、椰汁、香蕉泥)等量多少的影响。所以要找出最佳的培养条件,仍需要做大量的研究工作。

我国的国兰组培技术虽然已经成熟,但是还存在一些问题。野生国兰资源越来越少,一些濒危珍贵兰花种质资源保存工作应该认真对待。对一些植株可以取其茎尖、幼嫩叶片,根尖等外植体进行扩繁,达到保存的目的。但在操作中会出现褐化、污染、玻璃化等的影响<sup>[13]</sup>,这些问题还没有完全得到很全面的解决,因而成为保存

种质资源的难点问题之一。

国兰越来越受人们的喜爱,对国兰的观赏特征方面的要求也越来越高。但是单单靠传统的下山兰,已经不能满足当今社会的需求<sup>[14]</sup>。在以后的兰花育种工作中,应对兰花的生物学特性及遗传规律进行深入研究<sup>[15]</sup>,在原有优良下山兰的基础上,选育出更受人们欢迎的新品种。

### 参考文献

- [1] 李少球,胡松华,鲁章. 中国兰花(品种 欣赏 栽培)[M]. 广州:广东科技出版社,2003.
- [2] 卢思松. 中国兰与洋兰[M]. 北京:金盾出版社,1994.
- [3] 梁芳,崔波,马杰,等. 杂交兰原球茎增殖及分化研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(13):5309-5310,5353.
- [4] 孙芳,李承秀,张林,等. 春兰名品杂交后代快繁与分化研究[J]. 中国农学通报,2012,28(10):189-193.
- [5] 朱国兵,杨柏云,蔡奇英,等. 寒兰的快速繁殖技术[J]. 热带亚热带植物学报,2006,14(2):151-156.
- [6] 朱根发,陈明莉,罗智伟,等. 墨兰与大花蕙兰种间杂种原球茎的诱导及增殖研究[J]. 园艺学报,2004,31(5):688-690.
- [7] 周全,余平. 春兰根状茎的增殖与分化条件优化[J]. 湖北农业科学,2009,48(1):27-30.
- [8] 徐程,詹忠根. 中国兰的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2002,38(2):171-174.
- [9] 褚云霞,张永春. 春兰根状茎增殖与分化培养[J]. 上海农业学报,2007,23(3):82-85.
- [10] 杨柏云,杨宁生. 蕙兰原球茎增殖培养条件的研究[J]. 南昌大学学报,1995,19(1):39-42.
- [11] 朱根发,王碧青,吕复冰. 建兰与纹瓣兰种间杂种胚培养研究[J]. 热带亚热带植物学报,2005,13(5):447-450.
- [12] 石乐娟,张放,张士良,等. 植物生长调节剂对线艺春兰根状茎的增殖与分化的影响[J]. 园艺学报,2006,33(4):887-890.
- [13] 陈少珍,卜朝阳,闭志强,等. 兰花组织培养中常见问题及解决方法[J]. 广西农业科学,2006,37:72-74.
- [14] 罗毅波. 国兰产业化发展中的几个问题[J]. 中国西部科技,2006(15):14-17.
- [15] 张孟锦,杨志娟,许大熊,等. 兰花育种途径与进展[J]. 广东农业科学,2008(2):120-123.

## Establishment of Rapid Propagation System of Hybrid Embryo Between *Cymbidiumkanran* Makino and *Cymbidium faberi* Rolfe

SUN Fang<sup>1</sup>, NIU Tian<sup>1</sup>, LI Cheng-xiu<sup>2</sup>, ZHANG Lin<sup>2</sup>, WANG Hou-xin<sup>2</sup>, WANG Chang-xian<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Shandong Agriculture University, Tai'an, Shandong 271018; 2. Taishan Forestry Academy, Tai'an, Shandong 271000)

**Abstract:** In order to speed up the building of the rapid propagation system for hybrid cymbidium, taking rhizome of 'Xinshanghai' (♂) × 'Hanxiangmei' (♀) as explants, the effects of different concentrations of 6-BA and NAA combinations on rapid propagation and differentiation were studied. The results showed that MS+1.0 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA was the highest propagation coefficient and it could reach 3.08. MS+0.1 mg/L NAA+5 mg/L 6-BA was the optimum medium for adventitious bud regeneration. 1/2MS+1.0 mg/L NAA+0.2% AC could be good for adventitious roots' induction. The use of hormone would speed up the rapid propagation of hybrid *Cymbidium*.

**Key words:** hybrid *Cymbidium*; rhizome; proliferation times; differentiation rate