

## 杂交兰类原球茎增殖中芽分化的控制和快速繁殖

谢利, 马晓娟, 郭和蓉, 曾瑞珍, 张志胜\*

华南农业大学广东省植物分子育种重点实验室, 广州510642

**摘要:** 以‘玉女杂交兰’为材料, 研究了培养时间、活性炭、切块大小和外源生长调节物质对类原球茎增殖和分化的影响。结果表明, 培养时间、活性炭和切割处理对类原球茎增殖和分化影响显著, 在培养基中添加活性炭或对类原球茎进行切割均能有效控制增殖过程中的芽分化。将类原球茎切成直径2~3 mm的小块接种到培养基MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.3 g·L<sup>-1</sup> AC+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂中培养40 d, 类原球茎增殖率为384.23%。将增殖后的类原球茎接种到培养基1/2MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂中培养40 d, 芽分化率为463.06%。将分化的芽转入培养基1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.5 g·L<sup>-1</sup> AC+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+100 g·L<sup>-1</sup>土豆汁+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂中培养, 生根率为100%, 平均根分化数为2.80条·株<sup>-1</sup>。以泥炭土为基质, 组培苗的移栽成活率可达97.78%。

**关键词:** 杂交兰; 类原球茎; 增殖; 分化; 快速繁殖

## Control of Bud Differentiation of Protocorm-Like Bodies During Proliferation and Micropropagation of Hybrid *Cymbidium*

XIE Li, MA Xiao-Juan, GUO He-Rong, ZENG Rui-Zhen, ZHANG Zhi-Sheng\*

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

**Abstract:** The effects of culture time, active carbon (AC), size of inoculum and exogenous growth regulating substances on proliferation and differentiation of protocorm-like bodies (PLBs) in hybrid *Cymbidium* ‘YuNv’ were studied. The results showed that culture time, AC and size of inoculum significantly affected multiplication and differentiation of the PLBs. Adding AC in media or cutting PLBs could effectively control the bud differentiation during PLBs proliferation. After cultured on MS medium with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA for 40 d, the proliferation rate of the PLBs with 2–3 mm in length was 384.23%. The new-proliferated PLBs formed buds with the differentiation rate 463.06% when cultured on 1/2MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+20 g·L<sup>-1</sup> sugar+5.5 g·L<sup>-1</sup> agar for 40 d, and all buds produced roots on 1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+100 g·L<sup>-1</sup> potato juice+0.5 g·L<sup>-1</sup> AC+20 g·L<sup>-1</sup> sugar+5.5 g·L<sup>-1</sup> agar, with the average of 2.80 per plantlet. The transplantation survival rate of plantlets was 97.78% on peat soil substrate.

**Key words:** hybrid *Cymbidium*; protocorm-like bodies; proliferation; differentiation; rapid propagation

杂交兰(hybrid *Cymbidium*)是用国兰(*Chinese Cymbidium*)和大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)杂交培育而成的兰花新品种, 集国兰和大花蕙兰的部分优良性状于一身, 具有极高的经济价值、文化价值和广阔的市场前景。有关杂交兰原球茎增殖与分化的研究已有相关报道(梁芳等2008; 张先云等2009; 沈汉国等2012), 结果表明外源激素浓度、培养方式和活性炭浓度可影响原球茎的增殖、分化和生根。在杂交兰种苗的工厂化生产中发现, 不同杂交兰类原球茎的增殖和分化特性不同, 许多杂交兰的类原球茎在增殖过程中会出现芽苗分化现象, 不符合定时、定质、定量工厂化

生产种苗的要求, 因此研究如何控制杂交兰类原球茎增殖过程中的芽分化, 对建立符合工厂化生产需求的杂交兰快速繁殖技术体系具有重要的意义。‘玉女杂交兰’(*Cymbidium* ‘YuNv’) (图1-A)是本校课题组通过墨兰和大花蕙兰杂交培育出的兰花新品种, 有国兰香气, 具有花朵数多、适应性好、不用上山催花等优点。本试验以‘玉女杂交兰’类原球茎为材料, 研究影响类原球茎增殖和分

收稿 2013-10-12 修定 2013-12-24

资助 广东省科技攻关项目(2006A20201002、2011A020-201001、2011B090400510和2012B091100480)。

\* 通讯作者(E-mail: zszhang@scau.edu.cn; Tel: 020-38297154)。

化的因素,以建立该品种工厂化繁殖技术体系,为‘玉女杂交兰’种苗的工厂化生产奠定基础。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

供试材料为采用茎尖培养获得的‘玉女杂交兰’(*Cymbidium* ‘YuNv’)的类原球茎(图1-B),由本校课题组诱导和继代培养产生。

### 2 方法

#### 2.1 ‘玉女杂交兰’类原球茎增殖中芽分化的控制

**2.1.1 培养时间** 将培养30 d左右的类原球茎切成直径5 mm的小块,接种于增殖培养基MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.3 g·L<sup>-1</sup> AC(活性炭)+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂中,每瓶接种10块,3瓶为1重复,设2个重复,培养10、20、30和40 d后称重。

**2.1.2 切割方式** 选取培养20 d生长状态相同、大小基本一致的单个类原球茎(protocorm-like bodies PLBs),经纵向切一刀得到1/2类原球茎(1/2 PLBs),再纵向十字切得到1/4类原球茎(1/4 PLBs),将单个类原球茎和切割后的材料分别接种到增殖培养基中,每瓶接2块,培养30 d后观察增殖和分化情况。

**2.1.3 活性炭(AC)** 将类原球茎切成直径5 mm小块,分别接种于添加0.3 g·L<sup>-1</sup> AC和去除AC的增殖培养基中,每瓶10块,重量控制在2.0 g左右,5瓶1个重复,设3个重复,培养40 d后观察增殖和分化情况。

#### 2.2 ‘玉女杂交兰’的快速繁殖

**2.2.1 类原球茎的增殖** 将材料切成直径2~3 mm小块,接种于添加不同浓度6-BA和NAA的增殖培养基中,每瓶接种2.0 g左右,3瓶为1重复,每处理设3个重复,培养40 d后观察增殖情况。

**2.2.2 类原球茎的芽分化** 将材料切成直径5 mm小块,接种于添加不同浓度6-BA和NAA的分化培养基1/2MS+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂中,每瓶10块,3瓶为1重复,设3个重复,培养40 d后观察分化情况。

**2.2.3 生根壮苗** 选取2 cm左右的芽,接种于添加不同浓度NAA的生根培养基1/2MS+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+100 g·L<sup>-1</sup>土豆汁+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂中,每瓶接8株,3瓶1重复,每处理设3重复,40 d后统计株高、叶片数、根数与最长根长。

**2.2.4 试管苗移栽** 选取根系健壮的试管苗,分别以椰糠、泥炭土和水苔为基质进行移栽,每种基质设3个重复,每重复60株苗,移栽60 d后统计移栽成活率。

### 3 培养条件

试验中培养室的培养温度(26±2) °C,光照强度10~15 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,每天12~14 h。所有培养基的pH值介于5.8~6.2之间。

### 4 统计分析

数据的统计分析以Excel 2007和SPSS 17.0软件进行,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 ranger test)。

统计数据指标包括:增殖率(%)=(培养后类原球茎重量-接种类原球茎重量)/接种类原球茎重量×100;芽分化率(%)=(分化芽数+苗数)/接种类原球茎块数×100;褐化率(%)=褐化的类原球茎块数/接种块数×100;移栽成活率(%)=移栽成活苗数/移栽总苗数×100。

## 实验结果

### 1 ‘玉女杂交兰’类原球茎增殖中芽分化的控制

#### 1.1 培养时间

培养时间对‘玉女杂交兰’类原球茎的增殖和分化影响显著。随着培养时间的增长,类原球茎的增殖率和芽分化率提高,培养20 d开始出现分化,培养40 d的增殖率为244.13%,分化率为86.7%(表1)。

#### 1.2 切块大小

切块大小对‘玉女杂交兰’类原球茎增殖过程中的芽分化有明显影响,单个类原球茎芽分化率最高,为61.54%;1/2类原球茎次之,1/4类原球茎最低(表2)。培养40 d后,单个类原球茎出现芽分化;纵切得到的1/2类原球茎仍处于增殖状态;十字切得到的1/4类原球茎增殖缓慢,出现褐化死亡现象(图1-C)。这说明切割能有效控制类原球茎在增殖过程中的芽分化。但随着切割次数的增加,褐化率也明显提高,容易导致类原球茎褐化死亡。

#### 1.3 活性炭

活性炭对‘玉女杂交兰’类原球茎增殖和分化的影响显著。在添加0.3 g·L<sup>-1</sup>活性炭的增殖培养基

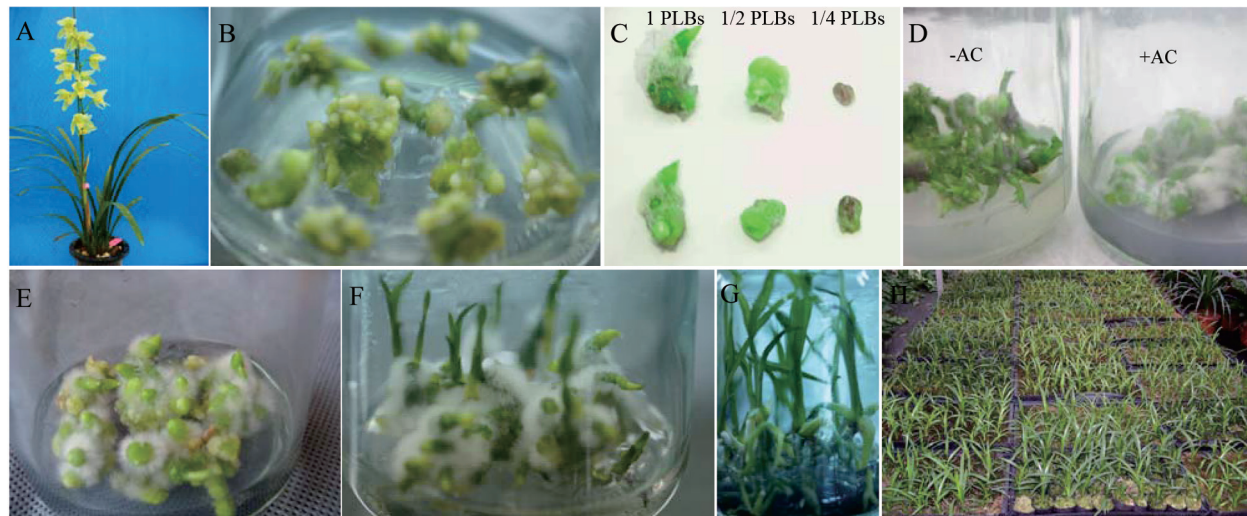


图1 ‘玉女杂交兰’的快速繁殖

Fig.1 Micropropagation of ‘YuNv’

A: ‘玉女杂交兰’开花植株; B: 由茎尖诱导出的类原球茎; C: 增殖培养40 d形成的类原球茎, 单个类原球茎接种(左), 纵切接种(中), 十字切接种(右); D: 增殖培养40 d形成的类原球茎, 不加活性炭(左), 添加活性炭(右); E: 控制芽分化增殖培养40 d形成的类原球茎; F: 芽分化培养40 d形成的芽; G: 生根壮苗培养40 d形成的再生植株; H: 移栽成活的小苗。

中, 类原球茎的增殖率达344.61%, 分化较少; 在不添加活性炭的增殖培养基中, 增殖缓慢, 易分化, 芽分化率达269.33% (表3)。培养40 d后, 类原球茎在不加活性炭的培养基中分化出大量芽, 在添加活性炭的培养基中仍处于增殖阶段(图1-D)。这说明培养基中加入活性炭可有效控制‘玉女杂交兰’类原球茎增殖过程中的芽分化。

表1 培养时间对‘玉女杂交兰’类原球茎增殖和分化的影响  
Table 1 Effects of culture time on the PLBs proliferation and differentiation of ‘YuNv’

培养时间/d	增殖率/%	芽分化率/%
10	27.87±3.13 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>
20	70.03±5.45 <sup>e</sup>	40.00±5.77 <sup>b</sup>
30	149.19±6.03 <sup>b</sup>	60.00±5.77 <sup>b</sup>
40	244.13±14.82 <sup>a</sup>	86.67±3.33 <sup>a</sup>

同列中不同小写字母表示差异显著, 相同字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。下表同此。

表2 切块大小对‘玉女杂交兰’类原球茎芽分化的影响  
Table 2 Effects of cut size on the PLBs proliferation and differentiation of ‘YuNv’

处理	总数/块	分化数/块	褐化数/块	分化率/%	褐化率/%
1 PLBs	78	48	0	61.54	0
1/2 PLBs	78	7	5	8.97	6.41
1/4 PLBs	78	1	30	1.28	38.46

## 2 ‘玉女杂交兰’的快速繁殖

### 2.1 类原球茎的增殖

类原球茎的增殖培养(图1-E)结果表明, 在增殖培养基中添加不同浓度的6-BA和NAA对‘玉女杂交兰’类原球茎的增殖影响显著(表4)。NAA浓度相同时, 类原球茎增殖率随6-BA浓度增加而显著降低; 6-BA浓度为1.0 mg·L<sup>-1</sup>时, 类原球茎增殖率随NAA浓度增加而显著增加。这说明较低浓度的6-BA和较

表3 活性炭对‘玉女杂交兰’类原球茎增殖和分化的影响  
Table 3 Effects of AC on the PLBs proliferation and differentiation of ‘YuNv’

活性炭浓度/g·L <sup>-1</sup>	增殖率/%	芽分化率/%
0	186.25±2.99 <sup>b</sup>	269.33±4.02 <sup>a</sup>
0.3	344.61±1.83 <sup>a</sup>	34.00±2.25 <sup>b</sup>

表4 6-BA和NAA对‘玉女杂交兰’类原球茎增殖的影响  
Table 4 Effects of 6-BA and NAA on the PLBs proliferation of ‘YuNv’

6-BA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	NAA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	增殖率/%
0	0	346.71±4.20 <sup>b</sup>
1.0	0.1	351.51±6.46 <sup>b</sup>
1.5	0.1	240.95±3.66 <sup>c</sup>
1.0	0.2	384.23±1.50 <sup>a</sup>
1.5	0.2	252.04±6.11 <sup>c</sup>



高浓度的NAA均可促进‘玉女杂交兰’类原球茎的增殖。在培养基MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.3 g·L<sup>-1</sup> AC+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂中, ‘玉女杂交兰’类原球茎的增殖率最高, 达384.23%。

## 2.2 类原球茎的分化

类原球茎的芽分化培养(图1-F)结果表明, 在分化培养基中添加不同浓度的6-BA和NAA对‘玉女杂交兰’类原球茎的分化影响显著(表5)。类原球茎分化的最适培养基为1/2MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂, 其芽分化率为463.06%。

## 2.3 生根壮苗

在生根培养基中添加NAA和土豆汁能显著促进根的分化和苗的生长, 但不同浓度NAA的生根数差异不明显(表6)。生根壮苗的最适培养基为1/2MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.5 g·L<sup>-1</sup> AC+20 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+100 g·L<sup>-1</sup>土豆汁+5.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂。在该培养基上

表5 6-BA和NAA对‘玉女杂交兰’类原球茎分化的影响

6-BA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	NAA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	芽分化数/个·瓶 <sup>-1</sup>
1.0	0.1	320.00±4.81 <sup>c</sup>
1.0	0.2	345.66±5.07 <sup>b</sup>
1.5	0.1	463.06±11.31 <sup>a</sup>
1.5	0.2	275.56±4.01 <sup>c</sup>
2.0	0.1	296.30±4.98 <sup>d</sup>
2.0	0.2	345.56±2.22 <sup>b</sup>

培养40 d的试管苗平均苗高为6.49 cm, 平均根数为2.80条·株<sup>-1</sup>, 平均叶片数6.89片·株<sup>-1</sup>, 最长根长为6 cm(图1-G)。

## 2.4 试管苗移栽

对试管苗进行移栽(图1-H), 3种基质的移栽成活率差异显著, 但均在90%以上, 以泥炭土为基质的移栽成活率最高(表7)。

表6 NAA和土豆汁对‘玉女杂交兰’生根壮苗的影响

Table 6 Effects of NAA and potato juice on the PLBs root differentiation of ‘YuNv’

NAA浓度/mg·L <sup>-1</sup>	土豆汁浓度/g·L <sup>-1</sup>	苗高/cm	叶片数	根数/条·株 <sup>-1</sup>	最长根长/cm
0	0	3.54±0.11 <sup>b</sup>	4.11±0.22 <sup>c</sup>	1.42±0.08 <sup>b</sup>	1.85
0.5	100	6.49±0.26 <sup>a</sup>	6.89±0.22 <sup>a</sup>	2.80±0.12 <sup>a</sup>	6.00
1.0	100	6.49±0.29 <sup>a</sup>	5.45±0.22 <sup>b</sup>	2.70±0.10 <sup>a</sup>	5.20
2.0	100	6.79±0.27 <sup>a</sup>	6.33±0.33 <sup>a</sup>	2.53±0.24 <sup>a</sup>	5.90

表7 栽培基质对‘玉女杂交兰’试管苗移栽成活率的影响

Table 7 Effects of culture substrates on the transplantation survival rate of the plantlets of ‘YuNv’

基质类型	移栽苗数/株	成活率/%
泥炭土	60	97.78±1.47 <sup>a</sup>
水苔	60	93.90±1.47 <sup>ab</sup>
椰糠	60	91.11±2.42 <sup>b</sup>

## 讨 论

杂交兰是一类同时具有国兰和大花蕙兰遗传物质的兰花, 不同杂交兰品种由于其含有国兰和大花蕙兰遗传物质不同, 其组培快繁特性也不同(王丰妍等2009; 朱根发等2004; 郑立明2008)。“玉女杂交兰”是墨兰和大花蕙兰杂交育成的, 其组培快繁特性已明显不同于大花蕙兰和墨兰。邹宗兰等(2007)研究发现大花蕙兰原球茎的培养时间超过30 d开始分化, 认为培养周期不应超过30 d; 而

墨兰根状茎的继代培养周期为60 d(张志胜和欧秀娟1995)。本试验发现培养20~40 d是‘玉女杂交兰’类原球茎增殖生长最快的时期, 其适宜的继代培养周期为40 d。

杂交兰种苗工厂化生产可采用一步成苗(一边增殖中间繁殖体, 一边生产种苗)途径, 或采用分步成苗(先增殖中间繁殖体, 后生产种苗)途径进行。一步成苗途径的优点是在新品种刚育成时有利于尽早将新品种推向市场, 但不利于种苗的定时、定质、定量的标准化生产, 同时工厂化生产的效率也比较低。采用一步成苗法, 2 g ‘玉女杂交兰’类原球茎在120 d可生产出约100株苗, 而采用分步成苗法可生产出约200株苗(私人通讯)。与一步成苗法相反, 分步成苗途径具有生产效率高、有利于标准化生产的优点。

芽分化控制是采用分步成苗途径生产杂交兰种苗的关键技术, 可通过缩短继代时间、切割中

间繁殖体、调整植物生长调节剂比例等进行控制(邹宗兰等2007)。本试验发现杂交兰类原球茎在不切割时继代20 d即开始芽分化, 如果此时进行继代培养, 类原球茎的增殖率低, 达不到高效工厂化生产要求, 培养基也得不到最充分的利用, 造成生产成本增大, 因此通过缩短培养时间来控制芽分化不是最优选择。活性炭是一种具有极丰富孔隙构造的多孔径炭化物, 有良好的吸附性, 可吸附培养基中的有害物质而防治褐变, 同时还可吸附培养基中的生长调节物质(刘用生和李友勇1994)。卜学贤和陈维伦(1988)研究发现, 每1 mg直径小于0.13 mm的分析纯粉状活性炭大约能吸附100  $\mu\text{g}$ 的生长调节物质, 从而使培养基中的外源生长调节物质含量低至不足以启动和引发芽分化的水平。本试验发现在培养基中加入0.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性炭可显著抑制‘玉女杂交兰’类原球茎增殖过程中的芽分化, 这与傅雪琳等(2000)、罗虹(1998)的研究结果一致。本研究还发现切块大小也可有效控制类原球茎增殖过程中的芽分化, 1/2纵切既有利于‘玉女杂交兰’类原球茎增殖, 也能有效控制其芽分化。本研究建立的‘玉女杂交兰’快速繁殖技术体系对促进具有自主知识产权的杂交兰新品种种苗

工厂化和标准化生产, 加快杂交兰产业国产化进程具有重要作用。

### 参考文献

- 傅雪琳, 张志胜, 何平, 欧秀娟, 何琼英(2000). 墨兰根状茎绿芽分化的研究. 华南农业大学学报, 21 (3): 53~55
- 梁芳, 崔波, 马杰, 叶永忠(2008). 杂交兰原球茎增殖及分化研究. 安徽农业科学, 36 (13): 5309~5310, 5353
- 刘用生, 李友勇(1994). 植物组织培养中活性炭的作用. 植物生理学通讯, 30 (3): 214~217
- 罗虹(1998). 活性炭对墨兰根状茎生长的影响. 广东农业科学, (1): 30~31
- 卜学贤, 陈维伦(1988). 活性炭对培养基中植物生长调节物质的吸附作用. 植物生理学报, 14 (4): 401~405
- 沈汉国, 邓樱, 杨镇明, 蓝伟泉, 罗丽霞(2012). 杂交兰‘十八格格’组织培养研究. 中国观赏园艺研究进展2012. 广东广州, 311~313
- 王丰妍, 李承秀, 王长宪, 张东旭, 潘银萍(2009). 大花蕙兰与春剑杂交原球茎增殖及分化研究. 中国农学通报, 25 (23): 327~330
- 张先云, 袁秀云, 马杰(2009). 杂交兰的组织培养与快速繁殖技术研究. 河南科学, 27 (4): 419~421
- 张志胜, 欧秀娟(1995). 墨兰的组织培养. 园艺学报, 22 (3): 303~304
- 郑立明(2008). 不同浓度6-BA对春兰×大花蕙兰种间杂种原球茎增殖与分化的影响. 浙江教育学院学报, (6): 68~72
- 朱根发, 陈明莉, 罗智伟, 罗思琼, 吕复兵, 王碧青(2004). 墨兰与大花蕙兰种间杂种原球茎的诱导及增殖研究. 园艺学报, 31 (5): 688~690
- 邹宗兰, 秦庭豪, 文颖, 饶晓鸿, 朱英(2007). 大花蕙兰工厂化繁殖技术研究. 西南农业学报, 20 (4): 743~746