

李玉萍, 罗凤霞, 史慧梅. 春兰与大花蕙兰杂交种原球茎增殖研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 53–55.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.013

春兰与大花蕙兰杂交种原球茎增殖研究

李玉萍, 罗凤霞, 史慧梅

(金陵科技学院园艺学院, 江苏南京 210038)

摘要:以春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂交种子萌发所得的原球茎为材料, 采用 N6、KC、1/2MS 等 3 种基本培养基配合以 6-BA、KT 和 NAA 的不同浓度设计正交试验, 筛选杂交种原球茎增殖的适宜培养基。结果表明: 基本培养基是影响杂种后代原球茎增殖的首要因素, N6 增殖效果最好; 3 种外源激素对原球茎的增殖率影响都极显著, 影响由大到小顺序为 NAA > KT > 6-BA, NAA 与 6-BA 浓度为 1:5 或 1:15 的比例, 对原球茎增殖效果最好; 春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂交种原球茎增殖最适宜培养基为 N6 + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L KT + 0.5 mg/L 6-BA 或 N6 + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L KT + 1.5 mg/L 6-BA。

关键词:春兰; 大花蕙兰; 原球茎; 增殖

中图分类号: S682.310.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0053-03

杂交育种是兰花育种最重要的方法, 利用该方法已培育出 10 万多个洋兰新品种^[1]。春兰 (*Cymbidium goeringii*) 为兰属多年生常绿地生草本, 花单生, 少数 2 朵, 花葶直立, 花小, 直径 4~5 cm, 花为浅黄绿色、绿白色、黄白色, 香浓。春兰高雅幽香, 具有很高的观赏价值, 在我国栽培已有 2 000 多年。大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*) 是以兰属中的一些附生性较强的大花种为亲本获得的人工杂交种, 是对兰属中通过人工杂交培育出的色泽艳丽、花朵硕大的品种的一个统称^[2]。全世界兰属植物近 70 种, 中国约 49 种, 目前用来作杂交亲本的原生种有近 20 种, 主要是大花的附生类以及少量的地生

类^[3]。兰属植物的果实为蒴果, 其形状、大小常因亲本或原生种不同而有较大的差异。但其种子均十分细小, 种子内的胚通常发育不完全, 且几乎无胚乳, 在自然条件下很难萌发, 现代育种多采用离体胚培养^[4-7]。大量扩繁的有利阶段是原球茎的增殖期, 本试验采用多因素正交试验, 从基本培养基以及外源激素种类及其浓度探讨了春兰与大花蕙兰杂种原球茎增殖的培养基, 旨在为春兰与芳香型大花蕙兰杂交育种提供基础。

1 材料与方法

以春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂交种子萌发所得的直径在 0.2~0.3 cm 生长旺盛的原球茎 (protocorm like-body, 简称 PLB) 为外植体进行增殖培养, 对基本培养基、NAA、6-BA 和 KT 进行 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交试验, 各因素水平见表 1。每处理接种 30 个原球茎, 重复 3 次。

通过极差分析法找到较好的增殖培养基, 在此基础上调整培养基再次进行 $L_9(3^3)$ 正交试验, 60 d 后再次统计增殖情况, 并用 SPSS 统计软件进行方差分析, 以邓肯氏 (Duncan's)

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金 [编号: CX(12)2021]; 国家林业局公益性行业科研专项 (编号: 201304117)。

作者简介: 李玉萍 (1976—), 女, 甘肃酒泉人, 博士, 副教授, 主要从事园林植物遗传育种和应用的研究。E-mail: lyp@jit.edu.cn。

通信作者: 罗凤霞, 硕士, 教授, 主要从事园林植物遗传育种研究。

E-mail: luofx@jit.edu.cn。

plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors[J]. Journal of Biosciences, 2004, 29(4): 471–487.

[10] Huang B R, Xu C P. Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(10): 1230–1237.

[11] Finn R D, Bateman A, Clements J, et al. Pfam: the protein families database[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42: D222–D230.

[12] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: D302–D305.

[13] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112(8): 531–552.

[14] Yu C S, Lin C J, Hwang J K. Predicting subcellular localization of

proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions[J]. Protein Science, 2004, 13(5): 1402–1406.

[15] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: W202–W208.

[16] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw, 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏[J]. 遗传, 2003, 25(3): 317–321.

[17] von Koskull-Doering P, Scharf K D, Nover L. The diversity of plant heat stress transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(7): 452–457.

[18] Scharf K D, Berberich T, Ebersberger I, et al. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution[J]. Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms, 2012, 1819(2): 104–119.

新复极差法测验差异显著性,以得到更适宜原球茎增殖的培养基配方。

表 1 原球茎增殖因素和水平

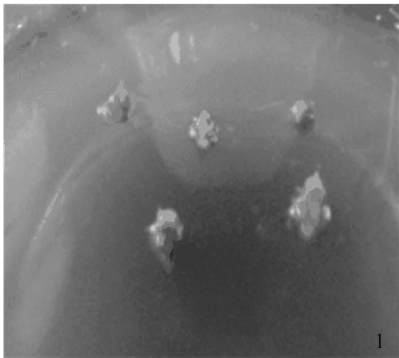
水平	基本培养基	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)
1	1/2MS	0	0.5	0
2	N6	0.1	1.0	0.05
3	KC	0.5	1.5	0.10

注:以上培养基加入蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L,调节 pH 值 5.6, 121 ℃ 高温灭菌 15 min。培养环境为温度(25±2) ℃,光照 12 h/d,光强 2 000 lx。接种 60 d 后统计原球茎增殖情况,增殖系数=增殖后的原球茎数/接种原球茎数。

2 结果与分析

2.1 L₉(3⁴) 正交试验增殖结果分析

在培养过程中,原球茎随着自身的不断增殖而逐渐形成簇生型原球茎团(图 1),统计原球茎接种 60 d 后的增殖情况,结果见表 2。



1—接种的原球茎; 2—增殖的原球茎团块
图1 原球茎增殖状况

由表 2 可知,B4 培养基的增殖系数最高,为 6.56,明显高于其他处理,其次是 B1,增殖系数为 4.84,B5 培养基和 B6 培养基的增殖系数基本一致,差异不明显,而 B7 培养基的增殖系数最小,仅为 3.20。极差分析结果表明,基本培养基对原球茎增殖影响最大,其次是 NAA、KT,影响最小的因子是 6-BA。3 种基本培养基中,N6 的增殖效果最佳,其次是 1/2MS。极差分析结果表明,4 个因子最佳组合为 N6 + 0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA + 0.10 mg/L KT,此组合即为 B4 培养基。试验结果与极差分析都表明,原球茎增殖效果最优的培养基为 N6 + 1.0 mg/L 6-BA + 0.10 mg/L KT。

2.2 L₉(3³) 正交试验增殖结果分析

在 B4 培养基基础上,对其进行优化,进一步研究各激素

表 2 杂种原球茎增殖统计

处理	基本培养基	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	接种数 (个)	增殖数 (个)	增殖系数
B1	1/2MS	0	0.5	0	90	436	4.84
B2	1/2MS	0.1	1.0	0.05	90	328	3.64
B3	1/2MS	0.5	1.5	0.10	90	367	4.08
B4	N6	0	1.0	0.10	90	590	6.56
B5	N6	0.1	1.5	0	90	389	4.32
B6	N6	0.5	0.5	0.05	90	378	4.20
B7	KC	0	1.5	0.05	90	288	3.20
B8	KC	0.1	0.5	0.10	90	295	3.28
B9	KC	0.5	1.0	0	90	342	3.80
k ₁	4.18	4.87	4.10	4.32			
k ₂	5.02	3.75	4.67	3.68			
k ₃	3.43	4.03	3.87	4.64			
R	1.59	1.12	0.80	0.96			

水平对原球茎增殖的影响。以 N6 为基本培养基,对 NAA、6-BA、KT 进行 3 因素 3 水平正交试验,每处理接种 30 个原球茎,重复 3 次,60 d 后增殖情况统计见表 3。用 SPSS 软件对增殖数据进行方差分析,结果见表 4。对 3 因素进行多重比较,结果见表 5。

表 3 杂种原球茎 L₉(3³) 正交试验增殖统计

处理	A:NAA (mg/L)	B:6-BA (mg/L)	C:KT (mg/L)	增殖系数		
				I	II	III
B10	0	0.5	0	6.32	7.44	5.23
B11	0	1	0.1	5.84	5.43	6.22
B12	0	1.5	0.2	5.03	5.27	4.9
B13	0.1	0.5	0.2	8.62	9.11	8.27
B14	0.1	1	0	7.17	7.67	6.67
B15	0.1	1.5	0.1	9.23	7.32	11.11
B16	0.2	0.5	0.1	8.39	7.44	9.33
B17	0.2	1	0.2	5.56	6.50	4.44
B18	0.2	1.5	0	6.72	6.22	7.22

注: I、II、III 指试验的 3 次重复。

表 4 原球茎增殖的方差分析

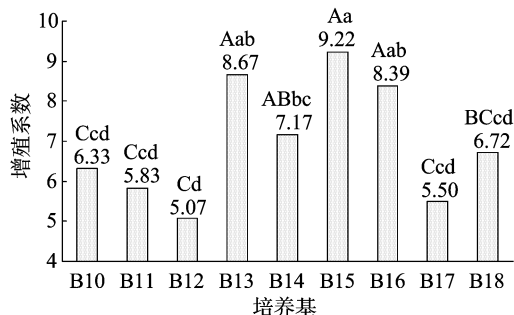
源	Ⅲ型平方和	df	均方	F 值	P 值
校正模型	52.434	6	8.739	11.229	0.000
截距	1 318.384	1	1 318.384	1 693.962	0.000
A:NAA	30.845	2	15.423	19.816	0.000
B:6-BA	11.926	2	5.963	7.662	0.003
C:KT	9.663	2	4.831	6.208	0.008
误差	15.566	20	0.778		
总计	1 386.384	27			
校正的总计	68.000	26			

表 5 单个因素对原球茎增殖系数的多重比较

A:NAA		B:6-BA		C:KT	
水平	增殖系数均值	水平	增殖系数均值	水平	增殖系数均值
1	5.74Bc	2	6.17Bb	3	6.87Bb
3	6.87Bb	3	7.00ABab	1	7.01ABb
2	8.35Aa	1	7.80Aa	2	7.07Aa

对正交试验 9 个处理进行多重比较,其差异显著性水平与增殖系数指标的比较见图 2。由图 2 可知,原球茎增殖系

数最高的培养基是 B15, 达到了 9.22, 增殖系数最低的为 B12, 仅为 5.07。B13、B14、B15 与 B10、B11、B12 差异极显著, 表明培养基内添加适量的 NAA 可促进杂交种原球茎的增殖。B16 与 B17、B18 差异极显著, 表明在 NAA 浓度相同时, 添加一定量的 6-BA 和 KT 可提高原球茎的增殖系数。



柱上不同小写字母、大写字母分别表示处理间差异显著($P < 0.05$)、差异极显著($P < 0.01$)

图2 原球茎增殖正交试验处理间多重比较

由表 4 可知, NAA、6-BA、KT 的 P 值均小于 0.01, 表明三者对原球茎增殖的影响差异都达到极显著水平。由表 5 可知, A 因素在 0.01 水平上 A_2 与 A_1 、 A_3 之间差异极显著, 且 A_2 平均值最高, 说明 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时杂交兰原球茎增殖效果最好。B 因素在 0.01 水平上 B_1 与 B_2 间差异极显著, 与 B_3 之间差异不显著, 以均值来看, B_1 和 B_3 较接近, 且均高于 B_2 , 说明 6-BA 浓度可选择 0.5 mg/L, 也可选择 1.5 mg/L。C 因素在 0.01 水平上 C_2 与 C_3 间差异极显著, 在 0.05 水平上 C_2 与 C_1 差异显著, 根据均值分析, C_2 最高, 表明 KT 浓度为 0.1 mg/L 时原球茎增殖效果最佳。由上述分析可知, 春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂种原球茎增殖培养基最佳组合为 N6 + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L KT 或 N6 + 0.1 mg/L NAA + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L KT, 其中后者与 B15 培养基相符。

3 结论与讨论

兰花大量扩繁的有利阶段是原球茎的增殖期, 此时期是提高繁殖系数的核心^[8]。基本培养基、植物激素的种类与浓度等都对原球茎的增殖有着至关重要的影响。本试验结果表明, 基本培养基是影响春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂种后代原球茎增殖的首要因素, 这与鲁迪研究春剑与大花蕙兰杂交原球茎增殖培养所得试验结果一致^[9]。陈小强等认为 1/2MS 培养基有利于大花蕙兰原球茎的增殖^[10]。本试验发现, 原球茎在 N6、1/2MS、KC 等 3 种培养基上培养, N6 的增殖系数最高, 这与陈小强等的研究结果^[10-11]有所不同。这可能是因为 N6 培养基与 1/2MS、KC 培养基所含的无机盐成分与离子浓度不同。N6 培养基是 1974 年朱至清等为水稻等禾谷类作物的花药培养而设计的, 其特点是离子浓度较低, KNO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 含量高, 不含钼, 目前在兰花类组培中也得到了广泛应用。1/2MS 培养基虽是将 MS 培养基大量元素减半, 但其离子总量仍相对较高, 不利于原球茎的增长。同时 KC 培养基与 1/2MS、N6 培养基相比, 可能是因其 Ca^{2+} 浓度较高, 抑制了原球茎的增长。

在组织研究中, 细胞分裂素类物质主要作用是促进细胞

分裂和器官分化等, 而生长素类物质主要是配合一定比例的细胞分裂素诱导不定芽的形成。因此大多研究者认为原球茎增殖阶段可以适当提高 6-BA 浓度并降低 NAA 的浓度。梁一池等认为 KT 和 NAA 2 种外源激素配合使用可以对内源激素产生影响, 有利于细胞分裂^[12]。杨玉珍等研究也发现, 相同浓度的 NAA 配合下, 大花蕙兰对 KT 的敏感程度高于对 6-BA 的敏感程度, 低浓度的 KT 可明显促进原球茎的增殖^[13]。本研究中, NAA、KT、6-BA 等 3 种外源激素对原球茎的增殖率影响都极显著, 影响顺序为 NAA > KT > 6-BA, 这与前人研究较一致。陈丽等在对墨兰的研究中发现 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA 即 1:2 的配比, 有利于墨兰根状茎的增殖^[11], 本研究发现 0.1 mg/L NAA + 0.5 或 1.5 mg/L 6-BA, 即 1:5 或 1:15 的比例, 对原球茎增殖效果最好。这可能是因为不同兰花种类原球茎生长机理有所差异, 或者是因为培养基中添加了较低浓度的 KT, 其具体原因有待进一步研究。

同时本研究仍存在一些不足, 本研究所用材料来源于春兰“紫萼”×大花蕙兰“日本绿”杂交种胚无菌播种萌发形成的原球茎, 此类原球茎是否与组培中由茎尖、腋芽等诱导出的原球茎有所不同, 仍有待以后进一步探究。因此, 本研究结果仅适用于春兰与大花蕙兰的有性繁殖, 在育种实践中具有重要的意义。此外由于材料有限, 本研究只对春兰与大花蕙兰 1 个杂交组合所得原球茎的增殖做了研究, 所得原球茎增殖培养基是否适应于其他组合, 还有待进一步确定, 但仍可为春兰与大花蕙兰杂种原球茎生长与发育提供一定参考。

参考文献:

- [1] 朱根发. 国兰杂交育种取得重大进展[J]. 花卉, 2008(3): 34-36.
- [2] 卢思聪. 中国兰与洋兰[M]. 北京: 金盾出版社, 1994.
- [3] 刘仲健, 陈心启, 茹正忠, 等. 中国兰属植物[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [4] 张志胜, 何琼英, 傅雪琳, 等. 中国兰花远缘杂交及杂交种子萌发的研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(2): 62-65.
- [5] 陈瑶瑶, 张燕, 张琛, 等. 杂交兰“韩国桃花”×蕙兰种间杂交种子无菌萌发特征研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(3): 441-446.
- [6] 李方, 陈昆松, 陈汉韬, 等. 蕙兰×台兰种间杂交种子无菌播种育苗技术研究[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(1): 71-75.
- [7] 余朝秀, 程丽霞, 王卜琼, 等. 黄蝉兰与素花虎头兰正反交育种及其种子无菌萌发效果的研究[J]. 西部林业科学, 2006, 35(2): 82-85.
- [8] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 237-247.
- [9] 鲁迪. 春剑和大花蕙兰种间杂交种子无菌萌发及杂交后代的 RAPD 分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- [10] 陈小强, 马毅, 孙宁, 等. 大花蕙兰原球茎增殖条件研究[J]. 天津农学院学报, 2009, 3(1): 9-12.
- [11] 陈丽, 潘瑞焱, 陈汝民. 墨兰原球茎生长的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(1): 59-64.
- [12] 梁一池, 杨华. 植物组织培养技术的研究进展[J]. 福建林学院学报, 2002, 22(1): 93-96.
- [13] 杨玉珍, 孙天洲, 孙廷, 等. 大花蕙兰的组织培养和快速繁殖技术研究[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(2): 86-88.