

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.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.009

墨兰绿墨素与大花蕙兰世界和平杂交种组培快繁技术

宋 莲¹, 王玉英¹, 张宇欢¹, 陈淑英¹, 李枝林^{1,2}

(1. 云南农业大学园林园艺学院花卉研究所, 云南昆明 650201; 2. 生物多样性与云南特色农业协同创新中心, 云南昆明 650201)

摘要:以墨兰绿墨素与大花蕙兰世界和平杂交种原球茎为试材,探索不同培养基配方对其增殖、分化及生根的影响。结果表明,原球茎增殖的最佳培养基配方为 1/2MS + 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA) 1.0 mg/L + 萘乙酸(NAA) 1.0 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 6.5 g/L + 香蕉 80 g/L + 活性炭 0.5 g/L,增殖率可达 317.77%;原球茎使用培养基 1/2MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 6.5 g/L + 香蕉 80 g/L + 活性炭 0.5 g/L 培养时的分化率为 54.96%,分化效果相对最好;培养基 1/2MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 6.5 g/L + 香蕉 80 g/L + 活性炭 0.5 g/L 有利于不定芽的增殖,增殖率为 227.5%;1/2MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L + 活性炭 1.0 g/L 为最适生根培养基,生根率达 81.00%,且苗体生长健壮。

关键词:墨兰绿墨素;大花蕙兰世界和平;培养基;增殖;分化;生根;快繁

中图分类号:S682.310.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)24-0041-03

墨兰(*Cymbidium sinense*)别称报岁兰、入岁兰,分布于中国福建、台湾、广东、广西、云南、贵州、四川等省(区),花期为 9 月至次年 3 月,根长而粗壮,假鳞茎椭圆形,叶片剑形,花茎直立,高出叶面,花香浓郁,抗性强^[1]。大花蕙兰(*C. hybridum*)别称西姆比兰、东亚兰,花期 10 月至次年 4 月,是兰属中一些热带附生种的杂种,株型高大,花大色艳,花期长、无香味,适应性强,既可盆栽,又可作切花。杂交育种是兰花育种最传统、最有效的方法,通过墨兰×大花蕙兰杂交获得 F₁ 代植株,可有望选育出具有国兰“香”、洋兰“艳”的兰花新品系。但是,兰花种子相对较小,内含发育不完全球形胚,在自然条件下很难萌发,而采用离体胚培养^[2]可解决这一难题。

目前,在墨兰、大花蕙兰、线艺兰、野生碧玉兰、墨兰金华山×春兰宋梅、春兰紫萼×大花蕙兰日本绿等兰属植物上有相关组培技术的报道^[3-8],但对墨兰绿墨素与大花蕙兰世界和平的 F₁ 后代组织培养技术研究尚未见报道。因此,本研究以墨兰绿墨素与大花蕙兰世界和平杂交种原球茎为试验材料,探索其增殖分化、不定芽增殖、生根的最佳培养基配方,以期为其新种质的创制和规模化生产提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

墨兰绿墨素(♀)与大花蕙兰世界和平(♂)杂交种原球茎,由云南农业大学花卉研究所自主培育。试验试剂均为

市购。

1.2 方法

1.2.1 原球茎的增殖分化 选取大小相同、嫩绿且长势良好的杂交种原球茎,剔除培养基、幼根和芽,接种于以 1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同浓度及配比的 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)(表 1)及琼脂 6.5 g/L、蔗糖 30 g/L、香蕉 80 g/L、活性炭 0.5 g/L, pH 值为 5.8 的培养基上进行增殖培养,培养条件为温度(23±2)℃,光照度 1 800~2 500 lx。每处理 45 个原球茎,重复 3 次。培养 45、60 d 后分别统计增殖率、出芽数。

1.2.2 不定芽的增殖 选取生长健壮、长势一致的不定芽,接种于以 1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同激素配比(表 2)及琼脂 6.5 g/L、蔗糖 30 g/L、香蕉 80 g/L、活性炭 0.5 g/L, pH 值为 5.8 的培养基上进行增殖培养,培养条件为温度(23±2)℃,光照度 1 800~2 500 lx。每处理 40 个不定芽,重复 3 次。培养 60 d 后统计不定芽的增殖率。

1.2.3 生根培养 将株高为 3~5 cm 的无根苗接种于以 1/2MS 培养基为基本培养基的不同生根培养基(表 3、表 4)中进行培养,培养条件为温度(23±2)℃,光照度 1 800~2 500 lx。每瓶 5 株,每处理 10 瓶,重复 3 次。接种 45 d 后观察生根情况。

1.3 数据统计分析

采用 Excel 2003 软件对数据进行整理,采用 SPSS 20.0 软件进行方差分析,采用最小显著性差异法(LSD 法)对试验数据进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对杂交兰原球茎增殖分化的影响

由表 1 可见,含不同激素的培养基对墨兰、大花蕙兰杂交种原球茎增殖分化效果差异明显;含 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L 的培养基对杂交兰原球茎的增殖相对最好,增殖率为 317.77%,显著高于其他培养基($P < 0.05$),说明杂交兰原

收稿日期:2016-06-27

基金项目:国家农业科技成果转化项目(编号:2012GB2F300423);云南省科技厅重点产品开发计划(编号:2012BB008);云南省科技厅社会事业发展专项(编号:2012GG006);云南省昆明市科学技术局重点项目(编号:2015-1-N-00984)。

作者简介:宋 莲(1991—),女,云南玉溪人,硕士研究生,主要从事园林植物资源利用与创新研究。E-mail:1164141920@qq.com。

通信作者:李枝林,男,教授,主要从事观赏植物资源利用及创新研究。E-mail:lzl-yn@sohu.com。

球茎增殖的最佳配方为 1/2MS + 6 - BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 6.5 g/L + 香蕉 80 g/L + 活性炭 0.5 g/L; 接种后 60 d, 部分原球茎分化出幼芽, 含 6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L 的培养基原球茎出芽率相对最高, 为 54.96%, 显著高于其他培养基处理 ($P < 0.05$), 说明原球茎分化效果最优的培养基为 1/2MS + 6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 6.5 g/L + 香蕉 80 g/L + 活性炭 0.5 g/L。

表 1 不同培养基对墨兰 × 大花蕙兰原球茎增殖分化的影响

培养基编号	6 - BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	接种原球茎数 (个)	原球茎净增殖数 (个)	增殖率 (%)	原球茎出芽数 (个)	原球茎出芽率 (%)
1	0.5	0.3	45	19	42.22h	36	54.96 ± 0.37a
2	0.5	0.5	45	41	91.11g	42	48.26 ± 0.83b
3	0.5	1.0	45	87	193.33d	23	17.49 ± 0.98e
4	1.0	0.3	45	66	146.67f	41	37.11 ± 1.51c
5	1.0	0.5	45	84	186.67e	50	38.52 ± 0.34bc
6	1.0	1.0	45	143	317.77a	31	16.76 ± 0.12e
7	1.5	0.3	45	99	220.00c	29	20.07 ± 0.88de
8	1.5	0.5	45	130	288.88b	72	40.97 ± 0.24b
9	1.5	1.0	45	67	148.88f	31	26.86 ± 1.37d

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.2 不同 6 - BA 浓度对杂交兰不定芽增殖的影响

由表 2 可知, 当 NAA 浓度为 0.3 mg/L 时, 含不同浓度 6 - BA 的培养基对墨兰、大花蕙兰杂交种不定芽的增殖有明显差异, 含 6 - BA 2.0 mg/L 的培养基增殖率相对最高, 为 227.5%, 显著高于其他培养基处理 ($P < 0.05$); 6 种培养基配

方中, 6 - BA 浓度在 0.5 ~ 2.0 mg/L 时, 随 6 - BA 浓度的增加, 不定芽增殖率升高, 当 6 - BA 浓度大于 2.0 mg/L 时, 不定芽的增殖受到抑制; 1/2MS + 6 - BA 2.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.5 g/L + 香蕉 80 g/L + 活性炭 0.5 g/L 为杂交兰不定芽增殖的最佳配方。

表 2 不同 6 - BA 浓度对杂交兰不定芽增殖的影响

培养基编号	6 - BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	接种数 (个)	不定芽总数 (个)	增殖率 (%)	苗生长情况
1	0.5	0.3	40	57	42.5d	叶色发黄, 芽细弱, 长势差
2	1.0	0.3	40	59	47.5d	叶色浓绿, 芽细弱, 长势一般
3	1.5	0.3	40	98	145.0b	叶色浓绿, 芽粗壮, 长势一般
4	2.0	0.3	40	131	227.5a	叶色浓绿, 芽粗壮, 长势健壮
5	2.5	0.3	40	95	137.5b	叶色浓绿, 芽中等, 长势良好
6	3.0	0.3	40	80	100.0c	叶色浓绿, 芽中等, 长势良好

2.3 不同培养基对杂交兰生根的影响

2.3.1 不同 NAA 浓度对杂交兰生根的影响 由表 3 可见, 5 组培养基配方均能诱导墨兰绿墨素、大花蕙兰世界和平杂交组培苗的生根, 且 NAA 对生根率的影响差异明显; 含 NAA

0.5 mg/L 的培养基杂交兰生根率相对最高, 为 81%, 分别比含 NAA 1.0、1.5、2.5 mg/L 培养基培养的显著高 30.65%、24.62%、32.79% ($P < 0.05$), 且根数多而粗, 植株生长健壮。

表 3 不同 NAA 浓度对杂交兰生根的影响

培养基编号	NAA 浓度 (mg/L)	6 - BA 浓度 (mg/L)	转接时根数 (条)	生根情况				苗生长情况
				生根率 (%)	平均根数 (条/株)	平均根长 (mm)	平均根粗 (mm)	
1	0.5	0.5	0	81 ± 1.41a	3.70 ± 0.57	25.73 ± 1.16	2.36 ± 0.13	++
2	1.0	0.5	0	62 ± 2.83b	2.95 ± 0.35	24.26 ± 3.22	2.72 ± 0.01	+
3	1.5	0.5	0	65 ± 7.07b	3.35 ± 0.07	19.88 ± 1.33	2.73 ± 0.01	+
4	2.0	0.5	0	80 ± 0.00a	3.45 ± 0.49	22.92 ± 3.26	2.93 ± 0.40	+++
5	2.5	0.5	0	61 ± 4.24b	3.65 ± 0.07	20.52 ± 0.40	2.85 ± 0.26	+

注: - 代表不生长; + 代表长势一般; ++ 代表长势良好; +++ 代表长势健壮。下同。

2.3.2 不同活性炭用量对杂交兰生根的影响 由表 4 可知, 活性炭对杂交兰生根的影响差异显著 ($P < 0.05$); 活性炭用量为 1.0 g/L 时的生根率相对最高, 为 81%, 且苗生根情况和生长情况最佳, 分别比活性炭用量为 0.5、0 g/L 的高 24.62%、47.27%。因此, 生根效果相对最好的培养基为 1/2MS + 6 - BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.5 g/L + 香蕉 80 g/L + 活性炭 1.0 g/L。

3 结论与讨论

在兰花组织培养中, 最常用的培养基为 MS、VW、KC、H、RM、White 及其改良型, 应用时可根据不同品种和类原球茎的形成、增殖、分化及壮苗等不同培养阶段加以修改^[9]。低盐培养基有利于兰花的生长, 朱根发等认为, 1/2MS 培养基有利于大花蕙兰的快速繁殖^[10]; 丁雪珍等认为, 最适于墨兰根

表 4 不同活性炭用量对杂交兰生根的影响

培养基 编号	活性炭浓度 (g/L)	NAA 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	转接时根数 (条)	生根情况(cm)				苗生长 情况
					生根率(%)	平均根数(条/株)	平均根长(mm)	平均根粗(mm)	
1	0	2.0	0.5	0	55±7.07c	3.05±0.35	19.54±3.91	1.98±0.21	+
2	0.5	2.0	0.5	0	65±7.07b	2.85±0.21	18.07±4.58	2.49±0.12	++
3	1.0	2.0	0.5	0	81±15.56a	3.70±0.99	20.10±2.53	2.93±0.01	+++

状茎增殖的基本培养基为 1/2MS^[11]；罗虹等在研究墨兰的组织培养和快速繁殖中也使用 1/2MS 培养基^[12]。

植物激素是植物新陈代谢中产生的天然复合物,植物激素的种类和浓度是影响兰花组织培养的重要因素之一,很小的量就会影响植物细胞的分化、分裂、发育、形态建成、开花和结实等^[13-14]。细胞分裂素的作用在于刺激细胞分裂、诱导芽的分化、促使叶片扩大和茎长高、打破顶端优势、促进丛生芽的形成和增殖、抑制根的生长^[15],而目前 6-BA 是兰花组织培养中最常用的细胞分裂素之一。生长素的主要生理作用是促进生根,与细胞分裂素协同可诱导不定芽的分化、侧芽的萌发与生长^[16],而 NAA 是兰花组培中最常用的生长素。陈丽等认为,NAA+BA 有利于墨兰原球茎的生长、分化^[17],陈小强等在研究大花蕙兰原球茎增殖时发现,NAA+6-BA 对大花蕙兰的增殖效果良好^[18],而一般情况下,当生长素/细胞分裂素比例高时抑制不定芽分化、促进生根,反之亦然^[19]。原球茎在分化芽苗阶段,由于生根数少而短,易导致炼苗时难以成活,因此,筛选最佳的生根培养基非常重要^[20]。相关研究表明,降低 6-BA 浓度、适当增加 NAA 的浓度有助于兰花生根。本试验结果表明,不同的 6-BA 与 NAA 配比对墨兰与大花蕙兰杂交兰的原球茎增殖与分化、不定芽增殖和生根有明显影响,含 6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基可获得 288.88% 的原球茎增殖率和 40.97% 的分化率;不定芽增殖的最佳激素配比为 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L,此时 NAA 浓度/6-BA 浓度为 0.15,增殖率为 227.5%,当 NAA 浓度/6-BA 浓度>0.15 时,不定芽的增殖率递增,而 NAA 浓度/6-BA 浓度<0.15 时,不定芽的增殖率随 6-BA 浓度的增加而递减;高浓度 NAA 对生根有抑制作用,NAA 浓度为 2.0 mg/L 时杂交兰的生根苗数多,生根率为 81%,且苗生长健壮。

香蕉对酸碱有很强的缓冲能力,能保持培养基 pH 值在 5.6 左右,对植物的生长、增殖具有促进作用,同时香蕉泥还能有效吸收外植体分泌的类多酚氧化物,抑制外植体的褐变、降低其死亡率。李小军等研究发现,香蕉对霍山石斛壮苗有促进作用^[21];王玉英等在辐射诱变的线艺兰快繁技术体系研究中加入了 80 g/L 香蕉泥^[22]。巩振辉等认为,适宜的生根培养基中添加适量的活性炭有助于生根^[23-25]。本试验在杂交兰不同培养阶段都添加了 80 g/L 香蕉泥,这有助于杂交兰组培苗的复壮、减轻褐变现象的出现;而在生根阶段加入 1.0 g/L 活性炭,此时杂交兰生根率高,根数多且长。

参考文献:

[1] 刘 燕. 园林花卉学[M]. 北京:中国林业出版社,2003:336.
[2] 王玉英,李光宏,李志敏,等. 野生黄婵兰无菌快繁技术的研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(28):11275-11277.
[3] 李 丽,罗君琴,聂振鹏,等. 线艺兰的组织培养及植株再生研究[J]. 浙江农业科学,2008(6):679-681.

[4] 陈兰芬,王 晶,田亦平,等. 墨兰组织培养根状茎分化技术研究[J]. 河北林果研究,2011,26(1):22-24.
[5] 胡燕梅,方中明,郭云贵,等. 大花蕙兰原球茎增殖、分化与离体保存的研究[J]. 安徽农业大学学报,2016,43(1):67-72.
[6] 王亚沉,王玉英,周慧恒,等. 野生碧玉兰组培快繁技术[J]. 亚热带植物科学,2013,42(1):27-30.
[7] 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):54-55,56.
[8] 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.
[9] 张 莉,张 明,高宏秀. 兰花组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学,2005,33(11):2134-2135,2147.
[10] 朱根发,蒋明殿. 大花蕙兰的组织培养和快速繁殖技术[J]. 广东农业科学,2004(4):36-38.
[11] 丁雪珍,韩 磊,张文静. 墨兰增殖培养基的筛选研究[J]. 北方园艺,2009(8):208-209.
[12] 罗 虹,陈汝民. 墨兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,1997(6):436-437.
[13] 王 玲,陈发棣,陈 凤,等. 不同细胞分裂素及使用浓度对蝴蝶兰花梗芽增殖生长的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):49-51.
[14] 章鹏程,陈 瑜,邓衍福,等. 6-BA 与 NAA 不同浓度配比对大花蕙兰原球茎诱导的影响[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版),2012,11(4):331-336.
[15] 陈菁瑛,蓝贺胜,陈雄鹰. 兰花组织培养与快速繁殖技术[M]. 北京:中国农业出版社,2004:32.
[16] 李子红,贾 燕. 珍品兰花快速繁殖与养护[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:125.
[17] 陈 丽,潘瑞炽,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.
[18] 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,2009,16(1):9-12.
[19] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2002:200-217.
[20] 李玉萍,王燕青,武文婷,等. 春兰与大花蕙兰杂交种原球茎分化和生根研究[J]. 天津农业科学,2015,21(8):127-132.
[21] 李小军,刘石泉,潘维陵,等. 香蕉提取物对霍山石斛试管苗壮苗的影响[J]. 江苏大学学报(自然科学版),2004,25(6):469-472.
[22] 王玉英,苏 畅,李海燕,等. 辐射诱变的线艺兰快繁技术体系研究[J]. 北方园艺,2015,39(23):101-103.
[23] 巩振辉,申书兴. 植物组织培养[M]. 北京:化学工业出版社,2007:34.
[24] Jiang J C,Tainter F H. Micro propagation of short leaf,virginia and loblolly short leaf pine hybrids via organogenesis[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1991,25(1):57-61.
[25] 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,2010:31-32.