

## 多花兰与蕙兰杂交及种胚萌发研究

王郑昊<sup>1</sup>,王传光<sup>2</sup>,赵琦<sup>1</sup>,张林<sup>3</sup>,李承秀<sup>3</sup>,王长宪<sup>3</sup>

(1. 泰安市徂徕山林场, 山东 泰安 271000; 2. 泰安市气象局, 山东 泰安 271000; 3. 泰安市泰山林业科学院, 山东 泰安 271000)

**摘要:**为选育出有香味、观赏性好、抗性强、栽培容易的品种,以多花兰为父本、蕙兰大一品为母本进行杂交,研究人工授粉、果实生长情况,开展兰花种间杂交育种的基础研究工作,了解杂交过程中可能出现的问题;对得到的杂交种子进行非共生萌发,建立完整的非共生萌发技术体系;在杂交根状茎的培养阶段,设计不同基本培养基、激素浓度和添加物,筛选最佳根状茎增殖、分化和生根壮苗的培养基。结果表明:多花兰与蕙兰大一品杂交授粉容易,结实率高,为100%。杂交适宜采收期90~150 d;接种种胚最佳萌发时间为90~150 d。最佳萌发培养基为ZB<sub>11</sub>。其根状茎的最佳增殖、分化和生根培养基为:1/2MS+6-BA 0.3 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+椰汁 20 mL·L<sup>-1</sup>+AC 0.5 g·L<sup>-1</sup>。在试验增殖的过程中出现了较为整齐的分化和生根,分化率达到95%以上。炼苗基质以草炭:珍珠岩:火山石=3:3:4为最佳。

**关键词:**多花兰;蕙兰;杂交;萌发

**中图分类号:**S682.31

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2013)02-0073-04

多花兰(*Cymbidium floribundum*)又称蜜蜂兰。为兰科兰属的附生种。假鳞茎近圆柱形,长1.5~2.5 cm,宽约1 cm,包藏于宿存的叶基内。叶2~4枚,近直立,矩圆状倒披针形,较厚革质,长22~27 cm,宽3.5~4.7 cm,先端急尖或钝,具明显的中脉,基部明显具柄;叶柄纤细,长15~23 cm,宽4~5 mm,腹面有槽,关节位于近中部。花序长20~30 cm,花茎直立,花40朵以上,密生,花色艳丽,无香,花期3~4月<sup>[1]</sup>。国内分布于云南、广东、广西、海南以及福建等省区。

蕙兰(*Cymbidium faberi*)又称九子兰、九节兰、夏兰。为兰科兰属的地生种。假鳞茎不显著,根粗而长,有分支。茎直立,高约30~80 cm,叶5~9枚,长25~80 cm,宽0.6~1.4 cm。直立性强,基部常对褶,横切面呈V形,边缘有较粗的锯齿。花常为浅黄绿色,有深紫红色的脉纹和斑点;花通常香气浓郁。一茎多花,常6~12朵,萼片长圆披针形或带状披针形;花瓣稍小于萼片;唇瓣3裂不明显,中裂片长椭圆形,有许多透明小乳突状毛,端反卷,边缘有短缘毛,白色,有紫红色斑点<sup>[2]</sup>。花期3~5月。蕙兰原分布于秦岭以南、秦岭以北及西南广大地区,是比较耐寒的兰花品种

之一。

多花兰花芽易分化,花朵多达40朵以上,色泽鲜艳,花期长,栽培容易,生长快,适应性强。但无香味,瓣型差,观赏性低。大一品是蕙兰中八大名品之一,具有高雅的幽香,绝佳的梅瓣,优美的叶态,较高的观赏性等。但是其花芽分化能力较弱,花朵较少,花期较短,经过长期栽培表现出抗性较差,栽培困难的缺点。通过人工杂交,将多花兰与蕙兰的优良特性进行结合,培养出具有蕙兰大一品株型优美、香浓瓣好,又有多花兰花多、抗性强、芽分化较易的兰花新品种,是兰花育种研究的方向之一,也是培育出新型品种的重要手段。可为兰花产业化发展奠定坚实的基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供试兰花为多花兰与蕙兰大一品。

#### 1.2 方法

1.2.1 人工杂交授粉 杂交试验在泰山林业科学研究院国兰技术研究中心进行。在开花3~5 d取父本新鲜花粉块,对开花3~7 d的母本进行授粉,即将花粉块放在母本蕊柱的药腔上。

1.2.2 外植体处理 75%酒精擦拭,编号。在超净工作台上,用75%酒精浸泡2 min,再用0.1%升汞浸泡10 min,无菌水冲洗2~3遍。

1.2.3 初代培养 授粉后长成蒴果,切开果皮,取其幼胚,均匀接种于KC、MF、B<sub>11</sub>和ZB<sub>11</sub>培养基中进行无菌萌发,每个处理4次重复。暗光下培养,接种20 d后,每5 d观察1次,对发芽时间、

收稿日期:2012-09-06

**第一作者简介:**王郑昊(1985-),男,山东省泰安市人,硕士,助理工程师,从事森林抚育经营工作。E-mail:andy-w-v-l@163.com。

**通讯作者:**王长宪(1959-),男,山东省平阴县人,硕士,研究员,硕士研究生导师,从事观赏植物育种工作。

萌发的根状茎数量等做详细记录,确定最佳萌发培养基。

1.2.4 继代培养 (1)根状茎增殖。基本培养基筛选:将杂交授粉组合获得的根状茎为试材,接种到设计的试验培养基中。基本培养基为 MS、1/2MS、W;生长调节剂为 6-BA、NAA;附加  $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的活性炭,蔗糖  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂  $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH 为 5.5。试验采用三因素三水平正交试验设计,每处理接种 30 个根状茎,各处理 3 次重复。置于  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光照  $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,光强  $2\,000 \text{ lx}$  下培养。(2)根状茎分化和生根。基本培养基筛选:根状茎的分化与生根基本同时进行,因此将扩繁获得的根状茎为试材接种,进行分化和生根研究。基本培养基为 1/2MS、 $\text{B}_5$ ;生长调节剂为 6-BA、NAA;附加  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的活性炭,蔗糖  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂  $8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH=5.5。试验采用三因素二水平正交试验设计,每处理接种 30 个根状茎,各处理重复 3 次。置于  $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光照  $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,光强  $2\,000 \text{ lx}$  下培养。

1.2.5 组培苗炼苗 试验按不同的基质种类和比例配成 3 种基质(基质一:草炭:珍珠岩=7:3;基质二:草炭:珍珠岩:火山石=3:3:4;基质三:珍珠岩:火山石=5:5),每种基质处理设 100 个重复,随机排列。用  $6 \text{ cm} \times 12 \text{ cm}$  的塑料容器袋栽植,统一肥水管理,60 d 后调查各组培苗的成活率和生长情况。瓶苗从培养室(恒温室)移至与外界相通的室内放置 2 d 后,在封口膜上扎 4~5 个约  $1.5 \text{ mm}$  的小孔,炼苗 4~7 d。

## 2 结果与分析

### 2.1 杂交果实发育

观察结果表明,多花兰与蕙兰大一品 20 个杂交组合共获得 20 个果实,结实率和坐果率为 100%。

### 2.2 杂交果实生长曲线

授粉后每隔 20 d 测量果实的纵径和横径,杂交果实近似圆柱形,计算出果实体积。以生长时间为横坐标,以果实体积为纵坐标,画出生长曲线。从图 1 看出,正常发育的果实为单“S”的生长曲线,人工授粉的 30~60 d 生长速度比较缓慢,这个阶段主要进行的是子房细胞的有丝分裂,子房的细胞数量增加;在授粉后 60~135 d 的时候,处于果实的对数生长期,子房的膨胀速度加快,这个阶段主要是子房体积的增大;经过 75 d 左右的对数生长期后,生长基本上停止;在授粉 150 d 以后,由于果实生长减缓甚至停止,对水分和养分的吸收能力减弱,再加上细胞水分的蒸腾,观察果实

体积有一定程度的缩小。

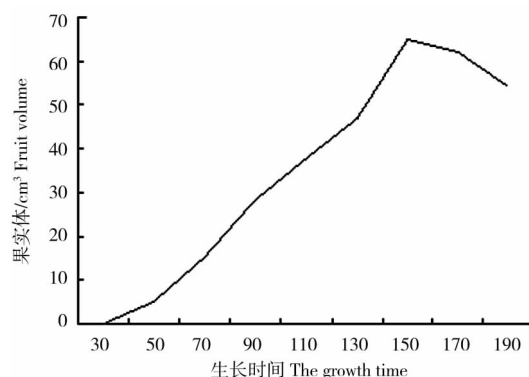


图 1 杂交果实生长曲线

Fig. 1 The growth curve of the crossbreeding fruits

### 2.3 杂交种胚萌发培养试验

在授粉后 90~210 d 每隔 20 d 采收多花兰与蕙兰大一品杂交果实种胚进行无菌萌发试验,观测结果见表 1。

表 1 不同采收时期播种萌发情况

Table 1 The germination of the embryo harvested in different periods

采收时间/d Harvesting period	萌发天数/d Days of germination	萌发量 The amount of germination
30	—	未萌发
50	—	未萌发
70	—	未萌发
90	27	萌发较多
110	27	萌发多
130	17	萌发较多
150	27	萌发少
170	45	萌发少
190	46	萌发很少
210	50	萌发很少

注:萌发天数是指由播种至萌发的时间。

Note:Germination days is the time from seeding to germination.

由表 1 可知,适宜采收期在 90~210 d,以 90~150 d 为最佳,种子发芽时间为 20~30 d。

以 130 d 采收的杂交果实种胚,分别接种到 ZB<sub>11</sub>、KC、MF 和 B<sub>11</sub> 培养基上,进行种胚的萌发试验并在接种 30 d 后,每 10 d 调查不同培养基中胚的萌发情况。在 4 种培养基中 ZB<sub>11</sub> 的萌发率最高。不同培养基在萌发数量上有明显差异,最佳培养基筛选不但可以获得较多数量的杂交后代,而且减少了工作量。

### 2.4 多花兰与蕙兰大一品杂交根状茎增殖结果

将多花兰与蕙兰大一品杂交果实种胚萌发形

成的根状茎接种到设计的培养基上,5 d后可看到根状茎稍变膨大,12 d后根状茎周围长出嫩绿色的新根状茎,26 d后新长出根状茎变成浓绿色,随着培养时间的延长,新芽数增加特别快,对

各处理培养 90 d 后根状茎的平均增殖倍数进行了统计及正交设计方差分析、极差分析,其结果见表 2、表 3、表 4。

表 2 多花兰与蕙兰大一品杂交根状茎增殖结果

Table 2 The proliferation condition of the rhizome crossed between *Cymbidium floribundum* with *Cymbidium faberiduse* ‘Dayipin’

处理 Treatment	试验方案 The test scheme			接种外植体数/个 The number of the inoculated explants	增殖数/个 The number of the proliferation	增殖倍数 Proliferation times
	培养基 Medium	6-BA/mg·L <sup>-1</sup>	NAA/mg·L <sup>-1</sup>			
1	MS	0.1	0.1	30	155	5.2
2	MS	0.3	0.5	30	214	7.1
3	MS	0.5	1.0	30	182	6.1
4	1/2MS	0.1	0.5	30	128	4.3
5	1/2MS	0.3	1.0	30	278	9.3
6	1/2MS	0.5	0.1	30	145	4.8
7	W	0.1	1.0	30	50	1.7
8	W	0.3	0.1	30	118	3.9
9	W	0.5	0.5	30	62	2.1

表 3 不同培养基影响多花兰与蕙兰大一品杂交根状茎增殖倍数正交设计方差分析

Table 3 The variance analysis of orthogonal design that the effect of different medium on the times of rhizome proliferation crossed between *Cymbidium floribundum* with *Cymbidium faberiduse* ‘Dayipin’

变异来源 Variation source	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
培养基类型 The type of medium	25.4422	2	12.7211	15.4926	0.0606
6-BA	15.4822	2	7.74111	9.4276	0.0959
NAA	2.5956	2	1.2978	1.5805	0.3875
误差 Error	1.6422	2	0.82111		
总和 The sum	45.1622				

表 4 不同培养基影响多花兰与蕙兰大一品杂交根状茎增殖倍数极差分析

Table 4 The range analysis of orthogonal design that the effect of different medium on the times of rhizome proliferation crossed between *Cymbidium floribundum* with *Cymbidium faberiduse* ‘Dayipin’

因子 Factor	均值 The average			极差分析 The results of range		
	水平 1 Level 1	水平 2 Level 2	水平 3 Level 3	极小值 The minimum value	极大值 The maximum value	极差 R The range
培养基类型 The type of medium	6.1333	6.1333	2.5667	2.5667	6.1333	3.5667
6-BA	3.7333	6.7667	4.3333	3.7333	6.7667	3.0333
NAA	4.6333	4.5000	5.7000	4.5000	5.7000	1.2000

正交设计方差分析检验表明,基本培养基及 6-BA 对杂交兰根状茎增殖的影响极显著,比较 F 值可以看出,基本培养基对杂交兰根状茎增殖更为显著,而 NAA 对根状茎增殖的影响也达到显著水平。通过极差分析(见表 4)进行比较,基本培养基因素中 MS 与 1/2MS 都达极显著水平,而 W 不显著,以 1/2MS 培养基对杂交兰根状茎增殖效果最好。因此,处理 5 的组合是所有处理中的最佳组合,多花兰与蕙兰大一品根状茎的最佳增殖培养基:1/2MS+6-BA 0.3 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+椰汁 20 mL·L<sup>-1</sup>+AC0.5 g·L<sup>-1</sup>。

在增殖的过程中,多花兰与蕙兰大一品增殖培养基 1/2MS+6-BA 0.3 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+椰汁 20 mL·L<sup>-1</sup>+AC0.5 g·L<sup>-1</sup>不但增殖快,而且在增殖的同时出现了较为整齐的分化和生根,分化率达到 95% 以上。因此,该培养及配方既是最佳增殖培养基,也是最佳分化和生根培养基。这是在其它兰花种和品种增殖和分化过程中罕见的现象,达到了较快的增殖和分化效果。

## 2.5 杂交苗生长基质的筛选及炼苗结果

经试验,基质二(草炭:珍珠岩:火山石=3:3:4)要明显优于其它两种基质。草炭可保持水分,火山石、珍珠岩可起到通透作用,草炭比例大湿度不易控制,因湿度太大容易感染病菌,火山石比例大不宜保持水分,因此在炼苗时草炭、珍珠岩和火山石的比例应该掌握到适宜才能保证炼苗成功。3种比例炼苗成活率均能达到82%以上,其中基质二可高达96%,可在生产中推广应用。

## 3 结论与讨论

多花兰与蕙兰大一品杂交授粉容易,结实率高,为100%。多花兰与蕙兰大一品杂交适宜采收期90~150 d为宜;接种种胚最佳萌发时间为90~150 d。最佳萌发培养基为ZB<sub>11</sub>。ZB<sub>11</sub>与其它培养基相比较对蕙兰为母本的种胚萌发具有较高萌发率,这可能不仅与其自身含有较多的氨基酸而且还与添加了活性炭有关,因为种子萌发过程中由于积累了有害物质而使种子和培养基发生褐化现象,而活性炭可以吸附种子生长过程中积累的有害物质,促进萌发。

多花兰与蕙兰大一品根状茎的最佳增殖、分化和生根培养基:1/2MS+6-BA 0.3 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+椰汁 20 mL·L<sup>-1</sup>+AC 0.5 g·L<sup>-1</sup>。在增殖的过程中出现了较为整齐的分化和生根,分化率达到95%以上。这是在其它兰花种和品种增殖和分化过程中罕见的现象,达到了较快的增殖和分化效果。

用于兰花组培的培养基种类繁多,最常用的培养基为MS、KC、ZB<sub>11</sub>、W、B<sub>5</sub>等,其中以MS的应用最为广泛。应用时根据不同品种和培养阶段对组分及其浓度加以修改。对于培养基中无机盐的量春兰(*C. goeringii*)要求要少,蕙兰(*C. faberi*)要求的量较大。该研究结果表明以蕙兰为母本萌发的杂交根状茎的增殖及分化培养基所需的无机盐和氨态氮浓度较低,均为1/2MS,与吴汉珠的试验结果一致<sup>[3]</sup>。

兰花杂交果实种胚萌发有原球茎和根状茎两条途径增殖,温带地生兰杂交种子萌发困难,萌发后一般形成根状茎,成苗难<sup>[4]</sup>。该研究表明:以蕙兰为母本果实萌发的种胚一般形成根状茎。与[4]中研究结果相吻合。

炼苗基质以基质二:草炭:珍珠岩:火山石=3:3:4;为最佳,无论从成活率还是从苗生长情况来看均达到较好效果。

## 参考文献:

- [1] 刘仲健,陈心启,茹正忠. 中国兰属植物[M]. 北京:北京科学出版社,2006:59-62.
- [2] 卢思聪,石雷. 大花蕙兰[M]. 北京:中国农业出版社,2005:2-80.
- [3] 吴汉珠,王续衍,林泰碧. ‘中国兰’茎顶组织培养研究[J]. 园艺学报,1987,14(3):203-207.
- [4] Shimasaki K, Uemoto S. Micropropagation of a terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes developed from seeds and pseudobulbs [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1990, 22: 237-244.

## Study on the Crossing between *Cymbidium floribundum* with *Cymbidium faberiduse* and the Embryo Germination

WANG Zheng-hao<sup>1</sup>, WANG Chuan-guang<sup>2</sup>, ZHAO Qi<sup>1</sup>, ZHANG Lin<sup>3</sup>, LI Cheng-xiu<sup>3</sup>, WANG Chang-xian<sup>3</sup>

(1. Taian Culaishan Forest Farm, Taian, Shandong 271000; 2. Taian Meteorological Bureau, Taian, Shandong 271000; 3. Taishan Forestry Science Institute, Taian, Shandong 271000)

**Abstract:** In order to breed out the varieties with good looking, strong resistance, fragrance, easy to cultivation, *Cymbidium floribundum* was used as male parent and *Cymbidium faberiduse* ‘Dayipin’ was used as female to conduct the crossbreed interspecies. The artificial pollination and the growth of *Cymbidium* fruit were researched to investigate the process of the crossing. The basis research work of crossbreed of *Cymbidium* was carried out. The system of asymbiotic germination propagation was established through the studies of asymbiotic germination of the crossbreed seeds. The appropriate culture mediums of the rhizome proliferation, differentiation and rooting were founded through the design of different basic medium, hormone concentration and additives. The results showed that it was easy to obtain hybridization pollination of *Cymbidium floribundum* and *Cymbidium faberiduse* ‘Dayipin’, seed setting rate was 100%. Advisable harvest time was 90 ~ 150 d for hybrid. The best embryo germination time was 90 ~ 150 d. The best medium for germination was ZB<sub>11</sub>. The best proliferation, differentiation and rooting mediums of rhizomes were 1/2MS+6-BA 0.3 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+Coconut juice 20 mL·L<sup>-1</sup>+AC 0.5 g·L<sup>-1</sup>. In the test, the breeding process appeared relatively regular differentiation and rooting, differentiation rate was above 95%. The best base material of hardening-seedling was grass carbon:perlite:pelelith=3:3:4.

**Key words:** *Cymbidium floribundum*; *Cymbidium faberiduse*; crossbreed; germination