

# 墨兰及其杂种的组织培养与快速繁殖<sup>\*</sup>

曾宋君 程式君 张京丽 赵逢畔 黄向力

(中国科学院华南植物园, 广州 510520)

**摘要** 针对墨兰及其杂种常规分株繁殖慢、种子在自然状况下极难萌发的情况, 以仙殿白墨及其它与象牙白、西藏虎头兰杂交所得的杂种的胚, 仙殿白墨与其杂种 F1 代的茎尖、花芽、幼叶、根进行离体培养。结果表明, 胚培养以 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L + 10%椰子汁培养基萌发效果较好, 发育到一定时期的早期胚即能萌发; 茎尖、花芽培养在 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 0.5%活性炭培养基上诱导原球茎比较适合, 根与幼叶离体培养未诱导出原球茎; 根状茎增殖在以花宝一号、花宝二号、蛋白胨等为主要原料并附加 0.5%活性炭的自制 G3 培养基上长得粗壮且繁殖速度快; 根状茎出芽诱导在 B5 + 6-BA 2~3 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 0.5%活性炭培养基上效果最好; 生根壮苗以 1/2 MS + NAA 2.0 mg/L + 10%苹果汁 + 10%香蕉汁 + 1.0%活性炭培养基能达到较理想的效果; 蔗糖浓度生根培养时以 2%较佳, 其它培养以 3%较好。仙殿白墨杂交种的胚萌发率比仙殿白墨略低, 萌发期略长; 但其花芽与茎尖的原球茎诱导、根状体增殖、根状茎出芽、生根壮苗培养、生长势、抗逆性等方面均具有杂种优势。

**关键词** 墨兰; 原球茎; 根状茎; 组织培养; 杂种优势

## A study on tissue culture and rapid propagation of *Cymbidium sinense* and its hybrids *in vitro*

Zeng Songjun Cheng Shijun Zhang Jingli Zhao Fengban Huang Xiangli

(South China Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510520)

**Abstract** In this paper, the tissue culture and rapid propagation of embryo, shoot, flower bud, leaf and root of *Cymbidium sinense* and its hybrids were studied. the results are as follows: The suitable mediums are 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L + 10% coconut juice in embryo sprouting and MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 0.5% active carbon in culture of shoot and flower bud. The culture of leaf and root had not succeeded. G3 that mainly includes Plyponex No. 1, Plyponex No. 2, Bacto-peptone and active carbon is the best medium in propagating of khizomei. The optimum medium of inducing buds form khizomei is B5 + 6-BA 2~3 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 0.5% active carbon. Growth of seedling and induction of root are the fastest in 1/2 MS+NAA 2.0 mg/L+10% banana juice + 10% apple juice. The optimum sucrose concentration of medium is 3% except the medium

1997-08-11 收稿

第一作者简介: 曾宋君 男, 1965 年出生, 硕士, 助理研究员, 现主要从事观赏与药用植物的组织培养和开发利用工作。

\*中国科学院华南植物园科学基金资助项目

in inducing root, which is 2%. Hybrids have heterosis to its mother in khizomei propagation, bud and root induction, seedling growth, disease resistance and so on.

**Key words** *Cymbidium sinense*; protocorm-like body; khizomei; tissue culture; heterosis

墨兰 (*Cymbidium sinense*) 是中国兰花中的传统名花, 它清丽、高雅、幽香, 在华南地区又正逢春节前后开花, 具有很高的观赏价值和经济价值, 深受人们的喜爱<sup>[1]</sup>, 但墨兰种子的胚发育不完全, 没有胚乳和子叶, 自然状况下很难萌发, 常规繁殖常采用分株进行, 繁殖速度慢, 其杂交种子也由于胚发育不完全, 自然状况下难萌发, 因此, 尽管我国对养兰有悠久的历史并驯化出许多名贵兰花, 但很少是通过有性杂交所得, 难以达到一定的数量并推广, 这长期以来限制了我国优质兰花资源的应用。近年来我国在国兰的组织培养方面已进行了较多的工作<sup>[2, 3, 4]</sup>, 墨兰的组织培养也有少数报道<sup>[5, 6]</sup>, 但未见成规模与产业。本研究以名贵墨兰品种仙殿白墨及其它与象牙白 (*Cymbidium eburneum*)、西藏虎头兰 (*Cymbidium tracyanum*) 的杂交种为材料, 探讨其胚、茎尖、花芽、幼叶与根的组织培养与快速繁殖方法并比较了墨兰杂种在组培繁殖力与成苗生长时的杂种优势。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 供试材料仙殿白墨、象牙白、西藏虎头兰及其仙殿白墨与它们的杂种在华南植物园兰园种植, 取各发育时期的胚、茎尖、花茎、幼叶与根作外植体。

**1.2 方法** 以仙殿白墨及其以它为母本和象牙白、西藏虎头兰杂交所得的受精胚为材料, 分别取1个月、2个月、3个月、4个月和5个月(基本成熟)时的朔果在75%的酒精中浸泡1 min, 再用0.1%的升汞溶液消毒15 min, 用无菌水冲洗5~6次, 在超净工作台上剖开朔果, 散播于1/2 MS、MS、Kundson C、V & W、White、N6、B5、自制G3等多种且附加不同激素组合的培养基上作萌发实验并将得到的原球茎进行继代增殖。G3培养基的组成为每升中含有花宝一号0.5 g、花宝二号0.25 g、蛋白胨3.0 g、酵母膏1.5 g、肌醇1.0 g; 每升中的矿质元素KNO<sub>3</sub>0.3 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>0.2 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.2 g、KCl0.1 g、Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>0.2 g、MgSO<sub>4</sub>0.25 g、柠檬酸0.15 g; 每升中再加入香蕉100 g; 蔗糖浓度为20 g/L。

以仙殿白墨及其杂种F1代的茎尖、花梗、幼叶和根作外植体在常规消毒后接种到上述各种培养基上离体培养并将得到的原球茎进行继代增殖。

将继代增殖所得到的根状茎进行出芽与生根诱导, 以培育出有根试管苗进行移栽。

所有培养基均用0.8%琼脂固化, pH 5.1~5.4。培养温度23~25℃, 每天光照10~12 h, 光照度1 000~1 500 Lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 以胚诱导原球茎

以仙殿白墨及其杂种朔果快开裂种子基本成熟时的胚为外植体, 在兰花播种常用的1/2 MS、MS、Kundson、V & W、N6、White、B5及自制G3培养基上播种, 所用激素6-BA、NAA的浓度分别为0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0并进行组合。当6-BA的浓度低于0.5 mg/L时对胚萌发影响不大, 高于0.5 mg/L时起抑制作用; NAA浓度在低于0.5 mg/L时随着浓度的增加对胚萌发的促进作用逐步增强, 超过这个浓度也会起抑制作用。在所采用的各种种类的培养基上

仙殿白墨及其杂种均能萌发,但其中以 1/2 MS 的效果最好, G3 的效果次之。在以 10%椰子汁、香蕉汁、苹果汁、绿豆汁作添加物时,椰子汁对胚萌发的促进作用最好;活性炭对胚萌发的促进作用并不明显。

在胚培养最适培养基 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 10%椰子汁上,不同胚龄的仙殿白墨及其杂种胚培养的萌发状况如表 1。仙殿白墨及其杂种胚的胚龄在 1 个月以下均不萌发,2 个月时有极少数萌发,3~5 个月时萌发率逐步升高;仙殿白墨在各胚龄期比其杂种的萌发率略高,萌发期略长。

表 1 不同胚龄的仙殿白墨及其杂种对其胚萌发的影响

Table 1 Effect of different embryo ages on the embryo sprouting

胚龄 Embryo ages	仙殿白墨 <i>Cymbidium sinense</i>		仙殿白墨 × 象牙白 <i>Cymbidium sinense</i> × <i>C. eburneum</i>		仙殿白墨 × 西藏虎头兰 <i>Cymbidium sinense</i> × <i>C. tracyanum</i>	
	萌发率 (%)	萌发期 (d)	萌发率 (%)	萌发期 (d)	萌发率 (%)	萌发期 (d)
	Sprouting percentage	Sprouting time	Sprouting percentage	Sprouting time	Sprouting percentage	Sprouting time
1 month	0	—	0	—	0	—
2 months	极少数	150	极少数	160	极少数	170
3 months	少数	130	少数	140	少数	140
4 months	40%	100	35%	120	30%	120
5 months	60%	90	50%	100	50%	100

## 2.2 以茎尖和花芽诱导原球茎

以仙殿白墨及其杂种 F1 代的茎尖、花芽、幼叶和根为外植体在与胚培养相同的培养基中培养时,幼叶与根均未诱导出原球茎。花芽和茎尖在大多数培养基中均诱导出了原球茎;培养基种类以 MS 培养基最佳;激素浓度以 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L 组合最佳;活性炭对原球茎的诱导起促进作用,当以 0.5%、1.0%、2.0% 作实验时,其浓度以 0.5% 较好;蔗糖浓度在以 10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L 作实验时,30 g/L 的效果较佳;椰子汁、香蕉汁、苹果汁、绿豆芽汁对茎尖与花芽诱导原球茎的效果不明显。在最适培养基 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 0.5% 活性炭上,仙殿白墨茎尖与花芽在 120 d 时有 40% 左右形成原球茎;而其两个杂种在 100 d 时就有 60% 左右形成原球茎。

## 2.3 根状茎的诱导与继代增殖

仙殿白墨由胚萌发而来的原球茎在原培养基上再培养 35 d 左右形成根状茎,由茎尖与花芽诱导而来的原球茎 30 d 左右形成根状茎;而其两个杂种形成原球茎的时间分别为 30 d 与 25 d。在与胚培养相同的培养基进行根状茎增殖研究,根状茎在 B5 与 N6 培养基上增殖速度很慢;在 Kundson C、V & W、White 培养基上的效果也不太好;在 1/2 MS、MS 培养基上的效果较好;但 G3 培养基的效果最佳。激素浓度以 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L 组合较佳;0.5% 活性炭、30 g/L 蔗糖浓度较合适;椰子汁、香蕉汁、苹果汁、绿豆芽汁均能加速根状体的增殖,其效果差异不明显。在最适培养基 G3 + BA 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 0.5% 活性炭 + 10% 水果添加物时,仙殿白墨 2 个月左右增殖量可达 5 倍以上,而其杂种 1 个半月即可增殖 5 倍以上。

## 2.4 不定芽与生根诱导

切割根状茎在与胚培养相同的培养基进行出芽与生根诱导,G3 培养基上很少有芽与根生成;V & W、Kundson C、White 培养基上出芽与生根效果也较差;B5 + 6-BA 2~3 mg/L + NAA

0.2 mg/L 诱导出芽的效果很好, 但不出根; B5 + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L 能诱导出根, 但效果不太好; 1/2 MS + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 2.0 mg/L + 10%香蕉汁 + 10%苹果汁 + 10%活性炭 + 20 g/L蔗糖具有较好的出芽与生根效果, 特别是在 B5 培养基上诱导出不定芽后去掉 1/2 MS 培养基中的 6-BA 生根壮苗效果相当好。仙殿白墨生根壮苗一般需要 2 个月, 其杂种一般只需要 1 个半月。

### 2.5 试管苗的栽培管理与成苗管理

把培养出来的试管苗放在室温下锻炼 5~10 d, 然后打开瓶塞炼苗 2~3 d, 洗去根部培养基, 种于经过曝晒或消毒过的带气孔火山岩或碎木炭、蕨根及珍珠岩等量混合的基质中, 成活率一般可达 95%以上, 广州地区 3~11 月均可移栽, 定植 1 个月左右可上盆, 盆底装一些塑料泡沫或砖石, 栽培基质用腐叶土与沙土混合, 每半月施一次叶面肥, 2~3 a 即可开花。杂种比仙殿白墨具有较强的生长势和抗病力及抗虫力。

## 3 讨论

(1) 蝴蝶兰、卡特兰等热带兰在东南亚、台湾等国家与地区利用组织培养和杂交育种等技术已形成了规模与产业, 国内一些观赏价值高的洋兰品种多来自这些国家与地区, 近年来, 我国在大力发展花卉事业, 引进国外优良花卉的同时, 也开始注意到应充分挖掘我国丰富的花卉资源。中国兰由于其清香脱俗, 在国内外享有崇高的声誉。我们如果对其中一些珍贵稀有品种利用组织培养等技术进行大规模推广并育出价值更高的新品种具有广阔的前景。本研究中所采用的材料仙殿白墨具有较高的观赏价值, 所育成的两个新品种的花色美观, 在生长势、抗逆性等方面又具有杂种优势, 现都已较大规模地进行了推广。

(2) 利用热带兰的早期胚培养来解决其远缘杂交的不亲和性, 我们已在石斛兰的胚培养中作过初步研究<sup>[7]</sup>, 本研究中, 墨兰及其杂种的早期胚培养虽不象石斛兰那样一定时期的早期胚与成熟胚的萌发率及萌发期相差不大, 但其部分早期胚的胚培养也获得了成功, 这有利于国兰的组织培养与杂交育种。兰花的属间杂交现在还没有成功的报道, 利用兰花的早期胚培养, 或许具有成功的希望, 如果能使洋兰花朵的艳丽和中国兰花朵的清香同时出现在同一个杂交品种上, 其经济价值将是巨大的。

(3) 花卉新品种的选育除杂交育种外, 利用染色体加倍也是一条有效的途径, 花卉中大花艳丽者常为多倍体。中国兰常为二倍体, 利用成功的早期胚组培技术使中国兰及其染色体加倍育成同源或异源多倍体, 改变花的大小与结构也具有广阔的前景。

## 参考文献

- 1 广东植物所编辑. 《海南植物志》(第四卷). 北京: 科学出版社, 1997. 246
- 2 吴汉珠, 王续衍, 林泰碧. 中国兰茎顶组织培养研究. 园艺学报, 1987, 14(3): 203~207
- 3 段金玉, 谢亚红. 在无菌条件下激素和种子处理对兰属七种植物种子萌发的影响. 云南植物研究, 1982, 4(2): 197~201
- 4 王熊. 建兰与秋兰原球茎的发生及其无性系的建立. 植物生理学报, 1981, 7(2): 203~207
- 5 张志胜, 欧秀娟. 墨兰的组织培养. 园艺学报, 1995, 22(3): 303~304
- 6 陈汝民, 叶庆生, 王小菁等. 墨兰种子胚的发育和培养初步研究. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(4): 72~75
- 7 曾宋君, 程式君. 石斛的试管苗快速繁殖. 中药材, 1996, 19(10): 490~491
- 8 黄家平, 戴思兰. 兰花组织培养综述. 广东园林, 1997, 2: 28~31