

墨兰与大花蕙兰种间杂种原球茎的诱导及增殖研究

朱根发 陈明莉 罗智伟 罗思琼 吕复兵 王碧青

(广东省农业科学院花卉研究所, 广州 510640)

摘要: 利用墨兰与大花蕙兰进行种间杂交, 成功获得了5个组合的杂种原球茎和植株。墨兰 × 大花蕙兰及大花蕙兰 × 墨兰, 均以原球茎方式萌发。以墨兰 × 大花蕙兰的杂种原球茎为材料, 通过 $L_9(3^4)$ 正交设计研究了 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、6-BA 和 NAA 等因素对杂种原球茎增殖的影响, 发现 NAA 对原球茎的增殖影响不大, NH_4NO_3 1650 mg L^{-1} (MS 正常浓度水平), 提高 KH_2PO_4 浓度 ($170 \sim 850 \text{ mg L}^{-1}$) 和 6-BA 浓度 ($1 \sim 10 \text{ mg L}^{-1}$) 有利于原球茎的增殖。9 个培养基中以 MS + NH_4NO_3 1650 mg L^{-1} + KH_2PO_4 340 mg L^{-1} + 6-BA 10 mg L^{-1} 效果最好。

关键词: 大花蕙兰; 墨兰; 杂交; 原球茎; 增殖

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 05-0688-03

Induction and Propagation of Hybrid Protocorm Like-body of Crosses between *Cymbidium sinense* and *Cymbidium hybridum*

Zhu Genfa, Chen Mingli, Luo Zhiwei, Luo Siqiong, Lü Fubing, and Wang Biqing

(Floricultural Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Hybrid plants were obtained from 5 crosses between *Cymbidium sinense* and *Cymbidium hybridum*. The genotype of germination by protocorm like-body (PLB) of *C. hybridum* is controlled by dominant gene (s). Because all of these hybrid embryos, whatever *C. sinense* × *C. hybridum* or *C. hybridum* × *C. sinense*, are germinated by PLB, which is the same as *C. hybridum*. Four factors of NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 、6-BA and NAA with three different concentration (L_9) were designed to study the effects on induction and propagation of PLB of *C. 'Jin Zui'* × *C. 'Forgotten Fruits'*. Analysis of variance shows: The different concentration among the factors which are NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 and 6-BA influences the induction and propagation of PLB directly, There is no difference with different concentration of NAA. NH_4NO_3 1650 mg L^{-1} (MS normal levels), higher concentration of KH_2PO_4 ($170 - 850 \text{ mg L}^{-1}$) and BA densities ($1 - 10 \text{ mg L}^{-1}$) was favorable to propagation of PLB. There are extremely remarkable differences among 9 media, the best is C_5 medium with NH_4NO_3 1650 mg L^{-1} , KH_2PO_4 340 mg L^{-1} and 6-BA 10 mg L^{-1} .

Key words: *Cymbidium sinense*; *Cymbidium hybridum*; Hybrid PLB; Propagation

1 目的、材料与方法

墨兰 [*Cymbidium sinense* (Andr.) Willd] 叶片宽厚挺直, 花有香味, 春节前后开花。大花蕙兰 (*Cymbidium hybridum*) 为兰属植物的杂交种, 大部分品种叶片长且披散, 花无香味, 花期 2~4 月。近年美国、日本、新西兰等的兰花育种者将大花蕙兰与建兰、纹瓣兰等杂交, 已培育出一些早花 (秋冬开花)、微香、短叶型或垂花型大花蕙兰品种, 很受消费者的喜爱^[1]。利用墨兰或春兰等与大花蕙兰杂交, 也选育出一些杂交后代^[2]。作者通过墨兰与大花蕙兰杂种胚的培养, 诱导萌发原球茎, 建立杂种原球茎的增殖技术, 为杂种后代的种植筛选建立一定数量的杂交后代群体, 期望培育出株型

收稿日期: 2004-01-08; 修回日期: 2004-04-15

基金项目: 广东省科技攻关重大专项 (2002A2040802、2003A2010401)

好、花大、有香味或易种植在春节前后开花的新种质。

供试墨兰品种有‘企剑白墨’、‘企剑黑墨’、‘金咀’。大花蕙兰品种有 3 个大花或中花型品种‘King Auther’、‘Sinseiki’、‘Golden Cup’及 4 个垂花品种‘Rubby Shower’、‘Forgotten Fruits’、‘Butter Ball’和‘Okey Doke’。利用上述材料进行墨兰与大花蕙兰正交或反交, 将授粉后 3~8 个月的杂交果荚, 用 0.1% HgCl₂ 消毒 10~15 min, 无菌水冲洗 5 次, 吸干水后切开果荚取出种胚, 置于 WC 培养基 (W 大量^[3] + MS 微量和其它成分) 中进行原球茎的诱导萌发。

以‘金咀’×‘Forgotten Fruits’的种间杂种原球茎为材料, 对 MS 培养基的 NH₄NO₃、KH₂PO₄、6-BA 和 NAA 进行了 4 因素 3 水平的 L₉ 正交试验 (表 2), 培养基其它成分同 MS + 香蕉 50 g L⁻¹ + 糖 30 g L⁻¹ + 琼脂 8 g L⁻¹, pH 5.4~5.6。将已萌发的杂种原球茎单个剖离, 轻轻刮净旧培养基, 选取大小相同的原球茎接种, 每瓶接种 5 个, 重复 3 次。置于 (26 ± 2) °C, 光照 14 h d⁻¹, 光强 2000 lx 下培养。定期统计增殖倍数、污染率、死亡率等。增殖倍数 = 新长出的原球茎数/接种原球茎数。

2 结果与分析

2.1 墨兰与大花蕙兰种间杂种胚的诱导萌发方式

在进行的杂交试验中, 有 13 个杂交组合的子房迅速膨大, 但其中 7 个杂交组合的果荚在授粉后 35~80 d 发育至小拇指大时变黄凋谢, 而剥开后可见一些白色粉状种胚。经无菌播种的 6 个组合中, 除 Sinseiki × 金咀未获得播种成功外, 其余 5 个组合均获得了杂种原球茎和杂种植株 (表 1)。

以大花蕙兰为母本的 3 个种间杂交组合, 大部分杂交种胚在 WC 培养基中播种后 50~63 d 出现了绿色原球茎, 与大花蕙兰品种间杂交种胚的萌发方式相同。果龄 (授粉后至播种的时期) 对原球茎萌发的时期影响不大, 但影响种胚的萌发率, 果龄越小, 萌发率越低。以墨兰为母本的 2 个杂交组合, 不仅果荚比大花蕙兰 × 墨兰的小, 种子量少, 而且种胚的萌发需较长的时间, 播种后 120 d 左右才出现绿色原球茎。其种胚均以原球茎方式萌发, 未表现出墨兰种胚的根状茎萌发方式。说明大花蕙兰种胚原球茎萌发性状是由显性基因控制。

2.2 NH₄NO₃、KH₂PO₄、6-BA 和 NAA 对原球茎增殖的影响

9 种培养基中原球茎增殖结果见表 2。F 测验表明, 除 NAA 对墨兰与大花蕙兰杂种原球茎的增殖影响不显著外, NH₄NO₃、KH₂PO₄ 和 6-BA

对原球茎增殖都达到显著水平。NH₄NO₃ 浓度为 1650 mg L⁻¹ (MS 正常浓度) 时原球茎增殖效果为最佳, 3300 mg L⁻¹ 处理也显著优于 825 mg L⁻¹ 处理。KH₂PO₄ 浓度以 340 mg L⁻¹ 效果最佳, 更高浓度 (850 mg L⁻¹) 效果显著高于 MS 培养基的正常浓度 (170 mg L⁻¹), 但略差于 340 mg L⁻¹ 的处理。随着 6-BA 浓度的升高, 原球茎的增殖倍数显著提高, 以 10 mg L⁻¹ 最佳。

表 1 大花蕙兰与墨兰种间杂交及无菌播种情况

Table 1 Results of sterile germination from embryos of crosses of *C. sinense* and *C. hybridum*

组合 Crosses	果荚数 Fruits	授粉至播种天数 Days after pollination	播种至出现绿色原球茎天数 Days for green PLB occurring
King Auther × 金咀 Jin Zui	2	110	63
	1	125	155
	1	210	50
King Auther × 企剑白墨 Qjian Baimo	1	110	63
King Auther × 企剑黑墨 Qjian Heimo	1	210	50
企剑白墨 Qjian Baimo × Sinseiki	2	250	120
金咀 Jin Zui × Forgotten Fruits	2	250	120

表 2 L₉(3⁴) 正交试验及杂种原球茎增殖情况

Table 2 Factorial experiments for media(L₉) and propagation ratio of hybrid PLB of *C. sinense* ‘Jin Zui’ × *C.* ‘Forgotten Fruits’

处理 Treat- ment	因素 Factors (mg L ⁻¹)				增殖倍数 Propagation ratio			
	NH ₄ NO ₃	KH ₂ PO ₄	6-BA	NAA	1	2	3	平均 Mean
C ₁	1(825)	1(170)	1(1)	1(0)	3.4	2.0	2.8	2.7
C ₂	1	2(340)	2(5)	2(0.5)	3.4	4.0	4.0	3.8
C ₃	1	3(850)	3(10)	3(1)	3.8	4.8	4.8	4.5
C ₄	2(1650)	1	2	3	4.4	5.2	5.6	5.1
C ₅	2	2	3	1	7.6	5.2	8.2	7.0
C ₆	2	3	1	2	3.0	4.0	3.4	3.5
C ₇	3(3300)	1	3	2	3.8	4.0	3.8	3.9
C ₈	3	2	1	3	5.2	5.0	4.6	4.9
C ₉	3	3	2	1	4.2	4.2	5.0	4.5
F 值	5.07*	4.20*	4.05*	3.10				

* P < 0.05

9 个培养基间存在极显著差异 (F 值为 $6.169 > 2.51$, $P < 0.01$)。采用最小显著差数法 (LSD) 对 9 个培养基进行多重比较, 发现原球茎增殖效果最好的处理是 C_5 , 其次是 C_4 、 C_8 , 再次是 C_3 、 C_9 。因此筛选出的最佳培养基为 NH_4NO_3 1650 mg L^{-1} 、 KH_2PO_4 340 mg L^{-1} 、 6-BA 10 mg L^{-1} 。

在本研究中还发现, 墨兰与大花蕙兰杂交, 不论以哪种为母本, 均以原球茎方式进行植株萌发, 说明大花蕙兰的原球茎再生性状是由显性基因控制, 而墨兰的根状茎再生方式是由隐性基因控制。墨兰的组织培养难点在于根状茎的诱导率和再生率低, 若能通过杂交或基因分离和转化的方式, 将控制原球茎再生的基因转入墨兰中, 将为墨兰的组培工厂化生产带来突破性进展。

参考文献:

- 1 朱根发. 红花系大花蕙兰的杂交亲本及育种进展. 中国花卉园艺, 2003, (8): 20~22
- 2 麦 奋. 垂花蕙兰及我国兰花的育种. 中国花卉盆景, 1998, (4): 16~17
- 3 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术. 北京: 中国林业出版社, 1991. 379

樱桃种间杂交种胚培养及子叶植株再生

李文生 闫国华 张晓明 牛爱国 张开春* (北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093)

Embryo Culture and Plant Regeneration from Cotyledons in Interspecies Hybrids of Cherry

Li Wensheng, Yan Guohua, Zhang Xiaoming, Niu Aiguo, and Zhang Kaichun* (Research Institute of Pomology and Forestry, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Science, Beijing 100093, China)

关键词: 樱桃; 胚培养; 子叶再生

中图分类号: S 662.5 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2004) 05-0690-01

2002 年 4 月 3 日, 在北京市农林科学院林业果树研究所樱桃资源圃进行种间远缘杂交, 设两个杂交组合, 即‘先锋 (*Prunus avium*) × 对樱 (*P. pseudocerasus*)’、‘CAB (*P. cerasus*) × 对樱 (*P. pseudocerasus*)’。杂交亲本生长健壮, 先锋为 8 年生, 对樱和 CAB 为 4 年生。两个组合分别杂交 293 朵和 163 朵花, 分别获得杂交果 9 个和 6 个, 杂交结实率为 3.1% 和 3.7%。成熟时采摘果实, 取出果核, 破除掉外壳, 分别得到 8 枚和 6 枚杂种种子。种子经表面消毒后去皮取胚接种于胚培养基, 置 4℃ 冰箱中冷藏 60~90 d, 当子叶逐渐转绿萌发时, 移入室内培养。移到室温环境后, 胚芽生长加快, 5~7 d 后腋芽丛生时切下胚芽继代培养, 同时将种胚的两片子叶完整剪下, 正面朝上接种于再生培养基, 进行子叶再生, 以挽救胚芽未萌发和未正常萌发的杂种胚。

基本培养基为 F14。胚培养基: F14 + 6-BA 0.5 (mg L^{-1} , 单位下同) + IBA 1.0 + GA 1.0。子叶再生培养基: F14 + 6-BA 0.5 + IBA 0.1 + GA 0.1。继代增殖培养基: F14 + 6-BA 0.5 + IBA 0.2 + GA 0.2。生根培养基: F14 + IBA 0.5 + NAA 0.05。蔗糖 2%, 琼脂 0.7%, pH 5.4。温度 (25 ± 2)℃, 光照 2000 lx, 12 h/d。

子叶培养 7~10 d 表面开始出现凸起, 15 d 左右长出不定芽。子叶基部长出的不定芽多于顶部, 其中‘先锋 × 对樱’比‘CAB × 对樱’的后代萌发早, 不定芽数量也较多。两个组合采集到的杂种胚各有 4 枚通过胚芽萌发成苗, 共得到 8 个杂交后代; 而通过子叶再生途径分别得到 7 个和 5 个杂交后代, 比胚培养途径多得到 3 个和 1 个杂交后代。

在本试验条件下, 胚芽和子叶再生的植株继代增殖均可达到 5 倍以上, 生根率 95%~100%, 在温室的移栽成活率达到 92%。目前, 这些种间杂种后代经继代扩繁、生根、驯化移栽, 已定植于田间, 进入鉴定选择阶段。通过试管内抗盐、抗碱、抗根瘤试验及田间嫁接亲和性试验, 已初步从中选出了两个抗性、嫁接亲和性高的优良株系。

收稿日期: 2004-06-07; 修回日期: 2004-09-03

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangkaichun@baafs.net.cn)