

文心兰丛生芽组培快繁研究初报

谷 凤, 侯卓捷, 张志平, 夏慧敏, 付玉兰

(安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036)

摘 要: 笔者主要采用正交设计安排试验, 探索通过以丛生芽途径再生植株的方法进行快速繁殖。研究的主要问题集中在不同基本培养基类型、不同激素配比和用量的选择、不同添加物的选择几个方面对丛生芽增值的影响。以期筛选出最优技术参数组合, 提高丛生芽增值系数, 建立文心兰最优再生体系。结果表明: 影响丛生芽增值的显著因子分别是基本培养基、细胞分裂素 BA、生长素 NAA。最适宜的培养基配方是 MS + BA 3.0 mg/L 或 4.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L 或 0.6 mg/L + 椰乳汁 150.0 ml/L 或 番茄汁 150.0 ml/L + Vc 0.2 mg/L + 活性炭 1.0 g/L + 糖 30.0 g/L + 琼脂 8.0 g/L + pH5.4。

关键词: 丛生芽, 正交设计, 文心兰, 组培快繁

中图分类号: S682.31 文献标识码: A

Study on the Technique System of Propagation of Bud Clumps in *Oncidium*

Gu Feng, Hou Zhuojie, Zhang Zhiping, Xia Huimin, Fu Yulan

(College of Forestry and Garden, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: The regeneration way of bud clumps was adopted to establish a rapid technique system of propagation in *Oncidium* in this experiment. The main contents focus on the following aspects, such as choice of basic mediums, combination and density of hormone and addictions. The Orthogonal Design is adopted to arrange experiment. Through above research, it was tried to find the main factors and improve the propagation coefficient and build up the superior regeneration system in *Oncidium* in the paper. The result showed that the main factors of multiplication of bud clumps are the basic medium, BA and NAA. The best multiplication medium is MS + BA 3.0 or 4.0 mg/L + NAA 0.4 or 0.6 mg/L + coconut milk 150.0 ml/L or tomato juice 150.0 ml/L + active carbon 1.0 g/L + Vc 0.2 mg/L + active carbon 1.0g/L + sugar 30.0 g/L + agar 8.0g/L.

Key words: Bud clumps, The Orthogonal Design, *Oncidium*, Tissue culture

文心兰 *Oncidium* 是一种观赏价值极高的高档兰花, 除了少数盆栽之外, 最适宜用作切花, 专供各种形式的艺术插花之用。但目前由于工业化培育文心兰的整体水平不高, 关键生产环节技术薄弱, 造成了文心兰繁殖系数偏低, 工业化生产效率不高, 许多名贵品种相对短缺, 供不应求, 市场售价极高。对于文心兰组织培养的研究将是解决这一问题的关键环节。有关的报道大多集中在通过原球茎增殖及苗分化来达到快速繁殖的目的^[1-8]。但原球茎途径历时较长且后代再

生植株中有较高的变异率, 难以保持母株的优良特性。丛生芽途径能够解决此类问题^[9,10], 然而有关文心兰通过丛生芽途径直接出苗的研究尚未见到详细报道。此次实验采用丛生芽途径直接出苗, 详细研究和探索了丛生芽途径的技术环节和最佳条件, 证实了丛生芽途径的可行性和有效性, 这将对改进和提高大规模工厂化生产具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

第一作者简介: 谷凤, 女, 1980 年出生, 硕士, 助教, 主要从事观赏植物培育的教学与科研。通信地址: 230036 安徽农业大学林学与园林学院花卉研究室。Tel: 0551-3198135, E-mail: gufengah@126.com。

通讯作者简介: 付玉兰, 女, 1944 年出生, 教授, 主要从事花卉培育的教学与科研。

收稿日期: 2006-11-20, 修回日期: 2006-12-05。

文心兰根莖诱导出的芽苗, 品种为“蜜糖文心”
Oncidium sweet sugar

1.2 设计方案

考虑到各因素间可能存在交互作用^[11], 因此此次试验采用 4 因素 3 水平 L27(3¹³) 正交设计。设基本培养基为 a 因素, 分置 3 个水平: a1 (KC)、a2 (1/2MS)、a3 (MS); BA 为 b 因素, 分置 3 个水平: b1 (3.0 mg

/L)、b2 (4.0 mg/L)、b3 (6.0 mg/L); NAA 为 c 因素, 分置 3 个水平: c1 (0.2 mg/L)、c2 (0.4 mg/L)、c3 (0.6 mg/L); 天然添加物为 d 因素分置 3 个水平:

d1 (椰乳汁 150.0 ml/L)、d2 (番茄汁 150.0 ml/L)、d3 (苹果汁 150.0 ml/L);

具体设计方案见表 1。取大小一致的芽苗, 每处理接种 6 瓶, 每瓶接种 4 个, 每处理重复 3 次。

表 1 丛生芽增殖试验设计 L27(3¹³)

处理序号	培养基组合	处理序号	培养基组合	处理序号	培养基组合	处理序号	培养基组合
1	a1b1c1d1	8	a1b3c2d1	15	a2b2c3d2	22	a3b2c1d1
2	a1b1c2d2	9	a1b3c3d2	16	a2b3c1d1	23	a3b2c2d2
3	a1b1c3d3	10	a2b1c1d2	17	a2b3c2d2	24	a3b2c3d3
4	a1b2c1d2	11	a2b1c2d3	18	a2b3c3d3	25	a3b3c1d2
5	a1b2c2d3	12	a2b1c3d1	19	a3b1c1d3	26	a3b3c2d3
6	a1b2c3d1	13	a2b2c1d3	20	a3b1c2d1	27	a3b3c3d1
7	a1b3c1d3	14	a2b2c2d1	21	a3b1c3d2		

注: 各组均添加琼脂 8.0 g/L, 食糖 30.0 g/L, 活性炭 1.0 g/L、Vc 0.2 mg/L、pH5.4

表 2 三次重复的平均丛生芽增殖倍数统计表

处理号	三次重复的丛生芽增殖倍数					生长状况	处理号	三次重复的丛生芽增殖倍数					生长状况
	I	II	III	平均值	PLB			I	II	III	平均值	PLB	
1	6.00	4.50	4.00	4.83		+++	15	4.75	5.30	5.75	5.27		++
2	4.00	4.33	4.33	4.22		++	16	3.75	3.85	3.75	3.78		+++
3	4.25	4.11	3.67	4.01		++	17	4.75	5.15	4.25	4.72	2.60	+++
4	3.67	3.92	3.92	3.84		+++	18	3.75	4.92	4.75	4.47		+++
5	3.75	3.80	4.25	3.93	2.65	++	19	3.00	4.31	4.75	4.02	3.57	+++
6	6.00	5.23	4.00	5.08		+++	20	4.50	6.75	6.25	5.83	3.21	++
7	1.50	2.67	3.00	2.39		+++	21	5.75	6.29	7.00	6.35		+++
8	4.67	4.42	4.50	4.53	2.80	++	22	7.00	5.57	4.25	5.61		++
9	4.67	4.10	4.00	4.26		++	23	6.50	6.60	6.50	6.53	2.01	++
10	4.23	3.50	1.50	3.08		++	24	3.25	5.08	5.75	4.69		+++
11	5.50	5.29	4.25	5.01		+++	25	6.33	6.78	5.75	6.29	2.09	+++
12	6.00	5.67	6.00	5.89		+++	26	5.75	6.33	7.00	6.36	2.90	+++
13	6.00	5.62	5.00	5.54	2.90	++	27	5.00	4.50	4.00	4.50		+
14	6.00	5.89	6.25	6.05		+++							

注: + 表示生长状况一般, 叶色淡绿; ++ 表示生长状况良好, 叶色浓绿; +++ 表示健壮饱满, 叶色浓绿

表 3 丛生芽平均增殖倍数方差分析结果

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P
处理总效应	12	55.81	4.65	5.39	0.00**
a 因素	2	28.58	14.29	16.56	0.00**
b 因素	2	5.71	2.86	3.31	0.04*
c 因素	2	10.51	5.26	6.09	0.00**
d 因素	2	4.67	2.34	2.71	0.07
b×c 因素	4	6.33	1.58	1.83	0.13
误差	68	58.68	0.86		
总和	80	114.49			

注: 3 次重复实验差异不显著 (F=0.410, P=0.669>0.05), 归入误差项。

2 结果与分析

2.1 基本培养基、细胞分裂素 BA、生长素 NAA、天然添加物对丛生芽增殖的影响

将诱导阶段萌发出的小芽,自基部剥离,并在小芽基部竖向切割后,接种到继代培养基上,150.0 ml 的培养瓶每瓶接种 4 个,每处理重复 3 次。转接后每 7 天观察一次增殖情况。14 天后,小芽基部切口部位膨大。28 天后,不同处理组陆续长出不定芽或原球茎,第 5、8、13、17、19、20、23、25、26 组既有不定芽又有原球茎,其余处理组仅长出不定芽,其中,第 23 组丛生芽增殖迅速,第 19、20 组原球茎增殖迅速。2 个月增殖倍数最高分别可达 6.53 倍和 3.57 倍,统计两个半月后的丛生芽平均增殖倍数并进行多因素多水平的方差分析,结果见表 2、3。

由表 3 方差分析结果表明:处理总效应及 a、c 两个因素的效应均达到 1% 的极显著水平 ($P < 0.01$),说明基本培养基和生长素 NAA 对文心兰丛生芽的增殖影响极大。b 因素的效应达到 5% 的显著水平 ($F = 3.31, P = 0.04 < 0.05$),说明细胞分裂素 BA 对文心兰丛生芽的增殖影响也显著。基本培养基、BA 和 NAA 均是促进丛生芽增殖的主要因素。b × c 的交互作用和 d 因素的效应未达到显著水平 ($P > 0.05$),说明天然添加物和 BA × NAA 的交互作用对丛生芽增殖影响不大,不是主导因子。综合以上分析,影响文心兰丛生芽增殖的主要因素是(1)基本培养基;(2)细胞分裂素 BA;(3)生长素 NAA。进一步对 a、b、c、d 因素进行多重比较,结果见表 4、表 5、表 6、表 7。

表 4 a 因素 3 水平 Duncan 检验

水平	平均值	差异显著性水平	
		P=0.05	P=0.01
a3	5.58	a	A
a2	4.87	b	B
a1	4.12	c	C

表 5 d 因素 3 水平 Duncan 检验

水平	平均值	差异显著性水平	
		P=0.05	P=0.01
d1	5.12	a	A
d2	4.95	ba	A
d3	4.49	b	A

2.1.1 基本培养基类型对文心兰丛生芽增殖的影响
由表 4 知:a 因素 3 水平之间的差异均达到 1% 的极显著水平,从平均值来看,第 3 水平最佳,其次为第 2 水平。又因为 a 为主要因素,故最优组合中必选 a3,即 MS。

2.1.2 椰乳汁、番茄汁、苹果汁三种天然提取物对文心兰丛生芽增殖的影响 虽然天然添加物的主导效应不

突出,但对丛生芽增殖有着一定的促进作用^[4]。由多重比较表 5 知:以上三种天然添加物之间也存在着一定的差异。d 因素 3 水平之间,d1 与 d3 差异显著,其余差异不显著。根据平均值看,以 d1 水平最优,其次为 d2。由于 d 为次要影响因素,d1、d2 任选其一,即椰乳汁 150.0 ml/L 或番茄汁 150.0 ml/L 均可。由于番茄是一种常见的蔬菜并且大棚番茄技术成熟,在本地区一年四季均有大量供应,随处可见,且价格便宜,而椰子不常见,除了椰子成熟期,市场上有较多供应外,其它月份供应很少,所以获取椰子受季节的限制。另外就价格而言,与番茄相比椰子较昂贵,因此建议使用番茄汁以降低组培成本。

表 6 b 因素 3 水平 Duncan 检验

水平	平均值	差异显著性水平	
		P=0.05	P=0.01
b2	5.17	a	A
b1	4.81	a	A
b3	4.59	b	A

表 7 c 因素 3 水平 Duncan 检验

水平	平均值	差异显著性水平	
		P=0.05	P=0.01
c2	5.24	a	A
c3	4.95	a	A
c1	4.38	b	B

2.1.3 细胞分裂素 BA 和生长素 NAA 对文心兰丛生芽增殖的影响 由上表 6 可以得出:b 因素 3 水平之间,b2、b1 与 b3 差异显著,其余间差异不显著。从平均值来看,b2、b1 水平平均增殖高于 b3 水平。由于 b 为主要影响因素,故最优组合中可选择 b2 或 b1,即 BA 4.0 mg/L 或 BA 3.0 mg/L

由表 7 知:c 因素 3 水平之间,c2、c3 两水平差异不显著,但与 c1 水平差异显著,其中,c5 与 c1 差异极显著。根据平均值,以 c2、c3 水平高于 c1 水平。由于 NAA 为主要影响因素,故最优组合中选 c2、c3 均可,即 NAA 0.4 或 0.6 mg/L。

另外,在此次试验过程中,发现第 5、8、13、17、19、20、23、25、26 组小芽基部均原球茎产生,其中第 19、20 两组原球茎产生的较多且增殖较快,故可初步认为适宜于原球茎诱导和增殖的培养基为 MS + BA 3.0 mg/L + NAA 0.2~0.4 mg/L + 椰乳汁 150.0 ml/L 或苹果汁 150.0 ml/L + Vc 0.2 mg/L + 活性炭 1.0 g/L + 糖 30.0 g/L + 琼脂 8.0 g/L + pH5.4。有关原球茎诱导、增殖及分化等方面的内容,将在下一步的工作中详细研究。

3 总结与讨论

综上所述,影响文心兰丛生芽增殖的主要因素是(1)基本培养基,以 MS 最佳;(2)细胞分裂素 BA,以

BA 3.0 mg/L 或 BA4.0 mg/L 最佳; (3) 生长素 NAA, 以 NAA 0.4 mg/L 或 0.6 mg/L 最佳。文心兰丛生芽增殖的最优组合是 a6b5(b4)c5(c6), 最适宜的培养基配方是 MS + BA 3.0 或 4.0 mg/L + NAA 0.4 或 0.6 mg/L + 椰乳汁 150.0 ml/L 或番茄汁 150.0 ml/L + Vc 0.2 mg/L + 活性炭 1.0 g/L + 糖 30.0 g/L + 琼脂 8.0 g/L + pH5.4。

文心兰成苗途径有两条: 一是丛生芽途径, 二是原球茎途径。这两种途径各有优劣。有关的报道大多集中在通过原球茎增殖及苗分化来达到快速繁殖的目的。

据现有的报道, 原球茎的月增殖率为 332.5%, 年理论增殖系数能达到 1.83×10^6 [12]。但是原球茎途径从诱导起始材料开始, 要经历从脱分化到再分化的过程, 即是:

外植体 $\xrightarrow{\text{脱分化}}$ 原球茎 $\xrightarrow{\text{再分化}}$ 小苗

从原球茎阶段到成苗阶段要比丛生苗途径晚 2 个多月, 而且长成的苗大多纤细柔弱, 必须经过壮苗培养阶段才能更好的生长, 另外原球茎后代再生植株中有较高的变异率, 难以保持母株的优良特性。

为了进一步减少遗传变异的发生, 有人提出摒弃原球茎途径增殖的方法, 采用丛生芽途径直接出苗 [10]。这在蝴蝶兰和大花蕙兰的组培快繁中已取得成功 [12-16], 有关文心兰通过丛生芽途径直接出苗的研究尚未见到详细报道。

丛生芽途径直接出苗, 一个芽在两个半月内增殖 6.53 倍, 年理论增殖系数约为 0.82×10^4 , 虽然繁殖系数比原球茎低, 但丛生芽途径繁殖周期短, 一年可进行多次, 可以跨越原球茎阶段直接出苗, 不需要分化培养, 长成的苗大多健壮, 不需壮苗培养, 简化了培养步骤, 节约了时间, 降低了生产成本, 而且再生植株变异率低, 能较好的保持母株优良特性。此次实验通过采用丛生芽途径直接出苗, 详细研究和探索了丛生

芽途径的技术环节和最佳条件, 证实了丛生芽途径的可行性和有效性, 这将对改进和提高大规模工厂化生产具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 彭晓明, 曾宋君, 张京丽, 等. 文心兰的茎尖及花梗组织培养和快速繁殖. 园艺学报, 2000, 27(2): 127-129.
- [2] 陈兴贻. 文心兰的组织培养. 植物生理学通讯, 1989, (5): 49.
- [3] 朱根发, 王怀宇, 陈明莉. 文心兰脱素快速繁殖技术研究. 广东农业科学, 1997, (4): 27-28.
- [4] 陈友菊. 活性炭和柳乳对文心兰离体芽尖培养的影响. 实用医学进修, 2000, 28(4): 219-221.
- [5] 何林林, 十三鸟和子, 孔德政, 等. 不同基本培养方式对文心兰原球茎增殖的影响. 华北农学报, 2001, 16(1): 88-91.
- [6] Kербаллы GB. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* by means of root tip culture. Plant Cell Reports, 1984, 3(1): 21-29.
- [7] Kербаллы G B. In Vitro flowering of *Oncidium varicosum* meri-clones. Plant Science Letters, 1984, 35(1): 73-75.
- [8] Norio Kurihala. Clonal propagation of *Oncidium* by means of stem tip culture. Bull Gunma hort Exp Sin, 1983, 11: 30-39.
- [9] 王亦菲, 陆瑞菊, 周润梅, 等. 丛生芽——文心兰快速成繁殖的新途径. 华北农学报, 2001, 10: 66-67.
- [10] 丁兰, 付庭洽. 兰花生物工程研究进展. 西北师范大学学报(自然科学版), 2000, 3: 9-11.
- [11] 潘学峰, 王日暖, 等. 文心兰茎尖离体培养研究. 热带林业, 2001, 145-152.
- [12] 张正良, 伊华. 文心兰分株繁殖和控花栽培. 中国花卉园艺, 2003, 12: 26-27.
- [13] 王怀宇. 蝴蝶兰的快速无性繁殖. 园艺学报, 1989, 16(1): 73-77.
- [14] 李进进, 廖俊杰, 柯丽婉, 等. 蝴蝶兰根段的组织培养. 植物生理学通讯, 2000, 23(1): 37.
- [15] 郑迎冬, 杨承能, 蒋林. 大花蕙兰的茎段培养. 种恺农业技术学院学报, 2000, 13(1): 19-22.
- [16] 刘明志, 朱京育. BA 和复合添加物对大花蕙兰增殖和分化的影响. 暨南大学学报(自然科学版), 2000, 21(3): 100-105.

(责任编辑: 杜宏)