

文心兰试管苗分化及育苗技术研究

魏翠华, 谢 宇, 陈 沁

(福州市农业科学研究所, 福建 福州 350018)

摘 要: 文心兰原球茎分化苗过渡驯化培养试验表明, 改良 1 号 + 椰子汁 100g/L 的培养基有利于原球茎分化成苗, 能促进分化苗生长健壮、整齐度好。壮苗与生根培养试验表明, 以改良 1 号为基本培养基, 加入香蕉泥 100g/L、活性炭 1g/L, 在较强光照 (2 000~3 000 lx) 下培养, 植株各项生长指标表现较好, 有利于后期炼苗成活; 以三角瓶为定瓶容器培养, 植株接种效率最高、污染率最低; 选取 3cm 高的植株定瓶, 可显著提高文心兰工厂化组培育苗的工作效率。

关键词: 文心兰; 组织培养; 试管苗

中图分类号: S682.31

文献标识码: A

文章编号: 1009-7791(2008)01-0037-04

Study on Plantlet Differentiation and Growth of *Oncidium*

WEI Cui-hua, XIE Yu, CHEN Qin

(Fuzhou Institute of Agricultural Sciences, Fuzhou 350018, Fujian China)

Abstract: The test for passing domestication culture of *Oncidium* adventitious buds from PLBs showed that taking the modified 1 medium as basic medium supplemented with 100g/L coconut milk for organic additive and no plant-growth regulator were favorable for the PLBs regeneration and could promote the adventitious buds to grow healthy and good uniformity. According to the test of culture medium, organic additive, the amount of activated charcoal, illumination intensity, container and the altitude of the plantlet to fixing into the container, etc, all which relating to the culture elements of PLBs rhizogenesis plantlet strengthening were screened. Results showed that, all plantlets growing from modified 1 medium with 100g/L banana mud, 1g/L activated charcoal, no plant-growth regulator, under the strong light (2 000~3 000 lx), which promoting the growth of plantlets had better performance in each growing index, and they were favorable for the survival of the later domestication. Results showed that also the plants growing in the triangular flask had highest inoculation rate, the lowest contamination rate and better growth index. In the altitude 3 cm of the plantlet to fixing into the container, the efficiency of factory micropropagation of *Oncidium* was improved.

Key words: *Oncidium*; tissue culture; plantlet

文心兰 (*Oncidium*) 又名舞女兰、金蝶兰等, 系兰科文心兰属植物, 属热带复茎性陆生兰^[1]。本属植物全世界原生种多达750种以上, 原产于美洲热带地区, 种类分布最多的有巴西、美国及秘鲁等^[2]。文心兰花朵造型奇特, 形态变化多样, 色彩鲜艳, 花小而多, 可连续不断地开放且持续时间长(1~3个月)^[2]。近年来, 文心兰作为盆花和切花的生产量均急剧增加, 市场需求量越来越大^[3-6]。

文心兰通常采用分株或播种等方法进行繁殖, 而种子没有胚乳, 发育不完全, 自然条件下种子萌发需与真菌共生^[7], 播种繁殖极为困难, 且播种存在后代性状不一等缺点^[2,8]; 此外, 每株文心兰一年仅繁殖2~3个芽, 分株繁殖系数低。因此, 利用组培技术进行快速繁殖是实现文心兰种苗工厂化生产

的理想方法。我国洋兰组培研究起步较晚,且多集中在大花蕙兰、蝴蝶兰等种类,有关文心兰的研究也多集中在原球茎及丛生芽增殖方面,而对原球茎分化形成幼苗的再培养条件尚无系统研究。本文研究文心兰试管苗壮苗生根培养过程中的关键技术问题,旨在探讨低成本、高效率、高品质的成苗技术及培养条件,为提高其组培育苗的工厂化生产效率提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用品种为从台湾引进的蜜糖文心兰 (*Oncidium Sweet Sugar*),先通过茎尖诱导形成原球茎 (PLB),再以 PLB 增殖继代培养 35d 的母瓶植株为接种材料。

1.2 方法

1.2.1 PLB 分化苗过渡驯化培养 将经过增殖的 PLB 团块转接至分化成苗培养基中进行过渡驯化培养,观察记录驯化苗生长状况及试管苗整齐度等。培养温度 $(26\pm 2)^{\circ}\text{C}$,光照强度 2 000 lx,光照时间 14h/d。

1.2.2 壮苗与生根培养 将 PLB 分化小苗切成不带根整齐单株,接种在壮苗生根培养基中,以 200ml 广口瓶为培养容器,每处理接种 10 瓶,每瓶 10 株,重复 2 次。培养温度 $(26\pm 2)^{\circ}\text{C}$,光照强度 2 500 lx,光照时间 14h/d。培养 75d 时,调查每处理中植株的最长叶长、叶数、假鳞茎形成、根数及最长根长等指标,计算生根率(生根苗数占试验总苗数的百分率)、假鳞茎形成率(形成假鳞茎苗数占试验总苗数的百分率),评价生根壮苗情况。同时在工厂化生产过程中,统计每个熟练接种工 8h(工作日)的接种苗数(指平均接种苗数)、污染苗数,计算污染率(污染苗数占接种苗数的百分率)、有效接种苗数(扣除污染以外的接种苗数),分析定瓶容器对接种操作工生产效率的影响。

2 结果与分析

2.1 PLB 分化苗过渡驯化培养

在预培养试验中发现,直接以 PLB 增殖培养后的分化苗进行定瓶,同一母瓶的分化苗大小差别很大,不利于提高接种工作效率。本研究以 PLB 增殖培养 35d 的母瓶为材料,以改良 1 号和花宝 1 号(2g/L)为基本培养基,分别添加不同有机添加剂进行过渡驯化培养 35d,探讨培养基、有机添加剂等对驯化苗生长状况及整齐度的影响。试验表明(表 1),有机添加剂对分化苗的健壮度、整齐度及根系发育影响较大,培养基中添加香蕉泥 100g/L 有利于分化苗及其根系生长,但根多、长不利于接种效率的提高。结合分化苗的整齐度,培养基中添加椰乳 100g/L 有利于驯化苗的生长。而改良 1 号与花宝 1 号(2g/L)基本培养基的影响差别不大。

表 1 基本培养基和有机添加剂对 PLB 分化苗过渡驯化培养的影响

基本培养基	有机添加剂(g/L)	35d 分化情况	整齐度
改良 1 号	香蕉泥 100	分化苗多,根较多、粗、长	++
	Peptone2	分化苗较少,同时伴随 PLB 增殖	+
	椰乳 100	分化苗多、整齐,PLB 少,根较短、少	+++
花宝 1 号 (2g/L)	香蕉泥 100	分化苗多,根多、粗、长	++
	Peptone2	分化苗较少,同时伴随 PLB 增殖	+
	椰乳 100	分化苗多、整齐,PLB 少,根粗短	+++

注: +、++、+++ 分别表示整齐度为较差、一般、较好。

2.2 壮苗与生根培养

2.2.1 不同培养基对植株生长状况的影响 在过渡驯化培养的基础上,选择三种基本培养基对 3cm 高的小苗进行生根壮苗培养。75d 后统计,三种基本培养基的生根率均较高,其余指标以 1/2MS 基本培养基最低,改良 1 号与花宝 1 号(2g/L)的各项生长指标值相近(表 2)。

2.2.2 有机添加剂对植株生长的影响 试验选择 5 种有机添加剂,以不加任何添加剂作对照(表 3)。结果表明,植株最长叶长以外

表 2 不同培养基对植株生长的影响

基本培养基	最长叶 长(cm)	平均叶 数(片)	生根率 (%)	最长根 长(cm)	平均根 数(条)	假鳞茎 (%)
1/2MS	7.9	3.2	97	3.4	3.2	45
改良 1 号	9.1	4.0	100	3.9	3.6	80
花宝 1 号(2g/L)	8.9	3.8	100	4.1	3.8	85

理Ⅰ和处理Ⅱ较好,两者平均达9.2cm及9.5cm,明显高于其它处理;平均叶数各组数值相近;生根率以处理Ⅰ~Ⅳ较高,达95%以上,其中处理Ⅱ达100%;最长根长以处理Ⅰ、Ⅱ较长,明显长于其它处理;平均根数以处理Ⅰ~Ⅳ较多,其中以处理Ⅱ及处理Ⅳ根数最多;假鳞茎形成率以处理Ⅱ最高,处理Ⅰ其次,对照与处理Ⅴ很低(10%以下)(表4)。

总体而言,以处理Ⅱ作为有机添加剂培养的植株,各项指标均有较好的表现,处理Ⅰ其次,两处理培养的植株健壮、根系粗壮;处理Ⅲ、Ⅳ表现中等;处理Ⅴ与对照组CK培养的植株瘦弱、根系细短。此外,处理Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ及CK培养的植株基部伴有少量小苗形成,影响植株的整齐度,不利于壮苗生根培养。

2.2.3 培养容器对植株生长状况的影响 不同培养容器对植株定瓶效率的影响试验表明,以接种工人每天的接种苗数统计,广口瓶的接种苗数最多,其次是三角瓶,宝利瓶最少。接种污染率以广口瓶最高,三角瓶和宝利瓶相近(表5)。但有效接种苗数以三角瓶最多,其次是宝利瓶,广口瓶最少。这与三种容器的不同结构有关,广口瓶瓶口大,有利于操作,工人接种速度快,但因其瓶口大以及塑料瓶盖密封性能差,易造成杂菌侵入,污染率高。而三角瓶、宝利瓶开口小,接种效率较低,但其橡胶瓶盖密封性能好,污染率也低。综合比较表明,采用三角瓶作为定瓶容器,有效接种苗数最多。

平均高度为3cm的植株分别定瓶于三种不同培养容器中。培养75 d后统计,结果表明,三种培养容器的生根壮苗效果差别不大(表6)。

综合考虑接种效率及植株生长状况,三角瓶最适用于定瓶苗的生根壮苗培养,有利于提高工厂化生产育苗工作效率。

2.2.4 定瓶苗高度对植株生长的影响 分别选取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0cm高的试管苗进行定瓶试验。结果表明,假鳞茎形成率、平均根数、最长根长均随着定瓶苗高度的增加而增加;平均生长量随着定瓶苗高度的增加,在高度4.0cm

时上升为最大值,5.0cm高的试管苗有所降低,但植株总高度最大;定瓶苗高度为1.0cm和2.0cm时,平均根数较少,最长根长也较短,且植株瘦弱,没有假鳞茎形成,基部伴生小苗,呈丛生状(表7)。

总体而言,定瓶苗较高有利于生根壮苗。考虑到母瓶中高的植株(4.0cm以上)所占比例不大,兼顾工厂化生产的工效问题,选择3.0cm以上的试管苗作为定瓶苗较为合理。

2.2.5 活性炭对植株生长状况的影响 试验表明,加入适量活性炭可促进瓶苗植株及其根系生长,主要表现为促进植株健壮生长及假鳞茎形成,同时还促进根系向地性生长(表8)。但高浓度的活性炭会影响植株生长,以加入1g/L活性炭较适宜。

表3 壮苗生根培养中有机添加剂种类与添加量

处理编号	有机添加剂种类	添加量(g/L)
I	蛋白胨 Peptone	2
II	香蕉泥	100
III	椰子汁	100
IV	番茄汁	100
V	苹果汁	100
CK	-	-

表4 有机添加剂组合对植株生长的影响

处理	最长叶长(cm)	平均叶数(片)	生根率(%)	最长根长(cm)	平均根数(条)	假鳞茎(%)
I	9.2	3.8	98	4.3	3.1	56
II	9.5	3.6	100	4.5	3.8	75
III	8.6	3.6	96	3.1	3.5	22
IV	8.8	3.8	95	3.6	3.8	28
V	7.9	3.3	72	2.8	1.7	6
CK	7.2	3.0	84	2.5	1.9	8

表5 不同培养容器对植株定瓶效率的影响

培养容器	每瓶接种株数	接种瓶数(瓶/d)	接种苗数(株/d)	污染率(%)	有效接种苗数(株/d)
广口瓶	11	140	1 540	10.5	1 378
三角瓶	33	45	1 485	3.6	1 432
宝利瓶	44	33	1 452	3.8	1 397

表6 不同培养容器对植株生长的影响

培养容器	每瓶接种株数	最长叶长(cm)	平均叶数(片)	假鳞茎(%)	平均根数(条)	最长根长(cm)
广口瓶	11	10.0	4.0	85	3.8	4.8
三角瓶	33	9.5	3.8	75	3.6	4.5
宝利瓶	44	9.4	3.8	72	3.5	4.3

表7 定瓶苗高度对植株生长的影响

定瓶苗高度(cm)	平均生长量(cm)	平均叶数(片)	假鳞茎(%)	平均根数(条)	最长根长(cm)
1.0	2.8	3.0	0	1.2	1.1
2.0	3.9	3.2	0	2.2	2.7
3.0	5.6	3.5	75	3.8	4.2
4.0	6.1	3.5	86	4.2	4.3
5.0	5.5	3.6	94	4.5	4.8

表 8 活性炭对植株生长的影响

活性炭用量(g/L)	植株生长	根系生长
0	植株较瘦弱, 基部长出丛芽, 有朝上也有朝下生长	多数根系朝培养基表面或向上生长
1	植株健壮, 部分植株长出假鳞茎	多数根系朝下生长, 根粗壮, 根毛多
2	植株较健壮, 部分植株长出假鳞茎	多数根系朝下生长, 根较粗壮
3	植株较瘦弱, 只有少数植株有假鳞茎	根系朝下生长, 根系少, 根细短

2.2.6 光照强度对植株生长的影响 试验表明, 定瓶 75d 时, 3 000 lx 光照下培养的植株, 最长叶长和生根率均明显高于 500 lx。2 000~3 000 lx 较强光照下培养的植株生根率达 96%~100%, 而弱光下培养的生根率仅 47%~65%(表 9)。就

根的粗度和长度而言, 较强光照下植株根系生长势也较强。总之, 较强光照下(2 000~3 000 lx), 植株粗壮, 移植成活率高(92%~98%); 而在过强光照下植株矮化生硬, 弱光下植株瘦弱茎抽节, 移植成活率低。

表 9 光照强度对植株生长的影响

光照强度 (lx)	最长叶 长(cm)	瓶苗生长情况	生根率 (%)	根系生长情况	移栽成 活率(%)
500	8.6	苗细弱、色淡, 茎抽节	47	根少细短	36
1 000	8.9	苗瘦弱、茎抽节	65	根少细长	57
2 000	9.6	苗较粗壮, 叶色深绿	96	根较多、较粗壮	92
3 000	9.8	苗粗壮、叶色深绿	100	根多、粗壮	98
4 000	8.1	苗矮壮, 叶短色浓	88	根少、粗短	78

3 讨 论

工厂化组培育苗过程中, 不仅要保持快速的繁殖速度, 还要求组培苗健壮、整齐度好^[9]。壮苗与生根培养的效果直接影响到炼苗与成活率, 因此, 该阶段是工厂化组培育苗的关键。本试验表明, 改良1号和花宝1号培养基, 适合于试管苗的快速生长, 但花宝1号价格昂贵, 改良1号为本课题组用主要大量元素自行调配的培养基, 成本较低, 在工厂化生产育苗中, 可选用该培养基。

有机添加剂如椰子汁、香蕉泥、番茄汁、马铃薯以及蛋白胨peptone等, 含有氨基酸、激素和酶等, 对细胞和组织的增殖、分化有明显的促进作用^[8], 已广泛应用于洋兰组培^[10-13]。研究表明, 培养基中加入香蕉泥100g/L, 培养的植株健壮、根系粗大, 有利于后期炼苗成活。由于香蕉品种、产地和成熟度的不同, 香蕉泥有效成分有所区别, 因此, 在工厂化生产育苗中, 应先试验待证实后再大量使用。

培养容器和定瓶苗高度, 影响工人接种效率和工厂化生产育苗的工作效率。试验表明, 三角瓶作为培养容器, 3cm以上试管苗定瓶的植株各项生长指标较好, 且能显著提高生产效率。

参考文献:

- [1] 陈心启,等. 中国兰花全书[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 226.
- [2] 曹汝义,等. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 154-155.
- [3] Santana G E, et al. Clonal propagation of *Oncidium* through the culture of floral buds[J]. Acta Horticulture, 1997,482: 315-320.
- [4] Prasshart B, et al. In vitro regenerator of *Oncidium* Gower Ramsey by high frequency PLBs proliferation[J]. India Journal of Plant Physiology, 1997,2(1): 10-14.
- [5] 何松林,等. 基本培养基及凝固剂对文心兰试管苗生长发育的影响[J]. 北京林业大学学报, 2001,23(1): 29-31.
- [6] 何松林,等. 不同基本培养基及培养方式对文心兰原球茎增殖的影响[J]. 华北农学报, 2001,16(1): 88-91.
- [7] 何松林,等. 施 CO₂ 时培养基糖浓度对文心兰试管苗生长的影响[J]. 园艺学报, 2003,30(6): 745-747.
- [8] 谭文澄,等. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 237.
- [9] 熊丽,等. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 94.
- [10] Murashige T, et al. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Plant Physiology, 1962,15: 437-497.
- [11] Fuf M L. Studies on the tissue culture of orchids 1. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by lateral buds from flower stems [J]. Orchid Rev., 1978,86: 308-310.
- [12] Fuf M L. Studies on the tissue culture of orchids 2. Clonal propagation of *Cattleya* by leaf tissue culture[J]. Orchid Rev., 1979,87: 343-346.
- [13] Sagawa Y, et al. Clonal propagation of orchid by tissue culture[C]. Tokyo: Jap Association for Plant Tissue Culture, 1982.