

叶秀仙, 黄敏玲, 罗远华, 等. 应用正交设计优化文心兰丛生芽增殖培养体系 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (9): 897-901.

YE X-X, HUANG M-L, LUO Y-H, et al. Orthogonal Optimization for Propagation of Clustered *Oncidium* Buds [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28 (9): 897-901.

应用正交设计优化文心兰丛生芽增殖培养体系

叶秀仙^{1,2,3}, 黄敏玲^{1,2,3}, 罗远华^{1,2,3}, 吴建设^{1,2,3}, 林 兵^{1,2,3}

(1. 福建省农业科学院作物研究所, 福建 福州 350013; 2. 福建省农业科学院花卉研究中心, 福建 福州 350013; 3. 福建省特色花卉工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要: 以文心兰‘小樱桃’花梗腋芽诱导出的丛生芽为增殖培养材料, 采用正交设计法, 研究基本培养基、6-BA、NAA 和水解乳蛋白 (LH) 4 种因素对文心兰丛生芽增殖的影响, 以期筛选出各因子的最佳水平, 建立文心兰‘小樱桃’丛生芽增殖培养体系。结果表明: 各试验因素对文心兰丛生芽增殖影响的主次关系为 6-BA > 基本培养基 > NAA > LH; 筛选出文心兰丛生芽增殖的最佳培养基配方为改良 1 号 + 6-BA 3.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + LH 0.5 g · L⁻¹, 45 d 平均增殖系数达 6.53, 有效提高了繁殖效率, 为其种苗工程化育苗提供了技术基础。

关键词: 文心兰; 丛生芽; 正交设计; 组织培养

中图分类号: S 68

文献标识码: A

Orthogonal Optimization for Propagation of Clustered *Oncidium* Buds

YE Xiu-xian^{1,2,3}, HUANG Min-ling^{1,2,3}, LUO Yuan-hua^{1,2,3}, WU Jian-she^{1,2,3}, LIN Bing^{1,2,3}

(1. Institute of Crop Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2. Flowers Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;

3. Fujian Engineering Research Center for Characteristic Floriculture, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: Peduncle axillary buds of the Little Cherry, *Oncidium*, were induced as explants. The orthogonal design was used to evaluate the effects of the culture medium containing inorganic substances, 6-BA, NAA and LH on the propagation of *Oncidium* buds. The result showed that 6-BA, the base medium, NAA and LH affected significantly on the bud multiplication. The optimal medium was the Improved Formulation No. 1, which consisted of the base medium, 6-BA 3.0 mg · L⁻¹, NAA 0.1 mg · L⁻¹ and LH 0.5 g · L⁻¹, and the average propagation coefficient was 6.53 in 45 days. The breeding efficiency was effectively improved. The result appeared to provide a basis for the commercialization of the seedling propagation.

Key words: *Oncidium*; bud clumps; orthogonal design; tissue culture

文心兰为兰科文心兰属 *Oncidium* 植物, 其花朵色彩鲜艳, 形似飞翔的金蝶, 又似翩翩起舞的舞女, 故又名跳舞兰、金蝶兰、舞女兰等。文心兰是新兴兰花植物, 商品价值高, 被誉为切花“五美人”之一, 是国内外花卉市场主流商品花卉之一。近年来, 我国文心兰种植面积、产量逐年上升, 产业发展前景十分广阔, 市场对优质种苗需求极为迫切。

文心兰同其他兰科植物一样, 按照传统的分株繁殖, 繁殖率低, 难以满足生产需要。因此, 利用组织培养技术进行快繁是实现文心兰种苗工厂化生产的理想途径^[1-4]。目前, 国内开展文心兰组织培养已有较多研究报道, 但大多研究选择原球茎途径, 而原球茎途径要经历脱分化再分化培养过程, 历时较长, 成苗率较低, 且再生植株中易出现变异, 难以保持母株的优良特性, 这对于优良品种的

收稿日期: 2013-06-21 初稿; 2013-08-05 修改稿

作者简介: 叶秀仙 (1977-), 女, 副研究员, 主要从事花卉组织培养技术研究 (E-mail: yxx7861@163.com)

通讯作者: 黄敏玲 (1960-), 女, 研究员, 主要从事花卉品种选育与生物技术研究 (E-mail: pudang12@yahoo.com.cn)

基金项目: 福建省科技计划重大专项 (2010NZ0003); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD-2-1317); 福建省自然科学基金项目 (2012J01114)

种性保持与种苗快繁均不利。近年来,笔者在文心兰主栽品种‘蜜糖’、‘南茜’种苗繁育方面证明了丛生芽途径的可行性^[5-6],其优点是通过芽生芽达到快繁目的,可大大降低再生后代变异的可能性。目前,有关文心兰采用丛生芽途径建立组培快繁技术的系统研究报道较少^[5-7],而有关采用正交试验设计方法优化文心兰‘小樱桃’丛生芽增殖培养体系的研究未见报道。本试验以文心兰‘小樱桃’花梗为外植体,选择丛生芽途径直接出苗,并采用正交试验设计,探讨丛生芽增殖优化条件,旨在探索高效、优质的种苗工程化快繁技术,为提高其种苗商业化生产效率提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

文心兰‘小樱桃’*Oncidium* ‘Little Cherry’,台湾引进的盆栽小花品种,具香味。选择健壮植株抽长的幼嫩花梗作为启动培养的外植体。试验在福建省特色花卉工程技术研究中心花卉育种实验室进行。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒处理 从健康母株上选取幼嫩带腋芽的花梗,用自来水冲洗 30 min,然后分段并剥去腋芽芽鞘,在超净工作台上将外植体放入无菌容器中,先用 75% 的酒精浸泡 30 s,随后转入 0.1% 升汞溶液中浸泡消毒 10 min,取出用无菌水冲洗 4~5 次,再用无菌滤纸吸干水分,备用。

1.2.2 丛生芽诱导与增殖 切取带腋芽的节间部分接种到 1/2MS+TDZ 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+白糖 30 g·L⁻¹+琼脂粉 5.0 g·L⁻¹培养基中进行丛生芽诱导培养。获得的丛生芽作为增殖培养试验材料。

丛生芽增殖采用 4 因素 4 水平 L₁₆ (4⁴) 正交设计,选择基本培养基、6-BA、NAA、水解乳蛋白(LH)为试验因素,代号分别为 A、B、C、D,各设置 4 个水平(表 1)。各处理培养基均附加白糖 30 g·L⁻¹、琼脂粉 5.0 g·L⁻¹。16 个处理,每处理接种 6 瓶。每瓶接种 6 团(每团带 2~3 个小芽),3 次重复。

1.2.3 生根培养及移栽 切取单芽接入 1/2MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹+白糖 20 g·L⁻¹+琼脂粉 5.0 g·L⁻¹+AC 0.5 g·L⁻¹+苹果泥 100 g·L⁻¹壮苗生根培养基中进行生根诱导,并进行移栽种植。

1.2.4 培养方式与培养条件 以 220 mL 组培瓶为培养容器,采用固体培养基培养方式,每瓶培养

基用量 25~30 mL, pH 5.8, 培养温度为 (25±2)℃, 光强为 2 000~2 500 lx, 光照时间为 12 h·d⁻¹。

1.2.5 数据统计 采用正交设计助手 V3.1 软件进行分析^[8]。

表 1 L₁₆ (4⁴) 因素及水平

Table 1 L₁₆ (4⁴) factors and levels in orthogonal design

编号	A(基本培养基)	B(6-BA)/(mg·L ⁻¹)	C(NAA)/(mg·L ⁻¹)	D(LH)/(mg·L ⁻¹)
1	MS	0.5	0.05	0
2	花宝 1 号	1.0	0.1	0.2
3	改良 1 号	2.0	0.2	0.5
4	改良 2 号	3.0	0.4	1.0

注:花宝 1 号用量 3.0 g·L⁻¹,改良 1 号为 1/2MS 添加花宝 1 号 1.5 g·L⁻¹ 配置而成,改良 2 号为 1/3MS 添加花宝 1 号 1.5 g·L⁻¹ 配置而成。

2 结果与分析

2.1 丛生芽诱导

外植体经消毒处理后,切取带腋芽的花梗切段接种在诱导培养基上,培养 12 d 后,花梗腋芽开始萌动,基部逐渐脱分化出生长点,60 d 后分化出带小叶的丛生芽(图 1-A)。丛生芽经 3 次继代转接,获得一定量的丛生芽,作为下一步丛生芽增殖的试验材料。

2.2 丛生芽增殖

丛芽团接种 15 d 后,芽基部切口部位开始膨大,30 d 后不同处理组陆续长出丛生芽(图 1-B~C)。增殖培养 45 d 后统计丛生芽增殖系数(增殖系数=增殖芽数/接种芽数),试验统计分析结果见表 2、3。

表 2 结果表明,从 K 值大小可以看出,在文心兰丛生芽增殖过程中,以改良 1 号为基本培养基较好,6-BA 浓度需求量较高,适宜浓度为 3.0 mg·L⁻¹,NAA 适宜浓度为 0.1 mg·L⁻¹,水解乳蛋白为 0.5 g·L⁻¹;从极差 R 值大小可以看出,不同因素对丛芽增殖影响的主次关系为 B>A>C>D,这说明对文心兰丛芽增殖起主要作用的是 6-BA,其次是基本培养基、NAA,水解乳蛋白对增殖的影响较小。文心兰丛芽增殖最佳处理组合是 A₃B₄C₂D₃,即改良 1 号+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+LH 0.5 g·L⁻¹,45 d 平均增殖系数达 6.53。

表 2 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计与极差分析

Table 2 Analysis on orthogonal design $L_{16}(4^4)$ and experimental data

处 理	因 素				丛生芽平均 增殖系数
	A	B	C	D	
1	MS	0.5	0.05	0	3.72
2	MS	1.0	0.1	0.2	4.23
3	MS	2.0	0.2	0.5	4.52
4	MS	3.0	0.4	1.0	5.38
5	花宝 1 号	0.5	0.1	1.0	3.73
6	花宝 1 号	1.0	0.05	0.5	3.37
7	花宝 1 号	2.0	0.4	0.2	4.18
8	花宝 1 号	3.0	0.2	0	4.76
9	改良 1 号	0.5	0.2	0.2	3.74
10	改良 1 号	1.0	0.4	0	5.14
11	改良 1 号	2.0	0.05	1.0	6.11
12	改良 1 号	3.0	0.1	0.5	6.53
13	改良 2 号	0.5	0.4	0.5	4.61
14	改良 2 号	1.0	0.2	1.0	3.56
15	改良 2 号	2.0	0.1	0	5.14
16	改良 2 号	3.0	0.05	0.2	5.56
K_1	17.85	15.80	18.76	18.76	
K_2	16.04	16.30	19.63	17.71	
K_3	21.52	19.95	17.66	19.03	
K_4	18.87	22.23	19.31	18.78	
k_1	4.463	3.950	4.690	4.690	
k_2	4.010	4.075	4.908	4.428	
k_3	5.380	4.987	4.145	4.758	
k_4	4.717	5.558	4.827	4.695	
极差 R	1.370	1.608	0.763	0.330	
主次顺序	B>A>C>D				
优水平	A_3	B_4	C_2	D_3	
优组合	$A_3 B_4 C_2 D_3$				

表 3 丛生芽增殖系数方差分析结果

Table 3 Analysis of variance on propagation rate

因素	SS	df	F	$F_{0.05}$	显著性	$F_{0.01}$	显著性
A(基本培养基)	3.928	3	15.225	9.280	*	5.390	*
B(6-BA)	7.031	3	27.252	9.280	*	5.390	*
C(NAA)	1.417	3	5.492	9.280		5.390	*
D(LH)	0.666	3	2.581	9.280		5.390	
误差	0.26	3					

从表 3 可知,基本培养基、6-BA 和 NAA 3 种因素均显著影响文心兰丛生芽增殖系数,但其影响程度的大小有较大差异,表现为 6-BA>基本培养基>NAA, LH 因素无显著影响,与极差分析结果一致。

2.3 生根培养及移栽

切取单芽接种到 $1/2\text{MS} + \text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂粉 } 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{AC } 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{苹果泥 } 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 壮苗生根培养基上,培养 10 d 左右开始发根,根呈放射状分布。壮苗

生根培养 60 d 后,可形成健壮的完整植株(图 1-D)。

当苗高 5~6 cm,具 4~5 片叶时,将瓶苗放置于遮光率 70%~80% 的温棚下炼苗约 10 d (闭口 4 d,半敞口 3 d,全敞口 3 d),以提高瓶苗适应力。出瓶后,瓶苗置于 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多菌灵或百菌清杀菌剂溶液浸泡消毒 8 min,捞出晾干,及时剔除畸形植株,采用水苔包住根部植入 4.5~5.0 cm 育苗杯中,移栽 3 个月后,移栽成活率均在 95% 以上,且生长势较好(图 1-E)。

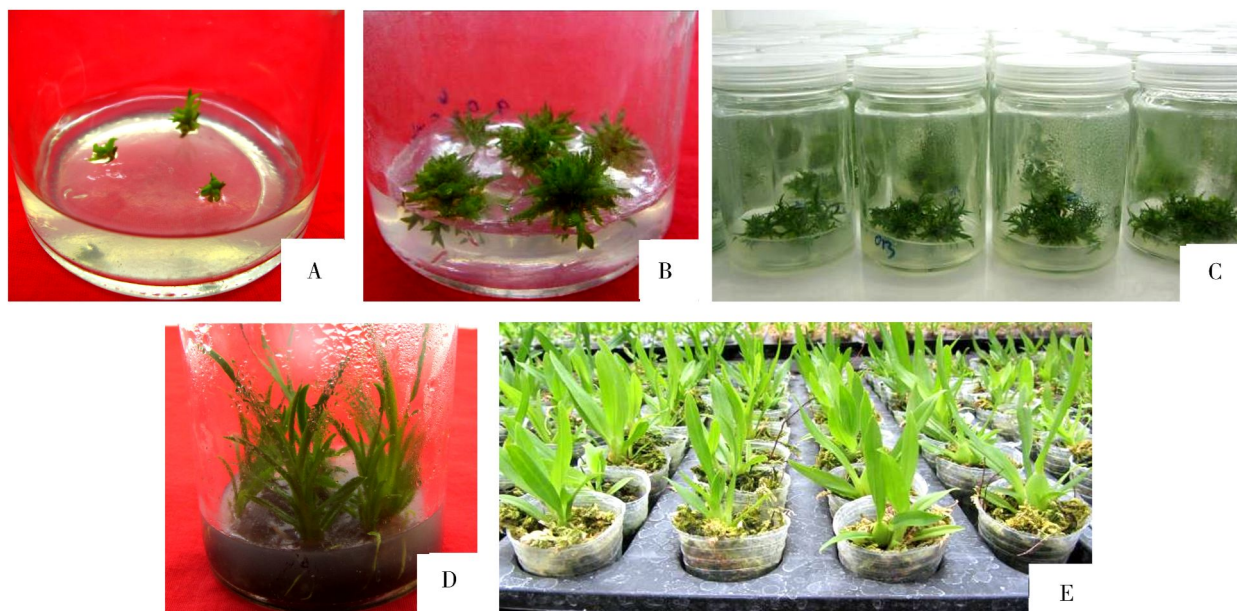


图 1 文心兰丛生芽诱导增殖培养生长过程

Fig. 1 Induction and proliferation of clustered *Oncidium* buds on culture medium

注: A 为丛生芽诱导; B、C 为丛生芽增殖; D 为试管苗生根; E 为试管苗移栽。

3 讨论与结论

文心兰由于存在外植体部位、基因型等因素的差异,其组培快繁关键技术环节中存在较多值得进一步研究的问题^[9],尤其在对特定基因型材料进行培养时,要通过反复试验,才能寻找出适合于特定基因型材料培养的专用培养基与培养方式。

本试验选择基本培养基、6-BA、NAA 和水解乳蛋白(LH)为关键试验因素,探索和优化了文心兰‘小樱桃’丛生芽增殖培养体系。试验结果表明对文心兰‘小樱桃’丛生芽增殖起主要作用的是 6-BA,其次是基本培养基、NAA,水解乳蛋白对增殖的影响较小;以改良 1 号为基本培养基较佳,6-BA 适宜浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 适宜浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 水解乳蛋白适宜浓度为 0.5

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 文心兰丛生芽增殖最佳处理组合是 $\text{A}_3\text{B}_4\text{C}_2\text{D}_3$, 即筛选出文心兰‘小樱桃’丛生芽较适宜的增殖培养基配方为改良 1 号 + 6-BA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{LH } 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 45 d 平均增殖系数可达 6.53, 繁殖率高,为种苗工程化育苗提供了技术保障。

在文心兰组培中,细胞分裂素和生长素是最常用的植物生长调节剂(或植物激素),这 2 类激素的浓度及其比例直接决定了文心兰外植体再生方式和器官分化类型,其中细胞分裂素最常用的是 6-BA,其主要生理功能是促进细胞分裂和分化,抑制顶端优势,促进丛生芽的生长及显著改变其他激素作用等。本试验中,6-BA 对文心兰‘小樱桃’丛生芽增殖影响最大,极大发挥了其生理作用,一定浓度的 6-BA 有利于其丛生芽增殖,这与文心兰

‘蜜糖’^[5-7]及崔广荣等^[2,13]研究结果基本一致,6-BA浓度 $2.0\sim 4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 较适合文心兰试管苗增殖,但所不同的是6-BA与NAA的配置比例存在差异,本试验筛选的激素组合为6-BA $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NAA适宜浓度 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,而其他研究中NAA浓度为 $0.2\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[6,13],这可能是与外植体基因型、试验方法等不同有关。

关于文心兰组培中基本培养基的选择,国外文献报道以1/2MS为基本培养基居多^[11-13],而国内文献报道的以MS基本培养基为多^[1-7,11],也有使用1/2MS基本培养基或其他基本培养基^[2,4],不同研究者之所以得出不尽相同的试验结果,这可能与所使用材料的基因型不同有一定关系。本试验通过对不同基本培养基对比,筛选出适合于文心兰‘小樱桃’丛生芽增殖的基本培养基为改良1号,基本培养基影响作用仅次于6-BA,这说明在对特定基因型材料进行培养时,必须考虑材料的基因型,确立适合于自身材料特点的基本培养基类型。

参考文献:

- [1] 何松林, 十鸟三和子, 孔德政, 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, (1): 29-31.
- [2] 崔广荣, 刘云兵, 张俊长, 等. 文心兰组织培养的研究 [J]. 园艺学报, 2004, (2): 253-255.
- [3] 黄萍萍, 潘伟彬, 廖福琴, 等. 文心兰组织培养与快速繁殖 [J]. 闽西职业大学学报, 2003, (4): 67-68.
- [4] 何松林, 孔德政, 杨秋生, 等. 碳源和有机添加物对文心兰原球茎增殖的影响 [J]. 河南农业大学学报, 2003, (2): 154-157.
- [5] 叶秀仙, 黄敏玲, 吴建设, 等. 文心兰茎尖诱导丛生芽高频率植株再生 [J]. 福建农业学报, 2009, 24 (2): 126-137.
- [6] 叶秀仙, 黄敏玲, 钟淮钦, 等. 文心兰离体再生体系建立及试管苗种质保存研究//中国观赏园艺研究进展 2009 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2009: 193-197.
- [7] 谷风, 侯卓捷, 张志平, 等. 文心兰丛生芽组培快繁研究初报 [J]. 中国农学通报, 2007, (2): 85-88.
- [8] 陈小桦, 岑爱华, 罗晓青. 正交试验设计方法在植物无性繁殖研究中的应用 [J]. 园艺与种苗, 2012, (9): 1-3.
- [9] 崔广荣. 文心兰组织培养及转基因研究进展 [J]. 草业学报, 2010, 19 (4): 220-229.
- [10] 崔广荣, 刘士勋, 何玉华, 等. 文心兰试管苗丛生芽高效增殖体系的建立 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(3): 562-567.
- [11] CHEN J T, CHANG W C. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* Gower Ramsey [J]. Plant Growth Regulation, 2001, 34: 229-232.
- [12] CHEN J T, CHANG W C. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae) [J]. Plant Science, 2000, 160: 87-93.
- [13] HONG P I, CHEN J T, CHANG W C. Promotion of direct somatic embryogenesis of *Oncidium* by adjusting carbon sources [J]. Biologia Plantarum, 2008, 52: 597-600.

(责任编辑: 黄爱萍)