

# 蜜糖文心兰的组织培养与工厂化生产技术创新

廖飞雄, 张孟锦, 邹春萍, 黄群慧

(广东省农科院花卉研究所, 广东 广州 510640)

**摘要:**介绍了蜜糖文心兰的组织培养体系与工厂化生产技术,指出用花梗和侧芽作外植体进行组织培养,可从再生芽中诱导出类原球茎,再通过芽和类原球茎 2 种途径进行增殖。在培养中观察发现,发育粗壮但未分化假鳞茎的再生芽诱导类原球茎能力最强,发育程度不同的类原球茎增殖特性不一,愈伤态类原球茎具较强增殖能力,增殖率最高;通过液体振荡培养 7 d 可以促进增殖潜能的形成,淘汰发育不良褐化死亡的类原球茎,使类原球茎发育同步化,通过悬浮培养后类原球茎出苗整齐一致,提出了液体悬浮培养和固体培养结合的高效工厂化生产新程序。

**关键词:**文心兰;快速繁殖;悬浮培养;类原球茎

**中图分类号:**S682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-874X(2007)10-0035-03

## Tissue culture and industry production technology innovation of *Oncidium* 'Sweet Sugar'

LIAO Fei-xiong, ZHANG Meng-jin, ZOU Chun-ping, HUANG Qun-hui

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

**Abstract:** Tissue culture and industry production technology of *Oncidium* 'Sweet Sugar' were introduced in this paper. It pointed out that using scape nodes and axillary bud as explants could successfully induced protocorm-like bodies (PLBs) from the regenerated shoots. Two ways of proliferations through shoots and PLBs could be found in the culture. Those shoots that the pseudobulb had not obviously been differentiated had higher potential in induction of the PLBs. Different types of the PLBs showed different proliferation characteristics, one of which like embryogenic callus with yellow-green color had strong ability of proliferation. Suspension culture in the liquid medium in Shaker for 7 days could increase the potential of proliferation, make PLBs to develop synchronously and eliminate some abnormal PLBs. An innovative technique of micropropagation integrated with suspension and solid cultures for industry production was developed based on the experiments.

**Key words:** *Oncidium*; micropropagation; suspension culture; protocorm-like bodies

文心兰(*Oncidium*)是重要的热带兰花,其利用组织培养方法进行繁殖的研究早有报道<sup>[1]</sup>,但大多集中在培养基和激素对诱导的影响上,且几乎都采用花芽、花梗<sup>[2-5]</sup>或茎尖<sup>[5-6,10-12]</sup>作外植体。近年来,也有学者开始研究不同培养环境和培养方式对文心兰增殖的影响<sup>[7]</sup>,从现有报道来看采用的基本上都是常规固体培养方法。文心兰在培养过程中容易诱导大量类原球茎而增殖,与芽生途径并存,固体培养会导致培养个体出现发育进程不同等问题,不利于同一时间内获得大批量整齐一致的幼苗。蜜糖文心兰是文心兰属的优良盆栽品种,其球茎粗大、叶片肥厚、花梗粗壮、花朵大、花瓣厚且唇

瓣大、花期长。本文建立了蜜糖文心兰的组织培养再生体系,观察其诱导培养和增殖特性,并在此基础上建立了液体固体培养相结合能在短时间内高效培养和实现工厂化快繁生产的技术。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 组织培养体系建立

于广东省农科院花卉研究所内的广东省名优花卉资源圃中选择生长健壮的蜜糖文心兰植株。

**1.1.1 外植体处理与芽苗诱导** 切取花梗和侧芽,先用 0.1% 洁尔灭洗涤、纯净水冲洗,然后用 75% 酒精漂洗 30 s、无菌水冲洗 2~3 次,再用 0.1% 升汞灭菌 8~10 min、无菌水漂洗数次。花梗和侧芽消毒后,选择着生花蕾的侧花梗,切取带节部分,接种于 MS+6-BA 2.0 mg/L+2.4-D 0.5 mg/L+利福平 500 mg/L 培养基中进行诱导培养,每升 MS 培养基中添加琼脂 7 g、蔗糖 30 g,

收稿日期:2007-07-25

基金项目:广东省自然科学基金项目(5006236);广东省科技攻关项目(2005B20901001)

作者简介:廖飞雄(1963-),男,博士,研究员,E-mail:liaofeixiong@gdaas.cn

并调节 pH 值为 5.5; 切取侧芽的生长点(仅带 1 片嫩叶), 接种于 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+利福平 500 mg/L 培养基上进行诱导培养。接种后置于人工光照培养箱中培养, 控制温度为  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ , 光照强度为 1 000~2 000 lx、每天连续光照 12 h。在培养期间, 观察芽的萌动情况和再生芽苗的生长情况。

**1.1.2 丛芽增殖与类原球茎的诱导增殖** 将诱导培养获得的再生芽苗接种于添加了 6-BA 和生长素的 MS 培养基中进行继代培养, 促进丛芽增殖和类原球茎诱导。将诱导出的类原球茎接种于 1/2MS(或改良 KC)+6-BA0.5~1.0 mg/L 培养基中进行增殖培养。在培养期间, 观察发育程度不同的再生芽苗的诱导情况和类原球茎的增殖特性。

**1.1.3 壮苗和生根培养** 将增殖出的丛芽和类原球茎接种于 MS+香蕉 20~50 g/L+蛋白胨 1 g/L 培养基中进行壮苗和生根培养。

## 1.2 工厂化生产技术创新

将用再生芽苗诱导培养出的类原球茎进行液体培养基增殖培养和同步化培养, 以建立适合工厂化生产的技术。液体悬浮培养在振荡培养器上进行(转速 60 r/min), 温度  $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ , 自然光照。液体培养分增殖培养和同步化培养 2 个步骤: 第 1 步, 将类原球茎接种于 MS+6-BA0.5~1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L 增殖培养基中培养 7 d; 第 2 步, 将增殖出的类原球茎转入液体同步化培养基(不添加任何激素的 MS 培养基)中再培养 7 d。液体同步化培养后将类原球茎取出吸干, 转接于添加了 20~50 g 香蕉和 1 g 蛋白胨的改良 KC 固体培养基中进行壮苗和生根培养。试验期间观察类原球茎和苗的生长情况, 定性比较液体培养 7 d 和 14 d 的效应。

## 2 结果与分析

### 2.1 芽苗的诱导培养

据观察, 花梗培养 15 d 后, 节位上的芽开始萌动, 40 d 后形成具有 2 片叶的新芽苗; 侧芽培养 10 d 左右开始萌动, 25~30 d 形成新芽苗。

### 2.2 芽苗的继代培养

据调查观察, 将新芽苗接种于继代培养基上 30~40 d 后可诱导出 2~3 个芽, 部分芽苗基部还可不断诱导出绿色、鲜嫩的细小类原球茎, 从而形成丛芽与类原球茎诱导增殖同时并存的情况(图 1)。

在继代培养中还发现, 发育程度不同的芽苗其基部诱导类原球茎的能力有所不同。其中, 幼嫩芽苗(长 1~2 cm、具 2~3 片叶)基部诱导类原球茎的能力较差, 诱导数量较少; 培养时间较长、假鳞茎明显膨大的成熟



图 1 芽基诱导类原球茎的形成

芽苗很少产生类原球茎; 而发育粗壮、但假鳞茎未明显分化的芽苗(长 2 cm 以上、具 3 片叶以上), 其诱导类原球茎的能力最强(诱导率 >50%)、诱导数量较大。随着培养时间的延长, 类原球茎的色泽由绿色转为黄绿色、再由黄绿色变为深绿色, 颗粒逐渐增大, 且外层大粒开始出现形态分化、形成两端有突起的成熟类原球茎; 成熟原球茎的增殖能力减弱, 继代培养后出芽形成小苗, 这种小苗的侧芽和不定芽增殖较少。

### 2.3 类原球茎的诱导特性

将诱导形成的类原球茎接种于 1/2MS(或改良 KC)+6-BA0.5~1.0 mg/L 固体培养基上进行增殖培养, 各种类原球茎均有一定程度的增殖, 但前 20 d 的增殖量较小, 之后增殖加快, 形成大量类原球茎; 在增殖的同时, 外层先形成的类原球茎开始分化。此外, 发育程度不同的类原球茎其增殖性能也不一样(图 2), 其中新诱导出的绿色愈伤组织状类原球茎(图 2-b)分化程度低、分裂能力强、增殖率高, 是用于类原球茎增殖的主要材料; 膨大呈粒状的类原球茎则主要进行形态建成, 部分在培养基上仍有增殖, 但增殖量较少, 以直接形成粒状类原球茎为主; 而已经形态建成并开始长叶的成熟类原球茎, 增殖量很少。

### 2.4 液体振荡培养与同步化处理

蜜糖文心兰在组织培养过程中的增殖方式有多种, 在固体培养基上, 芽苗在生长的同时其基部可诱导出类原球茎并进行增殖, 芽苗的生长发育与类原球茎的增殖同时存在, 使得增殖培养的增殖率低, 小苗发育



图 2 不同发育程度类原球茎的增殖效果

进程不一、整齐性差(图 3-a),如果按常规固体培养方法进行繁殖和工厂化生产,显然不利于繁殖效率的提高,会给生产管理带来困难。因此,如何使增殖和批量苗生长发育同步化,对于工厂化生产具有重要的意义。



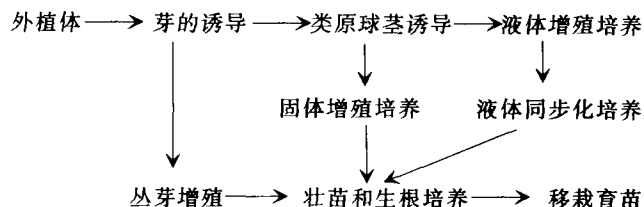
a: 不定芽增殖培养; b: 类原球茎同步培养

图 3 不同培养方法的效果

本研究发现,将类原球茎接种于液体培养基中悬浮培养 7~14 d 后,转接于未添加激素的改良 KC 固体培养基上,与一直培养于固体培养基上的类原球茎相比,其增殖活力和增殖倍数明显提高,且发育进程同步、小苗整齐一致。在液体悬浮培养中,我们观察到以下 5 种培养效应:(1)促进了类原球茎增殖潜力的形成,可使一些类原球茎在转移至固体培养基后形成绿色鲜嫩、增殖力强的球团;(2)发育程度不同的类原球茎其增殖方式和性能不同,大球茎以直接增生明显粒状球茎为主;(3)促进了类原球体的发育,一些类原球茎球体明显增大(鲜重可增加 3~4 倍)并出现明显的形态分化;(4)可淘汰部分不良类原球茎,液体悬浮培养后,不同的类原球茎的存活率不同,发育程度低的基本上可以全部成活,而在固体培养基上培养较长时间的类原球茎,部分在悬浮培养后会褐化死亡且悬浮培养 14 d 的死亡率更高,振荡培养 7 d 即可达到预期效果;(5)类原球茎发育同步化,经过液体悬浮培养,类原球茎在形态、大小上均基本一致,转移至固体培养基培养后可获得大批生长较整齐一致的幼苗。可见,通过液体悬浮培养与固体培养结合,在短时间内可进行蜜糖文心兰的批量化繁殖,繁殖率高达数百倍,完全能够实现工厂化高效生产。

将液体同步化培养后的类原球茎转移至附加有香蕉汁的改良 KC 固体培养基上,类原球茎先分化出叶茎,然后形成明显或不明显的扁平状假鳞茎,之后再从基部长出根系,从而形成完整的小苗。当苗高 4~5 cm 时即可出瓶移栽。

根据研究结果,我们认为适合蜜糖文心兰的工厂化生产程序如下:



### 3 结论与讨论

文心兰可通过诱导丛芽进行增殖,但增殖速率较慢。通过诱导能增殖类原球茎是文心兰重要的增殖特性。直接用茎尖外植体可以诱导类原球茎的产生,但操作要求高,外植体存活与诱导率都有限制。不管是用带芽花梗还是茎尖作为外植体,多数研究都是先诱导出不定芽,然后在芽的增殖中通过添加生长调节剂来诱导类原球茎,但对诱导出的类原球茎的特性除 Chen 等有研究报道外,其他研究均未认真观察,而不定芽在培养过程中发育程度和生长分化取向都不同,因此在诱导类原球茎时也有差异,说明在进行诱导增殖时,为提高诱导效率,可以对培养的不定芽进行选择,以获得最好的诱导培养效果。我们的研究结果也表明,不同形态的类原球茎增殖特性不同,因此,诱导出类原球茎后用其进行增殖培养时应对其进行选择,选用尚未开始分化呈愈伤态的类原球茎进行增殖培养才能获得较高的增殖效率。

在文心兰的组织培养中,芽增殖的同时诱导出类原球茎增殖,两种增殖途径并存使得组织培养的进程不一致,是影响培养效率与应用的重要因素,常规固体培养方法也可以进行离体培养增殖,但速度慢、繁殖率低、苗整齐度差、生产管理不便。而通过建立工厂化生产程序,可以用少量的类原球茎,经液体振荡培养进行同步化和增殖力提高,然后在固体培养基上增殖和分化,在较短时间内可生产出大批整齐一致的苗,且由于不用类原球茎多代循环增殖,因而能够减少变异的产生。

#### 参考文献:

- [1] 陈兴贻.文心兰组织培养[J].植物生理学通讯,1989(2):49.
- [2] Nuraini I, Mohd Shaib J. Micropropagation of orchids using scape nodes as the explant material [J]. Acta Horticulturae, 1992, 292: 169-172.
- [3] Santana G E, Chaparro K. Clonal propagation of *Oncidium* through the culture of floral buds [J]. Acta Horticulturae, 1999, 482: 315-320.

# 土壤改良剂研究现状及其在南方旱坡地的应用前景

赵记军<sup>1,2</sup>, 徐培智<sup>1,2</sup>, 解开治<sup>1</sup>, 陈建生<sup>1</sup>, 杨少海<sup>1</sup>, 唐栓虎<sup>1</sup>, 张发宝<sup>1</sup>, 黄旭<sup>1</sup>, 严超<sup>1,2</sup>

(1. 广东省农科院土壤肥料研究所/广东省养分循环与耕地保育重点实验室, 广东 广州 510640;

2. 甘肃农业大学资源与环境学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 综述了土壤改良剂的研发概况以及土壤改良剂的分类、机理、应用效果及使用技术, 并分析了土壤改良剂在南方旱坡耕地上的应用前景, 指出施用土壤改良剂可明显改善南方旱坡耕地普遍存在的酸、毒、瘠、漏、板、蚀等多种障碍因素, 可望成为提高旱坡耕地生产力的重要手段。

**关键词:** 土壤改良剂; 研究现状; 南方旱坡地; 应用前景

**中国分类号:** S156.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-874X(2007)10-0038-04

## Current situation and outlook of research and application of soil modifiers on slope cropland in South China

ZHAO Ji-jun<sup>1,2</sup>, XU Pei-zhi<sup>1,2</sup>, XIE Kai-zhi<sup>1</sup>, CHEN Jian-sheng<sup>1</sup>, YANG Shao-hai<sup>1</sup>,  
TANG Shuan-hu<sup>1</sup>, ZHANG Fa-bao<sup>1</sup>, HUANG Xu<sup>1</sup>, YAN Chao<sup>1,2</sup>

(1. Soil and Fertilizer Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. College of Resources and Environmental Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** This paper reviewed the current research progress, as well as the classification, mechanism, application techniques and application effects of soil modifiers. Meanwhile, it also discussed the prospect of their utilization on slope cropland in South China. It has been evident that soil modifiers were able to improve various constraints such as acidity, toxicity, infertile, leaking, hardness and erosion, which commonly exist on slope cropland in South China. It is expected that adoption of soil modifiers should be one of the effective approaches for enhancing the productivity of slope cropland.

**key words:** soil modifiers; current research; slope cropland in South China; outlook

随着我国城乡建设的快速发展和人口数量的日益增加, 农业耕地面积正逐年减少, 但对农产品的需求

却不断增大, 农业生产为获取更高的产量, 除实施调整种植结构、提高耕地复种指数等措施外, 在栽培上还采取了大量施用化肥的方法, 导致耕地土壤出现严重板结、结构破坏、通透性差、养分失调、肥力低下等问题, 因此迫切需要对土壤进行改良。目前, 改良土壤性状的方法很多, 如实行精耕细作、种植绿肥、增施有机肥、合理轮作等栽培措施, 而土壤改良剂(soil modifier)则是快

收稿日期: 2007-08-06

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD25B08)

作者简介: 赵记军(1981-), 男, 在读硕士生

通讯作者: 徐培智(1963-), 男, 研究员, E-mail: pzxu007@

163.com

- \*\*\*\*\*
- [4] 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[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 127-129.
- [5] Chen J T, Chang W C. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium Sweet Sugar*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 62(2): 95-100.
- [6] 潘学锋, 王日暖, 莫海. 文心兰茎尖离体培养研究[J]. 热带林业, 2001, 29(4): 145-150.
- [7] 何松林, 十鸟三和子, 王献, 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.
- [8] Chen J T, Chang W C. Effects of tissue culture conditions and

explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium 'Gower Ramsey'* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 69: 1, 41-44.

- [9] 钟士传, 曹善东. 文心兰(*Oncidium*)微体快速繁殖技术的研究[J]. 临沂师范学院学报, 2002, 24(6): 34-36.
- [10] 黄萍萍, 潘伟彬, 廖福琴, 等. 文心兰组织培养与快速繁殖[J]. 陕西职业大学学报, 2003(4): 67-68.
- [11] 杨玉珍, 雷呈, 胡如善, 等. 文心兰组织培养和快速繁殖技术[J]. 江苏农业科学, 2003(6): 77-79.
- [12] 李文玲, 翟林邵, 刘艺平. 文心兰原球茎诱导技术的研究[J]. 河南科学, 2004, 22(3): 360-362.