

蕙兰属植物组织培养研究进展

詹忠根

兰科蕙兰属(*Cymbidium* Spp.)植物因为其株形、花色、香气及叶片变化多端,在中国栽培历史悠久,品种数目繁多,俗称“国兰”。

1 蕙兰属植物地理分布

蕙兰属植物主要分布在亚洲及澳洲的热带和亚热带地区海拔约 1 000~2 500 m 的山区。在中国,从云贵、陕甘、安徽、四川、江南到华南地区之福建、广东和台湾等地区处处可见其踪迹。蕙兰属名 *Cymbidium* 是由唇瓣似船形的希腊语而来,约有 48 个种,蕙兰属依原生地不同可分三类,一是温带地生性小型蕙兰,原产于温带地方,如日本、韩国、中国大陆的长江流域及台湾的山区,如春兰、剑兰、寒兰、墨兰等;二是原生热带高海拔地区,如喜马拉雅山山麓、缅甸、泰国北部,花型大,花色艳丽,为大型蕙兰,如东亚兰(或称虎头兰);三是原产于印度之锡金和阿萨姆省、马来半岛、菲律宾及澳洲北部,大多是附生兰,有革质硬叶,花茎下垂,如凤兰。

蕙兰属植物在自然生长中,因海拔、气候及土壤等因素的变化常导致品种的变异,如云南地区因其全年温暖潮湿,山地幅员广阔,海拔高低变化大,多种植物经长期演化,其叶、花出现斑纹、斑线或缟等变化,称为“兰艺”,成为爱兰人士竞相珍藏的目标(如“达摩”)。

2 植株生育特性

蕙兰属植株主要由叶片、假球茎、鞘叶及肥大的根组成。每年春天,在假球茎节位上的叶腋处会分化出潜伏芽,但通常位于假球茎膨大部位下方较低节位的潜伏芽较易萌发成营养芽,而较高节位的潜伏芽常发育成花芽形成花序。当潜伏芽分化为营养芽(叶芽)后,由于叶片制造的大量养份的蓄积,使芽体基部的假球茎开始快速膨大,形成第二代假球茎。墨兰、东亚兰在假球茎肥大后,若养份供应持续充足及适当的低温刺激,潜伏芽即分化为花芽,可在冬天顺利抽梗开花,整个生长周期自潜伏芽萌发生成叶片、花芽分化完成开花,到次年的营养芽再萌发,历时约一年。素心兰和四季兰的生长方式和墨兰相似,只是在环境适合时,其生长周期可在 7~8 个月内完成。通常在第二代假球茎尚未完全成熟之前,其上的潜伏芽又可继续分化出第三代假球茎,且其营养芽的萌发几乎全年均可进行,繁殖速率较快。

3 蕙兰属植物的组织培养研究

蕙兰属植物品种数目繁多,除了姿态优雅、花朵具有淡雅

幽香外,其花艺及叶艺也极具观赏价值,为具有潜力的观花、观叶及香花植物,在外销贸易上极具竞争力,目前经济栽培的报岁兰、素心兰和四季兰等。但在自然条件下,除有些是由种子萌发长成外,其他均以分株方式繁殖,每年每株最多可增殖 2~3 株,繁殖速度相当缓慢。20 世纪 80 年代以后,我国组织培养逐步兴起。这一技术的应用对蕙兰属植物的快繁、品种复壮、加快优良品种的培育、挽救珍稀濒危种类等方面起到了重要作用。

3.1 蕙兰属植物组织培养中的形态建成

3.1.1 细胞学水平的研究 蕙兰属植物组织培养主要从两方面进行,即通过种子非共生萌发及茎尖、侧芽和花芽等外植体培养。非共生萌发时,种子吸水膨胀,中间部分的胚细胞分裂增殖,突破合点端种皮形成球形或椭圆形的结构^[1]。在外植体诱导时,愈伤组织表面也会产生浅绿色的球状突起^[2]。两者虽起源不同但结构相似,分别称作原球茎及类原球茎。从原球茎或类原球茎阶段到幼苗的发育过程两者相似^[1~4]。其大致过程如下:原球茎(类原球茎)部分区域的表皮细胞形成不规则束状分布的毛状突起,其中一部分突起可以直接发育成芽;与此同时,原球茎(类原球茎)顶端分生组织不断分裂并延伸成为根状茎,从种子萌发得到的根状茎增殖速度比来自茎尖、侧芽和花芽等外植体的根状茎快^[5];根状茎顶端可发育成芽,基部表皮细胞形成根毛状突起以吸收营养;根状茎节间的表皮或皮层细胞不断分裂形成侧生分生组织区,直接发育成芽或继续延伸成根状茎的侧枝,形成具多个分生组织区的丛生根状茎后再分化出芽;顶端分生组织下方的原形成层分化成维管柱,表皮或表皮下的薄壁细胞分化出不定根后形成完整的植株。在种子非共生萌发时,陈进勇等^[6]还观察到,在一定条件下,在原球茎表面会产生愈伤组织。其中一类为疏松愈伤组织,淡黄色,在固体培养基上逐渐白化死亡。另一类为致密愈伤组织,深绿色,分化率高于疏松愈伤组织。愈伤组织细胞的发育并不同步,形成愈伤组织、分生组织、不定芽、胚状体、假根和不定根等交错而成的复合体。原球茎上产生愈伤组织的可能原因是,在激素的刺激下使原球茎失去极性,表皮细胞经多次平周和垂周分裂后形成不规则的细胞团,而表皮下的薄壁细胞则不断分裂和生长形成愈伤组织块^[9]。

3.1.2 组织化学水平的研究 从组织化学来说,种子萌发时,种子内的脂类被吸收、转化与利用,萌发以后就逐渐消失,与其形态发生关系不大,仅作为萌发时的营养物质。蛋白质合成伴随着细胞的分裂进行,与 DNA 合成有密切关系。形成原球茎后,淀粉在细胞中大量出现,中央细胞中的淀粉比表皮细胞含量高,胚柄中不含淀粉,这说明种胚此时已开始进行光合作用。淀粉在基部的薄壁细胞内大量出现表明其含量的消长与器官形态发生有密切的关系^[3,6]。在刘国安等^[7]对剑兰根状茎分化前后的可溶性蛋白与过氧化物同工酶变化进行比较中发现:可溶性蛋白质 23、57、65 和 93 KD 含量稳定,21、51、73 和 81 KD 只在根状茎时期出现,28 和 30 KD 在分化中出现;过氧化物同工酶 C¹、C²、C⁹ 和 C¹⁰ 在分化前后均有表达,

C³、C⁴、C⁵、C⁶、C⁷和C⁸伴随分化而出现。

3.2 种子非共生萌发与外植体培养

3.2.1 种子非共生萌发 自Bernard用非共生萌发法使卡德丽亚兰与蕾丽亚兰杂交种子萌发成功以来,人们在多种兰花种子如齿瓣兰、蝴蝶兰、石斛兰、文心兰等用此法都获得成功。非共生萌发法大大简化了萌发和育苗技术,有很大的实用价值。许多实验证实,在蕙兰属植物种子的非共生萌发中,播种前对种子进行适当处理可以提高种子的萌发率。预处理的方法有多种,如用磁性搅棒搅动泡在无菌水中的种子或对种子进行超声波处理等物理方法。也可采用将种子浸泡在一定浓度的NaOH溶液中一段时间等化学方法,如段金玉等曾用0.1 mol/L的NaOH处理寒兰,结果其萌发率提高了10倍以上。但其机制尚待进一步研究,预处理可能在一定程度上会消除抑制种子萌发的因素。一般认为蕙兰属植物的种子难萌发,其原因可能是由于胚发育不全或无胚乳,也可能是由于种皮较厚、结构致密,阻碍了空气和水的透入所致,还有可能存在抑制萌发的物质。

3.2.2 外植体培养 蕙兰属植物的侧芽、茎尖等外植体经诱导能产生大量的类原球茎,类原球茎发育成根状茎后进一步长成幼苗。近20年来,先后已有不同种类的几十个品种的芽端培养获得成功。在茎尖、侧芽的取材部位、大小的研究中,一般认为茎尖优于侧芽,处于中上部的侧芽诱导成功率高于基部。外植体的大小以带有1~2个叶原基约1 mm~2 mm长的芽为宜。过小的外植体不但活力弱,而且分裂增殖的部位少,因为除了生长点外,在生长点与叶原基的之间分裂增殖能力也较强。而过大的外植体,诱导困难,容易褐化死亡^[9]。尽管茎尖和侧芽是极好的高质量外植体,但对母体将带来较大的伤害且芽的来源有限。如果采用花芽代替茎尖或侧芽进行无性繁殖可使母体免于受伤^[10]。另外,利用根及幼叶作为外植体也可减轻对母体的损伤,只是由于诱导的难度较大,目前尚未见有成功的报道。用芽端诱导时,其启动的难度并不大,主要问题是诱导启动后褐化非常严重。吴汉珠等的统计表明,诱导启动后褐化死亡数几乎占3/4。因此,如何减少褐化是培养的关键,目前认为较为有效的方法是将外植体用含150 mg/L柠檬酸和抗坏血酸的溶液处理1 h。另外,直接在培养基中加入活性炭、PVP(聚乙烯基吡咯烷酮)、MBP(磷酸一丁酯),加大接种的外植体体积,减少外植体伤口面,适当降低培养温度和暗培养等也可达到减少褐化的目的。

3.3 影响蕙兰属植物组织培养的若干因素

3.3.1 培养基 蕙兰属植物组织培养中所用的培养基种类较多。无菌播种时,KnudsonC(附加细菌胰蛋白胨)、MS、White以及附加细菌消化蛋白的Hyponex培养基等曾用于做寒兰的基本培养基;附加3 g/L的Hyponex和4 g/L的蛋白胨的培养基以及附加3 g/L的Hyponex和0.25 g/L的Ca(NO₃)₂·4H₂O培养基等曾用于春兰和剑兰的基本培养基;但Choi和Chung认为附加3 g/L的Hyponex和4 g/L蛋白胨的培养基对蕙兰属植物的无菌播种较合适。用于原球茎诱导增殖的培养基,常用的是改良的MS、White、VW、KnudsonC、Kyoto等。但最适培养基则因品种而异,例如春兰需要无机盐含

量低的培养基,其长期继代培养以1/2MS为宜,而蕙兰、墨兰则要求无机盐含量高的培养基^[11]。春兰、剑兰原球茎在补加椰乳的培养基的培养时,均可促进原球茎生长,使其顶部伸长而有利于分化形成芽,但与剑兰不同的是春兰原球茎在补加椰乳的培养基中长期培养时,增殖反而不如不加椰乳的显著。一般情况下,蔗糖是首选碳源,Kusumoto认为2%蔗糖对兰属原球茎生长最好,Peck等报道2%~3%蔗糖促进芽的形成,5%的蔗糖则适于其根的分化与生长。

3.3.2 生长调节剂 生长调节剂是诱导兰花原球茎和小植株形成及一些兰花品种种子发芽所必需的。培养基中添加的植物生长调节剂的浓度、种类和配对外植体诱导和原球茎增殖与分化起主导作用。在种子萌发及芽的诱导培养中,生长素浓度使用范围较大(0.1~5.0 mg/L),其浓度一般高于细胞分裂素,NAA诱导效果好于2,4-D和IBA^[12]。张菊野等认为6-BA能促进原球茎的发生与分化,NAA有利于原球茎原增殖与根的形成。所以外植体诱导成功后,在根状茎增殖与诱导分化成芽时需适当提高BA并降低NAA的浓度。在随后的生根壮苗阶段,则宜增加NAA的用量,若去除6-BA,效果更佳^[13]。生长调节剂的配比对根状茎增殖的影响因品种而异,孙安慈等报道1.0 mg/L BA与0.5 mg/L NAA组合对素心兰根状茎增殖效果明显,而0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA则适于四季兰。近年来王衍安等^[11]还发现IBA对芽分化增殖的效应显著大于NAA,用IBA和NAA处理所得到的幼苗根茎生长更加粗壮。

3.3.3 培养方式 组织培养方式有固体培养和液体培养之分。张菊野等发现春兰原球茎生长与分化成苗在液体培养时有较好结果。其原因显然是振荡培养通气好,原球茎与液体可充分接触和能更好地吸收营养之故。两种培养方式各有千秋,液体培养不利于根状茎分枝、增殖,培养过程污染率也有所增高,而固体培养诱导根状茎分化成完整小植株所需的时间较长,分化的整齐度也不如液体培养。在大规模生产时,固体培养仍不失是一种行之有效的办法,值得提倡。另外,先用固体培养增加分枝后再采用液体培养的方法也很奏效。

3.3.4 切割方式 为增加原球茎增殖系数,常需对原球茎进行切割。试验表明:在横切法(将一条原球茎切成前、中、后两段或三段)、纵切法(将原球茎一劈为二或一劈为四)和掰开法(将大丛原球茎顺势掰散成小丛或单个)、横切加纵切等方法中,以掰开法对原球茎的损伤最小,增殖效果也最佳^[15]。这与纵切后的杂种兰原球茎可促进其形成苗的结果不同。

3.4 活性炭

一般认为,低浓度的活性炭可吸附培养过程中外植体所分泌的酚、醌类等有害物质,有利于原球茎、根状茎及苗的生长,而明显抑制芽的分化^[15]。有人认为这是由于活性炭吸附了培养基中的生长调节物质,使培养基中的外源激素含量低至不足以启动和引发芽分化的水平。但罗虹等并不同意这一观点,有机机理仍有待进一步探讨。

3.5 无机离子与射线辐射

在蕙兰属植物的组织培养中,无机离子与射线辐射对根状茎的生长发育也有作用。陈汝民等在培养基中加入低浓度

的 $\text{La}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ (乙酸镧) 以促进墨兰根状茎增粗, 加快顶芽生长。何嵩等观察到乙烯抑制剂硝酸银可大大加快春兰和墨兰杂交种根状茎的分化频率。潘瑞炽等^[1]认为在墨兰营养生长前中期施用硝酸盐或铵盐肥料都可促进叶芽和叶片的生长, 而在营养生长转为生殖生长之前施用硝酸盐肥料可促进花芽分化。傅雪琳等应用低剂量的 $\text{Co}^{60}\gamma$ 射线对墨兰根状茎绿芽进行照射后, 有效促进了绿芽的分化。

此外, 培养基的 pH 值、光照时间、光质、培养温度、原球茎大小及接种密度对原球茎、根状茎的生长与分化都有一定程度的影响。

综上所述, 蕙兰属植物的组织培养工作已取得较大进展, 形态学研究已进入细胞水平, 正迈向分子水平。为了蕙兰属植物能早日走向世界, 应从选育出大花、绚丽、幽香和抗逆的优良品种入手。以组培为手段开展蕙兰属植物的多途径综合育种, 尤其是开展种属间杂交, 并结合染色体加倍形成异源四倍体, 采用原生质体培养与融合技术选育远缘杂交新品种, 同时也采用基因工程技术创建合乎人意的转基因兰花。另外, 我们还应尽快解决蕙兰属植物的试管苗移栽后生长缓慢和开花迟的问题。虽然蕙兰属植物栽入温室后开花难, 但其试管苗开花却较容易。王熊的试验表明, 秋兰原球茎转入附加 1.0 mg/L 及 0.1 mg/L NAA 的 BW 培养基上培养, 从小植株形成到花完全开放仅需约 2 个月的时间, 花单生, 花朵的大小、形态、色彩和香味均与盆栽的秋兰相似, 这对蕙兰属植物的商业化生产有一定的参考价值, 值得进一步探索。

参考文献:

- [1] 陈汝民, 叶庆生, 王小菁. 墨兰种子胚的发育和培养初步研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(4): 72~75.
- [2] 祝建, 张军, 石红军. 墨兰组织培养中原球茎的形态解剖研究

[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(4): 47~50.

[3] 陈进勇, 程金水, 朱滢. 几种中国兰种子试管培养根状茎发生的研究[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(1): 32~35.

[4] Huan, L. V. T., T. Takanura, and M. Tanaka. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in Cymbidium orchid. Plant Sci. 166: 1443~1449.

[5] 张志胜, 欧秀娟. 墨兰的组织培养[J]. 园艺学报, 1995, 22(3): 303~304.

[6] 陈进勇, 程金水, 朱滢. 几种中国兰种子试管培养愈伤组织发生的研究[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(4): 76~79.

[7] 刘国安, 丁兰, 杨红. 剑兰离体培养形态发生过程中蛋白质及过氧化物同工酶的研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2001, 37(1): 76~79.

[8] 贾勇炯, 陈放, 林宏辉. 剑兰簇生原球茎的诱导及分化诸因素研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1998, 35(2): 258~261.

[9] 贾勇炯, 曹有龙, 王水. 彩心剑兰花枝茎节离体培养的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2000, 1: 94~97.

[10] 陈丽, 潘瑞炽, 陈汝民. 墨兰原球茎生长的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(1): 59~64.

[11] 丁兰, 付庭治. 兰花生物工程研究进展[J]. 西北师范大学学报, 2000, 36(3): 111~116.

[12] 曾宋君, 程式君, 张京丽, 等. 墨兰及其杂种的组织培养与快速繁殖[J]. 广西植物, 1998, 18(2): 153~156.

[13] 王衍安, 徐瑛, 王志斌. 培养条件对墨兰组培芽增殖和生长的影响[J]. 山东林业科技, 1999, 2: 15~17.

[14] 傅雪琳, 张志胜, 何平. 墨兰根状茎绿芽分化的研究[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(3): 53~55.

[16] 毛碧增, 林蔚红, 钱秀红. 影响剑兰原球茎增殖的若干因素[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(1): 66~68.

(浙江经贸职业技术学院, 杭州 310018)

非洲紫罗兰的繁殖采用水插法, 只需一片叶子, 便可培育出小苗来, 很简单。备好一个不透光的小瓷瓶, 两张足以盖住瓶口的锡箔纸、几张小纸条、橡皮胶圈、胶带、塑膜等。

叶片必须是厚实、平整的壮叶, 嫩叶、老叶(叶缘发黄)或有病害的叶片不可使用。叶片选好后用手掰下。叶柄, 保留 $4 \text{ cm} \sim 5 \text{ cm}$ 为宜。然后在标签纸上写上品名、花色、花型及水插日期等, 将其缠在叶柄上, 外用胶带固定。增加叶柄的牢固度, 使其插入后固定不倒。接着, 往小瓷瓶中加水, 水深以叶柄入水 $1/4$ 或 $1/3$ 为宜, 不可太深, 否则叶柄会烂掉。随即将两张锡箔纸重叠罩在瓶口上, 用橡皮胶圈绷紧。而后在锡箔纸上打孔, 间距 1 cm 左右, 在不影响叶片舒展的情况下, 以插得密一些为好。插后用塑膜罩住叶片, 上扎小孔以通气。

插后的摆放位置因季节而异。春天水插, 放在朝阳的南窗前即可。在 $15^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$ 的情况下, 水插叶片可始终在阳光下晒, 状态良好。秋天水插, 9 月时可放在向阳窗台上, 但要拉上纱帘遮光, 并打开窗户通风 10 月以后摆放位置同春天。冬天水插, 北方可放在有暖气的向阳窗台上。

平时管理, 只要注意随时补水即可, 一周左右再换水一次。一般春天半月左右生根, 秋天一个多月生根, 冬天要一个多月才生根。当根长 $1 \text{ cm} \sim 2 \text{ cm}$ 时可以移栽。基质要沥水性强, 可用 4 份腐叶土、2 份炉灰、1 份园土、1~2 份河沙、1 份基肥(发酵豆饼末或麻渣)混合配制, 配好后要经曝晒或锅炒消毒方可使用。容器宜用纸盆, 因其透气性特好, 一次性纸质水杯即可。移栽时, 要先用培养土把根系薄薄地裹上一层再栽, 这样利于成活。填上土后慢慢墩实, 切勿用手按, 以免损伤根系。栽后马上浇水, 水一定不要沾在叶片上。水全部渗下后再浇一次。

移栽后, 小苗要经过简单的过渡才易成活。方法是: 找一个大的纸盒或泡沫塑料盒, 把小苗一盆盆摆放其中, 上蒙塑膜, 塑膜上打几个小孔, 保持潮湿且透气。春天一般过渡一个多月即可, 而冬天要过渡两一个多月才保险, 秋天无需过渡。从这个意义上看, 大量繁殖宜在秋天进行, 少量繁殖在冬天或春天进行也不错。夏天因过于炎热, 不能水插。

(李茜 江苏省东海县岗埠农场园艺所, 222344)

非洲紫罗兰的水插育苗