

兰花离体开花的研究进展

徐 京, 庞基良

(杭州师范大学 生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036)

摘 要: 从光周期、温度、植物激素、培养基成分、外植体种类等因素对兰花离体开花的影响因素进行了概述, 并对今后兰花花期调控的研究方向作了展望。

关键词: 兰花; 离体开花; 花芽分化

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0215-04

广义的兰花是整个兰科植物 (Orchidaceae) 的总称, 兰科是有花植物中最大的科之一, 属于单子叶植物纲, 全世界约有 800 多属, 25 000 ~ 30 000 种^[1]。它广泛分布于各种生态环境, 以其高度特异的叶形、花形和花色受到人们的喜爱, 历来都是花卉市场的主流产品。可是兰科植物的营养生长期较长, 难以开花, 这不但增加了周年投入成本, 也严重地限制了兰花产业的快速发展。兰花的种属不同, 其营养生长期的长短也不一样。例如: 兰属 (*Cymbidium*) 需 3 ~ 7 a; 石斛属 (*Dendrobium*) 需 2 ~ 4 a; 蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis*) 需 1 ~ 2 a; 万代兰属 (*Vanda*) 需 2 ~ 3 a; 卡特兰属 (*Cattleya*) 需 3 ~ 5 a; 文心兰属 (*Oncidium*) 3 ~ 4 a。因此, 缩短兰科植物的营养生长期, 已成为植物生理学家与园艺学家的研究热点。

研究兰科植物的开花过程及调控机制, 在理论上和应用上都具有重要意义。理论上可以了解控制兰花开花的各个过程的生理生化变化, 最终揭示控制这些特定

变化过程的机理。应用上研究影响兰花开花的因素, 可以对兰花的花期进行人工调控, 缩短其营养生长期, 减少投入资本。

兰花离体开花系统的建立, 为研究兰花从营养生长向生殖生长的转变机制、花芽分化和发育提供了理想的途径。在兰花组织培养中, 已有许多离体开花现象的报道^[2-6]。用离体培养的方法研究影响兰花花芽分化的因素, 可以随意对影响兰花花芽分化的特定因素进行人为调控, 这对于阐述其调控机理具有重要意义。

1 光周期

光照是影响植物花芽分化的重要因素之一, 日照长度影响许多种植物的试管开花^[7-8], 有些植物在短日照或长日照条件处理下, 其试管开花率有很大的差异。Vaz, APA 等^[9]将兰花 *P. pusilla* 4 月龄幼苗进行 [0、6、8、12、16、20、22、24 h, (25 ± 2) °C] 不同光照处理, 发现所有处理组均有花芽出现, 而且观察到花芽形成率与光周期之间呈正相关, 在长日照处理下花芽明显增多。但是, 每天给予 20 h 或更长的光照时间会严重影响其花芽分化, 抑制开花并缩短其寿命。12 h 和 16 h 的对于 *P. pusilla* 花的开放是十分适合的, 黑暗条件下形成的花芽则不能开放。朱国兵等^[10]发现寒兰 (*C. kanran*) 在光照时间从 8 h 增加到 16 h 时, 8 h 的花芽诱导率最高, 达 41.67%, 随着光照时间的增长, 花芽诱导率先是降低而

第一作者简介: 徐京 (1985-), 男, 在读硕士, 现从事植物基因工程研究工作。
通讯作者: 庞基良 (1963-), 男, 教授, 硕士生导师, 现从事植物发育生物学研究工作。E-mail: pangrenshuilang@yahoo.com.cn。
基金项目: 杭州市属高校重点实验室科技创新资助项目 (20070232H09)。
收稿日期: 2010-10-08

4.5 推进寒地浆果产业化经营, 扩大优质果品出口
大力推进以树莓、蓝莓、蓝靛果等为代表的寒地特色小浆果产业开发, 建成生产、加工、出口、技术推广服务等功能完善的现代寒地浆果产业体系; 充分发挥资源优势 and 区域优势, 合理利用资源, 提高浆果市场竞争力, 建设开放式的寒地特色浆果产业, 塑造品牌文化, 增加市场竞争力, 开发系列产品, 实现产业的持续快速发展。各地扶持小浆果产业开发应通过重点扶持一批龙头企业, 以利益联结带动产业的全面发展, 逐步形成“龙头企

业+科技园+农户”的产业化生产经营体系。同时, 培育果品营销主体, 鼓励发展各类果品专业合作组织、购销大户和农民经纪人, 提高组织化程度; 在重点地区建立高效率的绿色通道, 进一步改善果品的流通环境; 加强产地和销地批发市场的贮藏、运输、包装等方面配套设施建设, 改变目前果品市场运作手段落后的状况; 拓展国内、国际果品市场, 加强与国外果品贸易企业在果品基地建设和出口贸易方面的合作, 实施外向牵动战略, 搞活市场流通。

后又升高, 其中 14 h 处理诱导率最低, 仅为 12.90%; 当光照时间为 16 h 时, 花芽诱导率又有所升高, 达 28.26%, 但所有花蕾都不开花。

有研究表明, 碳水化合物的积累有利于花芽分化, 不同的光照强度和光照时间因能影响光合作用效率从而影响到碳水化合物的积累, 进而影响到花芽分化^[11]。Vaz, APA 等^[9]也发现与短日照处理相比, 长日照诱导 *P. pusilla* 形成和积累的碳水化合物较多, 而黑暗条件下其花芽的形成可能是由于吸收培养基中糖分的结果。虽然光周期对诱导兰花开花有很重要影响, 但可能不是开花诱导的主要因子。因为无论是实生苗还是组培苗, 在不同的条件下, 都有试管成花的现象, 这表明它们对光周期无特定要求。一般认为, 光照长度不会直接影响兰花花芽的分化, 但可能会通过影响植株的生长程度间接影响花芽的形成。

2 温度

温度也是影响植物从营养生长到生殖生长转变的重要因素之一, 诱导成花的温度类型主要有: 低温、高温、昼夜温差等, 不同植物成花时对环境温度都有各自一定范围的需求^[12]。

Duan 等^[4]以 25/20℃、25/15℃、25/10℃ 3 种昼夜温度诱导蝴蝶兰花芽分化(光照/黑暗 12 h/12 h), 结果表明较低的夜温(15℃、10℃)推迟花芽的形成, 尽管最后夜温 15℃与 25℃处理的蝴蝶兰在 120 d 后所形成的花芽量相差无几。Vaz, APA 等^[9]以 5 种温度(22、25、27、30、32℃)对兰花进行处理, 发现 27℃对于其生长、叶数、花芽的形成是最适合的, 最高和最低的温度均明显影响其生长和花芽形成。

一些盆栽兰花经过低温诱导(15~20℃)可明显促进花芽形成^[13-14], 但低温对离体兰花花芽的形成却似乎起抑制作用, 这表明温度对兰花在试管内外花芽分化的诱导可能存在差异。至于低温诱导兰花花芽分化的机理, 尚无相关研究, 可能是通过植物内源激素起调节控制作用的。

3 植物激素

植物生理学和遗传学的研究表明, 开花过程受到多种因子的调控, 影响植物开花的主要环境因子在很大程度上均是通过影响植物的内源激素及同化产物合成及流向而发生作用^[15]。植物激素在离体兰花的花芽形成和发育过程中起到了重要作用, 不同的兰花品种诱导花芽形成所需的激素种类、浓度存在差异。

3.1 细胞分裂素

3.1.1 6-BA 对于诱导兰花离体开花所用的细胞分裂素 6-BA 的使用是较为普遍的。Goh^[16-18]研究了单茎型杂种兰花(*Aranda Deborah*)整体植株花芽诱导和发育的调节作用, 观察到 6-BA 不仅促进花芽发端而且促使花

芽发育成熟并开花; 后来, Goh 又报道 6-BA 促进杂种石斛兰整体植株的花芽发端^[19-20]。此后, 在对 *Cymbidium ensifolium*^[2], *Dendrobium candidum*^[21], *Dendrobium Madame Thong-In*^[22], *Cymbidium niveo-marginatum Mak*^[23], *C. ymbidium goeringii* × *C. hybridum*^[6] 等兰花品种研究时都发现, 培养基中加入 6-BA 或辅以适当 NAA 时, 均可诱导植株开花。Duan 等^[24]研究 × *Dorilla Tiny* (*Doritis pulcherrima* × *Kingtella philippinensis*) 的试管开花时, 把经 6-BA 诱导花芽的植株转瓶培养在含 6-BA 的 VacinWeni 或 HyPonex 培养基中, 花芽不能开放, 而转到无 6-BA 的 Hyponex 培养基中, 花芽可以开花。这表明 6-BA 可以诱导花芽分化, 但抑制其正常开花。陈肖英在对霍山石斛的研究中也发现, 诱导的花芽大多数不能正常开放, 但如果将小苗在诱导花芽发生的培养基培养一段时间后, 再转入到无激素的 MS 培养基中, 可提高花芽的正常开放率^[25]。

3.1.2 TDZ TDZ 虽利于外植体开花, 但也影响正常的开花率。Chang 等观察到 TDZ 可缩短 *Cymbidium sinense* Willd 营养生长期 2~3 d^[26]。王琳^[27]对金钗石斛的研究发现, 6-BA 诱导金钗石斛的花芽形成率较低, 若单独用 TDZ 处理, 花芽形成率最高可达 34.3%。而 Kostenyuk^[23]等在 *Cymbidiumniveo-marginatum Mak* 试管开花研究中发现 TDZ 虽可以强烈的诱导花芽, 但花芽不久后干枯。王再花等^[28]在对细茎石斛的研究中也表明 TDZ 预处理浓度增加, PP₃₃ + TDZ 诱导花芽分化率和开花率下降, 畸形花增加, 根部褐化加剧。

3.1.3 2iP 和 ZT Chang 等发现 2iP 可诱导 *Cymbidium sinense* var. *misericors* 根状茎花芽分化, 并且其诱导效果要好于 6-BA^[29]。温云飞等^[30]报道了霍山石斛从种子到开花的整个生长过程, 其诱导 4 月苗龄的组培苗花芽分化所用的激素主要是 6-BA 和 2, 4-D, ZT。研究表明, 1 mg/L ZT + 0.1 mg/L 2, 4-D 可诱导较多数目的花芽, 高浓度 ZT (2 mg/L) 反而使诱导花芽数目减少。

3.2 生长素

生长素与细胞分裂素的配合使用, 可以促进兰花花芽的形成, 但是单独使用不能诱导开花。Goh^[16-19]在杂种兰花 *Aranda* 与石斛兰上观察到 IAA 阻止花芽形成。王熊^[3]将经诱导的 *Cymbidium ensifolium* 小苗再转入含 NAA 的培养基中生长, 出现畸形花或花芽枯萎死亡。王光远等^[21]对 *Dendrobium candidum* 的研究也发现单加 NAA 抑制花的形成。Kostenyuk 等在 *Cymbidiumniveo-marginatum Mak* 试管开花研究中发现, 尽管生长素运输抑制剂 2, 3, 5-三碘苯甲酸抑制开花, 但 NAA 本身不诱导开花^[23]。

3.3 脱落酸和多胺

已有报道表明 ABA 可促进一些植物的开花^[31-32]。

王光远等^[21]对 *Dendrobium candidum* 的研究发现 ABA 对诱导其花芽形成有明显影响。如果先将铁皮石斛原球茎在加 0.5 ~ 1.5 mg/L ABA 的培养基上培养 15 ~ 20 d, 再转到 6-BA 培养基上, 可以得到很高的成花率(平均 82.8%, 有些试验中达到 100%)。说明内源 ABA 的增加在花诱导的早期阶段中可能起重要的作用。多种植物在逆境条件下开花, 也可能与内源 ABA 的增加有关。另外, 研究也表明单独使用 2 mmol/L 的亚精胺也能形成 31.6% 的成花频率, 而过高和过低的亚精胺浓度均难以成花。王再花等^[28]在对细茎石斛的研究中表明 PP₃₃₃ + ABA 预处理可明显增加 PP₃₃₃ + TDZ 诱导花芽分化率和开花率。王琳^[27]在对金钗石斛的研究中也表明 PP₃₃₃ + ABA 预处理可明显增加诱导花芽分化率, 但所形成花芽大多数不能正常开放。

4 培养基成分

4.1 糖源

糖类, 作为培养基主要成分之一, 除了提供植物生长所需的碳源, 又调节培养基中的渗透压, 改善植物吸收营养的环境条件, 促进植物体内代谢, 合成生长阶段需求的各类物质。不同糖源和糖浓度对植物成花诱导具有不同效果, 选择适宜的糖源和适当的糖浓度有助于植物提早开花。

王光远等在对 *Cymbidium ensifolium* 的研究中发现, 改变糖源, 提高激素浓度能使根状茎上的营养芽变成花芽^[33]; 对铁皮石斛的研究也表明, 以 6% 葡萄糖或甘露醇为糖源加入培养基中, 不但使花芽形成时间提前, 而且成花率也增加^[21]。Duan 和 Yazawa^[24]研究 *Doriella Tiny* 的试管开花时, 发现植株在无糖的 Vacin Went 培养基和 Hyponex 培养基上, 6-BA 均不能诱导其花芽形成, 这表明为了使 6-BA 诱导花芽形成, 营养条件必须满足。在培养基中(不含 6-BA)加入 25 g/L 的蔗糖, 不诱导花芽形成; 在含 6-BA 的培养基中, 糖浓度改变为 10.80 g/L, 大多植株仍无花芽形成。这表明 6-BA 诱导花芽形成时, 糖浓度的大小是重要影响因素。

4.2 营养元素水平

营养元素水平及之间的配比影响试管开花, 其依据主要是植物成花的 C/N 比学说。该学说认为植物之所以由营养生长过渡到生殖生长, 是受植物体内 C/N 控制。当 C/N 比率小时, 趋于营养生长; 而当 C/N 比率大时, 趋于生殖生长。

Duan 和 Yazawa^[4, 24]对 2 种兰花的研究表明, 减少 MS 培养基中氮的含量促进花芽形成, 高水平的氮会抑制花芽形成; 高比值的 NH₄-N/NO₃-N 有利于花芽形成。王琳^[28]在对金钗石斛的诱导花芽分化过程中, 减少培养基中氮的含量(1/10N), 增加磷含量(5P), 同时将糖浓度增加到 40 g/L, 可使 TDZ 诱导的花芽形成率明显

提高, 最高约 76.3%。Tee 等^[34]对 *Dendrobium Sonia 17* 的研究也进一步表明了减少培养基中氮(1/5 N)的含量, 增加磷(5P)的含量可使花芽分化率增加。Kostenyuk^[23]对 *Cymbidium niveo-marginatum* Mak 试管开花研究中发现仅调节氮、磷的含量, 或只进行根修剪, 并不足以诱导其开花; 单使用 BA 时其诱导开花率也仅仅 40%; 当调节 BA、氮、磷和进行根修剪共同使用时, 开花率几乎达 100%。这说明调节营养元素诱导兰花花芽时, 必须有相应的条件与之配合, 如激素水平、糖的浓度等。

5 外植体种类

对于目前离体诱导兰花离体开花的外植体, 不外乎原球茎、无根小苗、完整植株 3 类, 不同的外植体类型, 花芽形成率和花芽出现时间存在差异。王光远等^[21]以原球茎为起始材料时, 45 d 就可形成花芽; 以无根小苗为起始材料时, 至少 2 个月才能形成花芽且花芽形成频率略低于原球茎; 以完整植株为起始材料时, 形成花芽时间最长且花芽形成频率最低。郑立明和庞基良^[6]以原球茎、1~2 cm 和 2~4 cm 幼苗为起始材料诱导花芽分化时, 也发现以 1~2 cm 幼苗(尚无根形成)的诱花效果最好。在 *Cymbidium niveo-marginatum* Mak 试管开花研究中, 当调节 6-BA、P、N 含量及根修剪联合应用时, 几乎 100% 的植株开花(90 d 内); 而不修剪根时, 花芽分化率明显下降^[23]。与有根植株相比, 原球茎、无根小苗的花芽诱导率明显要高得多, 这表明根对兰花试管苗的花芽分化可能存在抑制作用。

6 前景与展望

兰花是经济价值极高的观赏性植物, 主要用作切花和盆栽, 其贸易额在国际花卉市场中所占比例为 1/10, 并且逐年攀升, 市场前景极为广阔。然而兰科植物的营养生长期较一般花卉要长许多, 从播种到开花, 短则 2 a(如蝴蝶兰属), 长则要 7 a 之久(如国兰)。这无疑极大的限制了兰花产业的发展, 也无形中增加了投资的成本。因此, 研究影响兰花花芽分化的因素, 则显得尤为重要。

目前对于诱导离体开花的兰花种类较多(如蝴蝶兰、大花蕙兰、石斛兰、春兰、剑兰、文馨兰), 但均局限于试管研究, 尚不能应用于大田栽培, 对于影响花芽分化的机制也不清楚。高等植物的成花诱导过程受自身遗传因子和外界环境因素 2 个方面决定, 是开花基因在时间和空间上顺序表达的结果。外部温度、光照、激素等条件都是作为诱导因子来刺激内源基因的表达, 所以能否从直接调节诱导花芽分化相关基因的表达方面来促进花芽分化, Yu 和 Goh^[35]从石斛兰 'Madame Thong-In' 分离出的基因 *DOH1* 为该项研究带来了希望, 它们将反义 *DOH1* mRNA 转入石斛兰后, 转基因植株形成较多

的茎尖分生组织并提前开花,这是首次通过调节花芽分化相关基因的表达来促进兰花开花的例子。

在目前的兰花离体开花研究中,兰花的正常开放率均明显低于花芽诱导率。诱导花芽分化只是实现其开花的一部分,花器官分化后生长发育的适宜条件是什么,如何调节营养生长与生殖生长的关系,这些都最终影响花的品质。总之,开花是个综合的过程,由于植物成花诱导的复杂性,只有在了解植物内源信号传导机制后,再通过合理调节温度、光照、激素、营养条件等,刺激开花基因的表达,才能最终实现控制花期。

参考文献

- [1] Arditti J. Fundamental of Orchid Biology [M]. New York: John Wiley and Sons, 1992: 691.
- [2] 王熊. 兰花快速无性繁殖系的研究及花芽分化的探讨[J]. 植物生理学报, 1984(10): 391-396.
- [3] 王熊, 张菊野, 连宏坤, 等. 素心建兰无性繁殖系的建立及其开花[J]. 园艺学报, 1988, 15(3): 205-208.
- [4] Duan J X, Yazawa S. Floral induction and development in *Phalaenopsis in vitro* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture 1995, 43: 71-74.
- [5] Kerbauy G B. *In vitro* flowering of *Oncidium varicosum mericlones* (Orchidaceae) [J]. Plant Sci. Letters, 1984, 35: 72-75.
- [6] 郑立明, 庞基良. 春兰×大花蕙兰杂种试管苗开花现象[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(3): 320-324.
- [7] Dickens C W S, Staden J. The *in vitro* flowering of *Kalanche blossfeldiana* Poellniz. II. The effects of growth regulators and gallic acid [J]. Plant Cell Physiol., 1990, 31: 757-762.
- [8] Altamura M M, Pasqua G. Flower formation *in vitro* in a quantitative short-day tobacco; interrelation between photoperiod and inflorescence development [J]. Physiol. Plant, 1991, 82: 333-338.
- [9] Vaz A P A. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(5): 411-415.
- [10] 朱国兵. 寒兰快速繁殖技术及其试管成花的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2006.
- [11] Bemier G, Havelange A, Houssa G, et al. Physiological signs that induce flowering [J]. Plant Cell, 1993(5): 1147-1155.
- [12] 王利琳, 庞基良, 胡江琴, 等. 温度对植物成花的影响[J]. 植物学通报, 2002, 19(2): 176-183.
- [13] 陈明莉, 王怀宇, 朱根发. 蝴蝶兰花期调控技术初探[J]. 广东农业科学, 2001(4): 26-28.
- [14] 诸葛增侠. 大花蕙兰在天津地区的栽培技术[J]. 天津农学院学报, 2001, 8(3): 44-46.
- [15] Chang W C, Hsing Y I. *In vitro* flowering of embryoids derived from matureroot callus of ginseng (*Panax ginseng*) [J]. Nature, 1980, 28(4):

341-343.

- [16] Goh C J, Seetoh H C. Apical control of flowering in an orchid hybrid *Aranda Deborah* [J]. Ann. Bot., 1973, 37: 113-119.
- [17] Goh C J. Flowering gradient along the stem axis in an orchid hybrid *Aranda Deborah* [J]. Ann. Bot., 1975, 39: 931-934.
- [18] Goh C J. Regulation of floral initiation and development in an orchid hybrid *Aranda Deborah*. [J] Ann. Bot., 1977, 41: 763-769.
- [19] Goh C J, Yang A L. Effects of growth regulators and decapitation on flowering of *Dendrobium* orchid hybrids [J]. Plant Sci. Lett., 1978 (12): 287-292.
- [20] Goh C J. Hormonal regulation of flowering in a sympodial orchid hybrid *Dendrobium* Louisae [J]. New Phytol., 1979, 82: 375-380.
- [21] 王光远, 许智宏, 蔡德发, 等. 铁皮石斛的离体开花[J]. 中国科学(C辑), 1997, 27(3): 229-234.
- [22] Goh C J. Production of flowering orchid seedlings and plantlets [J]. Malaysian Orchid Rev. (Singapore), 1996, 30: 27-29.
- [23] Kostenyuk I, Oh B J, So I S. Induction of early flowering in *Cymbidium nipo-marginatum* Mak *in vitro* [J]. Plant Cell Reports, 1999(19): 1-5.
- [24] Duan J X, Yazawa S. *In vitro* floral development in × *Doritis pulcherrima* × *Kingiella philippinensis* [J]. Scientia Horticulturae, 1994, 59: 253-264.
- [25] 陈肖英. 霍山石斛试管开花研究[D]. 广州: 华南师范大学, 2000.
- [26] Chang C, Chang W C. Effects of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd *in vitro* [J]. Plant Growth Regulation, 2000, 30: 171-175.
- [27] 王琳. 金钗石斛试管开花研究[D]. 广州: 华南师范大学, 2004.
- [28] 王再花, 涂红艳, 叶庆生. 细茎石斛的快速繁殖和试管开花诱导[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(6): 1143-1144.
- [29] Chang G, Chang W C. Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericos* *in vitro* [J]. Plant Growth Regul., 2003, 39: 217-221.
- [30] 温云飞, 鲁润龙, 谢子立. 霍山石斛的快速繁殖和花芽诱导[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(4): 296-297.
- [31] Pursie J G. Phloem exudate of *Perilla crispa* and its effect on flowering of *P. crispa* shoot explants [J]. J Exp Bot, 1984, 35: 227-238.
- [32] Krekule J, Kobl R K. The condition of the apical meristem of seedlings responsive to a promotive effect of abscisic acid on the flowering in the short day plant *Chenopodium rubrum* [J]. Z. Pflanzenphysiol, 1981, 103: 45-51.
- [33] 王光远, 刘培, 许智宏. 石斛离体培养中 ABA 对诱导花芽形成的影响[J]. 植物学报, 1995, 37(5): 374-378.
- [34] Tee C S, Maziah M, Tan C S. Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium Sonia* 17 [J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(4): 723-726.
- [35] Yu H, Yang S, Goh C J. *DOH1*, a Class 1 knox gene, is required for maintenance of the basic plant architecture and floral transition in orchid [J]. The Plant Cell, 2000, 12(11): 2143-2159.

Research Advances on *in vitro* Flowering of Orchid

XU Jing, PANG Ji-liang

(College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036)

Abstract: The effects of Photoperiod, temperature, plant hormone, medium components and culture explants on the *in vitro* flowering of Orchid were summarize, and prospecting the study direction of flowering time regulation in the orchid.

Key words: Orchid; flowering *in vitro*; flower bud differentiation