

大花蕙兰组织培养的研究进展及应用

常美花¹, 王莉², 李文红¹

(1. 河北北方学院 园艺系, 河北 张家口 075000; 2. 唐山师范学院 滦州分校, 河北 唐山 063501)

摘要:系统论述了大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)组织培养的概况和发展简史, 综述了国内外大花蕙兰组织培养中外植体的选择、培养基的选择、激素配方的选择、培养容器的选择、培养条件、褐变的控制和正确的操作方法等方面的最新研究动向, 提出了我国大花蕙兰组织培养中存在的问题以及对我国大花蕙兰快繁技术的展望。

关键词:大花蕙兰; 组织培养; 概况; 研究动向

中图分类号:S 682.301.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)07-0174-04

大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)为兰科兰属多年生草本植物, 是近几年在国际花卉市场上流行的高档室内盆栽花卉及高档切花, 因其花色艳丽, 花期较长(2~3月), 且在冬春节日期间开放, 所以具有极高的观赏价值。大花蕙兰多为杂交品种, 种子繁殖无法保持其品种特性, 且结实率也相对较低。故传统栽培靠分株繁殖, 因而周期长, 繁殖系数低, 繁殖速度慢, 远远不能满足商品化生产的要求。国外已将组织培养技术应用于大花蕙兰的繁殖与生产^[1]。国内也有许多研究者对大花蕙兰的组织培养技术进行了大量的研究, 并用于商品化生产, 但还存在一些问题。现结合实践经验和国内外的有关文献, 对大花蕙兰组织培养快繁技术的研究进展及应用进行详述。

1 大花蕙兰组织培养概述

大花蕙兰的组织培养始于20世纪60年代, Morel^[2]采用大花蕙兰的茎尖, 在含有细胞分裂素的KC培养基上进行培养, 茎尖分生组织膨大形成类原球茎, 并分化出根和叶, 首次获得兰花无病毒小植株。Wimber^[3]对Morel的方法进行改进, 采用液体振荡培养的方法大大加快了原球茎的增殖速度, 短期内可以获得大量再生植株, 此后组织培养技术在兰花生产上得到了广泛的应用。

在我国, 大花蕙兰的组织培养快繁技术研究起步较晚。谷祝平等^[4]用扫描电镜详细观察了大花蕙兰茎尖培养中原球茎的形成及发育过程。张淑娟^[5]对大花蕙兰进行茎尖培养, 获得了再生植株。徐宏英^[6]以幼根为

外植体, 对大花蕙兰进行了组培快繁研究。郑迎冬^[7]以大花蕙兰的茎段为外植体进行了一次性成苗的研究, 简化了繁殖过程。刘立峰^[8]采用大花蕙兰的茎尖为外植体, 不经过愈伤组织及原球茎阶段, 直接诱导丛生芽, 且一次性成苗。曹孜义^[9]指出, 在生产过程中, 尽量避免诱导、继代、育苗和生根4个阶段用不同的培养基。用1种或2种培养基实现4个阶段的培养, 可以简化生产程序, 提高效率。

王燕萍^[10]以大花蕙兰圆球茎发生发育的不同阶段的培养物为试材, 采用石蜡切片法对其组织学进行研究, 观察记录了圆球茎形成的过程, 并指出圆球茎起源可能存在2条途径: 体细胞发生途径和器官发生途径。总之, 大花蕙兰组织培养过程为: 外植体的导入→体胚诱导^[1]→原球茎形成→原球茎增殖→芽的诱导分化→根的诱导分化→出苗; 外植体的导入→直接诱导丛生芽→丛生芽增殖→根的诱导分化→出苗。

2 大花蕙兰组织培养的研究进展

2.1 外植体的选择

2.1.1 种子作为外植体 目前, 兰花优良品种的获得主要以有性繁殖方式获得种苗。因此, 种子离体萌发技术的研究显得尤为重要。兰花种子小, 量多, 绝大多数种类种子不具子叶和胚乳, 在自然条件下需要和真菌共生才能萌发。在试验和实践中, 可模仿自然将种子和真菌共生培养, 但需要先分离出相应的菌种, 分离程序繁杂, 目前已经较少使用。取而代之的是非共生萌发技术或无菌播种^[11], 这种非共生萌发技术已经成功的运用在大花蕙兰上。该体系一般包括3个环节: 一是选择适宜的培养基。目前兰花无菌培养常用的培养基有 KnudsonC、Vacin & Went、Kyoto、Reinent & Monr、Lindeman、MS 以及美国 Hydroponic 公司出品的 Hyponex 培养基等, 据李杰报道^[11], 不同培养基种类不足以对种子萌发产生实质性的影响。但以 Hyponex 培养基操作简单且

第一作者简介: 常美花(1968-), 女, 河北涿鹿人, 硕士, 副教授, 主要从事花卉学和组织培养教学与科研工作。

基金项目: 河北省科技攻关计划资助项目(052201124)。

收稿日期: 2011-01-13

为节俭。此外适量添加天然提取物,如:椰汁、香蕉汁、蛋白胨、水解蛋白等可大大的促进兰花种子的萌发。二是种子选择与处理:不同成熟期的种子在无菌培养中发芽力不同^[12],某些种类未成熟的种子,比成熟的种子更容易萌发^[13-14],同时试验证明,播种前对种子进行适当的预处理,可以提高种子的萌发率。如:超声波处理、0.1 mol/L NaOH 溶液处理^[15];三是接种培养。

2.1.2 茎尖及茎节段作为外植体 茎尖是最早也是最常用的大花蕙兰快速繁殖的外植体,而且学者们对茎尖及侧芽的取材时间、最适取材部位及大小进行了深入的研究,一般认为带 1~2 个叶原基的茎圆锥体成活率最高,中间部位侧芽的成活率及生长率也较高^[16]。虽然顶芽和侧芽是极好的外植体,但芽的来源有限。据殷丽青^[17]报道茎尖诱导芽的效果优于茎节段,诱导率为 71.4%,而茎节段的诱导率为 57.1%。

2.1.3 根作为外植体 徐宏英^[6]报道,切取大花蕙兰的幼根作为外植体,经消毒处理后剪成 0.3~0.6 cm 长的根段,作为诱导原球茎的外植体材料,其原球茎的最高诱导率为 83%,而根系数量远比茎尖多,容易获得,能很大程度的扩大外植体的范围。

2.1.4 其它材料作为外植体 张瑜^[18]报道,用大花蕙兰试管苗的叶片做外植体,诱导愈伤组织,但其诱导率很低,只有 3.3%。此外,花梗作为外植体已在蝴蝶兰、万代兰、石斛兰、文心兰中获得成功^[19],花梗培养已成为目前兰花繁殖的主要手段。秘彩莉^[20]报道,可以用大花蕙兰花梗做外植体诱导原球茎,且用 B5+BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 的组合对大花蕙兰花梗诱导原球茎有明显作用。用嫩花梗作为繁殖材料,其花茎长,取材方便,不伤母株,可以大大提高原始材料的数量。

总之,大花蕙兰组织培养的外植体有种子、茎尖、茎节段、幼根等材料,不同的材料其原球茎的诱导率不同,激素配方也不同。

选择外植体应注意以下事项^[21]:①不能用没开过花的植株和组织培养瓶苗作为外植体进行组织培养繁殖。因为没开过花的植株不知其品种是否正确,不知其价值如何,故进行批量组织培养的经济价值较低。瓶苗可能由于继代次数的增加产生变异,进而影响开花质量。②严格选择用于组织培养的母本植株。第一,组织培养品种必须是数年后受到消费者喜爱的品种。第二,组织培养品种必须具有该品种的典型特征(尤其是花)。第三,植株生长健壮,绝对抗病毒感染。③防止组织培养中产生变异。在组织培养中采集的每个茎尖的繁殖量必须控制在一定的范围之内,不可过多。如:大花蕙兰采切的茎尖的繁殖数量应在 1 000~10 000 苗。

2.2 褐化的控制

由于兰花组织中的多酚氧化酶活性较强,酚类物质含量较高,褐化死亡率较高。据吴汉珠等统计国兰诱导

启动后,褐化死亡几乎占 3/4^[22],因此解决褐化问题是兰花组织培养的关键。

2.2.1 选择适宜的取材时间 由于兰花酚类物质含量与季节有关,在生长旺盛的季节,兰花新芽上的酚类物质含量显著提高,而在生长较弱的季节酚类物质明显减少,所以选择冬春季取材在一定程度上可以减少褐化死亡。

2.2.2 外植体的预处理 徐程等^[22]认为将取材的兰花外植体用含有 150 mg/L 柠檬酸和抗坏血酸溶液处理 1 h,是较有效的办法。

2.2.3 培养基中加入抗氧化剂和吸附剂 在继代培养中消除褐化,一般加入抗氧化剂和吸附剂。在 1 L 溶液中分别加入 20% 的硫代硫酸钠 5 mL、活性炭 2 mg、VC 2 mg、PVP(聚乙烯基吡咯烷酮)、MBP(磷酸一丁酯)等均对褐化有一定的控制作用,但从效果和成本看,硫代硫酸钠更为节俭有效^[11],而课题组在试验中以 1 L 培养基中加入 VC 2 mg,效果也很好。

2.2.4 采取单芽不切割法 Seeni 和 Latha^[23]采用单芽不切割,基部直接插入培养基内的方法,以减少创伤面,也能减弱褐化。

2.2.5 勤换培养基 据张瑜^[18]报道,勤换培养基可以避免褐化的发生,25~30 d 换 1 次培养基较为合适。

2.2.6 闭锁型种苗生产^[24] 古在丰树于 20 世纪 80 年代末首次提出了闭锁型种苗生产的理念。闭锁型种苗生产指的是在一个封闭的系统中,控制其营养液、光照、温度、湿度、CO₂ 及各种气体浓度,为植株的生长创造最佳的环境条件,可有效地减少污染率及褐化率。

2.3 培养基的选择

学者们认为适合大花蕙兰组织培养的基本培养基大致有 MS、VW、KC 及 White 等,但对于最适合的培养基意见不一致^[25],该课题组在试验中发现 MS 培养基较好。

2.4 激素配方的选择

激素的种类、浓度和不同组合对大花蕙兰外植体的诱导和原球茎的增殖及分化起着主导作用。不同的品种、不同的外植体对激素的种类、浓度和组合的要求也不同。有关激素对大花蕙兰组织培养的影响是一个很复杂的问题,因此许多学者对此问题进行了大量的研究。

2.4.1 激素的种类 从目前诸多的研究中可以看出,用于大花蕙兰组织培养的激素种类有生长素类和细胞分裂素类,常用的生长素类有: NAA、IBA、2,4-D,常用的细胞分裂素有: BA、KT 和 ZT。但徐宏英认为 ZT 的效果不如 BA 和 KT^[9]。

2.4.2 激素浓度及配比 据谷祝平^[26]报道,较高浓度的 BA 能促进大花蕙兰原球茎的增殖,较低浓度的 BA 促进原球茎的分化。根据李杰^[1]的报道,2,4-D 对愈伤

组织的发生有非常显著的作用。KT 是体胚(体细胞胚胎)发生的关键因子。杨玉珍^[27] 研究发现,大花蕙兰对KT 的敏感度高于对 BA,相同浓度下的 NAA,KT 用量微弱增减即会产生明显差异,低浓度的 KT 对原球茎的增殖有明显的促进作用,高于 0.1 mg/L 则会抑制其增

长。该课题组研究发现 2,4-D 对大花蕙兰原球茎增殖效果非常好。

为此,结合国内外 40 a 来大花蕙兰组织培养快速繁殖的研究成果进行反复比较,对目前最具权威性的一些大花蕙兰组织培养配方列举如下(表 1)。

大花蕙兰组织培养的几种配方

表 1		大花蕙兰组织培养的几种配方			
作者	再生方式	培养阶段	外植体	培养基及激素配比	备注
李 杰	圆球茎	圆球茎	茎尖	VW+0. 3 mg/ L BA+0. 3 mg/ L KT+1. 2 mg/ L NAA+100 g/ L CM	
	丛生芽	诱导	花梗	B5+1. 0 mg/ L BA+2. 0 mg/ L 2, 4-D	
		芽诱导	茎段	MS+2. 0 mg/ L NAA+4. 0 mg/ L BA	
		圆球茎	圆球茎	MS+2. 0 mg/ L BA+1. 0 mg/ L NAA+100 g/ L Bananna powder	
		增殖分化		MS+1. 0 mg/ L BA+0. 5 mg/ L NAA	
		壮苗生根		1/ 2MS+2. 0 mg/ L IBA+2. 0 g/ L peptone+100 g/ L Bananna powder+1. 5 g/ L AC	
徐宏英	圆球茎	圆球茎	根尖	VW+0. 5 mg/ L BA+1. 0 mg/ L KT+0. 5 mg/ L ZT	
		诱导		VW+0. 5 mg/ L BA+1. 5 mg/ L NAA+150 mY L CM+2 g/ L CH+蔗糖 20 g/ L	
		圆球茎	圆球茎	VW+0. 5 mg/ L BA+1. 0 mg/ L NAA+蔗糖 20 g/ L	
		增殖分化			
殷丽青	圆球茎	圆球茎	茎尖、茎节段	1/ 2MS+0. 1 mg/ L NAA+1. 0 mg/ L GA+150 g/ L Bananna powder	诱导率 71. 4%
	单 芽	诱导		MS+4. 0 mg/ L BA+0. 2 mg/ L NAA+0. 6 g/ L AC	
	丛 芽	丛芽增殖	丛芽	MS+2. 0 mg/ L BA+0. 2 mg/ L NAA+0. 3 g/ L AC	增殖率 3. 79
		圆球茎	圆球茎	MS+1. 0 mg/ L BA+0. 2 mg/ L NAA+0. 3 g/ L AC	增殖率 6. 1, 分化率 71. 1%
		增殖分化			
	壮苗生根		MS+0. 5 mg/ L NAA+0. 3 g/ L AC	生根率 100%	
杨玉珍	圆球茎	圆球茎	茎尖	改良 KC+0. 05 mg/ L KT+0. 5 mg/ L NAA	以半固体培养加香蕉泥为佳
		诱导、增殖			增殖率 4. 1%
		生根壮苗		改良 KC+0. 2 mg/ L NAA	以固体培养为佳
刘丽峰	丛 芽	丛芽诱导	茎尖	MS+2. 0 mg/ L BA+0. 1 mg/ L NAA+1. 0 g/ L AC	
		增殖			不经过圆球茎直接诱导丛生芽, 一次性成苗
		壮苗生根		1/ 2MS+1. 0 mg/ L BA+0. 1 mg/ L NAA+0. 1g/ L AC	
张 瑜	圆球茎	圆球茎	茎尖、茎段	MS+1. 0 mg/ L BA+0. 1 mg/ L NAA	诱导率 70%
		诱导			
		圆球茎增殖	圆球茎	MS+1. 0 mg/ L BA+0. 5 mg/ L NAA	增殖倍数 4. 12
常美花	圆球茎	圆球茎	茎尖	1/ 2MS+0. 2 mg/ L NAA	根诱导率 69%
		诱导		MS+0. 5 mg/ L BA+1. 0 mg/ L KT+2 g/ L AC	诱导率 76%
		圆球茎增殖	圆球茎	MS+0. 5 mg/ L BA+0. 8 mg/ L 2, 4-D+2 g/ L AC	增殖率 89. 6%
		幼苗分化及生根		MS+1 mg/ L KT+0. 5 mg/ L NAA+2 g/ L AC	分化率达到 89. 9%, 生根率 86. 4%

注:李杰^[11]、徐宏英^[6]、殷丽青^[17]、杨玉珍^[27]、刘丽峰^[8]、张瑜^[18]。CM 是椰乳,AC 是活性炭,CH 是水解络蛋白。

2.5 培养条件

2.5.1 培养容器 大花蕙兰组织培养时常用的容器是密闭性较好的玻璃瓶和塑料瓶,实践证明,肚大口小的容器更有利于减少瓶苗的污染。据何松林^[128] 报道,以高分子树脂膜培养器内植入岩棉作为培养基支持体并使用液体培养基的方法,使得试管苗的生长势明显提高,生根和根长显著增加,同时作为培养基支持体的岩棉块,其下部相互独立,每一小块岩棉上仅培养 1 株试管苗,移栽时可以携带块将植株逐个分离,直接上盆移栽驯化,从而减轻试管苗移栽时对植株根系的伤害。

2.5.2 环境条件 大多数的研究者在大花蕙兰组织培

养时所采用的条件是:培养温度 23~25℃。日光灯加光,光强 1 500~2 000 lx,光照时间 12~14 h/d,外植体诱导阶段进行弱光培养更有利于诱导。pH 为 5.3~5.6。

2.5.3 操作方法 大花蕙兰组织培养的关键在于培养基的配方和操作方法,从外植体的选取、灭菌、接种、培养的每一步操作都很关键。所以操作方法必须正确,而且在培养过程中需要认真仔细的观察,根据实际情况采取相应的措施。如:据邹宗兰^[129] 报道,大花蕙兰利用根萼诱导产生的原球茎有二种类型,一类是外观呈乳白色或浅绿色,表面比较光滑的颗粒,颗粒之间很容易分开,

用以继代增殖速度很快,易分化成小苗。另一类是外观呈绿色或白色半透明水渍状,表面有毛状物。这类原球茎用以继代增殖速度也快,但不易分化成小苗。该课题组在试验中也发现同样的现象,而且在同一种培养基上进行多次继代以后,原球茎的增殖和分化率都会大大的降低。原球茎在同一培养基上培养的时间越长老化程度越大,即原球茎变成深绿色,坚硬,这样的原球茎不易增殖也不易分化,所以要及时转接。

大花蕙兰的组织培养过程中常常出现原球茎增殖分化同步发生的现象。但可以通过采取多种措施,进行综合调控,使其按照预期期望的方向发育。据邹宗兰^[29]报道,在快速繁殖初期,需要在较短的时间内建立较大的无性系,采用较低水平的激素浓度,缩短原球茎转接周期,控制在20~30 d内;适当提高培养基的渗透压;将原球茎切成小块(5~10个)接种,便能获得满意增殖效果。相反,若希望获得较多的小苗,则可采取提高激素浓度,延长原球茎的培养时间,适当降低培养基渗透压,将原球茎尽量单个接种到培养基上。

总之,大花蕙兰组织培养的过程比较繁琐,要想提高效率,降低成本并进行快速繁殖,今后的研究重点应该是简化繁殖过程,如:直接诱导丛生芽,一次性成苗。或者在生产过程中,尽量避免诱导、继代、育苗和生根4个阶段用不同的培养基。

参考文献

[1] 李杰,黄敏仁,王明.植物外源激素对大花蕙兰胚体发生影响的研究[J].北京林业大学学报,2005,27(4):66-68.
[2] Morel G. Producing virus-free *Cymbidium*. Am[J]. Orchid Soc Bull. 1990(9):495-497.
[3] Whimber D D. Clonal multiplication of *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem. Am[J]. Orchid Soc Bull. 1963 32: 105-107.
[4] 谷祝平,高金城,李柏年.大花蕙兰茎尖培养的扫描电镜观察研究[J].西北植物学报,1990,10(2):128-131.
[5] 张淑鹄,刘与明.大花蕙兰的快速育苗[J].福建热作科技,1993(2):38-39.
[6] 徐宏英,赵玉明,谢海军.大花蕙兰组织培养快繁影响因素分析[J].园艺学报,2002,29(2):183-185.
[7] 郑迎冬,杨承勇,蒋林.大花蕙兰的茎段培养[J].仲凯农业技术学院学报,2000,13(1):19-22.
[8] 刘丽峰,张健.丛生芽—大花蕙兰快速繁殖的新途径[J].四川农业大学学报,2004,22(2):150-152.

[9] 曹汝义.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学出版社,2001:125-132.
[10] 王燕萍,王广东,吴霞.大花蕙兰类原球茎形态发生的组织学研究[J].亚热带植物科学,2008,37(1):25-28.
[11] 李杰,黄敏仁,王明.兰花生物技术的研究及应用[J].南京林业大学学报,2006 30(2):108-112.
[12] Steber R. In vitro seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides* an endangered *Florida orchid* [J]. Lindleyana, 1998, 13(2):102-112.
[13] Arditij, Michand Olova A P. Seed germination of north American orchids[J]. Bot Gaz, 1981, 142(4):442-453.
[14] Sagawa Y, Valmayor H L. Embry culture of orchid[C]. Proc 5th World Orchid Conf, 1966.
[15] 段金玉,梁汉兴.天麻种子的萌发率与种子成熟度的关系[J].云南植物研究,1982,4(3):303-306.
[16] 范成明,李技林,何月秋.兰花组织培养及分子生物学研究进展[J].园艺学报,2003 30(4):487-491.
[17] 殷丽青,王广东,张建军.大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)离体快速繁殖技术[J].上海交通大学学报(农业科学版),2006,24(4):365-369.
[18] 张瑜,付艳,殷奎德.大花蕙兰的组织培养和次生代谢物质的调控[J].农业生物技术科学,2006 22(9):56-58.
[19] 丁兰,付庭治.兰花生物工程研究进展[J].西北师范大学学报(自然科学版),2000 36(3):111-116.
[20] 秘彩莉,霍晨敏,冯全义.大花蕙兰快速繁殖技术初报[J].河北师范大学学报,2002 26(3):78-82.
[21] 卢思聪,石雷.大花蕙兰[M].北京:中国农业出版社,2005:84-85.
[22] 徐程,詹忠根,张铭.中国兰的组织培养[J].植物生理通讯,2002,38(2):171-174.
[23] Seeni S, Latha P G. Foliar regeneration of the endangered Red vanda *Renanthera imschootiana* Rolfe [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992 (29):167-172.
[24] 熊丽,吴丽芳.观赏花卉的组织培养与大规模的生产[M].北京:化学工业出版社,2003:1-14.
[25] 刘立峰.大花蕙兰组织培养技术体系研究[D].雅安:四川农业大学,2002:4-7.
[26] 谷祝平,颜廷进.大花蕙兰茎尖组织培养及形态建成的研究[J].实验生物学报,1989(2):149-151.
[27] 杨玉珍,孙天洲,孙廷.大花蕙兰组织培养和快速繁殖技术研究[J].北京林业大学学报,2002,24(2):86-88.
[28] 何松林,将要为,孔德政.不同培养方式对大花蕙兰试管苗生长的影响[J].河南农业大学学报,2007,41(6):619-622.
[29] 邹宗兰,秦庭毫,文颖.大花蕙兰工厂化繁殖技术研究[J].西南农业大学学报,2007,20(4):743-745.

Research Advances and Application on the Tissue Culture of *Cymbidium hybridum*

CHANG Mei-hua¹, WANG Li², LI Wen-hong¹

(1. Department of Horticulture, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000; 2. Luanzhou Sub-college, Tangshan Normal University, Tangshan, Hebei 731398)

Abstract: This article summarized the outline and development-history about tissue culture of *Cymbidium hybridum*, and concluded the last researches direction to tissue culture of *Cymbidium hybridum* which the related to the choice of explant, culture medium, culture container, culture environment, method of browning-control, and the correct method of operation in oversea and inland. Based on result of pre-researches, the paper proposed some issues effected development on tissue culture of *Cymbidium hybridum* now and the view on rapid-propagate in China.

Key words: *Cymbidium hybridum*; tissue culture; outline; research advances