

洋兰生物技术研究及其应用

赵九洲

(江西财经大学资源与环境管理学院, 南昌 330032)

中图分类号: S682.31; Q945 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2005)04-0077-02

生物技术在兰花的快繁、品种复壮、优良品种的培育等方面具有着重要作用。洋兰在我国的花卉产业中所占的比率较大, 许多种类的观赏价值较高, 是室内外装饰绿化和花艺的良材, 特别是蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)、大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)等花大色艳、花期长, 生产量大, 市场售价也高。多数兰科花卉的蒴果中虽含有数万至数十万粒种子, 但种子很难发芽繁殖, 分株繁殖率低, 不利于产业化生产。直到 20 世纪 80 年代后期园艺家们利用生物技术解决繁殖难的问题, 至今大花蕙兰等洋兰繁殖及大规模生产技术仍被控制在少数人手中。本文对洋兰组织培养技术及其应用进行综述, 旨在对洋兰的产业化和规模化生产提供理论依据。

1 原生质体培养与基因工程

大花蕙兰是利用原生质体培养而获得的一系列品种, 以叶片为材料的原生质体培养, 在 1% 纤维素酶+0.3% 果胶酶+0.2% 半纤维素酶+11% 甘露醇分离原生质体的产量最高。

Yang & Lee 等(1999)。用液体悬浮培养法培养大花蕙兰, 并对其用粒子轰击法(particle bombardment)进行 GUS-INT 和 NPTII 基因导入研究, 经 PCR 分析表明转基因成功, 转基因植物已经成功的栽植于土壤, 并适应温室栽培环境。大花蕙兰原生质体的融合比原生质体的分离培养难度更大, 成功的报道很少。

2 兰花种子离体萌发技术

兰科植物种子的子叶发育不全, 并且绝大多数种类的种子不具子叶和胚乳, 在自然条件下极难萌发。Noel Bernard (1899) 研究发现, 用从相关种类纯化的真菌感染种子, 种子萌发良好, 幼苗发育正常, 表明自然条件下兰科植物的种子萌发需要适宜的真菌的感染, 真菌与种子之间建立了一种共生关系, 种子从感染的真菌得到了萌发所需的养分。

徐锦堂从天麻原球茎中分离出紫萁小菇(*Mycenaos mudicola*), 用天麻种子伴该菌播种后, 萌发率可达 20% 以上, 大大促进了天麻的人工栽培。由于共生萌发需先分离出相应的

真菌, 分离程序繁杂, 而被非共生萌发法取代。

Bernard 以 *Ophrys L* 的块茎配制培养基, 首次使卡德丽亚兰与蕾丽亚兰杂交种子成功萌发。Arditi 等(1967) 用非共生萌发法也使不同种类的兰花种子萌发, 并得到了正常的种苗, 其中有齿瓣兰(*Odontoglossum oleave*)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)、石斛兰(*Dendrobiumchrysanthus*)、文心兰等(*Oncidium*)。

兰花种子成熟较慢, 一般在授粉后几个月方能成熟, 一些种类的兰花未成熟或接近成熟的种子就可收获播种培养, 甚至比成熟种子更容易萌发。卡德丽亚兰(*Cattleya*)、树兰(*Epidendrum Cochleatum*)、文心兰、蝴蝶兰、肾药兰(*Kingidium*)和万代兰(*Vanda*)等 10 个属的 19 个种和 15 个杂交种的萌发实验证明, 未成熟种子的确能很好萌发, 最短接种时间为授粉后 40 d~85 d(天), 但如果种子胚珠发育不全就不能萌发生长。许多实验证实, 播种前对种子进行适当的预处理可以提高种子萌发率。田梅生等用剪刀将四季兰种子种皮剪破后再进行无菌培养, 萌发率显著提高; 段金玉等研究发现, 用 0.1 mol/L (摩尔/升) NaOH 溶液处理多花兰(*Cymbidium floribundum*)、朵朵香(*C. goeringii*)、双飞燕(*C. goeringii* Shuang Fei Yan'), 豆瓣绿(*C. goeingii* 'Dou Ban Lu'), 寒兰(*C. kanran*)、套叶兰(*C. cyperifolium*)等, 处理 10 min~30 min(分钟), 萌发率可提高 10 倍以上。预处理可提高发芽率, 但其机理还有待进一步研究。

3 洋兰的组织培养技术

洋兰的组织培养始于 20 世纪 60 年代。Morel 采用兰属植物茎尖, 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原球茎, 并分化出根和叶, 首次获得兰花无病毒小植株。Wimber 对 Morel 的方法进行了改进, 采用液体振荡培养的方法, 大大加快了原球茎增殖的速度, 短期内可获得大量再生植株。此后, 组织培养技术在兰花生产上得到了广泛应用, 目前大约已有 60 余属, 数百种兰花可以用组织培养的方法进行繁殖。

3.1 洋兰组织培养程序

外植体(茎尖、侧芽、花梗、叶片等)→诱导 PLBs(protocol-like bodies)→PLBs 增殖→芽诱导及丛芽增殖→驯化处理→试管苗移栽(11~12 月进行为宜)→温室栽培管理^[1]。

3.2 外植体的培养

大部分兰花的花梗上花芽较多, 取材方便, 不伤母株。目前报道最多的是花梗培养, 以花瓣、萼片、子房为外植体的报道较少。茎尖是最早用于兰花快速繁殖的外植体。国际上最具商业价值的几个大属的兰花, 卡德丽亚兰、石斛兰、蝴蝶兰、文心兰等首先在茎尖培养中取得成功。



作者简介: 赵九洲, 1961 年生, 博士, 2004 年毕业于南京林业大学风景园林学院, 现任江西财经大学资源与环境管理学院副院长、副教授、研究生导师, 从事园林与观赏园艺专业的教学和科研工作, 先后在各类期刊上发表论文 40 余篇, 获省优秀教学成果二等奖 1 项, 省科技进步三等奖 2 项, 获得各类荣誉证书 16 项。

收稿日期: 2005-03-21

大花蕙兰的幼嫩花梗腋芽可直接诱导丛生芽,也可用花梗薄片从切口处诱导原球茎,诱导率因花梗取材部位不同而有差异。花梗培养已成为目前兰花繁殖的主要手段。试验表明叶片和花瓣为外植体污染率较高,而BA 1.0 mg/L~5.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L+B5培养基诱导花梗产生类原球茎(PLB)为67%^[5]。郑迎冬等以大花蕙兰试管苗茎段为外植体,诱导产生PLB及丛生芽,这与周月坤等人的研究相一致,但出愈率仍然较低,影响出愈率的因子及其解决的方法仍有待进一步研究。

3.3 培养基与激素

3.3.1 培养基 洋兰组织培养所用的培养基种类较多,成分含有无机盐类、维生素类、激素、氨基酸、核苷酸以及复合添加物。常用基本培养基有:KC、MS、VW、BM及其改良型^[4]。无性系快速繁殖使用较多的培养基为Kundson C、VW、MS等,White培养基应用较少。花梗为外植体,用B₅培养基诱导花梗产生原球茎较高^[2]。

3.3.2 细胞分裂素对原球茎(PLB)的影响 较高浓度的BA能促进大花蕙兰原球茎的增殖,较低浓度BA促进原球茎分化。BA和KT对大花蕙兰类原球茎诱导有显著作用,而ZT的诱导作用不明显,NAA对大花蕙兰类原球茎诱导有显著作用^[5]。6BA 1.0 mg/L(毫克/升)、NAA 0.5 mg/L(毫克/升)增殖率可达95.2%,而PLB的分化则以6-BA 0.4 mg/L、NAA 0.2 mg/L(毫克/升)为最佳^[9]。大花蕙兰PLB的增殖表现出一定的群体生长效应,类原球茎的增殖速度与接种密度成正相关^[2]。

3.3.3 蔗糖与复合添加物对大花蕙兰PLB分化的影响 徐宏英等研究表明,蔗糖对大花蕙兰类原球茎诱导增殖作用不明显^[5]。朱艳^[6]试验表明,蔗糖浓度对大花蕙兰原球茎分化有明显的影响,蔗糖浓度2%~3%为宜。

香蕉匀浆物在两种培养基上均表现出明显的促进作用,马铃薯匀浆物在KC培养基上并不表现明显的促进作用,但在White培养基上表现出仅次于香蕉匀浆物的促进作用^[7]。胰蛋白胨在KC培养基上表现出仅次于香蕉匀浆物的促进作用,但在White培养基上却比马铃薯差。酵母提取物在KC培养基上对原球茎的促进作用比马铃薯好,但在White培养基上却比不加任何添加物的对照组差,表现出抑制作用。

4 前景展望

原生质体培养及融合不仅给细胞壁及细胞膜相关的基础性课题提供了良好的材料,开辟了新的研究途径,而且倍受日益发达的兰花产业的关注,通过原生质体培养及融合技术能够培养远缘杂交产生新品种,尤其是利用基因工程技术得到转基因兰花,不论对植物生物工程研究还是对兰花产业的发展都有不可估量的价值。目前,已从卡德丽亚兰、石斛兰、蕙兰、蝴蝶兰等十几种兰花分离得到原生质体。外植体的来源有根、叶、原球茎、花瓣等,不同的外植体难度各有不同。Neuman先后用蝴蝶兰、石斛兰、万代兰(*Vanda*)为材料,得到3%~5%的融合原生质体。台湾的Chen W H等从几种蝴蝶兰的根、叶、花瓣、原球茎得到了大量的原生质体。Yang H H等从一种石斛兰分离出了色素合成基因,并且得到了高度表达,成功地克隆了蕙兰(*Cymbidium fabri*)花叶病毒外壳蛋白基因,用

基因枪轰击法将这一基因导入兰花的原球茎和愈伤组织,得到较高的转化表达,给兰花基因工程带来了希望。

大花蕙兰主要以茎尖为材料进行组培繁殖。以大花蕙兰试管苗茎段为外植体,诱导产生原球茎及丛生芽。如以1/2 MS+BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L(毫克/升)+BJ 100 g/L(克/升)为培养基进行培养,可以1次成苗,在4个月内长成完整植株,能够移栽成活。采用花梗、叶片、花瓣作为外植体材料诱导出类原球茎。试验证明BA 1.0~5.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L(毫克/升)+B5培养基更容易诱导花梗产生类原球茎,出愈率可达67%,出愈时间可达10 d(天),且污染低^[5],为大花蕙兰试管苗工业化生产提供了基础。

在PLB的增殖,丛生芽的诱导与增殖过程中,不论是固体培养还是液体培养,培养物接种3 d~4 d(天)后便开始分泌出红色多酚氧化物于培养基中,致使培养物生长受到抑制,活性炭对于防止褐化有很好的影响。其它抗氧化剂的作用如VitE、VitA和VitC的作用尚未见报道。

激素浓度和种类其组合对外植体的诱导和原球茎的增殖及分化起着主导作用。KT和NAA(或IAA)配合使用对喙蕊兰叶片诱导效果极好,BA在兰花组织培养中对叶诱导与芽增殖起着重要作用。洋兰的组织诱导、原球茎增殖及分化一般需用较高浓度细胞分裂素与低浓度生长素的配合,研究表明大花蕙兰杂交新品种‘西维亚’、‘玛利莲梦露’、‘蒙米拉丝’、‘女皇’等利于原球茎增殖的培养基为改良KC+KT 0.05 mg/L+NAA 0.5 mg/L(毫克/升),以半固体培养,加香蕉泥为佳,增殖率较高,利于生根壮苗的培养基为改良KC+NAA 0.2 mg/L(毫克/升),以固体培养为佳。但在中国兰(地生兰)芽端诱导培养中,生长素使用浓度范围较大(1.0 mg/L~5.0 mg/L(毫克/升)),生长素浓度一般高于细胞分裂素,NAA诱导效果好于2,4-D和IBA。用MS附加0.5 mg/L(毫克/升)BA和1.0 mg/L(毫克/升)NAA对素心兰等20个国兰种及品种诱导成功,在根状茎诱导芽分化时需提高BA浓度(0.2 mg/L(毫克/升)),降低生长素浓度(NAA 0.2 mg/L(毫克/升)),这与洋兰诱导启动及芽分化时激素浓度使用相反,其作用机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 兰花系列编委会. 图解兰花组织培养入门[M]. 园艺世界杂志社, 台北, 2001. 67~126.
- [2] 秘彩莉, 霍晨敏, 冯全义等. 大花蕙兰快速繁殖技术初报[J]. 河北师范大学学报, 2002, 26(2): 190~192.
- [3] 郑迎冬, 杨承勇, 蒋林. 大花蕙兰的茎段培养[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2000, 13(1): 19~22.
- [4] 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): 111~115.
- [5] 徐宏英, 赵玉明, 谢海军等. 大花蕙兰组培快繁影响因素分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(2): 183~185.
- [6] 朱艳, 胡军, 秦民坚等. 大花蕙兰的快速繁殖技术研究[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(6): 57~59.
- [7] 刘明志, 朱京有. 培养基、BA和复合添加物对大花蕙兰增殖和分化的影响[J]. 暨南大学学报, 2000, 21(3): 100~104.
- [8] 徐宏英, 王芳, 谢海军等. 大花蕙兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 534~535.
- [9] 杨玉珍, 孙天洲. 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): 86~89.