

中国兰花组织培养研究进展

丁燕芬^{1,2}, 王岩^{1,2}, 龙春林^{1*} (1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南昆明 650201; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204)

摘要 对中国兰花(*Chinese Cymbidiums*)组织培养的国内外研究进展进行了综述;着重对中国兰花组织培养中组织培养程序,原球茎的来源,培养基的选择,培养方式和培养条件等方面的研究进展进行了综述。

关键词 国兰;组培;外植体;培养基;激素

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)08-02247-02

Research Advances in Tissue Culture of Chinese Orchids

DING Yan-fen et al (School of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract Famous for its special form, aroma and culture connotation, traditional Chinese orchid with a long cultivation history is very popular in China. Tissue culture was widely used in different plant materials, however was not an effective method for Chinese orchid reproduction due to its particularity. Progress in Chinese orchid tissue culture was reviewed in this paper. Research advances of Chinese orchid tissue culture were elaborated such as tissue culture process, the origin of protocorm, culture medium selection and culture condition.

Key words Chinese orchid; Tissue culture; Explant; Medium; Hormone

中国兰花是狭义的兰花,又称国兰、东洋兰,系蕙兰属(*Cymbidium*)中的部分地生兰。按花期可大致分为:春兰(*C. goeringii*)、建兰(*C. ensifolium*)、寒兰(*C. kanran*)、墨兰(*C. sinense*)等^[1],其味幽香,花色淡雅,具有很高的观赏价值。笔者对中国兰花组织培养研究进展进行了综述。

1 中国兰花组培程序与原球茎的来源

1.1 组织培养程序 外植体—诱导形成原球茎—原球茎大量增殖—分化出小植株—生根壮苗培养—温室栽培—室外栽培。

1.2 原球茎来源 除茎尖、叶片和种子外,花瓣、萼片、子房、花梗、侧芽、花芽、茎段、根^[2]等外植体也成为兰花组织培养中原球茎的重要来源。但在国兰组培中,受技术、母体数量等因素制约,应用的外植体种类相对较少。

1.2.1 茎尖、侧芽。茎尖是最早用于兰花快速繁殖的外植体,侧芽应用也相当广泛。春兰^[3]、墨兰^[4]、建兰^[5]等均可用茎尖诱导出大量的类原球茎,类原球茎发育成根状茎后进一步长成幼苗。大花蕙兰、文心兰等复轴生长类型的洋兰更适合茎尖作为外植体。经过对茎尖及侧芽的取材时间,最适取材部位及大小的研究,一般认为带 1~2 个叶原基的茎圆锥成活率高,中间部位侧芽成活率较高^[6]。从长 1~2 cm、苞叶未展开的新芽上切取茎尖则成功率更高^[7],过小的外植体不但活力弱,而且分裂增殖的部位少;过大的外植体,诱导困难,容易褐化死亡^[8]。

1.2.2 种子。兰花种子非常细小,每粒种子长约 1~2 mm,直径 0.1~0.2 mm,重量只有 0.3~6.5 μg,且种子内的胚多半不成熟或发育不完全。因而兰花种子难以在自然条件下萌发。兰花种子在自然条件下萌发困难,除了与胚发育不完全有关以外,还与种皮致密、透性差或种皮中含有抑制物有关^[9]。Link 早在 1824 年就观察到自然条件下兰花种子萌发伴随着真菌感染的现象^[9]。Bernard 在 1899 年首次分离出兰花的根菌,并用其感染兰花的种子进行萌发试验,从而创立了兰花种子共生萌发的方法^[10]。我国兰科植物菌根菌研究发展

很快,在天麻^[11]、白芨^[12]等兰科植物以及石斛(*Dendrobium*)等附生兰中均有成功应用,但地生兰的共生萌发还在探索中。1909 年 Bernard 以眉兰(*Ophrys*)的块茎配制培养基,使卡德丽亚兰(*Cattleya*)与蕾丽亚兰(*Laelia*)杂交种的种子成功萌发,开创了非共生萌发的先例^[3]。黄磊等用春兰(*Cymbidium goeringii*)和大花蕙兰(*Cymbidium hybrids*)的杂交种子,经非共生萌发得到了无菌试管苗^[14]。田梅生等用剪刀将四季兰种皮剪破后种子的萌发率大大提高^[15]。段金玉等对兰属 10 种植物的种子离体萌发研究时发现,用浓度 0.1 mol/L 的 NaOH 浸泡寒兰、双飞燕、多花兰、朵朵香、双飞燕、豆瓣绿、套叶兰等 10~30 min,萌发率可提高 10 倍以上^[16]。另外,孙志栋等用春兰的种荚成功诱导出原球茎^[9]。大部分兰花种子可通过无菌萌发方式发芽,而萌发率因基因型而异。气生兰及其杂交后代的种子萌发力较强,地生兰种子萌发率普遍较低。

1.2.3 叶片。叶片作为外植体既可减少对母株的伤害,取材又不受季节的限制,是比较理想的外植体材料。其中以试管苗的幼叶作为外植体培养较好。陈丽等从幼叶的叶尖表皮细胞和叶肉细胞直接培养出体细胞胚,但在 30 d 之内无愈伤组织产生,在经过下一级的培养后分化出幼苗^[17]。

1.2.4 根。Stewart 等在 1978 年用树兰(*Epidendrum*)等的根开创性地培养出了原球茎和从愈伤组织分化出植株。之后,根的培养相继在不同兰花中获得了成功,大多采用根尖作为材料^[18]。

1.2.5 其他。另外,还有用花梗作为外植体,但多用于洋兰,国兰中很少使用。王求清等用春兰成年植株的根状茎成功诱导出完整植株^[19]。

2 培养基和激素

2.1 基质 用于兰花组培的培养基种类繁多,最常用的培养基为 MS、KC、VW、RM、H、White 及其改良型,其中以 MS 的应用最为广泛。应用时根据不同品种和培养阶段对组分及其浓度加以修改。如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^[20]。对于培养基中无机盐的量,春兰(*C. goeringii*)要求要少,惠兰(*C. faberi*)要求的量较大,而墨兰(*C. sinense*)则不敏感^[17]。蔗糖作为培养基的能源物质和渗透调节剂,对原球茎的生长影

基金项目 国家科技基础条件平台(2004DKA30430,2005DKA 210006);云南省自然科学基金(2005C0053M)资助。

作者简介 丁燕芬(1981-),女,江苏常州人,硕士研究生,研究方向:园林植物生物技术。* 通讯作者,研究员。

收稿日期 2006-12-11

响较大,因此一般情况下,蔗糖是首选碳源,且不同浓度对兰属原球茎生长的作用不同。Kusumoto 认为浓度 2%蔗糖对兰属原球茎生长最好^[21];Peek 和 Chun 报道用浓度 2%~3%蔗糖促进芽的形成,而根的分化和生长则用浓度 5%蔗糖最适合^[22]。

2.2 植物激素 植物激素对细胞的生长、分化、发育等一系列的生理变化和形态建成起着控制作用,是诱导兰属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激素种类、用量及配对外植体诱导和原球茎增殖与分化起主导作用。目前常使用的外源激素主要是生长素类(如 IAA、IBA、NAA 和 2,4-D)和细胞分裂素类(如 KT、ZT 和 BA)。对不同的兰花来说,在不同的生长发育阶段所需激素的量及种类都不尽相同。一般认为激素能够诱导胚发育形成原球茎,还可大大加快个体发生和形态建成的速度^[23]。在原球茎的诱导阶段,加生长素如 NAA 和细胞分裂素对原球茎的诱导有利,加细胞分裂素对原球茎的分化有促进作用;生根诱导时只需生长素即可^[16]。Seenii 等提出,BA 在兰花组织培养中对叶诱导与芽增殖起着重要作用^[24]。何子育等则认为在增殖生根与壮苗阶段不需加任何激素^[25]。朱发根等研究发现 10 mg/L BA 对墨兰与大花惠兰种间杂种原球茎的增殖效果最好^[26]。陈丽等在对墨兰的研究中发现 0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L BA 有利于墨兰根状茎的增殖^[17]。培养基中添加 2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 时,建兰原球茎既能增殖又能分化,成苗率较高且根系健壮。孙安慈^[3]等报道 1.0 mg/L 6-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 6-BA+0.5 mg/L NAA 则适于四季兰^[27]。

3 培养方式与条件

3.1 培养方式 组织培养方式有固体培养、半固体培养和液体培养之分。傅向东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^[28],其原因显然是振荡培养通气好,原球茎与液体可充分接触,能更好地吸收营养。傅向东在对建兰进行组织培养时发现液体悬浮培养方式明显地促进原球茎的增殖速度和分化成苗程度^[29]。毛碧增等对建兰的研究中发现,用液体悬浮培养可提高原球茎的增殖率^[29]。吕永杰等认为,在兰花的整个生产过程中,利用半固体培养或液体培养进行原球茎增殖,利用固体培养分化和生根,可增加繁殖系数,降低污染,减少成本,有利于大规模生产^[30]。

3.2 培养条件 培养基的培养温度、pH 值、光照时间、光质等环境条件对原球茎、根状茎的生长与分化都有一定程度的影响。培养温度在(25±3)℃最好。培养室相对湿度一般保持在 70%~75%最适。兰花所用的培养基一般呈弱酸性,pH 值在 5.0~6.0,不同的种类对 pH 值的要求不同。中国兰比较敏感,pH 值以 5.1~5.4 为宜。傅向东等发现对建兰原球茎增殖较为适宜的 pH 值是 5.0±0.2,以 pH 值为 5.0 最佳^[29]。另外,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 La(CH₃COO)₃,可促进墨兰根状茎增粗,加快顶芽生长^[31]。傅雪琳等应用低剂量的⁶⁰Co 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^[32]。石戈等发现高压静电场促进舟山春兰愈伤组织的生长^[33]。

4 结语

随着兰花产业的不断发展,组织培养技术必将成为兰

花繁殖培育、工厂化生产的重要手段。目前,中国兰花的组培已经取得较大进展,但相较于洋兰还有很多技术急需改进和发展。如国兰的试管苗移栽后生长缓慢和开花迟的问题,应及早解决。天然提取物在组培中的作用,兰花共生菌根及其应用需要研究。另外,可借助于其他栽培繁育手段,结合组织培养技术进行多方位育种,如多倍体育种,原生质体培养与融合技术等。同时也可采用基因工程技术创建符合大众审美观的转基因兰花。

参考文献

- [1] 徐程,詹忠根,张铭,等.中国兰的组织培养[J].植物生理学通讯,2002,38(2):171-174.
- [2] 陈心启,罗毅波.中国兰科植物研究的回顾和前瞻[J].植物学报,2003,45(S):2-20.
- [3] 孙志栋,陈惠云,葛红,等.中国春兰组织培养初探[J].安徽农学通报,2006,12(1):20.
- [4] 姜玲,张明涛,陈泽雄,等.墨兰组织培养结合化学处理脱除建兰花叶病毒(CymV)的研究[J].园艺学报,2005,32(6):1056-1060.
- [5] 贾勇炯,曹有龙,王水.彩心建兰花枝茎节离体培养的研究[J].四川大学学报:自然科学版,2000,37(1):94-97.
- [6] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1991:237-247.
- [7] 詹忠根.蕙兰属植物组织培养研究进展[J].北方园艺,2006(3):120-122.
- [8] 范成明,李枝林,何月秋,等.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.
- [9] LINK H F. Elementa Philosophiae Botanicae [M]. Bedin: Sumptibus Haude & Spener, 1824: 486.
- [10] BEMARD N. Sur la gemination du neottia nidus avis compt [J]. Rend Acad & Sci Paris, 1899(128): 1253-1255.
- [11] 徐锦堂,范黎.天麻种子与小菇属真菌共生萌发的研究[J].菌物系统,2001,20(1):137-141.
- [12] 郭顺星,徐锦堂.白芨种子萌发和幼苗生长与紫萁小菇等 4 种真菌的关系[J].中国医学科学院学报,1992,14(1):51-54.
- [13] BEMARD N. Evolution dans la symbiose les orchids et leurs champignons commensaux [J]. Ann Sci Nat Bt Ser, 1999, 9(9): 191-196.
- [14] 黄磊,贺筱蓉,郑立明,等.促进兰花组培苗生长的墨兰菌根真菌研究初报[J].2004,25(1):36-38.
- [15] 田梅生,王伏雄,前南芬,等.四季兰离体萌发及器官建成的研究[J].植物学报,1985,27(5):455-459.
- [16] 段金玉,谢亚红.在无菌条件下激素和种了处理对兰属十种植物种子萌发的影响[J].云南植物研究,1982,4(2):197-201.
- [17] 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.
- [18] STEWART J, BUTTON J. Development of callus and plantlets from epidendrum root tips cultured in vitro [J]. Am Orchid Soc Bull, 1978(47):602-612.
- [19] 王求清,余通平.春兰根状茎离体培养[J].园艺学报,2005(32):706-707.
- [20] 王熊.兰花生长发育规律的探讨[J].山东农业大学学报,1988(19):19-24.
- [21] KUSUMOTO M. Effects of coconut milk, agar, and sucrose concentrations, and media pH on the proliferation of Cymbidium protocorm-like hodies cultured in vitro [J]. Japan Soc Hort Sci, 1980, 48(4):503-509.
- [22] PECK K Y, CHUN C K. Effect of pH on the organogenesis and nutrient uptake through Cymbidium protocorms culture [J]. Korean J Plant Tiss Cult, 1985, 12(2):1-7.
- [23] 卢思聪,薛秀玲.建兰与多花兰杂交胚培养中植物激素的应用[J].种子,1982,4(2):31.
- [24] 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.
- [25] 何子育,黄勇芳,屈秀兰.蝴蝶兰的组织培养[J].热带作物科技,1999(5):26-27.
- [26] 朱发根,陈明莉,罗智伟,等.墨兰与大花惠兰种间杂种原球茎的诱

(下转第 2250 页)

究证实,DNA 免疫确实能够激发机体产生特异性抗体,相关机理有待进一步研究。

4 DNA 疫苗的优化策略

DNA 疫苗虽然具有减毒疫苗和灭活疫苗无法比拟的优点,但仍需优化。针对目前的技术水平来说,没有修饰的裸露 DNA 质粒,转染细胞后蛋白的表达不够理想,诱导的免疫反应较弱,因此为了得到更理想的免疫效果,进行 DNA 疫苗的优化是十分必要的。

构建质粒载体的基本要求是含有 1 个能使插入基因片段在哺乳动物细胞内高水平表达的启动子^[13]。在构建 DNA 疫苗时,如果将编码细胞因子的基因同时克隆入质粒,能够提高免疫反应或调整免疫反应类型^[14];将不同基因的表达质粒混合在一起进行免疫,也能得到较好的免疫效果^[15-16]。另外,近年来发现,转录终止元件亦可以促进基因表达的效应,研究表明,用兔 B 球蛋白基因派生的转录终止元件替代生长激素转录终止元件可提高表达能力^[17]。

研究发现,细菌 DNA 中含有以甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CPG)为单元所构成的基因,能刺激 B 细胞增殖,增强体液免疫;它是激活单核细胞分泌的细胞因子,能够引发 TH1 的体液和细胞免疫反应。因此,若能对 CPG 序列进行优化,将能够增强 DNA 疫苗的免疫能力。

在质粒中插入的基因片段一般选择病原体表面糖蛋白编码基因来构建疫苗,这有利于提高 DNA 疫苗的免疫效果,但这需在对病原体基因充分了解的基础上才能做到,对于某些较复杂的病原体还需要建立更有效的方法。表达文库免疫(expression library immunization,ELI)技术^[18]提供了一种在已知或未知病原体基因系统普遍有效的方法,这种技术的基本原理是将病原体基因组文库中的病原体 DNA 片段插入特定的质粒中,并引用基因免疫的方法筛选病原体基因组中具有免疫保护功能的基因片段。

DNA 疫苗制备好后,对免疫途径和接种方式的选择,关系到免疫效果的好坏。通常选择的方法有基因枪免疫法、皮肤浸润接种法等。基因枪免疫法是指将含有保护性抗原基因的质粒包裹在金或钨颗粒上,利用高压加速装置将颗粒直接射入上皮细胞内,从而提高质粒的转化效率。该方法主要倾向于诱导 Th2 型反应^[19]。皮肤是机体与外界环境直接接触的门户,含有递呈抗原功能最好的 APC 之一,即郎罕氏细胞,因此通过皮肤途径接种可能产生更好的免疫应答。除了上述因素外,对免疫佐剂进行优化,比如细胞因子佐剂、泛素佐剂等,也能优化 DNA 疫苗的免疫效果。

5 结语

DNA 疫苗在安全性、稳定性、免疫保护效果、制备等方面具有其他疫苗无法比拟的优势,必定能在未来的疫苗研制中扮演举足轻重的。DNA 疫苗不仅有可能成为病毒、细菌或寄生虫等感染性疾病的预防性疫苗,同时也可能作为非感染性疾病、肿瘤、自身免疫疾病等的治疗疫苗。目前 DNA 疫苗仍存在一些不可忽略的问题,随着研究的进一步深入,DNA 疫苗在临床上的广泛应用最终必将实现。

参考文献

- [1] 程相朝,张敏,王建军,等.DNA 疫苗的主要意义与特点[J].河南科技大学学报:医学版,2005,23(3):236-238.
- [2] WOLF J A,MALONE R W,WILLIAMS P,et al.Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J].Science,1990(247):1465-1468.
- [3] 温斌.DNA 疫苗与抗肿瘤免疫[J].国外医学免疫学分册,2003,26(1):17-19.
- [4] 钟辉,曹诚,李平,等.以恒河猴为模型的 DNA 的免疫保护作用研究[J].遗传学报,2000,27(2):95-100.
- [5] DONNCLLY J J,ULMER J B,LIU M A.DNA vaccines [J].Life Science,1997(60):163-172.
- [6] SEO S H,WANG L,SMITH R,et al.The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection[J].Virology,1997,71(10):7889-7894.
- [7] 韩岳,王希良.DNA 疫苗的免疫机制及其优化策略[J].医学分子生物学杂志,2005,2(2):143-146.
- [8] LECLERC C.New approaches in vaccine development[J].Comp Immunol Microbiol Infect Dis,2003,26(5/6):329-341.
- [9] 李新生,闫若潜,陈红英,等.禽类 DNA 疫苗研究进展[J].动物医学进展,2005,26(7):22-26.
- [10] WHITTON J L,RODRIGUEZ F,ZHANG J,et al.DNA immunization mechanistic studies[J].Vaccine,1999(17):612-619.
- [11] 彭国平,李筱筱,陈智.DNA 疫苗及其在病毒性传染病中的应用[J].国外医学流行病学传染病学分册,2005,32(2):93-102.
- [12] 摆茹.DNA 疫苗免疫原性的研究策略[J].免疫学杂志,2005,21(3):28-30.
- [13] 范书才.兽用基因工程制品的安全性问题[J].中国兽药杂志,2000,34(6):39-42.
- [14] 姜永厚,陈奖励,宋秀龙,等.鸡新城疫病毒 F 基因和鸡 IL-2 重组 DNA 疫苗的构建[J].中国预防兽医学报,2001,23(2):81-83.
- [15] 姜永厚,刘忠贵,陈奖励,等.鸡 IL-2 在新城疫病毒 F 基因疫苗免疫中的作用[J].中国兽医学报,2002,22(1):22-24.
- [16] 于涟,李建荣,黄耀伟,等.鸡白介素 2(IL-2)增强传染性法氏囊病毒多聚蛋白 DNA 疫苗免疫原性的研究[J].生物工程学报,2001(6):652-658.
- [17] 周世力.DNA 疫苗的研究进展[J].江汉大学学报:自然版,2002,19(2):80-84.
- [18] BARRY M A,HOWELL D P,ANDERSSON H A,et al.Expression library immunization to discover and improve vaccine antigens[J].Immunol Rev,2004(199):69-63.
- [19] 孙树汉.核酸疫苗及其在疾病免疫防治中的应用[J].第二军医大学学报,2001,21(6):28-30.

(上接第 2248 页)

- [27] 孙安慈,任玲,王伏雄,等.建兰根状茎增殖条件的研究[J].植物学报,1989,5(3):147-150.
- [28] 傅向东,钱秀红,毛碧增,等.几种理化因子对建兰原球茎生长的影响[J].浙江农业大学学报,1997,23(5):547-550.
- [29] 毛碧增,林蔚红,钱秀红,等.影响建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.

- [30] 吕永杰,李仕贵,周晓禾,等.观赏兰科植物组培快繁及遗传转化的研究进展[J].中国生物工程杂志,2003,23(10):42-46.
- [31] 陈汝民,罗虹,叶庆生,等.La³⁺对墨兰根状茎生长的调节作用[J].植物学报,1997,39(5):483-485.
- [32] 傅雪琳,张志胜,何平,等.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.
- [33] 石戈,吴婷婷.高压静电场对舟山春兰愈伤组织生长的影响[J].浙江海洋学院学报:自然科学版,2006,25(1):89-92.