

文章编号:0439-8114(2006)01-0122-03

兰花组织培养研究进展

安运华

(长江大学园艺园林学院,湖北 荆州 434025)

摘要:对兰花的组织培养进行了综述。着重阐述了兰花组织培养中组织培养程序、外植体的选择、培养基与激素的选择、培养方式和培养条件的研究进展情况。

关键词:兰花;组织培养;外植体;培养基

中图分类号:S682.31;S813.1² **文献标识码:**A

兰科(*Orchidaceae*)是有花植物中最大的一个科,约有 800 属,25 000~30 000 种,广泛分布于全球各地。兰花是整个兰科植物的总称,常见的有春兰、蕙兰、建兰、蝴蝶兰、石斛、卡特兰、文心等,其花具有极高的欣赏价值和经济价值。有些种类如天麻等则具有极高的药用价值。兰花的组织培养始于 20 世纪 60 年代。Morel^[1]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原球茎,并分化出根和叶,首次获得兰花无病毒小植株。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。

1 组织培养程序与外植体选择

蝴蝶兰再生体系的研究,近年来报道较多。蝴蝶兰组织培养程序一般为:外植体(茎尖、叶片、花梗)-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。

用于兰花离体繁殖的外植体材料很多,通常选择有新芽、幼叶、茎尖等。茎尖是最早用于兰花快速繁殖的外植体。大花蕙兰(*Cymbidium*)、嘉德丽亚兰

收稿日期:2005-10-28

作者简介:安运华(1967-),男,湖北京山人,讲师,主要从事园林植物和观赏园艺教学和研究工作,(电话)0716-8081260
(电子信箱)xwhzmhy@163.com。

参考文献:

- [1] 何国庆,尹源明,葛红娟,等. 早籼米酒精发酵的液化条件初探[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 375-377.
- [2] 李 祥,吕嘉桢,李小奎. 生料酿酒工艺技术研究[J]. 酿酒科技, 2002(6): 42-44.
- [3] 天津轻工业学院,华南工学院. 工业发酵分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1986.
- [4] 汪江波,薛海燕,邹玉玲,等. 早籼稻谷生料发酵生产酒精的工艺研究[J]. 酿酒科技, 2005(4): 58-60.
- [5] 张凤英,汤凯洁,王伯华,等. 免蒸煮大米酒精发酵特性的研究[J]. 酿酒科技, 2003(4): 35-37.

Study on Early-season *Indica* Rice to Produce Fueling Ethanol by Uncooked Material Fermental Technic

ZHANG Hua-shan, YU Xiang-hua, LI Ya-fang

(School of Technology Biotechnology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: A primary comparative research in technic aspect had been studied by using new fusant (KS-5) and *S. cereusiae* K to produce fueling ethanol by fermenting early *indica* rice directly on 10L fermenter. The result proved that it was an effective way to transform alcohol from early *indica* rice, the final ethanol concentration on fermental liquid could get to 7.0 and the cycle was 7 days. Constructing a brand-new plant which could directly use starch to make alcohol effectively would be the main research object in uncooked material fermentation industry.

Key words: early-season *indica* rice; uncooked material fermentation; fueling ethanol; fermental technic

(责任编辑 郑 威)

(*Cattleya*)、石斛兰 (*Dendrobium*)、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*)、文心兰 (*Oncidium*) 等首先在茎尖培养中取得成功^[2]。侧芽的应用也很广泛,一般认为带 1~2 个叶原基的茎原锥成活率高,中间部位侧芽成活率及生长率较高^[3]。但因为有的兰花只生一茎,摘取茎尖就有可能丧失母株,因此,人们在更大范围内寻找外植体。用叶片作外植体可以减轻或避免对母株的伤害。大多数以叶片为外植体的成功报道是取试管苗的幼叶为培养材料,从成熟植株上取幼叶为外植体培养成功的报道不多。有研究指出:蝴蝶兰试管苗幼叶原球茎发生率可达 90%,而成熟叶对诱导反应极弱^[4]。这可能是由于成熟植物组织向培养基中释放高浓度的抑制生长物质,严重影响兰花组织的存活^[5]。现已报道的蝴蝶兰外植体材料各异,不同的外植体其诱导的效率也不同(表 1)。

表 1 不同外植体原球茎的诱导效率

外植体	最高诱导率/%	特点(见参考文献)
子	100	产生性状分离,可用于育种 ^[6]
胚	80	产生性状分离,可用于育种 ^[7]
花梗节间	88	保持母株性状,取材受时间限制 ^[8]
花梗腋芽	94	保持母株性状,取材受时间限制 ^[9]
叶片(未切割)	90	保持母株性状,对母株伤害不大 ^[4]
叶片(切割)	61	保持母株性状,对母株伤害不大 ^[10]
根尖	75	保持母株性状,对母株无影响 ^[11]
茎尖	100	保持母株性状,损伤母株 ^[12]

2 培养基与激素

用于兰花组织培养的培养基种类繁多,常用培养基有:KC、MS、VW、BM 及改良型。周俊辉^[13]等在对蝴蝶兰的研究中表明:改良 KC 对原球茎的增殖效果最好,其次为 1/3MS,原球茎增殖应以较低的无机盐浓度为好;并且在培养中,添加一定浓度(2~3 g·L⁻¹) 活性炭时,对原球茎的增殖有促进作用。何松林^[14]指出:蝴蝶兰在生根过程中对矿物质盐的需求量较小,而在长苗过程中则对微量元素和有机成分的需求量稍高一些。

目前常使用的外源激素主要是生长素类(如 IAA、2,4-D 和 NAA)和细胞分裂素类(如 BA、ZT 和 KT)。一种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^[15];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^[16,18];生根诱导时只需生长素即可^[19,20]。Seeni 等^[21]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。何子育等则认为在增殖生根与壮苗阶段不需加任何激素^[22]。

组织培养中常用的有机添加物如椰子汁、香蕉和马铃薯等是一类含有氨基酸、激素和酶等有机成分较为复杂的天然复合物^[23]。多数研究证明,它们对细胞和组织的增殖与分化有明显的促进作用^[24]。在对蝴蝶兰的叶片诱导原球茎的研究中发现:添加 18% 的椰子汁时,每个外植体叶块上产生的原球茎颗粒既多又健壮^[10]。Mao 等^[25]研究了建兰原球茎的增殖和分化的影响因素,发现在液体培养基中添加活性炭、苹果汁、香蕉汁和椰子汁进行悬浮培养,建兰原球茎的生长和发育状态可达到最佳。

蔗糖作为培养基的能源物质和渗透调节剂,对原球茎的生长影响较大,不同浓度对兰花组培的作用不同。2% 的蔗糖有利于兰属原球茎的生长^[26];2%~3% 的蔗糖促进芽的形成,而根的分化和生长则以 5% 蔗糖最适合^[27]。活性炭可减少污染,抑制离子的吸收和防止褐变,从而利于根系的形成;多效唑对蝴蝶兰的生根和壮苗也有明显促进作用^[28]。pH 值影响细胞的透性、代谢和培养物生长、分化。从一些试验资料来看,原球茎在 pH 值 5.0~5.4 的环境中生长最好,过酸或近中性的环境都不适合^[29]。

3 培养方式

兰花的培养方式包括固体培养、半固体培养和液体培养 3 种。固液相培养基对不同种属兰花的效果不同。陈振光^[30]对蕙兰属的研究中发现,应先将外植体接种在固体培养基上,诱导原球茎的形成,然后在液体培养基中震荡培养,可快速繁殖原球茎。毛碧增等^[31]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。杨玉珍^[32]等在对大花蕙兰的研究中发现,半固体培养基(减少琼脂用量)最佳,原球茎增殖最大,色泽深绿,健壮。吕永杰^[33]等认为,在兰花的整个生产过程中,可以采用 3 种培养方式相结合的方法,即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,增加繁殖系数,降低污染,减少成本,利于大规模生产。

4 培养条件

对蝴蝶兰的快繁中研究发现,在蝴蝶兰的组培过程中,不同光照时间对愈伤组织的形成所需的时间、数量、原球茎的大小、愈伤组织的颜色都有很大的影响。连续 24 h 光照,可以在短期内得到大量的直径较大的原球茎状体^[34]。在蝴蝶兰叶片诱导培养中,光照为其他培养基反射过来的弱散射光,光照时间为每天 12 h^[4]。适当剂量的紫外光照射对兰花原球茎的增殖与分化有促进作用,过高剂量的紫外光照射则抑制原球茎的增殖与分化^[35]。在蝴蝶兰的

组培过程中,温度过低,形成原球茎状体所需时间较长,生长较慢;温度较高,容易造成污染且易褐变,所以选择合适的培养温度是必须的。通过研究认为,对蝴蝶兰试管苗的培养温度为 25℃^[34]。随着兰花产业的发展,利用组培技术繁殖培养兰花将越来越普遍。相信兰花的组培技术研究发展空间非常大,前景广阔。

参考文献:

- [1] MOREL G. Producing Virus-free Cymbidiums[J]. Am Orchid Soc Bull. 1960(29):495-497.
- [2] 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.
- [3] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社, 1991. 237-247.
- [4] 张秀清,王志武,王春英,等. 蝴蝶兰实生苗原球茎诱导研究[J]. 莱阳农学院学报, 1995, 12(1):44-46.
- [5] COMPTON M E, PREECE J E. Exudation and Explant Establishmen [J]. Intl Assoc Plant Tissue Culture News, 1986 (50):9-18.
- [6] 杨美纯,周歧伟,许鸿源,等. 蝴蝶兰的种子培养[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(4):258-260.
- [7] 曾宋君,彭晓明,张京丽,等. 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 武汉植物学研究, 2000, 18(4):344-346.
- [8] 鲁雪华,郭文杰,徐立晖,等. 蝴蝶兰花梗节间段培养繁殖的初步研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(5):491-492.
- [9] 胡海英,王建宇. 蝴蝶兰的离体培养与快繁技术研究[J]. 宁夏大学学报, 2002, 23(4):367-369.
- [10] 杨美纯,周歧伟,许鸿源,等. 外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎状体发生的影响[J]. 广西植物, 2000, 20(1):42-46.
- [11] 张秀清,王志武,王春英,等. 蝴蝶兰实生苗不同器官的离体培养[J]. 植物学通报, 1996, 13(1):50.
- [12] 秦 凡,周吉源. 蝴蝶兰的组织培养研究[J]. 生物学杂志, 2000, 20(3):19-21.
- [13] 周俊辉,叶超红,陈旭高. 蝴蝶兰原球茎增殖培养的研究[J]. 仲凯农业技术学院学报, 2002, 15(3):13-17.
- [14] 何松林,王 献,鲁 琳,等. 培养基和添加物对蝴蝶兰原球茎分化幼苗的影响[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(5):11-13.
- [15] 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.
- [16] 彭立新,王 姝,孟广云. 蝴蝶兰组织培养快繁研究[J]. 天津农业科学, 1999, 5(2):27-29.
- [17] 叶晓青,谢 东,魏 书,等. 不同激素水平对蝴蝶兰原球茎状体增殖的影响[J]. 江苏林业科技, 2000, 27(增刊):42-44.
- [18] 王 芳,文 峰,武 斌,等. 激素对蝴蝶兰快速繁殖的影响[J]. 新疆农业大学报, 2003, 26 (4):68-71.
- [19] 王 熊. 兰花快速无性繁殖的研究及花芽分化的探讨[J]. 植物生理学报. 1984, 10 (4):391-396.
- [20] 吴汉珠,王续衍,林泰碧. 中国兰茎顶组织培养研究[J]. 园艺学报, 1987, 14(3):203-207.
- [21] SEENI S, LATHA P G. Foliar Regeneration of the Endangered Red Vanda, Renanthera imschottiana Rolfe [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1992(29):167-172.
- [22] 何子育,黄勇芳,屈秀兰,等. 蝴蝶兰的组织培养[J]. 热带作物科技. 1999(5):26-27.
- [23] 何松林,孔德政,杨秋生,等. 炭源和有机添加物对文心兰原球茎增殖的影响[J]. 河南农业大学学报, 2003, 37(2):154-157.
- [24] SAGAWA Y, KUNISAKI J T. Clonal Propagation of Orchid by Tissue Culture[J]. Tokyo, 1992:683-684.
- [25] MAO B Z, LIN W H, QIAN X H, et al. Effects of Some Factors on the Growth and Differentiation of Cymbidium ensifolium Protocorm [J]. Journal of Zhejiang Agricultural University. 1997, 23(5):547-550.
- [26] KUSUMOTO M. Effects of Coconut Milk, Agar, and Sucrose Concentrations, and Media pH on the Proliferation of Cymbidium Protocorm-like Bodies Cultured in Vitro [M]. J. Japan Soc. Hort. Sci. 1980, 48(4):503-509.
- [27] PAEK K Y, CHUN C K. Physiological Characteristics of Cymbidium Protocorm Cultured in Vito. III Effects of Temperature, Sucrose Concentration and Physical Condition of Medium on Organogenesis of Protocorm [J]. Plant Culture, 1983, 10(1):35-44.
- [28] 秦贺兰,孙红梅. 蝴蝶兰研究进展[J]. 河南职业技术学院学报, 2002, 30(2):31-35.
- [29] 陈 丽,潘瑞炽,陈汝民. 墨兰原球茎生长研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1997, 7(1):59-64.
- [30] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 北京:中国农业出版社. 1996. 182-187.
- [31] 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.
- [32] 杨玉珍,孙天洲,孙 延,等. 大花蕙兰的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.
- [33] 吕永杰,李仕贵,周晓禾. 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.
- [34] 李向英,尹同萍,牛蕴华,等. 蝴蝶兰的快速繁殖及栽培管理研究[J]. 山东农业科学, 2000(4):13-14.
- [35] 徐卫辉,邓国础. 紫外光照射对兰花原球茎增殖、分化和超微结构的影响[J]. 激光生物学. 1995, 4(3):700-703.

Progress on Tissue Culture of Orchid

AN Yun-hua

(College of Gardening and Horticulture, Yangtze University Jingzhou, 434025 Hubei, China)

Abstract: The development of study on tissue culture of orchid is summarized. The program of issue culture, the choice of explant and medium, the ways and condition of culture are introduced.

Key words: orchid; tissue culture; explant; medium

(责任编辑 吕炎新)