

蝴蝶兰组织培养与基因工程育种研究进展

王云惠^{1,2}, 陈雄庭^{1*} (1. 中国热带农业科学研究院生物技术研究所, 海南海口 571102; 2. 海南职业技术学院, 海南海口 570216)

摘要 综述了利用种子、花梗芽作为外植体通过愈伤组织、体细胞胚、PLB、原生质体途径再生植株技术以及基因枪和农杆菌介导的遗传转化体系建立的研究成果。

关键词 蝴蝶兰; 组织培养; 基因工程育种

中图分类号 S682.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)16-04827-04

Research Achievements of Tissue Culture and Gene Engineering Breeding in *Phalaenopsis* spp.

WANG Yun-hui et al (Institute of Tropical Biological Sciences, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571102)

Abstract This paper reviews achievements of plant regeneration from flower stalk buds and seed of *Phalaenopsis* through callus, somatic embryogenesis, protocorm-like bodies (PLB), protoplasts and genetic transformation by particle bombardment and Agrobacterium-mediated were establishment.

Key words *Phalaenopsis* spp.; Tissue culture; Gene engineering breeding

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 又称蝶兰, 为兰科蝴蝶兰属花卉, 其花形酷似蝴蝶, 花色丰富艳丽, 花期持久, 在国内外花卉市场深受欢迎, 被誉为“兰花皇后”, 是兰科植物中栽培最广泛、最普及的种类之一, 具有较高的观赏价值和经济价值。近年来蝴蝶兰的国内外市场需求持续上升, 世界各国在进行大规模商品化生产的同时, 对蝴蝶兰的快速繁殖和新品种选育技术进行了广泛、深入的研究, 取得了重要进展。笔者结合多年研究实践, 对近年来国内外在蝴蝶兰组织培养和基因工程育种方面的研究进展进行综述, 旨在为蝴蝶兰的深入研究提供参考。

1 蝴蝶兰组织培养研究

组织培养技术是进行蝴蝶兰大规模商品生产和新品种选育的关键。从 1949 年 Potor 利用无菌培养技术成功地诱导蝴蝶兰花梗休眠芽发育成完整植株以来^[1], 经过多年研究改良, 到 1974 年 Intuwong 等利用蝴蝶兰茎尖作为外植体诱导类圆球茎、再生植株, 为实现蝴蝶兰工厂化生产奠定了基础^[2]。截止 2006 年底, 已报道的蝴蝶兰再生途径包括源于种子的原球茎愈伤组织再生途径^[3]、原球茎体细胞胚再生途径^[4]、叶片体细胞胚再生途径^[5]和源于花梗腋芽和花梗休眠芽茎尖 PLB 再生途径^[6-7]、茎尖胚性愈伤组织再生途径^[8]、茎尖愈伤组织原球茎再生途径^[9]、茎尖愈伤组织原球茎再生途径^[10]、叶片 PLB 愈伤组织再生途径^[11]、叶片 PLB 再生途径^[12]、叶片体细胞胚再生途径^[13]、芽生芽再生途径^[14]、愈伤组织原生质体再生途径^[15]。源于花梗休眠芽或花梗腋芽外植体的芽生芽途径获得的后代不但植株变异很少, 性状比较整齐, 而且成苗速度也较其他方式快, 是目前商品化种苗生产中主要采用的繁殖途径。

1.1 外植体的种类 由于蝴蝶兰是单轴气生花卉, 分株繁殖率较低。为满足蝴蝶兰消费市场不断扩大的需要, 近年来国内有大量关于蝴蝶兰组织培养方面的报道, 所用外植体包括种子^[16-18]、根段^[19]、花梗苗根尖^[20]、花梗腋芽^[21]、茎尖^[22]、叶片^[23-25]、胚^[26]、花萼节间^[27]、花梗节或花梗节间切段^[28]; 国外近期关于蝴蝶兰组织培养方面的研究报道, 主要集中在源于种子^[3-5]、花梗休眠芽和花梗腋芽^[6-15]的植株再

生等方面。

1.2 源于种子的再生体系 蝴蝶兰种子无菌培养技术是蝴蝶兰杂交育种的关键步骤, 日本、韩国和台湾糖业研究所对此进行了多年研究, 技术比较成熟。

1.2.1 原球茎愈伤组织再生途径。2000 年, Chen Y C 等用蝴蝶兰 *Nebula* 自花授粉 120 d 的种子作为外植体, 采用 1/4 MS^[29] 无机盐 + 1.0 g/L 蛋白胍 + 2.0 g/L AC + 50.0 g/L 香蕉泥 + 100.0 mg/L 肌醇 + 20.0 mg/L 蔗糖 + 3.0 g/L Gelrite (pH 值 = 5.2) 为诱导培养基, 在 10 μmol/(m²·s)、光/暗为 16 h/8 h、25 °C 的条件下培养约 1 个月形成原球茎。试验表明, 适宜增殖的材料是培养 2 个月的原球茎, 适宜的培养基是 1/2 MS (MS 培养基中大量元素和微量元素减半) + 100 mg/L 肌醇 + 0.5 mg/L 烟酸 + 0.5 mg/L VB₆ + 0.1 mg/L VB₁ + 2.0 mg/L glycine + 1.0 g/L 蛋白胍 + 170 mg/L NaH₂PO₄ + 20.0 g/L 蔗糖 + 2.2 mg/L Gelrite + 1.0 mg/L TDZ (pH 值 = 5.2), 在该培养基上暗培养 2 个月, 可诱导出大量的愈伤组织; 而在 28 ~ 36 μmol/(m²·s)、光/暗为 16 h/8 h、(26 ± 2) °C 的条件下培养, 则增殖出大量 PLB。要长期保持愈伤组织不分化, 适宜的培养基配方是 1/2 MS + 0.5 mg/L TDZ + 0.5 mg/L 2,4-D (pH 值 = 5.2), 每月转接 1 次, 可以较长时间 (12 个月以上) 保持不分化; 将愈伤组织转接到不添加激素的诱导培养基中培养, 就可再生形成植株。试验发现, 光照条件不同, 诱导产物不同; 在愈伤组织诱导培养基中添加 TDZ 比 BA 更有效^[3]。

1.2.2 原球茎体细胞胚再生途径。2004 年 Chen J T 等用蝴蝶兰 *amabilis* 自花授粉后 3 个月的种子作为外植体, 采用 1/2 改良 MS (MS 培养基中大量元素和微量元素减半) + 100 mg/L 肌醇 + 0.5 mg/L 烟酸 + 0.5 mg/L VB₆ + 0.1 mg/L VB₁ + 2.0 mg/L glycine + 1.0 g/L 蛋白胍 + 170 mg/L NaH₂PO₄ + 20.0 g/L 蔗糖 + 2.2 mg/L Gelrite (pH 值 = 5.2) 培养基, 在 28 ~ 36 μmol/(m²·s)、(26 ± 1) °C、光/暗为 16 h/8 h 的条件下诱导原球茎, 培养时间约为 45 d; 在上述培养基中添加 3.0 mg/L TDZ 对晶胚的诱导最有效, 经过 50 ~ 60 d 的培养, 可诱导出大量的晶胚; 将晶胚/原球茎转入不含激素的上述培养基中培养, 4 ~ 6 周后可形成带有 5 ~ 6 片叶、3 ~ 4 条根的小苗^[4]。在培养基中添加 NAA 对晶胚的形成有抑制作用^[4]。

笔者近期用杂种蝴蝶兰 (图 1) 自花授粉后培养 120 d 的种子 (图 2) 作为外植体, 用 MS + 0.5 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA

作者简介 王云惠 (1968 -), 女, 云南昭通人, 在读硕士, 副教授, 从事园艺作物遗传育种和栽培技术研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-08

+1.0 g/L AC+20.0 g/L 蔗糖+5.8 g/L 琼脂(pH 值=5.8)的培养基,在 $10 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光/暗为12 h/12 h、 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的条件下培养1个月,获得肉眼可见的PLB(图3);将PLB转移到 $1/3 \text{ MS} + 3.0 \text{ mg/L BA} + 0.3 \text{ mg/L NAA} + 1.0 \text{ g/L AC} + 15\% \text{ CW} + 30.0 \text{ g/L 蔗糖} + 5.8 \text{ g/L 琼脂}$ (pH 值=5.8)的培养基上,在 $28 \sim 36 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光/暗为16 h/8 h、 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下继续培养2周,可观察PLB迅速分化形成小苗(图4);试验还发现,光照强度不但影响外植体的诱导产物,也与生长速度密切相关。

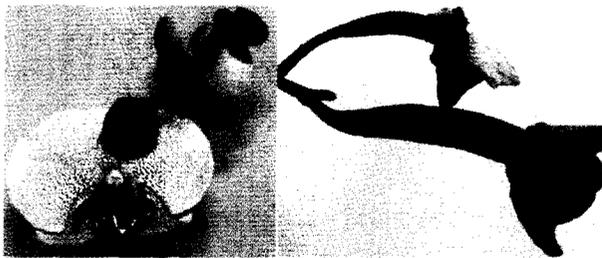


图1 白花紫斑蝴蝶兰杂种

图2 蝴蝶兰杂种果夹

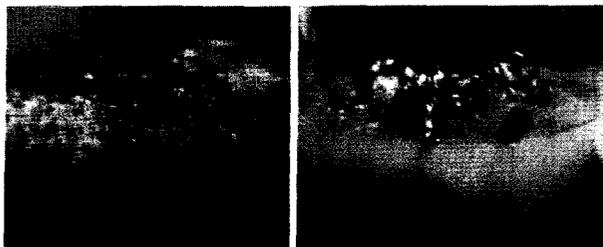


图3 种子培养1个月后的发育情况 图4 PLB转移到培养基上1个月

1.2.3 叶片体细胞胚再生途径。2006年,Chen等用蝴蝶兰*amabilis*自花授粉3个月后的种子为外植体,用 $1/2$ 改良MS+100 mg/L肌醇+0.5 mg/L烟酸+0.5 mg/L VB₆+0.1 mg/L VB₁+2.0 mg/L glycine+1.0 g/L蛋白胍+170 mg/L NaH₂PO₄+20.0 g/L蔗糖+2.2 g/L Gelrite(pH 值=5.2)培养基诱导小苗,在 $28 \sim 36 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光/暗为16 h/8 h的条件下经过180 d的培养(2个月转接1次),获得带有3~5片叶、2~4条根的小苗;切取叶片为外植体,研究TDZ和NAA 2种不同的激素对叶片诱导体细胞胚的影响,结果表明用1 cm长的叶片作为外植体,直接诱导体细胞胚最有效的激素是3.0 mg/L的TDZ^[5]。

1.3 源于花梗的再生体系 用花梗腋芽和花梗休眠芽作为外植体经过芽生芽途径再生植株是国内外应用最广泛的蝴蝶兰商品苗生产途径。用同样的外植体经过茎尖PLB、茎尖胚性愈伤组织、茎尖愈伤组织原球茎、叶片PLB愈伤组织、叶片PLB、叶片体细胞胚、愈伤组织原生质体等途径再生植株则是实现蝴蝶兰细胞育种、分子育种的基础。

1.3.1 茎尖PLB再生途径。1993年Ken T等用8个不同蝴蝶兰品种的花梗芽诱导的带有1~2片叶的茎尖作为外植体,比较了 $1/2 \text{ MS}$ 和NDM 2种基本培养基对茎尖诱导PLB的影响,发现NDM基本培养基+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L BA+20 g/L蔗糖+8.0 g/L琼脂粉(pH 值=5.4)比 $1/2 \text{ MS}$ 培养基效果更佳,在 $33 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光/暗为14 h/10 h的条件下培养1年(半年后每个月转接1次),可从1条花梗上的几个芽扩增至10 000多个PLB。相同条件下,

将PLB转接到不含激素的上述培养基上就可分化出植株^[6]。对植株的细胞学检测发现,该方法的变异率小于6%。

1995年Chen Y Q等用杂种蝴蝶兰花梗腋芽作为外植体,经芽生芽或茎尖PLB途径再生植株^[7]。试验发现,在培养基中添加TDZ的诱导效果明显好于BA,最适宜的TDZ浓度是2.3 mg/L;用VW基本培养基^[30]+15%CW+2.3 mg/L TDZ+10.0 g/L蔗糖+7.0 g/L琼脂粉(pH 值=5.3)诱导花梗芽萌发,在 $12 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光/暗为12 h/12 h条件下培养2个月,可得到带有2片叶以上的小植株;将再生植株花梗切离,转接到不加激素的同样培养基中,7周后可得到带根苗^[7]。

1.3.2 茎尖胚性愈伤组织再生途径。2001年Ken T等用9个不同表现型的蝴蝶兰花梗芽诱导的茎尖为材料,发现NDM^[6]+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L BA+10.0 g/L蔗糖+2.0 g/L gellan gum (pH 值=5.4)培养基,在 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $33 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光/暗为14 h/8 h条件下诱导胚性愈伤组织效果最好;用NDM+0.7 mg/L NAA+20.0 g/L蔗糖的液体培养基以80 r/min在往返式振荡培养箱中悬浮振荡培养3个月,可实现愈伤组织大量增殖;将培养基中的蔗糖浓度减少到10.0 g/L,在 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $35 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光/暗为14 h/8 h条件下继续培养,愈伤组织可经过PLB途径分化成小苗。对此途径再生的植株进行细胞学检测表明,植株变异率低于10%。试验表明,培养基中的蔗糖浓度直接影响诱导结果,当蔗糖浓度为10.0 g/L时,诱导产物为PLB;当蔗糖的浓度增至20.0 g/L时,诱导产物为愈伤组织^[8],与Ishii Y等^[10]所得结果一致。

1.3.3 茎尖愈伤组织原球茎再生途径。2003年Ken T等用蝴蝶兰花梗芽诱导的茎尖作为外植体通过细胞悬浮培养诱导愈伤组织形成原球茎再生植株,比较了在NDM基本培养基中添加葡萄糖、麦芽糖、果糖、蔗糖、山梨醇、乳糖等6种不同碳源对体胚诱导的影响。结果发现,10.5 g/L的葡萄糖浓度对诱导PLB的形成效果最佳;20.0 g/L的蔗糖诱导愈伤组织增殖的能力与葡萄糖相同,但不能诱导PLB的形成;添加适量的干酵母可促进愈伤组织的增殖、抑制PLB的形成;低浓度的BA(0.09 mg/L)对愈伤组织的增殖有微小的促进作用,但抑制PLB的形成。Ken T等用NDM+0.09 mg/L NAA+1.0 mg/L BA+10.0 g/L蔗糖+2.0 g/L gellan gum (pH 值=5.3)的培养基在 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $33 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光/暗为14 h/10 h的条件下诱导花梗芽出苗。用幼苗茎尖作外植体,将培养基中蔗糖的浓度增加到20.0 g/L诱导愈伤组织,3个月后将形成的愈伤组织接种到液体培养基中增殖,相同条件下以80 r/min的速度振荡培养,结果表明NDM+0.09 mg/L NAA+1.0 mg/L BA+10.5 g/L葡萄糖+(0.1~1.0) g/L干酵母培养基具有最高的PLB增殖率,20.0 g/L的蔗糖具有最高的愈伤组织增殖率^[9]。

1.3.4 叶片PLB愈伤组织再生途径。1998年Ishii Y等用蝴蝶兰'Santa Cruz'的花梗芽诱导的2 cm长的叶片作为外植体再生植株,试验表明,用叶片诱导PLB到愈伤组织比用叶片直接诱导愈伤组织容易,仅需在VW培养基中添加40.0 g/L的蔗糖和200 ml/L的椰子水就可取得很好的诱导效果(与添

加 BA 和 2,4-D 的培养基相比)。试验还发现,用 gellan gum 作为凝固剂诱导愈伤组织比用琼脂粉更好;保持愈伤组织不分化要用 VW + 40 g/L 蔗糖 + 200 ml/L CW + 0.1 mg/L 2,4-D + 0.01 mg/L BA + 2.0 g/L gellan gum (pH 值 = 5.3) 培养基,愈伤组织在不添加糖的培养基上,于 28 ~ 36 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、光/暗为 16 h/8 h 的培养条件下可分化 PLB,将 PLB 接种到生长培养基上就可分化成完整植株。对所得的再生植株进行细胞学检测和形态观察,未发现染色体和形态变异^[10]。

1.3.5 叶片 PLB 再生途径。2000 年 Park S Y 等用生物反应器系统再生植株,实现了蝴蝶兰的大规模增殖。用带条纹的粉红色蝴蝶兰杂种花梗芽(2 cm 长)作为外植体,用添加 3.0 mg/L BA 和 45 g/L 蔗糖的 MS 固体培养基诱导花梗芽萌发,待新芽长出叶片后切成 5 mm \times 10 mm 的小块,用 MS + 45.0 g/L 蔗糖 + 15.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA + 7.0 g/L 琼脂粉 (pH 值 = 5.7) 培养基诱导 PLB。8 周后,将长出的 PLB 横切,按 0.5 g/瓶的标准接种到装有 100 ml 液体培养基的长颈瓶(250 ml)中,培养基的成分为改良花宝培养基^[31](6.5 N-4.5P-19 K 1 g/L + 20 N-20 P-20 K 1 g/L) + 1% 土豆泥 + 活性炭 0.5% (pH 值 = 5.7),在 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 的培养条件下,于水平振荡仪上按 100 r/min 振荡培养 8 周,得到大量 PLB。试验比较了 MS、KC^[32]、VW、LM^[33]、改良花宝等 5 种不同培养基的 PLB 增殖效率,发现改良花宝培养基是最适宜类原球茎生长的液体培养基^[11]。

2002 年 Park S Y 等用花梗芽诱导的叶片作为外植体再生植株,选择蝴蝶兰杂种“Taisuco Hatarot”(粉红花品种)、“Annie”(白花品种)、“Golden star”(黄花品种)、“Annie”(白花紫斑品种)带有 2~4 个芽的花梗作为外植体(切成 2 cm 长带 1 个芽的段),用 MS + 4.6 mg/L BA + 45 g/L 蔗糖 + 7.0 g/L 琼脂粉 (pH 值 = 5.7) 的培养基诱导花梗芽萌发,将花梗芽诱导出的叶片作为外植体,用 1/2 MS + 20.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA + 30.0 g/L 蔗糖 + 7.0 g/L 琼脂粉 (pH 值 = 5.7) 培养基,在 (25 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、10 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光/暗为 16 h/8 h 条件下诱导 PLB,经过 12 周的培养,形成大量的 PLB,将这些 PLB 转入改良花宝培养基 + 2.0 g/L 蛋白胨 + 3% 土豆泥 + 0.05% AC + 30.0 g/L 蔗糖 (pH = 5.2) 中进行纸桥培养,8 周后,实现大量增殖。PLB 转接到改良花宝固体培养基上培养 6 周,可分化形成小苗。试验比较了 1/2 MS、VW、KC、LM 4 种不同基本培养基诱导叶片分化 PLB 的效果,结果显示 1/2 MS 是最适宜的基本培养基^[12]。

1.3.6 叶片体细胞胚再生途径。2005 年 Kuo H L 等用蝴蝶兰“LITTLE STEVE”的花梗芽诱导的无菌叶片(1 cm \times 1 cm)为外植体再生植株,用 1/2 改良 MS 培养基为基本培养基,比较在培养基中添加 2,4-D、Kt、BA、TDZ 4 种不同激素的效果,发现 TDZ 对叶片诱导体细胞胚的发生最有效;1/2 改良 MS + 1.0 mg/L TDZ + 20.0 g/L 蔗糖 + 2.2 g/L Gelrite (pH 值 = 5.2) 是诱导叶片产生体细胞胚最适宜的培养基;叶片正面朝上接种到培养基上暗培养 2 个月,可在叶片近轴端和伤口区域产生大量体细胞胚,将其转移到 28 ~ 36 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、(26 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光/暗为 16 h/8 h 的条件下继续培养 45 d,体细胞胚变绿并形成芽;再转移到不含 TDZ 的 1/2 MS 改良培养基上继续

培养约 2 个月,形成带 3~4 片叶和几条根的小苗。仅用 4.5~5 个月的时间,就从叶片经过体胚途径实现了植株再生。在适宜的培养条件下,一块外植体(1 cm \times 1 cm)最多可长出 15 株小苗^[13]。

1.3.7 芽生芽再生途径。2004 年 Polonca KOŠIR 等用花梗休眠芽作为外植体诱导丛生芽再生植株(芽生芽)。他们认为,除激素外,基本培养基中的大量元素和微量元素也是影响再生速度的关键因子。他们用 8 个不同品种的蝴蝶兰杂种作为试验材料,比较了 5 种不同培养基对花梗节休眠芽诱导丛生芽再生植株的效果,发现最有效的外植体诱导培养基为 P 6793 (Sigma 商用培养基) + 20 g/L 蔗糖 + 2.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA + 2.6 g/L gellan gum (pH 值 = 5.2),在 34 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、(24 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光/暗为 16 h/8 h 条件下培养,仅需 2 个月就可诱导形成大量丛生芽;丛生芽壮苗生根最适宜的培养基是 B₅ 培养基,在 B₅ 培养基上整个再生过程仅需 4 个月^[14]。芽生芽再生途径是目前所有报道中再生速率最快的方法,是一条快速而高效的蝴蝶兰种苗商品生产途径。

1.3.8 愈伤组织原生质体再生途径。2007 年 Shrestha B R 等用愈伤组织原生质体途径再生植株。试验用蝴蝶兰“Wataboushi”花梗芽诱导植株茎尖为外植体,用 Ken T 等报道的方法诱导愈伤组织,用原生质体经过愈伤组织诱导产生 PLB 再生植株。对成苗进行细胞学检测,未发现后代变异。试验表明,山梨醇是经原生质体途径再生植株中最适宜的碳源,不同的凝固剂对原生质体再生也有一定影响。这一再生途径的研究成功,为蝴蝶兰育种提供了新途径^[15]。

1.4 其他相关研究 1998 年 Chen W H 等报道,经 PLB 途径再生的蝴蝶兰植株,开花前在外形上完全没有差异,但到开花期可以看到部分植株出现表现型变异,用组织和染色体检测发现,仅有 1.5% 的植株出现基因型变异^[34]。Tsu H 等报道,在蝴蝶兰 PLB 增殖过程中,用 NP^[35]作为基本培养基时,用海藻糖作为碳源比用蔗糖作碳源增殖效果更好^[36]。

2 蝴蝶兰基因工程育种研究进展

市场上销售的蝴蝶兰大部分是用杂交育种方法培育而成。但常规杂交育种存在育种周期长、受亲缘关系局限、新品种培育速度慢、育种目标不易实现等缺点,因而基因工程育种技术应运而生。

Anzai H 等最先开始用基因枪法转化蝴蝶兰^[37]。Belamino M M 等用农杆菌 LBA4404(pTOK233)介导法将 GUS 基因导入蝴蝶兰愈伤组织,获得含有 GUS 标记基因的植株。该研究认为,在农杆菌侵染液中加入 200 μM 的乙酰丁香酮,28 $^{\circ}\text{C}$ 、30 r/min 侵染 10 h;共培养时在培养基中加入 500 μM 的乙酰丁香酮,共培养 3 d(暗培养),对提高侵染效率有明显促进作用;适宜的潮霉素筛选浓度是 50 mg/L;头孢噻肟(cefotaxime)抑菌浓度为 300 mg/L^[38]。Chai M L 等用农杆菌 LBA4404(pTOK233)介导,成功地将 GUS 基因导入蝴蝶兰 PLB,获得含有 GUS 标记基因的蝴蝶兰植株。该研究认为,将 PLB 横切成 2 份浸染 30 min,在培养基中加入 100 μM 的乙酰丁香酮共培养 2 d,延迟筛选 6 周,可以有效提高转化效率。开始筛选时潮霉素的适宜筛选浓度是 3.0 mg/L。经过 4 个筛选周期(4 个月)培养后再生的类原球茎如要继续筛选,潮

毒素的浓度应降为 $1.5 \text{ mg/L}^{[39]}$ 。Li J L 等用基因枪转化法将带有抗 CymMV 病毒基因的载体转入蝴蝶兰中, 出现转基因沉默^[40]。Mishiba K I 等用农杆菌 EHA101 (pIG121Hm) 介导, 将 GUS 基因导入蝴蝶兰原球茎中。该研究认为, 下列措施有助于提高转化效率: 用种子在液体 NDM 培养基中培养 21 d 时的原球茎做转化材料; 侵染前将蝴蝶兰原球茎转入含有 $100 \mu\text{M}$ 乙酰丁香酮的新鲜培养基中预培养 2 d, 预培养后的培养液中按 10:1 (V/V) 的比例加入 ($OD_{600}=0.6$) 农杆菌菌液, 浸染 7 h; 用 5 mg/L 的美洛培南 (meropenem) 进行抑菌, 共培养 1 周, 用 20 mg/L 的潮霉素筛选进行筛选, 筛选培养 2 个月, 恢复培养 1 个月。在含有 20 mg/L 潮霉素的培养基中, 直至分化成苗^[41]。Chan Y L 等用 UBI 启动子, 用农杆菌介导将抗 Mosaic 病毒 (CymMV) 和 *Erwinia carotovora* 的 CP 基因和 *Pfp* 基因相继转入蝴蝶兰中, 得到了具有广谱抗病性的蝴蝶兰植株^[42]。Rinaldi S 等以 CaMV35S 为启动子, 用农杆菌 EHA101 (pEKH-WT) 介导将抗病 *wasabi* 基因导入蝴蝶兰 'Wataboushi' 愈伤组织中, 获得了抗软腐病等多种细菌性病害的蝴蝶兰植株。该研究对 Belamino and Mii 所用方法进行了改进, 将浸染时间由 10 h 缩短为 2 h, 用 10 mg/L 浓度的美洛培南代替 500 mg/L 浓度的头孢噻肟抑菌, 效果更好^[43]。

3 问题与展望

我国有世界上最丰富的兰花资源和最广阔的兰花消费市场。从文献报道看, 国内在蝴蝶兰生物技术应用研究和产业化方面远滞后于欧美和其他东南亚国家与地区, 在研究的连续性、目的性、研究机构的重视程度等方面都存在较大差距, 很少拥有自主知识产权的产品。如何充分利用现有资源, 拓展研究思路, 用市场需求调控研究方向、研究成果推动产业发展, 利用基因工程育种技术, 从花色、花型、花香、抗逆性等方面开展研究, 尽快培育一批有自主知识产权的产品占据市场, 是国内蝴蝶兰乃至整个兰花产业当前面临的紧迫任务。

自 20 世纪 60 年代以来, 生物技术的应用促进了兰花组织培养技术的研究, 进而在兰花细胞工程、基因工程等生物技术的研究方面取得了重要进展, 并在全世界范围内带动了高效益、大规模的兰花产业发展。通过体细胞胚发生途径、愈伤组织途径、原生质体途径再生植株技术的成功, 农杆菌介导的各种遗传转化体系的建立和优化、基因枪转基因技术、多倍体诱变技术等生物技术的成功使用, 为蝴蝶兰利用细胞工程和生物技术育种提供了有利条件, 不同科、属、种间的种质交换成为可能, 通过体细胞融合、转基因技术、诱变育种等途径培育和改良蝴蝶兰品种, 基础工作已日趋完善, 前景十分广阔。

参考文献

- POTOR G. Method of vegetative propagation of Phalaenopsis stem cuttings[J]. Amer Orchid Soc Bull, 1949, 18: 739-742.
- INTUWONG O, SAGACUS Y. Clonal propagation of Phalaenopsis by shoot-tip culture[J]. Amer Orchid Soc Bull, 1974, 43: 893-895.
- CHEN Y C, CHANG C, CHANG W C. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of PHALAENOPSIS[J]. VITRO Cell Dev Biol Plant, 2000, 36: 420-423.
- CHEN J T, CHANG W C. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of PHALAENOPSIS AMABILIS var. formosa shimadzu[J]. Vitro Cellular & Developmental Biology, 2004, 5(6): 290-293.
- CHEN J T, CHANG W C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of PHALAENOPSIS AMABILIS[J]. Biologia Plantarum, 2006, 50(2): 169-173.
- TOKUHARA K, MII M. Micropropagation of PHALAENOPSIS and DORTAENOPSIS by shoot tips of flower stalk buds[J]. Plant Cell Rep, 1993, 13: 7-11.
- CHEN Y Q. Chitranan piluek effects of thidiazuron and N^6 -benzylaminopurine on shoot regeneration of PHALAENOPSIS[J]. Plant Growth Regul, 1995, 16: 99-101.
- TOKUHARA K, MII M. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of PHALAENOPSIS (Orchidaceae) [J]. Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2001, 37: 457-461.
- TOKUHARA K, MII M. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of PHALAENOPSIS orchids by adjusting carbohydrate sources [J]. Vitro Cellular & Developmental Biology, 2003(11/12): 635-639.
- ISHII Y, TAKAMURA T, GOI M, et al. Callus induction and somatic embryogenesis of PHALAENOPSIS[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 446-450.
- YOUNG P S, MURTHY H N, YOEU P K. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in PHALAENOPSIS[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 63: 67-72.
- PARK S Y, MURTHY H N, PAEK K Y. Rapid propagation of PHALAENOPSIS from floral stalk-derived leaves[J]. Vitro Cellular & Developmental Biology, 2002(3/4): 168-172.
- KUO H L, CHEN J T, CHANG W C. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of PHALAENOPSIS 'little steve' [J]. Vitro Cell Dev Biol Plant, 2005, 41: 453-456.
- KOŠIR P, ŠKOF S, LUTHAR Z. Direct shoot regeneration from nodes of PHALAENOPSIS orchids[J]. Acta Agriculturae Slovenica, 2004, 83: 233-242.
- SHRESTHA B R, TOKUHARA K, MII M, et al. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of Phalaenopsis[EB/OL]. (2007-01-12)[2007-02-15] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&opt=Abstract&list-uids=17219104>.
- 许鸿源, 周歧伟, 杨美纯. 蝴蝶兰的种子培养[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(4): 258-260.
- 梁宏伟, 王锋祥. 蝴蝶兰瓶播培养小试验[J]. 生物学通报, 2004, 39(10): 57.
- 张福明, 周歧伟, 许鸿源. 蝴蝶兰种子的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(4): 303.
- 李进进, 廖俊杰, 柯丽婉, 等. 蝴蝶兰根段的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2000, 35(3): 209.
- 林宗强, 黄德贵. 蝴蝶兰花梗的组织培养及快速繁殖[J]. 福建热作科技, 2001, 26(1): 4-7.
- 张元国, 刁家连, 刘玉娥, 等. 蝴蝶兰花梗腋芽组培再生技术体系的研究[J]. 山东农业科学, 2004(6): 3-5.
- 潘学峰, 黄凤娇. 海南蝴蝶兰组织培养研究[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 1997, 15(3): 206-211.
- 彭立新, 王妹, 孟广云, 等. 蝴蝶兰组织培养快繁研究[J]. 天津农业学报, 1999(5): 27-29.
- 张秀清, 王志武. 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.
- 姚丽娟, 徐晓薇, 林绍生, 等. 蝴蝶兰原球茎增殖分化影响因子探讨[J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(3): 42-44.
- 李军, 柴向华, 曾宝强, 等. 蝴蝶兰组培工厂化生产技术[J]. 园艺学报, 2004, 31(3): 413-414.
- 陈之林, 叶秀萍, 梁承邨. 蝴蝶兰花萼的离体培养[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 242-244.
- 林新华, 徐立晖, 郭文杰, 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.
- MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473-497.
- VACIN E, WENT F W. Some pH changes in nutrient solutions[J]. Bot Gaz, 1949, 110: 605-613.
- KANO K. Studies on the media for orchid seed germination[J]. Mem Fac Agric Kagawa Univ, 1965, 20: 1-68.
- KNUDSON L. A new nutrient solution for germination of orchid seed[J]. Amer Orchid Soc Bull, 1946, 15: 214-217.
- LINDEMANN E G P, GUNCKEL J E, DAVIDSON O W. Meristem culture of CAITILEYA[J]. Amer Orchid Soc Bull, 1970, 39: 100-127.
- CHEN W H, CHEN T M, FU Y M, et al. Studies on somaclonal variation in Phalaenopsis[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 7-13.
- ICHIHASHI S. Micropropagation of PHALAENOPSIS through the culture of lateral buds from young flower stalks[J]. Lindleyana, 1992, 7: 208-215.
- LIU T H A, LIN J J, WU R Y. The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of PHALAENOPSIS and DORTAENOPSIS protocorm-like-bodies[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 86: 125-129.

肠道微生态自我调节完成的。双歧杆菌等有益菌可将肠道中的糖类转变成 SCFA 和乳酸,降低肠道 pH 值,而低 pH 值环境又阻止了病原菌及腐败菌在肠内的定植^[5]。ENP 通过促进单胃动物理想肠道微生物菌的增殖,增加了动物机体对外源性病原菌的抵抗作用。该研究表明,0.3% 的 ENP 添加量能显著促进仔猪盲肠中双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖,抑制盲肠中大肠杆菌和梭菌的增殖,这说明肠道微生态在一定程度上具有自我调节能力。

血清 TP、ALB、GLO 含量反映机体蛋白质的吸收和代谢状况。CHO、TC₃ 含量的高低反映脂类的吸收状况;HDL、LDL、VLDL 反映脂类在体内的分解和转运状况;同时可以反映肝脏脂肪代谢状况^[6]。该研究发现,添加 ENP 使仔猪血清 TP、GLO、CHO 和 TC₃ 含量明显提高,通过血液转运的 CHO 和 TC₃ 提高,肝脂肪含量下降,抗脂肪肝的效果较强,加强了脂类在血液循环中的运转以及在肝脏、脂肪组织、心脏、肌肉组织中的利用。结合 GPT 活性指标的提高,仔猪在生长阶段,体内蛋白质代谢加强,氨基酸利用率提高,表现为生长速度的加快^[7]。同时仔猪分泌 GH、IGF-I、T₃ 和 T₄ 等激素的作用增强,意味着机体通过神经-内分泌途径使 TP、GLO 在生长期增加,以增强能量动员和体液免疫功能^[8]。

3.2 ENP 对仔猪免疫功能的影响 细胞内环磷酸腺(cAMP)含量取决于腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶(phosphodiesterase-PDE),cAMP 活化蛋白激酶 A 通过 PKAC 亚基选择性的刺激 mRNA 转录促进某些蛋白质的合成;细胞内环磷酸鸟苷(cGMP)含量取决于鸟苷酸环化酶(GC)和 PDE,cGMP 通过依赖 cGMP 蛋白激酶的激活,使底物蛋白质的磷酸化,或者调节离子通道,刺激或抑制 cAMP 分解,参与生物体内多种功能的调节^[9];血浆 cAMP 主要受交感-肾上腺髓质释放的儿茶酚胺的影响,而 cGMP 主要受到副交感神经释放的乙酰胆碱影响。cAMP/cGMP 对调节细胞功能具有重要作用,并且与植物性神经功能有密切关系。Gddbery 等将 cAMP/cGMP 对机体调节作用与中医的“阴阳学说”相联系,认为 cAMP/cGMP 在医学上有重要意义。该试验结果表明,ENP 可显著提高仔猪血液中 cAMP 的含量及 cAMP/cGMP 的比例,这对于促进仔猪的免疫功能有重要意义。

所有哺乳动物都有 IgG、IgM、IgA。IgG 有抗菌、抗病毒作用,在体液免疫中最为重要;IgM 在机体受病原感染后与补体结合,溶解病原体的作用很强,在抗感染中起“先锋”作用;IgA

随分泌液排出至粘膜表面,发挥抗菌、抗病毒作用,在消化道及呼吸道内作用尤为明显^[10]。该研究发现,添加 ENP 使仔猪血清 IgG、IgM 水平明显提高,表明 ENP 能增强机体体液免疫功能。此外,IgG 还具有防止败血症的作用,可作为仔猪对外界刺激免疫反应的发动剂,是一种重要的肠道保护型抗体^[11]。因此,仔猪阶段血清 IgG、IgM 和 IgA 水平的提高,在一定程度上可以减少仔猪腹泻的发生。从白细胞数量及分类也可看出,ENP 可以刺激仔猪非特异性的免疫功能,使其体液免疫功能有较大改善。

补体是特异性免疫的主要组成部分,担负机体非特异性抗感染作用。该研究发现,添加 ENP 使仔猪血清 C₃、C₄ 水平明显提高。表明在仔猪阶段,补体处于较高水平,可协助抗体和吞噬细胞杀灭病原微生物。由于体液免疫功能的改善,抵抗力提高,仔猪腹泻发病率降低,从而促进仔猪生长。Klasing 等认为,因各种免疫原的刺激而使机体免疫系统激活后,可导致采食量下降、饲料利用率降低,从而抑制动物生长^[12]。笔者在 ENP 组方中加入了具有免疫增强作用的中草药,能改善机体的体液免疫功能,提高饲料利用率和仔猪抵抗力,降低腹泻发生率,从而促进了仔猪生长。

参考文献

- [1] 谢仲权,牛树琦.天然植物饲料添加剂生产技术与质量标准[M].北京:中国农业科学技术出版社,2004:5-9.
- [2] 葛长荣,韩剑众,田允波,等.作为饲料添加剂的猪用天然植物中草药组方研究[J].云南农业大学学报,2002(1):45-50.
- [3] FARNWORTH E R, MOLDER H W, JONES J D, et al. Feeding jersalem artichoke flour rich in fructo-oligosaccharides to weanling pigs [J]. Canadian Journal of Animal Science, 1992, 72: 977-980.
- [4] HOUDJIK J G M, BOSCH M W, VERSTEGEN M W A, et al. Effects of dietary oligosaccharides on the growth performance and faecal characteristics of young growing pigs[J]. Animal Feed Science and Technology, 1998, 71: 35-48.
- [5] 许粹荣,胡彩虹,寡果糖对仔猪生长性能、肠道菌群和免疫功能的影响[J].中国兽医学报,2003,23(1):69-71.
- [6] 杨华,傅行,陈安国.猪血液生化指标与生产性能的关系[J].国外畜牧科技,2001(1):34-37.
- [7] 高士争,葛长荣,田允波,等.天然植物中草药有效成分对生长肥育猪血液生理生化指标的影响[J].云南农业大学学报,2002(1):164-169.
- [8] 田允波,高士争,张曦,等.天然植物中草药有效成分对生长肥育猪内分泌的影响研究[J].云南农业大学学报,2002(2):170-175.
- [9] 孙大业,郭艳林,马力耕,等.细胞信号转导[M].北京:科学出版社,2001:53-67.
- [10] 杜念兴.兽医免疫学[M].2版.北京:中国农业科技出版社,1998:49-51.
- [11] 程学慧,彭健.仔猪免疫保护机制及早期断奶对仔猪免疫技能的影响[M]//卢德勋.2000'动物营养研究进展.北京:中国农业科技出版社,2001:194-200.
- [12] KLASING K C. Nutritional aspects of leukocytic cytokines[J]. Journal of Nutrition, 1988, 118: 1436-1446.
- [13] RNA-mediated resistance[J]. Molecular Breeding, 2004, 13: 229-242.
- [14] MISHIBA K I, CHIN D P, MII M. Agrobacterium-mediated transformation of PHALAEOPSIS by targeting protocorms at an early stage after germination [J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 297-303.
- [15] CHAN Y L, LIN K H, JAYA S, et al. Gene stacking in Phalaenopsis orchid enhances dual tolerance to pathogen attack[J]. Transgenic Research, 2005, 14: 279-288.
- [16] SHAHRIEL R, CHINI D P, KHANI R S, et al. Transgenic PHALAEOPSIS plants with resistance to ERWINLACAROTOVORA produced by introducing wasabi defensin gene using AGROBACTERIUM method[J]. Plant Biotechnology, 2006, 23: 191-194.

(上接第 4830 页)

- [37] ANZAI H, ISHII Y, SHICHINOHE M, et al. Transformation of PHALAEOPSIS by particle bombardment[J]. Plant Tissue Cult Lett, 1996, 13: 265-271.
- [38] BELARMINO M M, MII M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 435-442.
- [39] CHAI M L, XU C J, SENTHIL K K, et al. Kim Stable transformation of protocorm-like bodies in Phalaenopsis orchid mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. Scientia Horticulturae (Sci. hortic.), 2002, 96: 213-224.
- [40] LIAO L J, PAN I C, CHAN Y L, et al. Transgene silencing in Phalaenopsis expressing the coat protein of Cymbidium Mosaic Virus is a manifestation of