

蝴蝶兰组织培养研究进展(综述)

郑玉忠, 张振霞, 陈泽华

(韩山师范学院 生物系, 广东 潮州 521041)

摘要: 本文从蝴蝶兰外植体的选择、不同基本培养基、激素及添加物对其增殖与分化的影响, 外植体褐变的防治以及生根壮苗方法等, 概述蝴蝶兰组培快繁方面的研究进展, 为其组培技术研究提供参考。

关键词: 蝴蝶兰; 组织培养; 原球茎

中图分类号: Q943.1; S682.31

文献标识码: A

文章编号: 1009-7791(2006)01-0071-04

Progress in Tissue Culture of *Phalaenopsis* spp.

ZHENG Yu-zhong, ZHANG Zhen-xia, CHEN Ze-hua

(Department of Biology, Hanshan Teachers College, Chaozhou 521041, Guangdong China)

Abstract: The research progress of tissue culture of *Phalaenopsis*, including the effects of explants sources, culture mediums, hormones and nutrition compositions on multiplication and differentiation of protocorm-like body, the inhibition on browning of explants and methods of rooting and seedling strengthening before transplanting, are reviewed. Some reference materials are also provided for further study in tissue culture of *phalaenopsis*.

Key words: *Phalaenopsis* spp.; tissue culture; protocorm-like body

蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* spp.) 属热带或亚热带的兰科植物, 其花形奇特, 姿态优雅, 色彩鲜艳, 花期长久, 素有“兰花皇后”之美誉, 观赏价值极高, 深受人们的喜爱, 国内外市场的需求量越来越大。蝴蝶兰的传统繁殖方式为分株繁殖, 繁殖系数低, 速度慢, 不能满足日益增长的市场需求。因此, 研究和开发蝴蝶兰具有重要的意义。

组织培养是蝴蝶兰快速繁殖的有效途径, 主要通过两条途径: 一是利用种子无菌发芽, 二是从离体器官诱导产生原球茎, 通过原球茎的增殖培养, 得到大量幼苗^[1]。早在 1949 年, Potor^[2]利用无菌培养技术成功地促使蝴蝶兰花梗上的休眠芽发育成完整植株, 该方法经过其他研究人员改进后, 曾一度成为蝴蝶兰的主要无性繁殖方式。1974 年, Intuwong 等^[3]利用蝴蝶兰茎尖诱导产生了原球茎状体, 再由原球茎分化成植株, 为实现蝴蝶兰工厂化生产奠定了基础。原球茎是一类呈珠粒状的幼嫩器官, 在兰科植物中多以这种器官发育、增殖和分化。

蝴蝶兰的组织培养中有几个关键的时期: 原球茎的诱导、原球茎的继代增殖、壮苗的培育。根据这几个重要的时期及其组织培养的外界条件, 国内外研究人员对蝴蝶兰组织培养进行了广泛的研究, 并取得了一定的成效。本文就近年来蝴蝶兰组培快繁技术的研究现状进行综述, 包括外植体的选择, 不同基本培养基、激素、添加物对其增殖与分化的影响, 外植体褐变的防治, 以及生根壮苗的方法等。同时展望未来的发展趋势, 为该研究领域今后的发展提供有益的信息。

1 外植体的选择

诱导蝴蝶兰原球茎采用的外植体主要有根段^[4]、花梗苗根尖^[5]、花梗腋芽^[6]、茎尖^[7]、叶片^[8-10]、胚

收稿日期: 2005-08-03

基金项目: 韩山师范学院青年基金项目 (QN200503) 资助

作者简介: 郑玉忠(1977-), 男, 广东潮阳人, 硕士, 从事植物生物技术研究。

注: 张振霞为通讯作者。

[11]、花葶节间^[12]、花梗节或花梗节间切段^[13]、种子^[14-16]等。顾伟民等^[17]研究表明,蝴蝶兰不同外植体的成活率有差异,其中花梗侧芽的成活率最高,达 75%,其次为花梗,成活率为 62.5%,叶片和根尖最差,分别为 12.5%和 7.5%。针对不同外植体,取材方法也不同,通常取花梗节之间 1~2cm 长的幼嫩部分,切取长 2~3mm 的切段作为外植体^[13]。如利用 2~3cm 长的根尖段,将其切成 0.5~0.8cm,接种 2 周后根端切口处开始膨大,产生淡绿色瘤状愈伤组织^[4];采用无菌种子苗茎尖作为外植体时,培养 30d 后基部出现愈伤组织,出愈率达 85%以上^[16];而利用正在培养的花梗苗生长旺盛的根尖进行培养,20d 左右外植体膨大且表面颜色明显加深^[5];陈之材等则用花梗腋芽为起始材料诱导花葶,由花葶节间切片可以高频率诱导分化不定芽^[12]。

2 基本培养基的选择

蝴蝶兰组织培养所采用的基本培养基包括 MS、1/2MS、VW、B₅、KC、花宝及其改良型等,但对最适培养基的选择却不同,主要在于蝴蝶兰品种差异及外植体来源不同所致。周俊辉等^[18]以红花品种为试材,研究比较了 MS、1/2MS 和改良 KC 三种基本培养基,发现改良 KC 的效果最好,1/2MS 次之,MS 最差;张秀清等^[9]、马子骏等^[19]的研究结果也显示出蝴蝶兰的原球茎增殖培养以较低的无机盐浓度为好。王静等^[20]以红花系 085# 和白花系 0217# 的杂交品种作试验材料,研究了大量元素对蝴蝶兰原球茎增殖与分化的影响,研究结果表明了大量元素对原球茎增殖有很大影响,1/2MS 对原球茎增殖最有利。姚丽娟等^[10]在 MS、1/2MS、KC 和 VW 的试验结果也表明,1/2MS 对蝴蝶兰原球茎增殖效果最好。鲁雪华等^[13]在花梗节间切段诱导原球茎的实验过程中对培养基进行筛选,也发现 1/2MS 或改良 MS 较 MS 效果好,减少 MS 中大量元素和部分微量元素及有机成分,适当增加少量的叶酸和生物素有利于原球茎的增殖生长。陈勇等^[1]认为,1/2 MS 培养基对原球茎的增殖和分化效果均好于 MS 培养基,MS 培养基中较高浓度的无机盐不利于原球茎的增殖和分化。杨美纯等^[14]则认为,MS 培养基最适合蝴蝶兰种子的萌发。另外,也有报道 B₅ 培养基更有利于蝴蝶兰根段原球茎的诱导和增殖^[4]。

3 植物生长调节剂对蝴蝶兰原球茎增殖与分化的影响

目前,蝴蝶兰组织培养中常用的细胞分裂素为 6-BA,较高浓度(1~8mg/L)的 6-BA 能促进蝴蝶兰原球茎增殖,较低浓度(0.1~0.5mg/L)的 6-BA 则能促进原球茎分化^[21]。也有研究认为,低浓度 6-BA 更有利于原球茎的增殖,而高浓度(6mg/L)的 6-BA 刺激多酚氧化酶作用,使原球茎容易产生褐化^[18]。姚丽娟等^[10]研究发现,附加 6-BA 后,原球茎增殖量明显高于附加 Ad 或 KT 的,增殖效果为 6-BA>KT>Ad>KT+Ad;当 6-BA 使用浓度在 1.0~3.0mg/L 时,增殖情况无明显差异;同时还发现 NAA 对原球茎增殖分化影响不明显。周俊辉等^[18]则认为,低浓度的 NAA 对原球茎增殖和出苗均有促进作用,高浓度的则不利。王静等^[20]研究结果也表明,适宜浓度的 6-BA 配合较低浓度的 NAA,更有利于原球茎的增殖,2.0mg/L 6-BA 和 0.3mg/L NAA 配合使用是蝴蝶兰原球茎增殖的最佳组合。叶晓青等^[22]也发现,在添加 BA 和 NAA 的培养基中,原球茎的增殖系数比单独添加 BA 或 NAA 的高;单独使用 2.0mg/L NAA 的处理组,其繁殖系数也较高。而陈勇等^[1]认为,高浓度的 NAA 对蝴蝶兰原球茎增殖有一定的抑制作用,NAA 浓度从 1mg/L 增加到 3mg/L,增殖率相应从 98.3%下降到 38.3%;其实验结果同时还表明,单独添加 3mg/L 6-BA,原球茎的增殖率与平均每块增殖数要高于其它各激素浓度的配比,且原球茎增殖迅速。彭立新等^[8]在蝴蝶兰组培快繁研究中,采用 3.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L NAA 配方,能够有效的诱导原球茎,同时还发现提高激素配比(5.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L NAA + 活性碳 1.0g/L),则有利于原球茎的增殖,提高增殖系数,且不用转接就可直接生根成苗,避免转接过程带来的污染损失,简化了培养过程,因而是一种值得推广的方法。此外,在培养基中加入 1.0mg/L GA₃ 对原球茎分化成芽有一定的抑制效果,为获得大量原球茎而避免分化成芽,适当添加 GA₃ 是有一定作用的^[20]。

4 培养基添加物对蝴蝶兰原球茎增殖和分化的影响

一些氨基酸类添加物,也可以作为培养基中的有机氮源,例如甘氨酸能促进离体根的生长,丝氨酸和谷氨酰胺有利于花药、胚状体或不定芽的分化。水解酪蛋白和水解乳蛋白对胚状体或不定芽或多胚的分化有良好的促进作用。而在培养基中加入一些天然有机物,如椰乳、香蕉泥、番茄汁等,也能提供一些必要的微量营养成分、生理活性物质和生长激素等,如加入 100~200mg/L 香蕉泥,具有较大的 pH 缓冲作用,对幼苗发育有促进作用。

在不同添加物对蝴蝶兰原球茎增殖和分化影响的研究中发现,水解酪蛋白对蝴蝶兰原球茎增殖有明显促进作用,而水解酪蛋白和香蕉匀浆相结合却对原球茎增殖有抑制作用,有机添加物之间的相互作用或有机添加物与培养基之间的相互作用可能对原球茎增殖有影响^[20]。许多研究也表明,添加适量的香蕉泥、椰乳或含胶质的果菜汁等均对原球茎增殖有明显促进效果^[15,17]。培养基中添加活性炭,低浓度(0.5~1.0g/L)时对原球茎增殖影响不明显,高浓度(2.0~3.0g/L)时对原球茎增殖有促进作用,但原球茎有黄化现象^[18]。蔗糖作为培养基的能源物质和渗透调节剂,对原球茎的增殖生长影响较大。有试验表明,2%的蔗糖浓度有利于原球茎生长,2%~3%蔗糖促进芽的形成,5%的蔗糖有利于根的分化和生长^[23]。陈勇等^[1]也认为蔗糖浓度对原球茎分化有明显的影响,当分化培养基含 1%或 2%蔗糖时原球茎 100%分化,尤其蔗糖为 2%时,分化速度最快;蔗糖含量为 3%~5%时,抑制原球茎的分化和生长,分化质量和分化速度都显著下降。

5 原球茎继代中褐化的防治

蝴蝶兰和其它兰科植物一样,原球茎状体在继代培养过程中易褐变死亡,不易增殖。在培养基中添加 1~2g/L 活性炭,适时切除培养物的褐化部分并及时更换新鲜培养基,能有效抑制外植体褐变死亡;培养基中加入 10%椰子水,也能促进原球茎的生长,减少原球茎增殖过程中的褐变^[24]。蝴蝶兰的群体效应很明显,单芽容易褐化死亡,且增殖较慢,因此,刚诱导出的原球茎状体不能过早切割转移,在继代阶段接种时,应尽量避免切成单芽,增殖时切块也不宜过小,否则容易褐化死亡^[10,25]。梁宏伟等^[15]指出,添加香蕉汁对蝴蝶兰原球茎形成及幼苗生长具有明显的促进作用,添加活性炭对于原球茎和幼苗生长也具有积极作用,防止培养材料出现褐化。

6 生根壮苗

壮苗培养是提高移栽成活率的一项重要措施;生根效果也直接影响到生产效益。此阶段的关键在于严格筛选激素的种类和浓度,一般需降低培养基的激素含量,以便形成健壮苗。常用的生长素有 IBA(0.3~1.5mg/L)、NAA(0.1~0.8mg/L)。鲁雪华等^[13]认为,添加 GA₃ 0.1mg/L + NAA 0.1mg/L 的组合能明显提高生根率,且植株健壮,长势好。林宗铿等^[26]则利用正交设计方法研究了培养基中的无机营养、NAA、蔗糖和多效唑四种因素对蝴蝶兰组织丛生芽生根壮苗的影响,发现无机营养是影响蝴蝶兰丛生芽生根率的主要原因,蔗糖次之,NAA 和多效唑影响程度较弱;无机营养也是影响根长的主要因素,多效唑次之,NAA 和蔗糖影响较小。

综上所述,用组培方法快繁蝴蝶兰较传统繁殖方法有三个明显的优点:节省育苗用地;节省繁殖材料,提高繁殖系数;利用茎尖脱毒培养,挽救因受病毒侵染而退化的优良品种,提高质量和欣赏价值。总之,组培快繁技术可大大提高生产效益和经济效益。

尽管国内外在蝴蝶兰组培方面取得了一定的进展,但仍存在繁殖系数偏低,增殖难,继代所需周期偏长等问题,有些方面的研究还存在不同、甚至相反的结论,也尚未建立经济高效低成本的标准化的种苗生产体系。因此,仍需加强蝴蝶兰离体培养繁殖技术的研究,探索通过组培加快育种和提高种苗的繁殖速度,解决目前市场需求。

参考文献:

- [1] 陈勇,等. 蝴蝶兰的快速繁殖和规模化栽培技术研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2004,31(11): 84-88.
- [2] Potor G. Method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* stem cuttings[J]. Amer Orchid Soc Bull, 1949,(18):739-742.
- [3] Intuwong O, et al. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot-tip culture[J]. Amer Orchid Soc Bull, 1975,(93): 893-895.
- [4] 李进进,等. 蝴蝶兰根段的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2000,35(3): 209.
- [5] 林宗铿,等. 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.
- [6] 张元国,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.
- [7] 潘学峰,等. 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): 206-210.
- [8] 彭立新,等. 蝴蝶兰组织培养快繁研究[J]. 天津农业学报, 1999,(5): 27-29.
- [9] 张秀清,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.
- [10] 姚丽娟,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.
- [11] 李军,等. 蝴蝶兰组培工厂化生产技术[J]. 园艺学报, 2004,31(3): 413-414.
- [12] 陈之材,等. 蝴蝶兰花茎的离体培养[J]. 园艺学报, 2003,30(2): 242-244.
- [13] 鲁雪华,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.
- [14] 杨美纯,等. 蝴蝶兰的种子培养[J]. 广西农业生物科学, 2002,21(4): 258-260.
- [15] 梁宏伟,等. 蝴蝶兰瓶播培养小试验[J]. 生物学通报, 2004,39(10): 57.
- [16] 张福明,等. 蝴蝶兰种子的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1999,35(4): 303.
- [17] 顾伟民,等. 蝴蝶兰组培快繁技术的研究[J]. 山东林业科技, 2004,(5): 12-13.
- [18] 周俊辉,等. 蝴蝶兰原球茎增殖的研究[J]. 仲恺农业技术学院, 2002,15(3): 13-17.
- [19] 马子骏,等. 蝴蝶兰工厂化生产技术研究[J]. 浙江林学院学报, 1998,15(2): 192-196.
- [20] 王静,等. 大量元素、有机添加物、激素对蝴蝶兰原球茎增殖的影响[J]. 上海农业科技, 2004,(3): 21-23.
- [21] Bhattacharjee S, et al. Effect of growth regulating substance on *in vitro* seed germination of *Phalaenopsis hybrid*[J]. Indian Agriculturist, 1999,43(1/2): 79-83.
- [22] 叶晓青,等. 不同激素水平对蝴蝶兰原球茎状体增殖影响[J]. 江苏林业科技, 2002,(33): 42-44.
- [23] 曹孜义,等. 实用植物组织培养技术教程[M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社, 2002. 179-181.
- [24] 姚丽娟,等. 蝴蝶兰防褐化技术探讨[J]. 广西热带农业, 2004,(3): 12-13.
- [25] 柴向华,等. 金边蝴蝶兰的叶片培养[J]. 热带农业科学, 2004,24(3): 18-21.
- [26] 林宗铿,等. 应用正交设计方法探讨蝴蝶兰丛生芽生根壮苗的条件[J]. 福建热作科技, 2002,27(1): 4-5, 11.

.....

(上接第65页)

5 意义与进展 肾茶为唇形科肾茶属多年生草本植物,该属植物仅有5种,产于东南亚至澳大利亚的热带及亚热带地区。我国仅有 *Clerodendranthus spicatus* 一种,在四川攀西、广西、海南、云南和台湾等省区有引种栽培。民间药用全草,有清热祛湿、排石利水之功效,用于治疗急、慢性肾炎、膀胱炎、尿路结石、风湿性关节炎等。肾茶中含有熊果酸(ursolic acid),又名乌索酸、乌苏酸,属三萜类化合物,分子量为456,是存在于天然植物中的一种三萜类化合物,具有广泛的生物学效应,为肾茶的主要药效成分之一,其含量高低直接影响肾茶药材及相关产品的质量。近年来肾茶资源的开发利用集中在以肾茶为主要原料的各类新药产品的研制上,而对肾茶药材质量控制方面的研究报道较少。在四川攀西地区的肾茶生产中,收获肾茶没有固定时间,农户考虑到自己的经济利益,根据其田间肾茶的长势,认为可保证有最高产量时才愿意收获,这必然造成肾茶药材质量的不稳定性。而对肾茶在不同生长阶段熊果酸含量的研究罕见报道,本研究结果可为生产中确定肾茶药材最佳采收期提供参考。