

树兰组织培养研究进展

甘春雁, 沈丽娟, 韦妙琴, 曾进, 苏大宏, 欧振飞 (南宁青秀山风景名胜旅游开发有限责任公司, 广西南宁 530029)

摘要 从外植体的选择、培养基、植物激素、其他添加物和培养条件等方面概述近几年国内树兰组织培养的研究进展, 分析树兰组织培养过程中存在的问题, 并提出相关建议与展望, 为今后树兰的快速繁育及种质资源保存研究提供参考。

关键词 树兰; 组织培养; 外植体

中图分类号 S682.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)13-0033-03

Research Advances in Tissue Culture of *Epidendrum*

GAN Chun-yan, SHEN Li-juan, WEI Miao-qin et al (Nanning Qingxiu Mountain Tourism Development Co., Ltd., Nanning, Guangxi 530029)

Abstract Research advances in tissue culture of *Epidendrum* at home in recent years were mainly reviewed from the aspects of the selection of explants, culture medium, plant hormone, other additives and culture condition. The exist problems in the tissue culture of *Epidendrum* were analyzed, then some proposals and prospect of *Epidendrum* were put forward, which provided for further study in rapid breeding and germplasm conservation of *Epidendrum*.

Key words *Epidendrum*; Tissue culture; Explants

树兰(*Epidendrum*)又名柱瓣兰, 为兰科树兰属植物的统称, 属濒危兰花物种, 原产于美洲热带地区的厄瓜多尔, 从佛罗里达到阿根廷北部地区均有广泛分布^[1]。因其具有较大的花序, 花色丰富艳丽, 花期较长, 整体观赏效果很好, 深受兰花爱好者的喜爱, 是一种具有极高观赏价值的热带兰花^[2]。在国外经过多年属内种间或品种间的杂交育种, 已培育出大量比树兰原生种更具高观赏效果的优良品种, 并已投入商业化生产^[3]。树兰在热带和亚热带地区常作为切花或盆栽栽培生产; 在温带地区常被应用于温室盆花栽培或园林地被栽培^[4]。

在我国, 关于树兰的栽培繁育技术仍未成熟, 且由于树兰珍贵、数量稀少, 市场上并不常见。传统的树兰繁殖方式有扦插繁殖、分株繁殖及无菌播种繁殖。但长期的扦插繁殖和分株繁殖速度太慢, 易受病毒病危害, 导致品质退化, 不利于树兰的推广生产。用无菌播种诱导形成原球茎进行繁殖, 繁育后代易发生变异, 不利于亲本形状的保持^[5]。随着先进生物技术的推广和运用, 组织培养技术已被应用于大量兰花品种的繁育^[6-12], 且在国内采用组织培养技术对树兰进行快速繁殖已有少量成功报道。笔者从外植体的选择、培养基、植物激素、其他添加物及培养条件等方面概述近几年对树兰原球茎的诱导、增殖以及分化影响的研究进展, 分析树兰组织培养过程中存在的问题, 并提出相应建议与展望, 旨在为今后树兰的快速繁育及种质资源保存提供理论依据。

1 种质资源

树兰属是兰科中较大的属, 有 1 000 多个原生种^[1]。树兰属在兰科植物中是一个亲和力较强的属, 据不完全统计, 到 1997 年已经与钝口兰属(*Amblostoma*)、巴克兰属(*Barteria*)、布劳顿兰属(*Broughtonia*)、白拉索兰属(*Brassavola*)等 17 个属杂交产生 2~6 个属间的人工属至少 45 个。截至

2012 年, 该属以母本做杂交的种约 606 个, 以父本做杂交的种约 673 个^[4,13]。目前, 树兰属常见种或品种有美花树兰(*Epi. Calanthum*)、缘毛树兰(*Epi. ciliare*)、棒叶树兰(*Epi. Corifolium*)、异形树兰(*Epi. Difforme*)、多花树兰(*Epi. Floribundum*)、芦荃树兰(*Epi. ibaguense*)、夜香树兰(*Epi. nocturnum*)、帕克森树兰(*Epi. parkinsonianum*)、丛生树兰(*Epi. polyanthum*)、假树兰(*Epi. Pseudependrum*)、兔唇树兰(*Epi. centropetalum*)、胶水树兰(*Epi. ciliare*)等^[3]。随着人们生活水平的不断提高, 花卉将成为人们精神生活的重要调节剂, 对花卉的需求量将越来越大。为丰富国内外花卉市场、促进兰花产业的快速发展, 保护濒危物种资源, 搜集、引进树兰属种质资源以及培育新种具有重要的意义和深远的应用价值。

2 组织培养技术

2.1 组织培养程序 树兰的组织培养程序与其他兰花的程序相似, 包括外植体的选择和消毒、诱导形成原球茎、原球茎继代增殖、分化成苗、生根壮苗的培养、出瓶移栽培养、室外栽培 7 个阶段^[14]。

2.2 外植体的选择 外植体是植物组织培养中原球茎的重要来源^[14]。在树兰的组织培养中, 常以种子、茎尖、茎段、丛芽、侧芽、幼芽、花梗等为外植体(表 1)。在树兰组织培养研究中, 在外植体的选择上, 谷祝平等^[5]以成熟的种子作为外植体; 曾宋君^[1]以种子、茎尖为外植体; 魏翠华^[2]以树兰茎尖、侧芽为外植体; 张建霞等^[15]以胶水树兰的幼芽为外植体; 潘雪峰等^[16]采用成熟度 7~8 成、未开裂的树兰蒴果的未成熟种子作为外植体; 孙瑶等^[17]以树兰无菌苗的茎段和丛芽作为外植体; 王泽祺等^[18]以树兰茎段为外植体; 周亚倩^[19]以树兰种子为外植体; 易双双等^[20]以树兰当年生分蘖苗的带芽茎段为外植体; 李春华等^[3]以种子为外植体, 均分别成功诱导出树兰的原球茎, 为下一步的组织培养试验提供关键材料。

2.3 培养基的选择 培养基是植物组织培养的核心技术, 是组织培养中植物组织离体材料赖以生存和发展的必要营养基地^[21]。树兰组织培养采用的基本培养基包括 MS、1/2MS、N6、改良的 VW 培养基等。

基金项目 南宁市科学研究与技术开发计划项目(20162324)。

作者简介 甘春雁(1988—), 女, 广西玉林人, 工程师, 硕士, 从事园林植物引种繁育及遗传育种研究。

收稿日期 2018-01-09

表1 国内树兰组织培养的外植体

Table 1 Explants of *Epidendrum* tissue culture in the domestic

序号 No.	外植体 Explants	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	常见应用 Common application
1	种子	量大,容易获取,可用于无菌播种	后代易发生变异,不利于亲本形状保持	诱导原球茎和组培实生苗,用于育种
2	茎段	操作方便,繁殖速度快,保持亲本形状	损伤母株	诱导原球茎
3	茎尖	茎尖细胞分裂最旺盛 ^[21] ,容易诱导出原球茎或愈伤组织,成功率较高的部位	损伤母株;操作困难,且易污染	诱导原球茎、丛生芽
4	花梗	取材方便,易消毒;避免母株受到更多的伤害,且获得与母株优良性状一致的再生苗 ^[22]	受到开花季节的限制	诱导原球茎
5	幼芽、侧芽、丛芽	顶端分生区细胞的分裂能力强,易于诱导出原球茎	损伤母株	诱导原球茎

谷祝平等^[5]以树兰的成熟种子在改良的VW培养基上诱导原球茎。曾宋君^[1]对树兰的胚培养和茎尖培养进行较为系统的研究,结果发现胚萌发的最适培养基为N6,在树兰的茎尖培养中以MS培养基的效果较好。魏翠华^[2]以改良的VW培养基为基本培养基进行树兰离体培养和植株再生研究,结果发现原球茎转入VW+BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基中可大量增殖并分化成小苗,小苗在1/2MS+NAA 0.5 mg/L+蛋白胨 3 g/L培养基中壮苗与生根,生根率达100%。张建霞等^[15]以1/2MS培养基作为愈伤组织诱导、原球茎增殖、原球茎诱导丛生芽、幼苗增殖、壮苗及生根等的基本培养基。潘雪峰等^[16]以树兰未成熟种子为外植体,研究原球茎的诱导、增殖、萌芽及生根培养等关键步骤的培养基配方,结果表明,树兰种子播种在MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+蔗糖 25 g/L培养基上,25 d左右即可见原球茎团;1/2MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.25 mg/L+蔗糖 20 g/L+CH 2.0 g/L培养基对原球茎增殖的效果最佳,增殖倍数超过9倍;将原球茎转入1/2MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+蔗糖 25 g/L培养基上,原球茎的出芽率超过90%;将芽接种在1/2MS+NAA 0.5 mg/L+BA 0.1 mg/L+香蕉泥 70 g/L+蔗糖 25 g/L的生根培养基中,生根率达94%。孙瑶等^[17]研究表明,树兰的诱导、分化和生根可以使用同一种培养基,即1/2MS+琼脂粉 8 g/L+活性炭 30 g/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。王泽祺等^[18]以树兰茎段为外植体进行组织培养研究,结果发现以1/2MS+NAA 1.0 mg/L+活性炭 1.0 g/L+蔗糖 25 g/L培养基进行生根培养效果最佳,生根率达93.06%。周亚倩^[19]对树兰的组织培养基诱变效应进行研究,筛选出1/2MS为适宜诱导种子萌发的基本培养基。易双双等^[20]以树兰当年生分蘖苗的带芽茎段为外植体在MS培养基上进行组织培养,结果发现树兰茎段丛生芽诱导最适宜培养基为MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,诱导率最高达73.13%;增殖最适宜培养基为MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 3.0 mg/L,增殖系数最高达5.2;生根最适宜培养基为MS+NAA 1.0 mg/L+IBA 1.5 mg/L,生根率可达100%。

2.4 植物激素 植物激素对植物离体培养中细胞生长、器官和组织的分化发育、形态建成起着重要的调节作用,在诱

导愈伤组织、胚状体或芽、根等器官,分化形成小植株的过程中必不可少。不同分化过程的培养基中添加的植物激素种类、用量及配比均不同,且激素对外植体诱导和原球茎增殖与分化起着主导作用^[14]。树兰组织培养中常采用的激素有NAA、IBA、6-BA、2,4-D等。

谷祝平等^[5]将采用种子诱导出的原球茎切割成小块,放入添加2,4-D 0.2 mg/L和6-BA 0.2 mg/L的VW液体培养基进行振荡液体培养,获得了大量原球茎。曾宋君^[1]在树兰继代培养的MS培养基中加入6-BA 0.5 mg/L效果较好,在生根培养时以1/2MS培养基加入NAA 0.2 mg/L和10%香蕉时效果最好。孙瑶等^[17]以树兰无菌苗为材料,探讨不同激素NAA、6-BA配比对原球茎诱导、芽分化和生根的影响,结果表明,不同激素组合对愈伤组织诱导、芽分化的影响差异显著,其中以NAA 1.0 mg/L+6-BA 3.0 mg/L的激素组合诱导出的茎段愈伤组织最好,诱导率达50.0%;以NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L的激素浓度配比诱导出的芽最多,诱导率达52%。王泽祺等^[18]采用正交试验研究NAA、IBA、6-BA对树兰愈伤组织诱导、不定芽增殖及生根培养的影响,结果发现以NAA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+6-BA 0.4 mg/L的激素对比对愈伤组织诱导效果最好,诱导率达24.44%;以NAA 1.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+6-BA 0.2 mg/L的激素对比对不定芽的诱导效果最好,诱导率最高达80%。其中,NAA浓度对树兰茎段愈伤组织诱导及不定芽增殖倍率的影响最大,IBA、6-BA浓度对愈伤组织诱导影响相差不大;6-BA浓度对不定芽诱导率的影响最大,其次是IBA,NAA浓度对不定芽诱导率的影响最小。易双双等^[20]研究不同质量浓度的6-BA、NAA和IBA激素组合对树兰茎段丛生芽诱导、增殖及生根均有显著影响。

2.5 其他添加物 在培养基中添加蔗糖、琼脂、活性炭、香蕉汁、苹果汁、椰子汁、水解酪蛋白、抑菌物质、有机质等,对诱导、增殖、生根等均有较好的调节、清除有毒物质、杀菌消毒、促进生长等作用^[23-29]。曾宋君^[1]在基本培养基中加入10%椰子汁能提高萌发率和成苗率,加入绿豆芽汁能促进胚的萌发,加入香蕉汁、苹果汁和胡萝卜汁能促进成苗,加入1%活性炭有利于根的形成。潘雪峰等^[16]研究不同蔗糖质量浓度对树兰原球茎增殖的影响,结果表明,培养基中不加

蔗糖或过高的蔗糖浓度都会抑制树兰原球茎的增殖,较适宜树兰原球茎增殖的蔗糖质量浓度为 20 g/L。

2.6 培养条件 在组织培养过程中,温度、光照、pH 等环境条件对培养物的生长有很大影响。研究表明,树兰组织培养较为适宜的条件:光照强度 1 500 ~ 2 000 lx,光照时间 12 ~ 14 h/d,培养温度(24 ± 2) °C, pH 5.8 ~ 6.0^[17-19]。

3 展望

近年来,虽然国内在树兰组织培养研究方面取得一定的进展,但树兰组织培养快繁技术仍处于未成熟的阶段,在组织培养过程中存在一些问题仍需继续探讨及完善:①与国外相比,国内树兰种质资源较少,因此对树兰品种资源的引进、搜集、筛选及杂交育种等仍是一项艰巨的工作。②外植体的选择是组织培养成功的关键。不同树兰品种以及不同器官部位均存在一定的分化能力差异,培养的难易程度也有很大区别。目前,树兰的离体培养大多选择种子、茎尖、茎段、丛芽、侧芽、幼芽、花梗等为外植体,而尚未见以对母株无伤害、不受季节限制且数量较多的叶片和根尖^[30]作为外植体进行研究的相关报道。因此,叶片和根尖是否为树兰组织培养中优良的外植体材料仍有待研究。③外植体的消毒是离体培养的重要环节。截至目前,国内对树兰外植体消毒方法的研究极少,外植体的表面消毒处理技术仍是未来研究的难点之一。④建立树兰组织培养快繁体系是实现大规模工厂化生产的关键技术。因此,对树兰优良品种的引进、筛选,组培快繁中外植体诱导萌发、丛生芽形成、增殖分化、生根壮苗培养等各个阶段,以及外植体的来源、培养基的筛选、外源激素、添加物和培养条件等方面的探索仍是今后主要研究内容,以期建立健全、高效、标准化的树兰组培快繁技术体系奠定坚实的技术基础,更快更好地实现树兰优良品种的工厂化生产,从而满足市场需求。

参考文献

[1] 曾宋君. 树兰的繁殖栽培[J]. 园林, 2001(3): 28-29.
 [2] 魏翠华. 树兰的离体培养和植株再生(简报)[J]. 亚热带植物科学, 2006(2): 64-65.
 [3] 李春华, 李柯澄. 树兰繁殖与栽培[J]. 中国花卉园艺, 2016(24): 22-25.
 [4] 卢思聪, 张毓, 石雷, 等. 世界栽培兰花百科图鉴[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2014: 338-343.
 [5] 谷祝平, 徐涛. 树兰原球茎增殖中体细胞胚发生的研究[J]. 兰州大学

学报(自然科学版), 1990, 26(1): 76-79.
 [6] 魏琪, 李凤兰, 胡国富, 等. 蝴蝶兰快速繁殖研究进展[J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 915-920.
 [7] 范成明, 李枝林, 何月秋. 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.
 [8] 张志胜, 欧秀娟. 墨兰的组织培养[J]. 园艺学报, 1995, 22(3): 303-304.
 [9] 崔广荣, 侯喜林, 张子学, 等. 蝴蝶兰叶片离体培养胚状体的发生及组织学观察[J]. 园艺学报, 2007, 34(2): 431-436.
 [10] 崔广荣, 刘云兵, 张俊长, 等. 文心兰组织培养的研究[J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 253-255.
 [11] 张宁宁, 夏明霞, 张琼, 等. 卡特兰组织培养研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(4): 42-44.
 [12] 于永畅, 牛田, 孙芳, 等. 国兰组织培养研究进展[J]. 山东林业科技, 2012(4): 100-103.
 [13] 卢思聪. 美丽奇妙的兰花家族之一——树兰[J]. 中国花卉盆景, 2010(3): 2-7.
 [14] 丁燕芬, 王岩, 龙春林. 中国兰花组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(8): 2247-2248, 2250.
 [15] 张建霞, 李洪林, 付志惠, 等. 胶水树兰的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 913.
 [16] 潘雪峰, 凌梅, 王安石. 树兰未成熟种子离体快繁技术[J]. 热带生物学报, 2010, 1(2): 158-164.
 [17] 孙瑶, 黄康康. 不同激素对树兰组织培养的影响[J]. 浙江农业科学, 2012(3): 342-343.
 [18] 王泽祺, 李聆睿, 张佳燕, 等. 树兰的组织培养研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 45-48.
 [19] 周亚倩. 两种兰花的组织培养与诱变效应的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
 [20] 易双双, 陆顺教, 冷青云, 等. 树兰茎段丛生芽快繁体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(12): 157-162.
 [21] 金铃. 兰花组织培养研究进展[J]. 现代农业, 2010(7): 14.
 [22] 杨善云. 蝴蝶兰组织培养的研究进展[J]. 园艺与种苗, 2012(9): 59-61.
 [23] 鲁雪华, 徐立晖, 郭文杰, 等. 卡特丽亚兰的组织培养[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(2): 242-245.
 [24] 王荣钦. 外植体部位、激素浓度对卡特兰、蝴蝶兰原球茎形成和增殖的影响[J]. 福建热作科技, 2000(1): 31-32.
 [25] 赵贵林, 郑平, 何德华, 等. 小型卡特丽亚兰的组培快繁研究初报[J]. 广东农业科学, 2002, 29(5): 24-26.
 [26] 吕复兵, 罗志娟, 王碧青, 等. 生长素和糖对卡特兰原球茎生长发育的影响[J]. 广东农业科学, 2005, 32(5): 35-36.
 [27] 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.
 [28] 马生健, 覃金芳, 曾富华. 有机添加物对卡特兰组织培养的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(1): 32-35.
 [29] 李正民, 王安石, 王健. 蝴蝶兰组织培养研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, 39(15): 19-22.
 [30] 丁秋露, 赵亚军. 兰花组织培养和分子生物学研究进展[J]. 生物学杂志, 2010, 27(2): 76-79.

(上接第 14 页)

[44] SÉRALINI G E, CELLIER D, DE VENDÔMOIS J S, et al. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2007, 52(4): 596-602.
 [45] SANDERS D, KAMOUN S, WILLIAMS B, et al. Long term toxicity of a roundup herbicide and roundup-tolerant genetically modified maize[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(3): 4221-4231.
 [46] LIU P, HE X, CHEN D, et al. A 90-day subchronic feeding study of genetically modified maize expressing Cry1Ac-M protein in Sprague-Dawley rats[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(9): 3215-3221.
 [47] BAKKE-MCKELLEP A M, KOPPANG E O, GUNNES G, et al. Histological, digestive, metabolic, hormonal and some immune factor responses in

Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed genetically modified soybeans[J]. J Fish Dis, 2007, 30(2): 65-79.
 [48] SANDEN M, KROGDAHLÅ, BAKKE-MCKELLEP A M, et al. Growth performance and organ development in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr fed genetically modified (GM) soybean and maize[J]. Aquacult Nutr, 2006, 12(1): 1-14.
 [49] BARTHOLOMAEUS A, PARROTT W, BONDY G, et al. The use of whole food animal studies in the safety assessment of genetically modified crops: Limitations and recommendations[J]. Crit Rev Toxicol, 2013, 43(S2): 1-24.
 [50] THOMAS K, EROUETGUICHENEY C, LADICS G, et al. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report[J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(7): 1116-1122.