

# 国兰组织培养研究进展

洪霞, 米敏, 刘也楠, 陈银龙\* (台州市农业科学研究院, 浙江台州 317000)

**摘要** 从外植体的选择处理、培养基、生长调节物质添加以及培养方式与条件等方面论述国兰组织培养, 总结存在的问题, 并提出建议, 为国兰组培技术的进一步突破提供参考。

**关键词** 国兰; 组织培养; 外植体; 消毒; 培养基; 激素

**中图分类号** S682.31 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)24-0020-03

## Research Progress on Tissue Culture of Chinese Orchid

HONG Xia, MI Min, LIU Ye-nan et al (Taizhou Academy of Agricultural Sciences, Taizhou, Zhejiang 317000)

**Abstract** Tissue culture of Chinese orchid was reviewed from choosing explant, culture medium, adding growth regulator, culture method and conditions. Problems were summarized, and advice was put forward to provide reference for breaking tissue culture of Chinese orchid.

**Key words** Chinese orchid; Tissue culture; Explant; Disinfection; Culture medium; Hormone

国兰, 又称中国兰, 古代称之为兰蕙, 在我国具有悠久的栽培历史。在古时, 就有以“兰章”喻诗文之美, 以“兰交”喻友谊之真, 更有众多咏兰诗词。国兰属于单子叶多年生兰属植物, 为附生或地生草本, 包括春兰 (*C. goeringii*)、蕙兰 (*C. faberi*)、建兰 (*C. ensifolium*)、墨兰 (*C. sinense*)、寒兰 (*C. kanran*)、莲瓣兰 (*C. tortisepalum*) 与春剑 (*C. tortisepalum* var. *longibracteatum*) 等 7 种, 除了春剑为莲瓣兰的变种外, 其他均为原生种。国兰的园艺品种非常丰富, 多达上千种, 以悠远清新的香气与独特的花艺、型艺为国人所喜爱, 具有较高的欣赏价值与经济效益<sup>[1-2]</sup>。在自然环境下, 野生的国兰资源遭遇大量的采挖, 已经很少能发现珍稀资源。已有的国兰品种主要通过分株进行繁殖, 栽培条件要求较高, 繁殖力低, 且对母株有一定的伤害, 很多品种不能满足市场的需求, 有的甚至导致一苗难求的局面, 阻碍国兰市场的繁荣。组织培养是兰花有效的繁殖方式, 能获取大量幼苗。1960 年, 首次使用大花蕙兰茎尖进行组织培养, 诱导出小球体<sup>[3]</sup>。部分国兰自交或者杂交得到的种子进行萌发能获取性状分离、表型特征不同的新幼苗。利用组织培养, 有些材料能够突变产生叶艺、花艺、增强抗性等, 既提高观赏价值, 又丰富国兰资源。因此, 国兰的组织培养对于优良品种扩繁以及新品种选育意义重大。

### 1 外植体的选择与处理

根据植物细胞全能性理论, 国兰的根、茎、叶、花、种子等器官都能利用组织培养形成完整植株。叶片与根取材广泛, 对母株伤害较小, 作为外植体较为理想。1965 年, Winber 以蕙兰幼叶为外植体获得原球茎, 首次证明叶片为外植体获得大量植株的可能性。但是, 之后利用国兰成熟植株的叶片获得再生植株未见成功报道。根尖存在分生组织, 取材方便, 但诱导出芽难度很大, 目前对根尖的研究集中在外植体消毒试验方面<sup>[4-5]</sup>。除根尖与叶外, 种子、芽(叶芽、花芽等)都是较好的外植体来源。

**1.1 种子** 兰花种子为蒴果, 轻薄细小, 胚发育不完全, 种子数量众多但发芽率低, 在自然环境下的萌发需要真菌的侵染, 两者存在共生关系。Bernard 开创了兰花种子的组织培养非共生萌发, 卡特利亚兰与蕾丽亚兰的杂交种子在人工培养基上成功萌发<sup>[6]</sup>。非共生萌发不需要借助真菌的侵染作用, 在加糖的适宜培养基中, 种子能够萌发, 目前在大部分的国兰品种中获得成功。有研究表明, 培养基中添加真菌诱导子能够促进种子的膨大, 提高种子的萌发率。真菌诱导子是指对作用植株具有专一性的菌丝体及其代谢物的混合物, 在培养基中添加的作用效果与浓度相关。蓝举民等<sup>[7]</sup>在蕙兰、春兰根部提取真菌制成混合的真菌诱导子, 发现能使春兰种子萌发率提升 15%~30%。此外, 在适宜的萌发培养基上, 春兰自交、杂交种子的萌发时间、萌发率与授粉时间相关, 以花后 2~5 d 为宜<sup>[8]</sup>。

蒴果消毒剂以 75%乙醇与 0.1%HgCl<sub>2</sub> 为常用, 消毒方式多种, 有采用 75%乙醇进行表面擦拭或者短时(30 s)浸泡, 然后用 HgCl<sub>2</sub> 浸泡灭菌, 也有使用 75%乙醇先进行表面消毒后再短时灼烧灭菌<sup>[7,9-11]</sup>。有研究表明, 由于兰花蒴果果皮较厚实, 使用 HgCl<sub>2</sub> 浸泡 20 min 甚至更长时间对萌发影响不大, 反而能更好地灭菌, 降低污染率<sup>[12]</sup>。种子的萌发率、萌发时间与种子的种类、熟度、培养基以及预处理方式有关。低浓度氢氧化钠或次氯酸钠溶液浸泡以及低温预处理后熟能使兰花种子萌发时间缩短, 并且提高萌发率<sup>[11,13]</sup>。此外, 还有研究表明金嘴墨兰的种子萌发以低无机盐浓度的基本培养基更为合适<sup>[14]</sup>。

**1.2 茎尖与侧芽** 早在 20 世纪 60 年代, 洋兰的茎尖组织培养以及工厂化生产已获得成功。80—90 年代, 国内开展了大量国兰茎尖与侧芽的组织培养工作。其中, 王熊等<sup>[15-16]</sup>利用茎尖与侧芽, 在建兰、蕙兰、春兰的多个园艺品种中获得大量的无性系; 贾勇炯等<sup>[17]</sup>也在建兰中利用腋芽获得无性系。2000 年以来, 黄萍萍等<sup>[18]</sup>利用素心兰的新生芽获得大量幼苗。利用茎尖与芽, 项艳等<sup>[19]</sup>在墨兰中获得成功。近期, 随着组培技术的发展, 冯兆光等<sup>[20]</sup>以春兰“龙字”的侧芽为外植体, 建立快繁体系。外植体的诱导成功率与获取部位有

**作者简介** 洪霞(1987—), 女, 浙江临海人, 助理农艺师, 硕士, 从事兰花新品种选育与推广工作。\* 通讯作者, 高级农艺师, 硕士, 从事花卉新品种选育以及组织培养工作。

**收稿日期** 2018-04-04

关,茎尖优于侧芽,中上部的侧芽优于基部。外植体大小一般为1~2 mm的芽,以带有1~2个叶原基为好<sup>[21]</sup>。也有研究表明,以国兰新芽为外植体,新芽以9~13 cm长为好,启动与诱导成功率最高<sup>[22]</sup>。但是,选取茎尖与新芽往往对母株造成一定的伤害,尤其是珍贵品种,外植体来源并不广泛。用芽端诱导启动虽然难度不大,但容易褐化,大部分在启动后褐化死亡<sup>[22]</sup>。

茎尖与侧芽的消毒处理主要分为2种,一是75%乙醇先浸泡15 s或者20 s,再转入0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡10 min。二是使用10% NaClO 浸泡10 min。与种子的消毒方式相比,由于茎尖与侧芽较嫩且不像种子一样有种皮包裹,消毒时间缩短。此外,也有研究认为,蕙兰的茎尖先以75%乙醇处理30 s,再使用10% NaClO 处理20 min的消毒效果较好<sup>[5]</sup>。

**1.3 花芽** 国兰的花梗上带有芽,也可以作为外植体的来源。人们最早利用蝴蝶兰的花芽获得快繁无性系。与洋兰相比,国兰的花器官诱导成功率不高。其中,贾勇炯等<sup>[23]</sup>利用MS培养基获得彩心建兰无性系;张志胜等<sup>[24]</sup>诱导出下山墨兰原球茎,而仙殿白墨与企剑黑墨的花芽经过诱导未能启动;曾宋君等<sup>[25]</sup>以MS为基础培养基,添加活性炭与合适的激素,使仙殿白墨及其杂交种的花芽成功诱导并启动。最近的研究表明,春剑的花梗切断在诱导出愈伤过程中,褐化率与切断的长度、厚度相关,大部分花梗切段在合适的激素配比下能够转绿膨大,但后续并没有增殖分化的报道<sup>[26]</sup>。

花芽的选取长度一般在2~6 cm,在消毒灭菌前小心剥除外面的苞片,再按照常规消毒方法进行消毒即可<sup>[23]</sup>。另有研究先用洗涤液清洗带土的花苞,再剥除苞片,每剥除几片苞叶就用60%乙醇或者HgCl<sub>2</sub> 消毒,防止污染<sup>[21]</sup>。

## 2 培养基

国兰组织培养选用的基础培养基与其他植物类似,如MS、KC、B5、Kyoto等。杂交春兰的萌发以MS为好,增殖分化以WPM为好<sup>[27]</sup>。在中透艺春兰的根状茎增殖分化过程中,B5培养基虽然增殖快但长势弱、易褐化,W培养基增殖慢,总体评价以3/4 MS为好<sup>[28]</sup>。仙殿白墨的种子萌发后,根状茎的增殖以1/2 MS、MS培养基为好,B5、N6、Kundson C、V&W、White等培养基增殖效果不好;分化以1/2 MS培养基为好,B5培养基虽然出芽效果好,但是没有根<sup>[25]</sup>。墨兰(*Cymbidium sinense*)×兔耳兰(*Cymbidium lancifolium*)种间杂种根状茎芽分化也以1/2 MS培养基为好<sup>[29]</sup>。综上所述,在最初开展试验优先以MS或1/2 MS为基本培养基。

## 3 植物生长调节物质

**3.1 激素** 目前,使用的激素分为两大类,细胞分裂素与生长素。细胞分裂素主要有6-BA、KT、TDZ等,生长素常用的有IBA、NAA、IAA、2,4-D等。张菊野等<sup>[30]</sup>、牛田等<sup>[31]</sup>研究表明,NAA利于春兰原球茎的增殖与根的形成,而BA则利于芽的分化。但是,同样在春兰上,与张菊野的研究恰好相反,陈尔等<sup>[32]</sup>认为6-BA浓度的适当提高,NAA浓度的降低有利于春兰根状茎的增殖,可见,品种不同、来源不同的春兰根状茎增殖分化条件也会发生变化。邢海等<sup>[28]</sup>对中透艺春

兰根状茎增殖分化研究表明,6-BA与TDZ都能促进增殖,但在相同浓度6-BA下,TDZ比NAA更能促进根状茎的增殖。卜朝阳等<sup>[13]</sup>研究表明不同比例6-BA与NAA激素组合对蕙兰根状茎增殖影响较大,以组合4 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA为最佳。贾勇炯等<sup>[17]</sup>对簇生建兰花芽诱导进行研究,发现NAA在1~5 mg/L和BA在0.5~3.0 mg/L的范围内,提高激素的浓度有利于花芽诱导产生原球茎。从以上研究来看,不同品种的兰花增殖分化需要的生长素与细胞分裂素的比例并不相同,但不论是增殖还是分化,激素的添加需要合适的浓度范围<sup>[33]</sup>。

**3.2 有机物质** 马铃薯汁、苹果汁、椰子汁、香蕉泥等有机物质的添加能够促进兰花种子的萌发,根状茎增殖与分化。研究表明,添加20%椰子汁促进小凤兰根状茎的分化,添加60 g/L土豆泥显著促进试管苗生长<sup>[34]</sup>。谢利等<sup>[35]</sup>在杂交兰生根培养中添加100 g/L马铃薯汁能促进幼芽生根壮苗。刘道敏等<sup>[36]</sup>在蕙兰“绿蕙红舌”种子的组织培养过程中,从萌发、增殖到分化以及最后的生根壮苗均以添加200 mg/L的马铃薯汁为好。但是,对于春兰的根状茎增殖来说,在猕猴桃汁、香蕉汁、梨汁、苹果汁、白萝卜汁、胡萝卜汁、马铃薯汁、红薯汁8种有机物中,以猕猴桃汁的效果最佳,根状茎中细胞分裂相关基因的表达显著提高<sup>[37]</sup>。卜朝阳等<sup>[13]</sup>在种子萌发过程中添加10%椰子汁为好。施福军等<sup>[14]</sup>在墨兰的生根培养中认为添加100 g/L营养附加物,如香蕉泥、马铃薯汁、椰子汁、红薯汁、玉米汁等均能促进生根壮苗。对建兰“岭南奇蝶”生根过程研究,添加香蕉与马铃薯的培养基对生根的效果要显著优于添加椰子汁的培养基<sup>[12]</sup>。春兰与大花蕙兰杂交的后代添加椰子汁增殖效果最好,生根壮苗以添加马铃薯汁与香蕉泥为好<sup>[38]</sup>。在不同有机物质的添加过程中,一般使用的椰子汁浓度为10%,马铃薯汁、香蕉泥等则在50~100 g/L为常用。

**3.3 活性炭** 添加活性炭主要是利用活性炭的吸附作用,减少培养材料代谢过程中产生的有害物质,减轻褐化现象。不同浓度的活性炭对墨兰地下根状茎段诱导效果不同,以1.0 g/L为好<sup>[39]</sup>。陈兰芬等<sup>[40]</sup>在墨兰芽分化时认为添加的活性炭浓度以0.3 g/L为好。但在其他品种国兰中有较多研究表明活性炭的添加对芽分化起到抑制作用,如小凤兰的研究表明活性炭添加促进苗的分化但抑制芽的分化;添加0.3 g/L活性炭能够促进玉女兰类的杂交兰类原球茎增殖,而芽分化较少,不添加活性炭时则有大量芽分化<sup>[34]</sup>。刘映雯等<sup>[41]</sup>对莲瓣兰“滇梅”根状茎增殖分化的研究发现,添加0.5 g/L活性炭对增殖来说较为合适,而在分化时以不添加活性炭为好,认为有可能活性炭在吸附有害物质的同时也吸附了叶酸激素等一些活性物质。褚云霞等<sup>[42]</sup>发现活性炭的存在严重抑制春兰根状茎分化成芽,与上述活性炭添加抑制芽分化的研究结果具有一致性。此外,陈尔等<sup>[32]</sup>发现1.0~3.0 g/L的活性炭有利于春兰根状茎的增殖。在幼芽生根方面,不同品种的国兰适宜活性炭浓度并不相同,“宋梅”“集圆”杂交兰添加3.0 g/L活性炭时有利于生根<sup>[43]</sup>,而“环球荷鼎×九章

梅”杂交种在活性炭浓度为1.0 g/L时,组培苗平均新根数与新根长数最大<sup>[44]</sup>。

#### 4 培养方式与条件

国兰的组织培养可以采用固体或者液体培养基,大部分采用固体培养基培养。有研究用液体培养基以彩心建兰茎尖为外植体诱导获得无性系<sup>[45]</sup>;也有研究认为液体培养基更有利于国兰种子的萌发,萌发早且整齐度高<sup>[46]</sup>。与大部分植物组培条件相似,培养温度为(25±2)℃,光照强度为2 000~2 500 lx。对中透艺春兰的研究发现,当光照为1 000 lx或者3 000 lx时,不利于其分化时保持艺向稳定,以2 000 lx左右为好<sup>[27]</sup>。不同的光源对春兰与大花蕙兰杂交后代组培苗生长影响不同,墨兰×大花蕙兰F<sub>1</sub>代生长以LED红蓝复合光(2RB)为好<sup>[47]</sup>。根据研究的材料与目的的不同,光照时间有8、12、14 h/d不等。兰花喜酸,在组织培养时pH一般在5.4左右,根据品种的不同在5.0~6.0变化。

#### 5 展望

我国兰花资源丰富,国兰深受人们喜爱。不管是野外采集还是对传统品种的分株繁殖,都不能满足市场需求,导致价高甚至一苗难求。组织培养扩大繁殖是保存稀有品种以及推进国兰商品化的重要手段。目前,通过组织培养也有部分国兰品种实现商品化,市场上能见到的组培苗品种有隆昌素、宋梅、大富贵、环荷等<sup>[48]</sup>。但是,目前很多品种由于存在技术上的原因难以实现大量组培扩繁。此外,大花蕙兰花色艳丽,经济效益好,可与国兰进行杂交获得杂交种质,改造国兰创制新品种,但杂交种质的萌发与成苗必须以组织培养技术来支撑。因此,通过对不同来源外植体实现组织培养技术突破,将对国兰市场的良性发展起到助力作用。

#### 参考文献

- [1] 杨冬之,刘海娟,罗毅波,等.国兰品种分类研究[J].安徽农业科学,2007,35(29):9242-9243.
- [2] 曾宋君,吴坤林,张建霞,等.国兰新品种的选育和杂交育种研究进展[J].中国野生植物资源,2013,32(1):1-5.
- [3] 杨增海.园艺植物组织培养[M].北京:农业出版社,1987:77-78.
- [4] 李子红,贾燕,珍品兰花快速繁殖与养护[M].上海:上海科学技术出版社,2006:11.
- [5] 于永畅,张安琪,聂硕,等.国兰组织培养中外植体消毒试验研究[J].山东林业科技,2013(5):55-57.
- [6] BERNARD N.L' evolution dans la symbiose.Les orchidées et leur champignons commensaux[J].Ann Sci Nat Bt Ser,1909,9(9):191-196.
- [7] 蓝举民,刘恩,龚明福.真菌诱导子对春兰种子萌发及组培苗成活的影响[J].农技服务,2016,33(3):101.
- [8] 王晓英,张林,李承秀,等.春兰授粉和种子无菌萌发研究[J].农学学报,2017,7(1):69-72.
- [9] 李玉萍,罗凤霞,汤庚国,等.兰属植物杂交亲和性及杂交胚培养研究[J].林业科技开发,2015,29(5):14-17.
- [10] 叶秀仙,黄敏玲,林榕燕,等.素心建兰无菌播种快繁技术研究[J].福建农业学报,2015,30(10):939-943.
- [11] 孙玉芬.兰属杂交种子无菌播种及再生体系的建立[D].杭州:浙江农林大学,2013:15.
- [12] 陈春.建兰“岭南奇蝶”种子无菌萌发与离体繁殖技术[J].亚热带农业研究,2016,12(2):125-129.
- [13] 卜朝阳,何荆洲,严华兵,等.3种野生国兰无菌播种研究[J].西南农业学报,2011,24(4):1495-1498.
- [14] 施福军,莫昭展,韦江萍,等.墨兰的无菌播种及根状茎的增殖研究

- [J].安徽农业科学,2008,36(32):13968-13969.
- [15] 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.
- [16] 王熊,陈季楚,刘桂云,等.建兰和秋兰原球茎的发生及其无性系的建立[J].植物生理学报,1981,7(2):203-207.
- [17] 贾勇炯,陈放,林宏辉,等.建兰簇生原球茎的诱导及分化诸因素研究[J].四川大学学报(自然科学版),1998,35(2):258-262.
- [18] 黄萍萍,黄爱勤.素心兰组织培养技术研究[J].闽西职业大学学报,2000(4):68-69.
- [19] 项艳,於凤安,彭镇华.墨兰离体快繁研究[J].林业科学研究,2003,16(4):434-438.
- [20] 冯兆光,李小龙,徐兵.春兰“龙字”的离体快繁技术研究[J].山东林业科技,2017,48(2):46-48.
- [21] 徐程,詹忠根,张铭.中国兰的组织培养[J].植物生理学通讯,2002,38(2):171-174.
- [22] 吴汉珠,王续行,林泰碧.‘中国兰’茎顶组织培养研究[J].园艺学报,1987,14(3):203-207.
- [23] 贾勇炯,曹有龙,王水,等.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.
- [24] 张志胜,何琼英,傅雪琳,等.中国兰花远缘杂交及杂交种子萌发的研究[J].华南农业大学学报,2001,22(2):62-65.
- [25] 曾宋君,程式君,张京丽,等.墨兰及其杂种的组织培养与快速繁殖[J].广西植物,1998,18(2):153-156.
- [26] 李灿,王永清.春剑花梗离体培养研究[J].安徽农业科学,2016,44(4):178-182.
- [27] 吕秀立,张冬梅.春兰杂交种子非共生萌发与快速繁殖[J].上海农业学报,2011,27(1):41-45.
- [28] 邢海,孙叶芳,郑琪,等.中透艺春兰根状茎的组培快繁及艺向培养研究[J].现代农业科技,2016(8):139-140.
- [29] 陈云喜,何丹丹,廖浩如,等.影响墨兰×兔耳兰根状茎芽分化的因素[J].中国农学通报,2010,26(9):65-69.
- [30] 张菊野,俞玲凤,连宏坤.几种影响春兰原球茎生长与分化的因素[J].植物生理学通讯,1993,29(3):175-178.
- [31] 牛田,张林,王厚新,等.春兰‘金荷鼎’×‘赤蕙’杂交根状茎芽分化及生根的研究[J].中国农学通报,2014,30(13):252-255.
- [32] 陈尔,王华新,陈宝玲,等.春兰根状茎增殖的影响因素[J].广西林业科学,2014,43(3):319-321.
- [33] 王玉英,李灵丽,刘丹,等.‘春绿兰’×‘虎雪兰’F<sub>1</sub>代组培苗快繁技术[J].北方园艺,2018,42(3):87-91.
- [34] 杨靖,谢利,曾瑞珍,等.影响‘小凤兰’根状茎增殖、分化和吐苗的因素研究[J].北方园艺,2016(2):105-109.
- [35] 谢利,马晓娟,郭和蓉,等.杂交兰类原球茎增殖中芽分化的控制和快速繁殖[J].植物生理学报,2014,50(2):209-213.
- [36] 刘道敏,荣维国,郝睿.国兰“绿蕙红舌”的组织培养技术[J].安徽农业大学学报,2012,39(4):656-659.
- [37] 黄玮婷,曾丽婷,吴博文,等.不同有机添加剂及柠檬酸钠组合对春兰根状茎增殖的影响[J].安徽农业大学学报,2017,44(6):1112-1118.
- [38] 孙玉芬,宁惠娟,张韶伊,等.春兰与大花蕙兰杂交后代根状茎增殖与分化条件[J].浙江农林大学学报,2014,31(1):156-161.
- [39] 翁锦周,林加耕,林江波.不同浓度活性炭对墨兰离体培养的影响[J].亚热带植物科学,2006,35(3):37-38.
- [40] 陈兰芬,王晶,田亦平,等.墨兰组织培养根状茎分化技术研究[J].河北林果研究,2011,26(1):22-24.
- [41] 刘映雯,许春梅,王丹,等.莲瓣兰“滇梅”根状茎的增殖与分化技术研究[J].安徽农业科学,2014,42(10):2890-2892.
- [42] 褚云霞,张永春,靖相密,等.春兰根状茎增殖与分化培养[J].上海农业学报,2007,23(3):82-85.
- [43] 于永畅,张林,王厚新,等.影响春兰杂交兰‘宋梅’×‘集圆’组培苗生根的因素[J].北方园艺,2013(7):66-68.
- [44] 马辉,张甜,梁丽君,等.春兰杂交种子无菌萌发及植株再生培养技术[J].江苏农业科学,2017,45(21):49-52.
- [45] 傅向东,钱秀红,毛碧增,等.几种理化因子对建兰原球茎生长分化的影响[J].浙江农业大学学报,1997,23(5):547-550.
- [46] 陈银龙.国兰无菌播种技术研究[J].安徽农业科学,2006,34(17):4291.
- [47] 张宇欢,李夏媛,王玉英,等.LED不同光质对墨兰×大花蕙兰F<sub>1</sub>代组培苗生长及生理指标的影响[J].热带农业科学,2016,36(9):1-6.
- [48] 黄国林,庄志勇,易春,等.国兰商品化组培快繁生产现状分析[J].湖南农业科学,2012(18):27-29.