

兜兰无菌播种和组织培养研究进展

曾宋君, 陈之林, 吴坤林, 段俊*

(中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 兜兰是兰科植物中无菌播种和组织培养最困难的种类之一, 商业上还没有无性克隆进行种苗大规模生产的报道。综述了兜兰的无菌播种和组织培养的研究进展, 展望了其应用前景。

关键词: 兜兰; 无菌播种; 组织培养

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 03-0793-04

A Resume of Germination and Mericlone of *Paphiopedilum*

ZENG Song-jun, CHEN Zhi-lin, WU Kun-ling, and DUAN Jun*

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The aseptical germination of seeds and mericlone of *Paphiopedilum* orchid are difficult and there is no report of its commercial propagation by mericlone. The research progress and prospect of germination and mericlone of *Paphiopedilum* orchid are briefly summarized in this paper.

Key words: *Paphiopedilum*; Aseptic sowing; Tissue culture

兜兰 (*Paphiopedilum*) 同大多数兰花一样, 种子没有胚乳, 在自然环境中需与真菌共生才能萌发, 且萌发率极低。兰花的传统繁殖方式为分株繁殖, 繁殖系数低、速度慢, 难以满足保护和开发的要求。兰花的组织培养始于 20 世纪 60 年代, Morel (1960) 采用大花蕙兰的茎尖为外植体, 诱导形成类原球茎并分化植株, 为实现兰花的工厂化生产奠定了基础。之后组培在其它许多兰花上获得了成功 (Arditti & Ernst, 1993; 范成明 等, 2003)。但兜兰人工授粉结实率低, 其无菌播种和组织培养难度大, 是兰科植物中种子试管培养最困难的属之一。本文综述了兜兰的无菌播种和组织培养的研究进展, 并展望了其应用前景, 以期对兜兰属植物的资源保护和商业应用提供参考。

1 无菌播种

兜兰的无菌播种一般不需添加植物生长调节剂, 萌发的原球茎能发育成小苗, 在添加合适浓度的植物生长调节剂时能进行原球茎的增殖, 然后再分化成苗。兜兰果荚的消毒通常用自来水洗净, 70% 酒精表面消毒 30 s, 再以 0.1% 的升汞溶液消毒 15 min, 最后用无菌水冲洗 5 次, 用无菌滤纸吸干水分, 用解剖刀切开果荚, 将种子散落到培养基中培养 (曾宋君 等, 2006)。

1.1 兜兰不同品种种子萌发率的差异

不同兜兰品种的结实率和萌发率不同, 总的说来, 杂交种的萌发比原生种容易。杏黄兜兰 (*Paphiopedilum armeniacum*) 授粉后 120 d 的种子在各供试培养基上较硬叶兜兰 (*P. micranthum*) 的萌发率低 (陈之林 等, 2004)。带叶兜兰 (*P. hirsutissimums*) 授粉后 150 d 左右的种子萌发率可达 50% (曾宋君 等, 2006)。 *P. delenatii* 的萌发率可达 68%, *P. bellatulum* 可达 69.7%; 而菲律宾兜兰

收稿日期: 2007-02-08; 修回日期: 2007-04-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (kscx2-sw-319); 中国科学院知识创新工程前沿项目 (20023301)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: duanj@scib.ac.cn)

(*P. philippinense*) 的萌发率仅为 32.8% (Li & Li, 1999)。

1.2 果荚成熟度对种子萌发的影响

不同栽培条件下果荚的成熟时间可能有一定的差异。果荚采收的时间对种子萌发有重要的影响。通过对杏黄兜兰和硬叶兜兰的播种试验发现授粉后 120 d 的种子可萌发, 而 180 d 时果荚已近开裂, 种子为黑色, 在试验中没有萌发, 这可能与完全成熟的种子进入休眠期或产生某些抑制物质有关 (陈之林 等, 2004)。有些成熟的种子在休眠时要培养数年才能萌发。有些兜兰种子在果荚还是青色时就有可能进入了休眠。*P. primulimum* 在授粉后 110 d, *P. delenatii* 在 150 d, 菲律宾兜兰和 *P. bellatulum* 在 130 d 时萌发率最高 (Li & Li, 1999)。

1.3 光照对种子萌发的影响

不同的兜兰品种对光照的要求不一样, 有些兜兰种子必须先经历暗培养才能萌发, 有些兜兰种子不需要暗培养就能萌发。Stimart 和 Ascher (1981) 报道暗培养有利于兜兰种子的萌发以及幼苗早期的生长。杏黄兜兰和硬叶兜兰经历 3 周的暗培养有利于提高萌发率 (陈之林 等, 2004)。

1.4 培养基种类对种子萌发的影响

兜兰种子萌发使用的基本培养基有 RE (Arditti, 1982), MS (Murashige & Skoog, 1962), 1/2 MS, 1/4MS, KC (Knudson, 1946), VW (Vacin & Went, 1949), Thomale GD 和花宝 (Hyponex) 1 号 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Li & Li, 1999) 等。硬叶兜兰和杏黄兜兰在 RE 培养基上萌发率分别为 32.4% 和 25.2%, 带叶兜兰可达 50%; 在 MS 培养基上, 硬叶兜兰仅有极少种子萌发, 而杏黄兜兰没有萌发, 采用 1/4MS 培养基它们的萌发率分别为 11.0% 和 8.1% (陈之林 等, 2004; 曾宋君 等, 2006)。在 Thomale GD 培养基上, *P. delenatii* 和 *P. primulimum* 的萌发率均比在其它培养基上高 (Li & Li, 1999)。可见培养基的盐分组成和浓度是影响种子萌发的重要因素。液体培养对兜兰 *P. bellatulum*, *P. delenatii*, *P. primulimum* 的种子萌发均表现出一定的促进作用 (Li & Li, 1999)。

1.5 有机添加物和活性炭对种子萌发的影响

一般认为, 在植物胚培养中加入适量的椰乳对种子的萌发有利, 在杏黄兜兰和硬叶兜兰的无菌播种中, 椰乳对种子的萌发有较好的促进作用, 试验用的椰乳最适浓度为 $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, 但在后期成苗时会产生一胚多苗现象, 部分苗生长不正常, 这可能与椰乳中富含玉米素 (Zeatin) 等植物生长调节剂有关。胰蛋白胍和酵母提取物对杏黄兜兰和硬叶兜兰种子的萌发没有显著的影响, 但有利于苗的生长 (陈之林 等, 2004)。培养基中加入活性炭一般会抑制兜兰种子的萌发。带叶兜兰的组织培养中, 在 RE 培养基中加入活性炭, 萌发率由 50% 降为 45%, 但种子出芽后生长较快 (曾宋君 等, 2006)。而 *P. bellatulum* 无菌播种时附加活性炭则可提高其萌发率 (Li & Li, 1999)。

1.6 原球茎的诱导增殖和生根壮苗培养

由种子而来的原球茎在 RE 培养基或花宝 1 号 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 花宝 2 号 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中附加椰乳 $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和活性炭 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 增殖和分化成苗效果均较好, 没加入活性炭, 形成的芽有部分会玻璃化 (曾宋君 等, 2006)。

将原球茎分化而来的小苗分成单株后转移到生根壮苗培养基 RE 上, 生根率均可达 95% 以上。添加香蕉汁时, 植株生长较快, 根系较好; 采用花宝 1 号 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 花宝 2 号 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蛋白胍 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 活性炭 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 10% 香蕉汁, 效果好且成本较低, 可以在生产中使用 (陈之林 等, 2004; 曾宋君 等, 2006)。

2 组织培养

2.1 外植体的选择

兜兰组织培养过程中, 外植体的灭菌难度大。采用茎尖作外植体时, 即使通过常规消毒仍大量地

被细菌、真菌、病毒和其它病原菌感染 (Stewart & Button, 1975; Huang, 1988), 采用 2~3 mm 的茎尖生长点为外植体, 能有效提高消毒的成功率, 但由于外植体过小, 外植体的启动生长速度慢 (Stewart & Button, 1975)。Huang (1988) 利用 *P. philippinense* × *P. Susan Booth* 等杂种兜兰种子无菌播种所获无菌苗的茎尖为外植体诱导出了丛生芽并能直接成苗。

Chen 等 (2004) 利用菲律宾兜兰 (*P. philippinense*) 的杂交种 PH59、PH60 的叶片为外植体诱导出了不定芽和带根的小植株。采用未切割的 1.5 cm 完整叶和 0.5 cm 的叶片切块为外植体时, 其不定芽诱导率和出芽个数与外植体形式、培养方式、植物生长调节剂浓度及兜兰品种有关。叶片未切割时, 在 1/2MS 培养基上 PH59、PH60 均有 25% 的外植体分化出芽, 添加植物生长调节剂时, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 能促进 PH59 不定芽的形成, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D, $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 能促进 PH60 不定芽的生成。而叶片切割时, PH60 只在 1/2MS + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 诱导出了丛生芽, 其它所有植物生长调节剂及其组合均表现出一定的抑制作用; 而 PH59 在 TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时尽管出芽的叶片数减少, 但每个叶片的平均出芽数增多, 可达 7.0 个, 对照为 5.6 个。

2.2 愈伤组织的诱导、增殖和再生

兜兰杂种 *P. callosum* 'Oakhi' × *P. lawrenceanum* 'Tradition' 由种子萌发而来的原球茎在 1/2MS + $1.0 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D + $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 培养基上能形成愈伤组织, 单独使用 TDZ 未能诱导出愈伤组织, 单独使用 2, 4-D 时诱导率低。愈伤组织在 1/2MS + $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 培养基上能增殖, 增长倍率可达 2.24。愈伤组织在 1/2MS + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 上能形成类原球茎分化出再生芽形成完整株 (Lin et al., 2000)。

2.3 不定芽的增殖和直接成苗

目前兜兰不定芽诱导常使用的植物生长调节剂主要是生长素类 (如 2, 4-D 和 NAA) 和细胞分裂素类 (如 BA、ZT 和 KT)。兜兰杂交种茎节培养时, 在无植物生长调节剂的 1/2MS 培养基上, PH59 有 33.3% 形成了芽, 而 PH60 无不定芽生成 (Chen et al., 2002)。兜兰杂交种茎节在初代培养时, BA 对不定芽的诱导和生根的影响不大, 在继代增殖中, 3、9、27、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BA 对芽的增殖表现出抑制作用, 对根的诱导除低浓度的 BA (3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 在第 2 代时表现出促进作用外, 其余浓度和代数中均表现出抑制作用 (Huang et al., 2001)。

TDZ (0.003、0.03、0.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 在初代培养时对不定芽的增殖和生根没有明显影响, 但继代培养时则对不定芽诱导表现出抑制作用, 浓度越高, 抑制作用越强; 除在第 3 代时低浓度的 TDZ (0.003 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 可明显促进生根外, TDZ 多表现为抑制生根, 浓度越高, 抑制作用越强 (Huang et al., 2001)。杂种 PH60 在 TDZ 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能获得较高的不定芽诱导率 (Chen et al., 2002)。

NAA 对不定芽的生长影响不大, 但较高浓度 ($>1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对不定芽的生成有轻微抑制作用; 对根的诱导, 较高浓度 0.3 和 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较低浓度 0.03 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果好 (Huang et al., 2001)。

2, 4-D 对兜兰茎节不定芽的诱导有一定的促进作用, 其浓度以 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时效果较好; PH59 在 1/2MS 培养基上附加 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 和 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 组合时效果比单独使用 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-D 或 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 好 (Chen et al., 2002)。

另外, 在培养基中加入一定浓度的硫酸腺嘌呤和磷酸二氢钠对不定芽的诱导和不定根的生成有一定的促进作用 (Huang et al., 2001)。糖类物质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。在兜兰的组织培养中, 蔗糖的效果比麦芽糖好, 浓度以 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的效果最好 (Huang et al., 2001)。在有机添加物中, 150 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 的椰乳能较好地促进不定芽的诱导和不定根的形成。1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水解酪蛋白具有相同的效果。10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的土豆汁能促进不定芽的生长, 但对不定根的诱导影响不大, 香蕉粉能促进不定芽的形成, 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的效果最好, 但对生根起抑制作用, 特别是在高

浓度 40 和 60 g · L⁻¹ 时非常明显 (Huang et al., 2001)。

3 试管苗的移栽

兜兰在出瓶前一般要在栽培温室中炼苗 2 周, 然后栽培在碎砖块和火山石混合基质或树皮和火山石的混合基质中, 保持较高的空气湿度, 硬叶兜兰和杏黄兜兰成活率可达 70% 以上 (陈之林等, 2004)。带叶兜兰可达 75% 以上 (曾宋君等, 2006)。而 Chen 等 (2002, 2004) 利用泥炭藓做基质, 试管苗的成活率高, 最高时可达 100%。

4 展望

兜兰由于具有极高的观赏价值和较高的经济价值, 在欧美广受人们欢迎, 其商业生产目前多采用无菌播种, 仅少量无性克隆的研究报道, 还没有无性克隆规模化生产的报道。在无菌播种时, 由于结实率和种子萌发率较低, 成苗差, 品种间差异大等原因, 有待进一步研究, 以提高种子萌发的成功率。同时由于无菌播种生产的后代不一致, 稳定性较差, 因此利用组织培养无性克隆兜兰种苗, 特别是无性克隆一些已选育出来的优良株系, 是今后兜兰种苗生产的研究重点, 也是兜兰产业化的发展方向。通过无菌播种和组织培养生产出大量观赏价值高的兜兰原种满足市场需求, 有利于降低兜兰原生种的商品价格, 从而加强对兜兰原生种的保护和可持续利用。

References

- Arditti Joseph. 1982. Orchid biology, reviews and perspective II. USA: Cornell University Press: 352.
- Arditti J, Ernst R. 1993. Micropropagation of orchids. New York: John Wiley and Sons.
- Chen T Y, Chen J T, Chang W C. 2002. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. In *Vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 38 (6): 595 - 597.
- Chen T Y, Chen Jen-tung, Chang Wei-chin. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 11 - 15.
- Chen Zhi-lin, Ye Xiu-lin, Liang Cheng-ye, Duan Jun. 2004. Seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (4): 540 - 542. (in Chinese)
- 陈之林, 叶秀琳, 梁承郢, 段俊. 2004. 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管苗培养. *园艺学报*, 31 (4): 540 - 542.
- Fan Cheng-ming, Li Zhi-lin, He Yue-qiu. 2003. Advances on orchid tissue culture and molecular biology. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (4): 487 - 491. (in Chinese)
- 范成明, 李枝林, 何月秋. 2003. 兰花组织培养及分子生物学研究进展. *园艺学报*, 30 (4): 487 - 491.
- Huang L C. 1988. A procedure for asexual multiplication of *Paphiopedilum in vitro*. *Am. Orchid Soc. Bull.*, 57: 274 - 278.
- Huang L C, Lin C J, Kuo C I, Huang B L, Murashige T. 2001. *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. *Sci. Horti.*, 91: 111 - 121.
- Knudson L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *Bull. Am. Orchid Soc.*, 15: 214.
- Li Nian, Li Yong-yi. 1999. Effect of capsular maturity, medium composition and liquid culture on seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum* spp. *Paphiopedilum in Taiwan II*. Taiwan *Paphiopedilum* Society: 10 - 12.
- Lin Y H, Chang C, Chang W C. 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 62: 21 - 25.
- Morel G. 1960. Producing virus-free *Cymbidium*. *Am. Orchid Bull.*, 29: 495 - 497.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 495 - 497.
- Stewart J, Button J. 1975. Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. *Ame. Orchid Soc. Bull.*, 44: 591 - 599.
- Stimart D P, Ascher P D. 1981. *In vitro* germination of *Paphiopedilum* seed on a completely defined medium. *Scientia Hort.*, 14: 165 - 170.
- Vacin E, Went F. 1949. Some pH changes in nutrient solution. *Botan. Gaz.*, 110: 605 - 613.
- Zeng Song-jun, Chen Zhi-lin, Duan Jun. 2006. Asepsis sowing and *in vitro* propagation of *Paphiopedilum hirsutissimum* Pfitz. *Plant Physiology Communications*, 42 (2): 247. (in Chinese)
- 曾宋君, 陈之林, 段俊. 2006. 带叶兜兰的无菌播种和离体快繁. *植物生理学通讯*, 42 (2): 247.