



王松太,曾丽婷,方中明,等.兰属植物组织培养研究进展[J].黑龙江农业科学,2019(10):144-151.

兰属植物组织培养研究进展

王松太,曾丽婷,方中明,周 银

(武汉生物工程学院 应用生物技术研究中心,湖北 武汉 430415)

摘要:利用组织培养技术能够进行兰属植物的快速繁殖,也能保持其优良品性,加速育种进程。近些年,兰属植物在组织培养方面已经取得较大进展。为促进兰属植物的组织培养和产业化大规模生产,本文以兰属植物中的春兰、墨兰、建兰、寒兰和蕙兰等为代表,从外植体选择、培养基选择及激素、有机添加物等方面进行总结与讨论,以期对兰属植物的组织培养和产业化大规模生产提供有效的参考。

关键词:兰属;组织培养;根状茎;增殖;分化

广义的兰花是兰科植物的总称,是单子叶植物中最大的且进化程度最高的科。全世界约700~800属,30 000~35 000种,其中可供栽培的约有2 000种,主要分布于热带和亚热带地区^[1]。常见的兰科植物有春兰、蕙兰、建兰、蝴蝶兰、石斛、卡特兰、文心兰等,大多兰花都具有极高的欣赏、经济及药用价值。我国有丰富的野生兰花资源,约173属1 200多种^[2]。兰花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。Morel^[3]以大花蕙兰的茎尖为外植体,将其诱导成原球茎并成功分化成植株,首次获得兰花无病毒苗,开启了兰花的组织培养。目前大约已有60余属数百种兰花可以用组织培养的方法进行繁殖,其中春兰、蕙兰、墨兰、寒兰、建兰、春剑、莲瓣兰等珍稀国兰品种也相继建立了快繁体系^[4]。国兰的快繁体系中材料来源分为种子培养和茎尖、侧芽及花芽等外植体培养,其中种子诱导形成的原球茎进一步生长会形成特殊的根状茎,根状茎可以作为增殖扩繁体系的材料,也可以分化出芽,小芽长大后经过壮苗生根可以作为组培苗进行移栽。国兰野生种及其杂交种的快速繁殖,包括根状茎增殖和分化等关键步骤。不同的国兰品种所需要的条件不同,因此限定了不同国兰品种快速繁殖的进程。本文以国兰中的春兰、墨兰、建兰、寒兰和蕙兰等为主要代表,对组织培养与快速繁殖中外植体选择、培养基选择及

激素、有机添加物等方面进行总结与讨论,以期对兰属植物的组织培养和产业化大规模生产提供有效的参考。

1 春兰的组织培养研究进展

春兰作为国兰中的名贵品种,其根状茎增殖与分化研究已取得不少进展。春兰组织培养多以无菌种子作为起始材料,获得无菌根状茎材料后进一步进行增殖分化。

春兰种子与其他兰属种子一样极其微小、种皮厚且种胚发育不完全,极不易萌发^[5-7],因此,当春兰种子萌发时,应选择发育较完全而没有过老的蒴果种子,对种子进行低温、酸碱、酶预处理后使种皮破坏,并选择合适的培养基提供适量营养使种子胚正常发育。当用春兰种子作为外植体建立春兰无菌繁殖体系时,研究发现授粉后生长8~9个月的春兰蒴果种子最容易萌发^[8],而对于春兰杂交蒴果来说,生长5个月的蒴果萌发率最高,且春兰杂交蒴果萌发率高于春兰蒴果^[9]。对春兰种子进行预处理时,先暗培养再进行光照培养是其萌发的保证^[10]。春兰杂交种子用10% NaClO进行预处理后萌发率最高,杂交种子萌发时在葡萄糖为碳源的培养基上萌发率优于蔗糖碳源,NAA、6-BA对春兰杂交种子的萌发基本无影响,且添加2 g·L⁻¹蛋白胨较其他有机添加物更适宜春兰杂交种子萌发^[11]。春兰‘宋梅’与墨兰‘白墨’的杂交率为100%,果实发育65~150 d时适于萌发,且蒴果种子130 d时,萌发所需时间为96 d,相对最短^[12]。

用春兰根状茎材料进行增殖与分化是春兰快繁常用的技术手段,优化春兰增殖与分化的培养基可以大大提高春兰繁殖效率,并利于春兰快繁的工厂化。在进行春兰根状茎增殖时,根状茎以

收稿日期:2019-03-20

基金项目:国家自然科学基金(31700626);湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2016304)。

第一作者简介:王松太(1980-),男,硕士,实验师,从事分子生物学研究。E-mail:408195646@qq.com。

通讯作者:周银(1983-),女,博士,副教授,从事植物分子生物学研究。E-mail:ripplet0931@hotmail.com。

掰开方式分割且增殖块有 3~5 条根状茎较适宜,接种时横向平放的根状茎分化效果显著好于倒接和正接^[13]。春兰相对更适宜无机盐含量低的培养基^[14],其增殖、分化的最适基本培养基是 1/2 MS 培养基,杂交品种生根的最佳培养基为 MS 培养基,也有报道表明 B₅ 与 1/2 MS 培养基进行转换培养较单一培养基更适于春兰根状茎增殖^[15]。春兰组培中常使用的细胞分裂素有 6-BA、ZT 和 KT,生长素有 IAA、2,4-D 和 NAA。研究者对不同浓度的生长素和细胞分裂素组合对春兰增殖分化的影响进行探讨,发现细胞分裂素利于春兰根状茎的增殖,生长素利于春兰根状茎的生长分化。在春兰‘绿云’组培中,BA、KT 对根状茎的增殖有明显的促进作用,IBA 促进根状茎的生长,较 NAA 效果好,添加 ZT 能显著促进春兰根状茎分化^[14],6-BA 相对 NAA、椰汁以及活性炭对黔南野生春兰原球茎增殖的影响最大^[16]。而 2,4-D 和 KT 对杂交组合春兰与大花蕙兰‘梦境’的根状茎分化作用不显著^[17]。

春兰组培时在培养基中添加有机物可以有效的提高繁殖效率。研究不同有机添加物对春兰根状茎增殖与分化的影响,其中香蕉最有利于其增殖与分化^[18],且 5% 的浓度最适,30 d 后春兰根状茎重量可达初重的 2.1 倍^[19]。也有报道称椰子汁对春兰根状茎的增殖与分化有较好的促进作用。在春兰与大花蕙兰杂交兰根状茎的组培中,椰汁对根状茎的增殖效果最佳,其次为香蕉泥、土豆汁,香蕉泥 100 g·L⁻¹ + 椰汁 50 mL·L⁻¹ 组合最利于根状茎的增殖与分化^[17]。在春兰杂交兰‘宋

梅’‘集圆’组培中,椰汁对杂交兰生根效果最好^[20]。

春兰组培中,活性炭有较强的吸附作用,能有效防止春兰根状茎的褐化,对根状茎的增殖效果明显,但在根状茎分化诱导出芽时有强烈的抑制作用,因此增殖培养通常会添加活性炭,而分化培养中通常不添加活性炭,在增殖培养中活性炭添加浓度在 1.0~3.0 g·L⁻¹ 为宜^[21]。活性炭也可提高芽生根率,3.0 g·L⁻¹ 时最佳^[20]。糖在培养基中为其提供碳源,浓度为 20 g·L⁻¹ 时最适,且可用白砂糖代替蔗糖^[22]。

春兰组培时培养室的环境也极其重要,适宜的环境状态可以使根状茎增殖与分化效果更优。春兰根状茎培养大多使用固体培养基,根状茎增殖在固体培养基中比薄层液体静置培养好,而诱导出芽阶段则反之^[22]。有报道称液体振荡培养与固体培养的交替培养相对单一固体或液体培养更有利于春兰根状茎的增殖,但操作较复杂^[21]。春兰根状茎增殖与分化一般都需光照,光照有利于根状茎增殖与分化。春兰根状茎分化的最适培养温度为 28 ℃,高温则抑制其分化^[21]。

从表 1 可知,春兰种子萌发的最适培养基为:1/2 MS+AC 1 g·L⁻¹;春兰根状茎增殖效果较好的培养基为:1/2MS+NAA 5.0 mg·L⁻¹+6-BA 0.1~0.5 mg·L⁻¹+活性炭 1.5 mg·L⁻¹,可添加椰子汁和香蕉汁;春兰根状茎分化较好的培养基结果比较多,且区别较大,各有所长,均能得到较高的分化率。

表 1 春兰组培最适培养基对比分析结果

Table 1 Results of compariove analysis on the optimum culture media in the tissue culture of *Cymbidium goeringii*

材料 Materials	研究方向 Research direction	研究内容 Research contents	最适培养基 Optimum culture media
春兰种子	种子萌发	种子萌发	1/2MS+ AC 1 g·L ⁻¹ ^[12]
春兰的杂交蒴果	蒴果分化增殖	激素的优化组合	1/2MS+NAA 0.3 mg·L ⁻¹ +蔗糖 20 g·L ⁻¹ +琼脂 7.0 g·L ⁻¹ ^[10]
春兰的杂交蒴果	蒴果分化增殖	有机添加物的优化组合	1/2MS+蛋白胨 1.5 g·L ⁻¹ +蔗糖 20 g·L ⁻¹ +琼脂 7.0 g·L ⁻¹ ^[10]
春兰种子无菌萌发的根状茎	根状茎增殖	激素的优化组合	1/2MS+6-BA 3 mg·L ⁻¹ +蔗糖 30 g·L ⁻¹ +琼脂 8 g·L ⁻¹ ^[19]
春兰根状茎	根状茎增殖	6-BA 和 NAA 优化组合	1/2MS+6-BA 0.1 mg·L ⁻¹ +NAA 5.0 mg·L ⁻¹ +1.5 g·L ⁻¹ AC ^[18]
黔南野生春兰原球茎	根状茎增殖	激素和有机添加物组合	1/2MS+6-BA 1 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹ +AC 3 g·L ⁻¹ +椰汁 40 mL·L ⁻¹ +VC 100 mg·L ⁻¹ +蔗糖 3% +琼脂 8 g·L ⁻¹ ^[16]
春兰×大花蕙兰的根状茎	增殖分化	NAA 和 6-BA 的组合优化探究	1/2MS+NAA 1.0 mg·L ⁻¹ +6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ ^[17]

续表 1

材料 Materials	研究方向 Research direction	研究内容 Research contents	最适培养基 Optimum culture media
春兰根状茎	根状茎分化	NAA 和 6-BA 组合优化	1/2MS+NAA 0.2 mg·L ⁻¹ + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ [21]
春兰根状茎	根状茎分化	NAA 和 6-BA 的组合优化	1/2MS + NAA 0.5 mg·L ⁻¹ + 6-BA 0.1 mg·L ⁻¹ + AC 1.5 g·L ⁻¹ [23]
春兰‘宋梅’根状茎	根状茎分化	NAA 和 6-BA 的组合优化	1/2MS+NAA 0.1 mg·L ⁻¹ +6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ [24]
春兰‘绿云’	根状茎分化	BA 和 IBA 的组合优化	1/2MS+BA 1.0 mg·L ⁻¹ +IBA 1.0 mg·L ⁻¹ [15]
春兰‘金荷鼎’×‘赤蕙’杂交根状茎芽	根状茎分化	BA 和 IBA 的组合优化	1/2MS+BA 2 mg·L ⁻¹ +IBA 0.2 mg·L ⁻¹ [25]
春兰‘宋梅’根状茎	根状茎生根	IBA 组合优化	1/2MS+IBA 1.0 mg·L ⁻¹ +AC 2.0 mg·L ⁻¹ [24]
杂交兰‘宋梅’×‘集圆’组培苗	根状茎生根	NAA 和 6-BA 组合优化	1/2MS+ NAA 3.0 mg·L ⁻¹ +6-BA 0.1 mg·L ⁻¹ [20]
春兰‘金荷鼎’×‘赤蕙’杂交根状茎芽	根状茎生根	NAA 和 BA 组合优化	1/2MS+NAA 2 mg·L ⁻¹ +BA 0.1 mg·L ⁻¹ [25]

2 墨兰的组织培养研究进展

墨兰作为五大类传统国兰之一,有“花中四君子”之一的美称,墨兰的根还具有一定的平喘药用功效[26]。在墨兰的无菌离体繁殖技术中,已经成功用墨兰种子、茎尖、侧芽、花芽进行诱导并获得了完整植株,曾宋君等[27]发现在 MS 培养基上花芽的诱导率相对较高。并有研究表明,墨兰基因型的差异对培养基的配方影响很大[28]。

墨兰组织培养常用的外植体有根状茎、蒴果、种子、茎尖、幼叶、根和花芽等。其中又以墨兰蒴果中的种子最常作为外植体[29]。选用墨兰种子作为外植体时原球茎诱导率高、效果好、容易取材,但易发生遗传变异,墨兰性状不稳定;选择用茎尖、根状茎为外植体时性状相对较稳定,能够有效的保留母株的优良性状;选用幼叶、花芽作为外植体时,同样能保留墨兰母株的优良性状,但不易诱导,增殖效果差。

在对墨兰进行组培时,首先是选择合适的基 本培养基。墨兰适于在无机盐含量高的培养基上 进行组培[30]。增殖培养时常见的基本培养基有 1/2 MS、MS、Hyponex-1、Hyponex-2 以及 Hyponex-1-2,其中以 1/2 MS 基本培养基效果最好[31]。进行原球茎诱导时,在 1/2MS 培养基中 加入适量的 6-BA、NAA 和椰汁是目前较常用的 培养基[32]。诱导墨兰苗生根时,基本培养基较多 选择 1/2 MS 和 MS 培养基。

对金嘴墨兰进行组培研究发现,较适宜种子 萌发的培养基为 1/2 MS 或改良 MS;在根状茎增 殖过程中,KC 培养基的增殖效果最好,增殖倍数

为 8.1,其次为 MS 培养基,增殖倍数为 7.4;6-BA 和 NAA 的比例控制在 2:1 效果较好[33]。在 进行墨兰的根状茎增殖时,常添加适量的植物生 长调节剂以促进其增殖,常用的有 6-BA、KT、 IBA、TDZ 和 NAA 等。以奇花墨兰组培根状茎 为外植体,研究发现 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 有利于墨 兰根状茎增殖[34],以杂种原球茎为外植体时发 现 NAA 对原球茎的增殖影响不大[35]。有研究以 墨兰企剑白墨为材料,发现墨兰根状茎诱导分化 出苗需要较高浓度的 6-BA,以 10 mg·L⁻¹ 较为 适宜,培养基中添加 GA₃ 不利于墨兰根状茎的 分化出苗[36]。研究发现 TDZ 能促进芽的分化, 但抑制根状茎的生长,同时使用 TDZ 后墨兰 4 个月内能形成 10 cm 的试管苗,缩短移栽后墨兰 营养生长期 2~3 年[37]。从表 2 可知,不同的细胞分裂素和生 长素配比影响了墨兰根状茎的增殖或分化,但 不同研究所采用的种类和浓度不尽相同,与实 验选取的不同基本培养基和不同的墨兰品种 有关。

有机添加物对墨兰增殖、分化与生根也有 影响。有报道指出 30 g·L⁻¹ 的香蕉添加量最 有利于墨兰根状茎的增殖[38],而添加 20% 椰 汁和 40 g·L⁻¹ 番茄汁会抑制根状茎增殖[39]。 1/2 MS 培养基中加入苹果汁和香蕉汁对墨 兰根状茎的出芽和生根也有较好的效果[40]。 MS 培养基中添加 10 g·L⁻¹ 土豆汁和 100 mL·L⁻¹ 椰子汁都能提高墨 兰芽的分化率[31]。而在生根培养基中加入香 蕉泥、红薯汁、马铃薯汁、椰子汁和玉米汁 5 种 营养附加物都能够促进墨兰生根[41]。

活性炭可吸收墨兰组培过程中产生的一些有

害物质,并能有效抑制褐化的产生。在墨兰原球茎诱导、芽分化、生根时最适活性炭浓度分别是1.0、4.0及2.0 g·L⁻¹^[42]。有研究表明活性炭浓度过高会抑制芽的分化,但在2.0 g·L⁻¹的活性炭浓度下,墨兰根状茎生长增殖旺盛,根状茎加粗分枝多,在墨兰幼苗培养基中添加5.0 g·L⁻¹活性炭效果最佳^[43]。

墨兰根的生长分化效率与温度有关,大多研究采用25±2℃光照条件下培养。光照强度对墨兰生长增殖影响较为显著,1 500~2 000 lx强度,12 h·d⁻¹条件下培养的根状茎生长较旺盛。还有

研究认为低剂量(5Gy)⁶⁰Coγ射线能促进墨兰生长,促进根状茎绿芽分化^[44]。

墨兰组培的培养基和培养条件已渐成体系。基本培养基对芽分化影响显著,1/2MS基本培养基的平均芽分化率最高。植物生长调节剂对芽诱导率影响不显著,但对平均芽分化率影响显著。不同浓度有机附加物对根状茎芽分化有促进作用。活性炭显著抑制根状茎芽分化,促进苗生长。表2总结对比了不同外植体来源的墨兰组培基本培养基和培养条件,为后续进行不同方向的研究提供参考。

表 2 墨兰组培最适培养基对比分析结果

Table 2 Results of comparative analysis on the optimum culture media in the tissue culture of <i>Cymbidium sinense</i>			
材料 Materials	研究方向 Research direction	研究内容 Research contents	最适培养基 Optimum culture media
墨兰胚	愈伤组织的诱导	激素优化	VW+NAA 0.1 mg·L ⁻¹ +TDZ 0.01 mg·L ⁻¹ ^[45]
墨兰杂交兰	种子无菌萌发	培养基优化	1/2MS+椰子汁 100 mL·L ⁻¹ +蛋白胨 1 g·L ⁻¹ + NaH ₂ PO ₄ 170 mg·L ⁻¹ +蔗糖 20 g·L ⁻¹ +肌醇 100 mg·L ⁻¹ +活性炭 1 g·L ⁻¹ ^[46]
金嘴墨兰	根状茎增殖	激素优化	KC+6-BA 2.0 mg·L ⁻¹ +NAA 1.0 mg·L ⁻¹ +蔗糖 30 g·L ⁻¹ +琼脂 7.1 g·L ⁻¹ +炭粉 1 g·L ⁻¹ ^[33]
墨兰春兰杂交兰根状茎	根状茎增殖	激素配比	1/2MS+6-BA 2.0 mg·L ⁻¹ +KT 0.5 mg·L ⁻¹ +NAA 0.05 mg·L ⁻¹ ^[47]
墨兰根状茎	根状茎增殖	以 ZW 培养基为基本培养基	ZW+NAA 5 mg·L ⁻¹ +活性炭 1 mg·L ⁻¹ +10%苹果汁或椰汁 ^[48]
墨兰根状茎	根状茎增殖	以 KC 培养基为基本培养基	KC+6-BA 2.0 mg·L ⁻¹ +NAA 1.0 mg·L ⁻¹ +炭粉 1 g·L ⁻¹ ^[41]
墨兰杂交兰的根状茎	根状茎增殖	Hyponex 为基本培养基	Hyponex+ NAA 1 mg·L ⁻¹ +BA 0.5 mg·L ⁻¹ +蛋白胨 1.5 g·L ⁻¹ +蔗糖 30 g·L ⁻¹ ^[47]
‘金凤锦’墨兰	根状茎增殖	激素优化	1/2 MS+BA 2 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹ +0.8 g·L ⁻¹ 活性炭 ^[40]
‘小凤兰’根状茎	根状茎增殖	激素优化	MS+6-BA 2.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.5 mg·L ⁻¹ +活性炭 0.5 g·L ⁻¹ ^[41]
墨兰根状茎	根状茎芽的分化	培养基优化	MS+6-BA 10 mg·L ⁻¹ +适量的 NH ₄ NO ₃ 、KH ₂ PO ₄ 和 AgNO ₃ ^[36]
墨兰根状茎	根状茎芽的分化	以 1/2MS 培养基为基本培养基	1/2MS+6-BA 2.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.2 mg·L ⁻¹ ^[31]
墨兰根状茎	根状茎芽的分化	以 MS 培养基为基本培养基	MS+6-BA 4.0 mg·L ⁻¹ +NAA 1.0 mg·L ⁻¹ +琼脂 8 g·L ⁻¹ +蔗糖 30 g·L ⁻¹ ^[30]
墨兰根状茎	根状茎芽的分化	激素优化	MS+KT 0.1 mg·L ⁻¹ +NAA 1.0 mg·L ⁻¹ +CM 100 mL·L ⁻¹ +活性炭 0.3 g·L ⁻¹ ^[49]
‘小凤兰’根状茎	根状茎芽的分化	有机添加物优化	1/2MS+6-BA 2.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.2 mg·L ⁻¹ +20%椰汁 ^[41]
企剑白墨的根状茎	根状茎的分化	添加无机物优化	MS+6-BA 10 mg·L ⁻¹ +KH ₂ PO ₄ 340 mg·L ⁻¹ ^[36]
墨兰根状茎芽	根状茎芽的生根	激素优化	1/2MS+IBA 1 mg·L ⁻¹ +1%活性炭 ^[29]
墨兰春兰杂交兰根状茎	根状茎芽的生根	激素优化	1/2MS+IBA 0.5 mg·L ⁻¹ ^[47]

3 建兰的组织培养研究进展

建兰的离体组织培养已获得较大进展,目前已经成功用建兰种子、茎尖诱导出了原球茎和根状茎并建立了快繁体系。建兰的花芽和侧芽也成功应用在组培中并直接分化出营养芽^[50-51]。有学者以建兰新品种‘黄金小神童’为材料时发现,侧芽茎尖在消毒前先用 2% 维生素水溶液浸泡 30 min 后再用 0.1% 升汞常规消毒,能有效延缓外植体褐化时间和保持外植体活力,外植体褐化率在 15% 以下^[52]。

建兰组织培养选用不同外植体时,不同激素组合对建兰种子原球茎的诱导有不同的影响。只添加 2,4-D 或者 6-BA 时无法诱导原球茎生成,但只添加 NAA 的培养基中能成功诱导出原球茎,说明建兰种子原球茎诱导与 NAA 有极大关系^[53]。以建兰品种‘小桃红’根状茎为外植体,当以 W/MS 或 VW 作为基本培养基进行比较试验时,MS 培养基更利于其增殖,且根状茎生长茁壮,深绿色,但不易生根;用 W 作为基本培养基更

易于分化,但小苗细弱嫩绿^[54]。研究激素对根状茎增殖、分化和生根的影响,发现 6-BA 利于建兰根状茎增殖,NAA 利于建兰根状茎分化^[50]。

以建兰品种‘小桃红’根状茎为外植体时,根状茎增殖的生长量变化呈 S 型曲线,各时期界限并不是很明显。培养基中碳源、氮源和磷酸盐的消耗曲线与根状茎的生长曲线基本一致。pH 由于根状茎先消耗碱性盐(铵态氮)而下降,后利用硝态氮而上升^[55]。

建兰组织培养最佳培养条件为温度 25~28 ℃,光照时间 14 h·d⁻¹,光照强度 30~40 μmol·(m²·s)⁻¹;生根培养 70~80 d,大棚炼苗 15~20 d 后出瓶移栽,用蛭石做基质覆盖水藓的移栽方法较单独用粉碎树皮或水藓的移栽效果好,移栽成活率达 90% 以上^[52]。表 3 中对目前不同建兰品种的组培基本培养基、激素配比和有机物添加等培养条件进行了对比分析,由于品种和研究内容不同,培养基的配方不尽相同,均为大规模快速繁殖建兰组培苗提供了参考。

表 3 建兰组培最适培养基对比分析结果

Table 3 Results of comparative analysis on the optimum culture media in the tissue culture of <i>Cymbidium ensifolium</i>			
材料 Materials	研究方向 Research direction	研究内容 Research contents	最适培养基 Optimum culture media
素心建兰	种子萌发	激素加有机添加物组合优化	1/2MS+6-BA 3.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.5 mg·L ⁻¹ +水解乳蛋白 2.0 mg·L ⁻¹ +活性炭 1.0 mg·L ⁻¹ +蔗糖 30 g·L ⁻¹ ^[56]
素心建兰	根状茎增殖	TDZ 和 NAA 组合优化	改良 1 号+TDZ 1.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.5 mg·L ⁻¹ +活性炭 0.5 g·L ⁻¹ +白糖 30 g·L ⁻¹ ^[56]
建兰	根状茎分化	有机添加物优化	MS+NAA 2.0 mg·L ⁻¹ +6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ +10% 椰子汁 ^[57]
建兰‘黄金小神童’	初诱导	最佳激素处理	1/2MS+TDZ 3.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.2 mg·L ⁻¹ ^[52]
建兰‘黄金小神童’	继代增殖	最佳激素处理	1/2MS+TDZ 3.5 mg·L ⁻¹ + NAA 0.16 mg·L ⁻¹ ^[52]
建兰‘小桃红’根状茎	根状茎增殖	激素优化	MS+6-BA 0.5 mg·L ⁻¹ +蔗糖 30 g·L ⁻¹ ^[55]
建兰‘小桃红’根状茎	根状茎分化	激素优化	MS+NAA 0.6 mg·L ⁻¹ +TDZ 1.0 mg·L ⁻¹ +蔗糖 30 g·L ⁻¹ ^[55]
建兰‘小桃红’根状茎	生根	激素优化	1/2MS+NAA 1.0 mg·L ⁻¹ +蔗糖 30 g·L ⁻¹ +活性炭 0.05% ^[55]
建兰	生根诱导	有机添加物优化	1/4MS+NAA 2.0 mg·L ⁻¹ +6-BA 0.1 mg·L ⁻¹ +10% 香蕉泥 ^[57]
建兰‘黄金小神童’	生根诱导	激素优化	1/2MS+6-BA 0.3 mg·L ⁻¹ +NAA 1.2 mg·L ⁻¹ ^[52]

4 寒兰的组织培养研究进展

寒兰在传统国兰中,以植株整体修长为典型特征。在寒兰组培中大多使用根状茎为外植体,但为了获得杂交新品种,也以种子为外植体,进行萌发诱导。寒兰种子萌发诱导的最佳培养基配方为:1/4 MS+NAA 0.2 mg·L⁻¹+6-BA 3 mg·L⁻¹;

根状茎诱导的最佳培养基配方为:1/2 MS+NAA 0.2 mg·L⁻¹+6-BA 2 mg·L⁻¹^[58]。以蕙兰‘新上海’(♂)与寒兰‘寒香梅’(♀)杂交种胚获得的根状茎为外植体,进行增殖分化研究时发现,杂交根状茎在不同配比的 NAA 和 6-BA 培养基上增殖、分化和生根效果各不同^[59]。

表 4 寒兰组培最适培养基对比分析结果

Table 4 Results of comparative on the optimum culture media in the tissue culture of *Cymbidium kanran*

材料 Materials	研究方向 Research direction	研究内容 Research contents	最适培养基 Optimum culture media	作用效果 Effects
寒兰	诱导类原球茎	激素配比	B5+TDZ 0.5 mg·L ⁻¹ + NAA 0.25 mg·L ⁻¹	诱导率 98.3% ^[60]
寒兰	继代增殖	激素配比	B5+S-3307 1.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.2 mg·L ⁻¹ + 蔗糖 3.5%	增殖系数 9.4 ^[60]
寒兰	类原球茎分化	激素配比	B5+ S-3307 0.75 mg·L ⁻¹ + 6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ + NAA 0.4 mg·L ⁻¹	分化率 87.8% ^[60]
蕙兰‘新上海’×寒兰‘寒香梅’根状茎	增殖	激素配比	MS+NAA 1 mg·L ⁻¹ + 6-BA 0.1 mg·L ⁻¹	增殖倍数 3.08 ^[59]
蕙兰‘新上海’×寒兰‘寒香梅’根状茎	不定芽分化	激素配比	MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA +5 mg·L ⁻¹ 6-BA	分化率 100% ^[59]
蕙兰‘新上海’×寒兰‘寒香梅’根状茎	诱导生根	激素配比	1/2 MS+1 mg·L ⁻¹ NAA +0.2% AC	诱导率 100% ^[59]
寒兰	生根	激素配比	1/2B ₅ +NAA 0.2 mg·L ⁻¹ +活性炭 0.05%	生根率达 100% ^[60]
寒兰	生根	激素配比和天然复合物添加	花宝 2 号 +NAA 0.1 mg·L ⁻¹ + IBA 0.5 mg·L ⁻¹ + 香蕉 50 g·L ⁻¹ ^[61]	

5 蕙兰的组织培养研究进展

蕙兰是中国栽培历史最悠久的国兰之一，其主要繁殖方式以采挖下山蕙兰为主，由于对野生资源的过度开采，蕙兰的组织培养技术应运而生，并取得一定成效，表 5 总结对比了蕙兰以及蕙兰

与其他兰花杂交种子的无菌萌发、根状茎或原球茎的增殖、生根等过程的培养条件和激素配比，为野生蕙兰的大规模快速繁殖、优良新品种的培育和野生蕙兰资源的保护提供了新思路。

表 5 蕙兰组培最适培养基对比分析结果

Table 5 Results of comparative on the optimum culture media in the tissue culture of *Cymbidium faberi*

材料 Materials	研究方向 Research direction	研究内容 Research contents	最适培养基 Optimum culture media
虎雪兰×‘绿春兰’蕙兰	种子无菌萌发	激素配比	1/2MS+ 6-BA1.0 mg·L ⁻¹ +NAA0.5 mg·L ⁻¹ + 3%花宝 1 号 + 0.05%碳粉 ^[62]
蕙兰	种子无菌萌发	激素配比	1/2MS+BA2.0 mg·L ⁻¹ +NAA2.0 mg·L ⁻¹ ^[63]
‘崔梅’×蕙兰	种子无菌萌发	不同基本培养基	W 培养基 +NAA0.5 mg·L ⁻¹ +6-BA1.0 mg·L ⁻¹ ^[64]
蕙兰	愈伤组织的诱导	激素配比	2,4-D 2 mg·L ⁻¹ +6-BA 4 mg·L ⁻¹ +NAA6 mg·L ⁻¹ ^[65]
蕙兰‘大一品’	增殖	激素配比	1/2MS+NAA1.0 mg·L ⁻¹ +6-BA0.5 mg·L ⁻¹ +CM 20 g·L ⁻¹ + AC 2 g·L ⁻¹ ^[66]
蕙兰‘大一品’	分化	激素配比	MS+NAA0.3 mg·L ⁻¹ +6-BA2.0 mg·L ⁻¹ +CM 20 g·L ⁻¹ ^[66]
蕙兰	不定芽诱导	激素优化	MS+TDZ 1 mg·L ⁻¹ +NAA0.5 mg·L ⁻¹ ^[63]
虎雪兰×‘绿春兰’蕙兰	增殖	激素配比	1/2MS+6-BA 1.5 mg·L ⁻¹ +NAA 0.5 mg·L ⁻¹ +KT 0.5 mg·L ⁻¹ + 3%花宝 4 号 +0.05%碳粉 ^[62]
‘崔梅’×蕙兰	根状茎分化和生根	不同基本培养基	MS+ NAA1.0 mg·L ⁻¹ +6-BA0.5 mg·L ⁻¹ ^[64]
蕙兰‘大一品’	生根	激素配比	MS+NAA 3 mg·L ⁻¹ +6-BA 0.1 mg·L ⁻¹ +CM 20 g·L ⁻¹ + AC 2 g·L ⁻¹ ^[66]

6 结语

国兰的组织培养近几年取得了很大进展,目前已在春兰、墨兰、建兰、寒兰、蕙兰等国兰品种中获得成功。随着市场对国兰需求量的增加,传统的分株繁殖将满足不了市场需求,解决国兰的组培难点显得尤为重要。植物组织培养技术具有保持其优良性状和快速繁殖的特性,由于兰花自身繁殖的缺点,植物组培技术在兰花业发展迅速,已经取得了一定的成果和进展,兰属组培技术的不断突破和进展也有利于保护野生兰花资源,同时推进国兰的繁殖育种,加快国兰的产业化生产进程。

参考文献:

- [1] Arditti J. Fundamentals of orchid biology [M]. Toronto: John Wiley&Sons,1992: 691.
- [2] 王琼,李枝林,余朝秀. 兰花育种研究进展[J]. 园艺学报, 2005,32(3): 551-556.
- [3] Morel G. Producing virus-free *Cymbidium* [J]. Am Orchid Soc Bull,1960,29: 495-497.
- [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.
- [5] Singh F. Differential staining of orchid seeds for viability testing [J]. American Ceramic Society Bulletin,1981, 50: 416-418.
- [6] Arditti J, Erns R. Physiology of germinating orchid seeds[M]. Orchid biology: reviews and perspectives III. New York: Cornell University Press,1984:177-222.
- [7] Smereci E A, Currah R S. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe [J]. Lindleyana,1989,4(1):6-15.
- [8] 庞惠仙. 一种芽孢杆菌促进春兰等种子萌发试验方法初报[J]. 植物生理学通讯,2010,46(2): 191-192.
- [9] 孙叶,包建忠,刘春贵,等. 春兰杂交种子无菌萌发及根状茎增殖的研究[J]. 金陵科技学院学报,2012,28(1): 76-79.
- [10] 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.
- [11] 孙叶,包建忠,刘春贵,等. 影响春兰、蕙兰杂交种子无菌萌发的若干因素[J]. 江苏农业科学,2010(2): 187-188.
- [12] 潘银萍,李承秀,王长宪,等. 春兰与墨兰杂交种子无菌萌发研究[J]. 北方园艺,2010(23):85-87.
- [13] 周全,于言,胡燕梅,等. 春兰根状茎增殖及其分化影响因素[J]. 江苏农业科学,2013,41(3): 40-41.
- [14] 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.
- [15] 石乐娟,张放. 春兰根状茎的增殖与分化的影响因素研究[J]. 浙江农业科学,2006(6): 638-641.
- [16] 宋丽莎,邓伟,黎骏凌,等. 黔南野生春兰原球茎增殖培养

影响因子的优化[J]. 种子,2012,31(9):106-108.

- [17] 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.
- [18] 孔凡龙,贾玉芳,柴明良,等. 春兰离体根状茎生长和分化的研究[J]. 核农学报,2009,23(2): 253-256.
- [19] 周全,余平. 春兰根状茎的增殖与分化条件优化[J]. 湖北农业科学,2009,48(1): 27-30.
- [20] 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.
- [21] 石兰蓉,彭婧茹,黎萍. 春兰根状茎离体培养的研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(1): 51-53.
- [22] 陈锦. 春兰根状茎增殖与诱芽技术研究[J]. 安徽农学通报,2008,14(7): 33-35.
- [23] 吕秀立,张冬梅. 春兰杂交种子非共生萌发和快速繁殖[J]. 上海农业学报,2011,27(1): 41-45.
- [24] 刘幸佳,徐伟东,崔玉花,等. 春兰组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2013(20): 101-104.
- [25] 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.
- [26] 柯文明,关见留,曾晓春. 墨兰的急性毒性和哮喘的初步研究[J]. 广东第二师范学院学报,2004,24(2): 87-89.
- [27] 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.
- [28] 高丽,李洪林,杨波. 基本培养基与生长调节剂组合对素心建兰根状茎增殖和芽分化的影响[J]. 亚热带植物科学, 2007,36(4): 13-15.
- [29] 陈汝民,叶庆生,王小菁,等. 墨兰种子胚的发育和培养初步研究[J]. 热带亚热带植物学报,1995,3(4): 72-75.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 钟士传,王侠礼. 中国兰花-墨兰微体快繁技术研究[J]. 北方园艺,2004(1): 56-57.
- [33] 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.
- [34] 郑艳艳,朴炫春,高日,等. 墨兰根状茎增殖及生物反应器培养的可行性研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(28): 17225-17227.
- [35] 朱根发,陈明莉,罗智伟,等. 墨兰与大花蕙兰间杂种原球茎的诱导及增殖研究[J]. 园艺学报,2004,31(5): 688-690.
- [36] 朱根发,叶秀斌,陈明莉,等. 培养基不同成分对墨兰根状茎分化成苗的影响[J]. 中南林学院学报,2003,23(5): 42-44.
- [37] Chang C, Chang W C. Effect of thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinense* Willd in vitro [J]. Plant Growth Regul,2000,30(2): 171-175.

- [38] 丁雪珍,韩磊,张文静. 墨兰增殖培养基的筛选研究[J]. 北方园艺,2009(8):208-209.
- [39] 杨靖,谢利,曾瑞珍,等. 影响‘小凤兰’根状茎增殖、分化和壮苗的因素研究[J]. 北方园艺,2016(2):105-109.
- [40] 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.
- [41] 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):13968-13969,13992.
- [42] 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(3):36-38.
- [43] 罗虹. 活性炭对墨兰根状茎生长的影响[J]. 广东农业科学,1998(1):30-31.
- [44] 傅雪琳,张志胜,何平,等. ^{60}Co 射线辐照对墨兰根状茎生长和分化的效应研究[J]. 核农学报,2000,14(6):333-336.
- [45] Huan L V T, Takamura T, Tanaka M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium orchid* [J]. Plant Science, 2004,166(6):1443-1449.
- [46] Lee O R, Yang D C, Chung H J, et al. Efficient in vitro plant regeneration from hybrid rhizomes of *Cymbidium sinense* seeds[J]. Horticulture Environment and Biotechnology, 2011,52(3):303-308.
- [47] Zuo L, Yu L, Chen B. Studies on rhizome multiplication and differentiation of *Cymbidium sinense* \times *Cymbidium goeringii* [J]. Agricultural Biotechnology, 2017,6(6):22-25.
- [48] 张志胜,欧秀娟. 墨兰的组织培养[J]. 园艺学报,1995,22(3):303-304.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] 王熊,张菊野,连宏坤,等. 素心建兰无性繁殖系的建立及其开花[J]. 园艺学报,1988,15(3):205-208.
- [52] 王济红,刘燕,祁翔,等. 建兰新品种黄金小神童组培育苗集成技术的优化[J]. 西南农业学报,2014,27(5):2135-2140.
- [53] 余迪求,杨明兰,李宝健. 建兰原球茎发生及其无性繁殖系建立[J]. 中山大学学报,1996(2):13-18.
- [54] 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.
- [55] 刘翠华,蒙阳,王朝雯,等. 建兰组织培养及根状茎增殖的动力学[J]. 南昌大学学报(理科版),2012,36(3):264-272.
- [56] 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.
- [57] 李承秀,黄艳艳,赵进红,等. 建兰变种组培快繁试验研究[J]. 农业科技与信息:现代园林,2007(9):44-48.
- [58] 陈进燎,胡庆林,张艺祎,等. 寒兰种子无菌萌发及根状茎诱导分化技术研究[J]. 中国园艺文摘,2016(12):16-19.
- [59] 孙芳,牛田,李承秀,等. 寒兰与蕙兰杂交种胚快繁体系的建立[J]. 北方园艺,2012(24):124-126.
- [60] 朱国兵,杨柏云,蔡奇英,等. 寒兰的快速繁殖技术[J]. 热带亚热带植物学报,2006,14(2):151-156.
- [61] 黄闽敏,刘晓芳,曹青爽. 寒兰组培苗生根培养的多因子正交试验研究[J]. 北方园艺,2009(4):53-55.
- [62] 孟英,闻永慧,李慧敏,等. 虎雪兰与朱砂兰、蕙兰正反交育种及种子无菌萌发与增殖研究[J]. 安徽农业科学,2014(13):3812-3814.
- [63] Tao J, Yu L, Kong F, et al. Effects of plant growth regulator in vitro propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe[J]. Afr J Biotechnol,2011,10(69):15639-15646.
- [64] 张东旭,李承秀,王长宪,等. 蕙兰杂交种子的无菌萌发和快速繁殖研究[J]. 中国农学通报,2009,25(12):159-164.
- [65] 黄江,廖思红,方元平,等. 大别山野生蕙兰愈伤组织诱导条件的优化[J]. 湖北农业科学,2012,51(23):5505-5507.
- [66] 于永畅,张林,王厚新,等. 影响蕙兰‘大一品’根状茎分化的因素研究[J]. 农学报,2012,2(12):37-41.

Review on Tissue Culture of *Cymbidium* Plant

WANG Song-tai, ZENG Li-ting, FANG Zhong-ming, ZHOU Yin

(Center of Applied Biotechnology, Wuhan University of Bioengineering, Wuhan 430415, Chian)

Abstract: Tissue culture is the main technology applied in the rapid propagation of *Cymbidium*, which shortened the breeding year and maintained the native eminent characteristics of *Cymbidium* species. In recent years, we had got a great progress in tissue culture of *Cymbidium*. In order to promote tissue culture and industrialized large-scale production of orchids, in this paper, the explant, culture medium, hormone optimization and organic additives were compared and discussed for *C. goeringii*, *C. sinense*, *C. ensifolium*, *C. kanran* and *C. faberi*, taken as typical representatives in *Cymbidium*. The results would provide effective reference for tissue culture and massive production of *Cymbidium*.

Keywords: *Cymbidium*; tissue culture; rhizome; multiplication; differentiation