

蝴蝶兰离体培养及其相关生物技术研究进展

崔广荣

(安徽科技学院植物科学学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 对蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)的离体培养、褐化及控制、物理化学诱变、转基因研究进展进行了综述,包括蝴蝶兰离体培养中的外植体选择、体细胞胚胎及类原球茎诱导、培养基及培养条件、培养方式、褐化控制等关键因素,并概括了生物反应器、转基因、诱变育种等相关生物技术研究进展。成体植株的花梗、茎尖和种子以及试管苗的叶片、茎尖、根尖等均可作为外植体;影响外植体褐化的主要因素有培养基的种类、pH值、温度、外植体的生理状况等;蝴蝶兰诱变育种及转基因研究尚处于初步阶段。

关键词: 蝴蝶兰; 组织培养; 生物技术; 研究进展

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)06-0696-11

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.06.018

Research Progress on *Phalaenopsis in vitro* Culture and Related Biotechnology

CUI Guang-rong

(College of Plant Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: The main research progresses on *Phalaenopsis in vitro* culture were reviewed, including explants selection, embryogenesis and protocorm-like body induction, medium, culture condition and method, and browning control, eg. Meanwhile, the bioreactor, genetic transformation, mutation breeding and other biotechnology were summarized. The flower stalk, tip of shoots and seeds from adult plants were common used as explants, and do the leaf, tip of shoots, root tips from tube plantlets. The main factors of explants browning were type of medium, pH, temperature and the physiological state. The researches about mutational breeding and genetic transformation in *Phalaenopsis* were still at preliminary stage.

Key words: *Phalaenopsis*; Tissue culture; Biotechnology; Research progress

蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)为兰科(Ochidaceae)多年生草本植物,主要分布于热带及亚热带地区,因其花型奇特,色彩丰富、艳丽,花期长久,被冠以“兰花皇后”,深受消费者的喜爱,是十分名贵的切花和盆栽花卉。蝴蝶兰的繁殖可通过分株、种子、组织培养技术进行,但蝴蝶兰植株分蘖繁殖系数低,周年仅2~3株,无法满足人们需求,而蝴蝶兰种子细小,胚发育不全,不含胚乳,自然条件下很难萌发,且种子繁殖难以保持母株的优良性状。植物组织培养技术已成为兰花优良种苗快繁的主要途径,其

基本环节主要包括类原球茎(Protocorm-like body, PLB)诱导、增殖及分化成苗、试管苗生根等。随着现代生物技术的发展,蝴蝶兰的离体培养与其他生物技术研究结合起来,开展了蝴蝶兰体细胞胚胎发生和发育、转基因、基因克隆及离体诱变育种等研究。本文综述了近年来有关蝴蝶兰组织培养及其相关生物技术的报道,并结合自己多年来从事蝴蝶兰研究实践进行分析阐述,旨在为蝴蝶兰生物技术研究提供参考和借鉴。

收稿日期: 2009-10-22

接受日期: 2010-01-15

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(070411010); 安徽省教育厅省级自然科学基金项目(KJ2007B053)资助

作者简介: 崔广荣(1964~), 男, 博士, 副教授, 主要从事观赏植物生物技术研究, email: cuigr64@sina.com

1 蝴蝶兰的离体培养

国外早在 20 世纪 50 年代前后就开展了蝴蝶兰的离体培养研究^[1],特别是 70 年代,蝴蝶兰组织培养技术得到了较快发展^[2-5],随着类原球茎诱导、增殖、再生植株技术的完善,蝴蝶兰工厂化生产得以实现,同时对培养条件不断优化并提高繁殖效率,包括外植体的选择、植物生长调节剂的种类及浓度的筛选等方面。近十多年来,在体细胞胚胎发生发育方面的研究^[6-9]为蝴蝶兰离体繁殖提供了新的途径。国内蝴蝶兰离体培养及相关生物技术的研究工作开展得相对较晚,多集中于组织培养与快速繁殖方面^[10-24]。

1.1 外植体选择

1.1.1 成体植株外植体的选择

蝴蝶兰初代培养的外植体主要有花梗、分蘖株的茎尖分生组织、种子等。Potor 于 1949 年最早报道用蝴蝶兰的花梗休眠芽或花梗切段诱导发育成完整植株^[1],随后在不同品种中又获得成功^[5,25-27]。国内以蝴蝶兰的花梗芽或花梗切段为材料,诱导芽苗或类原球茎也获得成功,建立了不同品种的离体快繁体系^[11-12,14-16,20-21]。以花梗为外植体的最大优点在于取材方便,消毒灭菌容易成功,保护母株免受更多的伤害,而不致于损毁、丢失,且能获得与母株优良性状一致的再生苗,不足之处是取材受到开花季节的限制。初代培养另一常用外植体为茎尖分生组织,Intuwong 等报道利用蝴蝶兰的茎尖诱导出类原球茎,再由类原球茎分化成苗^[2],这种培养的突出问题在于蝴蝶兰为单茎性植株,剥取茎尖就损坏了母株本身,而且蝴蝶兰茎极短,操作困难,易污染,成功率较低。但茎尖培养的优点是比较容易获取类原球茎或愈伤组织,因为茎尖分生组织细胞的生理年龄小,易于脱分化和分化,同时,操作细致还有可能达到脱毒效果,获得无病毒苗。蝴蝶兰种子在无菌条件下可形成球形胚状体——原球茎(Protocorm),再发育成苗,或从原球茎诱导愈伤组织或类原球茎^[28]。利用蝴蝶兰的成年盆栽植株进行初代培养,建立快繁体系,花梗及其组织是首选的外植体,另一潜在可用的外植体就是成年植株的叶片,但尚未见其离体诱导再生植株成功的报道。

1.1.2 试管苗外植体的选择

一旦获取无菌植株,幼嫩植株的所有器官、组

织、细胞都可以作为有效的外植体,如试管苗的幼叶、根尖、茎尖、茎段、类原球茎(或原球茎)都可作为外植体。

Tanaka 等用来自花梗试管苗的叶片进行离体培养再生植株获得成功^[29],Park 等研究了两类植物生长调节剂及其组合、蔗糖浓度、光照强度、培养方法等对 4 个品种离体叶片诱导类原球茎发生及分化成苗的影响^[30]。从不定芽诱导和类原球茎诱导两个方面实现快速繁殖,其中植物生长调节剂种类、浓度及组合、叶片切段的部位和大小等对类原球茎发生频率或不定芽形成率等均有影响^[11,14,21,31-37]。Kuo 等利用蝴蝶兰试管苗研究了离体叶片诱导体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis, SE)的过程,并通过类原球茎再生成苗^[38]。崔广荣等也报道了离体叶片诱导体细胞胚胎发生的影响因素,并对体细胞胚胎的发生发育进行了组织学观察^[10]。以试管苗幼嫩叶片为外植体经体细胞胚胎发生途径再生苗的成功,不仅为蝴蝶兰优良种苗快速繁殖提供了有效、方便的途径,也为蝴蝶兰转基因研究、化学诱变育种提供了很好的技术平台,因为其叶片体细胞胚胎发生起源于单细胞,可有效减少嵌合体的发生^[10,38]。

试管苗的根也是较好的外植体,它取材方便,可较好地保护母株,以根尖或根段培养实现试管苗再生均已成功^[29,39-40]。试管苗茎尖是类原球茎诱导的较好材料,诱导率较高^[11,14-15,17],可解决少数品种叶片难以成功诱导类原球茎,但茎尖培养操作较麻烦,需要在净化台上仔细剥离茎尖,且茎尖大小影响培养效果,茎尖过大容易直接成苗而不形成类原球茎,茎尖过小又容易褐化死亡^[17]。试管苗茎段培养在操作上要简单一些,而且诱导效果也较好^[11,14,41],但试管苗茎段很短,取样后会损毁大量的试管苗。Duan 等用合适的植物生长调节剂使试管苗茎段伸长,将各个节段切开培养,诱导丛芽或新苗,而茎尖部分继续培养成多节段长茎试管苗,从而实现试管苗的快速繁殖^[43]。这种方法有效解决了花梗、种子缺乏时试管苗的快速繁殖问题,也可避免类原球茎或愈伤组织再生苗途径所产生的体细胞无性系变异(Somaclonal variation)问题^[42-43]。不同外植体诱导的类原球茎(或原球茎)一般通过继代培养增殖,进而分化成苗,实现试管苗的快速

繁殖,但成熟的类原球茎或来自种胚的原球茎可进一步高效、快速诱导愈伤组织^[8,44]或再生类原球茎^[18,27]。Chen 等利用种胚形成的原球茎诱导愈伤组织,再分化成苗,经染色体分析证明了愈伤组织再生苗的遗传稳定性^[44];吕晓辉等将类原球茎横切进行培养,也成功诱导出愈伤组织,并对愈伤组织及其体细胞胚胎发生进行了组织学观察^[44]。Park 等将 PLB 切开,用不同液体培养基及培养方法实现 PLB 快速高效增殖^[45];崔广荣等利用类原球茎薄片(thin cell layer, TCL)在固体培养基上实现了 PLB 的高频诱导,这对建立高效农杆菌转化体系及离体化学诱变技术体系具有重要意义^[18]。

1.2 体细胞胚胎发生和类原球茎诱导

有研究表明,体细胞胚胎发生途径的再生植株在遗传上相对稳定,产生无性系变异的频率较低^[7,38,46-47],目前蝴蝶兰及其他兰花体细胞胚胎研究仍主要是探讨体细胞胚胎发生的条件、形态特征及组织学观察等^[48]。Ishii 等报道经过愈伤组织产生的体细胞胚胎或类原球茎,其发育过程与其他植物体细胞胚胎发生发育过程基本类似^[6]。Shrestha 等用来源于茎尖的细胞悬浮培养建立了高效蝴蝶兰体细胞胚胎发生发育体系,并从组织学上证明了茎尖单个细胞的体细胞胚胎发生发育过程与种子胚发育过程相同,且能有效再生植株,并证明糖源、植物生长调节剂、酵母粉添加量等对不同基因型的悬浮细胞形成的类原球茎数量及重量均有较大影响^[49]。Chen 等用来源于种子的原球茎高效诱导体细胞胚胎直接发生,结果表明植物生长调节剂对体细胞胚发生的频率、PLB 数量及形态有影响^[8]。Kou 等以试管苗叶片为材料,研究了植物生长调节剂种类、浓度对叶片切段的体细胞胚胎发生的影响,表明光照、叶片的部位对体细胞胚胎发生的频率及数量有影响^[38]。Gow 等的研究表明,多胺、ACC、AgNO₃、CoCl₂对不同品种的叶片切段及部位对体细胞胚胎发生的影响较大^[50],而且基因型、光照机制、叶片部位以及接种方式对体细胞胚胎的发生也有影响^[51]。

刘福平等对体细胞胚胎的发生过程进行了组织学观察,并对离体叶片诱导胚性愈伤组织过程中,外植体的 DNA、RNA 和水溶性蛋白质等含量进行了测定,初步揭示了细胞分裂素与蝴蝶兰体细胞

胚胎诱导的生理基础^[41]。崔广荣等^[10]以试管苗幼嫩叶片为材料,研究了外源植物生长调节剂、蔗糖浓度、椰汁添加量等对叶片体细胞胚胎直接发生的影响,优化了离体叶片直接诱导胚状体的培养基,并从组织学上说明了蝴蝶兰体细胞胚胎发生的细胞起源和较大颗粒状的成熟胚——类原球茎的发育过程。

关于蝴蝶兰体细胞胚胎发生的生理生化及分子机理有待于进一步研究。蝴蝶兰单细胞或原生质体培养技术可能是探索体细胞胚胎发生发育分子机理的瓶颈,因为只有有效控制体细胞发生发育阶段,获取发育一致的不同时期的细胞或胚状体,才能更有效地开展相关的研究工作。

1.3 培养基及培养条件

用于蝴蝶兰组织培养的基本培养基有 MS、VW、Hyponex、Kyoto、N₆、KC 等(表 1),其中 1/2MS、Hyponex 和 VW 为最常用,在培养基中添加不同的植物生长调节剂(Plant growth regulator, PGR)可有效地诱导出类原球茎或不定芽。这 3 种基本培养基的特点是无机盐浓度相对较低,无机盐含量较低的基本培养基较适合蝴蝶兰离体组织器官培养。较高浓度植物生长调节剂,尤其是高浓度植物细胞分裂素往往是体细胞胚胎发生或类原球茎诱导的关键,但并非浓度越高越好^[10,31,33,35,42]。从表 1 中可看出,不同研究的结果差异较大,这可能与蝴蝶兰基因型、基本培养基、培养条件、外植体大小及其取材部位等有关。

植物组织培养中最常用的植物生长调节剂是生长素类和细胞分裂素类,两类植物生长调节剂的浓度及比例决定了培养物的发育方向。用于蝴蝶兰组织培养的细胞分裂素类植物生长调节剂主要有 6-BA 和 TDZ,它们的培养效果都很好,TDZ 对细胞的生理作用效应要比 6-BA 强数十乃至数百倍^[7,9,35],是一类新兴的植物生长调节类物质,使用 TDZ 的浓度比 6-BA 低很多^[20,35-36],但其价格十分昂贵,较难溶解。Kuo 等^[38]在研究离体叶片体细胞胚胎发生时比较了 2,4-D、KT、6-BA 的诱导效果,单独使用 6-BA 和 TDZ 均能有效诱导体细胞胚胎的直接发生,TDZ 的诱导率比 6-BA 高;当 2,4-D 与 6-BA、TDZ 组合使用时,结果表明 2,4-D 对 6-BA 和 TDZ 的生理效应有阻碍作用,体细胞胚胎的诱导率

表 1 蝴蝶兰离体培养的主要培养基及添加物

Table 1 Main medium and its additional matter for *Phalaenopsis* culture *in vitro*

培养基 Medium	植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg L ⁻¹)	添加物 Additional matter	外植体 Explant	培养目的 Objection	培养效果 Effects of culture	参考文献 Reference
Kyoto 或 MS	6-BA 3.0		花梗侧芽、花序顶端	芽苗	Kyoto 多为单株芽, MS 多为丛芽	[11]
MS	6-BA 5.0 + NAA 1.0		茎尖、茎段、叶片	类原球茎、不定芽	茎尖形成 PLB;茎段、叶片不定芽诱导率分别为 65%、16.7%	[11]
VW	TDZ 1.0 ~2.0 或 6-BA 10	椰汁 15%	花梗芽	不定芽	诱导率 66.7% 诱导率 16.7%	[52]
Hyponex	6-BA 5 ~10	-	试管苗	茎伸长		[42]
MS	6-BA 3.0 + NAA 0.2	活性碳 1 g L ⁻¹	叶片	类原球茎	93%	[31]
1/2MS(改良)	TDZ 1.0 或 TDZ 0.1 + 2,4-D 1.0	-	原球茎(来自种子)	愈伤组织	TDZ 1.0 用于诱导, TDZ 0.1 + 2,4-D 1.0 用于继代	[43]
MS	6-BA 20 + NAA 1.0	蛋白胨 2 g L ⁻¹ + 马铃薯匀浆 3% + 活性碳 1 g L ⁻¹	叶片	类原球茎	诱导率 85%	[30]
Hyponex	-			类原球茎生长	成活率 75.1% .	
改良 MS	6-BA 5.0 + NAA 0.5	椰汁 15%	花梗节间切段	类原球茎	诱导率 88.8%	[12]
MS		椰汁 20%/马铃薯 200 g L ⁻¹ /香蕉	类原球茎	苗分化	NP 和 VW 优于 MS;椰汁和马铃薯优于香蕉	[13]
NP						
VW		200 g L ⁻¹				
改良 VW	6-BA 5.06-BA 3.0	-	花梗	花梗芽	芽萌发率 79.2%	[14]
改良 KC		椰汁 15%	茎尖	类原球茎	形成比例 7/10	
1/2MS	6-BA 3.0NAA 0.1	椰汁 10% 椰汁 15%	幼叶、茎尖	类原球茎 类原球茎分化		[15]
MS	6-BA 5.0 + NAA 1.0	椰汁 10%		不定芽	不定芽发生率 32.8%	[37]
Hyponex		蛋白胨 1 g L ⁻¹ + 香蕉泥 100 g L ⁻¹	叶片	不定芽生根	苗生根率 95%	
1/2MS(改良)	TDZ 3.0	蛋白胨 1 g L ⁻¹	原球茎(来源于种子)	体细胞胚胎发生	体细胞胚胎发生率 100%	[8]
MS	6-BA 3.0 + NAA 0.1		花梗腋芽	类原球茎	PLB 形成率 80%	[16]
Hyponex	6-BA 10 + NAA 1.0	蛋白胨 1 g L ⁻¹	叶片	类原球茎	PLB 诱导率 42.5%	[32]
1/2MS	TDZ 1.0		叶片不同部位	体细胞胚胎发生	体细胞胚胎发生率 55%	[38]
VW	6-BA 7.5 + NAA 1.0	蛋白胨 2.0 g L ⁻¹ + 香蕉泥 3% +	花梗	花梗芽苗	增殖系数 3.5 ~4.0	[33]
MS	6-BA 7.5 + NAA 1.0		花梗芽苗	丛芽增殖	诱导率 80% ~87%	
1/2MS	6-BA 10 + NAA 1.0	活性碳 2 g L ⁻¹	叶片切段	类原球茎		
1/2MS			类原球茎	植株再生		
VW	6-BA 0.1 + 2,4-D 0.1		类原球茎切片	愈伤组织诱导和体细胞胚胎发生	诱导率 60%	[44]
1/2MS	6-BA 10	椰汁 20%	嫩叶	愈伤组织	诱导率 96%	[41]
1/2MS	6-BA 4.0 + Ad 2.0 ~ 4.0 + NAA 1.0 ~2.0	椰汁 20%	叶片	体细胞胚胎发生	诱导率 67.5%	[10]
MS	TDZ 1.5	椰汁 10%	叶片	不定芽	60.9%	[35]
N6	6-BA 5.0 + KT 0.2	活性碳 2 g L ⁻¹	花梗节间切段	类原球茎;	诱导率 30%	[20]
1/3MS	TDZ 0.3 + NAA 3.0			类原球茎增殖	增殖系数 4.4	
1/2MS	6-BA 3.0		叶片	体细胞胚胎发生	发生率 80%	[50]

明显降低,影响 PLB 的生长发育。Gow 等^[50]也得到了类似的结果。其他植物的研究表明,2,4-D 在诱导体细胞胚胎发生的早期阶段发挥重要作用,但它却抑制体细胞胚胎的进一步发育^[47]。Chen 等指出 TDZ 为 1.0 ~ 10.0 mg L⁻¹ 时均能使花梗 100% 诱导出不定芽,但 6-BA 浓度达到 10.0 mg L⁻¹ 时才使花梗芽 100% 萌发^[52]。杨海芸等指出 TDZ 对蝴蝶兰不定芽的诱导效应远高于 6-BA,相当于 6-BA 的 20 倍以上^[35]。Chen 等以来源于种胚的原球茎进行愈伤组织诱导和再生植株研究,结果表明低浓度 TDZ 有利于 PLB 或芽形成,高浓度 TDZ 则有利于愈伤组织的形成,而 2,4-D 与 TDZ 组合虽降低了愈伤组织诱导率,但对愈伤组织继代增殖有一定的促进作用^[52]。可见,在蝴蝶兰组织培养中选择合适的植物生长调节剂类型及不同组合对培养目标的实现起着关键作用。NAA 也是一类常用的生长素类生长调节剂,它能使细胞分裂素类物质发挥更强作用,有研究表明高浓度的 6-BA 与 NAA 组合可有效提高离体叶片 PLB 的形成数量^[10,14,30]。

Park 等以来自于 4 个品种的花梗芽叶片诱导类原球茎,在相同培养条件下,不同品种外植体的类原球茎形成率不同、每个外植体形成的类原球茎数量不同,类原球茎继代培养因基本培养基不同而表现出显著差异^[30]。类原球茎增殖培养也因不同的培养方法而表现出差异^[30,33],即使基因型相同,基本培养基不同也会产生不同的结果^[30,35]。Gow 等也证实蝴蝶兰离体叶片体细胞胚胎发生频率因基因型不同而异^[50-51]。

光照条件对外植体的培养生长有一定的影响。暗培养有利于离体叶片诱导体细胞胚胎的发生^[39]和不定芽的形成^[35]。Gow 等的研究表明,光照时间越长,外植体褐变率越大,体细胞胚胎的发生率越低;光照时间越短,外植体褐变率越低,体细胞胚胎的发生率越高^[51]。

离体叶片的生理年龄不同对不定芽的发生有一定的影响。杨海芸等的研究表明,45 d 叶龄的叶片不定芽诱导率及分化系数要高于 30 d、60 d 叶龄的^[35]。除此之外,外植体的部位、切割方式、接种方式也对培养结果有较大影响。Kuo 等^[38]、Gow 等^[50-51]的研究表明,切口末端及近轴部分易于体细胞胚胎的发生,而叶尖部位最差,这与文心兰

(*Oncidium*)离体叶片的培养结果相反^[7]。黄磊等的研究表明,切割方式及切段大小对离体叶片的类原球茎诱导有影响:横切好于纵切,切段过大或过小均会降低 PLB 的诱导率^[36]。

糖不仅是离体培养物生长需要的碳源,也对培养基的渗透压调节发挥着重要影响,糖的种类及浓度对外植体的体细胞胚胎发生或 PLB 诱导有重要影响。Tokuhara 等用麦芽糖、果糖、山梨醇、乳糖、葡萄糖、蔗糖为糖源,分析培养基中糖源及糖浓度对悬浮细胞体细胞胚胎发生的影响,结果表明葡萄糖和蔗糖是较好的糖源,20 ~ 40 g L⁻¹ 的糖对 PLB 形成的数量、鲜重均有较好的促进作用,浓度过高或过低均不利于 PLB 的形成和生长^[53]。Liu 等的研究表明,固体培养时海藻糖促进蝴蝶兰类原球茎增殖的效果比蔗糖好,但不同品种间表现不同,而液体培养时,海藻糖比蔗糖更有利于提高 PLB 增殖率^[54]。崔广荣等指出蔗糖浓度对蝴蝶兰离体叶片体细胞胚胎的发生及液体培养的 PLB 增殖有重要影响^[10,17]。李杰等也指出蔗糖浓度对 PLB 发育成苗有影响,认为 20 g L⁻¹ 的蔗糖有利于类原球茎发育成苗^[33]。培养基中添加有机物如椰汁、马铃薯汁、蛋白胨等对外植体的生长发育有一定的促进作用(表 1),添加一定量的活性碳可减轻褐化、促进外植体生长发育等。

类原球茎的增殖相对容易,维持诱导培养基的植物生长调节剂水平或略降低均可有效实现类原球茎的增殖^[17,19,30,42],类原球茎分化则可通过降低类原球茎诱导培养基中植物生长调节剂浓度,甚至免除植物生长调节剂来实现^[30,38,50]。试管苗生根则可通过降低培养基中无机盐浓度并在培养基中添加适量的生长素类植物生长调节剂来实现^[10,17]。

蝴蝶兰组织培养要求培养基的 pH 值相对较低,一般范围是 5.2 ~ 5.5。在培养基中添加多胺、AgNO₃、CoCl₂ 等对培养效果的影响等还有待进一步研究^[51]。

1.4 培养方式与生物反应器研究

液体培养是植物组织培养常用的方法,如在细胞悬浮培养、次生代谢物生产中有广泛应用。与固体培养相比,液体培养的优点是外植体能充分、均匀吸收培养基的各种营养、均匀接受光照;外植体产生的褐化物能及时扩散至培养基中,避免固体培

培养基中局部高浓度的褐化物对外植体生长的影响等,但不足之处在于浸在液体中的外植体氧气供应不足及易产生玻璃化现象等问题^[19,55-56]。Park等建立了蝴蝶兰 PLB 液体培养的高效增殖体系,但完全浸没于液体培养基中的类原球茎容易褐化死亡,PLB 增殖和生长效果较差,当在 VW 液体培养基中加上不同厚度的脱脂棉盘时,5 周的培养周期内随着棉盘厚度的增加,PLB 的增殖率不断增加,表明蝴蝶兰 PLB 在半浸于液体培养基下的增殖、生长效果好,增殖率是固体培养的 3.4 倍,PLB 生长 30 d 的大小与在固体培养基上生长 67 d 的相当。可见液体培养具有培养基准备方便、易于更换、培养周期短等优点,而且培养基的种类对液体培养效果的影响较大^[27,30]。Liu 等的研究表明,蝴蝶兰 PLB 在固体培养比液体培养的增殖率高,而液体增殖培养时,滚动瓶培养较摇床培养方式好^[54]。可见,PLB 完全浸没于液体培养基对增殖不利,但通过改善培养条件或培养基类型及添加物,蝴蝶兰液体培养的优点可充分体现。崔广荣等的研究表明,培养基中的植物生长调节剂浓度、蔗糖浓度、椰汁的添加量对 PLB 增殖和生长状态均有影响,液体培养中蝴蝶兰、文心兰的 PLB 增殖曲线在 5 周内呈倒“V”字型,且均以第 3 周的增殖速度最快,而固体培养的 PLB 增殖率几乎呈直线上升,液体培养的 PLB 短时间内增殖速率较固体培养高,PLB 液体增殖培养周期不宜超过 3 周^[19]。徐文华以类原球茎薄切片为材料进行 PLB 液体增殖培养也得到相似的结果^[57]。

蝴蝶兰细胞(原生质体)悬浮培养的研究刚起步,主要是因为蝴蝶兰原生质体的分离有较大的难度^[49,58]。2007 年 Shrestha 等成功实现蝴蝶兰原生质体悬浮培养再生植株,这为蝴蝶兰细胞工程及相关研究带来新的生机^[49]。

植物液体培养条件的探索为植物组织培养的新领域——生物反应器(Bioreactor)的研究和应用奠定了基础,它可从根本上解决植物组织培养上依然存在的普遍问题,实现植物离体快繁规模化、自动化控制,降低劳动强度和生产成本的目标^[55-56]。Paek 等^[56]综述了生物反应器在园艺植物、药用植物规模化生产中的应用,全面概括了生物反应器的类型、理化参数、快速繁殖的自动化控制、生产实例

等,尤其是生物反应器在蝴蝶兰类原球茎增殖、苗再生上的应用^[45],为蝴蝶兰生物反应器的研究、规模化生产、自动化控制奠定了基础。

2 蝴蝶兰组织培养褐化研究进展

褐化、污染和玻璃化现象是植物组织培养中的三大难题。外植体内的酚类物质由伤口流出后在多酚氧化酶催化下,生成褐色的醌类物质对外植体的生长产生影响,木本植物的褐化一般比草本植物严重^[59]。蝴蝶兰组织培养的褐化程度较其他兰花严重,因此蝴蝶兰组织培养过程中的褐化问题是国内近年来的研究热点之一。

2.1 外植体褐变成分、生理因素与褐变的关系

印芳等以叶片为外植体,研究了 3 个褐化程度不同的蝴蝶兰品种在初代培养过程中总酚含量的动态变化,并对 9 种酚酸进行定性定量分析,初步揭示了各种酚酸与褐变的关系,表明总酚含量越高,褐变程度越严重^[60]。许传俊等的研究表明,外植体总酚含量增加,褐变加重,并且与苯丙胺酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性呈显著正相关,而且叶片外植体在褐变过程中,其内部的细胞组织结构也发生了明显的变化:上表皮变形、维管束破坏、薄壁细胞中有不明物质沉积^[61]。进一步的研究表明,外植体褐变发生前期多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性皆升高,褐变后 PPO、POD 活性下降,其同工酶谱也发生了相应的变化,而且总酚含量、PAL 活性与褐变程度呈极显著正相关^[62-63]。印芳等^[64]研究了蝴蝶兰组培褐变与酚类物质及相关酶活性的关系,表明绿原酸、邻苯二酚、儿茶酚、咖啡酸、没食子酸、对羟基苯甲酸及香豆酸与褐变相关,苯甲酸对褐变影响较小, PAL、PPO 活性与褐变程度呈正相关,POD 与褐变有很大关系,与许传俊等的研究结果一致^[61-63]。

2.2 影响外植体褐变的主要因素

外植体内所含的酚类物质是褐化的内在因素,不同植物、不同组织、生理年龄不同的组织器官内的总酚含量、酶活性均不相同,这些内在因素造成的褐化程度与外植体培养条件有密切的关系^[59]。培养基种类、pH 值、光照、培养温度等均对蝴蝶兰叶片外植体的褐化产生一定的影响^[64-65]。蝴蝶兰

离体叶片分别在 1/2MS、MS、B₅、N₆ 培养基中培养时,1/2MS 培养基的褐变率较低,MS、B₅、N₆ 培养基的褐变率较高,滤纸桥培养则可有效降低褐变率,MS 培养基中铁盐或微量元素缺乏均引起外植体严重褐变^[62],可见培养基中的无机盐浓度对外植体的褐化程度有重要影响,合适的培养基类型可有效降低褐化率,提高 PLB 诱导率^[66]。此外,培养基中减少琼脂含量或增加光照强度也增加外植体褐化程度^[62-63]。赵伶俐等的研究表明,pH 值及培养温度与外植体褐化均有关,在相同培养条件下,pH 值为 6.5 或培养温度为 20℃ 时的外植体褐化率最低,它们通过影响外植体内 PPO 活性及总酚含量而影响褐化率^[65]。

2.3 褐变控制

通过改善培养条件来控制外植体的褐变,主要是抑制 PPO 等多酚氧化酶的活性和减少培养基中酚类物质的含量,通常在培养基中添加抗氧化剂或吸附剂来控制褐变^[65-68]。常用的抗氧化剂主要有柠檬酸、半胱氨酸、谷胱甘肽、维生素 C、硫代硫酸钠等,常用的吸附剂有活性炭、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。许传俊等的研究表明,培养基中添加柠檬酸可减轻外植体褐变,添加活性炭、抗坏血酸或 PVP 对减轻叶片外植体褐变作用不明显^[63]。但刘真华等用蝴蝶兰幼苗进行培养时,除柠檬酸外,半胱氨酸、谷胱甘肽、维生素 C、硫代硫酸钠等抗氧化剂处理均对褐化有一定的抑制作用,其中谷胱甘肽、维生素 C 的抑制效果较好,而吸附剂活性炭比 PVP 效果好,是褐化控制效果最好的^[67]。聂卫泉等^[66]和王立娅等^[68]的研究也有相近的结果。不同研究者结果存在差异可能与他们所用的外植体、培养条件不同有关。王立娅等研究表明丛生芽继代培养时,经黑暗预处理能减轻褐变、促进植株的生长^[68]。

笔者在研究中观察到,尽管接种培养后期的培养基已经完全变成了褐色,外植体依然生长状态良好,离体叶片、茎尖、试管苗等均是如此^[10,17]。褐化物对蝴蝶兰外植体的生长发育的影响程度、外植体对褐化物的敏感性等问题仍有待于全面细致的研究。

3 蝴蝶兰的离体诱变

3.1 物理诱变

利用物理射线如 Co⁶⁰ γ 射线进行植物育种已

经取得了广泛的成功,但有关蝴蝶兰诱变育种的研究报道较少。章宁等通过 Co⁶⁰ γ 辐照获得了 203 株诱变苗^[69];孙晓莉等对盆栽试管苗进行特定剂量 Co⁶⁰ γ 照射后进行 RAPD 检测,有部分苗的基因组 DNA 发生了变异^[70]。他们使用的是整体植株,特定剂量 Co⁶⁰ γ 辐射可能会引起植株部分组织细胞内 DNA 发生变异,只能得到嵌合体。如果把物理诱变与蝴蝶兰组织培养结合起来,特别是在蝴蝶兰类原球茎生长发育期或体细胞胚胎发生早期进行 Co⁶⁰ γ 辐照处理,再通过组织培养再生苗,有可能直接得到纯合的突变体。丁慧清等指出,将辐射诱变与植物组织培养结合起来,能有效加快花卉新品种的育成与变异性的稳定^[71]。徐晓薇等用蝴蝶兰类原球茎为材料进行 Co⁶⁰ γ 辐照处理,从 5000 株再生苗中发现了 3 个有较高观赏价值的优良植株^[72];张相锋等利用蝴蝶兰类原球茎进行 Co⁶⁰ γ 照射,确定了辐射诱变的类原球茎半致死剂量^[73]。目前蝴蝶兰辐照诱变育种还不能应用到生产实践中,但为蝴蝶兰物理诱变育种提供了有益的借鉴和参考。

3.2 化学诱变

1961 年,Nakasone 和 Kamemoto 报道了蝴蝶兰多倍体的诱导^[74];Griesbach 用蝴蝶兰幼小原球茎为材料,在液体培养条件下进行秋水仙素处理,结果获得了 50% 的四倍体^[75]。崔广荣等分别以蝴蝶兰类原球茎、叶片为外植体进行秋水仙素化学诱变,均获得了大量多倍体植株,建立了蝴蝶兰多倍体诱导技术体系,为进一步进行蝴蝶兰多倍体育种奠定了基础^[76-77]。Chen 等采用切割培养原球茎或类原球茎的方法,获得了蝴蝶兰多倍体,为蝴蝶兰多倍体诱导开辟了新的途径^[78]。

陈超等用 EMS、叠氮化钠对蝴蝶兰类原球茎进行离体化学诱变,观察它们引起的类原球茎细胞内部结构的变化^[79]。蝴蝶兰 EMS、叠氮化钠等离体化学诱变在外植体的选择、诱变剂种类、诱变时间、诱变方法、诱变剂量等方面有待于进一步研究。

4 蝴蝶兰转基因研究进展

传统杂交育种仍是培育新品种的主要途径,但杂交育种受蝴蝶兰种质资源、生长缓慢、生育周期长^[80-81]等因素的限制,转基因技术可对蝴蝶兰品种进行定向、快速改良。兰科植物的转基因研究起步

较晚,可能是兰科植物的组织培养技术较一般的植物难、外植体生长速度相对缓慢、对农杆菌不敏感等原因,目前仍停留在转基因技术体系建立的层面,尚未能够在生产上应用。蝴蝶兰的转基因研究主要采用基因枪法^[81-82]和农杆菌介导法^[22,24,80,83]。

1996年Anzai等用基因枪法建立了蝴蝶兰转基因体系,但转化效率较低^[82]。Men用基因枪法转化石斛-蝴蝶兰愈伤组织或PLB,2 d后用潮霉素筛选,并用Southern杂交和Northern杂交进行鉴定,得到了12%的转化子,同时还发现了1株系基因沉默——*gus* (β -Glucuronidase, β -葡萄糖醛酸酶)基因整合进基因组但未表达^[81]。

Belarmino和Mii用起源于花梗芽的悬浮培养细胞团为转化受体,用农杆菌转化株系LBA4404(pTOK233)、EHA101(pIG121Hm)介导,经潮霉素筛选、*GUS*组织表达分析、PCR检测及Southern鉴定,获得了100多个转化植株^[80]。蝴蝶兰不同品系、不同增殖时期的类原球茎对感染的反应不同,不同菌株的浸染力也不同^[84]。柴明良等用农杆菌介导法以*gus*为报告基因转化类原球茎获得成功,随后又以*gfp*(绿色荧光蛋白基因)为报告基因转化了类原球茎^[22,83]。2005年Mishiba等以来自种胚早期发育阶段的原球茎为转化受体建立了蝴蝶兰的转化体系^[85]。最近,满若君等以类原球茎为转化受体,用农杆菌3个菌株EHA105、AGL1、LBA4404浸染,分析了菌液浓度、浸染时间、酚类诱导物和共培养时间对转化的影响,初步优化了蝴蝶兰的遗传转化条件^[24]。

总的看来,蝴蝶兰转基因研究尚处于初始阶段,转化的基因也仅限于遗传选择标记基因,转化受体以类原球茎为多,实际上,影响转基因的因素有很多,优化转基因条件,提高转化效率,建立蝴蝶兰转基因技术体系,发掘可用于改良蝴蝶兰遗传性状的外源基因等工作还有待进一步深入研究。

5 展望

蝴蝶兰的离体快繁技术已较为成熟,在生产上已得到广泛应用,并取得了巨大的经济效益。但改良蝴蝶兰品种,开发新产品,满足人们对新、奇、特花卉种类的需求等尚有很多工作要做。一方面需要深入开展相关基础研究,如体细胞胚胎发生发育的激素调控、分子机理等;另一方面继续将组织培

养与物理诱变、化学诱变、基因转化等工作结合起来,为培育蝴蝶兰新种质奠定理论和技术基础。此外,对于蝴蝶兰生长发育、开花等相关基因的克隆及功能研究,解决蝴蝶兰营养生长期过长,缩短生产周期,降低生产成本,使这名贵的“兰花皇后”真正成为百姓花卉,还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Potor G. Method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* stem cutting [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1949, 18: 739-742.
- [2] Intuwong O, Sagawa Y. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1974, 43: 893-895.
- [3] Tanaka M, Hasegawa A, Goi M. Study on the clonal propagation of monopodial orchids by tissue culture. I. Formation of protocorm-like bodies from leaf tissue in *Phalaenopsis* and *Vanda* [J]. J Jpn Soc Hort Sci, 1975, 44: 47-58.
- [4] Tanaka M, Senda Y, Hasegawa A. Plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis* [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1976, 45: 1022-1024.
- [5] Zimmer K, Pieper W. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by excised buds [J]. Orchid Rev, 1978, 86: 223-227.
- [6] Ishii Y, Takamura T, Goi M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis* [J]. Plant Cell Rep, 1998, 17: 446-450.
- [7] Chen J T, Chang C, Chang W C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium gower* Ramsey and subsequent plant regeneration [J]. Plant Cell Rep, 1999, 19: 143-149.
- [8] Chen J T, Chang W C. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu [J]. In vitro Cell Devp Biol Plant, 2004, 40: 290-293.
- [9] Chen J T, Chang W C. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis* [J]. Biol Plant, 2006, 6: 169-173.
- [10] Cui G R(崔广荣), Hou X L(侯喜林), Zhang Z X(张子学), et al. Efficient somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* in vitro culture and histological observations [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2007, 34(2): 431-436.(in Chinese)
- [11] Wang H Y(王怀宇). Rapid clonal propagation of *Phalaenopsis* by tissue culture [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 1989, 16(1): 73-76.(in Chinese)
- [12] Lu X H(鲁雪华), Guo W J(郭文杰), Xu L H(徐立晖), et al. The preliminary research on the rapid propagation of *Phalaenopsis* by using the joint-points of flower-stems as explants [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2002, 29(5): 491-492.(in Chinese)
- [13] He S L(何松林), Wang X(王献), Lu L(鲁琳), et al. The effect of culture media and organic compounds on the differentiation of *Phalaenopsis* PLB [J]. J CS For Univ(中南林学院学报), 2003, 23(5): 11-13.(in Chinese)
- [14] Qin F(秦凡), Zhou J Y(周吉源). Effect of different hormone on

- rapid propagation of *Phalaenopsis* [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2003, 21(5): 452–456.(in Chinese)
- [15] Chen Y(陈勇), Lin K X(林开县), Wang J H(王君晖). Studies on rapid propagation and large-scale planting of *Phalaenopsis* hybrids [J]. J Zhejiang Univ (Sci) (浙江大学学报: 理学版), 2004, 31(1): 84–87.(in Chinese)
- [16] Wang J W(王敬文), Ming F(明凤), Ye M M(叶鸣明), et al. A reliable protocol for plant regeneratin from pedicel axillary bud of *Phalaenopsis in vitro* [J]. J Fudan Univ (Nat Sci) (复旦大学学报: 自然科学版), 2004, 43(2): 230–234.(in English)
- [17] Cui G R(崔广荣), Zhang Z X(张子学), Zhang C Y(张从宇), et al. Study on PLB induction and propagation of *Phalaenopsis* [J]. Seed (种子), 2006, 25(12): 20–23.(in Chinese)
- [18] Cui G R(崔广荣), Zhang Z X(张子学), Zhang C Y(张从宇), et al. High efficiency regeneration of PLBs from thin cell layers of PLBs of *Oncidium* and *Phalaenopsis in vitro* [J]. J Anhui Sci Techn Univ (安徽科技学院学报), 2009, 23(2): 21–27.(in Chinese)
- [19] Cui G R(崔广荣), Zhang Z X(张子学), Hu N B(胡能兵), et al. A study on *Phalaenopsis* PLBs propagation in liquid culture [J]. Acta Laser Biol Sin(激光生物学报), 2009, 18(2): 189–194.(in Chinese)
- [20] Su J L(苏家乐), Chen S P(陈尚平), Tang J S(汤久顺), et al. Protocorm-like body induction and propagation of *Phalaenopsis* by Using the cutting segment of lower-stem-knot as explants [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2007, 43(5): 876–878.(in Chinese)
- [21] Bu Z Y(卜朝阳), Jiang H P(蒋慧萍), Man R J(满若君). Study on protocorm-like body induction by using flower-stalk and leaf of *Phalaenopsis in vitro* culture [J]. J Jiangsu Agri Sci(江苏农业科学), 2008, 36(3): 147–150.(in Chinese)
- [22] Chai M L, Xu C J, Senthil K K, et al. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Sci Hort, 2002, 96: 213–224.
- [23] Chai M L(柴明良), Kim D H(金斗焕). Establishment of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Phalaenopsis* [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2004, 31(4): 537–539.(in Chinese)
- [24] Man R J(满若君), Bu Z Y(卜朝阳), Li Y R(李杨瑞). Preliminary study on the genetic transformation systems of *Phalaenopsis* and *Oncidium* [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2008, 36(8): 3129–3131.(in Chinese)
- [25] Ichihashi S. Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks [J]. Lindleyana, 1992, 7: 208–215.
- [26] Homma Y, Asahira T. New means of *Phalaenopsis* propagation with internodal sections of flower stalk [J]. J Jpn Soc Hort Sci, 1985, 54: 379–387.
- [27] Park S Y, Syuuichi K, Atsushi K, et al. Efficient propagation of protocorm-like bodies of *Phalaenopsis* in liquid medium [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1996, 45(1): 79–85.
- [28] Wang H Y(王慧瑜), Zhang X S(张晓申), Yang L J(杨录军), et al. The culture technology of *Phalaenopsis* embryo and its rapid propagation [J]. North Hort(北方园艺), 2003, 35(5): 57.(in Chinese)
- [29] Tanaka Y, Sakanishi Y. Clonal propagation of *Phalaenopsis* by leaf culture [J]. Amer Orchid Soc Bull, 1977, 46: 733–737.
- [30] Park S Y, Hosakatte N M, Peak K Y. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves [J]. *In vitro* Cell Devp Biol Plant, 2002, 38: 168–172.
- [31] Peng L X(彭立新), Wang S(王姝), Meng G Y(孟广云). Study on tissue culture and rapid propagation of *Phalaenopsis* [J]. Tianjin Agri Sci(天津农业科学), 1999, 5(2): 27–29.(in Chinese)
- [32] Li C H(李成慧), Cai B(蔡斌), Shan L L(单丽丽), et al. Application of orthogonal design in protocorm induction from leaves of *Phalaenopsis* [J]. J Yangzhou Univ (Agri Life) (扬州大学学报: 农业与生命科学版), 2004, 25(2): 76–78.(in Chinese)
- [33] Li J(李杰), Huang M R(黄敏仁), Wang M X(王明庥), et al. Plantlets regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis* [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci) (南京林业大学学报: 自然科学版), 2005, 29(3): 28–32.(in Chinese)
- [34] Cui G R(崔广荣), Liao L L(廖玲玲), Liu Y C(刘跃成), et al. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Phalaenopsis*, subsequent development and plant regeneration [J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 2007, 28(1): 54–59.(in English)
- [35] Yang H Y(杨海芸), Wu Z(吴震), Wang G D(王广东), et al. Effects of different culture condition on adventitious shoots regeneration from the excised leaves of *Phalaenopsis* [J]. J Nanjing Agri Univ(南京农业大学学报), 2007, 30(1): 44–49.(in Chinese)
- [36] Huang L(黄磊), Chen Z L(陈之林), Wu K L(吴坤林), et al. Effects of cutting and explants size on PLB induction from *Phalaenopsis amabilis* leaves [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2009, 17(3): 261–266.(in Chinese)
- [37] Chai X H(柴向华), Li J(李军), Zhu B Q(朱饱卿), et al. Leaf clonal propagation of *Phalaenopsis* Blume [J]. Chin J Trop Agri(热带农业科学), 2004, 24(3): 18–20.(in Chinese)
- [38] Kuo H L, Chen J T, Chang W C. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* ‘Little Steve’ [J]. *In vitro* Cell Devp Biol Plant, 2005, 41: 453–456.
- [39] Yoneda K, Momose H. PLB and plantlet formation by root-tip culture in *Phalaenopsis* [J]. Bull Coll Agri Vet Med. Nihon Univ, 1988, 45: 191–196.
- [40] Li J J(李进进), Liao J J(廖俊杰), Ke L W(柯丽婉), et al. Tissue culture of *Phalaenopsis*’ root segments [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2000, 36(1): 37.(in Chinese)
- [41] Liu F P(刘福平), Chen Y L(陈移亮). Effect of cytokinin on the induction and macromolecules metabolic kinetics of somatic embryogenesis in *Phalaenopsis* sp. [J]. Fujian Agri Sci(福建农业科学), 2002, 22(2): 162–166.(in Chinese)
- [42] Duan J X, Chen H, Yazawa S. *In vitro* propagation of *Phalaenopsis*

- via culture of cytokinin-induced nodes [J]. J Plant Growth Regul, 1996, 15: 133–137.
- [43] Chen W H, Chen T M, Fu Y M, et al. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis* [J]. Plant Cell Rep, 1998, 18: 7–13.
- [44] Lü X H(吕晓辉), Huang X N(黄象男), Guo X H(郭晓慧), et al. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis* [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2007, 35(25): 8068–8070. (in Chinese)
- [45] Park S Y, Murthy H N, Paek K Y. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2000, 63: 67–72.
- [46] Ahloowalia B S. Somatic embryos in monocots: their genesis and genetic stability [J]. Rev Cytol Biol Veget Bot, 1991, 14: 223–235.
- [47] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 8–11.
- [48] Li J(李杰), Huang M R(黄敏仁), Wang M X(王明麻), et al. Research and application on the biotechnique engineers in orchids [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci) (南京林业大学学报: 自然科学版), 2006, 30(2): 108–112. (in Chinese)
- [49] Shrestha B R, Tokuhara K, Mii M. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Phalaenopsis* [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26: 719–725.
- [50] Gow W P, Chen J T, Chang W C. Influence of growth regulators on embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids [J]. Acta Physiol Plant, 2008, 30: 507–512.
- [51] Gow W P, Chen J T, Chang W C. Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct embryo genesis from leaf explants [J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31: 363–369.
- [52] Chen Y Q, Chirapan P. Effects of thidiazuron and N_6 -benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis* [J]. Plant Growth Regul, 1995, 16: 99–101.
- [53] Tokuhara K, Mii M. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources [J]. In vitro Cell Dev Biol Plant, 2003, 39: 635–639.
- [54] Liu T H A, Lin J J, Wu R Y. The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like bodies [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2006, 86: 125–129.
- [55] Meira Z. Simple bioreactors for mass propagation of plants [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005, 81: 277–285.
- [56] Paek K Y, Chakrabarty D, Hahn E J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005, 81: 287–300.
- [57] Xu W H(徐文华). Study on propagation of *Phalaenopsis* in liquid culture [J]. J Yangtze Univ (Nat Sci) Agri Sci Vol(长江大学学报: 自然科学版 农学卷), 2007, 4(4): 71–72. (in Chinese)
- [58] Qiao Y X(乔永旭), Zhang Y P(张永平), Wang G L(王桂兰), et al. Optimization of the method for isolating protoplast of *Phalaenopsis amabilis* Bl. [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 2008, 44(6): 1177–1180. (in Chinese)
- [59] Luo X F(罗晓芳), Tian X T(田硯亭), Yao H J(姚洪军). Polyphenol oxidase activities and phenol contents in tissue culture [J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报), 1999, 21(1): 92–95. (in Chinese)
- [60] Yin F(印芳), Ge H(葛红), Peng K Q(彭克勤), et al. The influence of phenols on tissue browning of *Phalaenopsis* [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2006, 33(5): 1137–1140. (in Chinese)
- [61] Xu C J(许传俊), Li L(李玲), Li H(李红), et al. Preliminary study on the elements of browning and the changes in cellular texture of leaf explant browning in *Phalaenopsis* [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2006, 33(5): 1111–1113. (in Chinese)
- [62] Xu C J(许传俊), Li L(李玲). Influence of medium and light intensity on the leaf explant browning in *Phalaenopsis* sp. in vitro [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 2006, 35(1): 9–12. (in Chinese)
- [63] Xu C J(许传俊), Li L(李玲). Changes of total phenol content and the activities of PPO, POD and PAL during the browning in *Phalaenopsis* explant in vitro [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2006, 33(3): 671–674. (in Chinese)
- [64] Yin F(印芳), Ge H(葛红), Peng K Q(彭克勤), et al. Relationship between tissue browning and phenolic acids and related enzymes in *Phalaenopsis* [J]. Sci Agri Sin(中国农业科学), 2008, 41(7): 2197–2203. (in Chinese)
- [65] Zhao L L(赵伶俐), Ge H(葛红), Fan C H(范崇辉), et al. Effects of pH and temperature on browning of *Phalaenopsis* [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2006, 33(6): 1373–1376. (in Chinese)
- [66] Nie W Z(聂卫卓), Bei L X(贝丽霞). Research of preventing leaves browning on the tissue culture of *Phalaenopsis* [J]. J Heilongjiang August First Land Reclam Univ(黑龙江八一农垦大学学报), 2008, 20(1): 28–31. (in Chinese)
- [67] Liu Z H(刘真华), Ge H(葛红), Guo S X(郭绍霞), et al. Studies of antibrowning in the tissue culture of *Phalaenopsis* [J]. Acta Hort Sin(园艺学报), 2005, 32(4): 732–734. (in Chinese)
- [68] Wang L Y(王立妮), Fang Z(方正), Li Y L(李英丽), et al. Study on browning of *Phalaenopsis amabilis* in the tissue culture [J]. J Agri Univ Hebei(河北农业大学学报), 2008, 31(5): 42–45. (in Chinese)
- [69] Zhang N(章宁), Su M H(苏明华), Xu S X(徐凤侠), et al. Radioactive breeding of *Phalaenopsis* spp. using RAPD method [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 2007, 36(5): 19–22. (in Chinese)
- [70] Sun X L(孙晓莉), Zhang T(章铁), Liu X Q(刘秀清). Study on the radiation of the Co^{60} γ -ray for variation induction in *Phalaenopsis aphrodite* by using RAPD-PCR technique [J]. Chin Agri Sci Bull(中国农学通报), 2009, 25(1): 156–159. (in Chinese)
- [71] Ding H Q(丁慧清), Zhang D X(张道旭), Yao Y(姚远). Combining

- of radiating and tissue culture can quichen new horticultural type's production and stabilizing [J]. Liaoning Agri Sci(辽宁农业科学), 1991(2): 49–51.(in Chinese)
- [72] Xu X W(徐晓薇), Lin S S(林绍生), Yao L J(姚丽娟), et al. Preliminary study on radioactive breeding of *Phalaenopsis* [J]. Guangxi Trop Agri(广西热带农业), 2008, 115 (2): 1–2. (in Chinese)
- [73] Zhang X F(张相锋), Ren Y L(任艳丽), Shang T C(尚天翠), et al. Effects of Co^{60} γ ray irradiation on protocorm-like bodies growth of *Phalaenopsis* [J]. North Hort(北方园艺), 2009(3): 177–180.(in Chinese)
- [74] Nakasone H Y, Kamemoto H. Artificial induction of polyploidy in orchids by the use of cochicine [J]. Hawaii Agri Exp Stn Techn Bull, 1961, 42: 1–27.
- [75] Griesbach R J. Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1981, 1: 103–107.
- [76] Cui G R(崔广荣), Zhang Z X(张子学), Hu N B(胡能兵), et al. *Phalaenopsis* tetraploid induction by colchicines during protocorm-like bodies in liquid culture [J]. J Zhejiang Univ (Agri Life Sci) (浙江大学学报: 农业与生命科学版), 2010, 36 (1): 49–55. (in Chinese)
- [77] Cui G R(崔广荣), Zhang Z X(张子学), Zhang C Y(张从宇), et al. Colchicine chemical induction during somatic embryogenesis from leaf segments of *Phalaenopsis* test tube plantlets [J]. Sci Agri Sin (中国农业科学), 2009, 42(9): 3368–3373.(in Chinese)
- [78] Chen W H, Tang C Y. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2009, 29: 229–238.
- [79] Chen C(陈超), Wang G L(王桂兰), Qiao Y X(乔永旭), et al. The PLB chemical induced mutagenesis and regeneration of *Phalaenopsis* [J]. J Nucl Agri Sci(核农学报), 2006, 20(2): 99–102. (in Chinese)
- [80] Belarmino M M, Mii M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 435–442.
- [81] Men S, Ming X, Wang Y, et al. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 592–598.
- [82] Anzai H, Ishii Y, Shichinohe M, et al. Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment [J]. Plant Tiss Cult Lett, 1996, 13: 265–271.
- [83] Chai M L, Xu C J, Senthil K K, et al. Stable transformation of protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Sci Hort, 2002, 96: 213–224.
- [84] Zhu G F(朱根发), Guo Z F(郭振飞). Progress on molecular biology of main ornamental Orchidaceae [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 2004, 21(4): 471–477.(in Chinese)
- [85] Mishiba K I, Chin D P, Mii M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phalaenopsis* by targeting protocorms at an early stage after germination [J]. Plant Cell Reports, 2005, 24: 297–303.
- [86] Cui G R(崔广荣). Methods and characteristics of plant transgene and gene silence [J]. J Anhui Techn Teach Coll(安徽技术师范学院学报), 2003, 17(1): 37–41.(in Chinese)