

兰花育种技术研究进展

吴根良¹, 商世能², 沈国正¹, 孙 瑶¹

(1. 浙江省杭州市农业科学研究院, 杭州 310024; 2. 浙江省杭州万向职业技术学院, 杭州 310023)

摘要: 综述了兰花的种子离体萌发、利用生化技术和分子标记进行兰花种质资源分类和种间品种间鉴别。同时概述了调控花色素合成酶、花器官形成、子房发育和胚珠发育以及构成建兰花叶病毒(CyMV)等特异基因分离克隆, 以及转基因技术等研究进展, 并对我国兰花育种进行了展望。

关键词: 兰花; 离体萌发; 分子标记; 基因分离; 基因转化; 育种

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2006)04-0115-03

兰花一般是指兰科植物(Orchidaceae), 它是鲜花植物中最大科之一, 全世界约有 800 多属, 25 000 多种, 分布于世界各地, 大多数种类分布于东南亚、澳大利亚、中南美洲、非洲和马达加斯加。我国的野生兰科植物约有 173 属, 1 240 多种^[1], 在南北各地均有分布, 但以云南、台湾、海南最为丰富。兰花是珍贵的观赏花卉, 此外还有作为药用的天麻(*Gastrodia elata*)、白芨、红门兰等和作香料的香子兰等, 有极高的经济价值。

具有观赏和药用价值的兰科植物目前在国际、国内市场上占有重要地位。保护和利用我国的野生兰科植物, 并拥有和选育新的种源, 才能在世界各国兰花业竞争日益激烈的今天占有一席之地。

1 兰花种子的离体萌发

远缘杂交和品种间杂交是兰花育种的重要方法之一。兰花种子萌发是兰花杂交育种的重要环节, 因为在自然条件下兰花种子的萌发率很低。

1.1 共生萌发

Bernard 在 1899 年首次分离出兰花的根菌, 并用其感染兰花的种子进行萌发试验, 从而创立了兰花种子共生萌发的方法。他指出: 在自然条件下兰科植物种子萌发需要适宜的真菌感染, 它促进种子萌发就在于把胚和基质连接起来, 形成共生系统。在这个共生系统中真菌促进了种子的糖异生及贮藏物质的利用, 并在它开始光合作用前, 持续提供营养物质。我国兰科植物菌根菌研究发展很快, 天麻菌根菌已经应用于天麻种子萌发和人工栽培。徐锦堂等从天麻原球茎中分离出紫萁小菇(*Mycena osmudicola*), 用天麻种子拌该

菌, 播种后种子的萌发率可达 20% 以上, 为此促进了天麻的人工栽培。郭顺星等对白芨种子的共生萌发进行了研究, 拌菌后的种子萌发率、原球茎和营养器官生长速率显著高于对照。郭顺星等对真菌在石斛(*Dendrobium*)种子萌发中的作用进行了研究。在种子共生萌发研究中, 尚有很多问题需要进一步深入探讨, 如兰科植物菌根菌的种类和特点、兰科植物与真菌的相互作用机制、优良共生菌的筛选、兰科菌剂的研制等。

1.2 非共生萌发

Bernard 以眉兰(*Ophrys*)的块茎配制培养基, 使卡德丽亚兰(*Cattleya*)与蕾丽亚兰(*Laelia*)杂交种的种子成功萌发, 开创了非共生萌发的先例。随后, Arditti 用非共生萌发对齿瓣兰(*Odontoglossum*)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)、石斛兰、文心兰(*Oncidium*)等种子进行萌发研究, 得到了正常的种苗。

兰花中有些种类未成熟或接近成熟的种子比成熟种子更容易萌发。仙人指甲兰(*Aerides*)、白拉索兰(*Brassavola*)、布鲁通氏兰、卡德丽亚兰、厚唇兰、树兰(*Epidendrum*)、文心兰、蝴蝶兰、肾药兰和万代兰(*Vanda*)等 10 个属的 19 个种和 15 个杂交种的种子萌发试验证明, 未成熟种子能很好萌发, 最短的是在授粉后 40 ~ 50d 萌发。

对于萌发难度较大的地生兰, 进行适当的种子预处理可以提高萌发率。段金玉等对兰属(*Cymbidium*)10 种植物的种子离体萌发研究表明, 用 0.1mol/L 氢氧化钠浸泡种子 10 ~ 30min, 能使多花兰(*C. floribundum*)、春兰(*C. goeringii*)、双飞燕(*C. goer.*)、线叶春兰(*C. goer. var. serratum*)、寒兰(*C. kanran*)、套叶兰(*C. cyperifolium*)等种子的萌发率提高 10 倍以上。

大部分兰花种子可通过无菌萌发方式发芽, 而萌发率因基因型而异。气生兰及其杂交后代的种子萌发力较强, 地生兰种子萌发率普遍较低。即使同为蝴蝶兰不同杂交组合的种子萌发率和幼苗生长发育也不同^[2]。一般在种子无菌萌发过程中激素是培养基中不可缺少的成分, 但有人认为卡德丽亚兰种子萌发可采用不含激素的 MS 培养基^[3]。杨美纯等认为在 MS、KC 和花宝三种培养基中, MS 最适合蝴蝶兰种子的萌发, 香蕉汁 150g/L 可明显提高种子萌发率并促进幼苗生长^[4]。

2 兰花的分类鉴定



第一作者简介: 吴根良, 1963 年 10 月生, 本科, 高级农艺师, 主要从事蔬菜花卉栽培技术研究和技术推广工作, 主持完成的相关重要科研项目有国家重大科技产业工程《工厂化高效农业科技示范工程》专题一项; 省级重点项目“切花月季高产、优质栽培技术开发”, “主要

鲜切花新品种引种与优质高效栽培技术研究”等, 曾荣获省市各类科技进步奖五项, 现主持浙江省科技厅重点项目“名贵花卉卡特兰产业化关键技术研究”等项目。

*基金项目: 杭州市科技发展计划(200462N08)。

收稿日期: 2006-01-14

兰花存在属间自然杂交种、属内种间、变种间和品种间的自然杂交种,人们常凭形态特征鉴定,如在云南新近发现的变种岩地兜兰(*Paphiopedilum tranlienianum* var. *saxosum*)^[9]。研究者利用同工酶技术对国兰品种或变种进行鉴定分类,得到的结果与传统的形态分类基本相似^[9]。国内外应用分子标记术进行兰花的分类已有报道。学者在杂交中观察到春兰与建兰、寒兰和墨兰(*C. sinense*)具有较高的亲和性;蕙兰(*C. faberi*)、纹瓣兰(*C. aloifolium*)、鼓槌石斛(*D. chrysotoxum*)和蝴蝶兰杂交则无亲和性。经 RAPD 分析,发现春兰与建兰、寒兰和墨兰的亲缘关系较近,与蕙兰和纹瓣兰亲缘关系较远,与石斛兰和蝴蝶兰更远。文李利用 RAPD 技术分析兰属 5 个种 2 个变种共 13 个品种间的亲缘关系。从 55 种 10 个碱基随机引物中筛选出 4 种引物,扩增出 93 条多态性带,多态率为 100%,经聚类分析,表明:建兰、墨兰和春兰的亲缘关系较近,而春剑(*C. longibracteatum*)、寒兰、独占春(*C. eburneum*)和兔耳兰(*C. lancifolium*)与建兰的关系较近^[7]。谭文澄等采用 LZF-1 寡核苷酸探针和限制性内切酶 Hinf 1 检测了兰属 23 个样株和石斛兰属 1 个样株的 DNA 酶切片断,获得了清晰易读的由 6 ~ 15 条带组成有特异性的遗传指纹图谱。各种植物谱带各具特异性,可见其亲缘关系不同;相同种的植物谱带条数一致,片断的分子量类似,此方法能获得特异的 DNA 图谱,可进一步应用于兰属的分子遗传分析^[8]。在栽培品种的鉴定上,梁红健等使用 10 种 20 个碱基引物对 19 个中国兰花品种的基因组 DNA 进行扩增,共产生 83 条扩增带,其中 80 条为多态性带。每个兰花品种都有其特有的扩增带可与其它品种区别开来。这种特异的条带可作为一个品种分子标记应用于品种鉴定, RAPD 对基因组的分析结果与传统分类学的结果基本相似。

3 兰花特异基因的分离克隆

3.1 花色基因

兰花的花色是重要的育种目标。近几年从兰花的不同组织中获得了许多基因和基因相关片断。查尔酮合成酶(又称苯基苯乙烯合成酶 *chalcone synthase*, *CHS*)是花青素生物合成的一个重要的关键酶。利用转基因共抑制的特点,将查尔酮合成酶反义基因 DNA 转到花卉中,可以改变植物的花色。Liew 等利用同源探针的方法,从 *Bromheadia finlaysoniana* 的 cDNA 文库中克隆出 3 个 *CHS* 基因 *OCHS3*、*OCHS4* 和 *OCHS8*,其序列长度分别为 1 445 bp、1 382 bp 和 1439 bp。三者同源性达 97% 以上。为了探析控制蝴蝶兰花色的机制,研究者以“白花红唇蝴蝶兰”和“红花朵丽蝶兰”为材料,进行了 *CHS* cDNA 克隆分析,发现前者约有 11 个 *CHS* 基因,后者约有 7 个 *CHS* 基因,可见蝴蝶兰 *CHS* 基因为多基因族。从“白花红唇蝴蝶兰”中选取出的 *pOCHS01* 克隆系, DNA 序列长度为 1 498 bp,可编码 390 个氨基酸。利用 *pOCHS01* 作探针,对以“粉红花蝴蝶兰”为母本与“白花蝴蝶兰”杂交后代的淡红花、晕红花和白花 Southern 杂交分析,考察到子代的杂交带与母本相似,而与父本完全不同。因此认为“白花红唇蝴蝶兰”的 *pOCHS01* 克隆系,可能是负责红花或喷点花花色表达的基因,而白花亲本可能无 *pOCHS01* 基因存在,它可能由其它 *CHS* 基因负责控制。韩颖颖等利用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)得到在蝴蝶兰花瓣中特异性表达的查尔酮合成酶 cDNA(*pchs-1*)。

经 DNA 序列分析表明,该序列与已发表的查尔酮合成酶基因有很高的同源性^[9]。查尔酮合成酶是次生代谢的关键酶,编码该酶的基因发生抑制后,既会引起易于观察的表型变化,又不会影响植物的生长。获得相关基因为深入开展改良花色的基因工程,奠定了一定的基础。

3.2 花发育基因

最近的研究表明,许多基因和基因片断与花的发育有关。Yu 等提取了石斛兰属品种 *Madame Thong-In* 营养期和花期的茎尖分生组织总 RNA,利用 mRNA 差异显示方法,发现营养期有 53 个特异表达的 cDNA 克隆,而在花期有 16 个特异表达的 cDNA 克隆。通过 Northern blot 分析,证实由营养生长向生殖生长的转变中,有 12 种 cDNA 克隆表达降低,而 8 种 cDNA 克隆表达增加。序列分析表明,其中 5 个基因可能是与花的转变有关的基因。他们进一步从兰花转化期的茎尖分生组织得到 *gene 7(otg 7)* 并用其为探针,分离出 3 个基因 *DOMADS1*、*DOMADS2* 和 *DOMADS3*,它们与花器官的形成有关^[10,11]。

在兰科植物中子房的发育是由授粉启动的。目前已发现和分离了一批控制兰花子房发育的特异基因。如蝴蝶兰 *PHAL.039* 基因,在子房发育的不同阶段都有表达,可能是子房发育的重要调控基因。利用 *PHAL.039* 作探针,在拟南芥花芽的 cDNA 文库中发现了与其同源的基因 *ATML1*。

张宪省等也对蝴蝶兰(*P. 'Generalku' hor.*)在授粉后的子房发育过程进行了研究。结果显示:在授粉后 12、24 和 48h,柱头和花柱中乙烯的产生和 ACC 氧化酶 mRNA 的积累显著下降,而子房内却明显上升,表明授粉后雌蕊中乙烯的产生与 ACC 氧化酶基因的表达密切相关。他们进一步分析了生长素、乙烯及去雄等与授粉有关因子调节下 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因在朵丽兰(*Doritaenopsis hybrid Hort.*)花中的表达。结果表明,生长素和乙烯均可诱导 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的 mRNA 在花器官中积累,而且积累模式相似。然而,去雄却不能诱导这两个基因在花器官中表达。原位杂交结果表明,生长素和乙烯处理后,ACC 氧化酶的 mRNA 在柱头的表皮和薄壁细胞中积累。Bui 和 O'Neill 发现 3 种 ACC 合成酶基因在蝴蝶兰授粉后的子房中起着重要作用。在蝴蝶兰授粉后 1h 便可在柱头上检测到 *PHAL-ACS2* 的表达,2h 后可在子房中检测到 *PHAL-ACS3* 的表达,而授粉后 6h 才可检测出 *PHAL-ACS1* 表达。利用外源生长素刺激,进行假授粉,也可在柱头和子房中发现 *PHAL-ACS2* 和 *PHAL-ACS3* 的先表达。可见这两种 ACC 合成酶基因的表达,是授粉的初始信号,而 *PHAL-ACS1* 则是次级信号。

3.3 胚珠发育基因

研究胚珠的发育可以揭示许多有关花发育的机制问题。蝴蝶兰在胚珠成熟时期的 cDNA 文库已被构建,并已分离出一批胚珠发育特异 cDNA 克隆。其中 cDNA 克隆 *O108*、*O126*、*O129* 等均为在成熟胚珠中表达或优势表达的特异基因。*O138* 是一个与成熟胚珠发育相关的基因,该基因的 mRNA 在成熟胚珠和根中大量积累,但在大孢子母细胞时期的胚珠中和子房中积累水平很低。DNA 序列分析表明,该基因含一个编码 284 个氨基酸,分子量为 30kD 的开放阅读框(ORF)^[12]。

3.4 花叶病毒基因

建兰花叶病毒(CyMV)和齿兰环斑病毒(ORSV)是危害兰花的两种重要病毒,对兰花生产威胁巨大。目前基因组序列已全部测定,RNA基因组为6 227 bp,3'端有poly(A)加尾,5'端有带帽结构,与马铃薯X病毒类似^[13]。其基因组结构包含5个ORF,ORF 1编码一个大小为160 kDa的依赖RNA的RNA聚合酶,ORF 2~4编码一个分子量为26 kDa/13 kDa/10 kDa的三基因连锁结构,ORF 5编码24 kDa的外壳蛋白(coat protein, CP)。潘俊松等测出CP基因大小为666 nt,核苷酸顺序与国外文献报道序列同源性为88.8%~96.1%,推算出氨基酸同源性为75.6%~91.0%,外壳蛋白亚氨基酸顺序差异主要在近C-端部分^[13]。Barry等通过比较不同来源的CyMV的运动蛋白(movement protein, MP)基因及齿兰环斑病毒编码54 kDa蛋白基因序列的差异,发现新加坡、日本、韩国、德国和夏威夷群岛的CyMV和ORSV的基因序列亲缘关系很近,核苷酸序列的同源性达91%~99%。刘志昕等从石斛兰中获得CyMV分离物中提取病毒RNA,用RT-PCR方法获得约500 bp MP基因片断。序列分析表明,该基因片断由474个核苷酸组成,与夏威夷分离物、新加坡分离物相应基因核苷酸序列分别具有97.8%同源性。根据核苷酸序列推导该片断含由个部分重叠的ORF,分别编码14 kD、12 kD和10kD的多肽^[14]。

4 基因转化

目前进行基因转化研究的兰花种类有蝴蝶兰属、兰属、石斛兰属、文心兰属、万代兰属、五唇兰属(Doritaenopsis)、卡德丽亚兰属和长萼兰属(Brassia)等^[15~17]。至今尚停留在建立基因转化体系的水平,还未达到应用阶段。

在基因转化中,花粉管法较为简便。它是在蝴蝶兰的子房受精时,将DNA从花粉管带入受精卵。经研究以授粉后第30d前后注射DNA效果最好。

另一类的基因转化的方法是基因枪和农杆菌法。Chia等报道了通过微粒子轰击,在万代兰的原球茎(protocolorm)上检测到萤火虫荧光素酶基因(LUX)瞬间表达。研究者以卡那霉素为选择剂,将NEO基因转入石斛兰,21个月获得稳定表达。有人将花色苷合成调控基因导入五唇兰中,获得瞬间表达,花瓣颜色发生变化。柴明良等把蝴蝶兰‘White Hikaru’类原球茎(protocolorm-like body PLB)用针刺后,与含绿色荧光蛋白基因(gfp)和潮霉素磷酸转移酶基因(hpt)的根瘤农杆菌共培养,培育出了转基因的蝴蝶兰。经绿色荧光蛋白检测和Southern印迹,证实了再生植株中含有gfp基因和hpt^[15]。从而初步建立了蝴蝶兰农杆菌转基因体系。

Yang等将带有NPTII和GUS标记基因的pKH200质粒,通过基因枪对大花蕙兰原球茎进行基因转化的研究,培育出抗卡那霉素的原球茎和转基因植株。经过PCR分析,证明NPT II基因存在于转基因植株中^[16]。我国学者将LFY基因(拟南芥中分离出的具有促进植物提早开花的基因)与单子叶植物的UBI启动子构建了一个适合在单子叶植物中高效表达的含有LFYcDNA的表达载体(pBIL-1),应用基因枪转化法,将其导入文心兰的原球茎中,获得了一

些卡那霉素抗性克隆^[17]。

5 展望

有关国际条约禁止野生兰花国际贸易,国内也增强了对野生资源保护意识。因此,加强兰花育种,拥有自主的知识产权,才能立足于竞争日益激烈的兰花业,走向世界。

今后我国的育种方式,除了传统的杂交育种外,可与种子离体萌发技术、组织培养相结合,利用分子生物技术建立兰花的分子标记图谱,对我国兰花资源进行分类和鉴别新品种亲缘关系,为兰花育种提供早期的辅助选择指标。兰花特异基因的分离克隆和转基因技术研究,可望将外来基因导入兰花植株内,以改良株形、花型、花色、花香和提高抗逆性,以缩短兰花育种周期和增强育种的预见性,提高育种效率,从而为兰花育种提供新途径。

参考文献:

[1] 陈心启.中国野生兰科植物彩色图鉴[M].北京:科学出版社,1999.

[2] 魏翠华.蝴蝶兰无菌播种培养实验[J].福建农业科技,2000,(2):16-17.

[3] 鲁雪华,徐立晖,郭文杰,等.卡德丽亚兰的组织培养[J].江西农业大学学报,2004,26(2):242-245.

[4] 杨美纯,周歧伟,许鸿源.蝴蝶兰的种子培养[J].广西农业生物科学,2002,21(4):258-260.

[5] 徐向明,欧阳雄.岩地兜兰,云南兰科植物一新变种[J].华南农业大学学报,2005,26(1):123-124.

[6] 孙彩云,张明永,梁承邨,等.墨兰、春兰变种和品种间同工酶分析[J].园艺学报,2002,29(1):75-77.

[7] 文李,叶庆升,王小菁,等.利用RAPD技术分析兰属品种间的亲缘关系[J].应用与环境生物学报,2001,7:29-32.

[8] 谭文澄,方盛国,谢海,等.兰属植物DNA指纹图的研究.[J].四川师范大学学报,1999,23(4):407-411.

[9] 韩颖颖,明凤,王敬文,等.蝴蝶兰查尔酮合酶基因cDNA的克隆、鉴定及其原核表达[J].复旦学报,2004,43(2):236-239.

[10] Yu H, Goh C J. Differential gene expression during floral transition in an orchid hybrid Dendrobium ‘Madame Thong-In’[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19:926-931.

[11] Yu H, Goh C J. Identification and characterization of three orchid MAD-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition[J]. Plant Physiol., 2000, 123:1325-1336.

[12] 王玲.蝶兰胚珠发育基因的表达及序列分析[J].植物学报,1999,41(3):276-279.

[13] 潘俊松,刘志昕,吴豪,等.建兰花叶病毒外壳蛋白基因序列分析及病毒检测[J].农业生物技术学报,1999,7(4):56-60.

[14] 刘志昕,吴豪,潘俊松,等.建兰花叶病毒运动蛋白基因克隆及序列分析[J].中国病毒学,2001,16(1):51-54.

[15] 柴明良,金斗焕.农杆菌介导的蝴蝶兰基因转化系统的建立[J].园艺学报,2004,31(4):537-539.

[16] Yang J, Lee H J, Shin D H, et al. Genetic Transformation of Cymbidium orchid by particle bombardment [J]. Plant Cell Rep, 1999, 18:978-984.

[17] 邵寒霜,李继红,王胜培. IfycDNA 高效单子叶植物表达载体的构建及转化兰花研究初报[J].热带作物学报,2000,21(3):58-62.