

# 兰花转基因研究进展

柴明良\* 徐晓薇<sup>1</sup> 林绍生<sup>1</sup>(浙江大学园艺系, 杭州 310029; <sup>1</sup>浙江省农业科学院亚热带作物研究所, 温州 325005)

**摘要** 作为热带和亚热带最重要的花卉之一, 兰花在基因工程的改良上有着诱人的前景。现就与兰花转基因有关的方面, 即成功遗传转化的兰花种属、兰花愈伤组织的诱导和培养、转基因外植体的处理、转基因材料的选择技巧、引入的外源基因和相关基因的克隆, 以及兰花转基因的前景进行综述。

**关键词** 兰花; 愈伤组织; 类原球茎; 转基因

兰花是整个兰科植物(Orchidaceae)的总称, 全世界约有 800 多属, 25 000 多种<sup>[1]</sup>, 是热带和亚热带地区最重要的花卉之一。虽然早在 1909 年兰花的试管无菌萌发已经成功<sup>[2]</sup>, 并且从上世纪 60 年代大花蕙兰(*Cymbidium grandiflorum*)茎尖培养成功<sup>[3]</sup>以来, 许多种类的兰花, 如蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)、大花蕙兰等已经通过试管播种或无性繁殖, 大量生产种苗, 形成了兰花工业。尽管转基因可以克服传统育种的局限性, 提高兰花对病虫害的抗性、对胁迫的耐性, 改变花色、香气、大小、株型和生长习性等, 但是, 相对其他重要的经济作物而言, 兰花的转基因研究开展较迟, 第一例初步的研究报道是在 1990 年, 通过微粒子轰击, 6 周后在万带兰(*Vanda*)的原球茎上检测到萤火虫荧光素酶基因的表达<sup>[4]</sup>。至今, 虽然已经在石斛兰(*Dendrobium*)<sup>[5-7]</sup>、兰属(*Cymbidium*)<sup>[8]</sup>、蝴蝶兰<sup>[9-12]</sup>、卡特兰(*Cattleya*)、长萼兰(*Brassia*)和五唇蝶兰(*Doritaenopsis*)<sup>[13]</sup>等兰花上建立了遗传转化体系, 但几乎所有研究的转化效率相对较低, 转化过程持续的时间较长, 也少有重要经济价值基因转入并稳定表达的报道。现结合笔者的工作, 对兰花转基因的进展进行回顾和展望。

## 1 外植体种类

在选择外植体时, 要考虑其组织培养的难易度、成活率、嵌合体发生率、体细胞无性系变异率以及目标基因的表达率等<sup>[14]</sup>。与其他植物相比, 兰花对转基因系统的要求有很大的不同。首先, 兰花细胞的增殖率低; 其次, 兰花细胞难于进行组织培养, 在兰花上还没有取得过从脱分化的细胞再生植株; 第三, 组织培养中的兰花细胞分泌出大量的

酚类物质, 在他们氧化时对细胞产生毒害<sup>[8]</sup>。所以, 尽管采用的外植体种类不外乎愈伤组织(callus)、原球茎(protocorm)和类原球茎(protocorm-like body, PLB)等, 但难度大。

兰花的种子或芽在离体培养时, 大多直接形成原球茎和类原球茎, 即直接的体细胞胚胎发生<sup>[15]</sup>, 最后形成植株。而仅仅在少数情况下, 会自发或通过添加某些特殊成分等而形成愈伤组织, 然后再生<sup>[16-18]</sup>。关于从兰花的茎尖、叶片和芽等形成愈伤组织, 从上世纪的 60 年代开始已有报道<sup>[16, 19-22]</sup>。Sajise 等<sup>[23]</sup>报道了蝴蝶兰胚性愈伤组织的形成。但这些研究大多局限在显微镜下的观察, 对愈伤组织形成的诱因、愈伤组织的解剖结构以及再生等未加细致的研究。并且, 这些愈伤组织通常生长非常有限, 继代培养后趋向坏死<sup>[17, 24-26]</sup>。而适用于转基因需求的兰花愈伤组织, 必须具有一定的增殖率, 通过继代培养而维持, 然后能够再生植株, 符合这样条件的仅有少量的报道<sup>[17, 18]</sup>。

在蝴蝶兰上, 最早是 1990 年 Sagawa<sup>[27, 28]</sup>报道了获得可长期维持的具有再生能力的愈伤组织, 该愈伤组织在含 20 g/L 蔗糖和 150 ml/L 椰子水的改良 VW 培养基上, 5 年后仍保持松脆性, 无任何形态变化, 胚性能力无明显下降。Ichihashi 等<sup>[29]</sup>报道, 蝴蝶兰和五唇蝶兰的愈伤组织生长所需的最适宜的碳水化合物浓度品种间有差异, 但几乎所有的蝴蝶兰和五唇蝶兰的愈伤组织在不含蔗糖的培养基中转绿再生。Ishii 等<sup>[18]</sup>发现, 蝴蝶兰“Santa Cruz”的 PLB 的切片在含蔗糖的 VW 培养基上形成愈伤组

收稿日期: 2003-12-31 接受日期: 2004-03-20

\* 通讯作者。Tel: 0571-86971036, Fax: 0571-86971009, E-mail: mlchai@zju.edu.cn

织,最适宜的培养基是添加 40 g/L 蔗糖和 200 ml/L 椰子水。Belarmino 等<sup>[10]</sup>成功地用花茎诱导的松脆的愈伤组织用于蝴蝶兰转化。

Men 等<sup>[30]</sup>将蝴蝶石斛兰(*D. phalaenopsis* Banyan Pink)和石斛兰(*D. nobile*)的种子播种在 1/2MS 培养基上,待子叶分化后,转移到含 1 mg/L BA 的 1/2 MS 培养基中,在萌动芽的基部形成了旺盛生长的愈伤组织和原球茎,此混合体成功地用于微粒子介导的遗传转化,但对愈伤组织的形态特征未加说明。在其同期发表的采用同种石斛兰的农杆菌介导的转化中,只用原球茎而没有用愈伤组织,其原因也未说明<sup>[31]</sup>。

Chen 等<sup>[32]</sup>以文心兰(*Oncidium*)品种“Gower Ramsey”花茎芽再生的试管植株的节间、叶片和根尖为外植体,在 1/2 MS 培养基添加 0.1~3.0 mg/L TDZ、3~10 mg/L 2,4-D 以及 1 g/L 蛋白胨上暗培养 4~7 周,诱导出坚硬的和黄白色的胚性愈伤组织,在相同的培养基上每月增殖 2~4 倍,在不含激素的培养基上通过体细胞胚胎发生形成 PLB。

在石斛兰(*D. fimbriatum*)中, Mitra 等<sup>[33]</sup>最早报道胚性愈伤组织的发生。以后, Roy 等<sup>[34]</sup>也作了报道。他们用萌发的种子或幼龄实生苗诱导愈伤组织,但发生愈伤组织的频率非常低。Roy 等<sup>[26]</sup>以石斛兰(*D. fimbriatum* var. *Oculatum*)试管苗的梢尖为外植体,在 Kundson C 添加 10% 椰子水、0.5 mg/L NAA 和 1 mg/L BA 培养基上获得了 66.7% 的愈伤组织发生率,在不含激素的培养基上旺盛生长并在表面再生 PLB。Tee 等<sup>[14]</sup>在 1/2 MS 添加 B<sub>5</sub> 维生素和 2% 蔗糖,无任何激素的培养基上从石斛兰(*D. var. Sonia*)的 PLB 中诱导出两种类型的愈伤组织。类型 A 透明或白色,坚硬,但表面略松脆;类型 B 呈淡黄色,瘤状,坚硬。在愈伤组织培养基中加入 50 μM picloram 后,形成了类型 C 愈伤,为黄色融合在一起的球形结构,愈伤组织块中空。经粒子轰击后,类型 B 愈伤 GUS 表达率高于其他两种愈伤。

Chang 等<sup>[17]</sup>在建兰(*C. ensifolium* var. *Misericors*)上首次报道了愈伤组织的诱导。在 MS 培养基添加 10 mg/L 2,4-D 和 0.1 mg/L TDZ 的培养基上,约 40% 的根状茎外植体、100% 的假鳞茎外植体和 25% 的根外植体经过 12~18 个月后,形成了愈伤组织,部分愈伤组织形成胚状体,胚状体再发育成根状茎,最终形成小植株。

虽然列举了上述不同属兰花成功诱导愈伤组织的报道,但认真分析有关方面的论文,不难看出,兰花愈伤组织的诱导存在种类和品种的特异性;愈

伤组织诱导的时间长,愈伤组织生长速度通常较慢,继代培养通常较困难;愈伤组织诱导、维持和增殖培养基无规律可循,不同种类对激素的要求更不相同。所以从普遍意义上而言,不能满足转基因对外植体的要求,从而成为兰花转基因研究进展的重大限制因素。所以,多数兰花的转化仍然采用原球茎或类原球茎为起始外植体。有关原球茎和类原球茎的诱导,在兰花中已经成为常规的技术,本文不再复述。

## 2 外植体的处理方法及选择技巧

由于原球茎和类原球茎组织相对紧密,个体又相对较大,不论采用微粒子轰击还是采用农杆菌介导的转化,如果不进行合适的处理,形成嵌合体的概率非常高,甚至不能得到稳定的转化子。对于坚硬的愈伤组织(兰花中通常出现的情况),也需要进行下述处理。

除松脆的愈伤组织外,为增加与农杆菌的接触或微粒子的接受面,通常对材料进行一定的处理,最简单的就是切成小块或小薄片。如 Men 等<sup>[30]</sup>在用蝴蝶石斛兰(*D. phalaenopsis* Banyan Pink)和石斛兰(*D. nobile*)进行转基因时,将愈伤组织与原球茎的混合材料切成直径 3~5 mm 的小块,然后进行轰击。在他们同期报道的石斛兰(*D. nobile*)农杆菌介导的转化中,将原球茎切成直径为 0.4~0.6 mm 的薄片<sup>[31]</sup>。Yu 等<sup>[7]</sup>在石斛兰(*D. Madame Thong-In*)农杆菌介导的转化中,PLB 切成 1 mm 厚的薄片。Yang 等<sup>[8]</sup>在用微粒子轰击转化建兰时,先将 PLB 在液体培养基中增殖 7 天,当新形成的次生 PLB 的直径在 1 mm 时,进行轰击。Knapp 等<sup>[13]</sup>在卡特兰、长萼兰和五唇蝶兰转基因时,将 PLB 切碎成 2 mm<sup>3</sup> 的小块,进行轰击。笔者等将 PLB 的表皮用解剖刀剥去或用注射器的针尖针刺<sup>[11,12]</sup>,这是基于 Begum 等<sup>[25]</sup>在对建兰 PLB 发生过程的切片观察中的发现,即新的 PLB 起源于表皮的内层细胞和亚表皮细胞,以及 Park 等<sup>[35]</sup>在五唇蝶兰上也发现,叶片再生培养时新原球茎从亚表皮细胞发生的研究结果。但是,前种处理对外植体的损伤过大,共培养后基本死亡;后者的效果佳<sup>[11]</sup>。

选择方法不外乎是在轰击或农杆菌感染后的直接选择,或经过一段时间的恢复生长再选择的延缓选择。但在具体的操作上,又各有技巧。

Men 等<sup>[30]</sup>在用蝴蝶石斛兰(*D. phalaenopsis* Banyan Pink)和石斛兰(*D. nobile*)进行转基因时,发现轰击 2 天后立即用潮霉素选择,蝴蝶石斛兰的转化率可达 12%~14%,而在共培养的 1 月后开始选择,

没有获得转化子。他们解释为：轰炸引起的损伤，使得被轰炸的带有转基因的细胞生长缓慢，在不选择剂的普通培养基中竞争不过未受到轰炸组织的生长，从而不能形成愈伤组织或原球茎；较早实施选择压，可防止未转化细胞组织的建立，减少和避免嵌合材料的发生。在他们同期报道的石斛兰(*D. nobile*)农杆菌介导的转化中<sup>[31]</sup>，也是在2~3天的共培养后立即进行选择。Knapp等<sup>[13]</sup>在进行卡特兰、长萼兰和五唇蝶兰转基因试验时，是在轰炸的2天后直接用bialaphos选择。

而Yang等<sup>[8]</sup>采用微粒子轰炸转化建兰时发现，轰炸后直接在含卡那霉素的培养基中选择，没有从类原球茎获得转化子。而转化后继续在不含卡那霉素的液体培养基中培养1月，再进行选择，在600个外植体中，获得了92株抗卡那霉素的梢，其中69%的梢在叶片中表达*gus*基因。他们认为，在轰炸后的1月内省略选择，确保了被轰炸细胞的旺盛生长，同时避免在起始选择时转化细胞附近的未转化而被杀死的细胞的毒性影响。

Yu等<sup>[7]</sup>在石斛兰(*D. Madame Thong-In*)农杆菌介导的转化中，将细菌感染和延缓选择有机结合。共培养周期分成两个阶段：第一阶段是在不含抗生素的固体培养基上与农杆菌共培养3天，接着的第二阶段是在含50 mg/L羧苄青霉素的液体培养基中共培养0~5周。未经过液体培养阶段的，没有获得转化子；4周液体培养的效果最佳，从204个PLB薄片获得58个抗卡那霉素的PLB，最后得到42株植株结构改变的含*DOH1*反义基因的小植株(*DOH1*为同源异型框基因，是兰花中维持基本的植株结构和花转换所必需的基因)。成功的关键是控制液体共培养过程中农杆菌的浓度，使最高的基因转移频率和最少的外植体的坏死达到平衡。

笔者等<sup>[11,12]</sup>在进行蝴蝶兰PLB的农杆菌介导的转化中，曾比较了直接选择和延缓选择两种情况对转化的影响。发现共培养后的PLB由于农杆菌的生长，已经相当的脆弱，直接选择后所有的外植体均死亡，而所有的转化植株均来自于6周后才进行选择的。究竟采用何种选择方法及采用何种技巧，可能受到基因型和不同试验条件的影响，但根本的要求是在保证最多的外植体细胞转化后，创造一个更有利转化细胞和组织生长、抑制未转化细胞或组织生长的微环境。

### 3 选择标记基因

至今所报道的兰花转基因的论文，采用的选择标记基因为*nptII*、*hpt*和*bar*，分别抗卡那霉素、

潮霉素和草甘膦类除草剂。其中又以*hpt*最常用。笔者发现<sup>[11]</sup>，在含高达400 mg/L卡那霉素的培养基上，蝴蝶兰PLB仍然正常生长、展叶并长出根系，所以卡那霉素不适宜作为选择剂，尽管在石斛兰上以50~200 mg/L的卡那霉素为选择剂<sup>[5,7]</sup>；而蝴蝶兰PLB对PPT却十分敏感，在0.4 mg/L时，类原球茎黄化，无根系长出，故也不适宜<sup>[11]</sup>，尽管在长萼兰、卡特兰和五唇蝶兰微粒子轰炸介导的转基因中，采用了1~3 mg/L的bialaphos作为选择剂<sup>[13]</sup>；在生根培养基中，当潮霉素浓度在3.0 mg/L选择8周，蝴蝶兰PLB的再生完全受到抑制，无一长出根系，在继续选择的情况下，即使降到1.5 mg/L，PLB的生长仍然受到抑制，无新根系长出<sup>[11]</sup>。在唯一用潮霉素选择蝴蝶兰原球茎衍生的愈伤组织的报道中<sup>[10]</sup>，采用的浓度高达50 mg/L。在石斛兰和蝴蝶石斛兰微粒子轰炸的转基因中<sup>[30]</sup>，也用30 mg/L的潮霉素。浓度的差异可能由基因型、生理条件、外植体的大小和类型及培养条件的不同引起<sup>[8]</sup>。笔者在草坪草的转基因中已证实，愈伤组织对潮霉素、PPT的耐性分别是植株的3倍以上<sup>[36]</sup>和5倍左右<sup>[37]</sup>。同时选择时间的长短也是一个因素，植物对抗生素等药剂的耐性随时间的延长而减弱，长时间的选择可用较低的浓度。因此，对每个特定的材料，需要经过预备试验，确定合适的选择药剂及其适宜的浓度。

### 4 转入的其他基因

除上述选择标记基因外，转入的报告基因主要是β葡糖醛酸酶基因(*gus*)和绿色荧光蛋白基因(*gfp*)，少数为萤火虫荧光素酶基因(*luc*)<sup>[4]</sup>。Yu等<sup>[7]</sup>通过农杆菌途径将*DOH1*反义基因转入石斛兰中。该基因在试管苗中得到表达，形成了多茎的植株，这是首例利用基因工程技术改变兰花形态的报道。

### 5 基因克隆

近年从兰花的不同组织中鉴定和分离了许多基因和相关基因片段<sup>[38-41]</sup>。Liew等<sup>[39]</sup>得到了主要花色素之一查尔酮全长的cDNA克隆，并测定了其中3个克隆的序列。Yu等<sup>[40]</sup>从兰花转化期茎尖分生组织(TSAMS)得到*otg 7*，并用其为探针从TSAMS的cDNA文库中分离出3个MADS-box基因，这些基因对兰花的花期起重要作用。Bui等<sup>[38]</sup>和Ho等<sup>[42]</sup>在蝴蝶兰中克隆到了3个1-氨基丙基-1-羧酸合成酶基因，这些基因主要是在兰花不同的时期调节乙烯合成，有改变兰花花期的潜力。

## 6 展望

作为最重要的和极高经济价值的观赏植物, 兰花的转基因研究具有诱人的前景。兰科植物种属特多, 不同的种属又各具独特的性状, 但有些属间无法杂交, 不能通过常规育种将性状相互转移。如兰属的春兰、蕙兰等, 花香浓郁, 但花小, 花期较短; 而洋兰类, 如蝴蝶兰、卡特兰等, 花朵大, 花期长, 花色艳丽, 但无香味。如果能够弄清上述控制香味基因的代谢途径, 并克隆相关基因转移到洋兰中并得到表达, 其商业价值不可估量。改变兰花的花色, 目前已受到关注, 如台湾大学园艺系正致力于通过外源基因导入蝴蝶兰的悬浮细胞, 培育转基因的纯黄色蝴蝶兰(私人通信)。改变石斛兰的花期、改良株型的相关研究也在进行之中<sup>[7, 30]</sup>。我国大陆兰花转基因的研究还相当薄弱, 要加快兰花资源的收集和鉴定, 从寻找改良潜力大、但又较容易进行转化的种类和品种入手, 加强园艺学科与基础生物学科的协作, 加快有重要经济价值基因的克隆, 才能尽快赶上世界水平。

### 参考文献 (References)

- [1] Arditti J. *Fundamental of Orchid Biology*, New York: John Wiley & Sons, 1992, 691
- [2] Bernard N. *Ann Sci Nat Bot Ser*, 1909, **9**: 191
- [3] Morel G. *Am Orchid Soc Bull*, 1960, **29**:495
- [4] Chia TF *et al.* Genetic engineering of tolerance to cymbidium mosaic virus. In: Bonham DG *et al.* (eds.) *Proceeding of the 13th World Orchid Conference 1990*, 13 WOC Proceedings Trust, Auckland, 1990,284
- [5] Kuehnle AR *et al.* *Plant Cell Rep*, 1992, **11**: 484
- [6] Chia TF *et al.* *Plant J*, 1994, **6**: 441
- [7] Yu H *et al.* *Plant Cell Rep*, 2001, **20**: 301
- [8] Yang J *et al.* *Plant Cell Rep*, 1999, **18**: 978
- [9] Anzai HY *et al.* *Plant Tiss Cult Lett*, 1996, **13**: 265
- [10] Belarmino MM *et al.* *Plant Cell Rep*, 2000, **19**: 435
- [11] Chai ML *et al.* *Sci Hort*, 2002, **96**: 213
- [12] 柴明良等. *园艺学报*, 2004, **31**: 537
- [13] Knapp JE *et al.* *Plant Cell Rep*, 2000, **19**: 893
- [14] Tee CS *et al.* *Plant Cell Rep*, 200, **21**: 452
- [15] Colli S *et al.* *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1993, **33**: 39
- [16] Steward FC *et al.* *Bot Gaz*, 1971, **132**: 65
- [17] Chang C *et al.* *Plant Cell Rep*, 1998, **17**: 251
- [18] Ishii Y *et al.* *Plant Cell Rep*, 1998, **17**: 446
- [19] Champagnat M *et al.* *Rev Gen Bot*, 1966, **73**:706
- [20] Gu Z *et al.* *Lindleyana*, 1987, **2**: 48
- [21] Kunisaki JT *et al.* *Amer Orchid Soc Bull*, 1972, **41**: 435
- [22] Morel GM. Clonal multiplication of orchids. In: Withner CL ed. *The Orchids*, New York: John Wiley and Sons, 1974, 166
- [23] Sajise JU *et al.* Some major problems in isolation and culture of orchid protoplasts. In: Kimura T *et al.* (eds.) *Pro. Nagoya Int. Orchid Show' 90*, Japan, 1990, 84
- [24] Begum AA *et al.* *J Japan Soc Hort Sci*, 1994, **63**: 419
- [25] Begum AA *et al.* *J Japan Soc Hort Sci*, 1994, **63**: 663
- [26] Roy J *et al.* *Sci Hort*, 2003, **97**: 333
- [27] Sagawa Y. Biotechnology in orchid. In: Kimura T *et al.*(eds.) *Proc. Nagoya Int. Orchid Show' 90*, Japan, 1990, 46
- [28] Sagawa Y. Orchids, other considerations. In: Ammirato PV *et al.* (eds.) *Handbook of Plant Cell Culture, Vol.5*, New York: McGraw-Hill, 1990: 638
- [29] Ichihashi S *et al.* *J Orchid Soc India*, 1996, **10**: 81
- [30] Men S *et al.* *Plant Cell Rep*, 2003, **21**: 592
- [31] Men SZ *et al.* *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2003, **75**: 63
- [32] Chen JT *et al.* *Plant Sci*, 2000, **160**: 87
- [33] Mitra GC *et al.* *Indian J Exp Biol*, 1976, **14**: 350
- [34] Roy J *et al.* Seed culture studies of *Dendrobium fimbriatum* and *Vanda tessellata*×*V. stangeana*. In: Basu PS *et al.* (eds.) *Recent Trends of Researches in Microbiology and Plant Physiology in India*, India: Burdwan University Press, 2000, 87
- [35] Park SY *et al.* *Plant Cell Rep*, 2002, **21**: 46
- [36] Chai ML *et al.* *J Kor Soc Hort Sci*, 2000, **41**: 450
- [37] Chai ML *et al.* *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2003, **4**: 346
- [38] Bui AQ *et al.* *Plant Physiol*, 1998, **116**: 419
- [39] Liew CF *et al.* *Plant Physiol Biochem*, 1998, **36**: 647
- [40] Yu H *et al.* *Plant Physiol*, 2000, **123**: 1325
- [41] Yu H *et al.* *Plant Cell*, 2000, **12**: 2143
- [42] Ho KK. *Plant Physiol Biochem*, 1999, **37**: 841

## Advances in Genetic Transformation of Orchids

Ming-Liang Chai\*, Xiao-Wei Xu<sup>1</sup>, Shao-Sheng Lin<sup>1</sup>

(Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; <sup>1</sup>Subtropical Crop Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Wenzhou 325005, China)

**Abstract** As one group of leading flowers in tropical and subtropical areas, orchids are the prospective plants for gene engineering. Some aspects on genetic transformation in orchids, *i.e.*, the successfully transformed genus and species, the methods for callus induction, the pre-treatment methods for the explants, the selecting methods for the transformed cells, the introduced foreign genes, the gene cloning, and the prospects of gene transfer in orchids were systematically reviewed.

**Key words** orchids; callus; protocorm-like body; genetic transformation

Received: December 31, 2003 Accepted: March 20, 2004

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86971036, Fax: 86-571-86971009, E-mail: mlchai@zju.edu.cn