

兰花生物技术的研 究及应用

李 杰^{1,2}, 黄敏仁¹, 王明庥¹, 蔡 汝², 匡鹏安³

(1. 国家林业局、江苏省林木遗传和基因工程重点实验室(南京林业大学), 江苏 南京 210037; 2. 江苏省兰花工程研究中心, 江苏 泰州 225321; 3. 四川省巴中市巴州区林业局, 四川 巴中 636000)

摘 要:结合国内外的研究文献和笔者的实践经验, 对兰花非共生萌发技术、组织培养、细胞工程、基因工程的研究进展及其应用进行了评述, 并分析了兰花生物技术的应用前景。

关键词:兰花; 非共生萌发; 组织培养; 细胞工程; 基因工程

中图分类号:Q819; S682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2006(2006)02-0108-05

Research and Application on the Biotechnique Engineers in Orchids

LI Jie^{1,2}, HUANG Min-ren¹, WANG Ming-xiu¹, CAI Ru², QUANG Peng-an³

(1. The Key Laboratory of Forest Genetics and Gene Engineering of the State Forestry Administration and Jiangsu Province (Nanjing Forestry University), Nanjing 210037, China; 2. Orchids Engineer Research Centre of Jiangsu Province, Taizhou 225321, China; 3. Bazhou District Forestry Bureau Sichuan Province, Bazhong 636000, China)

Abstract: Emphasized particularly on applications of Orchids biotechniques in recent researches and the authors' experience, advances in vitro seed germination without fungus, tissue culture, the engineer of somatic and gene were reviewed in this paper, and its status and prospects about applications in industrious were also discussed and viewed.

Key words: Orchids; Vitro seed germination; Tissue culture; Somatic engineer; Gene engineer

兰花约有 500 多属 20 000 多种, 分布于世界各地。由于兰花在自然状态下繁殖困难, 种子萌发率极低, 故传统栽培靠分株繁殖, 因而繁殖周期长, 繁殖率低, 育种进程缓慢。同时, 由于长期无性繁殖, 造成带病毒的植株日益增多, 兰花的品质下降。自 20 世纪 60 年代以来, 生物技术的应用促进了兰花组织培养的研究, 进而在兰花细胞工程、基因工程等生物技术的研 究方面取得了重要进展, 并在全世界范围内形成了高效益、大规模的兰花产业。笔者结合实践经验和国内外的有关文献, 对兰花生物技术领域的研究及产业化前景进行评述, 以期 为兰花的科研及生产应用提供参考。

1 非共生萌发技术

目前, 兰花优良品种的获得主要以有性繁殖方式获得种苗。因此, 种子离体萌发技术的研究显得尤为重要。兰花种子体小量多, 绝大多数种类 的种子不具子叶和胚乳, 在自然条件下, 需和真菌共生才能萌发。在实验和生产实践中, 可模仿自然和真菌共生培养, 但需先分离出相应的真菌, 且分离程序繁杂, 目前已较少使用。替而代之的是非共生萌发法, 或称无菌播种。随着兰花工业的发展, 兰花属间和种间杂种大量出现, 研究者们设计 了上百种种子无菌萌发培养基, 并成功地在蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)、文心兰(*Oncidium*)、大花蕙兰(*Cymbidium*)、石斛兰(*Dendrobium*)及中国兰中的春兰(*Cymbidium goering*)、墨兰(*Cymbidium sinense*)等产业化中推广应用, 基本形成了一套比较成熟的技术体系。该体系一般包括 3 个环节: (1) 选择适宜的培养基。目前兰花无菌萌发常用的培养基有 KnudsonC、Vacin&Went、Kyoto、Reinent&Monr、Lindeman、Vajrab-ha、MS 以及美国 Hydroponic 公司出品的 Hyponex 培养基等。据笔者在蝴蝶兰、文心兰、大花蕙兰、石斛兰及墨兰上的应用, 不同培养基种类不足以对种子萌发产生实质性的影响, 但以 Hyponex 操作简单且为节俭。此外, 适量的天然提取物, 如在

收稿日期: 2005-05-11

修回日期: 2005-11-01

资金项目: 江苏省科技攻关计划资助项目(BE2003384); 江苏省六大人才高峰项目(苏人发[2004]28号)

作者简介: 李 杰(1974-), 男, 工程师, 博士, 主要从事植物生物技术研究。

培养基中添加椰子汁、番茄汁、蛋白胨、酵母提取液、水解蛋白、苹果汁、香蕉汁等可大大促进兰花种子的萌发。(2)种子的选取和处理。兰花种子成熟较慢,一般在受粉后几个月方能成熟。不同成熟期的种子在无菌培养中,发芽力不同^[1]。某些种类的未成熟或接近成熟的种子,甚至比成熟种子更容易萌发^[2-3]。同时,实验证实,播种前对种子进行适当的预处理可以提高种子萌发率。预处理方法可以用物理方法(如用超声波处理),或用化学方法(如用不同种类及不同浓度的溶液浸泡种子等)。段金玉等对兰属 10 种植物种子离体萌发进行研究发现,用 0.1 mol/L NaOH 溶液对多花兰、朵朵香、双飞燕、豆瓣绿、寒兰、套叶兰等中国兰的种子浸泡 10~30 min,其萌发率可提高 10 倍以上^[4]。目前看来,大部分兰花种子均可以通过无菌萌发的方式进行萌发,只是萌发率各有不同。气生兰及杂交后代萌发力较强,这类种子无菌萌发技术已基本成熟。地生兰种子的萌发率普遍较低,包括中国兰在内,仍待进一步研究。(3)接种及培养。将果荚采下,切去残留花瓣与萼片,用 70% 酒精擦拭外部后,浸入到加少许展着剂的 0.5% 次氯酸钠溶液中消毒,而后取出用解剖刀纵切,并刮出种子,用长镊子播种。种子接种后,置于 20~25℃ 培养室,在 1 500 lx 下,光照 12~16 h,一般 10~14 d 后种子膨大,5~6 周后种子变绿,发育成原球茎并长出须根,2~3 个月后,原球茎长出第 1 片叶,9~10 个月后,球茎延长,长成具有 2~3 条根和 2~3 片叶的试管苗时,便可移栽入花盆。

2 组培快繁技术

兰花的组织培养始于 20 世纪 60 年代。之后 40 多年来,兰花组培技术不断地发展和完善,先后大约有 60 余属数百种兰花可用组培方法进行繁殖,且其产业化应用的成熟度已超过了其他花卉。但受基因型和外植体取材部位方式的影响,诸多文献发表的组织培养方法及配方多因无法重现而被疑为不实。同时,受商业利益的驱动,有关企业化栽培的知识与经验,多年来亦被视为不传之秘。笔者实践发现,兰花的组织培养关键在于培养基的配方和操作方法。

兰花培养种类选择的余地较大,而在激素组合及浓度上,一般是洋兰的组织诱导、原球茎增殖及分化需用较高浓度细胞分裂素与低浓度生长素的配合,而中国兰芽端诱导培养中,生长素浓度一般高于细胞分裂素。除培养基配方的影响外,选择适宜的外植体和有效控制褐化,是兰花组培繁殖能否成功的两大重要因素。茎尖是最早也是最常用的用于兰花快速繁殖的外植体。目前推向产业化的大花蕙兰、卡特兰、石斛兰、蝴蝶兰、文心兰等首先在茎尖培养中取得成功。中国兰的茎尖培养,也先后在建兰、春兰、墨兰等几十个品种中获得成功^[5]。除了茎尖,侧芽应用也相当广泛,尤其是带 1~2 个叶原基的茎圆锥成活率高^[6]。虽然顶芽和侧芽是极好的高质量外植体,但芽的来源有限。根据细胞全能性的观点,人们在更大范围内寻找了更多适宜的外植体,如试管苗的幼叶、根顶端分生区、花梗、子房等。这些研究工作的成功,减轻了对兰花母株的伤害,起到了对珍稀品种的挽救和保护作用。由于兰花组织中多酚氧化酶活性较强,酚类物质含量较高,褐化死亡率高。据吴汉珠等统计,国兰诱导启动后,褐化死亡几乎占 3/4^[5]。因而解决褐化问题是兰花组织培养的关键。常用措施包括:(1)选择适宜的取材时间。由于兰花酚类物质含量与生长季节有关,在生长旺盛的季节,兰花新芽上的酚类物质含量显著提高,而在生长较弱的季节,酚类物质明显减少。(2)外植体预处理。徐程等认为,将取材的兰花外植体用含 150 mg/L 柠檬酸和抗坏血酸溶液处理 1 h,是较为有效的方法^[5]。据笔者经验,可将所取外植体经流水冲洗后,先放在 2~5℃ 的冰箱中低温处理 12~24 h,消毒后先接种在只含活性炭和蔗糖的培养基中培养 5~7 d,取出外植体再接种到合适的培养基中,可有效地减轻大多数兰花组织的氧化褐变程度。(3)培养基中加入抗氧化剂和吸附剂。在继代培养中消除褐化,一般可加入抗氧化剂和吸附剂。如在每升培养基中分别添加 20% 硫代硫酸钠 5 mL、活性炭 2 g、维生素 C 5 mg,以及 PVP(聚乙烯基吡咯烷酮)、MBP(磷酸一丁酯)等,均对褐化有一定的控制作用,但从效果和成本看,硫代硫酸钠更为节俭有效。(4)选择最佳培养条件。如培养基的离子浓度、培养的方式、培养的温度和光照条件等。

为此,结合国内外 40 多年来兰花组培繁殖研究的成果,经反复筛选比较,对目前国际上最具商业价值的几个大属兰花组织培养配方列举如表 1。

表1 几种兰花组培配方

Table 1 Tissue culture formulation of several orchids

植物名称 Name	再生方式 Regeneration type	培养阶段 Culture stage	外植体 Explant	培养基及激素配比 Medium and concentration of hormones
卡特兰 (<i>Cattleya</i> sp.)	原球茎	原球茎诱导	茎尖、腋芽	MS+0.1 mg/L NAA+100 g/L CM MS+1.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+100 g/L CM * RM+0.1 mg/L NAA
		增殖分化		MS+(0.1~5.0)mg/L BA+(0.5~1.0)mg/L NAA+100 g/L CM * MS+(0.1~5.0)mg/L KT+(1.0~5.0)mg/L NAA+LH MS+5.0 mg/L KT+5.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA+0.1 g/L LH
		壮苗生根		MS+1.0 mg/L NAA+100 g/L banana powder +1.5 g/L AC
			花梗节间 花梗扦插 幼叶 幼茎 茎尖 根尖	2.5 g/L Hyponex No. 1+1.0 g/L Peptone+(3.0~5.0)mg/L BA VW+(2.5~3.0)mg/L BA MS+20.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+100 g/L CM * 1/3MS+100 g/L CM+10.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+10.0 mg/L A+1.0 mg/L GA ₃ VW+100 g/L CM+5.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+5.0 mg/L A+1.0 mg/L GA ₃ VW+2.0 mg/L CT+0.5 g/L LH+5.0 mg/L KT+10.0 mg/L BA+1.0 mg/L GA ₃
蝴蝶兰 (<i>Phalaenopsis</i> sp.)	丛生原球茎	丛生芽或原球茎诱导	子房	3.5 g/L Hyponex No. 1+0.1 g/L Myo-inositol+0.5 mg/L Nicotinic acid+2.0 mg/L Gly+0.5 mg/L B ₁ +0.1 mg/L B ₆ +5.0 mg/L BA+5.0 mg/L A+2.5 mg/L KT+1.0 mg/L IAA+0.3 mg/L LH+5.0 mg/L Cytidylic acid+100 g/L CM+0.5 mg/L Mannitol
			花粉块	MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L NAA+2.0 mg/L LH+5.0 mg/L BA+5.0 mg/L A+2.0 mg/L folic acid+5.0 mg/L Mannitol
		增殖		3.0 g/L Hyponex No. 1+0.1 g/L Myo-inositol+1.0 mg/L Nicotinic acid+2.0 mg/L Gly+0.5 mg/L B ₁ +0.1 mg/L B ₆ +2.5 mg/L KT+0.1 mg/L IAA+100 g/L CM
		分化		1.0 g/L Hyponex No. 1+2.0 g/L peptone+3% potato homogenate (W/V)+0.05% AC *
文心兰 (<i>Oncidium</i>)	原球茎	原球茎诱导	茎尖	MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L BA; MS+0.5 mg/L NAA+2.0 mg/L BA *
		增殖分化	花梗	N6+2.0 mg/L BA
		壮苗生根		KC+0.2 mg/L NAA+1.5 mg/L BA+100 g/L CM; 1/2MS+0.2 mg/L NAA+1.0 mg/L BA *
		壮苗生根		MS+0.5 mg/L NAA+100 g/L banana powder+2.0 g/L peptone+1.5 g/L AC *
大花蕙兰 (<i>Cymbidium</i> hybridum)	原球茎、丛生芽	原球茎诱导	茎尖 花梗	VW+0.3 mg/L BA+0.3 mg/L KT+1.2 mg/L NAA+100 g/L CM * B5+1.0 mg/L BA+2.0 mg/L 2-4D
		芽诱导	茎段	MS+2.0 mg/L NAA+4.0 mg/L BA *
		原球茎增殖分化	原球茎	MS+2.0 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+100 g/L banana powder * MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA
		壮苗生根		1/2MS+2.0 mg/L IBA+2.0 g/L peptone+100 g/L banana powder+1.5 g/L AC
石斛兰 (<i>Dendrobium</i>)	原球茎	原球茎诱导	茎尖、腋芽	MS+2.0 mg/L BA+2.0 mg/L A+100 g/L CM *
		增殖分化	原球茎	MS+0.5 mg/L BA+100 g/L CM *
		壮苗生根		VW+100 g/L banana powder+1.5 g/L AC
兜兰 (<i>Paphiopedium</i>)	原球茎	原球茎诱导	茎尖、腋芽	Heller+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L 2-4D+100 g/L CM(外植体成活培养用) Heller+MT的维生素+生物素1.0 mg/L(原球茎诱导用)
		壮苗生根		White+1.0 mg/L BA+5.0 mg/L NAA+100 g/L CM * 1.0 mg/L B ₁ +1.0 mg/L BA+2.0 mg/L NAA
春兰 (<i>Cymbidium goering</i>)	原球茎根状茎	原球茎诱导	茎尖	White+0.5 mg/L BA+2.0 mg/L NAA+100 g/L CM *
		增殖分化		B5+2.0 mg/L NAA+100 g/L CM+1.5 g/L AC
蕙兰 (<i>Cymbidium faberi</i>)	原球茎根状茎	原球茎诱导	茎尖	MS+0.5 mg/L BA+1.0 mg/L NAA+100 g/L CM
		增殖和壮苗生根同春兰		
建兰 (<i>Cymbidium ensifolium</i>)	原球茎根状茎	原球茎诱导	茎尖 腋芽	MS+5.0 mg/L NAA+100 g/L CM MS+2.0 mg/L NAA+4.0 mg/L BA
		增殖分化		MS+2.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA MS(液体)+3.0 mg/L BA+2.0 mg/L NAA+0.5 g/L LH
		壮苗生根		MS+1.0 mg/L BA+3.0 mg/L NAA+1.5 g/L AC
墨兰 (<i>Cymbidium sinense</i>)	原球茎根状茎	原球茎诱导	种子 茎尖	1/2MS+0.5 mg/L NAA+100 g/L CM MS+0.5 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+1.5 g/L AC
		增殖分化		MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L AC B5+3.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA+0.5 g/L LH+1.0 g/L AC
		壮苗生根		1/2MS+2.0 mg/L NAA+1.5 g/L AC

注:表中基本培养基配方和有关添加物缩写可参照文献[6],配方及获得方法参照文献[1-21]。标*为经作者重试,效果相对较好者。

3 细胞工程技术

体细胞胚具有个体间遗传背景一致, 结构完整, 快速量多等优点, 能极大地提高繁殖效率, 降低成本, 因而应成为兰花细胞工程技术中最优先研究的问题。在兰花中, 通过胚胎发生, 进行大量培养并再生植株的研究有些进展^[7-10]。从总体上看, 兰花体胚发生技术仍处于起步阶段, 尤其是体细胞胚胎发生机制的研究还处于摸索中。对兰花体胚发生的遗传影响和激素控制, 由于缺乏深入了解, 还无法从根本上有目的、高效地调节控制体胚发生过程。兰花原生质体培养和体细胞融合, 是兰花细胞工程技术中大有作为的研究领域, 因为通过这种技术体系, 对兰花品种改良和创造远源杂种方面, 都将产生不可估量的价值。事实上, 作为单子叶植物的兰花, 原生质体培养和融合与双子叶植物相比, 所取得的成功非常有限。目前, 已从卡特兰、石斛兰、大花蕙兰、蝴蝶兰等十几种兰花的根、叶、原球茎、花瓣等分离得到原生质体和部分融合体^[11-12]。但通过原生质体和融合体得到再生植株的成功报道很少。研究者们从酶解条件、融合方式和参数以及培养方式、培养基的选择等方面进行了有益的探索, 这些工作必将为最终获得重复性良好的兰花原生质体再生体系奠定良好基础。

4 基因工程技术

兰花基因工程技术的研究是近年才起步的, 主要是因为兰花是单子叶植物, 不是农杆菌的天然寄主, 长期被认为它对根癌农杆菌或发根农杆菌不敏感, 阻碍了农杆菌在兰花上的应用, 而一些直接转移的方法如 PEG 介导和电激法成功率不高。事实上, 从兰花产业的发展看, 将外源基因导入兰花的应用要求是迫切的。目前, 国际上最具商业价值的几个大属的兰花, 存在着病虫害严重、栽培和养护环境苛刻(如三基温要求高)、成花周期长、开花控制难度大、花色花形不丰富等普遍问题。兰花产业的发展迫切要求采用现代生物技术手段, 对品种进行遗传改良。从技术体系上看, 兰花转基因技术研究和开发的关键条件和时机已经成熟。首先, 兰花基因转化的受体系统构建技术日益成熟。一个优良基因转化受体系统, 要求植物材料有高效稳定的再生能力和大量稳定的外植体来源, 并且对选择性抗生素和农杆菌侵染有一定的敏感性。从目前研究看来, 这些条件基本具备。理论和实践都反复证明, 体胚、原球茎、类原球茎都是兰花基因转化的理想受体^[13]。40 多年来, 由各种兰花成功诱导这些受体材料和由之实现分化及植株再生的技术体系逐渐成熟, 高频再生性和重现性在工业化生产线中得到充分的验证, 并在兰花工业生产中反复改进提升。需要做的仅是按照科学试验的要求和基因转化受体系统的条件, 稍做完善, 便可直接推向基因工程技术的研究和应用。其次, 外源基因导入兰花的途径和方法日益拓展。最初, 外源基因在兰花上的转化都用直接导入法。如用基因枪(Microprojectiles), 直接轰击体胚、原球茎或类原球体, 先后成功地实现了 GUS 基因、荧光素基因、色素合成相关基因、蕙兰花叶病毒外壳蛋白基因等分别在万代兰、石斛兰等上的转化^[13-17]。但是基因枪法转化和再生频率相对较低^[16]。近几年来, 以农杆菌介导实现外源基因在兰花上的转化实验, 取得了一系列突破和成功^[18-20]。随着农杆菌侵染机理的深入研究和揭示, 农杆菌 Ti 质粒必将成为兰花的一种理想转化载体, 以农杆菌介导的外源基因在兰花上的转化必将形成新的研究热点。第三, 适宜转化的目的基因日益丰富。除应用于表达载体构建的选择标记和报告基因外, 目前已有多种目的基因转入兰花并得到高度表达的转基因植株。Yang 成功地从一种石斛兰中分离出了色素合成相关基因, 并获得高度表达^[21]。目前, 进行“遗传转化在热带观赏兰花育种上的应用研究”, 通过抗寒基因的转化, 以期获得抗寒性的蝴蝶兰植株; 厦门北大之路生物工程有限公司和北京大学蛋白质与植物基因工程国家重点实验室合作, 已将一种花分生组织决定基因 AP1 成功转入文心兰、蝴蝶兰、大花蕙兰等, 使花期得以调控; 日本科研人员, 将一种香味基因转入大花蕙兰, 得到了花味清香的转基因植株, 随着研究的深入, 适宜在兰花上转化的有益基因, 如已分离克隆的抗病基因、抗虫基因、抗寒性基因、改变花色的基因、促进开花的基因等具有较大潜在经济价值的目的基因, 必将得到高度应用。此外, 兰花基因表达调控和基因转化后的生物安全性问题等研究, 也正在开展。

5 兰花生物技术应用的现状与未来

兰花生物技术的成功应用, 不仅使繁殖速度极大地增加, 也获得了新的无性繁殖途径, 为解决种性

退化、难以繁育和新品种培育等问题提供了新的思路。国内外利用组织培养繁育成功的兰花达60多个属,其中近20个属被推向产业化。中国大陆在兰花生物技术应用研究和产业化方面,远滞后于欧洲和其他东南亚国家和地区。限制国产化(不包括台湾地区)兰化生物技术产业化发展的主要原因有以下几方面:(1)培养程序过于繁琐,成本高,科研成果不易向产业化方向发展。从发表的文献看,兰花组培通常需3~4个阶段,即外植体建立阶段、增殖培养阶段、分化阶段、生根培养阶段,在这些阶段中所用培养基不相同,不同阶段要不同配比的生长调节剂,而且有些研究者使用的生长调节剂,处理特殊,如赤霉素,不能直接加热灭菌,诸如此类的原因,使研究的成果在工厂化生产中,缺乏可操作性。(2)不同属、不同品种所用培养基不相同,重现性、稳定性差。由于不是从生产实际出发去解决问题,导致许多成果经不起产业化的检验。如许多关于兰花组培方面的文献,有着各种不同的,甚至是完全相反的结论。(3)兰花育种研究起步晚,进展缓慢。中国的兰花种质资源很丰富,但对育种研究重视不够。如素有“兰花之王”之称的大花蕙兰,主要杂交亲本当中,独占春、碧玉兰、美花兰和建兰等在我国均有分布,但在选育出的众多优良品种中,没有中国的品种权。即使在素有“兰花王国”之称的台湾,也只会有一些民间的花卉爱好者,在做传统的常规育种工作。刚开始的基因工程育种技术,也仅是尝试性的,真正到形成新的品种并推向市场,还有一段充满艰难曲折的道路。(4)兰花贸易市场体系没有形成。现在的兰花市场,依然是外来花商的市场。中国大陆在技术、品种、市场等兰花产业化的关键问题上,处处被动。

兰花生物技术是花卉应用最成功的高新技术,具有较大的市场潜力和产业发展未来。拥有一定品种资源的中国,如果在兰花生物技术的纵深研究,如简化的快繁工艺流程,传统和现代相结合的生物工程育种方面有所改善,再配以先进适用的栽培体系和市场营销体系,必能在兰花生物技术研究领域和国际兰花贸易市场上后来居上。

[参 考 文 献]

- [1] Stenber R. *In vitro* seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid[J]. *Lindleyana*, 1998, 13(2): 102—112.
- [2] Ardittij, Michand, Olova A P. Seed germination of north American orchids[J]. *Bot Caz*, 1981, 142(4): 442—453.
- [3] Sagawa Y, Valmayor H L. Embrya culture of orchid[C]. *Proc 5th World Orchid Conf*, 1966.
- [4] 段金玉, 梁汉兴. 天麻种子的萌发率与种子成熟度的关系[J]. *云南植物研究*, 1982, 4(3): 303—306.
- [5] 徐程, 詹忠根, 张铭. 中国兰的组织培养[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(2): 171—174.
- [6] 谭文澄. 观常植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [7] Begum AA, Tamaki M, Tahara M, et al. Somatic embryogenesis in *Cymbidium* through *in vitro* culture of innertissue of protocorm-like bodies[J]. *Jpn Soc Horti Sci*, 1994, 63: 419—427.
- [8] Chang C. Plant regeneration from callus of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 251—255.
- [9] Ishii Y, Takamura T, Goi M, et al. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*[J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 446—450.
- [10] Chen JT, Cheng C, Chang W C. Direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium gower* Ramsey and subsequent plant regeneration [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 19: 143—149.
- [11] 丁兰, 付庭治. 兰花生物工程研究进展[J]. *西北师范大学学报*, 2000, 36(3): 111—116.
- [12] Chen W H, Wu C C, Hsieh R M. Electrofusion and cell division of *Phalaenopsis* protoplasts[C]. *Proc 13th World Orchid Conf*, 1990.
- [13] Knapp J E, Kausch A P, Chanklee J M. Transformation of three genera of orchid using bargene as a selectable marker[J]. *Plant Cell Report*, 2000, 19: 893—898.
- [14] Chia T F, Chan Y S. Genetic engineering of tolerance to *Cymbidium* mosaic virus[C]. *Proc 13th World Orchid Conf*, 1990.
- [15] Chia T F, Chan Y S, Chua N H. The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* transformation[J]. *Plant*, 1995, 6: 441—446.
- [16] Anzai H, Ishiy, Shichinohe M, et al. Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment[J]. *Plant Tissue Cult Lett* 1996, 13: 265—271.
- [17] Yang J, Lee H J, Shin D H, et al. Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment[J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18: 978—984.
- [18] Nan G L, Kuehnle A R, Kado C I. Transgenic *Dendrobium* orchid through agrobacterium-mediated transformation[J]. *Malay Orchid Rev*, 1998, 32: 93—96.
- [19] Belarmino M M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 435—442.
- [20] Yu H, Yang S H, Goh C J. Agrobacterium-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 knox gene DOH1[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 301—305.
- [21] Yang H, Chuan N H. Isolation and characterisation of genes involved in the pigment biosynthesis of orchids[M]. *Proc 13th World Orchid Conf*, 1990.

(责任编辑 黄润州)