

## 兰花的功能基因

张盛春<sup>1</sup> 王小菁<sup>1,\*</sup> 叶庆生<sup>1</sup> 朱根发<sup>2</sup>

<sup>1</sup>华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; <sup>2</sup>广东省农业科学院花卉研究所, 广州 510640

### Functional Genes of Orchids

ZHANG Sheng-Chun<sup>1</sup>, WANG Xiao-Jing<sup>1,\*</sup>, YE Qing-Sheng<sup>1</sup>, ZHU Gen-Fa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, South China Normal University, Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China; <sup>2</sup>Floricultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

**提要** 对兰花的花发育相关基因、花色、激素及代谢途径相关功能基因的研究进展和前景作了介绍和讨论。

**关键词** 兰花; 功能基因; 花发育; 代谢

随着基因组学和功能基因组学的快速发展, 已经在模式植物拟南芥和水稻中获得了许多与植物发育相关的功能基因, 特别是在花发育方面取得了不少成果。兰科植物是被子植物中的最大家族之一, 其中具有观赏性的兰花如蝴蝶兰、石斛兰、大花蕙兰、卡特兰、文心兰、兜兰、万代兰等已经商品化, 随着市场的需求量日益加大, 与新品种(系)选育有关的兰花的生长发育、特别是与发育相关的功能基因的研究就显得十分迫切。目前有关兰花功能基因的报道相对较少, 对兰花发育的机制研究也比较薄弱, 本文对近年来兰花功能基因的研究进展作介绍。

#### 1 花发育相关基因

兰花花形特殊、结构复杂, 营养生长期比较长。有些兰花如蝴蝶兰、大花蕙兰的花芽分化需要低温诱导, 但对大多数种类兰花的花芽分化和后期生长发育调控机制还知之甚少。目前已经获得了一些兰花花发育相关的功能基因。

**1.1 MADS-盒家族基因** MADS 盒家族基因属于一个古老的基因家族, 存在于整个真核生物界, 该家族的成员编码 MADS 蛋白, 均为转录因子。MADS 盒基因通过表达水平的调节、共价修饰、多聚体的形成、与 DNA 的特异结合、与附加因子的相互作用等机制完成花形态建成的复杂调控 (Davies 等 1996)。

Yu和Goh (2000)从石斛兰(*Dendrobium grex Madame Thong-In*)营养生长到生殖生长过渡期的茎顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM)中得到 gene 7 (otg7), 并用其为探针, 从 SAM 的 cDNA 文库中分离出了 3 个 MADS-盒基因 (*DOMADS1*、*DOMADS2*、*DOMADS3*)。Yu 等(2002)进一步研究发现, *DOMADS1* 是石斛兰成花期的茎尖分生组织中特异表达的一个基因, 它除在茎中有弱的表达外, 在其它营养组织中检测不到。其转录产物均匀地分布在花序分生组织和花原基中, 以后, 在几乎所有的花器官中均有表达。在研究 *DOMADS1* 的分子调控中, 人们已分离得到它转录起始位点上游一个 3.5 kb 的启动子序列。序列分析发现在其上存有几个可能的 DNA 结合位点, 它们可能通过 MADS-盒 和 class 1 *knox* 基因(class 1 knotted 1-like homeobox genes) (Kerstetter 等 1994) 对 *DOMADS1* 的表达进行调控。Yu 等(2002)利用稳定的石斛兰 *DOMADS1::GUS* 融合基因转化系统对启动子序列进行缺失分析, 发现只有在全长上游启动子驱动下的 *GUS* 才表现出和 *DOMADS1* 一

收稿 2005-08-09 修定 2005-11-14

资助 广东省自然科学基金(04010374)和广东省农业攻关项目(2003A2010401)。

\*通讯作者(E-mail: wangxj@scnu.edu.cn, Tel: 020-85216417)。

样的时空特异性表达,表明全长上游启动子序列各部分中不同的Cis因子对控制*DOMADS1*在石斛兰营养、生殖组织以及营养生长到生殖生长过渡期的顶端分生组织中表达是缺一不可的。

Hsu和Yang (2002)从文心兰(*Oncidium Gower Ramsey*)中分离得到了花发育ABC模型中的B族基因*OMADS3*的cDNA序列,它和百合中的AP3同源基因*LMADS1*以及非洲菊中的*GDEF1*具有较高的同源性。*OMADS3*的表达在所有的花器官和营养叶中均能够检测到,它和拟南芥与金鱼草等模式植物的B族基因的表达不同。在拟南芥中异位表达截掉MADS盒或者C末端的*OMADS3*的cDNA会产生一种新的类似*ap2*突变体的花。这种花的萼片变化成类似于心皮的结构,花瓣变化成类似于雄蕊结构。他们进一步的研究表明,*OMADS3*可能是TM6-like基因的一种原始形态,而TM6-like基因存在于单子叶植物中,它和A功能基因家族具有相同的调控花器官形成和花发生的功能。

Hsu等(2003)在文心兰中克隆了AGL6-like基因*OMADS1*,将其在拟南芥中进行异位表达后,转基因植物都呈现出植株体积变小、开花显著提早和无限花序失去等特征。他们进一步的研究结果表明,在转入35S::*OMADS1*的拟南芥植株中,花时间基因*FT*、*SOC1*以及花分生组织特异性基因*LEAFY (LFY)*、*APETALA1 (API)*都受到显著的正调控。此外,异位表达还能够使晚开花表型的拟南芥突变体*gi-1*和*co-3*恢复野生型表型。这些都表明*OMADS1*在拟南芥中可以通过激活*FT*和*SOC1*基因来调控*LFY*和*API*基因的活性,从而促进开花。

Tsai等(2004)从蝴蝶兰(*Phalaenopsis sequestris*)中分离鉴定得到4个B功能基因,包括*PeMADS2*、*PeMADS3*、*PeMADS4*和*PeMADS5*,它们在植物体内表达的部位各不相同。*PeMADS2*主要在萼片、花瓣中表达;*PeMADS3*则主要在花瓣、唇瓣中表达,但两者在蕊柱中均有少量表达;*PeMADS4*只在唇瓣和蕊柱中表达;*PeMADS5*主要在花瓣中表达,但在萼片、唇瓣和蕊柱中也有

少量表达。它们可能在兰花形态建成中具有不同的作用。Tsai等(2005)最近又从蝴蝶兰中分离得到一个*GLOBOSA/PISTILLATA*-like基因,并对它的功能进行了研究,命名为*PeMADS6*基因。Southern blot分析表明*PeMADS6*基因在蝴蝶兰基因组中是单拷贝,在花萼、花瓣、唇瓣和花柱中表达并且参与它们的发育。原位杂交确认了*PeMADS6*的表达方式。授粉信号可以抑制*PeMADS6*在子房中的表达,说明该基因对蝴蝶兰子房或者胚珠的发育具有抑制作用。另外,生长素也能够作为调节抑制子房中*PeMADS6*基因表达的信号。将*PeMADS6*基因在拟南芥中异源超表达后发现,拟南芥的花萼转化成花瓣状,花的寿命比野生型的增加了3~4倍。另外,在转*PeMADS6*基因的拟南芥中还出现了种子推迟成熟的现象,这和*PeMADS6*基因对子房发育具有抑制作用的结论是一致的。因此,作为B功能基因,*PeMADS6*不仅仅是花器官的特异基因,并且在兰花的寿命和子房发育中也起功能作用。

**1.2 MYB家族基因** MYB家族基因在植物的生长、发育及繁殖中起作用。Wu等(2003)通过RT-PCR从石斛兰(*Dendrobium Woo Leng*)中分离克隆得到21个代表R2R3-MYB基因的cDNA片段,通过筛库获得6个全长cDNA,其中4个是典型的R2R3-MYB基因,它们分别是*DwMYB1*、*DwMYB2*、*DwMYB8*和*DwMYB10*。*DwMYB4*蛋白具有完整的R2重复和R3重复的前27个氨基酸残基,而R3重复中与DNA结合的HTH结构域则不存在(R2R3'),并且它的表达受开花的抑制。*DwMYB9*在R2重复的N端有8个氨基酸的缺失(R2'R3),它在成熟的花和花序中有高的表达,但在幼小的花芽中表达量低。*DwMYB8*和*DwMYB10*在表达方式上有相似性,两者在MYB区域的N端有较高的序列同源性。

**1.3 class 1 knox家族基因** class 1 *knox*家族基因的主要功能是抑制茎顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM)的形成。Yu等(2000)从石斛兰(*Dendrobium Madame Thong-In*)中分离得到homeo-

box基因 *DOH1*, 它是兰花基因组至今发现的第1个 class 1 *knox* 基因。*DOH1* 的 mRNA 在富含分生组织区域积累, 它的表达在花转化时期受抑制, 在兰花中超表达的 *DOH1* 完全抑制茎的形成和发育。转入 *DOH1* 的反义 mRNA 会产生大量的茎顶端分生组织, 并且开花提前。*DOH1* 通过控制 SAM 和茎的形成来维持兰花的形态。在花转化时期抑制 SMA 中 *DOH1* 的表达是必需的, 而且 *DOH1* 可能是 *DOMADS1* 上游的一个调节子。

**1.4 与子房发育相关的基因** 兰花子房的发育是由授粉启动的, 这是兰科植物的一种特有的特性, 因而成为研究子房发育的好材料(Arditti 1969)。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* (Lu 等 1996), 在蝴蝶兰子房发育的不同阶段都有表达, 可能是蝴蝶兰子房发育的重要调控基因。采用 *PHAL. 039* 作探针, 在拟南芥花芽的 cDNA 文库中也发现了与其同源的基因 *ATML1*。

## 2 与花色相关的基因

兰花的花色变化非常丰富, 如蝴蝶兰不仅具有红色、白色等单色花, 还具有白色红唇等复色花、线条花和斑点花等。因此, 兰花是非常理想的研究花着色机制的材料。

查尔酮合成酶(又称苯基苯乙烯酮合成酶, chalcone synthase, CHS)是花色素苷(anthocyanin)生物合成的一个重要的关键酶。Liew等(1998a)采用同源探针从兰花 [*Bronheadia finlaysoniana* (Lindl.)] 花的 cDNA 文库中分离得到了 CHS 的 cDNA *OCHS3*、*OCHS4* 和 *OCHS8*, 序列分别为 1 445、1 382 和 1 439 bp, 都含有一个单一的 1 185 bp 的开放读码框, 编码一个分子量大约为 42.9 kDa 的 394 个氨基酸的多肽。*OCHS3*、*OCHS4* 和 *OCHS8* 的核酸序列有非常高的同源性(大于 97%), 氨基酸序列有 76%~82% 的同源性, 而它们核酸序列与其他植物的 CHS 基因相比只有 59%~68% 的同源性。Northern blot 分析表明, 这 3 个基因在没有花色素苷的幼叶中有极高的表达, 但在有颜色的花中表达相对较低, 而在其它器官中则不表达。

在不同的花器官中, 它们在萼片中的表达最高, 其次是花梗和花柱, 而在花瓣和唇瓣中几乎检测不到, 但是 RT-PCR 分析则表明, 这 3 个基因的转录产物在植物的不同部位和所有的花器官中都能检测到。

许华欣和黄鹏林(1999)发现蝴蝶兰 CHS 基因为多基因家族。白花红唇蝴蝶兰约有 11 个 CHS 基因, 而红花朵丽蝶兰约含有 7 个 CHS 基因。白花红唇蝴蝶兰的 *pOCHS01* cDNA 长 1 498 bp, 可编码 390 个氨基酸的蛋白质, 其氨基酸序列与拟南芥等其他植物相比, 具 59.5%~64.9% 的同源性。采用 *pOCHS01* 作探针, 对以粉红花蝴蝶兰为母本与白花蝴蝶兰杂交选出的淡红花、晕红花和白花后代进行 Southern 杂交分析的结果表明, 子代的杂交条带与母本相似, 而与父本完全不同, 说明来自白花红唇蝴蝶兰的 *pOCHS01* 可能负责控制红花或斑点花花色表达的基因, 而白花亲本可能是无 *pOCHS01* 基因存在, 或者由其他 CHS 基因负责控制。

韩颖颖等(2004)用 RT-PCR 技术从蝴蝶兰花瓣中得到特异性表达的查尔酮合成酶 cDNA (*pchs-1*), 它与已发表的 CHS 基因有很高的同源性。将此 cDNA 序列进行原核表达时, 能够表达出与预测大小一致的蛋白。

Liew等(1998b)用同源探针通过 PCR 方法从兰花 (*B. finlaysoniana*) 花的 cDNA 文库中分离得到编码二氢叶酸还原酶(dihydroflavonol-4-reductase, DFR)的 cDNA 序列 *ODFR*。Southern blot 分析表明, 在该兰花中 DFR 由单基因编码, 而 Northern blot 和 RT-PCR 分析则表明 DFR 在所有紫色的组织中都有表达。该基因与单子叶植物中的 *DFR* 序列同源性比双子叶植物中的要高。

Su和Hsu (2003)从蝴蝶兰中分离得到一个细胞色素 P450 家族中的类黄酮-3', 5'-羟化酶(F3' 5'H)基因的 cDNA 克隆, 将其构建到植物表达载体后, 再利用基因枪法把它转入蝴蝶兰, 转基因的兰花花瓣颜色从粉红色变成品红色。类黄酮-3', 5'-羟化酶(F3' 5'H)基因是细胞色素 P450 家族中的一

种, 是合成3', 5'-羟化花色苷的关键酶, 是蓝色和紫色花所必需的。

### 3 与激素相关的基因

激素在植物生长发育过程中作用很大。目前, 在用外源激素缩短兰花幼年期和促进兰花从营养生长向生殖生长转变这两方面已有了一些研究, 但发现的与激素相关的基因还相对较少。

**3.1 与ACC相关的基因** 在被子植物的有性生殖过程中, 授粉及随后的两性配子融合启动花瓣衰老、花瓣颜色的变化以及子房发育和胚胎发生。兰花作为进化程度高的单子叶植物(Withner 等1974), 其花的形态结构和发育特征非常适合于花后生理研究。有研究表明, 授粉可诱导兰花乙烯的生物合成, 乙烯再进而调控花瓣的衰老、花粉萌发和子房发育(Stead 1992; Zhang 和 O'Neill 1993)。

O'Neill等(1993)从朵丽蝶兰(*Doritaenopsis hybrida* Hort.)柱头的cDNA文库中分离出乙烯生物合成的ACC合成酶和ACC氧化酶cDNA, 并对授粉及与授粉有关因子诱导基因在花各器官间的表达调控进行了初步分析。Zhang等(1995)报道, 授粉以后可以在花的不同器官中检测到这两个基因的表达, 它们的mRNA积累比也相似, 但是, ACC合成酶mRNA的积累比ACC氧化酶更加具有器官特异性。在花器官中, ACC氧化酶的mRNA有更大的丰度。

Nadeau和O'Neill(1995)构建了朵丽蝶兰雌蕊的cDNA文库, 并从中获得一个ACC氧化酶的cDNA *OA01*。他们发现 *OA01* 转录水平在授粉后的柱头和花瓣中受调控。而后他们又从授粉后24 h、正在衰老的花被文库中分离得到第2个ACC氧化酶cDNA, 命名为 *D-ACO2*, 编码325个氨基酸, 它和 *OA01* 具有95%的同源核酸序列。

Zhang等(1996)研究蝴蝶兰(*Phalaenopsis* 'General Ku' hor)在授粉后乙烯的合成和ACC氧化酶基因表达的结果显示, 授粉后12、24、48 h, 柱头和花柱中乙烯的产生和ACC氧化酶mRNA的积累显著下降, 而子房中则明显上升; 授粉后

雌蕊中乙烯的产生和ACC氧化酶基因的表达密切相关。此外他们还发现, 授粉后柱头中合成的乙烯的量相对最多, 花柱次之, 子房中最少。

Bui和O'Neill(1998)在蝴蝶兰中克隆到了3种ACC合成酶基因(*Phal-ACS1*、*Phal-ACS2*、*Phal-ACS3*), 并研究了授粉后基因的时空表达模式。他们的结果表明, 这3种ACC合成酶基因主要是在兰花不同的时期调节乙烯的合成, 在蝴蝶兰授粉后的子房发育中起着用。在蝴蝶兰授粉后1 h便可在柱头上检测到 *Phal-ACS2* 的表达, 2 h后可在子房中检测出 *Phal-ACS3* 的表达, 而 *Phal-ACS1* 的表达则授粉后6 h才可检测到。用外源生长素刺激, 进行假授粉, 也可在柱头和子房中检测到 *Phal-ACS2* 和 *Phal-ACS3* 的表达。说明 *Phal-ACS2*、*Phal-ACS3* 的表达是授粉的初始信号, 而 *Phal-ACS1* 则是次级信号。

Wang等(2001)将10 pmol的1型或者2A型丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶特异性抑制剂冈田酸(okadaic acid, OA)施用到蝴蝶兰的柱头后, 乙烯即大量增加, 整个花的衰老加速。而用乙烯生物合成或活性的抑制剂硫代硫酸银则能够有效地抑制OA诱导的乙烯合成并阻止花衰老, 表明蛋白磷酸酶抑制剂是通过乙烯信号途径来诱导花衰老的。OA能够诱导ACC合成酶多基因家族的不同表达途径。半定量RT-PCR检测时可以观察到, OA诱导后, 在柱头、唇瓣和子房的 *Phal-ACS1* 的表达比授粉诱导的高; 相反, OA诱导的 *Phal-ACS2* 和 *Phal-ACS3* 的表达则比授粉诱导的低。而用蛋白激酶的抑制剂星形孢菌素处理可抑制柱头中OA诱导的 *Phal-ACS1* 的表达并延缓衰老。这些结果表明, 一种未知蛋白的高度磷酸化能够使 *Phal-ACS1* 的表达增强, 从而促进乙烯的合成, 加速花的衰老。

**3.2 与细胞分裂素相关的基因** 兰花 *DSCKX 1* 是细胞分裂素氧化酶基因家族中新的一员, 它能够催化带有不饱和异戊二烯侧链的细胞分裂素的降解。Yang等(2002)通过兰花瞬时表达系统和稳定的拟南芥转化系统, 利用 *DSCKX1::GUS* 融合基因对

*DSCKX1* 基因的调控区进行缺失分析时, 分离得到了 *DSCKX1* 编码区上游一个 3.7 kb 片段, 功能分析表明此片段能够控制 *DSCKX1* 在不同组织中表达。

Yang 等(2003a)用基因差异显示法, 从培养在含有6-BA培养基上的石斛(*D. sonia*)的茎尖得到一个新的细胞分裂素氧化酶(cytokinin oxidase, CKX)基因 *DSCKX1*, 它受细胞分裂素的诱导, 编码的 CKX 蛋白对兰花中细胞分裂素含量的控制起作用; 并且他们已经找到了此基因受细胞分裂素诱导转录所必需的调控区域, 将 *DSCKX1* 基因在石斛中过量表达后, 细胞分裂素氧化酶酶活性增加与细胞分裂素含量减少之间呈现一致性。Yang 等(2003b)将此基因转入拟南芥中过量表达时见到, 转基因植株中细胞分裂素含量降低, 并且出现根变长、出芽频率变低、叶柄变短、叶体积减少等表型。他们进一步研究这些转基因植株时发现, *KNAT1*、*STM*、*CycD3* 基因的表达明显被抑制, 说明细胞分裂素可能通过调控这些基因来调控细胞周期以及根/芽的发育。

#### 4 与代谢途径相关的基因

许多观赏性兰科植物生长缓慢, 幼年期很长。这种生长特性可能与其体内的代谢途径有密切关系。目前, 兰花代谢途径的分子生物学研究已经起步, 并且发现了一些与其相关的基因。

**4.1 与蔗糖代谢相关的基因** 蔗糖-磷酸合成酶是植物中碳同化和分配中的关键调控酶, 它在光合作用细胞中对蔗糖的产生起作用。Li 等(2003a)从热带附生兰(*Oncidium Goldiana*)中克隆得到编码蔗糖-磷酸合成酶(sucrose-phosphate synthase, SPS)的全长 cDNA 序列 *sps1*。它具有 3 183 bp 的开放阅读框, 编码 1 061 个氨基酸的蛋白, 与玉米、菠菜中的 SPS 分别具有 56% 和 69% 的同源性。在附生兰的花中, *sps1* 有高水平的表达, 表明此基因可能在开花过程中起重要作用。当植株生长在高光强和较高浓度的二氧化碳中时, 会引起光合作用叶片中 *sps1* 转录产物的积累, 表明此基因的表达与叶片的光合速率有关。

Li 等(2003b)还从同样的附生兰中分离得到一个编码蔗糖合成酶的 cDNA 序列 *Osus*, 全长 2 829 bp, 含有一个 2 447 bp 的开放阅读框, 编码 816 个氨基酸、分子量约为 93.1 kDa 的蛋白。*OSUS* 的氨基酸序列和其它单子叶植物的约有 80% 的同源性。*Osus* 能够在大肠杆菌中融合表达出蔗糖合成酶蛋白。*Osus* mRNA 在所有检测过的组织中都存在, 并且在发育中的花序和根尖中含量最高。将附生兰培养在蔗糖或者葡萄糖培养基后, 根尖和成熟叶片中稳态的 *Osus* 基因的表达与玉米中 *Sus* 基因的表达一样明显增加。在无氧条件和增加二氧化碳的情况下, 成熟叶片中 *Osus* 基因的表达水平明显增加。其中基因的表达方式和调控的结果表明, 蔗糖合成酶在热带附生兰的生长和发育中起一定的作用。

Li 等(2004)从热带一种景天酸代谢途径的兰花(*Mokara Yellow*)中克隆得到一个蔗糖合成酶 cDNA 序列 *Msus1*, 长为 2 748 bp。它和单子叶植物中的蔗糖合成酶基因有 80% 以上的同源性。Northern blot 分析表明, 它在伸长的叶片和根尖中有较高的表达水平, 但在成熟的叶片和花中检测不到。

**4.2 与其它代谢相关的基因** Do 和 Huang (1997)用蝴蝶兰(*Phalaenopsis True Lady*)授粉后的花瓣构建 cDNA 文库, 从中克隆得到第 1 个植物乙酰辅酶 A 氧化酶的 cDNA, 称为 *pOAC031*。它含有 2 100 bp, 编码 699 个氨基酸多肽 PAC01 的读码框, PAC01 的等电点大概为 8.74, 分子量大约为 78 032 Da, 和植物乙酰辅酶 A 氧化酶的一个单体相似。Southern blot 分析表明此基因在植物基因组中是单拷贝或者多拷贝。将 PAC01 的序列和过氧化物酶体乙酰辅酶 A 氧化酶的序列比较后发现, 二者具有 13 个保守区域和 1 个 FMN 结合位点的相似性。

其它已克隆的与代谢途径相关的基因包括石斛兰(*D. crumenatum*)的异柠檬酸裂解酶(isocitrate lyase, DCRIC1)基因(Vellupillai 等1999)和液泡 H<sup>+</sup>-ATP 合成酶(vacuolar H<sup>+</sup>-ATP synthase)基因(Liew 等1999)。

#### 5 其他功能基因

Montieri 等(2004)用兰花(*Orchis italica*)中 LFY

的同源基因 *OrcLFY* 对一些不同种类的兰花在形态和分子进化上进行鉴别时发现, *OrcLFY* 是一个在分类中重建分子系统发育的新的标记基因。

Chen等(2005)用从石斛(*D. officinale*)的嫩叶提取RNA, 同源克隆得到凝集素2 (DOA2)全长cDNA, 777 bp 的 *DOA2* 编码170个氨基酸的凝集素前体。将其与兰科和石蒜科其他植物进行比较时发现, DOA2 有甘露糖结合凝集素类的特征, 并且含有3个甘露糖结合位点。半定量RT-PCR分析表明, DOA2 mRNA 的表达在所有组织中都能够检测到, 包括根、茎、叶, 其中在茎中表达最高, 叶中最低, 因此认为 *DOA2* 是一个组成型表达基因。

## 6 展望

兰花功能基因的研究已经取得了一些进展, 但与其他农作物相比, 还有距离。随着花卉产业化步伐的加快, 今后一段时间里, 兰花功能基因方面的研究可能应集中在以下方面: (1) 模式植物的研究表明, 花的发端至少受光周期途径、春化作用途径、自主开花途径和赤霉素途径的共同调控(Koornneef等1998; Simpson等1999)。目前, 兰花中与这4条途径相关的功能基因的研究还不多, 这可能会成为兰花分子生物学中研究的热点。(2) 虽然已经获得了一些花器官决定ABC模型中的同源基因, 但还需要分离、克隆更多的相关基因并寻找与兰花器官决定相关的特异基因, 以阐明兰花的花器官决定模式。(3) 花序轴伸长、花瓣生长以及花色形成对观赏品质形成意义很大, 寻找与此有关的功能基因还很少报道, 应加强研究。(4) 有些兰花如国兰、蝴蝶兰等生长缓慢, 对光合、呼吸、能量代谢等相关基因进行分离、克隆和功能分析将对阐明生长缓慢的机制有所贡献, 为生产中加快生长提供理论依据。(5) 与激素代谢相关的基因对兰花的生长和衰老等生理过程有调控作用, 目前的研究主要集中在授粉后与花衰老相关基因的研究, 对此今后可能会有更多的基因得到克隆和研究。(6) 大多数热带兰色彩艳丽而没有花香, 而一些春兰、秋兰等中国兰的香味则沁人心脾。因此如何获得有关兰花香味的功能基因并

研究有关代谢和调控途径以及香味腺体结构相关基因, 将为采用基因工程获得香、艳结合的兰花新品系奠定基础。(7) 迄今为止, 成熟的观赏兰花转化体系较少, 转化植株开花的周期较长, 因此将功能基因在兰花中进行超表达或基因敲除后, 观察植株的表型有比较大的困难。目前, 对功能基因在兰花中功能的研究大多都是采用异源表达, 即将基因转入拟南芥或其他生长周期短的模式花卉中, 进行表型观察, 以此分析基因的功能。建立高效、完善的不同种类特别是观赏兰花的遗传转化体系将是一项重要的基础性工作, 而后在此基础上将功能基因转化兰花, 将对基因的功能和调控研究以及为创造新品系奠定基础。

## 参考文献

- 韩颖颖, 明凤, 王敬文, 梁斌, 郭滨, 叶鸣明, 沈大棱(2004). 蝴蝶兰查尔酮合酶基因cDNA的克隆、鉴定及其原核表达. 复旦学报(自然科学版), 43 (2): 235~239
- 许华欣, 黄鹏林(1999). 蝴蝶兰苯基苯乙烯酮合成酶cDNA之选殖及分析. 中国园艺, 45: 19~35
- Arditti J (1969). Post-pollination phenomena in orchid flowers. Aust Orchid Rev, 34: 155~158
- Bui AQ, O'Neill SD (1998). Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers. Plant Physiol, 116: 419~428
- Chen ZH, Sun XF, Tang KX (2005). Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-binding lectin from *Dendrobium officinale*. Toxicon, 45: 535~540
- Davies B, Egea-Cortines M, de Andrade Silva E, Saedler H, Sommer H (1996). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. EMBO J, 15 (16): 4330~4343
- Do YY, Huang PL (1997). Characterization of a pollination-related cDNA from *Phalaenopsis* encoding a protein which is homologous to human peroxisomal acyl-CoA oxidase. Arch Biochem Biophys, 344 (2): 295~300
- Hsu HF, Huang CH, Chou LT, Yang CH (2003). Ectopic expression of an orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol, 44 (8): 783~794
- Hsu HF, Yang CH (2002). An orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AP3*-like MADS gene regulates floral formation and initiation. Plant Cell Physiol, 43 (10): 1189~1209
- Kerstetter R, Vollbrecht E, Lowe B, Veit B, Yamaguchi J, Hake S (1994). Sequence analysis and expression patterns divide the maize *knotted1*-like homeobox genes into two classes. Plant Cell, 6: 1877~1887
- Koornneef M, Alon So-Blanco C, Peeters AJ, Soppe W (1998).

- Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49: 345~370
- Li CR, Zhang XB, Hew CS (2003a). Cloning of a sucrose-phosphate synthase gene highly expressed in flowers from the tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*. *J Exp Bot*, 54: 2189~2191
- Li CR, Zhang XB, Hew CS (2003b). Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*. *Physiol Plant*, 118: 352~360
- Li CR, Zhang XB, Huang CH, Hew CS (2004). Cloning, characterization and tissue specific expression of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic CAM orchid *Mokara Yellow*. *J Plant Physiol*, 161 (1): 87~94
- Liew CF, Goh CJ, Loh CS, Lim SH (1998a). Cloning and characterization of full-length cDNA clones encoding chalcone synthase from the orchid *Bromheadia finlaysoniana*. *Plant Physiol Biochem*, 36 (9): 647~656
- Liew CF, Loh CS, Goh CJ, Lim SH (1998b). The isolation, molecular characterization and expression of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in the orchid, *Bromheadia finlaysoniana*. *Plant Sci*, 135: 161~169
- Liew CF, Lim AL, Loo MY, Sanjay S (1999). A cDNA encoding the 16 kDa proteolipid subunit of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATP synthase (accession no. AF117334) from the orchid *Dendrobium crumenatum*. *Plant Physiol*, 121: 1383~1385
- Lu P, Porat R, Nadeau JA, O'Neill SD (1996). Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell*, 8: 2155~2168
- Montieri S, Gaudio L, Aceto S (2004). Isolation of the *LFY/FLO* homologue in orchids *Italia* and evolutionary analysis in some European orchids. *Gene*, 26 (333): 101~109
- Nadeau JA, O'Neill SD (1995). Nucleotide sequence of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from senescing orchid petals. *Plant Physiol*, 108: 833~844
- O'Neill SD, Nadeau JA, Zhang XS, Bui AQ, Halevy AH (1993). Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *Plant Cell*, 5: 419~432
- Simpson GG, Gendall T, Dean C (1999). When to switch to flowering. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 14: 519~550
- Stead AD (1992). Pollination-induced flower senescence: A review. *Plant Growth Regul*, 11: 13~20
- Su V, Hsu BD (2003). Cloning and expression of a putative cytochrome P450 gene that influences the colour of *Phalaenopsis* flowers. *Biotechnol Lett*, 25 (22): 1933~1939
- Tsai WC, Kuoh CS, Chuang MH, Chen WH, Chen HH (2004). Four DEF-like MADS box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Physiol*, 45 (7): 831~844
- Tsai WC, Lee PF, Chen HI, Hsiao YY, Wei WJ, Pan ZJ, Chuang MH, Kuoh CS, Chen WH, Chen HH (2005). *PeMADS6*, a *GLOBOSA/PISTILLATA*-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development. *Plant Cell Physiol*, 46 (7): 1125~1139
- Vellupillai M, Goh CJ, Swarup S (1999). Sequence analysis of *Dcr1c1*, an isocitrate lyase gene from the tropical orchid *Dendrobium crumenatum* (accession no. AF193815). *Plant Physiol*, 121: 1383~1385
- Wang NN, Yang SF, Chang YY (2001). Differential expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes during orchid flower senescence induced by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Plant Physiol*, 126: 253~260
- Withner CL, Nelson PK, Wejksnora PJ (1974). *The Anatomy of Orchids in the Orchids Scientific Studies*. New York: John Wiley and Sons, 267~347
- Wu XM, Lim SH, Yang WC (2003). Characterization, expression and phylogenetic study of *R2R3-MYB* genes in orchid. *Plant Mol Biol*, 51: 959~972
- Yang SH, Yu H, Goh CJ (2002). Isolation and characterization of the orchid cytokinin oxidase *DSCCK1* promoter. *J Exp Bot*, 53: 1899~1907
- Yang SH, Yu H, Goh CJ (2003a). Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCCK1* in *Dendrobium* orchid. *Plant Mol Biol*, 51 (2): 237~248
- Yang SH, Yu H, Xu YF, Goh CJ (2003b). Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid *DSCCK1*. *FEBS Lett*, 555: 291~296
- Yu H, Goh CJ (2000). Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. *Plant Physiol*, 123 (4): 1325~1336
- Yu H, Yang SH, Goh CJ (2000). *DOHI*, a class 1 *knox* gene, is required for maintenance of the basic plant architecture and floral transition in orchid. *Plant Cell*, 12: 2143~2159
- Yu H, Yang SH, Goh CJ (2002). Spatial and temporal expression of the orchid floral homeotic gene *DOMADSI* is mediated by its upstream regulatory regions. *Plant Mol Biol*, 49 (2): 225~237
- Zhang XS, O'Neill SD (1993). Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *Plant Cell*, 5: 403~418
- Zhang XS, Yan XX, Ma XJ (1995). Pollination-induced expression of ethylene biosynthetic genes at transcription level in orchid flowers. *Acta Bot Sin*, 37 (5): 356~360
- Zhang XS, Zhong HW, Lü C, Huang X, Cao ZX (1996). Pollination-induced ethylene synthesis and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene expression in the gynoceium of *Phalaenopsis* orchid flower. *Acta Bot Sin*, 1996, 38 (5): 375~378