

◆濒危植物生物多样性综述◆

兜兰育种技术研究进展*

张玲玲^{1,2}, 房林³, 李琳³, 吴坤林³, 曾晶珏³, 张佳瑞^{1,2}, 康明³, 曾宋君^{3**}

(1. 中国科学院华南植物园园艺中心, 广东广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院华南植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 广东广州 510650)

摘要: 兜兰属(*Paphiopedilum*)植物具有独特的观赏价值,是具有巨大市场潜力的高档花卉,育成具有自主知识产权的优良品种是兜兰产业发展的基石。我国拥有丰富的兜兰种质资源,台湾的兜兰育种和产业化发展较好,但大陆地区兜兰产业的发展还处于起步阶段。由于生境破坏和过度采挖,兜兰属植物已是世界上较濒危的植物类群之一。选育出可进行市场推广的优良品种不但能获得较好的经济效益,而且能降低对野生种类的需求,间接实现兜兰的有效保育和可持续利用。本文对兜兰的育种目标、种质资源和主要育种技术(包括引种驯化、杂交育种、倍性育种、化学诱变、物理诱变和分子育种等)进行了综述,并对各项技术的优缺点进行了分析,以期为兜兰高效育种提供参考。

关键词: 兜兰; 引种驯化; 杂交育种; 倍性育种; 诱变育种

中图分类号: S682.31 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2023)06-1052-08

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20240125.003

兜兰属(*Paphiopedilum*)植物具有独特的观赏价值,是十分珍稀的高档花卉,备受世界园艺界的关注,曾多次在世界性园艺博览会上获得大奖,是极具开发潜力的新兴兰花种类,市场巨大。兜兰不仅花色丰富、花期持久,而且它的独特之处在于其奇特的囊状或盔状唇瓣^[1]。但是,兜兰属植物是世界上较濒危的植物类群之一,其所有的野生种类均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约附录 I》(CITES)而被禁

止贸易^[2]。中国在 2021 年发布的《国家重点保护野生植物名录》^[3]中,兜兰属除硬叶兜兰(*Paphiopedilum micranthum*)和带叶兜兰(*P. hirsutissimum*)外,其他种全部被列为国家一级重点保护植物,同时被禁止采挖。由于兜兰原生种的花色有限、环境适应能力较差等原因,选育出花色丰富、适应能力强的兜兰新品种并进行推广,有利于降低对野生种类的需求,进而减少过度采挖,可以从源头上消减致危因素,

收稿日期: 2023-09-28

修回日期: 2023-12-25

* 广州市科技计划项目(2024B03J1129),中国科学院战略生物资源能力建设项目(29KFJ-BRP-017-70)和林芝市科技计划项目(2023-QYCX-02)资助。

【第一作者简介】

张玲玲(1985-),女,在读博士研究生,工程师,主要从事园林植物和观赏园艺研究,E-mail:azhanglingling@scbg.ac.cn。

【**通信作者简介】

曾宋君(1965-),男,博士,研究员,主要从事园林植物和观赏园艺研究,E-mail:zengsongjun@scib.ac.cn。

【引用本文】

张玲玲,房林,李琳,等.兜兰育种技术研究进展[J].广西科学,2023,30(6):1052-1059.

ZHANG L L, FANG L, LI L, et al. Advance of Breeding Technology of *Paphiopedilum* [J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(6): 1052-1059.

实现对兜兰的有效保护和可持续利用。我国兜兰属种质资源丰富,为兜兰新品种的选育提供了丰富的种质资源。我国台湾的兜兰育种和产业化发展较好,但大陆地区的兜兰育种工作进展还较缓慢,具有自主知识产权的新品种较少。本文对兜兰的育种技术研究进展进行综述,并对各项技术的优缺点进行分析,以期对兜兰高效育种提供参考。

1 兜兰育种目标

兜兰育种的目标在不同的发展时期发生着变化。19世纪至20世纪初,花色艳丽、花瓣和萼片大而圆整的标准型杂交种深受消费者喜爱,随后具有斑点的褐红色摩帝型兜兰成为育种的热点,此外,多花长瓣型兜兰也曾是兜兰育种的热点^[4]。兜兰属植物的育种目标可归纳为以下6个方面。(1)花色。花是兜兰的主要观赏部位,创造观赏价值高的新花色是兜兰育种的主要目标^[4]。我国的年宵花选育一般以红色或者黄色为目标。(2)花型。按照美国兰花协会的标准,兜兰花型育种以选育圆整、宽阔、平整、齐满以及各部分均匀对称的花型为主要目标^[5]。(3)质地。按照美国兰花协会和台湾兰花产销发展协会的评审规则,兜兰优良品种须具有较厚且蜡质的花^[5]。(4)观赏期。维持较长的观赏期始终是兜兰新品种选育的重要目标,蜡质花一般具有较长的花期。另外,可应节开放对品种的商业化也非常重要。(5)香气。香气也是兜兰育种的重要目标。兜兰属植物大都没有香气,原生种中只有汉氏兜兰(*P. hangianum*)、麻栗坡兜兰(*P. malipoense*)和白花兜兰(*P. emersonii*)具有香气,它们是兜兰花香育种的主要亲本来源。华南植物园利用麻栗坡兜兰和白花兜兰选育出了带有香味的绿韵兜兰(*P. 'Lvyun'*,粤审花20170009)。(6)抗病、易开花、易栽培。兜兰新品种培育的最终目标是在市场上推广,而培育出抗病、易开花、易栽培的优良品种是推广的基础。

2 兜兰种质资源

兜兰属的野生种质资源是新品种选育的根基。全世界目前已知共有兜兰属植物109种^[6],中国是兜兰属植物分布较丰富的国家之一,《中国植物志》记载兜兰属植物有18种^[7],《Flora of China》^[8]和刘仲键等^[9]在《中国兜兰属植物》中记载中国有兜兰属植物27种,Zhou等^[10]在2021年报道中国兜兰属植物29种。产于中国的波瓣兜兰(*P. insigne*)、紫毛兜兰

(*P. villosum*)、白旗兜兰(*P. spicerianum*)和包氏兜兰(*P. villosum* var. *boxallii*)是参与杂交育种最多的亲本,可谓“超级亲本”,它们分别产生了19 746、19 378、18 957和18 295个杂交后代,以上4种兜兰的总后代数为20 536(并集关系),约占兜兰总杂交后代数的73%^[11]。

除了野生兜兰种外,人工培育的兜兰新品种也是极好的杂交亲本,兜兰育种的重要种质资源同样包括各种杂交种以及通过诱变和基因工程等方法培育产生的新品种和育种材料^[12]。例如,*P. 'Nitens'*是1877年由Veitch苗圃利用波瓣兜兰为母本、紫毛兜兰为父本杂交育成的杂交种,其在随后兜兰的杂交育种中起到了重要的作用^[13],产生了13 507个杂交后代^[11]; *P. 'Leeanum'*是1884年Lawrence利用波瓣兜兰为母本、白旗兜兰为父本培育出的杂交品种,以其为亲本育成了14 504个杂交后代^[11]。将培育的品种作为亲本,可以形成连续的品种路线,发展特有的杂交品系,从而有利于较有计划地达成育种目标^[11]。

3 兜兰育种技术

3.1 引种驯化

与人工创造新品种相比,引种驯化时间短、见效快并且节省人力物力。制定育种计划时,首先要考虑引种驯化的可能性^[12]。曾宋君^[14]在国内外兜兰引种栽培的基础上,以植株的生长状况、整株姿态、叶片观赏性、开花性、花形、花色和花朵观赏期为评价指标,利用灰色关联分析,对原产于我国的27种兜兰属植物的观赏价值进行综合评价,分析它们在华南地区的应用前景,并指出飘带兜兰(*P. parishii*)、白旗兜兰和紫纹兜兰(*P. purpuratum*)是最值得在华南地区推广的兜兰种类;带叶兜兰、亨利兜兰(*P. henryanum*)、汉氏兜兰、紫毛兜兰等是值得在华南地区推广的兜兰种类。

3.2 杂交育种

杂交育种是选育兰花新品种的重要方法,创造了巨大的兰花产业。1978年,兜兰杂交种在英国皇家园艺协会(RHS)登录的数量突破了10 000种,并于2005年达到了20 000种,现在RHS登录的兜兰杂交种已有28 921个。在RHS登录的杂交种数量上仅次于卡特兰属(*Cattleya*)的43 542个以及蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*)的39 411个。参与登录的育种机构(个人)有1 854个,登录数量最多的前10个育种机构(个人)主要来自美国、英国、日本,我国台湾也在

列, 他们的特点是发展形成了自己的杂交品系^[11]。我国大陆的兜兰杂交育种工作才刚刚起步, 华南植物园于 2000 年起进行兜兰的系统育种, 已获得杂交组合 200 多个, 其中, 105 个兜兰新品种在 RHS 上进行了登录, 18 个兜兰新品种通过了广东省新品种审定或评定(内部资料); 中国科学院昆明植物研究所也选育出了诸多优良的兜兰新品种。

曾宋君^[14]对兜兰的杂交方法、亲本选择和种苗繁殖方法进行了综述。黄小艳等^[15]对中国一级重点保护野生兰科植物的杂种登录情况、亲本选择、授粉及播种时期选择、属间杂交进展、杂交育种存在的问题进行综述, 指出在 RHS 上登录最多的是兜兰属植物。曾宋君^[14]认为, 兜兰最佳的授粉时间一般为花开后 1 周, 大部分兜兰种子在授粉后 4 个月能萌发, 5-6 个月达到萌发高峰。杨佳慧等^[16]也对兜兰的杂交方法进行了研究, 发现长瓣兜兰(*P. dianthum*) 在开花后 6-34 d 花粉活力和柱头可授性最强。初美静等^[17]对绿肉饼兜兰(*P. 'Pacific Cocoa Lovely'*) 的研究表明, 花粉活力随开花时间呈现出从弱到强再到弱的趋势, 开花后 15-20 d 花粉活力最大; 其柱头的可授性也随开花时间呈现出先弱后强再变弱的趋势, 开花后 10-20 d 柱头可授性最高。当亲本花期不遇时, 可将花粉用消毒的塑料管密封置 4 °C 冰箱保存, 曾宋君^[14]对彩云兜兰(*P. wardii*)、杏黄兜兰(*P. armeniacum*)、同色兜兰(*P. concolor*)、麻栗坡兜兰、带叶兜兰、长瓣兜兰的花粉于 4 °C 低温干藏 1 年后的活力进行了检测, 发现 45% 的杏黄兜兰花粉具有活力, 其他种类 50% 的花粉具有活力。在亲本的选择方面, 曾宋君^[14]认为, 以不同的兜兰种为亲本在 RHS 上登录的杂交种数量存在巨大差异, 这与它们的发表时间、观赏价值和杂交亲和性有关。波瓣兜兰、白旗兜兰、紫毛兜兰和包氏兜兰是 4 个最重要的原生种亲本, 它们的杂交后代占现今兜兰品种的 73%^[11]。兜兰原生种作为亲本的开发程度相差较大, 主流的原生亲本主要是兜兰亚属(Subgen. *Paphiopedilum*), 而对小萼亚属(Subgen. *Parvisepalum*) 的开发较少^[11], 此外, 特殊亲本对杂交育种非常重要^[4]。除种质资源的收集外, 杂交育种工作的另一个重点是天然特殊个体的收集与保存以及人工特殊个体的诱导(多倍体诱导), 这些不寻常的育种材料将对育种产生不可估量的作用。回顾整个育种史, 育种家频繁地使用白化、大花、抗病、斑点密集的个体, 培育出了许多优秀品种, 如波瓣兜兰的白化变种(*P.*

insigne var. *sanderainum*), 其花色素雅、通透, 呈淡绿色, 是重要的育种亲本; 魔帝兜兰(*P. 'Maudiae'*) 的亲本就是胼胝兜兰(*P. callosum*) 和劳氏兜兰(*P. lawrenceanum*) 的白化变种。种苗繁育是兜兰育种的基础, 兜兰杂交种子无菌播种存在萌发率低、成苗困难的问题, 此方面技术难题的攻克对兜兰育种非常重要。曾宋君等^[18,19]对兜兰属植物的无菌播种、共生萌发和组织培养等离体快繁技术的进展进行了综述, 为以上问题的研究提供了参照。

遗传规律可以为杂交育种提供依据, 从而进行有选择的亲本选配, 以达到育种目的。目前对兜兰观赏性状遗传规律的研究较少, 只有对初代亲本花色遗传的研究。麦奋^[20]认为不同颜色的兜兰在花色遗传中起着不同的作用。曾宋君等^[4]对兜兰花色的初代遗传进行了总结。兜兰花的质地有蜡质、纸质和半纸质之分, 蜡质花质地较厚, 有光泽, 是优良的观赏性状。本团队在研究中发现兜兰花的质地和花期具有关联性, 特别是在鲜切花方面。园林植物遗传学中虽然已存在诸多对花色、彩斑、花径、重瓣、株型和抗性的研究, 但对花质地的遗传及形成机制的研究较少^[12]。

目前, 杂交育种是兜兰的主要育种方法, 兜兰育种家通过杂交育种培育了几乎全部的市售兜兰新品种, 也选育出了许多深受市场喜爱的新品种。兜兰杂交育种存在一些自身难以解决的问题^[4]: 兜兰杂交后代育性差; 兜兰杂交常出现基因连锁, 不良性状基因常与优良性状基因连锁遗传, 难以获得理想的杂交后代; 兜兰杂交种子的萌发率低, 兜兰的无性克隆难度大; 兜兰杂交亲本组合存在任意性, 缺乏遗传规律的指导等。兜兰育种有必要在杂交育种以外, 拓展育种途径。

3.3 多倍体育种

多倍体育种是选育细胞核中具有 3 组以上染色体的优良新品种的方法。多倍体具有巨大性, 比起正常个体一般茎粗, 叶宽厚、色深, 花大、色艳, 果实大、种子大而少, 此外还具有可孕性低、适应性强和有机合成速率提高的特点, 并可以克服远缘杂交的不育性。在人工新品种选育方面, 多倍体育种是克服远缘杂交当代不孕和远缘杂种不结实的重要方法, 一般将多倍体视为超级亲本。多倍体花卉一般具有花大、重瓣性强、花色浓艳等特点, 深受人们欢迎。因此选育多倍体对育种具有重要的意义, 育种家常常有目的地选育多倍体。蝴蝶兰育种的超级亲本 *Phal. Doris* 和 *Phal. Zada* 均是杂交产生的四倍体, 在已登录的蝴蝶

兰杂交种中,90.2%具有 *Phal. Doris* 血统,43.5%具有 *Phal. Zada* 血统^[21,22]。

诱导多倍体的方法主要有物理方法和化学方法。诱导多倍体的物理方法包括利用各种射线、高速离心力和温度等进行处理;化学方法是用秋水仙素、水合氯醛、笑气、富民隆等进行处理^[12]。1937年秋水仙素的发现开创了多倍体育种的新时代。除秋水仙素外,除草剂也是一类有效的多倍体诱导化学试剂,如氨磺灵(*Oryzalin*)和氟乐灵(*Trifluralin*)对一些植物离体多倍体的诱导率比秋水仙素高,且对植株的伤害程度比秋水仙素轻微。除草剂诱导多倍体形成的机制和秋水仙素一样,也是干扰纺锤体的形成,但在低浓度下具有比秋水仙素更高的微管蛋白解聚能力。氨磺灵具有与微管蛋白的高亲和力及对细胞器 Ca^{2+} 运输系统的干扰能力,这使得氨磺灵具有更强的微管解聚能力,其对四倍体的诱导频率比秋水仙素高^[23,24]。多倍体的鉴定采用形态观察、气孔观察、流式细胞仪分析和染色体计数相结合的方法^[25]。

兜兰的多倍体育种研究较少。Huy等^[25]用秋水仙素处理长1.5 cm、有2-3片叶子的紫毛兜兰试管苗,在秋水仙素浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 、浸泡法处理6 d时的变异率最高(19.88%),存活率为65.19%。在Huy等^[25]的研究中,秋水仙素的处理方法是先将秋水仙素用最小体积的酒精溶解(秋水仙素浓度为90%),再用无菌水定容到需要的浓度,过滤灭菌。秋水仙素的处理浓度设置为0、2、10、50 $\mu\text{mol/L}$,处理时间设置为0、3、6、9 d。将不同体积的秋水仙素溶液添加到经过高压灭菌的SH液体培养基中,混匀。将诱变材料(1.5 cm长的兜兰试管苗)浸泡到以上含有秋水仙素的SH液体培养基中,并暗处理至相应时间。处理完成后将幼苗用无菌水冲洗干净,然后接种到添加0.5 mg/L NAA、0.5 mg/L BA、30 g/L 蔗糖、9.0 g/L 琼脂和1.0 g/L AC的SH培养基上进行壮苗培养,最后在3个月后进行死亡率统计和多倍体检验。兰花多倍体育种主要在石斛兰属(*Dendrobium*)、蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*)、大花蕙兰(*Cymbidium hybrid*)等的育种工作上应用较多,这可为兜兰育种提供参考。兰花多倍体育种使用的诱变剂主要是秋水仙素,除草剂类诱变剂应用较少;诱导方法主要为浸泡法,其次是混培法;诱变材料主要是原球茎、类原球茎和丛生芽。秋水仙素浓度多设置为0.01%-0.20%;浸泡法处理时间多设置在12-72 h,混培法处理时间多设置在10-40 d;不同的兰

花种类、诱变材料、诱变剂浓度和诱变时间,多倍体的诱变率不同。

3.4 化学诱变育种

化学诱变育种是利用化学诱变剂诱发植物产生遗传变异,以选育新品种的技术。化学诱变的机理是诱变剂的活性基因与遗传物质发生一系列化学反应,从而引起遗传物质的改变。化学诱变具有专一性的特点,由于特定的化学药剂仅对某个碱基或几个碱基有作用,因此化学诱变可改变单一不良性状,且保持其他优良性状不变。化学诱变简单易行,价格低廉。化学诱变具有迟发性,即诱变在当代往往不表现,在后代中才表现出新的性状改变,因此,化学诱变育种一般至少需要两代的培育和选择,才能获得性状稳定的新品种。与辐射诱变相比,化学诱变剂具有特异性,即变异的定位程度比辐射高,诱发的突变性状有明显的专一性,具有与辐射不同的诱变谱。化学诱变剂对生物分子的影响是个别的、局部的,不利作用小。化学诱变在园林植物遗传育种中有广泛的应用,育种家们采用该方法已选育出了许多优良的品种^[12]。甲基磺酸乙酯(EMS)是最常用的强诱变剂。1943年,Oehlkers用EMS诱发月见草(*Denothera biennis*)、百合(*Lilium brownii*)及风铃草(*Companula medium*)产生染色体畸变^[12]。EMS主要与鸟嘌呤作用,在嘌呤环的N-7上接上烷基,造成G-C向A-T的转换或T-A向C-G的颠换。诱变剂对植物生长的抑制作用与剂量成正比,其 M_2 (Mutation)的突变率与 M_1 植株表现的抑制作用成正比,因此可通过诱变剂抑制生长试验确定其适宜剂量^[12,26]。

目前,未见化学诱变在兜兰育种方面的应用,其他兰花种类的化学诱变育种可以为兜兰化学诱变育种的开展提供非常有益的参考。据罗维宇等^[27]报道,化学诱变育种至少已在兰属(*Cymbidium*)、石斛兰属、蝴蝶兰属等6个属13个兰花种中开展,至少已获得叶色改变、矮化、抗病、抗寒等突变体206个。罗维宇等^[27]发现根状茎、原球茎和类原球茎等中间繁殖体是常用的诱变材料,浸泡法是最常用的处理方法,并发现对兰花中间繁殖体进行化学诱变时EMS的常用浓度为0.05%-1.00%, NaN_3 浓度为2.0-8.0 mmol/L。

3.5 辐射诱变育种

辐射诱变育种是利用电离辐射使植物的遗传物质发生突变,并从中选择培育新品种的方法。辐射诱变育种可以提高突变频率(比自然界的突变频率提高

100倍甚至1000倍以上), 扩大突变谱, 诱发产生自然界中尚未出现或者很少的新类型, 为新品种选育提供非常丰富的原始材料。另外辐射后代分离少、稳定快, 可缩短育种年限。辐射诱变育种还能改变品种单一的不良性状, 而保持其他优良性状不变。此外辐射诱变育种还可增强抗逆性, 改良品质。同时辐射诱变育种能克服远缘杂交的不亲和性。辐射诱变育种的缺点是突变方向不确定, 目前很难人为控制; 有益突变还比较低, 有时发生逆突变, 恢复原来的性状等, 所以将辐射诱变育种与其他育种方法结合, 会获得更好的效果^[12,26]。

在辐射诱变育种技术中, 辐射源、辐射材料、剂量和剂量率是影响辐射效果的重要因素。目前兰花育种使用的辐射源有 γ 射线、X射线、快中子、热中子和重离子等, 使用最多的是 γ 射线和重离子, 与 γ 射线辐射相比, 碳重离子辐射的植株突变频率更高, 突变谱更宽^[26]。快中子照射组织电离密度大, 常常产生大的突变, 在同样的剂量条件下, 快中子辐射产生的突变率较高^[26], 目前兰花快中子辐射诱变育种还较少。兰花辐射材料多为原球茎、根状茎等中间繁殖体; 辐射剂量多采用半致死剂量(LD₅₀)。

兜兰的辐射诱变育种相关研究较少。孙音等^[28]研究了⁶⁰Co- γ 辐射对兜兰组培苗的诱变效应, 确定了种子的半致死剂量为6.29 Gy、不定芽的半致死剂量为5.00 Gy、小苗的半致死剂量为20.00 Gy。兜兰种子在萌发阶段和不定根分化阶段需要适宜的低辐射剂量, 不定芽增殖阶段和小苗阶段需要的剂量较高。随着辐射剂量的增大, 种子发芽率、不定芽增殖率、不定根分化率、小苗生长势下降, 变异增多。孙音等^[28]的研究结果表明在合适的辐射剂量下, ⁶⁰Co- γ 辐射诱导的兜兰组培苗变异性状明显, 效果稳定。兜兰辐射诱变育种的开展可以参考其他兰花种类的相关方法。据罗维宇等^[27]报道, 迄今至少已在兰属、蝴蝶兰属、石斛兰属等13个属44种兰花中开展了物理诱变育种研究, 获得了突变体716个, 培育出了小兰屿蝴蝶兰‘飞兰’(Phalaenopsis equestris ‘Feilan’)等兰花新品种12个, 其中叶色的突变出现频率最高, 表明通过辐射诱变选育兰花叶色变异新品种的成功率高。高祥云^[29]用重离子辐射杂交兰‘君豪兰’, 培育出了性状稳定的‘线艺君豪兰’新品种。高祥云^[29]也研究了重离子辐射对杂交兰的诱变效应, 发现重离子辐射完全抑制了杂交兰‘小凤兰’根状茎和杂交兰‘君红兰’类原球茎的分化, 这种抑制作用直到第6代都没

有恢复, 并且发现60 Gy重离子辐射的‘小凤兰’组培苗扩增出两条多态性条带, 多态率是2.0%。周亚倩等^[30]使用不同剂量的⁶⁰Co- γ 射线处理树兰(Epidendrum secundum)蒴果, 确定了树兰种子萌发的最佳剂量为20 Gy。李威^[31]对⁶⁰Co- γ 辐射小兰屿蝴蝶兰(Ph. equestris)的种质创新与机制进行了探索, 并申报了3个新品种。马丽娅^[32]对蝴蝶兰⁶⁰Co- γ 射线辐射植株组织培养及性状遗传进行了研究, 发现低剂量辐射遗传稳定性较好, 高剂量辐射遗传稳定性较差。孙晓莉^[33]对蝴蝶兰⁶⁰Co- γ 射线诱变育种进行了初步研究, 发现试验中4个蝴蝶兰品种的最佳辐射剂量分别是30、15、25和25 Gy。章宁等^[34]使用15 Gy ⁶⁰Co- γ 射线处理了蝴蝶兰的原球茎或幼苗, 获得了一系列诱变的幼苗, 经组织培养和生根移植后, 成活率高达90%。张相锋^[35]对蝴蝶兰原球茎诱导及辐射对原球茎增殖和分化的影响进行了研究, 初步确定了⁶⁰Co- γ 射线对蝴蝶兰原球茎的半致死剂量是50-68 Gy。张银洁等^[36]使用快中子脉冲堆对蝴蝶兰进行了辐射处理, 筛选出了蝴蝶兰原球茎的半致死剂量是 $2.50 \times 10^{11} - 3.50 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$ 。张银洁等^[37]也利用快中子脉冲堆对蝴蝶兰不同品种原球茎和幼苗茎段进行辐射处理, 分析得到了‘火鸟’(Doritaenopsis ‘Taisuco Firebird’)原球茎的半致死剂量为 $3.28 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$, ‘内山姑娘’(D. ‘Neyshan guniang’)原球茎的半致死剂量为 $4.06 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$, ‘火鸟’茎段的半致死剂量为 $2.24 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$, ‘内山姑娘’茎段的半致死剂量为 $2.30 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$ 。

3.6 分子育种

与杂交育种和诱变育种相比, 分子育种具有定向性, 可以有计划地定向改造生物, 创造新品种。由于兜兰愈伤组织难以诱导且类原球茎再生体系不易建立, 兜兰遗传转化体系的建立还在探索中。Luo等^[38]以魔帝兜兰(P. ‘Maudiae’)无菌播种120 d形成的原球茎为受体材料, 对受体材料的处理方式、农杆菌侵染时间、共培养基中乙酰丁香酮的添加浓度以及共培养时间进行条件优化试验, 初步建立了农杆菌介导的魔帝兜兰原球茎遗传转化体系。罗白雪^[39]采用子房注射法将农杆菌直接注射到兜兰的子房中, 成功诱导出了转基因植株, 研究表明注射时间对转化效率影响显著, 一般选择双受精时期的子房, 这是由于双受精后的合子具有再生及转化能力的感受态细胞, 容易接受外源DNA, 转化成功率高。Li等^[40]绘制了同色兜兰×带叶兜兰的高密度遗传连锁图谱, 确定了

4个叶片数量性状的基因位点。其他兰科植物的分子育种技术可以为兜兰提供参考。兰科植物遗传转化的受体材料通常选择类原球茎、原球茎和愈伤组织^[41,42],也可选择根状茎^[43]、子房^[38,44]等作为受体材料。遗传转化体系在蝴蝶兰、文心兰(*Oncidium*)^[45]、石斛兰^[46]和国兰(*Cymbidium*)^[42,43,47]等兰科植物中均有成功的报道。贾思思等^[48]对近年来兰花基因组测序、主要育种目标性状分子遗传基础、基因克隆以及转基因、基因编辑、分子标记辅助选择育种技术等方面的研究进展进行了综述。

4 展望

在育种目标方面,目前兜兰市售品种并不多,而且大都价格昂贵,观赏价值高得多花种类单苗售价多在千元以上,消费人群并不多。兜兰育种应当以走向市场、走进民众生活为目标,丰富市场品种供应,形成合适的市场价格。种质资源是兜兰育种的物质基础,兜兰育种单位都很重视种质资源的收集,加强保育技术、提高兜兰种质资源保育的可持续性至关重要。在育种技术方面,目前兜兰主要采用杂交育种,多倍体育种、化学诱变育种、辐射诱变育种和分子育种的应用还较少。以上技术在其他园林植物以及国兰、蝴蝶兰、石斛兰、文心兰、万代兰(*Vanda*)等兰花的育种工作中已经取得了显著的成绩,兜兰育种家应当拓宽育种技术。在兜兰杂交育种方面,我国大陆地区在亲本的选择上存在随机性,没有形成自己的育种路线和品系。另外对遗传规律的研究较欠缺,在兜兰的多倍体育种、化学诱变育种、物理诱变育种方面,当前应当开展相关的试验和探索,建立高效的诱变技术体系、突变体筛选和鉴定技术体系,并加强相关诱变机理的研究。在分子育种方面,当前主要是建立遗传转化体系。兜兰各项育种技术的基础都是组织培养技术,而兜兰的组织培养难度大,应当加强技术攻关。

参考文献

- [1] 曾宋君,陈砚,吴坤林,等. 国外兜兰属植物的引种和栽培初报[J]. 中国野生植物资源,2013,32(5):62-68.
- [2] 中华人民共和国濒危物种进出口管理办公室,中华人民共和国濒危物种科学委员会. 濒危野生动植物种国际贸易公约附录 I (中文版)[EB/OL]. (2023-02-23) [2023-12-24]. https://www.forestry.gov.cn/html/main/main_5129/20230223143210955269300/file/20230227162229442130474.pdf.
- [3] 国家林业和草原局,农业农村部. 国家重点保护野生植物名录[EB/OL]. (2021-09-07)[2023-12-24]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-09/09/content_5636409.htm.
- [4] 曾宋君,田瑞雪,陈之林,等. 兜兰属植物杂交育种研究进展[J]. 热带亚热带植物学报,2010,18(4):459-468.
- [5] 黄卫昌,胡超,倪子轶,等. 兰花的鉴赏与评审[M]. 北京:中国林业出版社,2018.
- [6] Royal Botanical Gardens Kew. Plant of the world online [EB/OL]. [2023-12-24]. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:327473-2>.
- [7] 中国植物志[DB/OL]. [2023-12-24]. <https://www.iplant.cn/frps>.
- [8] Flora of China [DB/OL]. [2023-12-24]. <https://www.iplant.cn/foc>.
- [9] 刘仲健,陈心启,陈利君,等. 中国兜兰属植物[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [10] ZHOU Z H, SHI R H, ZHANG Y, et al. Orchid conservation in China from 2000 to 2020: achievements and perspectives [J]. Plant Diversity, 2021, 43(5): 343-349.
- [11] 朱俊. 兜兰杂交种谱系分析[D]. 郑州:河南农业大学, 2021.
- [12] 程金水,刘青林. 园林植物遗传育种学[M]. 2版. 北京:中国林业出版社,2010.
- [13] BIRK L A. The *Paphiopedilum* Grower's Manual [M]. 2nd ed. Santa Barbara: Pisang Press, 2004.
- [14] 曾宋君. 兜兰引种繁殖杂交育种和 SSR 引物开发研究[D]. 北京:中国科学院研究生院, 2012.
- [15] 黄小艳,夏池,黄玮婷,等. 中国一级保护野生兰科植物杂交育种进展[J/OL]. 植物遗传资源学报, 2023: 1-20 (2023-10-31) [2023-12-24]. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230809001>.
- [16] 杨佳慧,吴婷,朱俊,等. 长瓣兜兰开花特性与繁育系统研究[J]. 园艺学报, 2021, 48(5): 1002-1012.
- [17] 初美静,宫子惠,孙纪霞,等. 肉饼兜兰传粉生物学及开花进程研究[J]. 种子, 2019, 38(3): 88-92, 96.
- [18] ZENG S J, HUANG W C, WU K L, et al. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(3): 521-534.
- [19] 曾宋君,郭贝怡,孔鑫平,等. 兜兰离体快繁技术研究进展[J]. 热带作物学报, 2020, 41(10): 2080-2089.
- [20] 麦奋. 兜兰属植物[M]. 台北:素馨出版社, 1987.
- [21] 朱根发,杨凤玺,吕复兵,等. 兰花育种及产业化技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2020, 47(11): 218-225.
- [22] 朱根发. 蝴蝶兰种质资源及杂交育种进展[J]. 广东农业科学, 2015, 42(5): 31-38.
- [23] 赵璘,刘文革,郭金丽,等. 除草剂在植物离体染色体加

- 倍上的应用[J]. 长江蔬菜, 2008(1):30-33.
- [24] WAN Y, DUNCAN D R, RAYBURN A L, et al. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1991, 81(2): 205-211.
- [25] HUY N P, TAM D T T, LUAN V Q, et al. *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 252: 283-290.
- [26] 徐冠仁. 植物诱变育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [27] 罗维宇, 宿庆连, 曾瑞珍, 等. 兰花诱变育种研究进展[J]. 热带作物学报, 2023, 44(11): 2135-2148.
- [28] 孙音, 郝军, 房义福, 等. ^{60}Co - γ 辐射对兜兰组培苗的诱变效应[J]. 中国农学通报, 2022, 38(15): 45-52.
- [29] 高祥云. 重离子辐照对杂交兰的组培和诱变效应[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [30] 周亚倩, 姚娜, 魏莉, 等. ^{60}Co - γ 射线对树兰蒴果辐照生物学效应研究[J]. 核农学报, 2017, 31(9): 1693-1699.
- [31] 李威. ^{60}Co - γ 射线辐照育种小兰屿蝴蝶兰的种质创新与机制探索[D]. 上海: 上海师范大学, 2022.
- [32] 马丽娅. 蝴蝶兰 ^{60}Co - γ 射线辐射植株组织培养及性状遗传的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
- [33] 孙晓莉. 蝴蝶兰 ^{60}Co - γ 射线诱变育种初步研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [34] 章宁, 苏明华, 刘福平, 等. 蝴蝶兰 ^{60}Co 射线诱变育种研究(简报)[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(2): 62-63.
- [35] 张相锋. 蝴蝶兰原球茎诱导及辐射对原球茎增殖和分化的影响[D]. 长春: 东北师范大学, 2007.
- [36] 张银洁, 李杰, 郑春. 快中子辐射对蝴蝶兰的诱变效应[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 158-159.
- [37] 张银洁, 李杰, 王芝娜, 等. 快中子辐射对蝴蝶兰原球茎和茎段增殖分化的影响[J]. 核农学报, 2014, 28(3): 440-445.
- [38] LUO B X, ZHANG L, ZHENG F, et al. Ovule development and in planta transformation of *Paphiopedilum Maudiae* by *Agrobacterium*-mediated ovary-injection [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 22(1): 84.
- [39] 罗白雪. 摩帝兜兰胚胎发育及转基因技术研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2016.
- [40] LI D M, ZHU G F. High-density genetic linkage map construction and QTLs identification associated with four leaf-related traits in lady's slipper orchids (*Paphiopedilum concolor* \times *Paphiopedilum hirsutissimum*) [J]. Horticulturae, 2022, 8(9): 842.
- [41] 朱根发, 郭振飞. 重要观赏兰科植物的分子生物学研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 39(4): 471-477.
- [42] 易双双, 陆顺教, 杨光穗, 等. 兰花遗传转化技术研究进展[J]. 北方园艺, 2016(20): 187-194.
- [43] 谢利, 王芬, 曾瑞珍, 等. 农杆菌介导的墨兰遗传转化[J]. 生物工程学报, 2015, 31(4): 542-551.
- [44] DA SILVA J A T, DOBRÁNSZKI J, CARDOSO J C, et al. Methods for genetic transformation in *Dendrobium* [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(3): 483-504.
- [45] 满若君, 卜朝阳, 李杨瑞. 蝴蝶兰·文心兰遗传转化体系的初步研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(8): 3129-3131.
- [46] 陈之林, 段俊, 曾宋君, 等. 原球茎为转化受体的农杆菌介导石斛遗传转化[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2007, 46(1): 86-90.
- [47] DA SILVA J A T. Jasmonic acid, but not salicylic acid, improves PLB formation of hybrid *Cymbidium* [J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2013, 22(2): 187-192.
- [48] 贾思思, 曾瑞珍, 魏倩, 等. 兰花分子育种技术研究进展[J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(1): 1-14.

Advance of Breeding Technology of *Paphiopedilum*

ZHANG Lingling^{1,2}, FANG Lin³, LI Lin³, WU Kunlin³, ZENG Jingjue³, ZHANG Jiarui^{1,2},
KANG Ming³, ZENG Songjun^{3**}

(1. Garden Center, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong, 510650, China)

Abstract: *Paphiopedilum* characterized by its distinctive ornamental value, holds substantial market potential within the realm of premium horticultural commodities. The cultivation of superior varieties with proprietary intellectual property rights is regarded as the cornerstone for the sustainable development of the *Paphiopedilum* industry. While China boasts a wealth of germplasm resources pertaining to *Paphiopedilum*, the development of the orchid industry in mainland China is still in its early stages. Primarily due to habitat degradation and excessive harvesting, *Paphiopedilum* species have earned the dubious distinction of being among the most endangered plant taxa worldwide. The systematic development and promotion of marketable superior varieties not only promise favorable economic returns but also facilitate a reduction in demand for wild species, indirectly contributing to the effective conservation and sustainable utilization of *Paphiopedilum*. This review comprehensively surveys the breeding objectives of *Paphiopedilum*, germplasm resources, and key breeding techniques, encompassing introduction and domestication, hybridization breeding, polyploidy breeding, chemical mutagenesis, physical mutagenesis, and molecular breeding technologies. Furthermore, a nuanced analysis of the strengths and weaknesses associated with these methodologies is provided, thereby establishing a foundational framework for the efficient breeding of *Paphiopedilum*.

Key words: *Paphiopedilum*; introduction and domestication; hybridization; ploidy breeding; mutation breeding

责任编辑:陆 雁,陈少凡



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>