

石斛属分子生物学研究进展

黄昕蕾, 王雁*

(中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要: 石斛兰是重要的新花卉作物资源, 具有极高的经济价值。对近年来石斛属分子生物学研究进行了综述, 包括现代分子生物学手段在石斛属分类研究的开发与利用, 花色、花发育、抗逆等关键基因研究, 遗传转化体系建立及转基因技术研究等。就今后石斛属植物主要研究方向进行了展望, 以期今后石斛属植物分子生物学研究理清思路。

关键词: 石斛属; 分子标记; 转基因

中图分类号: S718

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)03-0151-07

Advances in *Dendrobium* Molecular Biology

HUANG Xin-lei, WANG Yan

(Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: *Dendrobium* is one of the most important new floral resources with highly economic value. The advances in *Dendrobium* molecular biology were reviewed, including the development and application of modern molecular tools in the taxonomy; the cloning and characterization of key genes involved in the critical biological processes of *Dendrobium*, such as floral color, floral development and stress-tolerance; the establishment of genetic transformation systems and the research of transgenic technology. The main research directions of *Dendrobium* plants in China were analyzed, to offer the reference for further research.

Keywords: *Dendrobium*; DNA molecular marker; genetic transformation

石斛属 (*Dendrobium* Swartz) 为兰科 (Orchidaceae) 三大属之一, 其原种将近 2 000 种, 主要分布于亚洲热带、亚热带地区和太平洋岛屿。作为我国中药材的石斛兰, 是许多中成药的重要成分, 而作为观赏植物的石斛兰美丽又芳香, 是我国和世界著名花卉^[1-2]。

国内外在石斛兰栽培育种^[1-3]、组织培养^[1,4]、花芽分化^[5]、光合特性^[6-7]、菌根发育^[8-10]等方面取得了许多富有成效的研究结果。随着现代分子生物学技术的发展, 石斛属分子鉴定、相关功能基因分析及转基因等研究也取得了较大进展^[11-13]。本文就近年来石斛属植物分子生物学主要研究进展进行

综述, 为进一步开展该属植物抗逆机理、重要观赏性状的形成与代谢发育研究提供参考。

1 分子生物学辅助石斛属分类鉴定

石斛属植物常用的传统分类鉴定方法为性状鉴别, 由于石斛属植物种属间形态学和组织学特征差异很小, 给鉴别评价带来极大难度。显微技术的发展将性状鉴别与组织结构显微鉴别相结合, 推动了石斛属鉴别的发展。随着现代分析技术的发展, 以成分分析为主的指纹图谱鉴别法, 弥补了性状鉴别法的缺陷, 但容易受诸多因素的干扰^[14-15]。石斛属植物分类鉴定随着分子生物学的发展提升到分子水

收稿日期: 2016-11-08

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAD01B0703)

作者简介: 黄昕蕾(1985—), 女, 博士, 主要研究方向为花卉遗传改良。E-mail: 360449284@qq.com.

* 通讯作者: 王雁(1969—), 女, 博士, 研究员。E-mail: chwy8915@sina.com.

平,近 20 年来,DNA 分子标记在石斛属分类鉴定方面得到广泛应用。与其它分类鉴定方法相比,DNA 分子标记遗传稳定性好,多态性高,检测准确迅速,直接反映不同种属间 DNA 的差异性,能够快速准确地鉴定外形相近的石斛属植物。目前,用于石斛属植物种质资源鉴定的 DNA 分子标记技术主要有:以 southern 杂交为核心的 DNA 分子标记技术,如限制性片段长度多态性(RFLP)等;基于聚合酶链式反应(PCR)的分子标记技术,如随机扩增多态性 DNA(RAPD)、简单重复间隔序列(ISSR)、扩增片段长度多态性(AFLP)等;DNA 序列标记,如叶绿体基因组核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶大亚基(*rbcL*),叶绿体赖氨酸 tRNA 基因(*trnK* gene)和叶绿体赖氨酸基因的内含子序列(*matK*),以及核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA ITS)^[15-16]。

以 southern 杂交为核心的 RFLP 开发应用最早,分类鉴定结果可靠且稳定,但检测周期长,多态性差、操作复杂,且具有种属特异性^[15-16]。在石斛属分类鉴定中,常将 RFLP 与 PCR 技术相结合,避免了单纯使用 RFLP 操作繁琐等缺点,同时弥补了序列测定和位点特异性鉴别差的不足。张婷等^[17]利用 RFLP 结合 PCR 技术,成功鉴定了束花石斛(*Den. chrysanthum* Lindl.)、流苏石斛(*Den. fimbriatum* Hook.)及其形态相似种。

基于 PCR 技术的 RAPD、ISSR 和 AFLP 在石斛属植物研究中应用较多。RAPD 标记分析简单,引物多态性好,可快速区分种间的亲缘关系及遗传多样性。张铭等^[18]、丁鸽等^[19]、顾慧芬等^[20]通过 RAPD 获得铁皮石斛(*Den. officinale* Kimura et Migo)的特异性标记,可以快速分离鉴定铁皮石斛及其相似种。AFLP 兼具 RAPD 的方便性和 RFLP 的可靠性,对石斛属区分能力强大^[9],王慧中等^[21]、虞泓等^[22]、包英华等^[23]采用 AFLP 技术对外形很难区分的石斛属植物成功进行分类鉴别。在 SSR 基础上开发的 ISSR 标记重复性高、稳定性好、引物设计简单,适用于种间关系分析,沈颖等^[24]、武荣花等^[25]利用 ISSR 标记获得几种相近石斛的 ISSR 分子标记特征性条带。

核糖体 ITS/ITS2 序列种内保守,种间差异显著,广泛应用于鉴定石斛属的种内、种间变异和近缘属间变异。金建峰等^[26]、顾慧芬等^[27]、丁小余等^[28]、张蕾等^[29]、郑国浩等^[30]分别基于 rDNA ITS 序列成功鉴定多种石斛近缘种及相似种,Lau 等^[31]应用 ITS2 序列成功区分了石斛属相似种,丁小余

等^[32]、叶子等^[33]和 Takamiya 等^[34]应用 rDNA ITS/ITS2 成功鉴别性状难以区分的多种石斛药材干品。

用于石斛属植物鉴定研究的叶绿体基因组主要有 *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH*。石斛属中的 *rbcL* 进化较慢,变异性低,不适合用于种间水平鉴定。滕艳芬等^[35]、刘静等^[36]用 *matK* 基因成功鉴定区分了石斛与非石斛属混淆品,但 *matK* 基因进化速率略低,物种鉴定效率并不高。石斛属叶绿体 *psbA-trnH* 基因通用性高,广泛用于石斛属药用植物及其混淆品的鉴别。Yao 等^[37]、彭小凤等^[38]利用 *psbA-trnH* 序列成功区分了石斛属易混淆品种。

2 功能基因研究进展

2.1 参与花色形成的基因

石斛属具有白色、黄色、绿色、粉红色、粉紫色、紫红色、红棕色和棕色等诸多花色^[2]。类胡萝卜素和叶绿素是使石斛属呈现黄色和绿色的重要色素,新黄质、紫黄质、花药黄质、叶黄素、玉米黄质、 β -胡萝卜素、叶绿素 a 和叶绿素 b 是黄色花石斛兰的主要色素,类胡萝卜素和花青苷的共同作用使唇瓣呈现橙色和红色斑^[12,39]。Saito 等^[40]发现一种酰化矢车菊素糖苷是紫红色石斛兰的主要色素。Kuehnie 等^[41]分析了 28 个石斛兰切花品种,发现红色、橙色、棕色等花瓣中 3-羟基矢车菊素糖苷是主要色素,天竺葵糖苷和飞燕草糖苷比较少见。Mudalige 等^[42]从开桃红色花的石斛变种中发现 98% 的天竺葵素和 2% 的矢车菊素,花瓣中的黄酮成分主要是山奈酚衍生物而非槲皮素衍生物,推测该变种 *F3'H* 基因突变,从而 *DFR* 基因高表达使 DHK 转变为天竺葵素。

Mudalige 等^[42]从 2 种石斛杂交种中分离的 *CHS4* 具有高保守性,在未着色花蕾中高表达,随着着色过程表达量降低。孟衡玲等^[43]从铁皮石斛中分离得到 *CHS* 基因,发现其不仅参与类黄酮合成,还参与早期的器官形态建成和激素运输。Pitakdantham 等^[44]从 4 种石斛中分离到的 *DFR* 基因的氨基酸序列,它们具有 99% 的相似度,都在花蕾着色期表达,而在半开期时表达量达到最高。Piluk 等^[45]将石斛兰‘Sonia Earsakul’花开放分为 7 个时期,*DFR* 基因在盛开期不表达,在花蕾着色期表达量高。Rasika 等^[46]从石斛兰‘Earsakul’中克隆了 *CHS* 和 *DFR* 基因,发现 *DFR* 在花蕾中高表达,而 *CHS* 在幼嫩的花芽中高表达。Whang 等^[47]从细茎石斛中分离到 *DFR*、*CHS*、和 *F3'5'H* 基因,发现 *F3'5'H* 在蕊

柱中的表达量比花瓣中的高,利用离子轰击法短暂表达 *F3'5'H*,花被片由白色变为红紫色,推测 *F3'5'H* 是使细茎石斛花被显色的关键基因。Sahagun 等^[48]发现,*F3'H* 在石斛兰‘Sonia Earsakul’花开放过程中表达量逐渐上升,在完全开放后略有下降,通过基因沉默可阻断其内源色素形成。Krianghan 等^[49]从4种石斛杂交种中分离到 *CHS*、*CHI1*、*CHI2*、*F3'H*、*DFR*、*ANS*、*F3'5'H* 和 *FLS* 基因,推测石斛兰花瓣呈白色是因 *F3'H*、*DFR* 和 *ANS* 低表达而 *FLS* 高表达,石斛突变体的花色深浅与花青素合成相关基因的上调和下调表达有关。Wu 等^[50]从石斛兰‘Woo Leng’中克隆得到21个 MYB 转录因子,发现 *DwMYB4* 表达局限于石斛花中,*DwMYB9* 幼蕾期低表达而成熟期高表达。Lau 等^[51]认为,*DwMYB1* 与唇瓣表皮的锥细胞发育有关。Li 等^[52]从石斛兰杂交种中克隆得到 *DhMYB2* 和 *DhBHLH1*,发现这2个转录因子参与石斛兰花瓣花青素的生物合成,其中,*DhBHLH1* 与唇瓣花青素的合成密切相关,通过粒子轰击短暂表达 *DhMYB2* 或 *DhBHLH1*,会在白色花瓣上生成紫色斑点。有关石斛属类胡萝卜素合成相关基因的研究还未见报道。

2.2 参与开花过程的基因

MADS-box 基因调控兰花花器官形态发育是近年来花发育生物学的研究热点。2016年公布的铁皮石斛全基因组中,Zhang 等^[53]发现63个功能 *MADS-box* 基因和12个假基因参与兰花花器官形态发育,与小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb. f.) 一样,*FLC*、*AGL12* 和 *AGL15* 的同源基因也在铁皮石斛中缺失。铁皮石斛中发现28个 I 型 *MADS-box* 基因和35个 II 型 *MADS-box* 基因,数目明显少于大多数被子植物,其中,I 型 *MADS-box* 少于 II 型 *MADS-box* 可能和兰科种子形成过程中无法形成胚乳有关^[53-54]。

在多数被子植物花发育过程中,经典 ABCDE 模型用于描述被子植物萼片、花瓣、雄蕊与心皮的分化,但兰花花器官高度特化^[55],花形态发育模式有所不同,因此,Mondragón-Palomino 等^[56-57]提出‘兰花代码’用以解释兰花的花发育过程,并指出,A 类基因 (*API/SQUA*-like, *AP2*-like) 和 E 类基因 (*SEP*-like) 在各个花器官中都有表达,而 C 类基因和 D 类基因 (*AG*-like, *STK*-like) 仅在蕊柱和子房中表达^[56]。兰花 B 类基因可能负责形成花瓣状萼片、花瓣和唇瓣,包括 *AP3/DEF* 类和 *PI/GLO* 类,*AP3/DEF* 基因在萼片、花瓣和唇瓣发育中起关键作用,而 *PI/GLO*

类基因与其它双子叶植物 B 类基因功能相似。*AP3/DEF* 类基因又被分为4个分支,Clade1 (*PeMADS2*-like) 和 Clade2 (*OMADS3*-like) 形成萼片花瓣唇瓣,Clade3 (*PeMADS3*-like) 形成花瓣唇瓣,而 Clade4 (*PeMADS4*-like) 在花发育过程中相对晚的时期决定唇瓣形成。

目前已经从石斛中分离到6个 A 类、12个 B 类、3个 C 类、3个 D 类、5个 E 类基因^[55,58-60]。进一步对这些石斛兰花器官 *MADS-box* 特征基因进行分析,发现金钗石斛 (*Den. nobile* Lindl.) 中分离得到的 *MADS-box* 基因 *DnAGL19* 和 *DnSEP3*-like 除调控花器官形态发育外,还参与到冬春两季的低温春化调控过程^[58-59]。Yu 等^[61-62]从石斛兰‘Madame Thong-In’中分离到2个 E 类基因 *DOMADS1*、*DOMADS3*,在花发育中的各个花器官中均有表达;Skipper 等^[63-64]从球花石斛 (*Den. thyrsiflorum* Rchb. f.) 中分离出3个 A 类基因 *DthyrFL1*、*DthyrFL2* 和 *DthyrFL3*、1个 C 类基因 *DthyrAG1* 和1个 D 类基因 *DthyrAG2*,其中,*DthyrFL1-3* 三个基因在花发育过程中起着重要作用,*DthyrAG1* 只表达在子房及胎座发育的初期,而 *DthyrAG2* 在整个子房发育中都有表达。Xu 等^[65]从木石斛 (*Den. crumenatum* Sw.) 中分离到6个基因,其中,A 类基因 *DcOAP2* 在叶片及各个花器官中都有表达,3个 B 类基因中,*DcOAP3A* 在叶片及所有花器官中均有表达,*DcOAP3B* 在唇瓣、花瓣、花粉囊和蕊柱中表达,*DcOPI* 在各个花器官中均有表达,D 类基因 *DcOAG2* 在花粉囊和蕊柱中表达,E 类基因 *DcOSEPI* 在所有花器官中都有表达。石斛兰‘Spring Jewel’中得到的 Clade3 *DenAP3-3* 在唇瓣表达^[66],细茎石斛的 Clade4 类 *DMMADS4* 在唇瓣花瓣和蕊柱表达^[67],石斛兰‘Chao Praya smile’中的 *DOAPI* 在不同开花阶段的花器官中都有高表达^[60],这些都基本符合‘兰花代码’;但木石斛中的 C 类基因,*DcOAG1* 却在所有花器官中表达^[65],石斛‘Madama Thong-In’中的 *AP3/DEF* 类基因 *DOMADS2* 在唇瓣和子房中表达而在外轮萼片中不表达^[61]。这些基因的精确表达模式和功能还需要进一步研究。

对这些石斛兰花器官中的 *MADS-box* 基因进行功能鉴定,发现大多数兰花的 *MADS-box* 类基因在拟南芥或拟南芥突变型中可以异位表达^[55]。拟南芥中过表达‘Chao Praya smile’中的 *DOAPI* 基因可以提前开花^[60]。拟南芥中异位表达木石斛 *DcOPI* 和细茎石斛 *DMPI* 导致外萼片变为花瓣状器官,可能

是 *PI/GLO* 类基因保守性比较好,但是过表达木石斛 *DcOAP3A* 和细茎石斛 *DMAP3B*,并未形成表型变异,可能是因为在兰科中 *AP3/DEF* 类基因是古 *AP3* 类型,序列与拟南芥 *AP3* 差别很大^[65,68]。拟南芥中过表达细茎石斛 *DMMADS4*,F1 代外轮萼片转化为花瓣状器官,可能是 *DMMADS4* 和 *DMPI* 相互作用形成异质二聚体从而调节花瓣发育^[55,69]。

2.3 参与抗逆胁迫的基因

石斛属多生长于温暖湿润气候,低温是影响石斛生长、分布与品质的重要因素^[1],有关植物抗寒相关的功能基因和调控基因取得较快进展,为石斛属抗寒基因的研究提供了参考。

抗寒功能基因是与植物抗寒性直接相关的基因,如热休克蛋白(Hsp)基因家族参与植物抗逆反应,提高植物的低温耐性。铁皮石斛全基因组中发现 20 个 Hsp70 成员,远比小兰屿蝴蝶兰(9 个)的多,这可能是铁皮石斛更具有广泛生态适应性的原因^[53]。李东宾等^[70]从铁皮石斛中克隆出 *Hsp70*,qRT-PCR 分析证实,*Hsp70* 可在 4℃ 冷胁迫下被诱导。李东宾等^[71]利用 SCot-PCR 差异表达分析筛选出冷胁迫下 11 条与铁皮石斛抗寒性相关的基因片段。Wu 等^[72]利用代谢组学和转录组学分析铁皮石斛的冷驯化幼苗,发现了一些石斛幼苗冷驯化时的标记基因。

抗寒调控基因主要通过控制抗寒基因的表达,寒冷信号传导等过程来提高植物的耐寒性。如 *WRKY* 转录因子是植物特有的调控逆境反应的转录因子家族,参与植物应对各种生物胁迫如低温、高温、干旱、盐胁迫等和非生物胁迫如病毒、细菌等的响应过程^[73]。He 等^[74]在铁皮石斛根茎基因组中确认 63 个 *DoWRKY* 基因,它们的表达受低温调控,在铁皮石斛冷应激反应中发生作用。潘园园等^[75]将从金钗石斛中分离得到的 *WRKY* 基因导入烟草,表明 *DnWRKYII* 转录因子在调节氧化胁迫方面起到一定的积极作用。蒋园等^[76]克隆得到铁皮石斛 *DnWRKY5* 基因,qRT-PCR 分析表明,*DnWRKY5* 基因在铁皮石斛应答低温胁迫中可能起重要的调控作用。张子凤等^[77]克隆 *DnWRKY6* 基因,发现它对铁皮石斛生长发育过程中不同组织的调控作用差异明显。

植物抗病基因(*R* 基因)可有效提高植物病害防御能力,铁皮石斛全基因组中发现 157 个植物抗病基因(*R* 基因),数目明显比小兰屿蝴蝶兰(79 个)的多,这可能是铁皮石斛拥有更好抗病性的原因^[53-54]。

2.4 其它

除上述相关功能基因研究以外,参与菌根互动、多糖合成^[78]、生物碱合成^[79]、信号转导等诸多代谢通路的基因也被发掘克隆。铁皮石斛和小兰屿蝴蝶兰全基因组测序项目的完成,得到大量蛋白编码基因,获得大量参与萜类合成、抗病基因、热休克蛋白、多糖合成、CAM 代谢、花形态建成等相关功能基因,极大推动了石斛属植物的基础科研。

3 转基因研究

石斛兰转基因研究起步较晚,目前报道的遗传转化体系多采用农杆菌介导法、基因枪法和农杆菌子房注射法,遗传转化体系建立的相关条件,如转化方法选择、转基因条件优化、标记基因选择等是目前研究重点。

农杆菌介导转化方法目前已经广泛应用于双子叶植物和一些单子叶植物,如水稻、小麦、玉米等。Nan 等^[80]提出,农杆菌介导法可用于转化石斛兰。Yu 等^[81]首次将经薄层切片处理的类原球茎与农杆菌共培养之后用卡那霉素进行筛选,发现原球茎易诱导,转化后也易分化成苗,但易产生嵌合体。Zheng 等^[82]利用超声波辅助农杆菌介导法将 *CHS* 基因成功转入石斛‘Sanya’中。Sawetalake 等^[60]以愈伤组织为材料,利用农杆菌介导法将 *DoAPI* 基因成功转入石斛兰‘Chao Praya smile’。Men 等^[83]建立了稳定的农杆菌介导转化原球茎的方法。杨翠芹等^[84]、闻真珍等^[85]优化了金钗石斛的转化体系,以其类原球茎为材料,研究了影响农杆菌介导转化的因素。张妙彬等^[86]、冯莹等^[87]、张振华等^[88]利用农杆菌介导转化石斛兰类原球茎,讨论了不同侵染条件等对石斛兰转化的影响。Ling 等^[89]建立了稳定的农杆菌介导转化铁皮石斛原球茎的方法,并讨论了几个启动子对铁皮石斛转化效率的影响。

以石斛兰原球茎为材料进行的瞬时表达,应用较多的是基因枪转化法,成功率也略高于农杆菌介导转化法。Chang 等^[90]将兰花花叶病毒外壳蛋白(CP)基因用微粒轰击法转入石斛原球茎,经过潮霉素筛选后得到抗兰花花叶病毒的转化植株。杨雪飞等^[91]用基因枪轰击类原球茎法将来源于大麦的抗旱耐盐碱基因 *lea3* 导入铁皮石斛。而以花器官材料进行的瞬时表达,应用较少,Li 等^[52]通过粒子轰击短暂表达 *DhMYB2* 或 *DhBHLH1*,发现这 2 个转录因子参与石斛兰花瓣花青素的生物合成,Whang 等^[47]利用离子轰击法短暂表达 *F3'5'H*,发现其是细茎石

斛花被显色的关键基因。Pinthong 等^[92]通过农杆菌渗入法将与花色相关的特异性基因在石斛‘Sonia’的萼片和花瓣中快速表达。

农杆菌子房注射法结合了花粉管通道法和农杆菌转化的优点,操作简单,为兰科植物育种提供一种简单高效的方法。刘其府等^[93]对人工自花授粉 45 d 的金钗石斛进行子房注射,发现成熟果实注射部位的种子 GUS 染色率最高。无菌播种之后,经潮霉素筛选,获得转基因植株。

4 展望

随着石斛属基因组学的不断发展,分子标记理论的愈发成熟,DNA 分子标记技术越来越多的应用于石斛属种群的分类和亲缘关系鉴定,为石斛属资源鉴定和物种保护提供参考;但 DNA 分子标记技术在实际生产应用中还有一定的局限性,要求一定的设备和技术,同时一些分子生物学标记的稳定性和重复性还需提高。随着测序成本的降低和生物信息学的发展,通过基因组序列分析寻找 DNA 候选序列,可以获得更合适的引物,更佳的多态性图谱,从而为石斛属分类鉴定提供更方便快捷的途径。

常规杂交育种一直用于改进石斛属的花色、花型、花期、抗病性等诸多品质,但石斛属的遗传背景研究相对落后,很多种具有自交不亲和特性,难以满足人们对兰花新品种的要求^[2]。随着花色、花发育、花香、抗逆性等相关功能基因的深入研究,利用分子模块设计育种,通过遗传转化,导入花色、花香、花期、株型等目的基因,培育出花大色艳、芳香、花期长且矮化的石斛兰新品种是石斛属育种的重要趋势。我国是石斛兰属许多支系分布的北部边缘地区,具有大量潜在的新性状和新基因,特别是一些抗逆性状,为石斛兰产业提供了丰富的人工育种种质资源^[2]。

石斛属功能基因的研究相对较少,多为克隆和表达模式分析,基因组和转录组研究也起步较晚。随着小兰屿蝴蝶兰全基因组以及铁皮石斛全基因组工作的完成,阐明了石斛属植物诸多重要基因调控机制,如石斛多糖基因调控、兰花花器官建成、抗性相关调控以及广泛的生态适应性调控机制等。在此基础上,进一步明确各机制的重要调控基因,建立候选基因稳定高效的功能验证体系,是未来石斛属研究的重点方向。全基因组及一系列转录组工作的完成,极大的推动了石斛属的基础科研,给石斛属植物的产业化发展带来新的机遇。

参考文献:

- [1] 王 雁,李振坚,彭红明,等. 石斛兰——资源·生产·应用[M]. 北京:中国林业出版社,2007.
- [2] 王 雁,周进昌,郑宝强,等. 石斛兰[M]. 北京:中国林业出版社,2014.
- [3] 邓茜玫,郑宝强,郭 欣,等. 聚石斛花粉生活力及贮藏的研究[J]. 林业科学研究,2014,27(5):657-661.
- [4] 孙永玉,咎少军,徐永艳,等. 齿瓣石斛栽培基质筛选及其栽培方式研究[J]. 林业科学研究,2007,20(4):506-509.
- [5] 郑宝强,邓茜玫,李 奎,等. 不同温度处理对石斛兰花芽分化和发育的影响[J]. 林业科学研究,2017,30(3):460-464.
- [6] 刘高慧,李 昆,孙永玉,等. 齿瓣石斛光合特性研究[J]. 林业科学研究,2014,27(2):265-269.
- [7] 王 雁,孙 晔,李振坚,等. 3 种石斛在不同基质中的光合特性研究[J]. 林业科学研究,2008,21(6):778-782.
- [8] 陈连庆,王小明,裴致达. 石斛菌根化组培苗对 P 素吸收利用的研究[J]. 林业科学研究,2005,18(2):163-168.
- [9] 陈连庆,裴致达,韩宁林,等. 石斛菌根真菌液培生长特性的研究[J]. 林业科学研究,2002,15(2):207-211.
- [10] 陈连庆,裴致达,韩宁林,等. 三种石斛菌根形态结构及元素构成的研究[J]. 林业科学研究,2002,15(1):88-95.
- [11] 邹成勇,刘 燕. 我国石斛属植物研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,12(38):6164-6166.
- [12] 李崇晖,仇 键,杨光穗,等. 兰花花色化学及相关功能基因研究进展[J]. 热带农业科学,2013,33(7):45-53.
- [13] 李 清,李 标,郭顺星. 兰科石斛属植物分子生物学研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(15):2753-2761.
- [14] 杨善岩,王升贵,李海龙,等. 石斛的分类鉴别研究现状[J]. 安徽农业科学,2013,41(4):1495-1497,1500.
- [15] 张文龙,曾桂萍. 分子标记技术及其在中药石斛研究中的应用进展[J]. 基因组学与应用生物学,2014,33(2):452-457.
- [16] 刘 枫,赵 群,戴 军,等. DNA 分子标记技术在石斛属鉴别中的应用进展[J]. 皖西学院学报,2017(2):9-13.
- [17] 张 婷,徐路珊,王峥涛,等. 药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似种的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 药学学报,2005,40(8):728-733.
- [18] 张 铭,黄华荣,廖苏梅,等. 石斛属 RAPD 分析及鉴定铁皮石斛的特异性引物设计[J]. 中国中药杂志,2001,26(7):442-447.
- [19] 丁 鸽,丁小余,沈 洁,等. 铁皮石斛野生居群遗传多样性的 RAPD 分析与鉴别[J]. 药学学报,2005,40(11):1028-1032.
- [20] 顾慧芬,庄意丽,梅其春. 铁皮石斛试管苗的 RAPD 分析及其特异性鉴定引物设计[J]. 复旦学报:自然科学版,2007,46(3):401-405.
- [21] 王慧中,卢江杰,施农农,等. 13 种石斛属植物遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 分子细胞生物学报,2007,40(3):205-210.
- [22] 虞 泓,和 锐,倪念春,等. 石斛属 4 种植物的 AFLP 分析[J]. 中草药,2004,35(7):808-810.
- [23] 包英华,潘超美,白 音. 3 种药用石斛鉴别特征的综合分析[J]. 华南师范大学学报,2014,46(3):112-117.
- [24] 沈 颖,徐 程,万小凤,等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应

- 用[J]. 中草药,2005,36(3):423-427.
- [25] 武荣花,王雁,彭镇华,等. 我国石斛属部分植物的 ISSR 标记分析[C]. 中国园艺学会观赏园艺专业委员会,2007:83-87.
- [26] 金建峰,朱思眉,蒋明,等. 石斛属植物 rDNA ITS 序列的克隆与分析[J]. 浙江农业学报,2014,26(3):685-692.
- [27] 顾慧芬,庄意丽,马子建,等. 基于 ITS 序列分析铁皮石斛与近缘类群的亲缘关系[J]. 中成药,2010,32(4):628-632.
- [28] 丁小余,徐璐珊,王峥涛,等. 束花石斛及其相似种的 DNA 分子鉴别[J]. 中国中药杂志,2002,27(6):407-411.
- [29] 张蕾,邱道寿,蔡时可,等. 铁皮石斛及其混伪品的 rDNA ITS 序列分析与鉴别[J]. 安徽农业科学,2013,41(7):2872-2874,2888.
- [30] 郑司浩,黄林芳,陈士林. 鼓槌石斛特异性 PCR 分子鉴定[J]. 中草药,2013,44(6):744-748.
- [31] Lau D T W, Shaw P C, Wang J, et al. Authentication of medical *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA[J]. *Planta Medica*,2001,67(5):456-46.
- [32] 丁小余,王峥涛,徐红,等. 枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别[J]. 药学学报,2002,37(7):567-573.
- [33] 叶子,卢叶,王峥涛,等. 基于 ITS 序列鉴别石斛类药材[J]. 中国中药杂志,2014,39(20):3928-3935.
- [34] Takamiya T, Wongsawad P, Tajima N, et al. Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*,2011,34(5):779-782.
- [35] 滕艳芬,吴晓俊,徐红,等. 石斛及其常见混淆品的 *matK* 基因序列比较[J]. 中国药科大学学报,2002,33(4):280-283.
- [36] 刘静,何涛,淳泽,等. 药用石斛的叶绿体 *matK* 基因序列分析及鉴别[J]. 药学学报,2009,44(9):1051-1055.
- [37] Yao H, Song J Y, Ma X Y, et al. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence; the chloroplast-*trnH* intergenic region[J]. *Planta Medica*,2009,75(6):667-669.
- [38] 彭小凤,何涛,淳泽,等. 基于叶绿体 *psbA-trnH* 和核糖体 5S rRNA 基因间隔区序列的石斛种间和种内鉴别[J]. 应用与环境生物学报,2015,21(5):887-896.
- [39] Kanchit T. Flower pigments in yellow *Dendrobium* species and hybrids[D]. Honolulu: University of Hawaii,1984.
- [40] Saito N, Toki K, Uesato K, et al. An acylated cyanidin glycoside from the red-purple flowers of *Dendrobium*[J]. *Phytochemistry*,1994,37(1):245-248.
- [41] Kuehnle A R, Lewis D H, Markham K R, et al. Floral flavonoids and pH in *Dendrobium* orchid species and hybrids[J]. *Euphytica*,1997,95(2):187-194.
- [42] Mudalige-Jayawickrama R G, Champagne M M, Hieber A D, et al. Cloning and characterization of two anthocyanin biosynthetic genes from *Dendrobium* orchid[J]. *American Society for Horticultural Science*,2005,130(4):611-618.
- [43] 孟衡玲,张薇,卢丙越,等. 铁皮石斛查尔酮合酶基因克隆与表达分析[J]. 南方农业学报,2016,47(12):2015-2019.
- [44] Pitakdantham W, Sutabutra T, Chiemsombat P, et al. Isolation and characterization of dihydroflavonol 4-reductase gene in *Dendrobium* flowers[J]. *Journal of Plant Sciences*,2011,6(2):88-94.
- [45] Piluk P, Ratanasut K. Expression profiles of the dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) gene in the sepals and petals of *Dendrobium* *Sonia Earsakul*[C]. 1st Mae Fah Luang University International Conference,2012:1-8.
- [46] Rasika G, Mudalige-Jayawickrama R G, Champagne M M, et al. Cloning and characterization of two anthocyanin biosynthetic genes from *Dendrobium* orchid[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*,2005,130(4):611-618.
- [47] Whang S S, Um W S, Song I J, et al. Molecular analysis of anthocyanin biosynthetic genes and control of flower coloration by flavonoid 3'5'-hydroxylase (*F3'5'H*) in *Dendrobium moniliforme*[J]. *Journal of Plant Biology*,2011,54(3):209-218.
- [48] Sahagun J, Ratanasut K. Development of flavanone-3-hydroxylase (*F3'H*) gene silencing system in *Dendrobium* *Sonia Earsakul* flowers for engineering aurone biosynthetic pathway[C]. *International Biochemistry & Molecular Biology Conference*,2016:266-269.
- [49] Kriangphan N, Vuttipongchaikij S, Kittiwongwattana C, et al. Effects of sequence and expression of eight anthocyanin biosynthesis genes on floral coloration in four *Dendrobium* hybrids[J]. *The Japanese Society for Horticultural Science*,2015,84(1):83-92.
- [50] Wu X M, Lim S H, Yang W C. Characterization, expression and phylogenetic study of *R2R3-MYB* genes in orchid[J]. *Plant Molecular Biology*,2003,51(6):959-972.
- [51] Lau S E, Schwarzacher T, Othman R Y. dsRNA silencing of an *R2R3-MYB* transcription factor affects flower cell shape in a *Dendrobium* hybrid[J]. *BMC Plant Biology*,2015,15(1):194.
- [52] Li C H, Qiu J, Ding L, et al. Anthocyanin biosynthesis regulation of *DhMYB2* and *DhbHLLH1* in *Dendrobium* hybrids petals[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*,2017,112:335-345.
- [53] Zhang G Q, Xu Q, Bian C, et al. The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution[J]. *Scientific Reports*,2016,6:19029.
- [54] Cai J, Liu X, Vanneste K, et al. The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*[J]. *Nature Genetics*,2015,47(1):65-72.
- [55] Silva J A T D, Aceto S, Liu W, et al. Genetic control of flower development, color and senescence of *Dendrobium* orchids[J]. *Scientia Horticulturae*,2014,175(1):74-86.
- [56] Mondragón-Palomino M, Theissen G. MADS about the evolution of orchid flowers[J]. *Trends in Plant Science*,2008,13(2):51-59.
- [57] Mondragón-Palomino M, Theissen G. Conserved differential expression of paralogous *DEFICIENS*- and *GLOBOSA*-like *MADS-box* genes in the flowers of Orchidaceae: refining the 'orchid code'[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*,2011,66(6):1008-1019.
- [58] 陈敏燕,郭无瑕,刘小如,等. 金钗石斛 *SEP3*-like 基因的克隆及其在春化过程中的表达分析[J]. 园艺学报,2016,38(8):1579-1588.
- [59] Liu X R, Pan T, Liang W Q, et al. Overexpression of an Orchid (*Dendrobium nobile*) *SOCI/TM3*-like Ortholog, *DnAGL19*, in *Ara-bidopsis* Regulates *HOS1-FT* Expression[J]. *Frontiers in Plant Sci-*

- ence,2016,7:1-12.
- [60] Sawetlatake N, Bunnag S, Wang Y, *et al.* *DOAPI* promotes flowering in the orchid *Dendrobium* 'Chao Praya Smile' [J]. *Frontiers in Plant Science*,2017,8:400.
- [61] Yu H, Goh C J. Identification and characterization of three orchid *MADS-box* genes of the *API/AGL9* subfamily during floral transition [J]. *Plant Physiology*,2000,123(4):1325-1336.
- [62] Yu H, Yang S H, Goh C J. Spatial and temporal expression of the orchid floral homeotic gene *DOMADSI* is mediated by its upstream regulatory regions [J]. *Plant Molecular Biology*,2002,49(2):225-237.
- [63] Skipper M, Pedersen K B, Johansen L B, *et al.* Identification and quantification of expression levels of three *FRUITFULL*-like *MADS-box* genes from the orchid *Dendrobium thyrsiflorum* (Reichb. f.) [J]. *Plant Science*,2005,169(3):579-586.
- [64] Skipper M, Johansen L B, Pedersen K B, *et al.* Cloning and transcription analysis of an *AGAMOUS*- and *SEEDSTICK* ortholog in the orchid *Dendrobium thyrsiflorum* (Reichb. f.) [J]. *Gene*,2006,366(2):266-274.
- [65] Xu Y F, Teo L L, Zhou J, *et al.* Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum* [J]. *Plant Journal*,2006,46(1):54-68.
- [66] Pan Z J, Cheng C C, Tsai W C, *et al.* The duplicated B-class *MADS-box* genes display dualistic characters in orchid floral organ identity and growth [J]. *Plant Cell Physiology*,2011,52(9):1515-1531.
- [67] Sirisawat S, Fukuda N, Ezura H, *et al.* *DMMADS4*, a *DEF*-like gene from *Dendrobium* is required for floral organ identity and flower longevity of orchid [J]. *Acta Horticulturae*,2009(836):259-264.
- [68] Sirisawat S, Ezura H, Fukuda N, *et al.* Ectopic expression of an *AP3*-like and a *PI*-like genes from 'Sekokoku' orchid (*Dendrobium moniliforme*) causes the homeotic conversion of sepals to petals in whorl 1 and the suppression of carpel development in whorl 4 in *Arabidopsis* flowers [J]. *Plant Biotechnology*,2010,27(2):183-192.
- [69] Abdullakassim S, Handa T. Genetic transformation and analysis of protein-protein interaction of Class B *MADS-box* genes from *Dendrobium moniliforme* [M]//Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology. London: InTech,2012.
- [70] 李东宾,高燕会,斯金平,等. 铁皮石斛 *Hsp70* 基因的克隆及冷胁迫表达分析 [J]. *中国中药杂志*,2013,38(20):3446-3452.
- [71] 李东宾,高燕会,斯金平. 冷胁迫下铁皮石斛抗寒相关基因的 SCoT 差异表达分析 [J]. *中国中药杂志*,2013,38(4):511-515.
- [72] Wu Z G, Jiang W, Chen S L, *et al.* Insights from the cold transcriptome and metabolome of *Dendrobium officinale*: global reprogramming of metabolic and gene regulation networks during cold acclimation [J]. *Frontiers in Plant Science*,2016,7(e0121658).
- [73] 谢政文,王连军,陈锦洋,等. 植物 *WRKY* 转录因子及其生物学功能研究进展 [J]. *中国农业科技导报*,2016,18(3):46-54.
- [74] He C, Silva J A T D, Tan J, *et al.* A Genome-Wide Identification of the *WRKY* Family Genes and a Survey of Potential *WRKY* Target Genes in *Dendrobium officinale* [J]. *Scientific Reports*,2017,7(1):9200.
- [75] 潘园园,徐祥彬,王春玲,等. *WRKY* 转录因子的研究概况 [J]. *浙江农业科学*,2012(2):253-257,261.
- [76] 蒋园,朱玉球,高燕会,等. 铁皮石斛 *WRKY5* 基因的克隆与表达分析 [J]. *中草药*,2016(2):301-308.
- [77] 张子凤,吕楠,安红强,等. 铁皮石斛 *DoWRKY6* 转录因子基因的克隆与分析 [J]. *现代生物医学进展*,2017,17(4):615-618.
- [78] Zhang J, He C, Wu K, *et al.* Transcriptome Analysis of *Dendrobium officinale* and its application to the identification of genes associated with polysaccharide synthesis [J]. *Frontiers in Plant Science*,2016,7:1-14.
- [79] Guo X, Li Y, Li C, *et al.* Analysis of the *Dendrobium officinale* transcriptome reveals putative alkaloid biosynthetic genes and genetic markers [J]. *Gene*,2013,527(1):131-138.
- [80] Nan G L, Tang C S, Kuehnle A R, *et al.* *Dendrobium* orchids contain inducer of agrobacterium virulence genes [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*,1997,51(6):391-399.
- [81] Yu H, Yang S H, Goh C J. Agrobacterium-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 knox gene *DOHI* [J]. *Plant Cell Reports*,2001,20(4):301-305.
- [82] Zheng Q, Zheng Y P, Wang G D, *et al.* Sonication assisted agrobacterium-mediated transformation of chalcone synthase (*CHS*) gene to Spring *Dendrobium* cultivar 'Sanya' [J]. *African Journal of Biotechnology*,2011,10(56):11832-11838.
- [83] Men S Z, Ming X T, Liu R W, *et al.* Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Dendrobium* orchid [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,2003,75(1):63-71.
- [84] 杨翠芹,秦耀国,罗玉容,等. 利用正交设计优化金钗石斛的转化体系 [J]. *西南大学学报*,2009,31(6):41-45.
- [85] 闻真珍,何春梅,刘运权,等. 农杆菌介导的 *DnMADS2* 基因转化金钗石斛初步研究 [J]. *热带作物学报*,2013,34(11):2188-2191.
- [86] 张妙彬,梁攀中,肖浩,等. 农杆菌介导石斛兰遗传转化的研究 [J]. *园艺学报*,2008,35(4):565-570.
- [87] 冯莹,赖钟雄. 石斛兰转 ACS 反义基因抗性原球茎及转化植株的筛选与鉴定 [J]. *西北植物学报*,2013,33(2):247-253.
- [88] 张振华,王涛,陈喜蓉,等. 农杆菌介导的 *CyMV-CP* 基因对石斛遗传转化研究 [J]. *热带作物学报*,2011,32(3):463-467.
- [89] Ling K, Chen H T, Zhang W X, *et al.* Building a Genetic Manipulation Tool Box for Orchid Biology: Identification of Constitutive Promoters and Application of *CRISPR/Cas9* in the Orchid, *Dendrobium officinale* [J]. *Frontiers in Plant Science*,2017,7(30):2036.
- [90] Chang C, Chen Y C, Hsu Y H, *et al.* Transgenic resistance to *Cymbidium mosaic virus* in *Dendrobium* expressing the viral capsid protein gene [J]. *Transgenic Research*,2005,14(1):41-46.
- [91] 杨雪飞,王璞,罗建平. 铁皮石斛外源 *lea3* 基因的转化及耐盐性分析 [J]. *应用与环境生物学报*,2010,16(5):622-626.
- [92] Pinthong R, Sujipuli K, Ratanasut K. Agroinfiltration for transient gene expression in floral tissues of *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' [J]. *International Journal of Agricultural Technology*,2013.
- [93] 刘其府,董会,曾宋君,等. 农杆菌子房注射法对金钗石斛的活体转化研究 [J]. *华南农业大学学报*,2013,34(3):378-382.