

# 兜兰属植物及其研究现状\*

龙波<sup>①</sup> 龙春林<sup>②</sup>

① 硕士研究生,中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204;中国科学院研究生院,北京 100039

② 教授,博士生导师,中国科学院昆明植物研究所,昆明 650204

\* 国家科技基础条件平台项目(No. 2004DKA30430 & 2005DK21006),云南省自然科学基金(2005C0053M)资助项目

关键词 兜兰 组织培养 保护生物学 分子生物学

兜兰属植物是兰科中的珍品,被《华盛顿公约》列为 I 级珍稀濒危物种,有许多种是极具观赏价值的世界级花卉名品;其花期长,花色庄重素雅,花型奇特,其唇瓣状如拖鞋,故有“拖鞋兰”之称。杏黄兜兰是世界上非常罕见的黄花种类,和硬叶兜兰并称为“金童玉女”,在国际兰花展中屡获金奖。本文概述了近 20 年来国内外对兜兰属植物的研究,着重介绍了兜兰属植物在组织培养、保护生物学、分子生物学、生理生态学等方面的研究进展,并指出在杂交育种、种质保存及基因工程等方面均有待于对其进行深入研究。

## 1 兜兰属植物的概况

兜兰,又称“女士拖鞋兰”、“仙履兰”,是兰科兜兰属(*Paphiopedilum*)植物的统称。在拉丁语中,兜兰的属名 *Paphiopedilum* 由爱神 *Paphos* 和鞋子 *Pedilon* 组合而成,即爱神之鞋,以其唇瓣的形状而得名。

兜兰是兰科植物中最具特色的一个类群,也是最奇特的观赏兰花<sup>[1,2]</sup>。本属植物的花形十分奇特,唇瓣呈兜状,酷似旧时欧洲淑女的拖鞋;背萼特别发达,具有艳丽的花纹。兜兰与其他兰花明显不同的地方是,2 枚能育雄蕊着生在蕊柱的两侧;发达的背萼呈扁圆形或倒心形,在各瓣中最显著。因此,兜兰以其独特魅力和许多优异特性而备受世界花卉爱好者的钟爱。

全世界约有兜兰属植物 66 种,近年来发表了 10 余个新种,总数增加到 80 余种<sup>[3]</sup>,主要分布于热带和亚热带地区,其中 1/3 以上分布于中国。

杏黄兜兰自传入欧美后,获得近百个美国兰展奖项,热潮至今未衰。硬叶兜兰曾勇夺世界兰展全场总冠军,惊艳兰坛。杏黄兜兰和硬叶兜兰被并称为“金童玉女”,是兰花中的珍品,备受世人的关注。

然而受盛名之累,中国的兜兰属植物虽然丰富,但由于过度采集、走私出境猖獗以及生境破坏等原因,近十几年来野生兜兰的数量急剧减少,分布区逐渐萎缩,不少种类已经到了灭绝的边缘。针对野生兜兰受到掠夺性采挖和贸易而导致该类群植物迅速减少甚至灭绝

的状况,《华盛顿公约》(即《濒危野生动植物种国际贸易公约》,Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES)把所有兜兰属植物列入其附录一名录,等同于大熊猫的保护等级,受到国际社会的严格保护。

## 2 研究进展

由于兜兰属植物的奇特性和巨大的观赏价值,不少国内外学者开展了兜兰属的分类学、形态学、细胞学、地理学、栽培和杂交育种的工作,并出版了一些专著<sup>[4-12]</sup>。现从以下 8 个方面对兜兰属植物的研究状况进行简要概述:

### 2.1 形态学和细胞生物学

唐沢耕司<sup>[4]</sup>对几十种兜兰进行了形态学的观察和核型分析,并在此基础上进行了分类上的讨论,将兜兰属划分成六个亚属。Braem G J<sup>[12]</sup>对兜兰属的分类与唐沢耕司的基本一致。

任玲等对兜兰(*P. godefroyae* Stein)有性生殖全过程曾有过详细的研究。结果表明兜兰胚珠具一层珠被,胚囊发育为蒴型,胚乳具二核。种子成熟时胚柄及胚乳核都消失。成熟种子只具单层细胞的种皮和一个未分化的球形胚。单粒分散的花粉包裹于黄色粘性物质中。推测此粘液可能是花粉鞘类物质,它使得传粉效率更高,但这种花粉团块的结构在兜兰属中是否普遍,在兰

科植物系统发育上有何意义,还需要进一步的比较和观察<sup>[13]</sup>。

孙安慈<sup>[14]</sup>对兰科植物的兰属、兜兰属及石斛属 16 个种的叶片及其横断面进行了扫描电镜的观察。观察发现兜兰属的各个种上下表皮细胞均为多边形,花叶类上表皮细胞表面明显呈乳突状,叶肉有分化;绿叶类呈龟背状隆起,叶肉不分化。叶表皮细胞形状、表面的突起和纹饰、叶肉分化与否等反映了各属的特征。叶片形态结构特征也反映了各个种的生长习性,对生长环境的适应。因此,认为叶片的形态特征可以作为种、属分类的参考。

## 2.2 组织培养

利用组织培养的方法进行大规模克隆繁殖,无疑可以减轻对野生兜兰植物的采集压力。由于兜兰原生种的组织培养较难,杂交种的组织培养相对较易,因此利用杂交种进行组织培养是国外兜兰商品化种苗生产的主要方式。兜兰与大多数洋兰一样,由于种子的胚发育不完全,在自然状况下需与真菌共生才有极少数的萌发。

国内外对兜兰菌根的研究发展缓慢。李明<sup>[15]</sup>曾采用根组织切片法从杏黄兜兰根内分离到 13 株真菌,其中以镰刀菌和组丝核菌为优势菌。将组丝核菌 JF74, JF75, JF80 制成菌剂,施入杏黄兜兰根部,对杏黄兜兰产生了一定的促进生长的效果。但是镰刀菌对杏黄兜兰是有益还是有害及其作用机理还待进一步研究。

目前的组织培养研究着重于优化培养条件,如外植体的取材、培养基成分和激素的选择试验。研究发现用杂交种兜兰的外植体诱导类原球茎较易获得成功<sup>[16-22]</sup>,而采用无菌种子萌发技术,已成功地获得多种兜兰的无性克隆个体<sup>[23-27]</sup>。但无论是在国内还是国外,兜兰属植物的花药培养、原生质体培养等尚未见报道。

随着人口增长、环境变化、滥伐森林和耕地沙漠化,一些珍稀的物种以及具有抗虫、病、毒、不良环境潜能的地方栽培品种已经灭绝或濒于绝种。此外,因植物育种技术的发展,高产品种单一化趋势日益明显,植物遗传基础越来越窄。因此,利用植物组织和细胞保存种质,所占空间小,基因型稳定,受外界影响小,同时也便于种质交换和转移,防止有害病菌的人为传播。然而,在兜兰属植物的种质资源保存技术方面国内外仍然是空白。

## 2.3 传粉生物学

Hans Bänziger 从 1990 到 1994 年共花了 224 小时

持续在泰国常绿林里观察紫毛兜兰,发现其周围大约有 100 种双翅目食蚜蝇,在 15 个实验对象中有效花粉传播者主要为雌性的 *Episyrphus alternans*, *Syrphus fulvifacies*, *Betasyrphus serarius*。紫毛兜兰靠花色和散发出类似尿素的味道来吸引远距离的昆虫,退化雄蕊(可能是模拟一滴蜜汁或露水)引诱近距离昆虫。当昆虫被吸引时,便着陆于中央一突疣(伪装成栖木),因控制不住而滑入兜内。为了防止昆虫飞出,唇瓣形成囊状,所以昆虫只能擦过柱头,粘上花药逃出去。粘稠的花药至少可以持续 8 周的生活力,但只有 8% 的植株可以产生蒴果<sup>[28]</sup>。

刘可为等对杏黄兜兰的传粉生物学进行研究,结果发现杏黄兜兰的繁育系统是兼具异交和自交的混合交配系统。杏黄兜兰是一种食源性欺骗的植物,它模仿食源性植物黄花香。此外,通过检测还发现杏黄兜兰的花粉为脂质;花粉活力和柱头可授性在花朵开放期内具有同步性,而花粉在柱头凋落后仍具活力,去除了雄蕊可明显延长花朵开放时间<sup>[29]</sup>。

## 2.4 保护生物学

罗毅波等在了解了国际兰科植物研究和保育的最新进展和发展趋势的基础上,提出国内关于兰科植物保育的研究与国际同类工作相比存在不小的差距<sup>[30]</sup>。他们认为兰科植物由于其单个果实内具有成千上万颗种子,因而利用种子进行大规模繁殖就成为兰科植物迁地保护的重要手段。特别是对兜兰属植物来说,目前组织培养等方法还未取得突破,种子繁殖就成为唯一的规模繁殖的方法<sup>[3]</sup>。

刘仲健等<sup>[31]</sup>对梧桐山野生的紫纹兜兰进行了观察,研究了当地的气候、植被、土壤和其他环境因素与紫纹兜兰之间的关系。观察结果表明,梧桐山地区的紫纹兜兰在次生阔叶林下生长良好;大多数开花的紫纹兜兰均能结果。因此认为,紫纹兜兰生存所面临的主要威胁应该是其生境亦即森林的破坏,而不是其自身存在的生物学缺陷。

居群遗传学的研究可以解释植物的遗传变异水平及其空间结构,为制定原地保护策略提供基本数据。李昂采用空间自相关分析方法对硬叶兜兰(*Paphiopedilum micranthum*)和独花兰(*Changnienia amoena*) 4 个天然群体的小尺度空间遗传结构进行了研究,以探讨两种兰科植物群体内遗传变异的分布特征及其形成机制。结果表明,适时的迁地保护对硬叶兜兰是必要的。上述研究结果有助于进一步了解物种的进化历程和濒危机制,并且能为制定有效的保护策略和措施提供科学依

据<sup>[32]</sup>。

## 2.5 分子生物学

分子标记技术应用于兰科植物的分类鉴定和品种鉴别,为兰花的分类提供了分子水平的证据,也为兰花保护策略和措施的制定提供了理论基础。但至今为止,国内外用此技术研究兜兰属遗传多样性的报道并不多见。

Antony V Cox 等<sup>[33]</sup>应用核 rDNA 的 ITS 核苷酸序列数据,研究杓兰属、兜兰属、美洲兜兰属、碗兰属、墨西哥兰属的 150~170 个种之间的亲缘关系,其中兜兰属的研究包括了中国兜兰属的 15 个原生种。研究认为 section *Parvisepalum* 应从短瓣亚属 subgenus *Brachypetalum* 中划出另立一亚属 subgen *Parvisepalum*; 而 section *Coryopedilum* 和 section *Pardalopetalum* 应归为一个组 section *Pardalopetalum*。ITS 树状图明确了 5 个属和各属内种间的亲缘关系,兜兰属的划分与 Cribb 的传统分类基本一致。

国内也有应用分子标记的报道,孙彩云曾利用 RAPD 和同工酶分子标记技术来分析中国兜兰种间亲缘关系。研究结果显示,RAPD 和同工酶两种手段对种间亲缘关系的划分与传统分类大致吻合,同工酶比 RAPD 的结果更接近传统分类。兜兰亚属需进一步分组,彩云兜兰、卷萼兜兰、紫纹兜兰及其变种云南虎皮应自成一个组,白花兜兰和同色兜兰的真正的分类学位置应如何确定尚需进一步研究<sup>[34]</sup>。

## 2.6 系统演化和生态地理

王英强<sup>[35]</sup>分析了国产兜兰属植物的生态地理分布特点和发展趋势,以及兜兰属植物的系统演化趋势与生态地理环境的关系。国产兜兰主要分布于热带过渡地区(南亚热带),主产于西南各省区;大多数种类生长于石灰岩山地,多为半附生兰,呈丛生生长;国产兜兰属中最原始的短瓣亚属绝大部分种类仅分布在滇东南地区与贵州、广西连成一片的岩溶地貌的石灰岩地区,而兜兰属中较进化的兜兰亚属大部分种类在本区皆有分布。这说明滇东南的石灰岩地区可能是兜兰属的起源中心和演化中心,中国的南亚热带地区是兜兰属植物的生态多样性中心。

## 2.7 生理生态

Gehring<sup>[36]</sup>发现茉莉酸会使 *P. supersuk* 和 *P. tonsum* 这两种兜兰的保卫细胞关闭。在 5~15 min 内茉莉

酸导致细胞内的酯化上升 0.5 个 pH 单位。茉莉酸引起的酯化通常会使气孔关闭,而丙酸会抑制茉莉酸引起的气孔关闭。Gehring 认为,茉莉酸导致细胞内的酯化与保卫细胞的运动有关。

Zeiger<sup>[37]</sup>发现在兜兰属里,绿光不但刺激了光敏色素反应,还引起了蓝—绿光可逆性反应。实验表明红光可以使气孔张开,且在远红光下是可逆的。这个实验结果与 Zeiger 等<sup>[38]</sup>的观点有差别——导致兜兰气孔张开的是蓝光而不是红光。气孔开度与红光速率成反比,另外保卫细胞质体会影响叶黄素循环组合,在蓝光照射下玉米黄质的含量增加。Zeiger 对保卫细胞叶绿体的研究作了展望,认为进一步的研究应当是关于在完整的叶片保卫细胞叶绿体中,通过光合作用固碳,能产生多少渗透性的活性糖;用缺失了保卫细胞所有钾离子通道的突变体来阐明,作为保卫细胞的渗透剂,蔗糖是否可以完全替代钾离子。

## 2.8 基因工程研究

兰科植物表现有高度特异的形态、结构和生理特性,是研究花着色机理和子房发育的理想对象。兰花具有特异的查尔酮合成酶(CHS)和二氢叶酸还原酶(DFR)等可控制花色素合成的基因。其他的如 DOH1 基因控制石斛兰花芽的形成和提早开花,PHAL.039 基因和 ACC 合成酶基因在蝴蝶兰授粉后的子房发育中起着重要的调控作用。由于兰科植物对根癌农杆菌或发根农杆菌不敏感,并且一些直接转移的方法如 PEG 介导和电激法成功率低,使得兰花基因工程的研究进展缓慢。目前只有蝴蝶兰属、大花蕙兰、石斛兰属、文心兰属、五唇兰属和万代兰属等几种兰科植物有转基因研究进展方面的报道,主要以原球茎为材料采用基因枪或农杆菌法转化,部分研究获得了转化植株<sup>[39]</sup>。

## 3 展 望

到目前为止,对兜兰的研究已取得一些成果,但与蝴蝶兰、大花蕙兰、石斛等其他的观赏性兰花相比,还有很大的空间。最近发展了新的组织培养技术——薄层切片(Thin Cross Section)培养和薄层细胞(Thin Cell Layers)培养,此类技术能高效地获得再生小植株,但也尚未在兜兰上应用。由于兰花杂交育种方法繁琐,选育周期长,不光是兜兰,整个兰科的育种工作进展缓慢,这势必影响我国兰花的发展。以组织培养为基础开展综合育种,包括种属间杂交、诱变育种,远缘杂交同时结合

转基因技术,将为兜兰育种研究带来希望。

(2006年5月8日收到)

- 1 BRAEM G, CHIRON G. *Paphiopedilum* [M]. Paris: Tropicalia, 1988.
- 2 CRIBB P J. The Genus *Paphiopedilum* (Ed. 2) [M]. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo), 1998.
- 3 罗毅波,贾建生,王春玲. 初论中国兜兰属植物的保护策略及其潜在资源优势[J]. 濒危物种科学通讯,2005,4(2):11-20.
- 4 唐沢耕司. パフィオペディルム[M]. 誠文堂新光社,1982.
- 5 BIRK L A. The *Paphiopedilum* Grower's Manual [M]. Pisang Press, 1983.
- 6 CRIBB P J. The Genus *Paphiopedilum*. The Royal Botanic Gardens [M]. London: Kew and Corringrid Books, 1987.
- 7 麦奋. 亚洲原产拖鞋兰图谱[M]. 台北:淑馨出版社,1990.
- 8 陈心启,吉占和. 中国兰花全书[M]. 北京:中国林业出版社,1998.
- 9 陈心启,吉占和,罗毅波. 中国野生兰科植物彩色图鉴[M]. 北京:科学出版社,1999.
- 10 AVERYANOV L, CRIBB P, et al. Slipper Orchids of Vietnam [M]. Sydney: Timber Press, 2003.
- 11 CAVESTRO W. Le genre *Paphiopedilum* [M]. Paris: Claudine Gilquin, 2003.
- 12 BRAEM G J. *Paphiopedilum*: Eine Monographie aller Frauenschun-orchideen der asiatischen Tropen und Subtropen [M]. Hildesheim: Schmersow, 1998.
- 13 任玲,王伏雄. 兜兰胚胎学的研究[J]. 植物学报,1987,29(1):14-21.
- 14 孙安慈. 兰属、兜兰属、石斛属植物叶片的扫描电镜观察[J]. 武汉植物学研究,1995,13(4):289-294.
- 15 李明,张灼. 杏黄兜兰菌根研究与应用[J]. 生物学杂志,2001,18(6):17-18.
- 16 张晓红,徐涛,谷祝平. 兜兰类原球茎的诱导及植株再生[J]. 生物多样性研究进展.
- 17 HUANG L C, LIN C J, KUO C I. *Paphiopedilum* cloning in vitro [J]. Scientia Horticulturae, 2001, 91: 111-121.
- 18 CHEN T Y, CHEN J T. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids [J]. In Vitro Cellular and Development Biology-Plant, 2002, 38, 595-597.
- 19 CHEN T Y, CHEN J T, CHANG W C H. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 76: 11-15.
- 20 曹受金,田英翠,潘百红,等. 兜兰组培快繁影响因素分析[J]. 北方园艺,2005,(3):79-80.
- 21 LIN Y H, CHANG C H, CHANG W C. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 62: 21-25.
- 22 STIMART D P, ASCHER P D. In vitro germination of *Paphiopedilum* seed on a completely defined medium [J]. Scientia Horticulturae, 1985, 26: 57-67.
- 23 PIERIK R L M. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. in vitro [J]. Scientia Horticulturae, 1987, 34: 139-153.
- 24 陈之林,叶秀麟,梁承邨,等. 杏黄兜兰和硬叶兜兰的种子试管培养[J]. 园艺学报,2004, 31(4): 540-542.
- 25 丁长春,虞泓,刘方媛. 影响杏黄兜兰种子萌发的因素[J]. 云南植物研究, 2004, 26(6): 673-677.
- 26 丁长春,虞泓,刘方媛,等. 杏黄兜兰胚培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2005,41(1): 55.
- 27 NHUT D T, TRANG P T T, VU N H, et al. A wounding method and liquid culture in *Paphiopedilum delenatii* propagation [J]. Propagation of Ornamental Plants, 2005, 5(3): 158-163.
- 28 BÄNZIGER H. The mesmerizing wart: the pollination strategy of epiphytic lady slipper orchid *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein (Orchidaceae) [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1996, 121: 59-90.
- 29 刘可为,刘仲健,雷嗣鹏,等. 杏黄兜兰传粉生物学的研究[J]. 深圳特区科技,2005,11:171-178.
- 30 罗毅波,贾建生,王春玲. 中国兰科植物保育的现状和展望[J]. 生物多样性,2003,11(1): 70-77.
- 31 刘仲健,张建勇,茹正忠,等. 兰科紫纹兜兰的保育生物学研究[J]. 生物多样性,2004,12(5):509-516.
- 32 李昂,罗毅波,葛颂. 采用空间自相关分析研究两种兰科植物的群体遗传结构[J]. 生物多样性,2002,10(3):249-257.
- 33 COX A V, PRIDGEON A M, et al. Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences [J]. Plant Systematics and Evolution, 1997, 208: 197-223.
- 34 孙彩云,张明永,叶秀奔,等. 利用 RAPD 和同工酶研究中国兜兰属种间亲缘关系[J]. 园艺学报,2005,32(2):268-272.
- 35 王英强. 中国兜兰属植物生态地理分布[J]. 广西植物,2000,20(4):289-294.
- 36 GEHRING C A, IRVING H R, et al. Jasmonate induced intercellular alkalization and closure of *Paphiopedilum* guard cells [J]. Annals of Botany, 1997, 80: 485-489.
- 37 ZEIGER E, TALBOTT L D, FRECHILLA S, et al. The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century [J]. New Phytologist, 2002, 153: 415-424.
- 38 ZEIGER E, ASSMANN S M, MEIDNER H. The photobiology of *Paphiopedilum* stomata: opening under blue but not red light [J]. Photochemistry and Photobiology, 1983, 38: 627-630.
- 39 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,2004,21(4): 471-477.

### Amazing *Paphiopedilum* and Its Research Status Long Bo<sup>①</sup> Long Chun-lin<sup>②</sup>

① Graduate Student, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039

② Professor, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204

Key words *Paphiopedilum*, tissue culture, conservation biology, molecular biology

(组稿:林凤生;责任编辑:丁嘉羽)