

香石竹分子育种研究进展

李 鹏, 朱 宏, 赵 凯, 潘爱虎

(上海市农业科学院生物技术研究所, 上海市农业遗传育种重点实验室, 农业部转基因植物环境安全监督检验检测中心(上海), 上海 201106)

摘要: 香石竹是当代世界上最重要的切花品种之一。尽管传统育种技术在香石竹遗传改良方面取得了显著成就,但仍不能满足当前香石竹生产优良品种的需求。随着生物技术的发展,以基因工程技术为核心的现代分子育种技术已经成为香石竹育种的重要研究方向。综述了近年来国内外香石竹分子育种的研究进展和成果,简要评述了香石竹分子育种研究中存在的问题并展望其应用前景。

关键词: 香石竹; 转基因; 分子育种

中图分类号: S681.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)05-0152-03

Progress of Molecular Breeding in Carnation

LI Peng, ZHU Hong ZHAO Kai, PAN Ai-hu

(Biotech Research Institute of Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Supervision, Inspection and Test Center for Environment Safety of GM Crops of MOA (Shanghai), Shanghai 201106)

Abstract: Carnation is one of the most important cut flowers in the world. Though the conventional breeding has made remarkable achievements in the genetic improvement of carnation, it does not satisfy the current production demand of fine carnation varieties. With the development of biological technology, molecular breeding has become an important research direction of carnation breeding. In this paper, research progress of carnation molecular breeding was summarized in recent years, and the problems and perspectives related to genetic engineering for molecular breeding of carnation were also elucidated briefly.

Key words: Carnation; transgenic; molecular breeding

香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 又名康乃馨, 为石竹科石竹属多年生草本植物, 是当代世界最主要的切花品种之一。其生产面积和销售量列切花品种之首, 全球生产总面积已达 8 700 多 hm^2 。香石竹起源于南欧、地中海、法国到希腊一带^[2]。我国原产的中国石竹 (*Dianthus chinensis* L.) 也具有较高的观赏价值, 是现代切花香石竹的主要亲本之一^[1]。我国香石竹栽培开始于 20 世纪初, 已有 80 多年的历史, 但作为大规模切花生产是 80 年代初才在上海开始, 香石竹育种工作刚刚起步^[2]。目前主要产地有上海、云南、广州等地。全国范围内, 云南是近年来香石竹生产速度最快的省份,

收稿日期: 2008-03-04
第一作者简介: 李鹏(1981-), 男, 山东省滨州市人, 硕士, 研究实习员, 从事转基因植物环境安全性评价研究。Tel: 15800300115; E-mail: sunsite@126.com.
通讯作者: 潘爱虎, Tel: 021-62208750; E-mail: aihup@yahoo.com.cn.

2006 年康乃馨种植面积为 1 125. 584 hm^2 , 占全国种植面积的一半, 已成为我国乃至亚洲最大的香石竹生产基地^[3]。

1 香石竹传统育种

1. 1 香石竹杂交育种

杂交育种是得到香石竹新品种最可靠的方法之一。首先选定父母本, 了解其遗传性。进行反复杂交就能够得到理想的新品种。在杂交育种中, 种间杂交是香石竹重要的遗传变异来源, 许多品种来源于复杂的种间杂交, 形成了广泛的株型、株色、花型、花色变异^[4]。例如以色列最大的香石竹种苗公司 Shemi 种苗公司有专门的育种专家培育新品种, 主要采用杂交育种的方法, 从亲本选择到新品种的形成注册, 5 a 为一个周期, 每年都有新品种推向市场。目前该公司已有 50 多个品种登记注册, 公司每年新增 5 ~ 10 个新品种, 同时也不断淘汰旧品种。但是杂交育种需要较长的时间, 普通生产者一般很难长

期从事杂交育种^[2]。

1.2 香石竹诱变育种

诱变育种是人为采用放射性物质进行照射, 诱导香石竹变异植株发生的育种方法。可以利用插穗、发根种苗或者试管苗进行射线照射诱变。从变异的植株中找出性状优良的植株, 再通过无性繁殖或植物组织培养技术发展成株系。植物组织培养技术也是进行诱导育种的重要途径之一, 而且容易定向控制, 是比较经济的育种方法之一。

香石竹使用辐射处理的诱变源, 基本上是用钴 60。发根的插条使用剂量为 4 000 ~ 6 000 伦琴, 未发根的插条使用剂量为 8 000 ~ 10 000 伦琴。秋水仙素处理香石竹去顶后的腋芽, 采用 20% 的浓度处理。对诱变产生的香石竹优良单株采用无性繁殖的方法加以繁殖利用^[2]。

2 香石竹分子育种

2.1 香石竹花色基因工程

花色是香石竹最重要的特征之一。长期以来, 人们通过传统育种及定向选择技术进行香石竹花色改良。虽然杂交育种在花色改良中作出了重要贡献, 但其远缘杂交亲和性差, 难于打破生物物种生殖隔离和某些基因连锁, 染色体重组时交换量小, 育种周期长, 效率较低^[5-6]。因此, 对花色基因的研究具有重要意义, 一方面使人们有可能对花色进行人工修饰, 进一步提高其观赏和商品价值; 另一方面, 由于花色的明显可见性, 花色基因可作为看得见的标记基因, 用于研究基因的表达、调控等^[7]。

花色主要由类黄酮、类胡萝卜素、生物碱三类物质决定^[8]。类黄酮是使花呈现蓝色的关键色素, 存在于液泡内, 分为花青素、异黄酮和黄酮醇等, 其中花青素可反映花中大部分红、蓝、紫和红紫等颜色^[9]。类黄酮类色素的生物合成途径已较为清楚^[8]。由苯丙氨酸到花青素的合成可以分成三个阶段, 第一阶段由苯丙氨酸到香豆酰 CoA; 第二阶段由香豆酰 CoA 到二氢黄酮醇, 这是类黄酮代谢的关键反应, 它合成花青素和其它黄酮物质; 第三阶段是各种花色苷的合成, F3' H 和 F3' 5' H 是最关键的酶, 它们决定无色二氢黄酮醇的羟化位置和程度, 从而最终决定合成花色苷的种类和花的颜色, 如果二氢黄酮醇 B 环的 3' 和 5' 位都被羟化, 将形成蓝紫色翠雀素糖苷的前体; 如果只有 3' 位被羟化, 将形成红色花青素糖苷的直接前体; 若 3' 和 5' 位都未被羟化, 则转变成砖红色的花葵素糖苷^[9]。

Florigene 公司将矮牵牛的 F3' 5' H 基因和 DFR 基因导入白花的香石竹中, 转化株积累了大量的花翠素, 花色也因而发生了改变, 改变程度与导入

基因的表达强度相关^[7]。利用正义 RNA 技术, Tanaka 等将 CHS 基因(查尔酮合成酶基因)导入香石竹, 使花色变浅^[8]。Fukui 等通过对已经市场化的蓝紫色转基因香石竹品种 Moonshade 和 Moon-dust 花色和类黄酮结构的分析, 认为蓝色花形成需同时具备三个条件: F3' 5' H 基因表达所引起的翠雀花素的积累, 黄酮醇共染剂的存在, 花瓣液泡 pH 达到 5.5^[10]。Zuker 等为了改变香石竹品种 (Carnation cv. Eilat) 的花色, 通过反义 RNA 技术抑制黄酮醇 3' 羟化酶(flavanone-3-hydroxylase)基因的表达, 花色逐渐变淡, 同时花香味也变浓了^[11]。

2.2 香石竹花香基因工程

香味是香石竹品质的一个重要组成。花瓣可分为表皮、薄壁组织和维管组织三部分。表皮具有独特的乳头状突起, 称为腺毛, 薄壁组织含有许多油细胞, 油细胞能分泌出有香气、易挥发的芳香油, 通过腺毛扩散到空气里, 使花产生香味。单萜和倍半萜为植物挥发油的主要成分, 赋予水果、蔬菜和鲜花以香味。萜类产生于异戊二烯(又称甲羟戊酸)途径。在 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶的存在下, 二羟甲基戊酸生成, 经 ATP 磷酸化后, 变成互为同分异构体的异戊烯醇焦磷酸酯和 3, 3-二甲基丙烯焦磷酸酯。于是, 在不同酶的作用下, 这两种异戊二烯单元, 由于参与到头尾相互缩合的个数的不同, 就合成了各种各样链长的萜类^[12-13]。为使花朵芬芳, 利用萜类的合成原理, 转入外源基因或改变内源基因, 培育带有新型香味的或强化原有香味的花卉, 使之更受大众欢迎。

包括香石竹在内的多数切花品种没有浓郁的芳香气味。Lavy 等将来源于伯惠绣衣(Clarkia breweri)的芳樟醇合酶(linalool synthase)基因转入香石竹品种(Carnation cv. Eilat), 转化植株的叶片与花都产生了芳樟醇及其氧化物^[14]。

2.3 香石竹保鲜基因工程

延长香石竹切花的保鲜期, 对香石竹生产、运输、贮存及消费影响重大。影响香石竹观赏寿命的因素非常多, 但乙烯与衰老的关系最直接^[15]。ACC 合成酶是乙烯合成反应限速酶, 编码该酶的基因是一多基因家族, 各成员的表达具有组织特异性。在香石竹花器官中, 该基因家族的 3 个成员分别在花柱(DCACS2, DCA CS3)和花瓣(DCACS1)中特异表达^[16]。克隆了与香石竹衰老有关的三个 cDNA 基因, 并证明这些基因的表达促进花瓣衰老^[17]。Savin 等将反义 ACC 氧化酶(ACC oxidase, ACO)基因 cDNA 导入香石竹, 内源 ACO mRNA 的表达受到抑制, 抑制了乙烯生成, 使瓶插寿命延长了近 1

倍^[18]。Bovy 等将拟南芥 *etr1-1* 等位基因导入香石竹,降低花瓣对乙烯的敏感性,延长了瓶插寿命,并且导入 *etr1-1* 的植物延长衰老的时间比用化学药剂抑制乙烯生产的时间长^[19]。Kiss 等把反向的 ACC 合成酶基因转入到香石竹中,经 NTP II 的 Southern 杂交以及 RT-PCR 检测,证实外源基因已转入香石竹中^[20]。Kosugi 等将正义 ACO 基因 cDNA 导入香石竹,延缓了花瓣衰老^[21]。Florigene 公司将 ACC 合成酶反义基因导入香石竹,这种转基因香石竹比普通香石竹的观赏寿命延长了 2 倍^[22-23]。张树珍等通过农杆菌介导法将花特异表达启动子驱动的 ACC 氧化酶的反义基因转入香石竹中,经多重 PCR 及 PCR- Southern 杂交检测,证实 ACC 氧化酶的反义基因已整合进香石竹的基因组中^[24]。余义勋和包满珠通过农杆菌介导法将 ACC 氧化酶(ACO)基因导入香石竹,多数转化株系瓶插寿命延长 2 倍以上,衰老过程中乙烯释放量显著减少,部分转基因株系切花衰老过程中几乎检测不到乙烯^[25]。日本研究人员已成功开发出了花期相当于普通品种约 3 倍的香石竹。普通香石竹完全开放 5~7 d 后就开始枯萎,而新开发的香石竹“筑波 1 号”开放 19.5 d 后还没有枯萎^[5]。

2.4 香石竹株型基因工程

香石竹株型形态对香石竹的经济价值起着决定性影响。因此,香石竹株型形态改良一直是科学工作者研究的重点之一。香石竹株型形态包括花器官形态、花枝着生状态、花序类型及植株形态等^[26]。

Zuker 等将 *RolC* 基因导入香石竹,转化株系的花芽和插条数目增加,茎秆花数比对照多三倍^[27]。Casanova 等发现在转 *RolC* 基因香石竹的 4 个株系(*Dianthus caryophyllus* L. cv. White Sim)中,*RolC* 表现出类似细胞激动素和生长素的活性,可以提高根和芽的再生率^[28]。

2.5 香石竹抗性基因工程

目前,香石竹抗性基因工程见于报道的研究成果不多。Yu 和 Bae 将香石竹斑驳病毒(CarMV)外壳蛋白基因转化到香石竹三个品种中,经 PCR 和 Southern 杂交分析,CP 基因整合到香石竹基因组中,多数转基因植株均可正常生长^[29]。我国的花卉工作者也成功获得了提纯的香石竹叶脉斑驳病毒外壳蛋白基因 cDNA,并测定了序列,初步确定了该基因,为利用生物技术培育香石竹奠定了基础^[4]。林荣呈等通过农杆菌介导法将 *npt* 基因导入香石竹品种,经 PCR 和 Southern 杂交分析,证实外源基因已整合到植物基因组中^[30]。

154

黑龙江农业科学

3 问题和展望

虽然香石竹分子育种已取得较大进步,但是它们的转化只局限于少数几个品种。多数品种的转化仍处于提供理论技术保证和转化体系的建立与优化阶段,多数实验室获得的转基因植株不含经济性状的改变或改变的方向不是很理想。而且通过基因工程技术所获得的只是一种人工种质新材料,不是生产上立即可以应用的新品种,它必须经过育种程序的考验^[31]。所以分子育种必须与常规育种结合,在传统育种基础上改良某些运用传统育种技术所不能取得的性状,将转基因花卉的外源目的基因持续地遗传给后代或通过有性生殖转移到别的品种中去^[4]。

由于分子育种技术克服了常规育种方法周期长、预见性差、选择效率低的局限性,可以定向改良植物遗传性状,聚合优良基因,对新品种进行科学定向选育,并且香石竹仅供观赏而非食用。不会进入到食物链中,基本上不存在食用安全问题,相对易被批准应用。因此香石竹分子育种前程似锦。

参考文献:

[1] 黄坚,顾其祥,池坚.香石竹生产技术[M].北京:中国农业出版社,2004: 4-5.

[2] 李世峰,莫锡君.香石竹在我国育种状况简述[J].北方园艺,1999(1): 38-39.

[3] 云南花卉信息中心.2006 年中国康乃馨、月季和唐菖蒲产销分析[EB/ OL].[2007-12-14] <http://flower.aweb.com.cn/2007/12/14/11200712140916620.shtml>.

[4] 薛淮,刘敏,张纯花,等.花卉分子育种研究进展[J].生物工程进展,2002,22(2): 81-85.

[5] 包满珠.植物花青素基因的克隆进展及其应用[J].园艺学报,1997,24(3): 279-284.

[6] 汪政科,彭镇华.观赏植物基因工程研究进展[J].林业科学研究,2000,13(1): 97-102.

[7] 李洪清,李美茹,潘小平,等.花色改造基因工程[J].中国生物工程杂志,2003,23(7): 42-46.

[8] Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. Metabolic engineering to modify flower color [J]. Plant Cell Physiology, 1998, 11: 1119-1126.

[9] 张石宝,胡虹,李树云.花卉基因工程研究进展 I : 花色[J].云南植物研究,2001,23(4): 479-487.

[10] Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T. A rationale for the shift in color towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3' 5' hydroxylase gene [J]. Phytochemistry, 2003, 63: 15-23.

[11] Zuker A, Tzfira T, Ben-Meir H. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3- hydroxylase gene[J]. Mol. Breed, 2002, 9: 33-41.

[12] 沈同,王镜岩.生物化学: 第二版下册[M].北京:高等教育出版社,1991: 194-195.

[13] 许智宏.植物生物技术[M].上海:上海科学技术出版社,1998: 41-42.

(下转第 159 页)

cm, 生育日数 86 d, 活动积温 1 610℃。抗寒能力较强。

父本特征特性: 叶色浅绿, 花瓣较大, 雄蕊正常, 花粉量大, 花黄色, 茎浅绿色, 有微量蜡粉, 恢复力达到 100%, 株高 127 cm, 生育日数 87 d, 活动积温 1 640℃。抗倒伏能力强。

2.3 主要特性

抗菌核病能力较强, 较耐其它病害, 苗期耐早春低温冷害, 抗倒伏能力强, 比较抗干旱。

品质性状: 芥酸含量 0.78%~0.94%, 硫甙含量 19.8~23.44 μmol·g⁻¹, 含油量 42.36%~43.14%。

3 栽培技术

3.1 播期

第 1~3 积温带适宜播期为 4 月 15 日~5 月 1 日, 第 4~6 积温带适宜播期为 4 月 25 日~5 月 25 日。

3.2 密度

平播行距 30 cm, 保苗 60~80 万株·hm⁻², 垄作

保苗 40~60 万株·hm⁻²。

3.3 施肥

杂交种 NK U-14 对硼肥比较敏感, 土壤中有效硼含量≤0.7 mg·kg⁻¹时产量明显下降, 一般施硼砂 7 500 g·hm⁻², 或施速效硼肥 1 500~3 000 g·hm⁻²。施 N、P、K 肥 225 kg·hm⁻², N:P:K 配比为 1:0.4:1。

4 亲本繁殖及制种方法

隔离区 2 000 m 以上, 选择 3 年没种过油菜的地块; 父母本行比 2:4, 行距 45 cm 或 60 cm 以上大垄; 父母本可同期播种; 花期人工去杂、去劣, 并人工辅助授粉; 也可放蜂辅助授粉, 蜂量 4 箱·hm⁻²; 在父本终花前砍除父本, 保证杂种纯度; 制种单产在 600 kg·hm⁻²左右。

5 适应区域

适宜黑龙江省油菜栽培区, 内蒙等春油菜栽培区种植。

(上接第 154 页)

[14] Lavy M, Zuker A, Lewinsohn E. Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the Clarkia breweri linalool synthase gene[J]. Mol Breed, 2002, 9: 103-111.

[15] 黄春琼, 郭安平, 孔华, 等. 基因工程在花卉育种中的应用进展[J]. 热带农业科学, 2006, 26(2): 54-59.

[16] Michelle L, Jones W, William R, et al. Differential expression of three members of the l-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase gene family in carnation[J]. Plant Physiol, 1999, 119: 755-764.

[17] Lawton K A, Huang B, Goldsbrough P B, et al. Molecular Cloning and Characterization of Senescence-Related Genes from Carnation Flower Petals[J]. 1989, 90 (2): 690-696.

[18] Savin K L, Baidoette S C, Graham M W. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence[J]. Hort Science, 1995, 30: 970-972.

[19] Bovy A G, Agenent G C, Dons H J, et al. Heterologous expression of the Arabidopsis etr1-1 allele inhibits the senescence of carnation flowers[J]. Mol. Breed, 1994(4): 301-308.

[20] Kiss E, Veres A, Galli Z, et al. Production of transgenic carnation with antisense ACS(l-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase) gene[J]. International Journal Horticultural Science, 2000, 6(4): 103-107.

[21] Kosugi Y, Waki K, Iwazaki Y. Senescence and gene expression of transgenic non-ethylene-producing carnation flowers[J]. J Jpn Soc Hort Sci, 2002, 71(5): 638-642.

[22] Raghotham A K G, Lawton K A, Goldsbrough P B, et al. Characterization of an ethylene-regulated flower senescence related gene from carnation[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17 (1): 61-71.

[23] Park K Y, Drory A, Woodson W R. Molecular cloning of an l-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18 (2): 377-386.

[24] 张树珍, 汤火龙, 杨本鹏, 等. 康乃馨 ACC 氧化酶反义基因遗传转化康乃馨的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(6): 699-702.

[25] 余义勋, 包满珠. 不同结构的外源 ACO 基因导入香石竹对瓶插寿命的影响[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 704-707.

[26] 刘青林, 陈俊愉. 观赏植物花器官主要观赏性状的遗传与改良[J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 81-86.

[27] Zuker A, Tzfira T, Scovel G, et al. rolC transgenic carnation with improved horticultural traits: Quantitative and qualitative analyses of greenhouse grown plants [J]. J Am Soc Hort Sci., 2001, 126: 13-18.

[28] Casanova E, Zuker A, Trillus M I, et al. The rolC gene carnation exhibits to kintin and auxin like activities[J]. Sci. Hortio, 2003, 97: 321-331.

[29] Yu S N, Bae K M. Development of viral disease resistance in Dianthus caryophyllus by transformation of CarMV CP gene II. Plant transformation and expression of CarMV CP gene [J]. J K or Soc Hort Sci., 2002, 43: 471-475.

[30] 林荣呈, 陈龙清, 包满珠. 提高根癌农杆菌介导的香石竹遗传转化效率的研究[J]. 林业科学研究, 2003, 16(2): 123-128.

[31] 熊华斌, 程在全, 王玲先, 等. 国内外转基因花卉的研究进展[J]. 西南农业学报, 2004, 17(S1): 340-346.