

· 综 述 ·

香石竹植株再生及基因工程研究进展

余义勋^{1,2} 刘娟旭¹ 包满珠^{2*}

(1 华南农业大学园艺学院 广州 510642)

(2 华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室 武汉 430070)

摘要 本文对香石竹的再生体系、遗传转化体系及其分子育种现状作了较为系统的总结。香石竹的再生体系多以器官直接再生不定芽为主, 而通过愈伤组织和体细胞胚途径再生报道较少。用农杆菌介导法和基因枪法均可建立香石竹遗传转化体系, 但近年来的研究显示农杆菌介导法应用普遍且比较稳定。近年来以延长香石竹瓶插寿命为目标的分子育种研究已取得较大进展, 对其色、香和形等其他重要性状的分子育种也已经起步, 而有关香石竹抗性的分子育种有待进一步开拓。

关键词 香石竹, 植株再生, 遗传转化

Advances in Plant Regeneration and Genetic Engineering of Carnation

Yixun Yu^{1,2}, Juanxu Liu¹, Manzhu Bao^{2*}

¹ (College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

² (Key Laboratory of Horticultural Plant Biology of Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract This paper reviews plant regeneration, genetic transformation and genetic improvement of carnation (*Dianthus caryophyllus*). Although there were few reports on plant regeneration from callus and somatic embryogenesis, organogenesis is still the principle method for plantlet regeneration of carnation. The genetic transformation systems were established by using *Agrobacterium tumefaciens* and microprojectile bombardment. The agrobacterium-mediated transformation is a stable and commonly used method for genetic improvement of the species. Great progress has been made in prolonging the vase life of carnation flowers of different cultivars. Some progress has also been made on modification of flower color, flower odor and plant form. Work on improving resistance to pests and diseases should be initiated in the future.

Key words carnation (*Dianthus caryophyllus*), plant regeneration, genetic engineering

香石竹(*Dianthus caryophyllus*), 又名麝香石竹和康乃馨, 为石竹科多年生草本植物, 是世界四大切花之一, 被誉为“母亲节”之花, 在花卉市场中占有重要地位。我国香石竹的大

规模切花生产是从20世纪80年代中期以后开始的。目前我国香石竹育种工作远远落后于生产的要求。而且面临着耐储藏运输能力差、病虫害病毒害严重和原有品种退化的问题。

收稿日期: 2005-06-29; 接受日期: 2005-11-29

基金项目: 国家自然科学基金(39970532)和华南农业大学博士启动基金项目。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn

遗传转化近年来成为观赏植物研究的活跃领域之一,首先应用于遗传转化研究的观赏植物有矮牵牛、香石竹、菊花和月季等。近10年来香石竹的遗传转化已取得了长足的进展,在某种程度上已成为花卉遗传转化的模式植物。

1 再生体系的建立

建立一个良好的转化受体系统是植物基因转化的前提和基础。香石竹的组织培养历史较早,组培体系比较成熟。

1.1 器官直接再生不定芽

利用植株外植体不经愈伤组织直接分化不定芽途径,优点是减少组培环节,缩短再生时间,减少不定芽变异等,缺点是用于遗传转化有可能出现嵌合体。香石竹器官直接再生不定芽的报道较多,所用外植体包括叶片、茎段、腋芽、茎尖、花瓣和花丝等,其中以叶片和茎节再生不定芽途径最为成熟,不定芽诱导率也较高。

van Altvoest等(1992)报道用叶片作外植体,叶片基部伤口处直接分化不定芽,其分化率受株龄和叶龄的影响,认为6~7周龄植株的顶芽下3对幼叶最有利于不定芽分化,分化培养基为MS + 0.3 mg·L⁻¹ NAA + 0.9 mg·L⁻¹ BA,分化率达65%,每个叶片分化芽达10个。随后van Altvoest等(1994)又指出对叶片作一些预处理(伤口较宽或多带一些茎组织等),再生率明显提高。Messeguer等(1993)也发现对叶片来说只有叶基部才能分化不定芽,且发现暗培养和增加蔗糖浓度有利于不定芽分化。林荣呈和包满珠(1999)以叶片为外植体也得到相类似的结果。笔者在研究5个香石竹品种的再生中发现,BA和TDZ 2种激素均可诱导叶片分化不定芽,且发现AgNO₃(0~25.0 mmol·L⁻¹)对不定芽分化起抑制作用,5个品种的叶片再生率在38.6%与61.8%之间,主要分化部位是叶片与茎分离后的基部伤口处。

Zuker等(1995)用撕去叶片的茎节作外植

体,分化率达86%,平均每个外植体分化12.1个不定芽。Lubomski和Jerry(1989)也曾用茎节在1/2MS培养基添加一定的激素分化出不定芽,Frey和Janick(1991)用茎节和茎间作外植体得到不定芽。Nontaswatsri等(2002)比较了30多个香石竹品种的叶片和茎节的不定芽分化能力,结果显示其分化能力与品种相关。比较有趣的是,茎节也是在与叶片分离后的伤口部位具有分化能力,分化过程也与叶片相似,接种10天后基部出现小芽点,3周后出现小芽丛。芽诱导基本培养基多为MS,添加激素有a-萘乙酸(a-naphthalene acetic acid, NAA)、6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, BA)和N-苯基-N'-1, 2, 3-噻重氮-5-基脲(N-phenyl-N'-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea, TDZ),且发现BA与TDZ对不定芽诱导有相似的作用。

Frey和Janick(1991)用花瓣作外植体获得不定芽,只有花瓣与花托的连接部位才具有分化能力,这一点与叶片相似,切伤的花瓣分化率比完整的花瓣分化率高,而平均分化芽数比完整的花瓣要低。分化率最高可达90%以上,平均每个外植体可以分化20个不定芽,但伴随着较多的玻璃化、花芽或畸形芽等现象。Messeguer等(1993)用花瓣和花基部作外植体得到相类似的结果。Miller等(1991)用切碎的花芽作外植体,认为主要的芽形成位置是花瓣背面的表皮下细胞,在研究的11个品种中每一单朵花芽可分化70个以上芽,也发现有大量的畸形芽。徐玉冰等(1986)利用花托外植体获得再生芽。Miller等(1991)用腋芽外植体,从腋芽基部伤口处可分化不定芽。

1.2 通过愈伤组织再生不定芽

通过愈伤组织途径,往往扩繁量大,用于基因转化可获得较多的转化植株。香石竹通过愈伤组织再生不定芽比较困难,有关报道亦较少。Radojevic等(1990)用茎段先诱导愈伤,然后诱导出不定芽,诱导率达80%,但愈伤组织经过6次继代之后,就失去分化不定芽的能力。

Ruffoni等(1990)用茎尖分生组织先在固体培养基上诱导出愈伤组织, 再对愈伤细胞悬浮培养10天后, 将悬浮细胞转移到固体培养基上可以获得不定芽, 不定芽再生率为62%~80%。

1.3 体细胞胚途径再生不定芽

该途径的胚性细胞具有很强的接受外源DNA的能力, 且胚状体多为单细胞起源, 是理想的基因转化感受态细胞。目前有关香石竹体细胞胚报道非常少。

Frey 等(1992)用体细胞胚途径获得Scania、Improved White Sim 和 Sandra 3个香石竹品种的再生植株。用茎节先诱导出胚性愈伤组织, 再将其转入胚诱导培养基, 30天后出现胚状体, 每个胚性愈伤可分化4个胚, 但分化率严重受基因型影响。Yantcheva 等(1998)利用叶片作外植体通过直接体细胞胚途径(不经过愈伤组织阶段)获得香石竹再生芽, 经过胚诱导、胚发育、胚成熟和胚生根4个阶段获得再生植株。Nakano 和 Mii(1993)指出某些抗生(如青霉素)可以刺激香石竹体细胞胚发生。

2 遗传转化技术的研究

目前遗传转化技术主要是农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法和基因枪(microprojectile bombardment)法, 二者在香石竹遗传转化中均有应用。转化再生途径基本上都是器官直接再生不定芽途径。

2.1 农杆菌介导法

根癌农杆菌转化系统是目前研究最多且技术方法最成熟的基因转化途径。农杆菌介导法转化体系的研究主要考虑以下几个问题: 基因转化受体的选择, 这是转化成功的关键; 农杆菌的株系、侵染时菌液浓度和预培养时间也影响转化率。香石竹对农杆菌较为敏感, 用农杆菌介导法有较多报道, 所用再生途径主要是器官直接再生途径。Lu等(1991)利用香石竹茎段和花瓣作外植体, 获得转化植株, 以花瓣为外植体的转化率不到茎段的1/10, 共培养过程中适当提

高NAA浓度可提高转化率。Robinson 和 Firoozabady(1993)以花瓣、花丝和叶片作外植体建立了植株再生体系, 将标记基因GUS和NPTII转入体内。van Altvost 等(1995, 1996)以叶片和花瓣作外植体, 用农杆菌介导法获得转化植株。林荣呈等(2003)以幼叶为外植体, 将NPTII基因和bar基因导入香石竹5个品种, 建立了遗传转化体系, 并指出LBA4404菌株转化效率比EHA101菌株高, 最佳预培养时间为2天, 最佳共培养时间为3天, AgNO₃抑制不定芽分化。

2.2 基因枪法

1987年Sanford等发明了基因枪。Zurker等(1995)首次利用基因枪法, 以茎节为外植体建立了香石竹遗传转化体系。随后Zuker等(1999)又将基因枪与农杆菌介导结合起来, 建立起更加高效稳定的遗传转化体系。

3 目的基因的导入及其表达

3.1 延长瓶插寿命基因

香石竹是典型的乙烯致衰植物, 也是研究乙烯代谢的花卉之一。延长瓶插寿命对延长观赏期, 调节流通有重要作用。传统保鲜方法多采用含有Ag⁺的乙烯抑制剂或乙烯拮抗剂等保鲜剂, 但这些化学物质会造成环境污染。关于香石竹切花保鲜基因工程有较多报道(表1)。

Savin 等(1995)将反义ACC氧化酶(ACC oxidase, ACO)ACO基因cDNA导入香石竹, 结果抑制了内源ACO mRNA的表达, 进而抑制了乙烯生成, 使瓶插寿命延长了近1倍。Kosugi等(2002)将正义ACO基因cDNA导入香石竹, 也延缓了花瓣衰老。Bovy等(1999)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。余义勋和包满珠(2004a, 2004b)与余义勋等(2002)从香石竹基因组中克隆到ACO基因, 构建了ACO基因的多种T-DNA结构植物表达载体, 分别导入香石竹不同品种, 瓶插寿命延长2倍以上。孙雷心(1996)报道, 转

化 ACC 合成酶基因的香石竹已经在澳大利亚获准上市。

3.2 色、香、形基因

花青素是香石竹花色构成的主要色素。Tanaka等(1998)报道将正义*CHS*基因导入香石竹,花色由粉红色变浅。Zuker等(2002)通过反义RNA技术抑制了3'黄烷酮羟化酶(flavanone 3-hydroxylase, F3H)基因表达,从而对香石竹品种 Eilat 花色进行了修饰。花色由原来的橘黄色变为白色或淡红色,同时花香味也变浓了。Fukui等(2003)将类黄酮3',5'-羟化酶基因导入香石竹,并指出变蓝色香石竹的获得需要3个条件:翠雀素的产生、类黄酮类似物的共同作用以及花瓣液泡pH达到5.5。林荣呈等(2003)通过农杆菌介导法将植物花青素*C1/Lc*基因导入香石竹品种,使原来的白色花冠变为粉红色。

大多数香石竹芳香味很淡或基本无香气。Lavy等(2002)将仙女扇(*Clarkia breweri*)牻牛儿苗合成酶(linalool synthase)基因导入香石竹,转化植株的叶片与花都产生牻牛儿苗。

香石竹植株形状与花和其他器官的形状与大小对其商业价值的影响也是至关重要的。Zuker等(2001)将*rolC*基因导入香石竹后,侧枝

分化数比对照多48%以上。Casanova等(2003)发现在转*rolC*基因香石竹的4个株系中,*rolC*表现出类似细胞分裂素和生长素的活性,增加了花瓣和叶片芽的再生率以及生根率(表1)。

3.3 抗性基因

Bae和Yu(2002)与Yu和Bae(2002)将香石竹纹斑病毒外壳蛋白基因克隆到二元载体并得到香石竹转化再生苗。林荣呈等(2003)通过农杆菌介导法将*bar*基因导入香石竹品种,获得转化植株。我国的花卉工作者还成功地获得了提纯的香石竹叶脉斑驳病毒外壳蛋白基因的cDNA,并测定了序列,初步确定了该基因,这为利用生物技术培育香石竹奠定了基础(薛淮等, 2002)。

4 香石竹分子育种的展望

香石竹作为一种观赏植物,与食用没有直接关系,且多数香石竹雄蕊瓣化,转基因后不会产生基因漂移现象,因而,香石竹的分子遗传改良具有十分广阔的前景。

香石竹是研究乙烯致衰的模式植物。近些年来,通过抑制乙烯合成途径相关酶(如ACC合成酶(ACC synthase, ACS)和腺苷甲硫氨酸合

表1 不同目的基因导入香石竹一览表

Table 1 The present status of genetic transformation of *Dianthus caryophyllus*

转化受体	品种	转化方法	转化基因	表达效果	参考文献
茎段	Scania 和 White Sim	农杆菌介导	反义 <i>ACO</i>	瓶插寿命延长	Savin et al., 1995
叶片	Nora	农杆菌介导	正义 <i>ACO</i>	瓶插寿命延长	Kosugi et al., 2002
叶片	Lena	农杆菌介导	<i>etr1-1</i>	瓶插寿命延长	Bovy et al., 1999
叶片	Master 和 Mabel	农杆菌介导	正义、反义和重复 <i>ACO</i>	瓶插寿命延长	余义勋和包满珠, 2004a, 2004b
叶片	White Sim	农杆菌介导	<i>CHS</i>	花色变浅	Tanaka et al., 1998
茎段	Eilat、Coket 和 Desio	基因枪	<i>F3H</i>	花色由白变红	Zuker et al., 2002
叶片	White Sim	农杆菌介导	<i>F3'5'H</i>	花色变蓝	Fukui et al., 2003
叶片	Master	农杆菌介导	<i>C1/Lc</i> 、 <i>bar</i>	花色由白变浅红, 抗除草剂	林荣呈等, 2003
茎段	Eilat	农杆菌介导	<i>Lis</i>	香味变浓	Lavy et al., 2002
茎段	White Sim	基因枪	<i>rolC</i>	侧枝数目增加	Zuker et al., 2001
茎段	White Sim	基因枪	<i>rolC</i>	再生率和生根率增加	Casanova et al., 2003

成酶(SAM synthase, SAMS)等)以及降低对乙烯敏感性以延长保鲜期等方面已取得较大研究进展,但是目前已转化的品种仍然太少,如果利用基因工程方法使大多数市场主流品种的瓶插寿命得以延长,将对推动香石竹产业的进一步发展具有重要意义。

香石竹的花色基因工程改良也具有较广阔前景。在构成花色的三大类色素中,对类黄酮和类胡萝卜素的研究较多。对以类黄酮为主要成色物质的香石竹来说,对其进行不同层次的调控,有望培育出丰富多彩的新品种。控制花卉香味的代谢物远比构成色彩的代谢物多,但对芳香这一性状的背景了解很少,有待进一步研究。近期工作重点集中于单萜类物质的合成过程,且在香石竹上得以应用。株型的改良对盆花香石竹显得更为重要,其深入研究可望培育出适合花坛或花境的香石竹品种。

花卉抗性育种是现代花卉育种研究的新热点,而香石竹的病害和虫害都非常严重,因此,利用基因工程技术对其抗性进行改良是一项十分迫切的任务。

参考文献

林荣呈, 包满珠 (1999). 香石竹的叶片培养及植株再生. 植物生理学通讯 35, 205-206.

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

孙雷心 (1996). 首朵 rDNA 花今夏在澳大利亚开放. 生物技术通报 1, 18-18.

徐玉冰, 牛维和, 刘继红 (1986). 麝香石竹的花器官培养植株再生. 植物生理学通讯 3, 42-42.

薛淮, 刘敏, 张纯花, 潘毅 (2002). 花卉分子育种研究进展. 生物工程进展 22(2), 81-85.

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

余义勋, 包满珠 (2004b). 通过转重复的 ACC 氧化酶基因延长香石竹的瓶插期. 植物生理与分子生物学学

报 30, 541-545.

余义勋, 张俊卫, 孙振元 (2002). 香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆与植物表达载体构建. 林业科学研究 15, 256-260.

Bae, K.M., and Yu, S.N. (2002). Development of viral disease resistance in *Dianthus caryophyllus* by transformation of *CarMV CP* gene: I. Development of *CarMV CP* gene expression system for transformation. J. Kor. Soc. Hortic. Sci. 43, 466-470.

Bovy, A.G., Agenet, G.C., Dons, H.J.M., and Van, A.C. (1999). Heterologous expression of the *Arabidopsis etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. Mol. Breed. 4, 301-308.

Casanova, E., Zuker, A., Trillas, M.I., Moysset, L., and Vainstein, A. (2003). The *rolC* gene in carnation exhibits cytokinin- and auxin-like activities. Sci. Hortic. 97, 321-331.

Frey, L., and Janick, J. (1991). Organogenesis in carnation. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 116, 1108-1112.

Frey, L., Saranga, Y., and Janick, J. (1992). Somatic embryogenesis in carnation. HortScience 27, 63-65.

Fukui, Y., Tanaka, Y., and Kusumi, T. (2003). A rationale for the shift in color towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene. Phytochemistry (Amsterdam) 63, 15-23.

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

Lavy, M., Zuker, A., and Lewinsohn, E. (2002). Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. Mol. Breed. 9, 103-111.

Lu, C.Y., Nugent, G., and Wardley-Richardson, T., Chandler, S.F., Young, R., and Dalling, M.J. (1991). *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Biotechnology 9, 864-868.

Lubomski, M., and Jerrzy, M. (1989). *In vitro* propa-

- gation of pot carnation from stem internodes. *Acta Hortic.* **251**, 235-240.
- Messeguer, J., Acconada, M.C., and Mele, E.** (1993). Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Sci. Hort.* **54**, 153-156.
- Miller, R., Kaul, M., and Hutchinson, J. F.** (1991). Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants. *Ann. Bot.* **67**, 35-42.
- Miller, R., Kaul, M., and Hutchinson, J.F.** (1991). Shoot regeneration from fragmented flower buds of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Ann. Bot.* **68**, 563-568.
- Nakano, M., and Mii, M.** (1993). Antibiotics stimulate somatic embryogenesis without plant growth regulators in several *Dianthus* cultivars. *J. Plant Physiol.* **14**, 721-725.
- Nontaswatsri, C., Fukai, S., and Touma, T.** (2002). Comparison of adventitious shoot formation from node and leaf explants of various carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **77**, 520-525.
- Radojevic, B., Djordjevic, N., and Petrovic, J.** (1990). *In vitro* culture techniques for carnation breeding. *Acta Hortic.* **280**, 163-168.
- Robinson, K.E.P., and Firoozabady, E.** (1993). Transformation of floricultural crops. *Sci. Hortic.* **55**, 83-89.
- Ruffoni, B., Massabo, F., and Curir, P.** (1990). Adventive regeneration in cell colonies of carnation. *Acta Hortic.* **280**, 173-176.
- Savin, K.L., Baidoette, S.C., and Graham, M.W.** (1995). Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence. *HortScience* **30**, 970-972.
- Tanaka, Y., Tauda, S., and Kusumi, T.** (1998). Metabolic engineering to modify flower color. *Plant Cell Physiol.* **11**, 1119-1126.
- van Altvast, A.C., Koehorst, H., and Bruinsma, T.** (1994). Improvement of adventitious shoot formation from carnation leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **37**, 87-90.
- van Altvast, A.C., Koehorst, H., and Jong, J.** (1992). Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Sci. Hortic.* **51**, 223-235.
- van Altvast, A.C., Koehorst, H., and Jong, J.** (1996). Transgenic carnation plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of petal explants. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* **169**, 169-173.
- van Altvast, A.C., Riksen, T., and Koehorst, H.** (1995). Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation. *Acta Hortic.* **420**, 92-94.
- Yantcheva, A., Vlahova, M., and Antanasov, A.** (1998). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Rep.* **(18)**, 148-153.
- Yu, S.N., and Bae, K.M.** (2002). Development of viral disease resistance in *Dianthus caryophyllus* by transformation of *CarMV CP* gene. II. Plant transformation and expression of *CarMV CP* gene. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **43**, 471-475.
- Zuker, A., Ahroni, A., and Tzvi, T.** (1999). Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Mol. Breed.* **5**, 367-375.
- Zuker, A., Tzfira, T., and Ben-Meir, H.** (2002). Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Mol. Breed.* **9**, 33-41.
- Zuker, A., Tzfira, T., and Scovel, G.** (2001). *RoIC*-transgenic carnation with improved horticultural traits: Quantitative and qualitative analyses of greenhouse-grown plants. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **126**, 13-18.
- Zurker, A., Lchang, P.E., and Ahroni, A.** (1995). Transformation of carnation by microprojectile bombardment. *Sci. Hortic.* **64**, 177-185.

(责任编辑: 孙冬花)