

生物技术在花卉植物遗传育种上的应用

李辛雷, 陈发棣

(南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

摘要: 生物技术的发展为花卉植物种质资源的研究、创新及新品种培育提供了更多的途径。该文对花卉植物的离体保存、分子标记及细胞工程、基因工程在花卉植物种质创新方面的研究进展及取得的成果进行了综述, 并对存在的问题及今后的发展方向进行了探讨, 以期对相关研究提供参考。

关键词: 花卉植物; 生物技术; 遗传育种

中图分类号: Q941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)02-0134-08

Application of biotechnology in genetics and breeding of flower plants

LI Xin-lei, CHEN Fa-di

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The development of biotechnology opened more ways for the improvement and breeding of flower plants germplasm resources. This paper reviews advances and application of preservation, molecular markers and the innovation of germplasm resources by cellular engineering and genetic transformation for flower plants. Present problems and some suggestion about the prospects of development are put forward.

Key words: flower plants; biotechnology; genetics and breeding

近年来,随着经济发展和生活水平提高,人们对花卉质量的要求越来越高。传统的育种方法逐渐表现出育种周期长、遗传变异有限、引入某一优良性状的同时可能会伴随一些不良性状等局限性。生物技术作为一门新兴学科,为传统育种注入了新的活力,提供了全新的思路。在花卉植物种质资源的保存与研究上,离体保存越来越体现其优越性,而分子标记已成为花卉植物生物技术方面最活跃、应用最多的一项技术。利用生物技术进行种质创新可以从细胞、基因水平定向改造生物,扩大了育种范围,提高了育种效率。

1 种质资源保存

种质保存(germplasm conservation)使个体中

所含有的遗传物质保持其遗传完整性,且有高活力的通过繁殖将其遗传性传递下来。离体种质保存是将植物外植体在无菌环境下进行组织培养,将这些外植体贮存在各类生长抑制条件下,使其缓慢生长或停止生长,以达到长期保存的目的,而后如果需要时可迅速恢复正常生长。相对传统方法而言,离体保存所占空间小,基因型稳定,受外界影响小,恢复快,易于控制。离体保存包括限制生长保存及低温保存、超低温保存。

1.1 限制生长保存及低温保存

限制生长保存通常在培养基中加入生长抑制剂如脱落酸(ABA)、矮壮素(CCC)、B₉、PP₃₃₃、6-BA等,或通过提高蔗糖浓度、加入甘露醇、山梨醇调节培养基的渗透压,也有降低培养基中某些营养物质

收稿日期: 2004-10-12 修订日期: 2004-12-26

基金项目: 江苏省基础计划青年创新人才基金项目(BK2002417);江苏省教育厅高技术产业化项目(JH02-086);江苏省科技攻关项目(BE2001354);江苏省高技术研究(BG2003305)。

作者简介: 李辛雷(1978-),男,硕士生,观赏园艺专业,从事菊花生物技术育种研究。

的浓度来保存种质,另外控制光照和降低培养环境的氧气含量亦有利于限制生长保存。目前通过微繁及控制生长技术保存种质的常用温度范围有 3 种: 常温(15~25 °C)、常低温(15~0 °C)和低温(0~-80 °C)。陈菁瑛等(1998)在切花菊的试管苗保存时发现培养基中添加 10 mg/L B₉ 有利于种质离体保存,延缓生长作用较明显,18 个月时存活率仍达 66.4%;2% 甘露醇有利于离体保存,浓度升高时成活率下降;较弱的光照,菊花的光合作用减弱,有利于缓慢生长;常温(25 °C)处理全部死亡,4 °C、6 °C 处理存活率仅 10%,10 °C、15 °C 的存活率分别达 63.0%、58.7%,说明适当降低温度有利于提高菊花的存活率,且性状正常。菊花植株在 25~27 °C 培养环境中,当氧的分压(PO₂)低于 50 mmHg 时(正常大气中氧分压为 152.0 mm Hg),随着 PO₂ 降低,植株生长量降低,而且对植株的进一步生长没有影响(Bridgen 等,1981)。史永忠等(2000)研究发现铁皮石斛试管苗在 4 °C 黑暗条件下可连续保存 12 个月,并能恢复生长,1/2 MS 和 1/4 MS 培养基上的存活率高于 MS。辛淑英和谢欣(1995)将由不定芽再生的组培苗转入 16~18 °C、光照 1 000 lx 和每天光照 8 h 的低温种质库中保存,结果表明附加甘露醇的 MS 培养基具有增加百合离体种质存活率的作用,其中 MS+甘露醇 2% 处理的效果最好,保存一年后的存活率高达 92.9%。CPRO-DLO 公司将百合活体在 -2 °C 条件下贮存了 3 a,仍未丧失活力(Tuyl 等,1996)。

1.2 超低温保存

超低温(ultra-low temperature)通常指低于 -80 °C 的低温,主要是液氮(-196 °C)及液氮蒸汽相,可降低甚至完全抑制其生活力及基因变异可能性,因此能够保持生物材料的遗传稳定性,有利于解决组织、细胞继代培养及自然界中积累性的突变等变异。目前超低温保存正成为长期稳定地保存植物种质资源的有效手段。刘燕等(2001)对 18 个科 47 种花卉种子进行超低温保存研究,除了两种花卉种子进入液氮后炸裂外,其余 45 种花卉种子保存后都有一定发芽率,有些保存后种子发芽率还高于保存前。结果表明,超低温保存技术可广泛应用于园林花卉种子保存,花卉种子自然含水量状态即可存于液氮中,从液氮中取出后,35~40 °C 温水浴化冻有较高的发芽率。尽管超低温保存已经取得一定进展,但由于需要昂贵的实验设备,实验的实际可操作性,物种的

特性等原因,冷冻前后的遗传稳定性及保存后的再生能力等问题仍需解决,超低温保存在花卉植物上的实际应用仍有一段距离。

2 分子标记应用

作为基因型易于识别的表现形式,遗传标记(genetic markers)在植物种质资源的研究和育种工作中有着十分重要的地位。目前,应用较为广泛的遗传标记有形态标记(morphological markers)、细胞标记(cytological markers)、生化标记(biological markers)和分子标记(molecular markers)。前 3 种标记都是基因表达的结果,是对基因的间接反映,标记数目有限,多态性较差,易受环境条件的影响。而 DNA 分子标记主要通过对供试材料 DNA 指纹图谱比较分析后筛选出的特异带进行资源的鉴定,是 DNA 水平遗传变异的直接反映。DNA 分子标记能对各个发育时期的个体、各个组织器官甚至细胞作检测,不受环境与基因表达与否的限制,数量极多,遍及整个基因组,多态性高,遗传稳定(Janssens, 1995)。所以,DNA 分子标记从它诞生之日起,就引起了生物学家极大的兴趣。在短暂的几十年中,经历了迅猛的发展,分子标记日趋成熟。目前,DNA 分子标记已成为花卉植物生物技术方面最活跃的技术之一,广泛应用于生物遗传多样性、亲缘关系分析,种质资源的系统演化及分类,基因的定位、分离测序及克隆,辅助育种,遗传图谱的构建等方面,并显示了独到的优势(Caetano, 1995)。

2.1 DNA 分子标记在亲缘关系、系统演化及分类研究上的应用

在花卉植物的分类、物种与品种间亲缘关系及系统演化等方面研究中,应用分子标记技术进行的系谱分析可以提供分子水平的客观依据,比传统方法更能反映其间的遗传多样性,有利于育种中亲本的选配及资源的有效利用。目前,蔷薇属、菊属、莲属、绿绒蒿属、百合属等类群已将 RAPD 分子标记应用到系统分类中。Hosoki 等(1997)利用 RAPD 分析中国牡丹(Chinese Treepeony)栽培品种的遗传关系,通过聚类分析揭示中国牡丹品种可大致分为 4 大类,但这些类别并非总是和叶型、花型或花色分类相一致。Jay 等(1989)成功地对粉红康乃馨品种进行了鉴定。Jackson 等(2000)运用 PCR 技术分析微卫星 DNA,对菊花的一些群体进行分子水平上

的研究。Barcaccia 等(1997)利用 RAPD、AFLP 对天竺葵属植物进行品种鉴定以区分表现型相似的个体。陈向明等(2001)对 7 种花系系的 35 个牡丹栽培品种进行 RAPD 分析,发现同一花色的不同品种间和不同花系系间都存在较大的遗传多态性。刘青林等(1999)曾用 RAPD 技术对梅花亲缘关系进行了研究,结果表明梅与杏的亲缘关系最近,与李较近,与山桃、毛樱桃较远。施苏华等(1998)应用 RAPD 技术对 11 种金花茶进行了种间遗传相似性分析,研究其系统发育关系。Hagit(1994)利用 DNA 指纹图谱分析玫瑰的遗传关系。陈新露等(1995)用 RAPD 技术分析了 6 个丁香(*Syringa*)品种间的遗传关系,确认了品种间的发展演化关系。戴思兰等(1998)对菊属 26 个分类居群间的亲缘关系和 7 个野生菊的系统发育关系进行了研究,从分子水平上验证了现代栽培菊花(*Dendranthema morifolium*)是以毛华菊(*D. vestitum*)、野菊(*D. indicum*)种间天然杂交为基础,然后紫花野菊(*D. zawadski*)、菊花脑(*D. nankingense*)等又参与杂交,再经过人工选择形成的栽培杂种复合体。

2.2 DNA 分子标记在花卉植物辅助育种上的应用

在花卉植物辅助育种中,运用 DNA 分子标记可以进行早期选择,提高选择的准确度和育种效率,缩短育种周期。分子标记辅助育种主要应用于杂交亲本的选配,遗传转化中目的基因的检测,遗传变异的检测,远缘及体细胞杂种快速鉴定,无性系、不育系的鉴定,杂种纯度的评估等。花色的不稳定表达是花卉植物转基因存在的一个主要问题,Jain 等(1998)对非洲菊的研究认为,利用分子标记技术可以有效鉴定变异是否可以稳定遗传。Kazvhisia 等(1997)把叶绿体的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶大亚基(vbcl)基因和 rRNA 基因特殊区域的 PCR 扩增产物,用 20 多种限制性内切酶进行酶切的 DNA 限制性片段长度多态性的分析,成功地鉴定百合种间杂种。Malek 等(1997)找到了与月季黑斑病菌抗性基因紧密连锁的分子标记,以便在月季抗黑斑病菌育种过程中,可以通过分子标记方法进行辅助选择,从而提高育种效率。王国良等(2001)使用 RAPD 标记技术对 45 个月季芽变品种进行鉴别,为表型性状极为相近的切花月季品种的分子鉴定提供了可靠的技术手段。吴红芝等(2002)根据菊花 B 病毒(CVB)的外壳蛋白基因序列设计、合成引物,建立了 CVB 快速、灵敏、准确的 RT-PCR 鉴定和检测技

术。

2.3 DNA 分子标记在花卉基因定位、分离及克隆上的应用

基因定位就是将具有某一表型性状的基因定位于分子标记的连锁图中,实现分子连锁图与经典连锁图的整合。在分子标记技术迅速发展的同时,产生了基于单标记分析、区间作图和复合区间作图的 QTL 的统计模型,QTL 定位研究随之快速发展。Iuoras 等(1998)利用 RAPD 分析来确定太阳花中那些与分枝隐性基因相关的标记。荷兰的植物育种与繁殖中心开发了 RAPD 分子标记系统,找到了与百合镰刀菌抗性基因连锁的 RAPD 分子标记(Tuyl 等,1996)。Holton 等(1997)利用矮牵牛 AFLP 构建的连锁图谱发现,FLS 基因(类黄酮合成基因)和 F_1 连锁,而 F_1 位点是控制类黄酮合成的,表明 F_1 是 FLS 的结构基因。利用连锁图谱还对矮牵牛花中控制色素 P450 酶的 $Hf1$ 和 $Hf2$ 基因进行了定位(Holton 等,1997;蔡友铭等,2002)。Dunemann 等(1999)基于北美杜鹃的连锁图谱进行 QTL 分析,对缺绿病和花色这些数量性状进行了定位研究。Scovel 等(1998)利用 RAPD 分子标记找到紧密连锁康乃馨花型的位点标记,然后将 RAPD 标记转换为 RFLP 标记,它能 100% 准确区分康乃馨的中国和美国群体的花型。刘志昕等(2001)已将建兰花叶病毒运动蛋白进行了基因克隆并分析了基因序列,为今后的建兰花叶病毒检测工作奠定了基础。张爱平等(1999)从香石竹上分离香石竹斑驳病毒,应用 RT-PCR 合成并扩增外壳蛋白基因 cDNA。

2.4 DNA 分子标记在花卉基因图谱构建上的应用

遗传图谱(Genetic map)又称连锁图谱(Linkage map),构建遗传图谱是遗传学研究中一个很重要的领域,是对基因组进行系统研究的基础,也是在分子遗传基础上强化育种的依据。基因连锁图在花卉基础遗传研究中有重要的应用价值。首先,它提供了有关性状遗传控制的信息,尤其对那些复合变异类型;其次,连锁图说明了性状变异间的连锁关系;第三,对于控制性状的基因连锁图可以作为路标,指示对有关基因的转化。花卉植物遗传图谱的构建已经开展,如 Holton 等利用 AFLP 构建矮牵牛(*Petunia*)连锁图谱(蔡友铭等,2002)。Dunemann 等(1999)利用 239 个 RAPD 标记,38 个 RFLP 标记和 2 个微卫星标记构建了北美杜鹃(*Rhododendron*)的分子连锁图谱;Sondur 等

(1996)在前人工作的基础上,直接利用 RAPD 标记构建了番木瓜的遗传图谱; Pillay 等(1996)用 RAPD 标记研究啤酒花杂种一代的遗传变异及分离情况,认为其分离比例符合孟德尔遗传规律,并分析了将其用于遗传连锁图谱构建的可行性。

3 种质创新

生物技术深入到细胞水平、基因水平来定向地改造生物,提高了育种的的目的性和可操作性。生物技术在植物上的应用,可打破种间杂交的障碍,扩展遗传物质交流的范围,为种质创新提供了更有利的措施,使品种改良方法现代化和高效化。

3.1 细胞工程

高等植物细胞在生理上的重要特性之一就是细胞全能性(totipotency),即在适宜的条件下,一个植物细胞可形成一个完整的植株。植物细胞工程就是在植物细胞全能性的基础上,利用植物组织和细胞培养及其它遗传操作,对植物进行改良,选育有优良性状的新品种,保存具有重要价值或濒于灭绝的植物种类,使资源的创新达到一个新的水平。1902年 Haberlandt 提出细胞全能性概念,1958年 Steward 等用胡萝卜(*Daucus carota*)体细胞培养成功使其得到首次证实。

3.1.1 单倍体育种 自1964年 Guha 等报道了从曼陀罗(*Datura metel*)首次成功诱导单倍体以来,观赏植物中矮牵牛(*Petunia hybrid*)、郁金香(*Tulipa gesneriana*)等均已获得了单倍体植株。单倍体育种中应用最多的是花药培养,即诱导未成熟花粉改变正常的配子体发育途径,转向雄核发育,再经胚胎发育而形成单倍体植物的方法。花药培养具有选择效率高,快速利用新的种质资源和缩短育种周期等优越性。Arzate 等(1997)在百合花药培养中发现:花粉接种时的发育时期比培养基更重要,单核小孢子早、中期比晚期易产生愈伤组织,冷处理及暗培养有利于诱导愈伤组织。褚云霞等(2001)利用百合品种‘Pollyanna’单核期小孢子进行花药培养得到植株,经染色体鉴定,有25%的单倍体存在。另外单倍体也可通过诱导远缘杂交、异源细胞质、未授粉子房培养等方式来实现。Watannabe(1977)利用野生菊与栽培菊花(*Chrysanthemum makinoi*) $2x(2n=18) \times (Ch. shiwogiku cv. Kinokuniense) $10x(2n=90)$ 、(*Ch. makinoi*) $2x(2n=18) \times (Ch. ornatum)$ $8x$$

($2n=72$)远缘杂交后进行胚拯救,分别得到染色体数为 $2n=46$ 和 $2n=37$ 的杂种,被认为是孤雄生殖,前者外部形态较母本更多地相似于父本,外部形态不同于父本的变异可能是由于母本的细胞质遗传。

3.1.2 体细胞无性系变异的利用 组织培养再生的植株中,存在广泛的变异,称之为体细胞无性系变异。体细胞无性系后代变异广泛,稳定快,能基本保持原品种的特性,这为新品系的选育提供了优越条件。费水章和周维燕(1994)利用菊花花蕾培养,得到了具有变异的植株。裘文达和李曙轩(1983)利用菊花花瓣组培,培育出了3个新的品种。单细胞对外界环境很敏感,一些外界因素(如射线、激光和离子束、冷热处理、盐胁迫等)很容易使其遗传物质发生变异,并且单细胞一旦发生无性系变异之后,细胞团、愈伤组织、植株等各个阶段都会保持这一变异特性,从而保证了再生植株的变异遗传稳定性,在较短时间内获得有利用价值的突变体。此外,变异的细胞(植株)在不同的外界因子胁迫下,将形成不同特性的无性系。体细胞变异的利用,可以得到常规育种中不易得到的变异类型,创建新的种质资源。花卉植物育种目标的多元性,将使体细胞变异的应用前景更为广阔。

3.1.3 幼胚拯救 远缘杂交可以向栽培品种导入近缘种属植物的优良种质,提高栽培作物的抗性和品质,扩大基因库,实现种质创新和培育新的优良品种。但由于各物种间存在生殖隔离,不同的复杂遗传基础,同源性差异,双亲生理上的不协调,胚与胚乳的不亲和及花器官形态、发育的差异等原因,使得远缘杂交很难得到种子,或者杂种种子不萌发,或萌发后夭亡,属、种间杂交成功率较低。利用生物技术可以克服远缘杂交障碍,克服受精前不亲和现象可利用体细胞杂交,而胚拯救技术被认为是克服受精后障碍的有效手段。李容辉等(1992)通过对丁香杂交胚的培养发现幼胚培养能克服杂交种子的败育现象,并且认为花叶丁香与佛手丁香杂交胚离体培养的有效时期是授粉后85~95 d。百合是花卉胚拯救的模式植物,Nakajima(1940)用简单的糖溶液培养成功了 *Lilium speciosum* 与 *L. auratum* 及 *L. speciosum* 与 *L. japonicum* 杂交获得的杂种胚。Asano 等(1977)提出百合胚拯救的基本培养基为 MS 培养基,并提出胚乳看护培养技术。子房切片培养与胚珠培养也是获得远缘杂种的有效方法之一,当胚很小时应先进行子房横切片培养再进行胚珠培养。

Van 等(1991)取百合柱头切割授粉后 7~40 d 的子房进行切片,厚度为 2 mm,成功地获得了种间杂种。Van 等(1990)分别利用百合和郁金香胚珠培养获得杂种。至今在花卉上,胚拯救已经成功地应用于凤仙花属、菊属、葱属、鸢尾属、郁金香属、六出花属、小苍兰属、朱顶红属、马蹄莲属等。

3.1.4 原生质体培养和体细胞杂交 在植物生物技术育种中,原生质体培养具有特殊意义,是细胞杂交和遗传转化的基础。原生质体对外界环境很敏感,一些外界因素(如射线、激光、离子束、冷热处理、盐胁迫等)也很容易使其遗传物质发生变异,在较短时间内获得有利用价值的突变体。熊兴耀等(1995)通过菊花茎段诱导产生的愈伤组织建立了细胞悬浮系,并酶解获得了原生质体。李名扬等(1996)等利用直接酶解花瓣愈伤组织获得原生质体的方法实现了菊花植株再生,Lindsay 等(1997)利用酶解菊花茎尖和幼嫩叶片产生原生质体的方法实现了植株再生。

体细胞杂交指用双亲的体细胞原生质体或其衍生系统进行诱导融合,再经培养、筛选、鉴定等步骤得到细胞杂种。原生质体通过体细胞融合而获得体细胞杂种,从而有效克服远缘杂交上的障碍,扩大亲本组合范围,综合不同物种的遗传信息,丰富现有种质资源。至今有 50 多种植物通过原生质体融合得到的细胞杂种,以茄科、十字花科和芸香科较多,禾本科、豆科和菊科植物也有报道。

由于植物原生质体具有再生植株的全能性,又排除了细胞壁的障碍,因此比其它类型的外植体更容易导入外源基因。王国英和贺普超(1994)用电击法将 *npt II* 基因转入欧白英(*Solanum dulcamara*)的原生质体,获得转基因植株。李国梁等(1999)对青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)叶和下胚轴原生质体进行了遗传转化研究。一些性状改良基因或抗性基因可以通过 PEG 转化方法转入到原生质体,然后再对转化原生质体培养,获得转基因植株,以达到改良品种的目的。

3.2 基因工程

植物基因工程技术指克隆一些特有性状的基因,并通过生物、物理和化学等方法,导入到受体植物细胞,通过组织培养育出转基因植物的生物技术。近年来,基因工程技术为观赏植物性状改良提供了全新的思路,成为最有前途的花卉育种新技术。与传统育种手段相比,基因工程育种具有独特的优势:

可以定向修饰花卉的某个或某些性状而保留其它原有性状;通过引入外来基因可以扩大基因库。所以,通过基因工程完全有可能培育出一些新奇、独特及具有各种目标性状的品种,大大缩短育种周期,提高育种效率。

基因工程在花卉植物育种中的应用重点集中在花色、株型、抗性、花期等方面的改良上。Meyer 等(1987)首次将源自玉米的编码 *DQR* 的 *AI* 基因导入矮牵牛白花突变体中,产生了开砖红色花的矮牵牛。美国加州奥克兰 DNA 植物技术公司研究人员 Courtney-Gutterson 等(1994)用 T-DNA 作为载体将苯基苯乙烯酮合成酶(*CHS*)以有义和反义方向导入开粉红色花的菊花品种'Moneymaker'中,获得了 133 株有义植株和 83 株反义植株,其中各有 3 株开白花和浅粉色花,而剩余植株仍开粉红色花。在开白色和浅粉色花的植株中由于 cDNA 与 mRNA 结合,而使 *CHS* 活性降低,导致苯基苯乙烯酮前体物质咖啡酸含量提高。白花植株通过无性繁殖仍能稳定地遗传,但后代开白花的植株中有一些花为粉红色,这可能是反义 RAN 未能完全抑制 *CHS* 基因表达的缘故。Aida 等(2000)用反义抑制法将 *CHS* 或 *DFR* 基因导入蓝猪耳(*Torenia hybrid*),结果反义方向导入的转化株花色均一变亮,而正义方向导入的转化株花色不均一变亮。

株形是花卉植物一个重要的形态,如用于盆栽或地被用途的小菊,往往需要植株矮化、分枝性强、着花数目多等。Zheng 等(2001)将烟草光敏色素基因导入菊花品种'Kitau'中,获得的转基因植物与对照相比,其株型明显矮化,而且分枝角度要比野生型大。可能是由于光敏色素合成引起 GA_3 过量表达,从而导致茎缩短,多分枝,这与人工喷施 GA_3 取得的效果是相似的。Dolgov 等(1997)将 *rolC* 基因导入菊花品种'White Snowdon'中,获得二个转化系,其中一个系与对照相比,表现为丛生、矮化,并且叶多分裂。Petty 等(2000)把光敏色素基因 *phyA* 导入菊花中,发现菊花的花梗变短,叶绿素增加,并延缓衰老。Yu 等(2000)将 *DOH1* 基因导入石斛(*Dendrobium nobile*),转基因植株分枝性强且矮化。

抗性育种也是花卉育种的一个重要方面。Marchant 等(1998)将几丁质酶基因转入现代月季中,转基因植株黑斑病的发生率大大降低。Takatsu 等(1999)将水稻几丁质酶基因导入菊花品种'Yam-

abiko' 中获得了抗灰霉病 (*Botrytis cinera*) 的转化植株。Dolgov 等 (1995) 将 *Bt* 中的 δ -内毒素基因导入再生能力很强的 'Bornholm' 和 'White Harri- come' 菊花品种中, 获得转化植株, 在不喷施化学药剂的情况下, 植株表现出对扁虱 (web tick) 的抗性。Wordragen 等 (1993) 以离体叶片为材料将 *Bt* 基因转入到菊花品种 'Parliament', 获得了抗虫植株。Kamo 等 (1996) 将菜豆黄斑病毒外壳蛋白基因 (BYMVCP) 和 *Gus* 基因转入唐菖蒲的悬浮细胞中, 获得了转基因植株。Yepes 等 (1999) 将编码番茄斑萎病毒、凤仙坏死斑病毒和花生环斑病毒外壳蛋白的基因导入菊花品种 'Polaris'、'Golden Polaris'、'Iridon' 中, 分别获得了转基因植物。

在花期改良育种中, 邵寒霜等 (1999) 克隆了调控花分生组织启动的相关基因—拟蓝芥 *LFYcD-NA*, 然后转化到菊花中, 转化后代有 3 株与对照相比其花期分别提前 65 d、67 d 和 70 d; 另外有 2 株, 花期分别推迟 78 d 和 90 d。Yu 等 (2000) 用反义抑制法将 *DOH1* 基因导入石斛, 获得转化株, 其花期比对照早 10 d。Zheng 等 (2001) 将 *PHYBI* 基因转入菊花, 转基因植株 LE31 和 LE32 花芽分化比对照植株分别延迟 4 d 和 5 d, 而开花分别延迟 17 d 和 20 d, 表明 *PHYBI* 基因主要影响花芽发育而不是影响花芽分化。

4 结束语

我国被称为“世界园林之母”, 拥有丰富的花卉种质资源, 但我们对种质资源的保存、研究与利用还远远不够。花卉种质资源是遗传育种的前提和基础, 只有掌握了大量的育种材料, 才能培育出新品种。植物生物技术使人类对种质资源的保护、研究和利用达到新的水平, 我们必须加大保护、搜集、整理和评价工作力度, 充分发掘花卉种质资源的优异基因, 加以科学合理的开发利用, 使其为育种工作服务。同时, 花卉植物在长期的演化过程中, 在自然选择和人工选择的双重压力下, 形成了非常丰富的变异类型, 遗传背景较为复杂, 其遗传与生理生化特性的研究还有待深入。加强基础性研究工作, 拓展研究深度与广度, 如构建遗传图谱, 进行重要性状遗传基础研究, 重要性状相关基因定位、分子克隆等, 将对花卉遗传改良及种质创新具有深远意义。生物技术育种是花卉育种的新技术、新领域、新方向, 具有

其独特的优势。生物技术在花卉植物上的应用已经取得了一定成果, 但与农作物和其他园艺作物相比, 仍有待深入。我们应抓住生物技术带来的发展机遇, 充分利用我国丰富的花卉植物种质资源优势及已经取得的研究成果, 结合我国花卉育种现状, 集中力量, 从基础工作做起, 尤其在我国传统特色花卉育种上重点突破, 加强学科交叉, 借助其他学科力量, 加大应用研究, 逐步开展具有本国特色的花卉育种, 振兴我国花卉事业。

参考文献:

- Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y. 2000. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation[J]. *Plant Sci Limerick*, **153**: 33-42.
- Arzate FAM, Nakano T, Yamata H. 1997. Production of doubled-haploid plants from *Lilium longiflorum* Thunb anther culther[J]. *Plant Sci*. **123**(1~2): 179-187.
- Asano Y, Myodo H. 1977. Studies on crosses between distantly related species of Lilies. II. The culture of immature *Hybrid embryos*[J]. *J Japan Soc Hort Sci*, **46**: 267-273.
- Barcaccia G, Tavoletti S, Falcinelli M, et al. 1997. Verification of the partheno genetic capability of unreduced eggs in an *Alfalfa* mutant by a progeny test based on morphological and molecular marker[J]. *Plant Breeding*, **116**: 475-479.
- Bridgen MP, Staby GL. 1981. *Plant Science Letters*, **22**: 177-186.
- Caetano AG. 1995. DNA amplification finger printing analysis of Bermuda Grass: Genetic relationship between species and inter-specific crosses[J]. *Thero Appl Gene*, **91**(2): 228-235.
- Cai YM(蔡友铭), Wu W(武 雯), Zhou HY(邹惠渝), et al. 2002. Application of molecular marker in the study of flowers plants(分子标记在花卉研究中的应用现状)[J]. *J Nanjing Fore Univ(Nat sci)*(南京林业大学学报), **26**(2): 84-86.
- Chen JY(陈菁瑛), Lan HS(兰贺胜), Chen JY(陈景耀). 1998. *In vitro* conservation of chrysanthemum germplasm(菊花种质离体保存研究)[J]. *J Southwest Agric Univ(西南农业大学学报)*, **6**: 638.
- Chen XL(陈新露), Zhao XY(赵祥云). 1995. Analysis of genetic relationship among lilacs (*Syringa*) by RAPD(应用 RAPD 技术评价丁香品种间遗传关系)[J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, **22**(2): 171-175.
- Chen XM(陈向明), Zheng GS(郑国生), Zhang SW(张圣旺). 2001. RAPD analysis of tree peony cultivars(牡丹栽培品种的 RAPD 分析)[J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, **28**(4): 370-372.
- Courtney-Gutterson N, Napoli C, Lemieux C. et al. 1994. Modification of flower color in florist's chrysanthemum; pro-

- duction of a white-flowering variety through molecular genetics[J]. *Bio/Technology*, **12**(3): 268-271.
- Dai SL(戴思兰), Chen JY(陈俊愉), Li WB(李文彬). 1998. Application of RAPD analysis in the study on the origin of Chinese cultivated chrysanthemum(菊花起源的 RAPD 分析)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **40**(11): 1 053-1 059.
- Dolgov SV, Mitouchkina TY, Skryabin KG. 1997. Agrobacterial transformation of chrysanthemum[J]. *Acta Hort*, **447**, 329-334.
- Dolgov SV, Mityshkina TU, Rukavtsova EB, et al. 1995. Production of transgenic plants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat with the gene of *Bac. thuringiensis* δ -endotoxin [J]. *Acta Hort*, **420**: 40-47.
- Dunemann F, Kahnau R, Stane I. 1999. Analysis of complex leaf and flower characters in *Rhododendron* using molecular linkage map[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**: 1 146-1 155.
- Fei SZ(费水章), Zhou WY(周维燕). 1994. Studies on morphological and cytological variation of chrysanthemum(切花菊再生株的形态和细胞学变异的研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **21**(2): 193-198.
- Hagit BM. 1994. Alexander Vainstein Assessment of genetic relatedness in roses by DNA finger print analysis[J]. *Sci Hort*, **58**: 115-121.
- Hosoki T, Kimura D, Hasegawa R. 1997. Comparative study of Chinese Treepeony cultivars by random amplified polymorphic DAN(RAPD) analysis[J]. *Sci Hort*, **70**(1): 67-72.
- Iuoras M, Patrascu M. 1998. A marker gene collection and RAPD markers for recessive breeding in sunflower [A]. Proceedings of the Fourth European Conference on Sunflower Biotechnology[M]. France; Montpellier.
- Jackson JA, Matthews D, Cooper W, et al. 2000. Investigation of microsatellite profiling for DUS in chrysanthemum [J]. *Acta Hort*, **521**: 243-253.
- Jain SM, Vitti D, Grassotti A. 1998. Biotechnology and mutagenesis in *Gerbera* improvement[J]. *Advance in Horticultural Science*, **12**(1): 47-53.
- Janssens GA. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR Theor[J]. *Appl Genet*, **91**(4): 691-698.
- Jay M, Ferrero F. 1989. An integrated varietal identification approach using modern technology application to pink carnation varieties[J]. *Plant Varieties and Seeds*, **2**(1): 63-71.
- Kamo K, Blower A, Mcelroy D. 2000. Effect of the cauliflower mosaic virus 35S, actin, and ubiquitin promoters on uidA expression from a Bar-uidA fusion gene in transgenic *Gladiolus* plants[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, **36**: 13-20.
- Kazvhisia H, Hosoki T. 1997. Possibility of classification in some species of *Lilium* by PCR-RFLP of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Large subunit(rbcL) Gene and Ribosomal RNA Gene[J]. *J Japan Soc Hort Sci*, **66**(1): 189-192.
- Li GL(李国梁), Zhong ZX(钟仲贤), Li X(李 贤). 1999. Transformation of *Brassica oleracea* var. *italica* cotyledons and hypocotyl protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens* (青花菜子叶和下胚轴原生质体的遗传转化系统)[J]. *Acta Agric Shanghai*(上海农业学报), **15**(1): 28-32.
- Li MY(李名扬), Chen W(陈 薇). 1996. Plant regeneration from protoplast of petal callus of *Dendranthema morifolium* (菊花花瓣愈伤组织原生质体再生植株)[J]. *J Agric Biotechnology*(农业生物技术学报), **4**(3): 243-248.
- Li RH(李容辉), Zang SY(臧淑英), Zhang ZM(张治明). 1992. Study on hybrid embryo of *Syringa persica* \times *S. vulgaris* 'alba-plena' *in vitro* culture(丁香杂交胚离体培养的研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **19**(2): 187-188.
- Lindsay GC, Leder SE. 1997. A protoplast to plant system for the chrysanthemum[J]. *Acta Hort*, **447**: 329-332.
- Liu QL(刘青林), Chen JY(陈俊愉). 1999. A preliminary research on the relationship of *Prunus mume* cultivars and its close relations by using RAPD Assay(梅花亲缘关系 RAPD 研究初报)[J]. *J Beijing Fore Univ*(北京林业大学学报), **21**(5): 76-81.
- Liu Y(刘 燕), Zhou H(周 慧), Fang B(方 标). 2001. The study of ultra-low temperature conservation on seed of ornamental plants(园林花卉种子超低温保存研究)[J]. *J Beijing Fore Univ*(北京林业大学学报), **23**(4): 39-44.
- Liu ZX(刘志昕), Wu H(吴 豪), Pan JS(潘俊松), et al. 2001. Cloning and sequencing of movement protein gene of *Cymbidium mosaic virus*(建兰嗜病毒运动蛋白基因克隆及序列分析)[J]. *Virologica Sin*(中国病毒学), **1**: 13-17.
- Malek BV, Weber WE, Debener T. 1997. Identification of molecular markers linked to Rhrl, a gene conferring resistance to blackspot in roses[J]. *Theor Appl Genet*, **101**: 977-983.
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, et al. 1996. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf.) [J]. *Molecular Breeding*, **4**: 187-194.
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G. 1987. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene[J]. *Nature*, **330**(614): 677-678.
- Nakajima T. 1940. Studies on embryo culture in plants; Embryo culture of interspecific hybrids in lilies[J]. *Japan J Breed*, **8**: 105-110.
- Petly LM, Thompson AJ, Thomas B. 2000. Modifying chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) growth habit genetic manipulation[J]. *Acta Hort*, **508**: 319-321.
- Pillay M, Kenny ST. 1996. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*; level of genetic variability and segregation in F1 progeny[J]. *Theor*

- Appl Genet*, **92**: 334—339.
- Qiu WD(裘文达), Li SX(李曙轩). 1983. Some new types obtained from petal tissue culture of chrysanthemum(菊花花瓣培养再生植株)[J]. *Acta Agric Univ zhejiang*(浙江农业大学学报), **9**(3): 243—246.
- Scovel G, Hben M, Ovadis M, et al. 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation(*Dianthus caryophyllus*) flowertype[J]. *Theor Appl Genet*, **96**: 117—122.
- Shao HS(邵寒霜), Li JH(李继红), Zheng XQ(郑学勤), et al. 1999. Cloning of the LFY cDNA from *Arabidopsis thaliana* and its transformation to *Chrysanthemum morifolium*(拟南芥 LFYcDNA 的克隆及转化菊花的研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **41**(3): 268—271.
- Shi SH(施苏华), Tang SQ(唐绍清), Chen YQ(陈月琴), et al. 1998. Phylogenetic relationships among eleven yellow-flowered *Camellia* species based on RAPD(八种金花茶植物的 RAPD 分析及其系统学意义)[J]. *Acta Phytota Sin*(植物分类学报), **36**(4): 317—322.
- Shi YZ(史永忠), Pan RC(潘瑞焱), Wang XJ(王小菁), et al. 2000. In vitro conservation of *Dendrobium officinale* at low temperature(铁皮石斛种质资源的低温离体保存)[J]. *China J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), **6**(4): 326—330.
- Sondur SN, Manshardt RM, Stiles J. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA marker[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, **93**: 547—553.
- Takatsu Y, Nischizawa Y, Hibi T, et al. 1999. Transgenic chrysanthemum(*Dendranthema grandiflorum* (ramat) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold(*Botrytis cinerea*)[J]. *Sci Hort*, **82**: 113—123.
- Tuyl JM, Holsteijn HCM. 1996. Lily breeding research in the Netherlands[J]. *Acta Hort*, **414**: 35—45.
- Van Tuyl JM, Bino RJ, Custers JBM. 1990. Application of in vitro pollination ovary culture, ovule culture and embryo rescue techniques in breeding of *Lilium*, *Tulipa* and *Nerine* [A]. In: De Jong(ed). *Integration of In vitro Techniques in Ornamental Plant Breeding*[M]. Wageningen: CPO P, 86—97.
- Van Tuyl JM, Van Dein MP, Van Creij M, et al. 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses[J]. *Plant Science*, **74**: 115—126.
- Wang GL(王国良), Wu SQ(巫水钦). 2001. Study on the discrimination of cut rose varieties and their sports by means of RAPD(切花月季芽变品种的分子标记与鉴别研究)[J]. *J Jiangsu Fore Sci & Tech*(江苏林业科技), **28**(1): 1—9.
- Wang GY(王国英), He PC(贺普超). 1994. Transformation of *Solanum dulcamara* protoplasts and regeneration of transgenic plants(电击法诱导的欧白英原生质体转化和转化植株再生)[J]. *Chinese J Biotechnology*(生物工程学报), **10**(1): 24—29.
- Watannabe K. 1977. Successful ovary culture and production of F₁ hybrids and androgenic haploids in Japanese chrysanthemum species[J]. *J Heredity*, **68**: 317—320.
- Wordragen MF, Honee G, Dons HJM, et al. 1993. Insect-resistant chrysanthemum calluses by introduction of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene[J]. *Transgenic Res*, **2**: 3, 170—180.
- Wu HZ(吴红芝), Kong BH(孔宝华), Chen HR(陈海如), et al. 2002. Detection of chrysanthemum virus B by RT-PCR(RT-PCR 检测菊花 B 病毒的研究)[J]. *J Southwest Agric Univ*(西南农业大学学报), **24**(2): 115—117.
- Xin SY(辛淑英), Xie X(谢欣). 1995. The effects of mannitol on in vitro conservation of lily germplasm(甘露醇浓度对百合种质离体保存的影响)[J]. *Crop Genetic Resources*(作物品种资源), (3): 50—52.
- Xiong XY(熊兴耀), Long YL(龙岳林). 1995. Plant regeneration from protoplasts of chrysanthemum(菊花原生质体培养及植株再生)[J]. *J Southwest Agric Univ*(西南农业大学学报), **6**(2): 115—118.
- Yepes LM, Mittak V, Slightom JL, et al. 1999. *Agrobacterium tumefaciens* versus biolistic-mediated transformation of the chrysanthemum cvs. Polaris and Golden Polaris with nucleocapsid protein genes of three tospovirus species[J]. *Acta Hort*, **482**: 209—218.
- Yu H, Yang SH, Goh CJ. 2000. DOH1 a class 1 know, is required for maintenance of the basic plant architecture and floral transition in orchid[J]. *Plant Cell*, **12**: 2 143—2 159.
- Zhang AP(张爱平), Yue Y(岳颖), Ye R(叶荣), et al. 1999. Isolation of TNF-induced genes expressing in the endothelial cells(香石竹斑驳病毒 CarMVsh 外壳蛋白基因克隆及原核表达)[J]. *J Fudan Univ*(Nat sci)(复旦大学学报(自然科学版)), **38**(5): 489—496.
- Zheng ZL, Yang ZB, Jang JC, et al. 2001. Modification of plant architecture in chrysanthemum by ectopic expression of the tobacco phytochrome B1 Gene[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, **126**(1): 19—26.
- Zhu YX(褚云霞), Chen LQ(陈龙清), Huang YW(黄燕文), et al. 2001. Studies on anther culture of lily(百合的花药培养研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **28**(5): 472—474.