

花色模式植物—非洲紫罗兰

裴仁济, 陈小强, 孙 宁, 张乃楠, 张 宁, 张 磊

(天津农学院 植物细胞工程研究中心 天津 300384)

摘 要: 综述了非洲紫罗兰形态特征以及研究进展, 从分子水平上概述了建立花色模式植物—非洲紫罗兰所应具备的基因工程技术条件, 阐述了花色素种类、花色影响因素和花色改变途径, 并提出展望。

关键词: 非洲紫罗兰; 模式植物; 分子标记; 基因图谱; 展望

中图分类号: S 682.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)11-0219-04

随着全球经济的快速发展, 科学技术的提高、人类精神文明的加强以及生活质量的改善, 世界花卉产业取得了长足发展, 在种植业中具有较高设施化发展条件和经济效益。但是, 由于缺少创新品种, 近年来花卉产业的生产附加值不断降低, 大大减缓了花卉产业发展速度。分子生物技术的发展为花卉品种创新带来新的机遇, 针对花色研究植物多样的问题, 建立花卉模式植物, 是从分子水平上了解花色差异机理的根本途径。通过拟南芥、苜蓿、酵母菌、大肠杆菌等多个模式生物对研究价值的体现, 将非洲紫罗兰作为花卉花色模式植物来研究具有深远的意义。

1 非洲紫罗兰概述

1.1 非洲紫罗兰形态特征

非洲紫罗兰(*Saintpantia ionantha*), 又称非洲堇、非洲紫苣苔或圣包罗花, 为苦苣苔科非洲紫罗兰属多年生常绿草本植物, 原产于非洲坦桑尼亚海拔 700~1 000 m 的坦葛尼喀地区的乌桑巴拉山上^[1]。非洲紫罗兰株高一般 15~30 cm, 全株表面长有绒毛。叶片基生, 卵圆形或长圆状心形, 长 6~7 cm, 肉质, 全缘, 先端钝。叶面暗绿色, 叶背浅绿色, 略带红晕。总状花序, 花序梗较长, 高出叶丛。花单生或聚生, 花冠阔钟形, 花径 2~3.5 cm, 二唇状, 上唇 2 裂, 下唇 3 裂, 裂片椭圆形, 蒴果有毛。性喜半阴、温暖、湿润环境, 生长适宜温度为 18~26℃。花期每次 1~2 月。花卉品种繁多, 花色艳丽, 包括蓝色、粉红色、红色、紫色、砖红色、绿色及白色等不同色系, 园艺品种达 2 000 多个, 具有较高的观赏价值, 是国际上著名的室内盆栽花卉, 被称为室内花卉皇后^[2]。其栽培特点:

第一作者简介: 裴仁济(1982-), 男, 江苏人, 硕士, 研究方向为植物细胞工程育种。

通讯作者: 张磊(1952-), 男, 本科, 教授, 现主要从事植物细胞工程方面研究工作。E-mail: zll1952@yahoo.com.cn

基金项目: 天津市科技支撑计划重点资助项目(09ZCKFNC01600)。

收稿日期: 2010-03-16

繁殖方便, 生活周期短, 一般扦插叶片繁殖, 幼苗到花期一般为 3~5 月, 每年有 3~4 次花期, 且花期时间长; 生长条件适宜; 花色多, 便于建立色素及相关基因在同一花卉中代谢途径和分子机制的研究, 克服了不同色素在不同花卉中研究的缺陷, 有利于花色基因图谱建立; 基因组小, 染色体少, 染色组为 $2n=4x=28$; 可自花或异花授粉。

1.2 非洲紫罗兰作为花色模式植物的条件

模式生物是指在人们研究生命现象过程中长期、反复作为研究材料的物种, 模式生物研究中得出的许多生命活动规律往往代表了许多物种共同的规律^[3]。随着生物技术不断进步, 植物基因组研究发展迅速, 包括拟南芥、苜蓿、玉米、水稻、高粱等都完成了基因图谱的建立, 为进一步深入研究打下了良好的基础。但对于花卉, 在分子水平上的研究相对较少或分散, 至今没有建立模式花卉研究材料, 虽然拟南芥、金鱼草和矮牵牛等常作为花卉研究辅助材料, 但由于自身特点的限制, 缺乏从系统上建立花卉各个性状基因图谱, 尤其在花色方面, 花色代谢途径都是通过研究不同花卉基础上建立的, 这样就不能从整体上把握花色的显色机制。通过对非洲紫罗兰的初步研究, 其具备作为花卉花色模式植物的基本条件, 对花卉产业发展有着深远的影响。

1.3 非洲紫罗兰研究应用

非洲紫罗兰繁殖的方法一般包括种子繁殖、叶片扦插和组织培养。由于非洲紫罗兰种子不易收集和扦插繁殖周期较长, 大多采用组织培养方法获得再生植株, 繁殖系数提高近百倍。刘爱华等以红花和紫花非洲紫罗兰品种叶片为外植体, 筛选出叶片愈伤组织诱导最适培养基 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 不定芽增殖最适培养基 MS+KT 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 试管苗生根培养基 BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+活性炭 0.2 mg/L; 试管苗移栽土质为腐质土最好^[4]。曹秀敏等对非洲紫罗兰组织培养研究表明各培养阶段的最适培

培养基分别为:芽诱导培养基 MS+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA;芽分化培养基 MS+1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;壮苗培养基 MS+0.1 mg/L NAA;生根培养基 1/2MS+0.2 mg/L IBA^[5]。Wanglei 等从非洲紫罗兰两侧与辐射对称花中分离得到 SiCYC1A 和 SiCYC1B 两个 CYC 类完整基因,并进行序列分析^[6]。课题组对非洲紫罗兰进行了染色体核型分析,得出其染色体组为四倍体,每个染色体组包含 7 条染色体。另外,选用白色、红色和蓝色植株叶片,利用原子火焰吸收光谱法检测了 Cu、Zn、Mg 等 8 种金属离子,在不同的花色叶片中金属离子存在明显差异,表明其分布与花色差异具有一定相关性(待发表)。

2 非洲紫罗兰花色研究具备的条件

2.1 分子标记技术

广义的分子标记(Molecular marker)是指能够遗传且能被检测到的 DNA 序列或蛋白质标记。狭义的分子标记只特指 DNA 标记,DNA 分子标记是指反映生物个体或种群间基因组中某种序列差异特征的 DNA 片段,可直接反映基因组 DNA 间的差异^[7]。第一类是以 Southern 杂交为基础的分子标记,主要包括限制性片段长度多态性(RFLP)、可变数目重复位点(VNTR)以及原位杂交等。第二类是以 PCR 为基础的分子标记,主要包括随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、简单重复序列标记(SSR)、扩增片段长度多态性(AFLP)、特征序列扩增区域(SCAR)以及序列标记位点(STS)等。第三类是新型的分子标记,主要包括单核苷酸多态性(SNP)和表达序列标签(EST)等^[8]。刘昌龙等人利用 RAPD 技术构建了桂花的 DNA 图谱用于品种鉴定^[9]。谢伟等运用 RAPD 技术对中国兰花进行分类和种质资源的鉴定,取得了较好的稳定性和重复性^[10]。张克中等通过 RAPD 和 AFLP 技术对 30 份野百合亲缘关系和遗传多样性进行了初步的研究^[11]。目前,分子标记技术在花卉上的运用大多还停留在分类、亲缘分析以及品种鉴定上,如何利用分子标记技术为花色改变创造条件是花卉新品种创新的出发点。

2.2 建立遗传图谱

遗传连锁图谱是指通过遗传重组分析得到的基因位于染色体上的线形排列图,通常用遗传重组值表示基因间距离。构建高密度的分子标记遗传连锁图谱,可以为基因定位、物理图谱构建和以图谱为基础的抗性基因克隆奠定基础,还可为分子标记辅助选择创造条件。因此,遗传图谱可作为花卉花色研究的理论依据和基础。Debene. T 等研究小组通过利用二倍体月季杂交分离群体建立了第一个月季的基因组连锁图,总共分析了 365 个 RAPD、AFLP 标记、8 个 RFLP 片段和 5 个 SCAR 标记,定位了园艺性状相连锁的双倍花、桃红色花色、花瓣

数和黑斑病抗性等基因位点^[12]。Dunemann 等利用 329 个 RAPD 分子标记、38 个 RFLP 分子标记和 2 个微卫星标记构建了北美杜鹃的连锁遗传图谱,并通过了 QTL 分析,对缺绿病和花色等数量性状进行定位^[13]。所以,根据非洲紫罗兰花色多的特点,利用分子标记技术,可以将不同花卉中表达的花色基因在同一花卉植株中进行基因定位,建立花色的基因文库,为花色研究奠定基础,品种创新提供新的动力。

3 花色研究应用

3.1 色素种类及影响因素

花色主要通过花瓣色素而呈现出来,一般分为三大类。第一类为黄酮类色素,包括花青苷(如天竺葵色素、矢车菊色素、翠雀色素等)和黄酮、黄酮醇(如槲皮酮、6-羟槲皮酮、杨梅黄酮等)、苯基苯乙烯酮(如苯基苯乙烯酮柚配质、紫柳因)和噢 κ (如金素定)都溶于水。第二类为胡萝卜素类色素,难溶于水,以结晶或沉淀的形式存在于细胞质的质粒中,又称为质粒色素类,包括有红、橙、黄色素在内的一大色素类群,存在于花瓣中的多为 β -胡萝卜素和莖菜黄质,它常与噢 κ 一起共同成色,是玫瑰、水仙、郁金香、百合、紫罗兰等黄色花的来源。第三类是与生物碱有关的其它水溶性色素,如甜菜素、小檗碱、罂粟碱等。甜菜素是生物碱,包括产生红色或紫色的甜菜色素和产生黄色的甜黄质,罂粟碱使罂粟目的罂粟属和绿绒蒿属植物产生黄色,小檗碱使毛茛目的小檗属植物呈深橙色,其都是生物碱的衍生物^[14]。

影响花色成色因素:花色素结构:花色素苷所带的羟基数、羟基甲基化程度、糖基化种类、数目以及与糖基相连的脂肪或芳香族酸都是花色变化的因素。特别是花色素苷 B 环的羟基化是花色变化的主要因素;共色作用:共色作用是指类黄酮及其它有关化合物与花色素苷一起呈现增色效应及红移,产生从紫色到蓝色的色系;螯合作用:细胞液中存在 Al、Fe、Mg、Mo 等重金属离子,常与色素螯合,在一定程度上改变了花色,往往偏向紫色;pH 值:细胞液 pH 值发生变化,常引起花色变化,花青苷受 pH 值影响最大,酸性时呈红色,中性时呈淡紫色,碱性时则呈蓝色;花瓣细胞的形状:花瓣色素的颜色被具有各种结构的细胞所包围,从而改变了入射光线。一般认为圆锥型可以增加入射光进入表皮细胞的比例,入射光碰到有角度的圆锥型细胞会发射进入表皮细胞,若碰到没有角度的扁平细胞则完全反射回去,所以具有圆锥型突起的花瓣细胞可以吸收较多的光线,而使颜色变深^[15]。

3.2 花色代谢关键基因和改变途径

3.2.1 关键基因 由于类胡萝卜素和生物碱类色素研究较少,研究和应用最多的是花色素苷的相关基因。根据花色素苷代谢途径,分离得到的结构基因主要包括

CHS 基因、*F3H* 基因、*F3'H* 基因、*F3'5'H* 基因、*DFR* 基因、*ANS* 基因及 *3GT* 基因等, 调节基因主要为从玉米中获得的 *r.s.sn.lc.b.ci.pl.vpl* 基因等、从金鱼草中获得的 *del.def* 基因、从矮牵牛中克隆的 *an2.an4* 基因、百日草中的 *ted3* 基因、龙胆中获得的 *uchs1* 基因等和矮牵牛中已经定位了 7 个与 pH 值相关的基因 *Ph1-Ph7*, 其中 *Ph6* 的基因已被分离得到^[19]。

3.2.2 改变途径 反义基因技术: 利用反义基因转录产生的反义 RNA 抑制目的性状基因的表达, 进而修饰目标性状的方法。Firoozabady 将菊花的 *CHS* 基因与 cDNA 反向连接于 CaMV 的 35S 启动子上, 再连接双元载体 Bin19 转入矮牵牛, 使花色由紫红色变为粉红色并夹有白色, 有些花朵则表现为纯白色^[17]。共抑制法: 通过正向导入 1 个或几个内源基因的额外拷贝, 反而抑制该内源基因转录产物 mRNA 的积累, 进而抑制该内源基因的表达。该技术在矮牵牛、蓝猪耳等花卉的花色修饰方面已取得成功^[18]。共抑制引起花色多样性的分子机理目前还不是很清楚, 可能是由于同源顺序的存在产生共抑制效应, 导致基因互作效应。李艳等将 *chsA-uidA* 融合基因导入矮牵牛中, 得到了转基因植株, 花色发生了明显的改变, 共抑制率几乎达到了 100%^[19]。外源目的基因导入法: 将欲修饰的植株中导入原先不具有的一个或几个基因, 从而使该受体植物增加一个或几个新的性状, 通过转录调控因子引入花卉中, 在原来不产生某种色素的组织中有新的色素形成。包满珠等将 *C1* 和 *Lc* 基因转入矮牵牛后, 部分转基因植株的花冠筒由白色变为粉红色。Meyer 等将由玉米的编码 *DFR* 基因的 A1 基因导入矮牵牛白花突变体中, 结果产生了开砖红色花的矮牵牛^[20]。核酶技术: 利用核酶可特异性切断 mRNA 分子, 使基因发生转录后的沉默。将特异的核酶导入花卉细胞内使其抑制目标性状的关键酶基因的表达, 从而达到改良花色的目的。

4 展望

进入 21 世纪, 科学技术一如既往迅猛发展, 人类生活水平也在不断改善和提高, 但花卉产业发展速度正在放缓, 究其原因, 传统的花卉育种方法培育花卉新品种的速度已不能满足人们对花卉欣赏需求。如何打破这个瓶颈, 走花卉创新途径是根本, 其中花卉花色改变是重要的突破口。当今, 利用基因工程技术改变花色已经取得了一些成果, 但如何让花色在后代中保持稳定, 是一个有待进一步研究的课题。所以, 利用非洲紫罗兰作为花色模式植物研究, 可以从各个方面探寻花卉花色显色机制, 比如色素、共色作用、pH 值、金属离子等之间相互作用的关系, 利用分子标记技术和花色代谢途径图, 克隆花色关键酶基因以及影响这些基因表达的调控基因, 建立花色代谢基因遗传图谱, 为从分子水平上实现

花色真正改变提供可行的研究途径。与此同时, 还要加大花卉产业基础研究的投入, 科研上增加研究项目, 生产流通上建立战略性花卉生产基地, 真正实现花卉生产规模化、工厂化和产业化, 逐步增强我国在花卉国际市场上竞争的市场份额, 促进经济发展, 为人们带来和谐生活。

参考文献

- [1] 王连英, 秦奎杰, 吴添新, 等. 花卉学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988: 498-500.
- [2] 陆帅, 董永辉, 陈佳. 非洲紫罗兰形态特征及繁殖技术[J]. 现代农业科技 2009 43(6): 39-40.
- [3] 魏臻武, 盖钧镒. 豆科模式植物—蒺藜苜蓿[J]. 草业学报, 2008, 17(1): 114-120.
- [4] 刘爱华, 张耀华, 张慧英. 非洲紫罗兰的组织培养[J]. 农业与技术 2005, 25(5): 119-122.
- [5] 曹秀敏, 刘宏敏, 张明, 等. 非洲紫罗兰的组织培养和植株再生[J]. 河南大学学报, 2005, 35(2): 61-62.
- [6] WANG Lei, GAO Qiu, WANG Yin-zheng et al. Isolation and sequence analysis of two CYC-like genes SlCYC1A and SlCYC1B from zygomorphic and actinomorphic cultivars of *Saintpaulia ionantha* [J]. Acta Phytotaxonomica Sinica 2006, 44(4): 353-361.
- [7] 李丽, 王海岗, 张晓丽, 等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 山西农业科学, 2008 36(3): 15-18.
- [8] 刘朝显, 睦顺照, 郭丽, 等. 分子标记在观赏植物研究中的应用[J]. 现代农业科学与技术, 2008, 7(6): 6-8.
- [9] 刘龙昌, 向其柏, 刘玉莲. RAPD 标记在桂花遗传多样性检测和品种鉴定中的应用[J]. 南京林业大学学报, 2004, 28(21): 76-82.
- [10] 谢伟, 乐超银, 周艳. 5 种中国兰花 RAPD 反应条件的优化[J]. 热带农业科学, 2005 25(4): 19-23.
- [11] 张克中. 百合种质扩繁、亲缘关系及雄性不育诱导研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2003: 1-2.
- [12] Debener T, Mattiesch L. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 1999 99(6): 891-899.
- [13] Dunemann F, Kahnau R, Stane I. Analysis of complex leaf and flower characters in *Rhododendron* using a molecular linkage map. Thero Appl Genet, 1999 98(6-7): 1146-1155.
- [14] XU Ji-zun, WANG Li-hu. Advances in the Transformation of Flower Color Gene in Ornamental Plant [J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2006 8(5): 56-60.
- [15] Li Feng-lan, Hu Guo-fu, HU Bao-zhong. Advances in Flower Color Gen [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2004 35(5): 627-633.
- [16] ZHANG Long, Li Wei-hua, JIANG Shu-mei, et al. Progress of Molecular Basis of Biosynthesis and Transcriptional Regulation of Anthocyanins [J]. Acta Horticulturae Sinica 2008 35(6): 909-916.
- [17] Zuker A. Genetic engineering for cut-flower improvement [J]. Biotech Advances, 1998, 16(1): 33-79.
- [18] Chuck G, Robbins T, Nijjar C. Tagging and Cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element activator [J]. The Plant Cell 1993(5): 371-378.
- [19] 李艳, 惠有为, 张仲凯, 等. 查尔酮合成酶基因对矮牵牛花抑制的研究[J]. 中国科学 C 辑, 2001, 31(5): 401-407.
- [20] Meyer P, Heidmann I, Forkmann G. A new petunia flower colour gene nated by transformation of mutant with maize gene [J]. Nature, 1990 330: 677-678.

桔梗种质资源评价与创新研究进展

陈庆亮, 单成钢, 倪大鹏, 张教洪, 朱京斌, 王志芬

(山东省农业科学院 原子能农业应用研究所, 山东 济南 250100)

摘要: 归纳了桔梗种质资源的化学评价、农艺性状评价、分子评价、创新与利用研究的主要进展, 讨论了桔梗种质资源评价及创新中存在的问题和不足, 并对其研究前景进行了展望。

关键词: 桔梗; 种质资源; 育种; 资源评价; 种质创新

中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)11-0222-03

桔梗 (*Platycodon grandiflorum* Jacq. A. DC.) 为桔梗科桔梗属植物的根, 具有宣肺、利咽、祛痰、排脓之功效^[1], 是极具开发前景的药、食、赏兼用经济作物。桔梗种质资源的评价及创新是桔梗育种和栽培的基础性研究。现有研究工作主要集中于桔梗种质资源的化学评价、农艺性状评价、分子评价、创新与利用等。鉴于桔梗种质资源评价与创新对今后桔梗高密度遗传图谱建立及新品种选育的重要性, 现就种质资源评价及创新的关键问题进行了系统分析和综述, 拟为桔梗种质资源研究与利用提供参考。

1 化学评价

20 世纪 90 年代前后, 一些学者为研究栽培桔梗与野生桔梗、生长不同年限桔梗等质量的差异, 对桔梗种

质资源的总氨基酸、总糖、总皂苷(或者皂苷 A、B、D)含量进行了比较, 研究表明, 不同产地桔梗总氨基酸和桔梗总皂苷(或者桔梗皂苷 A、B、D)含量有差异^[2-4]; 但亦有相反的结论, 即不同产地桔梗总皂苷含量没有差异^[5]。同时, 得到 2 a 生桔梗总皂苷含量明显高于 1 a 生桔梗总皂苷含量, 而且 2 a 生栽培桔梗与野生桔梗相比, 总糖和皂苷含量差异不明显^[6,9]。

上述研究结果表明, 因栽培桔梗与野生桔梗总皂苷含量差异不明显, 桔梗可以栽培, 并栽培桔梗可以入药; 桔梗的采收年限为 2 a。该研究结果为桔梗种植和采收提供了一定的理论指导, 促进了桔梗栽培技术的发展。然而, 前人关于不同产地桔梗总皂苷含量的研究结果有矛盾之处, 可能的原因一是研究材料不同, 导致了研究结果不一致; 二是研究材料数量较少, 结果缺乏代表性。

2 农艺性状评价

20 世纪末, 随着桔梗栽培时间的增加, 农家品种出现异化、杂化等现象, 严重限制了桔梗产业化发展。为获得优质、高产、多抗的桔梗新品种, 有些学者开始对不同产地桔梗农艺性状(直立与倒伏、产量性状、果实特性、生长发育特性等方面)进行研究。结果表明, 直立型桔梗比匍匐型具有高产、优质、抗倒伏特性^[10]; 根据产量

第一作者简介: 陈庆亮(1972-), 男, 博士, 助理研究员, 现从事药用植物生理及育种工作。

通讯作者: 王志芬(1963-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向为药用植物品种选育栽培及药用植物标准化。

基金项目: 山东省农业良种化工程资助项目(2005L208-02); 山东省农业科学院高新技术自主创新基金资助项目(2006YC X008); 山东省农业科学院博士科研启动基金资助项目(2006YBS003)。

收稿日期: 2010-02-10

Flower Colors Model Plant-*Saintpaulia ionantha*

PEI Ren-jia, CHEN Xiao-qiang, SUN Ning, ZHANG Nai-nan, ZHANG Ning, ZHANG Lei
(Tianjin Agriculture University Plant Cell Engineering Research Center, Tianjin 300384)

Abstract: In this paper, the morphological structure and research development of *saintpaulia ionantha* were summarized, the genetic engineering technology condition was viewed to establish flower colors model plant-*Saintpaulia ionantha* via molecular level. the variety of flower colors, the facts of influence, and the way of changing flower colors were reviewed. Finally, we put forward the prospect.

Key words: *Saintpaulia ionantha*; model plant; molecular marker; genetic map; prospect