

# 石竹科植物组织培养与细胞工程

陈丽萍\* 王艳菊 葛亚明 赵戊雨

(浙江大学园艺系, 农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029)

**摘要** 近年来, 植物组织培养与细胞工程研究在石竹科植物上取得了一定进展。现从组织培养、原生质体培养和体细胞杂交、单倍体育种、试管开花、转基因等5个方面对其进行综述, 并展望了石竹科植物在组织培养和细胞工程研究方面的发展前景。

**关键词** 石竹科; 植物组织培养; 植物细胞工程

石竹科(Caryophyllaceae)共有75个属, 约2000种, 广泛分布于世界各地。我国有30属388种, 分布于全国各地<sup>[1]</sup>。石竹科植物是重要的观赏园艺植物, 其中香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)、中国石竹(*Dianthus chinensis* L.)和美国石竹(*Dianthus barbatus* L.)是它的3个重要观赏种<sup>[2]</sup>, 常被用作庭院花坛栽培, 也可做成盆花、鲜切花等, 以香石竹最为著名。

植物组织培养与细胞工程(plant tissue culture & cell engineering)是利用植物的一部分组织、器官、细胞、原生质体等进行离体培养, 在人工控制条件下, 研究它的生长、发育、分化、再生规律等, 以期按照人们的意愿来改变细胞内的遗传物质而获得新物种或特殊细胞产品的一门综合性科学技术。利用植物组织培养与细胞工程技术可以解决石竹科植物无性繁殖中的种性退化问题; 可以将有利基因转移到需要改良的石竹科植物中<sup>[3-5]</sup>; 通过原生质体培养和体细胞杂交技术, 可以克服石竹科植物不同品种、种、属之间的有性杂交不亲和障碍, 获得新种质<sup>[6,7]</sup>等。近年来, 植物组织培养与细胞工程研究在石竹科植物上已取得了一定进展。

## 1 石竹科植物的组织培养

在石竹科植物的组织培养中, 常选择茎尖、茎段、叶片和花瓣等作为外植体来获得再生植株。图1综合了迄今为止国内外利用石竹科植物不同部位作外植体, 通过不同再生途径, 获得再生植株的研究进展。

### 1.1 茎尖培养

茎尖是石竹科植物组织培养中常用的一个取材部位, 除用于快速繁殖外, 还用于脱毒培养、种

质资源保存等。从20世纪90年代初开始, 国内外报道了这方面的研究成果。香石竹由于生产中采用的扦插繁殖导致品质严重下降, 因此, 它的茎尖培养具有重要的生产实践意义。Can等<sup>[8]</sup>研究了不同生长素、细胞分裂素和赤霉素组合对罂粟茎尖快繁的影响。结果表明: 茎尖分生组织在MS + 5.0 mg/L BA + 1.0 mg/L IAA培养基中比在含其他几种生长调节剂组合的培养基中产生的丛生芽多。Onamu等<sup>[9]</sup>报道了TDZ的剂量和处理时间对香石竹茎尖离体繁殖效率的影响很大。他们的研究表明, TDZ的浓度为1~5 mg/L, 处理时间为3~10天, 对香石竹茎尖进行离体繁殖时, 效率可达100%。

### 1.2 茎段培养

茎段也是石竹科植物快速繁殖中的常用材料之一, 由于其具有取材方便、数量多等优点而被广泛采用。Wadat等<sup>[10]</sup>研究了以茎段作外植体, 采用凝胶培养基培养(agar-gelled medium)、液体摇动培养(liquid shaken medium)以及液体培养基上漂浮界面膜辅助培养(an interfacial membrane raft floating on liquid medium)等3种不同培养方式对香石竹再生频率的影响。结果表明, 第三种培养方式的再生频率比另外两种方式可提高两至三倍, 这在植物快繁过程中可大大节约成本。Godo等<sup>[11]</sup>对剪秋罗茎段培养进行了研究, 外植体在1/2MS + 0.2 mg/L BA和1/2MS培养基上的再生频率分别为30%和70%。在MS + 10 mg/L BA培养基上每个茎段节点平均可以生成8个可利用芽, 而且芽的遗传稳定性相当稳定<sup>[12]</sup>。

### 1.3 叶片培养

石竹科植物的叶片培养可通过直接或间接再生

收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2005-04-19

\*通讯作者。Tel: 0571-86971006, E-mail: chenliping@zju.edu.cn

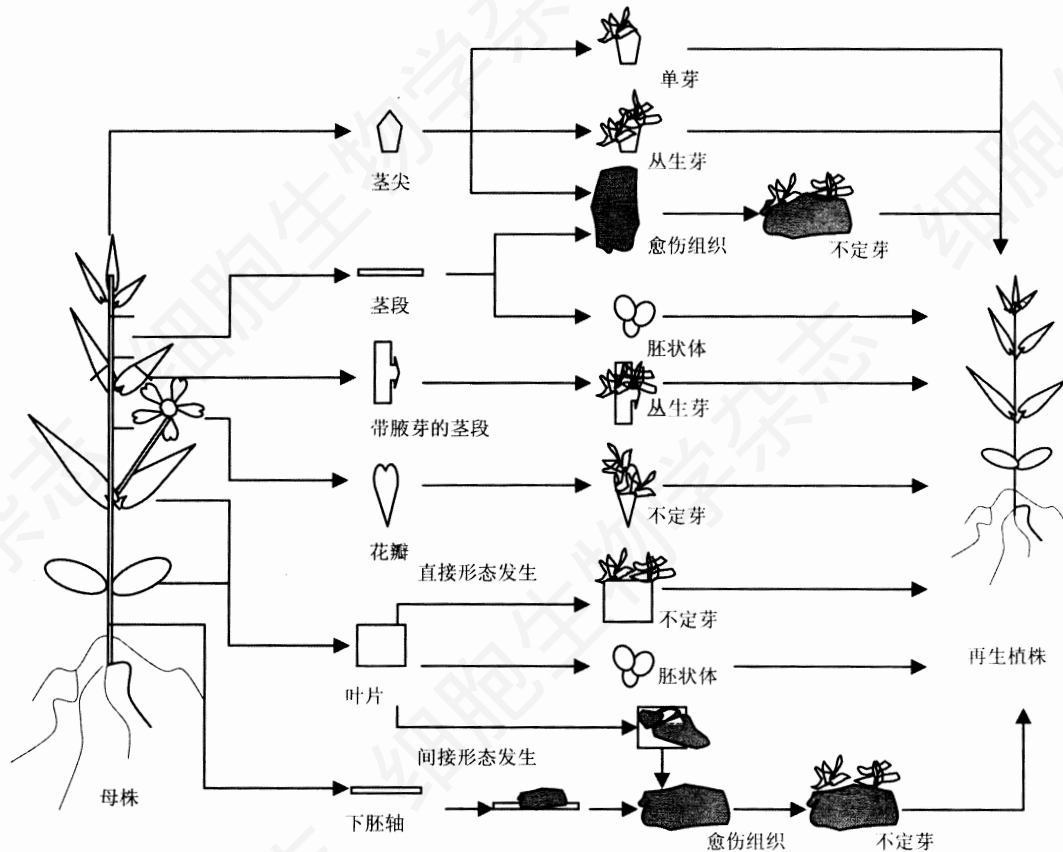


图1 石竹科植物的再生途径

途径获得再生植株。Jethwani 等<sup>[13]</sup>向培养基中加入生长素PAA(phenylacetic acid)对中国石竹叶片的愈伤组织进行再分化研究。结果发现,最适愈伤组织分化培养基为MS + BA(2.0, 5.0 mg/L)+ PAA(0.5, 1.0 mg/L)。无论单独或组合使用BA、NAA、2,4-D,愈伤组织都不能再分化产生芽。此外,他们还对中国石竹的第1片叶子(从顶部开始)和第2片叶子的愈伤组织诱导情况做了比较,研究表明第1片叶子和第2片叶子基部诱导出的愈伤组织具有再生能力,而第2片叶子其余部分诱导的愈伤组织不具有再生能力。Kantia 等<sup>[12]</sup>研究报道:中国石竹叶片外植体在3 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA和3 mg/L BA + 1 mg/L NAA的MS基本培养基上培养,都会直接产生不定芽;而在0.5 mg/L BA + 1 mg/L 2,4-D的MS培养基上虽也可以产生不定芽,但伴随有愈伤组织的产生,产生的不定芽要在含BA和NAA的培养基上才能生长。Pareek 等<sup>[14]</sup>以香石竹、中国石竹和美国石竹的叶片为外植体,采用MS + 1 mg/L 2,4-D液体培养基诱导出了体细胞胚,体细胞胚在MS + 1 mg/L GA<sub>3</sub>固体培养基上发育成幼苗,首次建立了

石竹科植物直接体细胞胚诱导再生体系。

Okamura 等<sup>[15]</sup>用碳离子束照射香石竹叶片,经组织培养获得了花的突变体,成为香石竹新品种。该研究发现:碳离子束照射的方法与伽马射线和X射线照射的方法相比,前者诱导的再生率最高,能诱导多种花色和花型的突变体。离子束照射与组织培养结合的方法可以在短时间内获得商业品种,具有很高的实际利用价值。

#### 1.4 花瓣培养

Nakano 等<sup>[16]</sup>以香石竹花瓣、叶片和茎段为外植体诱导不定芽。结果只有花瓣具有较高的再生频率,适宜的培养基为MS + 1.1~2.2 mg/L BA和MS + 0.9 mg/L NAA。Fisher 等<sup>[17]</sup>以香石竹花瓣为外植体研究了两种培养方式对石竹芽再生频率的影响。结果表明,石竹花瓣在液体培养基比固体培养基上的再生率高(前者可达100%,而后者只有50%);花瓣的各部位都会形成再生芽,每个外植体最多可产生7个不定芽。Casanova 等<sup>[18]</sup>也由香石竹花瓣诱导出再生芽,诱导率达84.4%,而rolC转基因香石竹花瓣的再生芽诱导率高达90.4%,他们随后的研

究进一步证实了这一结果的可靠性<sup>[5]</sup>。

## 2 石竹科植物的原生质体培养和体细胞杂交

Nakano等<sup>[19]</sup>首次成功地对石竹科植物原生质体进行了培养。他们从石竹属的7个栽培种的叶片中分离出大量原生质体，且这些原生质体都能形成丛生芽，但不同栽培种芽的再生频率存在显著差异。其中以中国石竹和美国石竹杂交种的芽再生频率最高，达43.3%。Kim等<sup>[20]</sup>对石竹科瞿麦通过叶肉培养，分离培养原生质体，产生的愈伤组织经培养5周产生重生芽，每块愈伤组织产生10~15个再生芽。此后，Nakano等<sup>[6]</sup>又利用体细胞杂交技术将中国石竹和美国石竹进行了种间杂交。通过对再生植株的花色、染色体数目、脂酶同工酶、核rDNA的分析证明再生植株是种间体细胞杂种。这个实验证明了应用体细胞杂交技术对石竹属进行遗传改良的可能性。同年，他们又以PEG法将中国石竹和香石竹进行原生质体融合<sup>[7]</sup>，获得了两者的体细胞杂种。

## 3 石竹科植物的单倍体育种

Demmink等<sup>[21]</sup>以四倍体香石竹为材料，在其开花和子房形成之前，采集花芽获得胚珠，将每个胎座切成两半，接种到MS + 0.9 mg/L BA + 0.8 mg/L NAA + 6% 蔗糖 + 0.7% 琼脂培养基上。培养3周后，经流式细胞仪鉴定表明，所得二倍体来源于四倍体。再生植株的花比四倍体母体小，且不产生花粉。但如果将其作为母本与二倍体或四倍体杂交，则具有可育性，由此产生的所有种子播种后，没有二倍体苗产生。该研究对开展石竹科植物的单倍体育种具有重要意义。

## 4 石竹科植物的试管开花

近二三十年来，国内外都有一些成功诱导试管开花的报道。在石竹科中，类似的报道仅有香石竹、剪秋罗等。与普通开花相比，试管开花植株形体变小但花的形状和颜色不变，具有一定的观赏价值，可作为微型盆景应用于花卉生产。此外，试管开花为研究植物的开花机制提供了一个良好的实验体系，为工厂化杂交育种开辟了一条新途径。

唐定台等<sup>[22]</sup>以石竹试管花的茎段为材料，研究了多种因子对试管花形成的作用。结果表明：开花

植株的茎段可稳定地保持形成花芽的能力；外源激素对试管花的形成不是必需的因子；低浓度的生长素利于长根，对花芽的形成没有明显的影响，但较高浓度却明显地抑制试管花的形成；细胞分裂素促进营养芽的分化，而抑制花芽的形成；在缺少NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>的培养基中植株的营养生长受到抑制，植株变矮，叶片数减少，基部叶片发黄，植株提前开花，但不影响开花率；植株上部茎段比下部茎段形成花芽的频率高。Wurr等<sup>[23]</sup>研究了温度和日照长度对*D. allwoodii*和*D. alpinus*花芽分化和生成的影响。他们指出，温度是试管开花最重要的影响因素，低温(4℃)培养的植株在10~15℃条件下生根，可以提早开花，而且材料种类不同对低温的需求亦不同。

## 5 石竹科植物的转基因

Baudinette等<sup>[24]</sup>对香石竹CMB2 (carnation MADS box gene 2)基因进行了分离及其特性描述，这是有关香石竹基因分离的首次报道。此后，Zuker等<sup>[3]</sup>通过高效的香石竹转化体系成功地将渗透蛋白基因、PR-1基因和几丁质酶基因转移到香石竹中，从而使其生根能力增强，产量提高，且这些性状能够稳定保持。另外，依据反义表达原理，他们将由香石竹克隆的3-羧化酶黄烷酮基因进行转化试验，以阻断花青素的生物合成途径，所获得的转化植株的后代由一个单色品种产生了一系列的多色品种。

Estopa等<sup>[25]</sup>研究了石竹农杆菌介导的遗传转化过程中卡那霉素与其他抗生素混用的效果。结果表明，几种抗生素的单独或结合使用，可抑制假阳性的发生。Nontaswatsri等<sup>[26]</sup>通过改变共培养条件建立了有效的农杆菌介导的香石竹遗传转化体系。Fukui等<sup>[4]</sup>深入研究了转基因香石竹中改变花色的3', 5'-羟基类黄酮基因的表达原理，该研究为创造更多香石竹种质资源提供了理论基础。OK等<sup>[27]</sup>以SSH(suppression subtractive hybridization)技术来鉴定与香石竹花的发育有关的基因，从而探索诱导香石竹花成熟的基因，他们指出植株中农杆菌rolC基因的过度表达可以改变植株的生长及发育。Kosugi等<sup>[28]</sup>的研究表明：控制转基因香石竹花瓣乙烯生成的基因可以由控制其萎蔫的基因来调节。Casanova等<sup>[9]</sup>将rolC基因转入香石竹，rolC像细胞分裂素和生长素一样促进转基因香石竹外植体芽和根的再生。

## 6 展望

目前,植物组织培养与细胞工程在石竹科植物上的研究和应用主要集中在组织培养技术,相对而言该技术已经发展得较为成熟。目前,该技术研究的材料主要集中在香石竹上,其次是中国石竹和丝石竹,而对石竹科其他植物的研究较少。因此,希望在今后的研究工作中拓宽研究对象,注重开发石竹科植物的其他观赏花卉,以提高石竹科植物的利用价值。

就国内而言,多数研究采用的外植体主要集中在茎尖、茎段和叶片等,而在花瓣和花药培养上鲜见报道,转基因工作也未见报道。而国外相关研究已经取得了一定成果。相信随着转基因技术的日臻完善,其在改良石竹科植物的花色、花型、抗性等方面的应用前景将更为光明。

通过体细胞无性系变异可以筛选突变体,可以育成具有不同花型、花色的新品种。多倍体诱导可以提高作物的产量和品质,增强抗病抗逆能力,在花卉作物上,还可以提高花的观赏价值。这些都是石竹科植物组织与细胞工程技术今后研究的方向。另外,石竹科植物的组织培养为试管开花机制的研究提供了一个良好的实验平台,且能够提高试管苗的附加值,为试管开花产品的开发打下了基础。

### 参考文献 (References)

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会主编. *中国植物志*, 北

京: 科学出版社, 1996, **26**: 47

- [2] Kantia A *et al. Sci Hort*, 2002, **96**: 205  
 [3] Zuker A *et al. In: Sorvari S et al. (eds.) IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, Tampere, Finland: ISHS Acta Horticulturae, 2001, 91  
 [4] Fukui Y *et al. Phytochemistry*, 2003, **63**: 15  
 [5] Casanova E *et al. Plant Sci*, 2004, **167**: 551  
 [6] Nakano M *et al. Theor Appl Genet*, 1993, **86**: 1  
 [7] Nakano M *et al. Plant Sci*, 1993, **88**: 203  
 [8] Can C *et al. Doga Turk Tarim ve Ormancilik Dergisi*, 1992, **16**: 641  
 [9] Onamu R *et al. African Crop Science Journal*, 2003, **11**: 125  
 [10] Watad AA *et al. Sci Hort*, 1996, **65**: 313  
 [11] Godo T *et al. Bull Bot Gard Toyama*, 2000, **5**: 35  
 [12] Godo T *et al. Bull Bot Gard Toyama*, 2004, **9**: 9  
 [13] Jethwani V *et al. Plant Cell Reports*, 1996, **15**: 869  
 [14] Pareek A *et al. Sci Hort*, 2003, **98**: 449  
 [15] Okamura M *et al. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 2003, **206**: 574  
 [16] Nakano M *et al. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994, **36**: 15  
 [17] Fisher M *et al. Sci Hort*, 1993, **53**: 231  
 [18] Casanova E *et al. Sci Hort*, 2003, **97**: 321  
 [19] Nakano M *et al. Plant Cell Reports*, 1992, **11**: 225  
 [20] Kim JC *et al. Plant Cell Reports*, 1996, **16**: 18  
 [21] Demmink JF *et al. Acta Hort*, 1987, **216**: 343  
 [22] 唐定台等. *园艺学报*, 1996, **23**: 277  
 [23] Wurr DCE *et al. Sci Hort*, 2000, **86**: 57  
 [24] Baudinette SC *et al. Plant Sci*, 2000, **155**: 123  
 [25] Estopa M *et al. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, **65**: 211  
 [26] Nontaswatsri C *et al. Plant Sci*, 2004, **166**: 59  
 [27] OK SH *et al. Plant Sci*, 2003, **165**: 291  
 [28] Kosugi Y *et al. Plant Sci*, 2000, **158**: 139

## Plant Tissue Culture and Cell Engineering in Caryophyllaceae

Li-Ping Chen\*, Yan-Ju Wang, Ya-Ming Ge, Xu-Yu Zhao

(Department of Horticulture, Key Laboratory for Horticultural Plant Growth, Development & Biotechnology, Agricultural Ministry of China, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** Good progress has been made in recent years through plant tissue culture and cell engineering in Caryophyllaceae. Such aspects as *in vitro* propagation, protoplast culture, somatic hybridization, haploid breeding, flowering in tube and gene transformation in Caryophyllaceae were summarized in the present article. The prospects of researches on Caryophyllaceae were discussed as well.

**Key words** caryophyllaceae; plant tissue culture; plant cell engineering

Received: August 30, 2004 Accepted: April 19, 2005

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86971006, E-mail: chenliping@zju.edu.cn