

· 成果快报 ·

# 菊花优异种质资源挖掘与种质创新研究

陈发棣\* 陈素梅 房伟民 张 飞 蒋甲福  
滕年军 管志勇 王海滨 宋爱萍 赵 爽

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

[关键词] 菊花; 种质资源; 优异基因; 远缘杂交; 分子改良

菊花是我国十大传统名花和世界四大切花之一, 观赏和经济价值极高。我国是栽培菊花的起源中心<sup>[1]</sup>, 然而我国菊花遗传育种研究却十分滞后, 原有商业品种约 90% 为荷兰、日本引进品种。因菊花遗传基础狭窄及地域气候差异, 已有引进品种和我国原有自主品种的抗蚜虫性、耐低/高温性均较差, 是限制我国菊花产业发展的瓶颈。为此, 亟待开展菊花抗性种质创新及抗性与观赏性聚合的品种改良研究。我国是菊花近缘种属野生资源的分布中心, 其中不乏优异抗性资源, 远缘杂交育种则成为拓宽菊花遗传基础及提高抗性的有效手段。为此, 本课题组针对菊花遗传基础狭窄、优异种质(基因)资源挖掘利用不足、育种技术滞后、缺乏自主知识产权新品种等制约菊花产业发展的重大科学问题和技术需求, 收集保存了 5000 余份菊花及其近缘种属种质资源, 从中挖掘出 67 份优异种质, 建立了基于远缘杂交的育种技术体系, 育成系列高抗(耐)性新奇特菊花新品种, 在抗蚜虫性、花期及株型等育种方面取得了突破性进展, 新品种已在 10 多个省(市)推广应用。本研究成果对推动我国菊花育种、品种更新和产业升级具有重要意义。

## 1 菊花及其近缘种属种质资源收集、保存与评价

通过广泛收集菊花及其近缘种属种质资源, 建成了“中国菊花种质资源保存中心”, 保存种质资源 5 000 余份, 包括菊花近缘种属野生种质 332 份、品种 3 200 余个和其他育种中间材料 1 500 余份。创建了超低温与离体缓慢生长保存技术体系, 克服了

土地资源、人力、物力不足的限制及传统圃地保存种质易混杂、丢失、种性退化等问题, 实现了核心种质节本高效中长期保存, 并先后为 50 余家从事菊花研究和生产的单位提供菊花品种或育种材料上千份, 有力推动了菊花育种研究。建立了菊花及其近缘种属植物园艺性状与抗/耐性的评价体系, 挖掘出 67 份优异抗性育种核心种质, 明确了部分重要园艺性状和抗/耐性的形成机制<sup>[2-6]</sup>, 为菊花抗性遗传改良提供了基因储备。初步阐明了菊花及其近缘种属植物的系统进化关系, 证实了菊属与亚菊属、蒿属的亲缘关系较近<sup>[7]</sup>; 创新地提出杂交引起的基因组、转录组和甲基化水平的快速改变可加速菊花及其近缘属植物的进化历程, 且基因组非编码区删除及甲基化水平的上升或下降, 可使杂种后代快速二倍体化<sup>[8-9]</sup>, 为利用远缘杂交拓宽菊花遗传基础和菊花种质创新提供了重要依据。

## 2 菊花远缘杂种创制与新品种选育

栽培菊花遗传基础狭窄, 种内遗传改良困难。远缘杂交是实现优异基因在不同种属间转移的有效途径之一, 然而, 远缘杂交障碍限制了优异基因的有效转移。项目组揭示了杂种胚败育和细胞程序性死亡是菊花远缘杂交障碍的主要原因<sup>[10-13]</sup>, 创建了基于胚珠培养的幼胚拯救技术, 解决了菊花柱头短小授粉难、幼胚微小难剥取、胚胎败育难以获得远缘杂种的难题, 为将菊花近缘种属植物优异基因导入栽培菊花及实现优异基因在种属间的聚合找到了突破口<sup>[10]</sup>。率先建立了以远缘杂交、外源种属抗(耐)性利用为主体的菊花育种技术体系, 成功将菊花近缘

收稿日期: 2015-10-25; 修回日期: 2015-11-15

\* 通信作者, Email: chenfd@njau.edu.cn

种属植物的抗/耐性优异基因导入了栽培菊花,创制出 15 个属间、6 个种间远缘杂种,共 236 份抗性(抗寒、抗病虫等)新种质<sup>[14-17]</sup>,有效拓宽了菊花基因库;其中,6 个属间杂种及抗蚜性、耐盐性与托桂花型的 3 属 4 物种聚合新种质均为首次报道<sup>[17]</sup>;育成了系列高抗(耐)性新奇特菊花新品种,获植物新品种权 34 个,江苏省鉴定品种 20 个。育成的新品种已在全国 10 多个省(市)进行大量推广应用,改变了以往我国菊花商业品种花色单调、新奇特品种缺乏、抗性弱、花期多集中在秋季、依赖进口等状况,取得了显著经济和社会效益,有力地推动了我国菊花品种更新和产业升级。

### 3 菊花优异基因挖掘与分子改良

栽培菊花多为六倍体及其非整倍体,基因组高度杂合,遗传背景复杂,传统育种周期长、存在不定向性等不足。基因工程育种具有快速、定向改良某一性状的优点,是对传统杂交育种的重要补充。项目组在前期优异种质发掘基础上,在菊花重要园艺性状和抗性基因挖掘与分子改良方面取得突出进展。构建了菊花花器官 EST 文库<sup>[18]</sup>,在此基础上,创制了  $GA_{20}$ -氧化酶基因 *DgGA20ox* 的转基因矮化菊花<sup>[19]</sup>;克隆了调控菊花分枝的 *DgLsL* 基因,创制了分枝改良的菊花新种质<sup>[20]</sup>;此外,通过连锁作图解析了菊花株型、花期和花型相关园艺性状的基因效应,挖掘出一批主效 QTL<sup>[21-24]</sup>。从耐寒异色菊中克隆了耐寒转录因子 *CdICE1*,发现 *CdICE1* 主要通过诱导菊花 *DgDREB* 表达以增强植株的低温、干旱和盐渍等非生物胁迫耐性<sup>[25]</sup>。率先提出 16℃ 温和低温驯化下的 *ICE1*-miRNA398-CSD 抗寒调节新路径,发现在 16℃ 驯化条件下,异色菊 *CdICE1* 超表达可使 miR398 表达显著下降,从而解除 miR398 对其靶基因 *CSD1* 和 *CSD2* 表达的抑制,提高耐寒性<sup>[26]</sup>。另外,还挖掘出菊花株型等多个重要园艺性状<sup>[27-28]</sup>、养分吸收<sup>[29-31]</sup>、耐盐<sup>[32-33]</sup>、抗蚜虫<sup>[34-35]</sup>等抗/耐性相关关键基因,并通过同源转化实现了部分菊花目标性状的定向分子改良,为菊花新品种培育开辟了新途径,加快了育种进程。

### 4 小结与展望

本项目组长期致力于菊花优异基因资源挖掘、创新利用和新品种选育研究,建成了“中国菊花种质资源保存中心”,挖掘出耐寒、抗蚜虫性等优异抗性育种核心种质 67 份;明确了杂种胚败育是菊花远缘

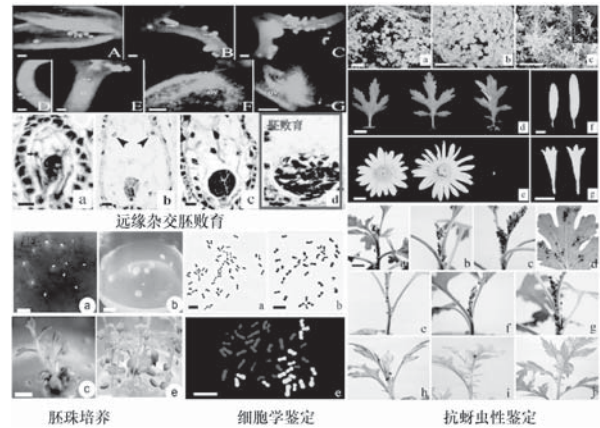


图 1 菊花远缘杂交种质创制技术体系

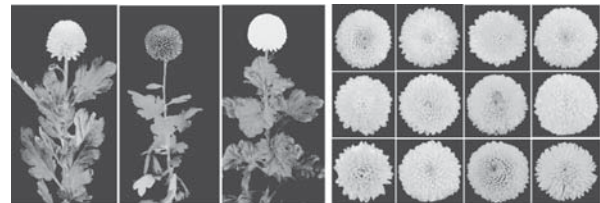


图 2 选育的部分菊花新品种

杂交障碍的主要原因,率先建立了以远缘杂交、外源种属抗/耐性利用为主体的菊花育种技术体系,实现了远缘杂种的规模化创制;鉴定出多个重要园艺性状和抗/耐性相关优异基因,并实现了菊花部分目标性状的定向分子改良。在此基础上,我们将着重解析菊花及其近缘种属植物重要品质性状和抗性形成的遗传调控机制,研究成果将进一步推动菊花近缘种属优异基因资源在菊花种质创新和新品种选育研究中的应用,对我国菊花品种更新和产业升级具有重要意义。

**致谢** 本研究得到国家自然科学基金(31425022, 31272196)的资助。

### 参 考 文 献

- [1] 李鸿渐. 中国菊花. 南京: 江苏科学技术出版社, 1993.
- [2] Yin DM, Chen SM, Chen FD, Guan ZY, Fang WM. Morphological and physiological responses of two chrysanthemum cultivars differing in their tolerance to waterlogging. *Environ Exp Bot*, 2009, 67: 87-93.
- [3] Yin DM, Chen SM, Chen FD, Guan ZY, Fang WM. Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendranthema* species to waterlogging. *Environ Exp Bot*, 2010, 68: 122-130.

- [4] He JP, Chen FD, Chen SM, Lv GS, Deng YM, Fang WM, Liu ZL, Guan ZY, He CY. Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant and defense enzyme activity in response to aphid infestation. *J Plant Physiol*, 2011, 168(7): 687—693.
- [5] Zhang SM, Chen SM, Chen FD, Teng NJ, Fang WM, Guan ZY. Anatomical structure and gravitropic response of the creeping shoots of ground-cover chrysanthemum ‘Yuhuaajinhua’. *Plant Growth Regul*, 2008, 56: 141—150.
- [6] Chen Y, Jiang JF, Chang QS, Gu CS, Song AP, Chen SM, Dong B, Chen FD. Cold acclimation induces freezing tolerance via antioxidative enzymes, proline metabolism and gene expression changes in two chrysanthemum species. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(2):815—822.
- [7] Zhao HB, Chen FD, Chen SM, Wu GS, Guo WM. Molecular phylogeny of *Chrysanthemum*, *Ajania* and its allies (Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast *trnL-F* IGS sequences. *Plant Syst Evol*, 2010, 284: 153—169.
- [8] Wang HB, Jiang JF, Chen SM, Fang WM, Guan ZY, Liao Y, Chen FD. Rapid genomic and transcriptomic alterations induced by wide hybridization: *Chrysanthemum nankingense* × *Tanacetum vulgare* and *C. crassum* × *Crossostephium chinense* (Asteraceae). *BMC Genomics*, 2013, 14:902
- [9] Wang HB, Jiang JF, Chen SM, Qi XY, Fang WM, Guan ZY, Teng NJ, Liao Y, Chen FD. Rapid genetic and epigenetic alterations under intergeneric genomic shock in newly synthesized *Chrysanthemum morifolium* × *Leucanthemum paludosum* hybrids (Asteraceae). *Genome Biol Evol*, 2014, 6(1):247—259.
- [10] Deng YM, Chen SM, Lu AM, Chen FD, Tang FP, Guan ZY, Teng NJ. Production and characterization of the intergeneric hybrids between *Dendranthema morifolium* and *Artemisia vulgaris* exhibiting enhanced resistance to chrysanthemum aphid (*Macrosiphoniella sanbourni*). *Planta*, 2010, 231: 693—703.
- [11] Zhang FJ, Dong W, Huang LL; 等. Identification of microRNAs and their targets associated with embryo abortion during chrysanthemum cross breeding via high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0124371
- [12] Zhang FJ, Wang ZQ, Dong W, Sun CQ, Wang HB, Song AP, He LZ, Fang WM, Chen FD, Teng NJ. Transcriptomic and proteomic analysis reveals mechanisms of embryo abortion during chrysanthemum cross breeding. *Sci Rep*, 2014, 4: 6536.
- [13] Sun CQ, Huang ZZ, Wang YL, Chen FD, Teng NJ, Fang Weimin, Liu Zhaolei. Overcoming pre-fertilization barriers in the wide cross between *Chrysanthemum grandiflorum*? (Ramat.) Kitamura and? *C. nankingense*? (Nakai) Tzvel. by using special pollination techniques. *Euphytica*, 2011, 178(2): 195—202.
- [14] Zhu WY, Zhang F, Chen SM, Xu LL, Wang L, Wang HB, Qi XY, Li HY, Chen FD. Intergeneric hybrids between *Chrysanthemum morifolium* ‘Nannongxiaoli’ and *Artemisia vulgaris* ‘Variegata’ show enhanced resistance against both aphids and *Alternaria* leaf spot. *Euphytica*, 2014, 197: 399—408.
- [15] Deng YM, Chen SM, Chen FD, Cheng X, Zhang F. The embryo rescue derived intergeneric hybrid between chrysanthemum and *Ajania przewalskii* shows enhanced cold tolerance. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 2177—2186.
- [16] Liu SY, Chen SM, Chen Y, Guan ZY, Yin DM, Chen FD. *In vitro* induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. *Sci Hortic*, 2011, 127(3): 411—419.
- [17] Deng YM, Jiang JF, Chen SM, Teng NJ, Song AP, Guan ZY, Fang WM, Chen FD. Combination of multiple resistance traits from wild relative species in chrysanthemum via trigeneric hybridization. *PLoS ONE*, 2012, 7(8):1—15.
- [18] Chen SM, Miao HN, Chen FD, Jiang BB, Lu JG, Fang WM. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) collected from the inflorescence of chrysanthemum. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27: 503—510.
- [19] Miao HB, Jiang BB, Chen SM, Zhang SM, Chen FD, Fang WM, Teng NJ, Guan ZY. Isolation of a gibberellin 20-oxidase cDNA from and characterization of its expression in chrysanthemum. *Plant Breed*, 2010, 129: 707—714.
- [20] Jiang BB, Miao HB, Chen SM, Zhang SM, Chen FD, Fang WM. The lateral suppressor-like gene, *DgLsL*, alternated the axillary branching in transgenic chrysanthemum (*Chrysanthemum* × *morifolium*) by modulating IAA and GA content. *Plant Mol Biol Rep*, 2010, 28(1): 144—151.
- [21] Zhang F, Chen SM, Jiang JF, Guan ZY, Fang WM, Chen FD. Genetic mapping of quantitative trait loci underlying flowering time in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *PLoS ONE*, 2013, 8(12):e83023.
- [22] Zhang F, Jiang JF, Chen SM, Chen FD, Fang WM. 2012. Mapping single-locus and epistatic QTL for plant architectural traits of chrysanthemum. *Mol Breed*, 2012, 30(2): 1027—1036.
- [23] Zhang F, Chen SM, Chen FD, Fang WM, Chen Y, Li FT. SRAP-based mapping and QTL detection for inflorescence-related traits in chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*). *Mol Breed*, 2011, 27(1): 11—23.
- [24] Peng H, Zhang F, Jiang JF, Chen SM, Fang WM, Guan ZY, Chen FD. Identification of quantitative trait loci for branching traits of spray cut chrysanthemum. *Euphytica*, 2015, 202(3):385—392.
- [25] Chen L, Chen Y, Jiang JF, Chen SM, Chen FD, Guan ZY, Fang WM. The constitutive expression of *Chrysanthemum dichrum* ICE1 in *Chrysanthemum grandiflorum* improves the level of low temperature, salinity and drought tolerance. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 1747—1758.
- [26] Chen Y, Jiang JF, Song AP, Chen SM, Shan H, Luo HL, Gu CS, Sun J, Zhu L, Fang WM, Chen FD. Ambient temperature enhanced freezing tolerance of *Chrysanthemum dichrum* CdICE1 *Arabidopsis* via miR398. *BMC Biol*, 2013, 11:121.
- [27] Liu RX, Chen SM, Jiang JF, Zhu L, Zheng C, Han S, Gu J, Sun J, Li HY, Wang HB, Song AP, Chen FD. Proteomic changes in the base of chrysanthemum cuttings during adventitious root formation. *BMC Genomics*, 2013, 14:919.
- [28] Xia SJ, Chen Y, Jiang JF, Chen SM, Guan ZY, Fang WM, Chen FD. Expression profile analysis of genes involved in horizontal gravitropism bending growth in the creeping shoots of ground-cover chrysanthemum by suppression subtractive hybridization. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(1): 237—246.
- [29] Zhao M, Song AP, Li PL, Chen SM, Jiang JF, Chen FD. A bHLH transcription factor regulates iron intake under Fe deficiency in chrysanthemum. *Sci Rep*, 2014, 4, 6694.



- [30] Liu P, Chen SM, Song AP, Zhao S, Fang WM, Guan ZY, Liao Y, Jiang JF, Chen FD. A putative high affinity phosphate transporter, *CmPT1*, enhances tolerance to Pi deficiency of chrysanthemum. *BMC Plant Biol*, 2014, 14:18
- [31] Gu CS, Zhang XX, Jiang JF, Guan ZY, Zhao S, Fang WM, Liao Y, Chen SM, Chen FD. Chrysanthemum *CmNRT2* interacts with *CmNRT2* in the control of nitrate uptake. *Sci Rep*, 2014, 4:5833.
- [32] An J, Song AP, Guan ZY, Jiang JF, Chen FD, Lou WH, Fang WM, Liu ZL, Chen SM. The over-expression of *Chrysanthemum crassum CcSOS1* improves the salinity tolerance of chrysanthemum. *Mol Biol Rep*, 2014, 41: 4155—4162.
- [33] Li PL, Song AP, Gao CY, Wang LX, Wang YJ, Sun J, Jiang JF, Chen FD, Chen SM. Chrysanthemum *WRKY* gene *CmWRKY17* negatively regulates salt stress tolerance in transgenic chrysanthemum and Arabidopsis plants. *Plant Cell Rep*, 2015, 34(8): 1365—1378
- [34] Li PL, Song AP, Gao CY, Jiang JF, Chen SM, Fang WM, Zhang F, Chen FD. The over-expression of a chrysanthemum *WRKY* transcription factor enhances aphid resistance. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 95:26—34
- [35] Xiao XL, Shao YF, Jia JF, Ren LP, Chen FD, Fang WM, Guan ZY, Chen SM. Gene expression profiles responses to aphid feeding in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). *BMC Genomics*, 2015, 15:1050.

### Discovery of excellent chrysanthemum germplasm and germplasm enhancement

Chen Fadi      Chen Sumei      Fang Weimin      Zhang Fei      Jiang Jiafu      Teng Nianjun  
Guan Zhiyong      Wang Haibin      Song Aiping      Zhao Shuang

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

**Key words** chrysanthemum; germplasm; elite gene; distant hybridization; molecular breeding

· 资料信息 ·

## 浙江大学在阐明干细胞移植治疗暴发性肝衰竭作用机制方面取得重要进展

在系列国家自然科学基金(项目批准号:31571356、81271708、81571818)以及科技部 973 等项目的资助下,浙江大学医学院附属第一医院、传染病诊治国家重点实验室李君教授、李兰娟院士与药学院陈新教授合作,在干细胞移植治疗暴发性肝衰竭的机制研究方面取得重要进展,研究结果以“Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs”(定量评价人骨髓间充质干细胞移植救治暴发性肝衰竭作用机制)为题于 2016 年 2 月 16 日在线发表于国际权威消化病学杂志 *Gut* (论文链接:<http://gut.bmj.com/content/early/2016/02/14/gutjnl-2015-311146.abstract>)。

暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)病死率高达 80%,原位肝移植是目前最有效的治疗方法之一。由于供肝短缺、费用昂贵,亟需寻找治疗 FHF 的有效替代疗法,而干细胞移植被认为是治疗 FHF 的新希望。

该项目组曾利用人骨髓间充质干细胞(hBM-SC)肝内移植成功救治 FHF 的大动物(猪),研究成果发表于 *Hepatology* (2012, 56: 1044)。在此基础

上,项目组利用大规模抗体芯片、全基因测序、蛋白质谱分析等新技术,从生化功能、细胞因子表达谱、转录组、代谢组与组织学等水平对植入 hBMSC 与宿主间发生的相互作用关系进行了定量评价。结果发现,植入干细胞可明显抑制 FHF 所致的致命性细胞因子风暴,并在 7 天内恢复宿主 FHF 内环境,精确定量证实此时猪肝脏中的人源性肝细胞约占 4.5%,人源性白蛋白约占 0.4%,表明早期干细胞增殖分化的作用有限。利用多组学功能关联分析技术,他们发现移植干细胞主要通过抑制炎症介质分泌、调节免疫反应等旁分泌作用来改变宿主对 FHF 损伤的响应,最终促进宿主自身肝脏再生修复;同时发现 delta-like ligand 4(DLL4)在干细胞移植治疗 FHF 过程中对肝组织修复发挥了关键作用,还在猪和大鼠 FHF 治疗模型中得到验证。该项研究不仅使人们重新认识了干细胞移植作用机制,更为基于干细胞作用的单分子(DLL4)或分子鸡尾酒疗法的临床转化提供了科学依据。

(供稿:杨正宗 杜生明 李恩中)