

菊花基因工程研究进展

吕晋慧¹, 孙 明²,孙 鑫², 吴 月亮²

(1. 山西农业大学林学院, 太谷 030801;

2. 北京林业大学园林学院, 100083)

摘要:菊花遗传背景复杂, 传统育种往往不能获得预期的目的。生物技术为菊花育种提供了一条新的途径。现就菊花基因工程中的遗传转化技术进行了综述, 分析了影响菊花遗传转化的主要因素, 并概述了菊花基因工程中存在的问题。

关键词:菊花; 遗传转化; 基因工程

中图分类号:S 682.1¹ **文献标识码:**A

文章编号:1001-0009(2007)01-0041-03

自上世纪首次获得转基因烟草以来, 植物基因工程发展迅速, 迄今已有约 200 种植物获得了转基因植株。利用基因工程进行农作物、林木、园艺植物的改良育种受到了各国科学工作者的关注。菊花的遗传背景复杂, 基因高度杂合, 菊花基因库缺少某些特性基因如: 兰色基因、早花期基因等限制了常规育种的进程。分子育种是新兴的一门技术, 通过基因工程导入外来基因可扩大现有种的基因库; 定向修饰某个目标性状并保留其它性状不变; 打破种间杂交障碍, 克服远源杂交不亲和性和不同染色体倍性差异的限制, 为菊花种质资源的创新、利用提供新的途径。现对近年来菊花的遗传转化研究作一综述。

1 遗传转化技术

菊花上应用的遗传转化方法主要有农杆菌介导法和直接导入法。

1.1 农杆菌介导法

Lemieux、van Wordragen 等最早于 1989 年对菊花遗传转化进行了研究。1991 年 Ledger 等对菊花叶片与根癌农杆菌的共培养进行了详细的研究。同年 Firoozabady

等用根癌农杆菌介导法对牵牛查尔酮合酶改变菊花花色进行了研究, 但没有获得稳定的转化体。此后 Renou、de Jong、Pavingrova、Urban、Sherman、Takatsu、Annadana、Toguri、Aswath、王关林、任永霞、蒋细旺、洪波等都进行了根癌农杆菌转化菊花的研究。研究表明根癌农杆菌介导转化后外植体再生困难。Lowe 等用发根农杆菌 R1000 菌株侵染菊花, 发现 R1000 诱导的肿瘤生长不正常。

1.2 直接导入法

直接导入法可以不依赖农杆菌和其它生物媒体, 将特殊处理的裸露 DNA 直接导入植物细胞, 实现外源基因的转化。Sanford 用基因枪法在几种植物材料上成功的实现了转化, 解决了不同菌株对不同物种材料侵染能力不同的问题。Yepes 等于 1995 年首次用基因枪在 1 000 氮气压, 1 cm 射击距离, 20%~40% 相对湿度的条件下轰击 6 个菊花品种的茎段、叶片和叶柄, 其中 4 个品种获得了转化番茄斑萎病毒 *TSWV(N)* 外壳蛋白基因的工程植株。Yepes 等 1999 年再次用基因枪法轰击菊花外植体获得成功。Karle 等用聚乙二醇 (PEG) 法成功把 *NPT II* 基因导入菊花中。

2 影响转化效果的因素

根癌农杆菌的侵染能力和外植体的感受性是植物转化成败的关键因素。农杆菌染色体基因的调控、*vir* 基因的活化能力、农杆菌的 Ti 质粒类型、外植体生理状态和选择压等都影响转化效果。

2.1 不同类型的根癌农杆菌菌株侵染力不同

不同根癌农杆菌菌株的侵染力不同, 同时不同菊花品种对同一农杆菌的敏感性也不同。菊花遗传转化中使用的根癌农杆菌主要有胭脂碱型农杆菌: C58、MOG301、T37spec; 章鱼碱型农杆菌: A6、Ach5、LBA4404、MOG101、GV2260 和琥珀碱型农杆菌: A281、EHA101、EHA105、Bo542、Chry5、B6S3、MOG10、MP90。大部分研究认为胭脂碱型农杆菌 MOG301、章鱼碱型农杆菌 A6、Ach5、MOG101, 琥珀碱型农杆菌 A281、EHA101、EHA105 和从菊花中分离的农杆菌 Chry5 对菊花的侵染力高, 章鱼碱型农杆菌 LBA4404 转化后转化率低。原因是用不同根癌农杆菌携带相同的表达载体进行遗传转化, LBA4404 转化率低, 甚至得不到转化苗。而 TAKATSU、Boase 研究与上述结论不一致, Boase 认为在正确选择菊花品种及不同来源的外植体、菌株、表达载体和抗生素的条件下 LBA4404 可以获得好的转化效果, 表达载体可能是造成转化率低的原因。TAKATSU 也认为 C58C1、MP90、LBA4404 三种菌株的侵染力没有差别。

2.2 选择压对转化率的影响

菊花遗传转化中主要采用根癌农杆菌介导的间接转化方法, 在筛选过程中需要加入两种抗生素, 一种是



第一作者简介:吕晋慧, 女, 1972 年生, 1996 年毕业于山西农业大学林学院, 1999 年获果树学硕士学位, 同年留校任教, 2005 年于北京林业大学园林学院获得园林植物及观赏园艺专业博士学位, 研究方向为园林植物与遗传育种, 现主要研究内容为通过分子育种调控菊花花期研究。

收稿日期: 2006-09-10

抑菌抗生素,主要有羧苄青霉素、头孢霉素,浓度范围为 100~500mg/L。另一种是选择标记抗生素,有卡那霉素、G418 和潮霉素,其中用的较多的是卡那霉素,使用浓度大多集中在 10~50mg/L。

抗生素对外植体会产生毒害作用。Jaime 比较了不同抗生素对菊花的毒害性,依次为氯霉素>利福平>链霉素>米诺环素>羧苄青霉素>抑菌抗生素。抗生素种类的正确使用是影响菊花转化的关键之一。Renou 用 25、50mg/L 的卡那霉素和 5、10mg/L 的潮霉素进行筛选培养,卡那霉素筛选后没有获得转基因苗,潮霉素筛选后转化率则高达 40%。Yepes 研究表明孢霉素对外植体有一定的毒害作用,影响菊花再生,而羧苄青霉素则促进菊花不定芽再生,有利于遗传转化。

零界选择压的确定及加入选择压的时间和选择压的强度对转化效果也有较大影响。遗传转化中不同菊花品种有不同的零界选择压。如 Yepes 就菊花品种 'Blush'、'Dark Bronze Charm'、'Golden Polaris'、'Iridon'、'Polaris' 和 'Tara' 对卡那的敏感性进行了研究,其中 'Blush'、'Tara' 对卡那特别敏感,'Dark Bronze Charm' 和 'Iridon' 品种则需要较高的卡那浓度。依据加入选择压的时间不同可分为早期选择、延迟选择和不加选择压 3 种选择方法。按照选择压强度大小及施加过程又分为逐步提高选择压、逐步降低选择压和采用零界选择压 3 种选择方法。遗传转化中要根据不同的菊花品种做适当调整。

2.3 外界因素对转化效果的影响

农杆菌的浓度、侵染时间、农杆菌和外植体共培养温度、时间等都是影响转化效果的重要因素。不同遗传转化体系差异较大,其中农杆菌浓度在 OD_{600} 0.02~2.2 之间、侵染时间最短 10~15 s,最长 30 min,共培养时间 0~8 d。转化体系受基因型的影响较大,只能根据不同品种、外植体、菌株确定最佳的菌液浓度、侵染时间等。

vir 区基因活化诱导物 AS 的使用也影响转化率。de Jong、TAKATSU、Annadana、Boase 认为 AS 有利于提高转化率。而蒋细旺认为 AS 对转化没有明显影响。

外植体的感受性是菊花转化成功的关键因素之一。一般认为发育早期的幼年态组织细胞分裂旺盛,容易脱分化实现基因转化。菊花转化中采用幼嫩的叶片、茎段容易转化成功。同时组培苗比大田苗更容易转化。

伤口的质量也会影响转化效果。在组培中增加叶片表面的伤口可以提高外植体的再生率,但伤口过多造成农杆菌对外植体的毒害、外植体的感受性下降、严重影响抗性芽的再生。De Block 也有类似报道,过多的伤口降低了马铃薯的转化率和再生率。

Boase、Fukai 认为乙烯抑制剂的使用可提高转化率。Fukai 研究结果表明使用 $AgNO_3$ 后转化率从 1% 提高到 13%。

2.4 不同基因型间的差异

基因型也是影响转化的重要因素之一。基因型影

响菊花外植体的再生率和不定芽数量及再生的稳定性。只有再生率高、再生稳定的品种才有成功转化的可能。同时不同菊花品种对菌株、抗生素的敏感性差异都影响菊花转化效果。Urban 转化 3 个菊花品种 'Iridon'、'Hekla'、'Polaris',只有 'Iridon' 获得了稳定的转化株系。高亦柯转化不同基因型的菊花只有 '美矮黄' 获得了转化植株。

3 菊花基因工程中存在的问题

3.1 转化率问题

转化效率低是菊花基因工程中存在的主要问题之一。目前虽已获得了一些菊花品种的转基因植株,但这些转基因植株大都是进行了大量的重复试验后才获得的。转化效率低主要表现在转化频率低、重复性差、随机性大、对基因型的依赖性强等。目前已有的报道中获得高重复性转化的菊花品种仅限于 '1581'、'Paliement'、'Shuhou-no-chikara'、'Iridon' 品种。导致转化率低的原因除上述的几个因素外,另一个重要的原因是转化后外植体内生困难、转化细胞不易成苗。以后可以改进的措施有:扩大品种选择,进一步完善再生体系,继续优化现有的遗传转化体系,并积极探求更有效的转化方法。

3.2 外源目的基因在菊花中的表达问题

外源基因的表达调控比较复杂。外源基因在转化植株中的表达主要与外源基因的表达水平和表达的植物组织部位等有关。菊花转基因中外源基因的沉默或外源基因低水平表达、不稳定表达和对转化外源基因表达可操作性差等是目前菊花转基因面临的主要问题之一。

研究认为启动子 (CaMV35S 启动子、potato Lhca3、St.L 启动子、UEP1 启动子) 不同是外源基因表达水平不同的因素之一。菊花遗传转化中有关启动子的研究较少,目前仅见 Annadana、de Jong、Fukai、Wordragen 有相关报道。Annadana 认为 CaMV35S 启动子不适宜用来进行菊花遗传转化。其中 Wordragen 研究表明 35S 启动子下的 GUS 基因在菊花中 (5 d) 表达比烟草 (2 d) 要迟 3 d。Annadana 研究结果表明双 CaMV35S 启动子与单一的 CaMV35S 启动子作用相仿,GUS 表达活性都很低。而 UEP1 启动子条件下的基因在花中的表达水平是 CaMV35S 启动子下的 50 倍,Lhca3、St.L 启动子下的 GUS 活性是 CaMV35S 启动子下的 GUS 活性的 175 倍。而烟草中 dCaMV35S 下的 GUS 活性是菊花中 GUS 活性的 400 倍。CaMV35S-GUS 的区别是 5' 端的读码区不同,De Loose、Harpster 认为这段序列可以影响 mRNA 的稳定性。De Loose 认为这段序列在转基因烟草中可能起到调控 GUS 活性的作用。Lhca3、St.L 启动子有类似的基因序列。而 Lhca3、St.L 和 CaMV35S 启动子作用下外源基因在转基因烟草中的表达效果相似,菊花有可能缺乏使 CaMV35S 启动子有效表达的转录因子。dCaMV35S 在菊花转基因中的作用有待进一步研究。

目前还不能把 dCaMV35S 看或是菊花表达水平低

七种方法鉴别苗木种子的优劣

李明, 孙俊庶

1 感观法 它是利用人的感觉, 观察种子是否发育正常的一种方法。如观察种子的饱满程度、种皮的颜色、坚韧程度和有无光泽, 有无虫眼以及气味等。发育正常的种子都具有一定的光泽, 如油松种子灰褐色, 落叶松、水曲柳、花曲柳种子都是黄褐色, 樟子松、赤松和胡桃楸种子都是暗褐色, 红松种子褐色, 榆树种子黄色, 文冠果种子栗褐色等。核桃、文冠果等大粒种子, 用手拿起摇动发出响声, 证明已干, 用手捻种仁, 柔韧不碎的是新种子, 有粉状物的为旧种子。而陈旧、发霉或浸过水的种子, 干燥后则无光泽。发育成熟的种子, 一般都具有本树种特有的气味。如松类种子具有松脂香味, 锦鸡儿等豆科树木种子都有水豆味, 芸香科树木种子常带有桔子皮味等。若是有发霉和腐烂的气味, 说明种子已经变坏, 不能再用了。用手指摸榆树、槭树等翅果种子, 种仁饱满为好种子, 反之是秕粒或空粒的坏种子。种皮有虫眼或菌丝体的种子都不能用。

2 切开法 这种方法针对的是大、中粒种子, 其方法是用快刀将种子从中切开进行观察, 凡是种子饱满、种胚健康、胚乳或子叶的颜色正常,

都是品质优良的好种子; 如果种胚腐烂、发软、变色、有斑点, 或种仁干硬、萎缩、有虫害以及空粒、无胚的均为品质低劣的坏种子。如油松种子, 胚乳为白色且油分多, 胚淡白色的是好种子, 胚乳灰白色且油分少, 胚变软呈深黄色的是坏种子, 杜仲种子, 种仁金黄色、油分多的为好种子, 种仁干硬、带黑色、油分少的为坏种子; 核桃种子, 种仁新鲜饱满, 胚黄色或乳白色的为好种子, 种仁萎缩或局部油质

化的为坏种子。

3 挤油法 此法适用于杨树、柳树、泡桐、香椿等中、小粒种子。方法是从盛种子的麻袋或容器中, 分上中下三部分取出 100~200 粒种子然后均匀地放在白纸上, 上面再盖一张白纸, 用玻璃碾压研碎, 然后再把上层白纸和碾碎的种子拿开, 油质湿润纸面多的是好种子, 油印湿润过少、或没有油印的是发育不良的种子。也可浸湿后或放在水中煮 10 分钟, 捞出放在两个玻璃片中间挤压, 只压出白色种仁的是饱满有生命力的种子, 只压出水分和气泡的是空粒或秕粒种子, 最后计算种子的优良率。

4 染色法 这是利用苯胺染料不能透过活细胞的原生质, 而能透过死细胞的组织并染上颜色来判断种子有无生命力的检验方法。此法适用于许多针阔叶树种种子, 如油松、红松、杉木、水曲柳、白蜡、刺槐等。在死胚中含有单宁的, 如栎类种子, 因染不上颜色, 不能采用此法。染色的方法是, 种子浸水膨胀后取出种胚, 放在 0.05% 的靛蓝溶液中, 根据树种和温度的不同, 将种子浸泡 1~3 h 后, 取出洗净, 观察染色程度。凡是整个胚或子叶以下 2/3 没有染上色的都有生命力。凡种胚、胚芽全部染色, 胚根和胚茎大部分染上色的都有生命力。凡种胚、胚芽全部染色, 胚根和胚茎大部分染色或胚茎中间染色的均无生命力。

5 比重法 此法适用于大粒种子。根据种子在液体中漂浮或下沉的多少来鉴别种子的好坏。方法是, 先从种子中取出少量的坏种子, 若比水的比重轻, 可在水中加适量的酒精, 若比水的比重大, 可在水中加适量的食盐, 配制适宜的溶液, 将坏种子放入液体中全部漂浮为准。然后取出 100~200 粒种子放入深液中, 根据漂浮和下沉的种子多少, 计算出种子的优良率。

6 爆裂法 此法适用于带有油性的油松、落叶松、侧柏等。方法是取种子放在热锅里, 很快就会发出响声爆裂开的为好种子, 不爆裂的为坏种子。

7 透明法 这种方法主要用于小粒种子, 如杉木种子, 用温水浸泡 24 h, 然后用两片玻璃夹住种子, 对光仔细观察, 透明的是好种子, 不透明而带黑斑的是坏种子。

(河北省衡水市园林处, 053000)

或基因沉默的唯一原因。菊花巨大的染色体组 (9000Mb/细胞或 25pg/细胞)、外源基因的多拷贝、外源基因在染色体组中的整合位点等也可导致外源基因沉默或低水平表达。引起外源基因沉默的因素较多也较复杂, 还有赖于转基因技术及配套科学和技术的进一步完善。

4 菊花基因工程的应用进展

菊花基因工程起步较晚, 转化过程又受菌株类型、基因型等的影响, 成功转化并能稳定表达的并不多。从近 20 年的研究看, 早期的研究主要是建立有效的菊花再生体系和探讨遗传转化中的各种因素对转化的影响, 转入的基因主要是 *NPT II* 和 *GUS* 基因。后期则以转入目的基因为主建立不同菊花的转化体系。外源基因主要有改变花色基因 (*Jc*、*GHIS*、*PSY*、*IsyCB*)、抗性基因 (*Bt*、*NP-1*、*TSWV*、*RCC2*、*pacl*、*gna*、*DREB1A*、*Gry1AC*)、成花基因 (*LFY*、*AP1*)、改变形态基因 (*gai*、

Rolc、*PHYB-1*、*tbMADS4*) 等。旨在通过转基因调控菊花花色、提高抗性 (抗病、抗虫、抗寒)、改变植株株型和调控花期等, 其中部分转基因苗表现出了目的性状, 并进入了田间试验。蒋绍叶、Jaime 对此也有较详细的综述。

5 展望

目前菊花生产中病虫害严重、菊花花期集中、周年生产成本低、花色单调等是影响国内外菊花生产的主要瓶颈。但菊花是草本植物, 与木本植物相比, 它具有周期短、再生体系相对容易建立的优点, 同时菊花主要以观赏为主, 转基因植株容易为人们接受。但菊花基因工程起步较晚, 遗传转化过程受菌株类型、基因型等的影响, 转化效率低、重复性差, 随着分子生物学的迅速发展, 与基因工程有关的各环节将不断得到改进和完善。分子育种与常规育种相结合有可能培育出抗性更强、株型更低矮 (地被菊)、花期更早、花色花型更新颖的菊花新品种。