

# 枸杞遗传转化研究进展

曲 玲, 石 志 刚, 焦 恩 宁, 李 丁 仁, 曹 有 龙

(宁夏农林科学院国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

**摘 要:**枸杞是多棘刺浆果类落叶小灌木,具有“药食同源”型的综合特征。现从遗传转化方法、转化所用的外植体以及导入的外源目的基因等方面总结了枸杞的遗传转化研究进展,分析了枸杞转基因研究中存在的一些问题,并探讨了今后的研究方向及应用前景。

**关键词:**枸杞;遗传转化;离体培养;基因工程

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0187-05

枸杞系茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium*)多棘刺浆果类落叶小灌木,世界上枸杞属植物约有 80 余种,多数

**第一作者简介:**曲玲(1972-),女,宁夏银川人,硕士,副研究员,现主要从事枸杞抗病性和枸杞生物技术抗病育种等研究工作。E-mail:cutepearl-1230@163.com.

**责任作者:**曹有龙(1963-),男,宁夏中宁人,博士,研究员,硕士生导师,宁夏回族自治区枸杞种质创新与遗传改良创新团队首席专家,现主要从事枸杞生物技术研究工作。E-mail:youlongc@hotmail.com.

**基金项目:**宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ0964, NZ12251)。

**收稿日期:**2012-09-10

种分布在南、北美洲,欧亚大陆约有 10 种,我国有 7 种和 3 个变种,主要分布于西北和华北<sup>[1]</sup>。枸杞作为药用植物,具有“药食同源”型综合特征,具有补肝益肾、强筋壮骨、益精明目、滋阴润肺等传统医疗保健功效,近年来,随着人们对枸杞营养成分、药理作用的系统研究,枸杞还具有改善与调节免疫功能、抗肿瘤、抗氧化及抗衰老等奇特功效。多年来,随着枸杞产业的不断发展,采用常规育种技术,枸杞品种在产量和品质得到了成功改良,菜用枸杞新品种培育方面也获得突破<sup>[2-4]</sup>,但目前生产上仍缺乏抗病、抗逆、抗除草剂且农艺性状优良的主栽品种。由于枸杞遗传高度杂合、遗传背景不清,加之基因组信息缺乏、遗传信息研究薄弱,因此采用传统的

[2] 杨艳珊. 花卉设施栽培研究进展[J]. 现代化园艺, 2011(7): 3-7.

[3] 李春华. 云南花卉产业发展现状及对策研究[J]. 企业导报, 2010(7): 125-126.

[4] 陆继亮. “云花”出口现状与展望“十一五”云南花卉出口透析[J]. 花木盆景(花卉园艺), 2011(1): 54-55.

[5] 云南花卉出口国家和地区增加到 49 个[EB/OL]. <http://www.troagri.com.cn>, 2012-03-19.

[6] 吉章. 云南花卉产业发展新格局[J]. 致富天地, 2011(6): 24.

[7] 温跃戈, 张启翔, 赵素敏, 等. 昆明地区花卉生产温室发展规划探讨[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(4): 88-92.

[8] 陆继亮. 2007 年云南花卉种苗产销分析[J]. 中国花卉园艺, 2007(9): 19-21.

[9] 段欢耘, 毛羽, 王靖元, 等. 昆明市设施花卉土壤盐化现状与可持续发展对策[J]. 现代农业科技, 2011(7): 307-312.

[10] 苏友波, 李刚, 毛昆明, 等. 昆明地区主要花卉蔬菜基地设施栽培土壤养分变化特点[J]. 土壤, 2004, 36(3): 303-306.

## Current Situation and Suggestions of Yunnan Flower Facility Cultivation

ZHAO Pei-fei, LI Xia

(Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205)

**Abstract:** On the basis of describing advantages of Yunnan flower industry at a leading position in China, rationalize industry regional distribution, economic organizations between flower business and flower growers, the current situation of rapid development of Yunnan flower facility cultivation, improvement of cultivation and management techniques were analyzed. The existing problems in the flower facility cultivation were pointed out, such as lower facilities, scientific needed to be improved, lower utilization rate because of blind investment and construction facilities, lacking of advanced production technology and management tools, lacking of dedicated cultivars and standardized technology system and so on; finally, the corresponding countermeasures and suggestions were proposed.

**Key words:** Yunnan flower; facility cultivation; status; suggestion

育种方法对枸杞进行品种改良存在周期长、效率低等问题。利用植物基因工程技术培育枸杞品种,可以消除上述因素的限制,打破物种间的界限,更精确地定向改良现有枸杞种质的遗传性状,获得传统育种方法难以得到的枸杞新种质,为枸杞育种研究、种质资源开发利用提供了一条非常有潜力的途径。

植物遗传转化是植物基因工程的一个重要环节,是应用重组 DNA 技术将外源基因导入植物基因组,以获得转基因植株的技术<sup>[5]</sup>,自从世界上第 1 例转基因植物问世以来,通过各种转化方法,已获得转基因植物近 200 种<sup>[6]</sup>。枸杞遗传转化的研究起步较晚,但由于枸杞无性繁殖容易,对转基因植株外源性状保持有利、易于离体操作、离体繁殖再生系统已较为成熟,因此该项研究进展较快。迄今为止,农杆菌介导的枸杞遗传转化系统已经建立,运用基因枪法等基因直接转移技术也已获得了转基因枸杞再生植株。该文综述了近年来国内枸杞遗传转化的研究概况,着重从枸杞遗传转化方法、转化所用的外植体以及导入的外源目的基因等方面进行了分析,并探讨了枸杞转基因研究中存在的主要问题,展望了今后的研究方向,旨在为枸杞基因工程育种研究提供一定的参考。

## 1 枸杞遗传转化方法

应用于植物的遗传转化方法按照载体的形式可以分为农杆菌介导的外源基因转移法和基因的直接转移法,前者包括原生质体共培养法、植物组织器官共培养法、活体接种感染法及植物原生质体和农杆菌原生质球的融合转化;后者包括化学法、电激法、微注射法、基因枪法、花粉管通道法、激光微束法、超声波法等。枸杞遗传转化技术是随着枸杞组织培养和细胞培养技术不断完善而发展起来的。枸杞组织培养和细胞培养的快速发展,为植物基因工程技术应用于枸杞遗传改良打下良好的基础。目前应用于枸杞的转基因技术主要是农杆菌介导的外源基因导入方法,外源基因直接导入的中子束法和基因枪法也有报道。

农杆菌介导法与其它转基因方法相比,具有方法成熟、简便易行、转化机理清楚、转化率高,转移目的基因明确(为 T-DNA 左右边界之间序列),能够转化大片段 DNA,转化的外源基因以单或低拷贝整合到植物基因组中,遗传稳定性好,符合孟德尔定律等特点,成为双子叶植物常用的基因转化方法,运用于一些单子叶植物遗传转化也获得了成功<sup>[7-8]</sup>。迄今获得的近 200 种转基因植物中 80% 以上是通过根癌农杆菌系统转化获得的<sup>[9-10]</sup>。农杆菌介导法也是枸杞基因转化最早成功的方法,由王慧中等<sup>[11-12]</sup>首先运用该方法建立起了枸杞遗传转化体系,并获得了卡那霉素抗性再生植株。继而赵亚华等<sup>[13-14]</sup>、刘丹如等<sup>[15-16]</sup>、杜国利等<sup>[17-18]</sup>采用叶盘转化法将外源目的基因转入枸杞,通过分子杂交和表达产物的

分析检测或免疫组织化学方法证明目的基因已经导入枸杞体内并得到表达,从而分别获得了对镉具有一定抗性<sup>[13]</sup>、锌含量是普通枸杞 2 倍多的高锌转基因枸杞植株<sup>[14]</sup>及表达 HIV 壳体蛋白(Capsid, CA)的枸杞再生植株及毛状根<sup>[15-18]</sup>,标志着枸杞遗传转化研究已经进入提高枸杞营养价值和药用价值的实际应用化阶段。此外,在增强枸杞抗虫性方面,研究者将雪莲花凝集素(GNA)基因采用农杆菌介导的叶盘法导入枸杞细胞中并获得了再生植株,经分子检测目的基因得到了表达,部分再生植株表现出对枸杞蚜虫一定的抗性<sup>[19-20]</sup>。Giri 等<sup>[21]</sup>认为木本植物比起草本植物难于进行基因转化,缺乏有效的遗传转化系统和植株再生系统是其中重要的原因之一,由王慧中等<sup>[12]</sup>通过愈伤组织再生途径所建立的枸杞遗传转化系统,转化频率均较低,前者转化后愈伤组织分化芽中,只有 30% 为正常芽,后者的转化频率也只有 11.8%,Hu 等<sup>[22]</sup>进而又通过体细胞胚再生途径建立起了较为理想的枸杞基因转化受体系统,与以前相比该系统具有转化率高、嵌合体较少、遗传性一致等优点,有约 60% 的转化外植体产生了抗性愈伤组织,每克鲜重的抗性愈伤组织又可形成约 166 个体细胞胚<sup>[23-25]</sup>。农杆菌介导的遗传转化虽然受体类型广泛,可在原生质体、单细胞、细胞团、组织器官和植株水平进行操作,但木本植物植株再生基因型依赖很大,目前建立的枸杞遗传转化体系外植体均来源于宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L)种内品种,研究的树种单一,未能对枸杞种质资源进行有效的利用,今后枸杞遗传转化研究应拓宽研究树种,实现育种目标的多元化。

DNA 直接转化是指用物理、化学和生物手段将裸露的外源 DNA 导入植物细胞,并使外源 DNA 所包含的基因在植物细胞内进行表达的转基因方法。这一方法能克服农杆菌介导法中宿主范围的限制,使受体植物范围大大扩展,特别是使过去认为十分困难的禾谷类作物的遗传转化有了突破性进展。枸杞遗传转化研究中运用的 DNA 直接转化法有快中子束法和基因枪法。快中子束的转基因机制与电激法<sup>[26]</sup>、激光微束穿刺法<sup>[27]</sup>等基因转化方法基本相同,一方面中子束可在细胞膜及细胞壁上穿孔,形成 DNA 进入的通道,克服了外源基因进入细胞核的障碍;另一方面是中子辐射能够引起 DNA 大分子链的断裂和碱基损伤,从而使生物体内的 DNA 修复功能活跃起来,促进了外源基因的整合<sup>[28]</sup>。孔英珍等<sup>[28]</sup>首次研究了快中子束在枸杞转基因方面的应用,并获得了抗卡那霉素的小苗,初步确证外源基因已导入枸杞细胞,但该转化系统转化频率很低,仅有 4.4%。基因枪法又称粒子轰击技术(Particle bombardment)或高速微粒子发射技术(High-velocity microprojectile),它是籍高速度运动的金属微粒将附着于其表面的核酸分子引入到受体细胞中的一种遗传物质导入技术。基因枪法

的最大优点是可转化多种组织和器官,转化受体可以是胚性悬浮细胞、愈伤组织、未成熟胚、分生组织,也可以是花粉和茎尖等,此方法没有明显的宿主限制,并且能将基因直接导入叶绿体中,现已成为植物遗传转化工作中应用仅次于农杆菌转化技术的转基因方法<sup>[29]</sup>。顾海燕等<sup>[30]</sup>、曹有龙等<sup>[31]</sup>以叶片为外植体,首次采用基因枪法将抗肝炎基因导入枸杞叶绿体基因组中,获得了壮观霉素抗性植株,经PCR初步检测外源目的基因已导入枸杞细胞中,抗性愈伤组织得率为约为5%。目前应用于枸杞遗传转化的外源基因直接转化的方法较少,与农杆菌介导法相比,转化效率也很低,对获得的转基因枸杞再生植株大多数未进行分子杂交检测,此外,转化条件还需进一步优化以提高转化效率。

## 2 转化所用的外植体

来源于植物的不同外植体及同一外植体的不同发育阶段对于遗传转化成功都具有重要意义。目前枸杞遗传转化研究中运用最多且转化成功的受体材料主要有叶片和茎段<sup>[11-15,19-20,24-25,32]</sup>。但采用茎段、叶片、子叶、胚轴等离体多细胞组织或器官通过愈伤组织途径诱导的不定芽往往是嵌合的,变异率高,需进一步分离、筛选,从中选出同质的转化植株,但有时这并不容易做到,仅能获得嵌合的转化植株,遗传稳定性差。早期胚性愈伤组织细胞的细胞壁薄,广泛存在胞间连丝,而且代谢十分活跃,因此孔英珍等<sup>[28]</sup>也将其作为转基因枸杞研究中的理想受体材料。曹有龙等<sup>[31]</sup>和杨汉民等<sup>[33]</sup>通过体细胞胚发生途径获得了枸杞再生植株,因为枸杞体细胞胚的发生源于单个细胞而且染色体稳定,因此通过胚状体发生途径建立的枸杞再生体系也是最为理想的基因转化受体系。Hu等<sup>[24]</sup>将农杆菌侵染叶片后获得的愈伤组织转接于胚状体培养基上诱导植株再生,获得的转基因植株形态和核型正常,而且转基因胚性愈伤可长时间保持高效体胚分化频率和植株再生频率,转化频率比以前建立的枸杞转化系统显著提高。胡忠等<sup>[32]</sup>还研究了外植体的取材时间对转化效率的影响,认为在以发根农杆菌A<sub>4</sub>介导的枸杞转化中,种子苗的3周龄叶片切段和2周龄茎切段发状根诱导频率较高;而Hu等<sup>[24-25]</sup>以根癌农杆菌EHA101(pIG121Hm)介导的基因转化中,也是3周龄的种子苗叶片切段的转化频率较高。另外他还认为外植体经预培养后进行转化效率较高。

以原生质体和胚性悬浮单细胞系为基因受体材料主要优点是外源DNA的转入更加有效,嵌合体较少,可获得同质的转化植株,易于筛选。目前枸杞的原生质体和悬浮单细胞培养均已较高频率地获得了再生植株<sup>[34-37]</sup>,为一些以它们为理想基因受体的DNA直接导入法(基因枪法、PEG法、电激法)的运用提供了条件,从而可建立起转化效率更高、稳定性更好更多样的枸杞遗传转化系统。

## 3 外源基因的类型

目前应用于枸杞遗传转化研究的选择标记基因有抗生素抗性基因,如新霉素磷酸转移酶基因(NPT-II)<sup>[11-12]</sup>、潮霉素磷酸转移酶基因(Hpt)<sup>[15]</sup>及氨基糖苷3'-腺苷酸转移酶基因(aadA)<sup>[30]</sup>。报告基因有胭脂碱合成酶基因(NOS)<sup>[11-12]</sup>、 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因(GUS)<sup>[24-25]</sup>及NPT-II<sup>[11-12]</sup>,它们在农杆菌介导的枸杞遗传转化体系的建立和转化条件的优化等方面起到重要作用。由于枸杞遗传转化研究起步较晚,迄今为止,导入枸杞的外源目的功能基因很少,主要应用于提高枸杞的营养价值和药用价值,如来源于小鼠的金属硫蛋白-IcDNA,将其导入枸杞细胞并得到表达后可获得富集锌或抗镉的转基因枸杞<sup>[13-14]</sup>;MA<sub>4</sub>-CA融合基因,转入枸杞后可表达人类免疫缺陷病毒(HIV)疫苗<sup>[15-16]</sup>;HisE基因,转化枸杞后可用于培育转基因肝炎疫苗型枸杞<sup>[30]</sup>;雪花莲凝集素(GNA)基因,导入枸杞基因组后可以增强枸杞对蚜虫的抗性<sup>[19-20]</sup>;BAR、K<sub>C</sub>、CAF<sub>1</sub>基因<sup>[38]</sup>。由于枸杞生产中病虫害危害严重、果实储藏保鲜困难,所以枸杞基因工程育种中抗病、抗虫及耐储新品种的培育相对来说就更为迫切,目前这方面的研究进展还相对缓慢,今后枸杞遗传转化研究中应采用更多具有遗传改良意义的基因如抗病虫基因、延缓果实衰老基因等,以培育出抗逆、品质优良、耐储的育种材料。

## 4 枸杞遗传转化存在的问题与展望

### 4.1 枸杞离体组织培养再生系统中的问题

建立高频率、重复性好的离体组织培养再生系统是进行植物遗传转化的前提,也是影响转化频率的重要因素之一。我国自20世纪80年代初开展枸杞组织培养研究以来,进展迅速,以枸杞叶片<sup>[39-40]</sup>、下胚轴、茎端和幼嫩子房<sup>[41]</sup>、叶柄、茎段<sup>[42-43]</sup>、花药(花粉)<sup>[44-45]</sup>、胚乳<sup>[46]</sup>、悬浮培养细胞系<sup>[32,47-48]</sup>、原生质体<sup>[34-36]</sup>为材料的组织培养均较高频率地获得了再生植株,而且对再生植株不同发育途径(即指通过愈伤组织途径、原生质体途径、胚状体再生途径等)中的形态发生进行了细胞组织学观察<sup>[32-33,36,49]</sup>,这些离体再生系统的建立为枸杞的遗传转化研究提供了较为良好的基因受体系统。但目前枸杞中再生体系相对比较成熟的主要是宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)的一些品种(如“宁杞1号”、“宁杞2号”),而对于其它具有育种价值和经济价值的野生近缘树种资源,如枸杞(*L. chinense* Mill)、北方枸杞(*L. chinense* Mill. var. *potaninii* (Pojark.) A. M. Lu)及黑果枸杞(*L. ruthenicum* Murr.)等都还没有成熟的组培再生体系,这大大限制了枸杞遗传转化研究对枸杞丰富基因资源的利用,因此今后不但要从最佳培养基配方、最佳培养条件等方面提高现有受体系统的再生频率,而且要着手建立不同枸杞树种的最佳组织培养系统。



#### 4.2 遗传转化技术中存在的问题

农杆菌介导的植物基因转化由于其自身的优越性成为枸杞遗传转化中应用最早、最成功的方法,但还是存在转化频率较低、稳定性较差等问题,由于农杆菌与木本植物寄主的相互作用可能更加复杂,因此为了提高现有枸杞转化系统的转化频率,以后还应根据被转化的树种及外植体的类型对所用农杆菌菌株类型、转化效果因子(包括菌液浓度、共培养条件、侵染时间等)进行优化选择;对再生植株不同发育途经的细胞起源进行了解,以便在组培培养方法、培养基的设计上及材料的选择上更有利于已转化细胞的启动分裂及植株再生,仅可能保证转化细胞与再生细胞的一致性;最后应采用合适的选择标记基因,合适抗生素浓度在不影响细胞正常生

长的前提下准确、有效地区分转化与非转化细胞,并逐步建立适应各树种的基因工程转化体系。

利用基因枪法和中子束法建立起来的枸杞遗传转化系统与农杆菌法相比起来转化频率更低,更需要根据转化材料的生理特点,从技术因素、设备改进、培养条件等多方面进行优化,提高转化频率及重复性,此外,还可以尝试基因枪法与农杆菌协同转化的方法,以提高转化效率。枸杞是无限花序,全年的开花次数多,花期长,可持续 4~5 个月,因此采用花粉管通道法进行基因转化不但可绕开组织培养,而且可能更具有可操作性。

总之,枸杞遗传转化研究虽已取得了一些进展(表 1),但目前与其它作物相比还相对滞后,尽管已建立起了少数种(品种)的遗传转化体系,但成功地将外源目

表 1 枸杞遗传转化研究简况

Table 1 Study on genetic transformation of wolfberry

外源基因	转化方法	菌株	种或品种	转化材料	结果	参考文献
<i>NPTII, nos</i>	根癌农杆菌	C58 d	宁夏枸杞	嫩茎	抗 Kan 再生植株	[11-12]
小鼠金属硫蛋白-IcDNA	根癌农杆菌	LBA4404	“宁杞 1 号”	幼茎	富集锌枸杞再生植株	[14]
小鼠金属硫蛋白-IcDNA	根癌农杆菌	LBA4404	“宁杞 1 号”	幼茎	抗镉枸杞再生植株	[13]
<i>MA<sub>4</sub>-CA</i> 融合基因	根癌农杆菌	EHA105	宁夏枸杞	叶片	表达 HIV 疫苗再生植株根系	[16]
发状农杆菌 <i>A<sub>4</sub></i> (未构建外源基因)	发根农杆菌	A4	宁夏枸杞	叶片、茎	再生出发状根	[31]
<i>NPTII</i>	中子束法	—	宁夏枸杞	叶片	抗 Kan 再生植株	[28]
<i>GNA<sub>1</sub>, NPTII</i>	根癌农杆菌	LBA4404	“宁杞 1 号”	叶片	转基因再生植株	[19-20]
<i>GUS, NPTII</i>	根癌农杆菌	EHA101	宁夏枸杞	叶片	抗 Kan 再生植株	[22, 24-25]
<i>GUS, BAR, KC<sub>1</sub>, CAF<sub>1</sub></i>	根癌农杆菌	LBA4404	宁夏枸杞	叶片	抗 Kan 再生植株	[38]
<i>HisE, aadA</i>	基因枪法	—	“宁杞 1 号”	叶片	抗壮观霉素植株	[30]

的基因转入枸杞的报道仅有不到 10 篇,且基本尚未真正在农业生产或医药领域得到应用,而且研究范围较窄,与抗病、抗逆、产量品质、耐储相关的外源目的基因的转化研究均未开展,针对这些问题,今后应加强以下方面的研究工作:一是对影响转化效果的因子进行进一步优化,提高枸杞遗传转化技术体系(特别是单细胞再生与转化系统)的转化效率及稳定性,开发适合多基因型的高频再生系统,加强外源目标基因在转基因枸杞及其后代中稳定遗传表达及田间综合性状评价的研究。二是除利用模式植物中转化成功的外源目的基因外,应加强枸杞新基因克隆和功能鉴定方面的研究,特别是应注意挖掘我国丰富的野生枸杞资源和地方品种中抗病、抗虫及独特风味品质方面的基因源,给枸杞转基因研究提供更多有应用价值的目的基因。三是加强枸杞基因组研究。四是应及时开展转基因枸杞安全性评价和检测技术研究,包括转基因枸杞产品的食品安全、生态环境安全等。同时,为了增强转基因枸杞的食用安全性,在选择目的基因时,应选择对人畜无害的目标基因,还可采用组织特异性表达启动子驱动目的基因在人畜不食用的植物组织器官中表达。此外,可采用叶绿体转化系统避免外源基因随花粉传播,从而提高转基因枸杞的环境安全性,只有这样才能有效促进转基因枸杞的推广应用。相信随着基因克隆、载体构建、枸杞离体组织培

养再生植株系统和遗传转化技术的日臻发展和完善,培育出具有商业价值的高产优质、抗逆、抗病虫、耐储运的枸杞新品种将成为可能。

#### 参考文献

- [1] 钟铨元. 枸杞高产栽培与育种[M]. 银川:宁夏人民出版社,1994: 116-117.
- [2] 钟铨元,李健,樊梅花,等. 枸杞新品种“宁杞 1 号”的选育[J]. 宁夏农林科技,1988(2):28-30.
- [3] 钟铨元,李健,樊梅花,等. 枸杞新品种“宁杞 2 号”的选育[J]. 宁夏农林科技,1989(3):21-23.
- [4] 李润淮,石志刚,安巍,等. 菜用枸杞新品种宁杞菜 1 号[J]. 中国蔬菜,2002(2):48.
- [5] 贾士荣. 植物遗传转化的研究进展[C]//农业高新技术论. 北京:科学技术文献出版社,1993:121.
- [6] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科技出版社,2002.
- [7] Cheng M, Joyce E F, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115: 971-980.
- [8] 杜娟,王萍,王昱. 植物遗传转化育种技术的研究进展及评价[J]. 吉林农业科学,2000(5):23-27.
- [9] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998:194-195.
- [10] 贾士荣. 转基因植物概述[C]//农业生物技术进展与展望. 合肥:中国科学技术大学出版社,1993:17-24.
- [11] 王慧中,杜立群,李安生,等. 枸杞基因转移再生苗的研究[J]. 中药材,1991,14(10):3-4.
- [12] 王慧中,杜立群,黄发灿,等. 根瘤农杆菌介导的枸杞转化及转化植

- 物的获得[J]. 中国科学(B辑), 1993, 23(4): 391-395.
- [13] 赵亚华, 茹炳根. 转小鼠金属硫蛋白 cDNA 枸杞的获得及其检测[J]. 西北植物学报, 1998, 18(2): 229-236.
- [14] 赵亚华, 何平, 高向阳, 等. 根癌农杆菌介导的 mMT-IcDNA 转化枸杞及其表达的研究[J]. 中国农业科学, 2000, 33(2): 92-97.
- [15] 刘丹如, 宋长征, 张更林, 等. HIV-1 衣壳蛋白在转基因枸杞中表达的免疫组织化学定位[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(5): 719-721.
- [16] 刘丹如, 宋长征, 张更林, 等. 重组 HIV-1 壳体蛋白在转基因枸杞根系中的分泌表达[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(2): 53-57.
- [17] Du G L, Song C Z, Zhang G L, et al. Transgenic *Lycium barbarum* L. established as HIV capsid protein expression system[J]. Plant Mol Biol Rep, 2005, 23: 1-6.
- [18] 杜国利, 宋长征, 张更林, 等. 转基因枸杞表达重组 HIV 壳体蛋白的鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(2): 127-133.
- [19] 曲玲, 曹有龙, 侯玉霞, 等. 将 GNA 基因导入宁夏枸杞及其表达的研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(3): 88-91.
- [20] 罗青, 李晓莺, 巫鹏举, 等. 枸杞组织培养中青霉素对细菌污染的抑制作用[J]. 宁夏农林科技, 2006(3): 6.
- [21] Giri C C, Shyamkumar B, Anjaneyulu C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to tree: an overview [J]. Trees, 2004, 18: 115-135.
- [22] Hu Z. Shoot regeneration from leaf explant of *Lycium barbarum* and Agrobacterium-mediated genetic transformation [J]. Russ J Plant Physiol, 2001, 48: 453-458.
- [23] Hu Z, Ding H B, Wang X, et al. Comparative study on the syntheses of DNA, RNA and protein during *in vitro* organogenesis and somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* [J]. Acta Biol Exp Sin, 1998, 31: 403-411.
- [24] Hu Z, Yang J, Guo G Q, et al. C. High efficiency transformation of *Lycium barbarum* mediated by Agrobacterium tumefaciens and transgenic plant regeneration via somatic embryogenesis[J]. Plant Cell Rep, 2002, 21: 233-237.
- [25] Hu Z, Wu Y R, Li W, et al. Factors affecting Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of *Lycium barbarum* L. [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2006, 42: 461-466.
- [26] 易自力, 周朴华, 刘选明, 等. 植物外源基因直接导入技术及其在禾谷类作物中的应用[J]. 作物研究, 1999(4): 43-46.
- [27] 王兰岚, 傅荣昭, 宋桂英, 等. 利用激光微束穿孔法将外源基因导入小麦的研究[J]. 遗传学报, 1995, 22(5): 394-399.
- [28] 孔英珍, 姚春娜, 王根轩, 等. 利用中子束将外源基因导入枸杞的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(4): 524-527.
- [29] 安韩冰, 朱祯. 基因枪在植物遗传转化中的应用[J]. 生物工程进展, 1997, 17(1): 18-26.
- [30] 顾海燕, 马昕, 王仙琴, 等. 抗肝炎转基因枸杞新品种培育的初步研究[J]. 陕西农业科学, 2007(6): 44-46.
- [31] 曹有龙, 贾勇炯, 罗青, 等. 枸杞髓部细胞悬浮培养及胚状体发生[J]. 宁夏农学院学报, 1997, 18(3): 47-52.
- [32] 胡忠, 杨军, 郭光沁. 宁夏枸杞发根农杆菌转化系的建立及影响转化因素的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20(5): 766-771.
- [33] 杨汉民, 高清祥. 枸杞体细胞胚的诱导与形态发生[J]. 植物学通报, 1991, B增刊: 59-60.
- [34] 田惠桥, 肖翊华. 枸杞下胚轴原生质体培养再生植株[J]. 实验生物学报, 1993, 26(1): 89-93.
- [35] Ratmshnyak Y I, N M Piven, Rudas V A. Protoplast culture and plant regeneration in *Lycium barbarum* L. [J]. Plant cell, Tissue and Organ Clture, 1989, 17: 183-190.
- [36] 曹有龙, 许兴, 宋玉霞, 等. 枸杞原生质体培养及高效成株体系的建立[J]. 植物学通报, 2001, 18(5): 605-614.
- [37] 曹有龙, 罗青, 陈晓斌, 等. 具高分化潜能的枸杞胚性悬浮细胞系的建立和保存[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 1996, 17(4): 59-63.
- [38] 朱永兴, 曹鹏, 许兴, 等. 多基因表达载体 KCTB 转化宁夏枸杞的研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(9): 74-77.
- [39] 陈维伦, 郭东红. 枸杞叶片愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1980(6): 40-41.
- [40] 马和平, 李毅, 马彦军, 等. 枸杞叶片再生植株体系的建立[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(2): 22-26.
- [41] 牛德水, 邵启全, 王莉. 枸杞下胚轴、茎端和幼嫩子房的愈伤组织诱导及其植株再生[J]. 遗传, 1983, 5(6): 24-26.
- [42] 王芳, 丁燕红, 田玉秀. 新疆野生枸杞愈伤组织分化及植株再生[J]. 新疆农业大学学报, 2004, 27(4): 19-22.
- [43] 张尔荣. 枸杞叶柄的组织培养(简报)[J]. 植物学通报, 1991(4): 12-13.
- [44] 樊映汉, 臧淑英, 赵敬芳. 两种枸杞植物花药培养单倍体的诱导[J]. 遗传, 1982(1): 19-21.
- [45] 顾淑荣. 枸杞花粉植株的获得[J]. 植物学报, 1981, 23(3): 246-248.
- [46] 顾淑荣, 桂耀林, 徐廷玉. 枸杞胚乳植株的诱导[J]. 植物学报, 1985, 27(1): 106-109.
- [47] 牛德水, 邵启全, 秦金山, 等. 枸杞细胞系的建立及单细胞培养再生植株[J]. 科学通报, 1985(4): 296-298.
- [48] 牛德水, 邵启全, 张敬, 等. 枸杞悬浮培养条件下的胚状体发生[J]. 遗传, 1990, 12(6): 5-7.
- [49] 王亚馥, 王伦山, 丁惠宾. 枸杞组织培养中形态发生的细胞组织学观察[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 1989, 25(4): 88-92.

## Advances on Transformation of Wolfberry

QU Ling, SHI Zhi-gang, JIAO En-ning, LI Ding-ren, CAO You-long

(National Engineering Research Center of Wolfberry, Ningxia Academy of Agricultural and Forest Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002)

**Abstract:** Wolfberry is a berry crop both as human medicine and food. It is a kind of deciduous undershrub with much thron. In this paper, progresses in genetic transformation of wolfberry were reviewed in terms of transformation methods, recipient materials and target genes. In the meantime, the problems and the perspectives of genetic transformation in wolfberry were discussed.

**Key words:** wolfberry; genetic transformation; *in vitro* culture; genetic engineering