

非洲菊植株再生和基因工程育种的研究进展

王 颖, 陈雄庭

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 中国海南 海口 571101)

摘 要: 对近几年来非洲菊植株再生和基因工程育种的研究进展和成果进行了总结, 同时对非洲菊不同外植体材料和培养基配方的进展进行了探讨. 近年来, 不断发展的基因工程技术已经成为花卉育种研究的热点, 解决了一些传统育种工作中不能突破的问题, 它为非洲菊性状改良提供了全新的思路, 主要介绍了这一技术在非洲菊花色、花型和增加抗性等方面的应用概况.

关键词: 非洲菊; 植株再生; 基因工程

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2007)S1-0048-04

Advances in Plant Regeneration and Gene Engineering Breeding of *Gerbera jamesonii*

WANG ying, CHEN Xiong-ting

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences,
Haikou 571101, Hainan, China)

Abstract: Research on *Gerbera jamesonii* regeneration and gene engineering breeding recently were reviewed, the development with different explants and in *Gerbera jamesonii* were discussed. Recently molecular breeding has become the hot spot of the fields in ornamental plant breeding, which will help the breeder to overcome the limitation of the conventional breeding. It become more easily to improve *Gerbera jamesonii* traits by using the gene engineering techniques. Advances of genetic engineering used to improve the color of flower, the shapes of flower, and increasing resistance in detail were introduced.

Key words: *Gerbera jamesonii*; plant regeneration; gene engineering breeding

(Life Science Research, 2007, 11(4) S1: 048-051)

非洲菊(*Gerbera jamesonii*)又名扶郎花,为菊科大丁草属多年生草本花卉.其花朵硕大,花枝挺拔,花色丰富,切花率高,在温暖条件下可周年供应鲜切花,为世界五大切花之一.非洲菊属异花授粉植物($2n = 50$)^[1],自交不孕,其种子后代易发生变异,同时,花器构造极为特殊,在生产实践过程中,其切花在瓶插期间易发生颈曲和萎焉.随着生物工程技术的发展及花卉产业“高品质,高效益”发展的客观需要,传统的花卉育种已

不能适应这种新的需求,现代生物技术尤其是基因工程在花卉育种上的应用,打破了种间杂交障碍,为定向选育新品种提供了更为先进的手段.本文对近年来人们在非洲菊基因工程育种方面的研究做一综述.

1 非洲菊再生体系的研究进展

利用组织培养的方法使植株再生是对植物进行转基因改良的重要前提条件,转基因成功与否

收稿日期: 2007-07-03; 修回日期: 2007-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660098); 科技部成果转化基金资助项目(05EFN216900371); 中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目

作者简介: 王颖(1978-),女,河北石家庄人,助理研究员,硕士,主要从事植物分子生物学研究, Tel: 0898-66890587, E-mail:

wangyingem@126.com

China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

在很大程度上依赖于再生体系是否高效. 理论上, 非洲菊植株上的任何器官均可诱导产生愈伤组织. 早在 20 世纪 70-80 年代就已有有人着手研究用组织培养手段进行非洲菊的无性快速繁殖. 1973 年, Pierik 首先报道了用非洲菊离体花托和花萼诱导发芽^[2]; 1974 年, Murashige 用非洲菊的生长点作外植体培养得到侧芽^[3]; 1987 年, 黄济明等以花托为材料, 研究了非洲菊器官在离体培养条件下诱导成苗和消除试管植株突变的问题^[4]. 近年来, 非洲菊的组织培养的研究日趋深入, 不少研究者对非洲菊不同器官外植体材料的培养效果进行比较研究.

1.1 花托的组织培养

非洲菊组织培养最常用的外植体是花托. 鲁雪华等^[5]取开花期的幼嫩小花托作外植体, 经常规消毒后, 接种在 MS+6-BA 10 mg/L (以下培养基添加物单位均为 mg/L) 培养基中培养, 一个月后愈伤组织开始出现, 60 d 左右, 在愈伤组织周围长出营养芽, 随之形成正常的幼苗, 再移至 1/2MS+IBA0.3 培养基上诱导生根. 王春彦等^[6]取直径为 0.8 cm 左右的幼小花托, 接种在 1/2MS+BA8.0+NAA0.3 的培养基上诱导分化成小植株, 再转至 1/2MS 上诱导生根. 杨波等^[7]以非洲菊花蕾为外植体, 接种在 MS+BA10+NAA0.05 培养基中, 45 d 左右诱导成芽, 再将芽接种于 MS+BA2.0+IAA1.0 培养基中进行继代培养出苗, 最后将苗接种于 1/3MS+IBA 0.1 的培养基中, 15 d 即可生根, 30-35 d 平均生根率达 98.8%. 而郑秀芳等^[8]则取直径在 0.5-1.0 cm 的头状花序, 先后在 70%乙醇和 0.1%升汞消毒后, 去掉总苞片, 将花托切成 0.2-0.3 cm 的小方块, 在 B5+BA10+IAA 0.1 上诱导分化成小植株, 再在 MS+BA1.0+IAA 0.1 上增殖, 最后在 1/2MS+IBA 0.01 上诱导生根, 15 d 内即可达到 100%的生根率.

1.2 叶片的组织培养

非洲菊的叶片组织培养, 嫩叶可取自田间植株或试管苗. 刘福平等^[9]取田间植株嫩叶, 经消毒灭菌后将嫩叶切段, 在 MS+NAA0.2+BA2.0+KT2.0 培养基上诱导, 3 周出现小块愈伤组织, 愈伤组织以每月 5 倍速度生长. 再转至 MS+NAA 0.2+BA 3.0 的分化培养基, 1 个月即可分化出芽, 再将成株芽苗 (约 3 cm 高) 转至 MS+NAA0.5 培养基中进行生根, 2 周后绝大多数芽苗根长 2-3 cm, 且根系发达. 张建华等^[10]也是以田间植株嫩叶为外

植体, 将已灭菌的叶片切段, 在 MS+BA4.0+IAA 0.2 培养基上直接诱导成植株, 再在 MS+IAA 0.2-0.5 培养基上进行诱导生根. 而徐士清等^[11]则是用试管苗叶片作外植体, 不用灭菌消毒, 直接将叶片切块, 在 MS+BA3.0+NAA 0.1 培养基中进行培养, 4 周左右即可出芽, 再转至 1/2MS+IAA 1.0 培养基上进行生根, 生根率可达 99%.

1.3 幼芽的组织培养

幼芽同样也可取自田间植株和试管苗. 冯玉璞等^[12]在温室培养的植株上获取外植体, 清洗后, 从根颈部上切取 0.1-0.3 cm 小段, 分别用 75%酒精、0.1%升汞消毒液灭菌消毒后, 在 MS+BA0.5+NAA0.2 培养基上培养, 2 周左右即可形成丛生苗, 再转至 1/2MS+IBA 0.5 培养基上诱导生根. 刘丽荣等^[12]取田间植株的微茎尖, 大小在 0.5 cm 左右, 消毒灭菌后在 MS+BA3.0+IAA 0.25 培养基上诱导分化, 接种一周后茎芽的生长锥就开始萌动, 继续培养 15 d 左右, 其外植体基部就长出丛生幼芽, 再转至 1/2MS+IAA 2.0 上诱导生根, 生根率 95%以上. 而陈发棣等^[13]则以试管苗中不带根的幼芽为外植体, 在培养基为 MS+BA 4.0+KT1.0+La3+30 上进行培养, 增殖倍数可达 18.6.

1.4 种子的组织培养

种子的组织培养是通过无菌种子萌发的幼苗切段实现的. 余显荣等^[14]将种子用纱布袋包装, 在无菌条件下, 用 75%酒精浸泡 1 min, 再用 0.1%升汞表面灭菌 10 min, 冲洗后, 先在 1/2 MS 上暗培养 10 d 左右使其萌发, 再将幼苗切段在 MS+BA1.5+IBA 0.2 上诱导分化, 30 d 左右即可形成小植株, 然后在 MS+BA0.5 培养基上增殖, 每 20 d 为一周期, 可快速获得大量试管苗, 再将小苗移至 MS+NAA2.0 的培养基上生根, 2 周左右即可出苗.

2 非洲菊基因工程育种研究进展

植物基因工程技术指克隆一些特有性状的基因, 并通过生物、物理和化学等方法, 导入到受体植物细胞, 通过组织培养育出转基因植物的生物技术. 近年来, 基因工程技术为观赏植物性状改良提供了全新的思路, 成为最有前途的花卉育种新技术. 与传统育种手段相比, 基因工程育种具有独特的优势: 可以定向修饰花卉的某个或某些性状而保留其它原有性状; 通过引入外来基因可以扩大基因库. 所以, 通过基因工程完全有可能培育出一些新奇、独特及具有各种目标性状的品

种,大大缩短育种周期,提高育种效率.

2.1 花色基因工程

花色基因工程是花卉基因工程中研究得比较深入的一个领域.有花的颜色是一种复杂性状,它主要由三大类色素决定^[15,16],即类黄酮(Flavonoids)、类胡萝卜素(carotenoids)及甜菜色素(betalains).这三大类色素的合成涉及到多个代谢步骤、多种酶的催化,因而与之相关的基因也较多,其作用机理十分复杂.花的颜色还受到色素浓度、多种色素的共同成色作用,某些色素与重金属离子(Fe、Mo等)螯合作用、液泡液的pH值等因素的影响.

应用基因工程技术,可以从两方面来改变花的颜色.第一,利用反义RNA和共抑制技术抑制基因的活性,造成无色底物的积累,使花的颜色变浅或变成无色.Elomaa^[17]首先报道了通过反义chs阻断非洲菊花色合成的转基因植株,他们以试管小植株的叶柄为外植体,与断臂Ti质粒pGV2260和一个具NPTII基因的二元质粒的根瘤农杆菌C58共同培养,然后进行卡那霉素选择,在愈伤组织中恢复了转基因苗(transgenicshoot),每100个外植体获0.1~2个转基因苗.查尔酮合成酶基因gchs1或二氢黄酮醇-4-降解酶基因gdf r的转化结果,也证明了反义技术对非洲菊的有效性^[17].gchsh1的抑制导致4株转基因植株中的两株为淡粉红色或奶白色,而对照花色为红色.在所获得的4株反义gdf r转化子中,两株为粉红色,并表现为gdf r表达水平的降低^[17];第二,是通过引入外源基因来补充某些品种缺乏合成某些颜色的能力.Nagaraju等也以3~4周龄试管苗叶柄、叶片和茎尖为外植体,LBA4404含二元载体带NPTII和uidA基因进行转化,获得了转基因植株^[18].调节花色素苷生物合成途径的基因也被用于改变花色素.Elomaa将从玉米中分离的Lc基因和从金鱼草(Antirrhinum majus)中获得的del基因用于非洲菊^[19].受35S启动子控制的del基因在转基因的非洲菊中表达后,呈现出对叶片和花萼色素形成的增强作用,并伴随gdf r表达的增强.但在花中没有观察到色素的增强.

2.2 花型基因工程

利用染色体加倍技术可以实现增加花径大小和花瓣数的目标,但机率很低.通过分子生物学手段已鉴定出抑制花发育的同源异型基因,通过改变同源异型基因的表达方式,可有目的地改变

花型.如花的大小和形状^[20,21],也可以通过新的植物中抑制AG类基因的活性获得重瓣花^[22].花型改造的机理源于花发育的ABC模型.ABC模型^[23]的中心思想是调控花器官的发育是由同源异型基因控制的,这些同源异型基因按其功能可分为A、B、C3组,A组基因调控花萼和花瓣,B组基因决定花瓣和雄蕊的发育,C组基因调控雄蕊和心皮发育.目前已不同程度上证实了ABC模型的正确性.从非洲菊中分离的一些天然MADS盒基因,其中2个AGAMOUS基因、2个GLOBOSA基因和1个DECIPHERS分别参与了花瓣(B功能)和雄蕊雌蕊(C功能)的发育^[24],以反义定向引入非洲菊后,引起转基因植株的花结构发生了许多变化.带有拟南芥agamous基因的转基因非洲菊也已育成^[25].

2.3 抗性基因工程

白粉病(Powdery mildew)是种植于温室的非洲菊易发病害之一(尤其是温差较大或湿度过高时).Stefan等从非洲菊中鉴定出一种关键性的酶,该酶对抗虫和抗病性化合物的生物合成有益.研究发现,携带有反义gchs2基因的植株完全缺乏吡喃酮衍生物gerberin和parasorboside的生物合成^[26].这表明,该酶是非洲菊获得抗虫及抗病性的关键因子.目前,在学术领域有关抗性基因的研究也表现得相当活跃,如抗虫性的苏云金芽胞杆菌(Bt)毒蛋白基因、昆虫特异性神经毒素基因;抗菌性的与病程相关的蛋白类基因——几丁质酶基因和葡聚糖酶基因;抗病毒性的病毒外壳蛋白基因、抗逆性的超氧化物歧化酶SOD基因^[27]、海藻糖合成酶基因otsA^[28].上述基因可能会对预防或防止非洲菊在生产过程中易于出现的白粉虱、白粉病、枯萎病和病毒病产生正面的影响.因此,积极开展有关方面的研究工作是很有必要的.

非洲菊作为一种时尚花卉正受到越来越多人的喜爱,所以,该种花卉新品种的培育显得尤为重要.非洲菊的改良与其他众多花卉的育种目标无太大差异,也多集中于抗性的增强、保鲜期的延长以及花色和花型的改变等,但也要注重非洲菊自身所固有的特性.比如,乙烯被认为是致使花衰老的诱导因子,但也有研究表明,非洲菊属于对乙烯不敏感的切花,其衰老过程中活性氧代谢活跃,对外源活性氧敏感性大于外源乙烯^[29].如果运用基因工程技术将调控乙烯合成和反应的ACC合成酶、ACC氧化酶以及乙烯转导途径中的相

关基因导入到非洲菊中是否也能像香石竹那样达到延迟衰老的目的^[30],目前还不得而知。所以,任何花卉(不仅仅是非洲菊)都应做到个性与共性的统一。

参考文献(References):

- [1] LEFFRING L. Flower production in gerbera: Correlation between shoot, leaf and flower formation in seedlings[J]. *Scientia Hort*, 1973, 1: 221-229.
- [2] PIERIK R L M. Gerbera plantlets from in vitro cultivated capitulum explant[J]. *Scientia Horticulturae*, 1973, 1: 117-120.
- [3] MURASHIGE T. Clonal multiplication of Gerbera through tissue culture[J]. *Hort Sci*, 1974, 9: 175-180.
- [4] 黄济明,倪跃之,林满江.非洲菊的快速繁殖[J]. *园艺学报*, 1987, 14(2): 125-128.
- [5] 鲁雪华,林勇,郭文杰.非洲菊小花托的离体培养[J]. *亚热带植物通讯*, 1996, 25(2): 21-24.
- [6] 王春彦,高年青,张效平,等.非洲菊幼花托离体培养研究[J]. *江苏农业科学*, 2003, (1): 47-49.
- [7] 杨波,康明.非洲菊组培快繁技术研究[J]. *湖北农业科学*, 2000, (2): 48-49.
- [8] 郑秀芳,李名扬.非洲菊花托培养和植株再生[J]. *西南农业大学学报*, 2001, 23(2): 171-173.
- [9] 刘福平,林丽仙,邹小鲁,等.非洲菊组织培养(简报)[J]. *亚热带植物通讯*, 2000, 29(2): 52.
- [10] 张建华,陈火英,庄天明,等.非洲菊叶片离体诱导成株的激素调控[J]. *北方园艺*, 2002, (4): 60-61.
- [11] 徐士清,杨世湖,倪丹,等.非洲菊试管苗叶片的组培快繁[J]. *园艺学报*, 2002, 29(5): 493-494.
- [12] 冯玉璞,王立英.非洲菊的组织培养及快速繁殖报告[J]. *中国农学通报*, 2003, 19(2): 88, 123.
- [13] 刘丽荣,苏荣德,李忠利.非洲菊组织培养繁殖的试验研究[J]. *辽宁农业职业技术学院学报*, 2002, 4(3): 13-15.
- [10] 陈发棣,陈滨.非洲菊组织培养中 La³⁺ 的应用初探[J]. *园艺学报*, 2002, 29(4): 383-385.
- [14] 余显荣,李艳,罗晓玲,等.非洲菊的组织培养与快速繁殖[J]. *植物生理学通讯*, 1999, 35(3): 208-209.
- [15] M ITCHELL K A, MARKHARN K R, BOASEM R. Pigmentchemistry and colour of *P. elargoniun* flower[J]. *Phytochemistry*, 1988, 47(3): 355-361.
- [16] TANAKA Y, T SUDA, KUSUMI T. Metabolic engineering to modify flower color[J]. *Plant Cell Physiology*, 1998, (11): 1119-1126.
- [17] ELOMAA P, HONKANAN J, PUSKA R, et al. Agrobacterium-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation[J]. *Biotechnology*, 1993, 11: 508-511.
- [18] NAGARAJU V, SRINIVAS G S L, SITA G L. Agrobacterium-mediated genetic transformation in *Gerbera hybrida*[J]. *Curr Sci*, 1998, 74: 630-634.
- [19] ZUKEI A, TZFIRA T, VAINSTEIN A. Genetic engineering for cut flower improvement[J]. *Biotechnol Adv*, 1998, 16: 33-79.
- [20] 瞿礼嘉,顾红雅,胡苹,等.现代生物技术导论[M].北京:高等教育出版社,1998.241-286.
- [21] 华志明.花发育的基因调控与花性状的改造[J]. *生物技术通报*, 1998, 1: 16-20.
- [22] 吴乃虎,刁丰秋.植物转录因子与发育调控[J]. *科学通报*, 1998, 43(20): 2133-2138.
- [23] COEN E S, MEYEROWITZ E M. The war of the whirls: genetic interactions controlling flower development[J]. *Nature*, 1991, 353: 31-37.
- [24] YU D, MIKA K, EIJA P, et al. Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gebera hybrida* (*Aster2aceae*) [J]. *The Plant Journal*, 1999, 17(1): 51-62.
- [25] 任祝三,张慧玲.转基因技术在切花育种中的应用[J]. *细胞生物学杂志*, 2000, 22(2): 67-71.
- [26] ECKERMAN S, SCHRODER G, SCHMIDT J, et al. New pathway to polyketides in plants[J]. *Nature*, 1998, 396: 387-390.
- [27] 侯文胜,郭三堆,路明,等.利用转基因技术进行植物遗传改良[J]. *生物技术通报*, 2002(1): 10-15.
- [28] 戴秀玉,王忆琴,杨波,等.大肠杆菌海藻糖合成酶基因对提高烟草抗逆性能的研究[J]. *微生物学报*, 2001, 41(4): 427-431.
- [29] 吴岚芳,黄绵佳,蔡世英.非洲菊切花活性氧代谢的研究[J]. *园艺学报*, 2002, 30(1): 69-73.
- [30] 何小玲,王金发.观赏花卉的品质基因及其基因工程问题[J]. *植物生理学通讯*, 1998, 34(6): 462-466.