

农杆菌介导的草莓遗传转化研究进展

李文砚¹,孔方南^{1,2},卢艳春²,韦 优²,徐冬英³,赵 静³,周 婧

(广西南亚热带农业科学研究所,广西 龙州 532415)

摘要:草莓(*Fragaria* spp.)是蔷薇科草莓属的多年生草本植物,具有较高的经济价值和营养价值。由于近年来分子生物学理论和技术的持续发展,草莓已作为模式植物而被研究。建立高效的遗传转化体系是基因功能验证的基础,尽管草莓的遗传转化研究已经有二十多年的历史,但是仍然存在转化效率低的问题。综述了影响草莓外植体再生、农杆菌介导的转化效率的几个主要因素以及转基因研究在抗病毒、抗虫、抗除草剂、抗逆及品质改良等方面的最新进展,对草莓转基因研究中存在的主要问题和今后的研究方向及应用前景进行了探讨。

关键词:草莓;根癌农杆菌;遗传转化;基因工程

中图分类号:S668.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)03-0143-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.03.0143

草莓属于蔷薇科草莓属,是一种营养和经济价值都较高的草本果树植物,由于其果实出色的味道、香气和颜色等备受广大消费者的欢迎^[1]。

全世界范围内草莓属植物分布较为广泛,约50个种,20个常见种,主要分布在大洋洲南部、南美太平洋沿岸、亚洲、欧洲和非洲等。我国的地域辽阔,气候类型多样,有着丰富野生草莓资源,我国产约7~9个种^[2],在世界上属于野生草莓种质资源最丰富的国家^[3-4]。

由于草莓的高杂合性和多倍性等特点,给其新品种培育工作带来了一系列难以解决的为题,诸如培育周期长、效率低下、工作量加大等^[5],但是随着近年来生产技术持续不断的发展,在提高品种品质、产量方面,传统的草莓培育新品种的方法受到了诸多因素的困扰,生产上还是缺乏抗病虫、抗逆境等的优良品种。所以当前人们可以利用植物分子生物工程技术创造新的种质资源。自国内外针对草莓相继开展的转基因研究的时间是在20世纪80年代末^[6-12]。草莓基因工程的真正开始是1990年以James等^[13]获得的第一株草莓转基因植株为标志的,之后,多种有价值的外源目的基因相继被转入草莓中。因此,基因型是影响

草莓遗传转化是否成功的关键,广泛收集草莓品种的不同基因型,探索更有利于草莓遗传转化的再生条件仍是目前研究的重要课题^[14]。

1 影响草莓离体再生的各种不同因素

近些年来对草莓外植体离体再生和遗传转化的研究越来越多。许多研究人员从多方面入手进行了大量的研究,努力探寻再生频率高的基因型、外植体类型及培养条件等。

1.1 基因型

因为基因型的影响,即使是同一品种组织的再生频率也不甚相同,所以说基因型对建立再生体系影响很大。许多大量研究表明染色体上的基因可调控外植体的再生能力,在研究草莓的再生体系时,许多研究人员都报道过植物外植体基因型不同,其产生不定芽的能力亦不甚相同。因此对比多种基因型,挑选出再生能力强作为外植体以便建立高效的草莓遗传转化体系^[15]。

1.2 外植体的生理状态

在草莓组织培养技术研究中,研究最多、分子生物学工程应用也最多的其中一条途径是以叶片作为外植体不定芽,该途径不定芽再生可分为两种方式:经愈伤组织再生不定芽和直接再生不定芽。此外,叶片的离体再生能力与其再生不定芽能力受叶片的生理状态影响,而叶片的生理状态也受植物叶龄、叶片部位、接种时外植体放置方式等因素影响。通常生长旺盛的幼年型的植株外植体较成年型的植株外植体具有更强的再生能力。温室生长14~30 d的植株叶片的再生效率比叶龄在30 d以上至一年生植株叶片的再生率

收稿日期:2015-11-25

基金项目:广西壮族自治区直属公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目(GXNYRKS201601)

第一作者简介:李文砚(1987-),女,河北省邯郸市人,硕士,研究实习员,从事木奶果等生理生化、遗传多样性分析和草莓生物技术研究。E-mail:liwenyan20100@163.com。

通讯作者:周婧(1979-),女,学士,高级农艺师,从事热带、亚热带主要果树品种的调查收集与保护利用研究。E-mail:823343462@qq.com。

高^[16-17]。因此可以通过离体继代繁殖草莓试管苗即可获得大量幼嫩且生长健壮的外植体。

1.3 生长调节剂种类和浓度

植物激素是培养基中的关键物质,不同激素的种类、浓度对植物离体再生效率具有很大影响,这在草莓中也充分体现出来。在建立草莓叶片离体再生体系中,培养基中主要添加的有两类激素,第一类是细胞分裂素,第二类是生长素,激素使用的关键是调节这两种激素的种类与比例。第一类激素一般多选用 6-BA,第二类激素一般多选用 IBA、IAA、2,4-D、NAA 等^[18]。在草莓离体再生体系的许多研究中发现,以 TDZ 与 6-BA 相比较,TDZ 具有更高的活性,可诱导不同基因型的叶片再生不定芽^[17,19],TDZ 也可促进原生质体的再生^[20],所以是 TDZ 较 6-BA 更能够明显提高草莓的离体再生效率。TDZ 随后被广泛应用于植物组培中是自 20 世纪 80 年代初 Mok 等^[21]发现其具有细胞分裂素活性。也发现,作为细胞分裂素,TDZ 的特点是具有较宽的有效浓度范围,而且 6-BA 与 TDZ 配合使用的效果显著优于 NAA 和 2,4-D 与 TDZ 配合使用的效果^[19]。

1.4 温度和光照

草莓的再生体系要求的温度一般是 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,恒温培养^[18]。Nehra 的研究发现最适光强为 $12.5\ \mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{S}^{-1})$ 。在低光照或无光照条件下也会产生不定芽,但生长的不定芽是白化且纤细,在光强为 $25\ \mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{S}^{-1})$ 及以上时,每个外植体的再生效率以及平均再生芽数均会随之下落。当光强达到 $62.5\ \mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{S}^{-1})$ 时,叶片外植体最终褐化^[16]。前期暗培养对草莓影响较复杂^[17]。所以今后需要对暗培养作用机制作进一步研究。

2 草莓遗传转化研究进展

2.1 草莓遗传转化方法

在 20 世纪 70 年代以来,开发出来的植物遗传转化技术有多种^[22],但是目前常用的主要有两种,第一种是农杆菌介导法^[23-26]和第二种基因枪法^[27-29]。农杆菌介导法是人为首次建立起来的广泛应用的转移基因方法^[30],这种遗传转化方法至今一直被广泛应用,它具有许多优势,例如拷贝数低、遗传稳定性高以及能够转入大片段 DNA 等,而且操作简单、费用低廉。农杆菌主要有两种类型,分别为发根农杆菌和根癌农杆菌,目前主要

是根癌农杆菌应用于果树的遗传转化研究中^[31],根癌农杆菌介导的遗传转化法也成为应用于草莓中的最主要的遗传转化方法。

2.2 影响农杆菌介导草莓遗传转化效率的主要因素

2.2.1 试材基因型 植物遗传转化是否成功的决定性的因素取决于植物的外源基因型^[32]。Binnns 等人研究发现,在一般情况下细胞的生理状态决定了特定的基因型,特别是细菌细胞壁的结构连接的影响,细胞受到创伤后分泌的小分子酚类化合物,研究还发现细胞内源激素水平影响细胞的生长和分化^[33]。

2.2.2 菌株类型 农杆菌的浸染能力是影响植物遗传转化是否成功的其中一个主要因素。植物遗传转化效率的高低直接取决于农杆菌与外植体之间是否有高侵染力的配合^[34]。不同农杆菌的致病性不一样,其中野生的琥珀碱性菌株 A281 对许多植物都具有超致病性,现在农杆菌介导的草莓遗传转化研究中常用的就是将 A281 改变后获得的菌株 EHA105^[31]。利用 GUS 瞬时表达检测早期阳性抗性愈伤组织的诱导率时,发现琥珀碱型菌株 A281 的转化效率高于章鱼碱型菌株或胭脂碱型菌株,约是这两种类型菌株 10 倍多^[35],琥珀碱型菌株 EHA105 约是 LBA 的 8 倍^[36]。

2.2.3 菌液浓度和侵染时间 细菌的浓度和外植体受感染的时间对植物遗传转化的是否成功有很大影响。所以在转化试验过程中要适当缩短繁殖速度快的菌株的侵染时间以及适当延长繁殖速度较慢的菌株的侵染时间。研究认为在植物遗传转化研究中为达到最佳的遗传转化效率可用 OD 值为 0.5 的农杆菌菌液侵染外植体 10 min^[37]。

2.2.4 共培养时间 在整个遗传转化过程中,共培养时间在其中也是非常重要的环节,在该期间会完成 T-DNA 的切割、转移和整合等一系列过程。只有共培养时间长于 16 h 细菌在创伤部位才能产生肿瘤。此外共培养的时间也不要过长,否则农杆菌会过度生长造成后期除菌工作致使转化效率降低^[37]。共培养时间 2~4 d 是最佳的时间^[38-40],共培期间产生肉眼可见的菌落时即可进行后续的选择培养或推迟选择培养^[41]。众多试验研究结果表明草莓的共培养以 3 d 的时间比较适宜^[7-8,10,12,42]。

2.2.5 推迟培养和筛选培养 在植物遗传转化试验中常用立即选择或推迟选择这两种选择培养

方式。之所以在选择培养中较多采用推迟选择是因为草莓属于对卡那霉素较为敏感的植物。在进行遗传转化试验中多采用卡那霉素浓度在 $20 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ [14,42-43]。

2.2.6 抗生素的种类 抑菌性和选择性两类抗生素在农杆菌介导的植物遗传转化中常被使用到[38]。由于选择标记基因转化细胞可以对抗生素表现出抗性,在再生培养基中加入一定量的选择性抗生素后转化细胞能在选择再生培养基上正常生长,而非转化细胞的植株则逐渐死亡。而抑菌性抗生素的作用是使农杆菌的生长得到抑制,一个有效的受体转化系统应该是既对选择性抗生素敏感又不受抑菌性抗生素的影响。

头孢霉素和羧苄青霉素是草莓上常用到的抑菌性抗生素[14]。转化时可用约 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的头孢来抑制农杆菌的生长,但朱海生等[37]的研究发现 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的羧苄青霉具有更好的抑菌效果,且对不定芽的分化影响亦较小。

在筛选转化植株的过程中潮霉素和卡那霉素两种选择性抗生素常被用到。朱海生等[37]研究表明卡那霉素浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时即可抑制非转化细胞的生长。

2.3 遗传转化在草莓上的应用

二十多年来草莓的遗传转化研究取得了很大成就。草莓是第三个转基因获得成功的果树,前两个果树树种分别为核桃和苹果[14]。通过转基因技术着重改变草莓的抗病虫能力、对环境胁迫的抗性、栽培性状、果实储藏性和果实品质等方面。应用于转基因的目的基因绝大多数是从其它作物甚至微生物中分离克隆出来的外源基因,而外源基因以抗性基因和标记基因为多,如导入草莓的 GUS 基因、NPT II 基因、GFP 基因、Bt 基因、潮霉素磷酸转移酶基因以及光敏色素基因等。当前草莓转基因已经不局限于利用其它生物的外源基因而是从草莓自身出发,克隆自身有价值的基因,使得转基因工作不仅可以达到培育新种质资源的目的,而且成为一种检验克隆基因功能的有效工具[31]。

参考文献:

- [1] 康厚祥,姜丰,杨国顺. 草莓转基因研究进展[J]. 生物技术通报,2006 (S): 67-69.
- [2] 雷家军,代汉萍,谭昌华,等. 中国草莓属(*Fragaria*)植物的分类研究[J]. 园艺学报,2006,33(1): 1-5.
- [3] 雷家军,杨高,代汉萍,等. 我国草莓野生种质资源[J]. 果树科学,1997,14(3): 198-200.
- [4] 雷家军,代汉萍,邓明琴,等. 草莓种间杂交的研究[J]. 园艺学报,2002,29(6): 519-523.
- [5] Lewis A. Biocontrol of plant disease: the approach for tomorrow[J]. Cop Protection,1991,10: 1086-1105.
- [6] Papvizas G C. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harziaum* for tolerance to benomyl enhanced capabilities[J]. Phytopathology,1982,72: 126-132.
- [7] Papvizas G C. Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma virid* resistant to MBC fungicides[J]. Phytopathology,1983,73: 407-411.
- [8] Harman J S, Baker R. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere competent mutants of *Trichoderma harziaum* [J]. Phytopathology, 1987, 77: 358-362.
- [9] Baker R. Diversity in biological control. Cop Protection, 1991,10: 85-94.
- [10] 徐同. 木霉对土传病原真菌的拮抗作用[J]. 植物病理学报,1993,23(1): 65-67.
- [11] 陈建爱,肖敏,王未名,等. 木霉诱变菌株发酵条件研究[J]. 核农学报,2002,16(5): 305-309.
- [12] 杨合同,唐文华. 绿色木霉 LTR. 2 菌株的紫外线改良[J]. 中国生物防治,2004,20(3): 182-186.
- [13] James D J, Passey A J, Barbera D J. Agrobacterium-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors [J]. Plant Science,1990,69: 79-94.
- [14] 李小红,汤浩茹. 草莓的遗传转化研究进展[J]. 西华师范大学学报: 自然科学版,2006,27(2): 134-138.
- [15] 牛建新,鲁晓燕,于艳华. 外植体和培养因子对草莓不定芽诱导的影响[J]. 北方园艺,1999,3: 30-31.
- [16] Nehra N S, Stushnoff C. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks[J]. Journal of American Society for Horticulture Science,1989,14(6): 1014-1018.
- [17] 于冬梅,胡文玉,王关林. 基因型和培养因子对诱导草莓叶片再生芽的影响[J]. 沈阳农业大学学报,1998,29(2): 138-143.
- [18] 尹淑萍. 草莓栽培品种离体再生及遗传转化研究[D]. 北京: 中国农业大学,2005.
- [19] 张志宏,吴禄平. 草莓主栽品种 Tula 遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报,1998,6(2): 200-204.
- [20] Nyman M, Wallin A. Improve culture technique for strawberry protoplasts and determination of DNA content in protoplasts derive plants[J]. Plant Cell, Tissue Organ and Culture,1992,30: 127-133.
- [21] Mok M M, Mok W S, Armstrong J. Cytokinin activity of N-phenyl-N-1,2,3-thiazol-5-yl urea and its effect on cytokinin autonomy in callus cultures of Phaseolus[J]. Plant Physiol,1980,65: 24.
- [22] 顾红雅,瞿礼嘉,明小天. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社,1995.
- [23] 刘丹. 农杆菌介导 ASACC 基因转化苹果的研究[D]. 南京: 南京农业大学,2004.
- [24] 赵玉辉,李作轩. 农杆菌介导果树遗传转化之研究进

- 展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(11): 281-285.
- [25] 叶霞, 黄晓德, 陶建敏, 等. 农杆菌介导(Ferritin)基因转化苹果的研究[J]. 果树学报, 2005, 22(4): 387-389.
- [26] 冯凤娟. 农杆菌介导的 HAR 基因转化甜瓜和苹果的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [27] 马生健, 曾富华, 徐碧玉, 等. 基因枪介导的高羊茅基因转化体系的建立[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 691-693.
- [28] 佟兆国, 蔡斌华, 章镇, 等. 果树中基因枪法遗传转化的研究进展[J]. 果树学报, 2008, 25(3): 289-285.
- [29] 李保山. 基因枪法在植物转基因种的应用[J]. 科技信息, 2008, 17: 648-649.
- [30] Tzini Tzifira, Vitaly Citovsky. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology[J]. Plant Biotechnology, 2006, 17: 147-154.
- [31] 李天忠, 张志宏. 现代果树生物学[J]. 北京: 科学出版社, 2008: 371.
- [32] 陈再刚, 周大祥, 胡廷章. 影响农杆菌介导植物遗传转化的因素[J]. 重庆工学院学报: 自然科学版, 2007, 21(3): 106-109.
- [33] Binns A N. Agrobacterium-mediated gene delivery and the biology of host range limitations[J]. Physiol Plant, 1990, 79: 135-139.
- [34] 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, 194-317.
- [35] Bont A, Eggermont K, Druart P, et al. Agrobacterium-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): and assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13: 587-593.
- [36] James D J, Danekar A M. Regeneration and transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) [J]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991: 1-18.
- [37] 朱海生, 潘东明, 林义章, 等. 根癌农杆菌介导草莓遗传转化研究[J]. 核农学报, 2008, 22(1): 36-40.
- [38] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 345-346.
- [39] 周春丽, 郭卫东, 路梅. 农杆菌介导佛手遗传转化主要影响因素的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(5): 374-381.
- [40] 沈俊岭, 赵芳, 李云, 等. 速生型刺槐遗传转化体系的建立[J]. 核农学报, 2006, 20(6): 477-481.
- [41] 贾小明, 樊军锋. 影响农杆菌介导的河北杨遗传转化的因素[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(5): 102-105.
- [42] 张红梅, 王俊丽. “全明星”草莓叶片遗传转化体系的建立[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 68-70.
- [43] 邓馨, 胡文玉. 草莓叶片再生芽及遗传转化系统的建立[J]. 植物学通报, 2000, 17(2): 174-178.

Study Progress on Genetic Transformation of Strawberry Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

LI Wen-yan¹, KONG Fang-nan^{1,2}, LU Yan-chun², WEI You², XU Dong-ying³, ZHAO Jing³, ZHOU Jing[□]

(South Asian Tropical Agricultural Science Research Institute of Guangxi, Longzhou, Guangxi 532415)

Abstract: Strawberry (*Fragaria* spp.) belongs to the Rosaceae family and perennial herbaceous plants, the *Fragaria* genus, and it had high nutritional value and economic value. Along with the recent advances in molecular biology research, genetic engineering which is based on adventitious buds regeneration and genetic transformation becomes to a significant way for *Fragaria* breeding. In recent years, a lot of excellent varieties have been cultivated, and planting area gradually expanded, however there still were many factors that restricted the development of strawberry production. Genetic engineering opened up a new way for plant breeding and germplasm resources development and utilization and other fields, a new type that conventional breeding could not get could be gotten using genetic engineering. It summarized the latest developments of strawberry transgenic research mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in antiviral, insect resistance, herbicide resistance, stress resistance and quality improvement, the main problems of strawberry transgenic research and the research orientation of future and application prospects were discussed.

Keywords: *Fragaria* spp.; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; genetic engineering