

草莓(*Fragaria ananassa* Duch) 遗传转化研究进展

尹淑萍, 金万梅, 孟凡红

(北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

[摘要] 从遗传转化的途径、导入的外源基因、影响转化效率的因素等方面综述了草莓遗传转化研究进展, 并对存在的转化率低、外源基因整合的随机性等问题进行了讨论。

[关键词] 草莓; 遗传转化; 农杆菌

[中图分类号] S668.403.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0172-05

草莓(*Fragaria ananassa* Duch)属于蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria*)多年生草本植物。在世界小浆果生产中,草莓荣居首位。近年来,传统育种方法在提高草莓品种的产量、品质方面取得了一些进展,但生产上仍然缺乏抗病、抗虫、抗逆境和抗除草剂的优良品种。草莓属双子叶植物,它的高杂合性和多倍性给常规育种带来了周期长、工作量大和效率低等问题。利用植物基因工程技术培育草莓品种可以不受上述因素的限制,并且草莓无性繁殖的特点对转基因植株外源性状的保持十分有利。因此,转基因技术将成为草莓品种改良的重要途径之一。

自20世纪80年代末以来,各国学者对草莓再生体系的研究取得了一定的进展,一些草莓品种获得了高效再生体系,促进了草莓遗传转化的研究。目前,国内外已有多位学者就草莓抗病、抗虫、抗除草剂等性状进行了基因转化并获得了转基因植株。以叶片为外植体,农杆菌介导的遗传转化是较为成熟的转化途径。但同时也存在外源目的基因整合的随机性和转化率低等问题,需做进一步的研究。

1 草莓遗传转化的途径

1.1 农杆菌介导的遗传转化研究

20世纪80年代末期,根癌农杆菌作为基因转移的手段被广泛地应用于双子叶植物中,然而在重要的经济作物——果树中,农杆菌的应用只限于核桃^[1]和苹果^[2]。随着草莓再生系统的逐步建立和完善,开始有学者探索通过农杆菌对草莓进行遗传转化的可能性。最初的研究多使用报告基因,目的在于

研究影响遗传转化的各种因子,建立起有效的遗传转化方法,为导入具有经济价值的目的基因创造条件。

首先报道农杆菌对草莓进行成功转化的是James等^[3],2个双元的Ti质粒载体pBIN6(携带有 nos 基因和 npt Ⅱ基因)和pSS1(携带有 npt Ⅱ和 ipt (异戊烯基转移酶基因)被用于转化草莓试管苗的叶片和叶柄,并获得了转基因植株。载体pBIN6中的 nos 基因和 npt Ⅱ基因在转基因植株中得到了表达,在转基因植株移入温室生长几个月后 nos 基因仍能持续表达;在 R_0 代通过自交得到的 R_1 代中, nos 基因的分离比符合3:1的孟德尔比例。用pSS1转化的植株,因细胞分裂素的过量表达而表现出不正常的表型。这些植株的芽可以在无附加激素的培养基中生长,不能诱导生根,并且对卡那霉素不敏感。在同一年,Nehra等^[4,5]报道了利用农杆菌菌株MP90(携带 npt Ⅱ和 gus 基因)侵染草莓愈伤组织和叶盘,分别得到了3%和6.5%的转化率。获得的再生植株经NPTⅡ酶活和GUS活性检测、Southern杂交分析等鉴定证明是带有外源报告基因的转基因植株。在这一研究中,高效的叶盘再生体系(再生率达84%)和有效的选择模式是成功的关键。在转化芽的选择过程中,他们先将侵染后的叶盘在不含卡那霉素的再生培养基上预培养10d,然后将绿色的分生组织转移到含有50mg/L卡那霉素的培养基中进行筛选,存活的分生组织再转移到含有25mg/L卡那霉素的培养基中再生不定芽。

随着农杆菌转化方法的深入研究,学者们的研

[收稿日期] 2002-01-28

[基金项目] 北京市科技新星计划资助项目(953812300)

[作者简介] 尹淑萍(1970—),女,河北保定市人,助理研究员,硕士,主要从事果树生物技术研究。

究方向更多地集中到针对某一国家或地区的主栽品种,建立起高效稳定的转化体系以及通过目的基因的导入改良现有草莓品种性状,其中包括抗虫、抗病毒、抗真菌、抗除草剂以及改良果实品质等。

James 等^[6]研究了外源抗虫基因对草莓的转化。已知与几种鳞翅目和鞘翅目害虫抗性有关的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *cpt1*,通过农杆菌被转入了草莓品种“Raoella”中,转基因植株经过抗性筛选和 Southern 杂交鉴定,部分阳性克隆植株进行了藤象甲(*Otiorhynchus sulcatus*)幼虫饲喂试验,结果显示在转基因植株上幼虫的成活率为 80%~90%。

草莓拟轻型黄边病毒(SMYEPV)的外壳蛋白基因通过农杆菌转化草莓品种“Totem”和“Hood”。PCR 和 Southern 杂交结果显示,该基因被整合进了草莓的基因组;ELISA 分析表明,该基因在转基因株系中得到了表达。但作者没有报道对转基因株系进行抗性分析以及田间农艺性状的检测结果^[7]。

Martinelli 等^[8]利用携带有 pKYLX71 质粒的 LBA4404 菌株转化草莓品种“Pajaro”和“Chandler”,将来自烟草的抗真菌蛋白 *osmotin* 的基因转入了草莓。在转基因植株中积累了显著水平的杀真菌剂活性,抑制了病原体 *O. lycopersici* 和 *Botrytis cinerea* 的孢子形成。

南非学者 Hennie 等较为完整地研究了抗除草剂基因对草莓的转化^[9]:编码 PAT(草丁膦乙酰转移酶)的基因通过农杆菌转入了南非的主栽品种“Selekta”中。转化使用了在温室中生长 1~3 个月的幼嫩叶片,于附加 TDZ 的 N6 培养基上诱导植株再生。通过比较,卡那霉素比除草剂 glufosinate-ammonium 更适合作为转化芽的选择剂。在含有卡那霉素的选择培养基上,芽的再生率约为 10%。杂交分析结果表明,插入不同转基因株系中的 PAT 基因的拷贝数从 1 到大于 34 不等。在温室内,转基因植株增殖正常,表型上与对照相似。在喷施 3 次 glufosinate-ammonium 后,转基因植株均无受害症状且生理表现健康,而未转化的对照植株于 3 周后死亡。将转基因植株栽入容器内进行田间试验,结果大部分转基因株系在果实颜色、形状及口味上的表现均不正常,部分株系在植株高度、叶的形态和盛花时间与对照有所不同。所有转基因株系的果实产量均明显低于对照。在全部 22 个转基因株系中,有 4 个株系除了具有抗除草剂和结果少的特点以外,其余表型均类似对照的“Selekta”。值得注意的是,从试验容器周边 1~5 m 内种植的非转基因的“Selek-

ta”上收集的种子,有 1.3%对叶面喷施除草剂具有抗性,其中抗性种子的 92%是从距离转基因植株 1 m 以内的植株上收集的。

张志宏等^[10]在建立了高效再生体系的基础上,利用携带有 *gus* 报告基因的农杆菌菌株 EHA105 和携带有 *bar* 基因的 LBA4404 对草莓品种“弗吉尼亚”进行了转化,转化芽在附加卡那霉素 25~50 mg/L 的培养基上能够正常生长、分化和生根。*bar* 基因的转化芽在附加除草剂草丁膦 10 mg/L 的培养基上能够正常生长分化,而对照植株继代培养 1 个月后死亡。温室内的转 *bar* 基因植株在连续喷施 3 次 400 倍除草剂 Basta(草丁膦的有效质量浓度 180 g/L)后仍能正常生长,对照植株喷施 1 次后即表现出叶片焦枯,10 d 后全部死亡。在田间,转 *bar* 基因植株均能正常开花结果,其他生物学性状也表现正常。

有关改良果实品质的转化也是研究的重点之一。Bachelie 等^[11]研究了来自马铃薯的蔗糖酶基因对草莓的转化,目的在于尝试改良果实的风味和加工品质。蔗糖酶催化蔗糖的降解,调节果实内的碳水化合物组成及平衡,因而对决定草莓的果实风味和加工品质起着重要作用。在对“Symphony”转化中获得了 14.2%的再生芽,但由于未能有效控制农杆菌的生长而没有获得转化芽。对“Senga Sengana”的转化初步得到了 13 个转化芽,进行 PCR 检测证实了马铃薯蔗糖酶基因在草莓中的存在。Dolgov 等^[12]则使用了超甜蛋白 *thaumatin* I 的编码区构建双元载体转化草莓,PCR 分析证明,*thaumatin* I 转入了草莓中。

人们在改善草莓的耐储运性能方面,也做了积极的探索。Mathews 等^[13]将控制乙烯生物合成的一个基因编码 S-腺苷甲硫氨酸水解酶 SAMase 的基因转入到草莓品种“Totem”中,转化率达到了 58.8%。有大约 500 株转基因植株已移栽入土壤中准备做进一步的分析。Firsov 等^[14]通过农杆菌将比目鱼的抗冻蛋白(AFP)基因导入草莓品种“Firework”,但对其耐储运性状并没有报道。

1.2 DNA 直接导入遗传转化的研究

DNA 直接导入方法有花粉管通道法、基因枪法、原生质体法等^[15]。随着草莓原生质体再生成株技术的突破,利用原生质体直接吸收外源 DNA 的基因转化研究也有进展。Nyman 等^[16]利用电激法转化草莓叶片和叶柄原生质体,得到了表达 GUS 活性的转化植株。但花粉管通道法和基因枪法在草

莓的遗传转化中尚未见报道。

2 草莓遗传转化所涉及的基因

目前,通过遗传转化导入草莓的基因既有报告基因,如 *gus*, *npt II* 等,也有少量有经济价值的目的基因,其中包括豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *cpt1*,草莓拟轻型黄边病毒的外壳蛋白基因,抗真菌蛋白基因 *osmotin*,抗除草剂基因 *bar* 和编码 PAT(草丁膦乙酰转移酶)的基因 *pat*,以及甜蛋白的基因 *thau-*

matin I 和抗冻蛋白基因等(表 1)。这些目的基因大部分围绕着抗病毒、抗病虫害、抗除草剂以及改良果实品质等性状,与通过基因工程改良草莓品种的育种目标相一致。同时还应看到,随着植物分子生物学研究领域的飞速发展,有越来越多的基因被克隆,以用于草莓的遗传转化,其中包括与抗性相关的植物凝集素基因^[17,18]、几丁质酶基因^[19],与果实软化相关的苹果菌素基因^[20]等。

表 1 草莓遗传转化导入的外源目的基因

Table 1 Foreign genes adopted in genetic transformation of strawberry

基因型 Genotype	外植体 Explant	外源目的基因 Foreign gene	参考文献 Reference
草莓 <i>Fragaria ananassa</i> Duch	叶片和叶柄 Leaf disc and petiole	<i>nos</i> 和 <i>npt II</i> 基因 <i>nos</i> and <i>npt II</i>	[3]
红衣 Redcoat	愈伤组织 Callus	<i>gus</i> 和 <i>npt II</i> 基因 <i>gus</i> and <i>npt II</i>	[4]
斯科特 Selekta	叶盘 Leaf disc	<i>gus</i> 和 <i>pat</i> 基因 <i>gus</i> and <i>pat</i>	[9]
图特和胡德 Totem and Hood	叶盘 Leaf disc	病毒外壳蛋白基因 Coat protein gene of SMYEPV	[7]
派扎罗和查德勒 Pajaro and Chandler	叶片和叶柄 Leaf disc and petiole	几丁质酶基因 <i>osmotin</i>	[8]
斯弗尼和森加加拉 Symphony and Senga Sengana	茎段 Stem	甲硫氨酸水解酶基因 Samase gene	[11]
烟花 Firework	叶盘 Leaf disc	抗冻蛋白基因 AFP gene	[14]

3 影响转化率的主要因素

3.1 再生系统

成功的基因转化首先依赖于高效稳定的再生系统。基因转化操作中的一些处理,如农杆菌侵染,抗生素的使用等都会使再生频率有不同程度的降低,因此只有再生频率高的再生系统,才有获得高频转化的可能。

在草莓的遗传转化中,对以叶片、叶柄等为外植体再生不定芽的途径研究最多,已有多个品种通过此途径获得了再生植株,不同品种间的再生频率有很大差异,其中基因型是影响草莓叶片再生能力的一个重要因素^[9,21~27]。利用草莓原生质体培养获得再生植株的周期长、难度大、再生频率低,只有少数草莓品种获得了成功^[16,28,29],所以在实际应用上局限性较大。草莓花药经过离体培养获得再生植株的过程也是一种可用于基因转化的再生系统,但再生植株的倍性较为复杂^[30]。极少数由花粉粒直接诱导产生的不定芽可形成单倍体植株,如果以该系统作为遗传转化的受体系统,因生殖细胞直接为受体细胞而具有更强的接受外源基因的能力,而且,受体细胞是单倍体细胞,转化的基因无显隐性的影响,有利

于外源基因的表达。植株通过加倍后可成为纯合的二倍体新品种,可大大缩短复杂的选育纯化过程。

3.2 农杆菌的侵染

农杆菌菌株是影响转化效率的重要因素。张志宏等^[27]认为,获得较高频率的转化芽与使用琥珀碱型的强致病菌株 EHA105 关系密切。菌株所携带载体也会影响致病性^[31],但针对不同农杆菌菌株及其所携带质粒对草莓侵染能力的比较,还缺乏全面的研究。

此外,农杆菌的活化、农杆菌浓度、共培养条件和时间等,也会造成转化效率的差异。

3.3 外植体的脱菌培养

与农杆菌共培养后有效地杀死和抑制农杆菌的生长,才能保证外植体更好地生长发育。常用的脱菌抗生素有羧苄青霉素(carbenicillin, Carb)、头孢霉素(cefotaxime, Cef)及羧吩青霉素(timentin)。由于脱菌抗生素对外植体的影响在不同植物中差异较大,需要在试验中注意选择。Finstad 等^[7]的数据显示,羧苄青霉素会降低草莓叶盘的再生率,在试管苗的生长过程中会导致顶端和根的矮化。而使用 100 或 200 mg/L 羧吩青霉素则不会抑制叶盘的再生,对苗的生长也没有不良影响。因而建议使用羧吩青

霉素作为农杆菌脱菌抗生素。

3.4 转化体的选择培养

如何选择转化体也是一个重要环节。选择抗生素的种类及使用浓度,需要通过具体的试验来确定。选择的方法和时期对筛选转化体也很关键。Nehra等^[5]认为,侵染后的外植体在无抗生素的培养基中培养10 d后,再加入选择压进行筛选是获得高频率转化芽的一个关键因素。共培养后直接放在选择培养基上的叶盘经常是伸展的并且边缘翘起,叶盘中间部分由于接触抗生素而白化死亡,边缘细胞虽然最有可能再生出芽,但由于失去生长激素和营养的供应而未能形成芽。另外,单个的转化细胞很可能不能拮抗选择压也是诱因之一。

4 问题与展望

4.1 转化率

转化率低是草莓遗传转化的首要问题,不同基

因型的草莓转化差异很大;转化受体不同,转化率也不同。草莓的叶片和叶柄容易建立高频再生体系,较花粉和原生质体的转化率高。但叶片和叶柄的转化体可能是嵌合体,而且容易发生变异。因此,如何提高转化率,建立高效、稳定的转化系统是今后研究的重要课题。

4.2 外源基因整合的随机性

无论是通过农杆菌途径还是外源DNA直接导入,其目的基因的整合都是随机的,而且拷贝数既有单拷贝又有多拷贝,这样常常会引起基因的过量表达或基因沉默。通过同源重组向植物基因组特定位点引入外源目的基因的研究已经开始,但效率很低^[32]。因此,外源基因的定点整合与稳定表达也是急需研究的问题之一。

上述问题的解决,将会促进草莓遗传转化技术的突破,使草莓基因工程育种技术更加完善,从而实现对现有草莓品种的定向改良。

[参考文献]

- [1] McGranahan G H, Leslic C A, Uratsu S L. Agrobacterium-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants[J]. Bio/Technology, 1988, 6: 800—804.
- [2] James D J, Passey A J, Barbara D J, et al. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill) using a disarmed binary vector[J]. Plant Cell Reports, 1989, 7: 658—661.
- [3] James D J, Passey A J, Barbara D J. Agrobacterium-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors[J]. Plant Science, 1990, 69: 79—94.
- [4] Nehra N S, Chibbar R N, Kartha K K, et al. Agrobacterium-mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 10—13.
- [5] Nehra N S, Chibbar R N, Kartha K K, et al. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 293—298.
- [6] James D J, Passey A J, Easterbrook M A, et al. Progress in the introduction of transgenes for pest resistance in apples and strawberry[J]. Phytoparasitica, 1992, 20(Suppl): 83—87.
- [7] Finstad K, Martin R R. Transformation of strawberry for virus resistance[J]. Acta Horticulturae, 1995, 385: 86—90.
- [8] Martinelli L, Rugini E, Saccardo F. Genetic transformation for biotic stress resistance in horticultural plants[J]. In Vitro, 1996, 32(3): 69—70.
- [9] Hennie J, Plessis D U, Brand R J. Efficient genetic transformation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cultivar Selektia[J]. Acta Horticulturae, 1997, 447: 289—293.
- [10] 张志宏, 吴禄平, 代红艳, 等. 草莓主栽品种再生和转化的研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(3): 189—193.
- [11] Bachelier C, Graham J, Machray G, et al. Integration of an invertase gene to control sucrose metabolism in strawberry cultivars[J]. Acta Horticulturae, 1997, 436: 161—163.
- [12] Dolgov S V, Lebedev V G, Firsov A P, et al. Expression of the thaumatin gene in horticultural crops[A]. Sacrasicia M, Porceddu E. Genetics and breeding for crop quality and resistance[C]. Dordrecht, Germany: Kluwer academic publishers, 1999. 165—172.
- [13] Mathews H, Wagoner W, Kellogg J, et al. Genetic transformation of strawberry: stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 1995, 31(1): 36—43.
- [14] Firsov A P, Dolgov S V. Agrobacterial transformation and transfer of the antifreeze protein gene of winter flounder to the strawberry[J]. Acta Horticulturae, 1999, 484: 581—586.
- [15] 金万梅, 巩振辉, 李桂荣, 等. 植物遗传转化方法和转基因植株的鉴定[J]. 陕西农业科学, 2000, (1): 24—29.
- [16] Nyman M, Wallin A. Transient gene expression in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) protoplasts and the recovery of transgenic

- plant[J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 105—108.
- [17] Boulter D, Edwards G A, Gatehouse A M R, et al. Additive effects of different plant-derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants[J]. *Crop Protection*, 1989, 9: 351—354.
- [18] Hilder V A, Powell K S, Gatehouse A M R, et al. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids[J]. *Transgenic Research*, 1995, 4: 18—24.
- [19] Collinge D B, Slusarenko A J. Plant gene expression in response to pathogens[J]. *Plant Molecular Biology*, 1987, 9: 389—410.
- [20] Bennett A, Rose J. Fruit-specific and ripening-regulation expansion genes to control fruit texture and softening [P]. US Patent: 5929303, 1999-07-27.
- [21] Nehra N S, Stushnoff C, Kartha K K. Regeneration of plants from immature leaf derived callus of strawberry[J]. *HortScience*, 1988, 23: 56.
- [22] Jones O P, Waller B J, Beech M G. The production of strawberry plants from callus culture[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1988, 12: 235—241.
- [23] Nehra N S, Stushnoff C. Direct shoot regeneration from Strawberry leaf disks[J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1989, 114(6): 1014—1018.
- [24] Mansouri E I, Mercado J A, Valpuesta V, et al. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 15(8): 642—646.
- [25] Barcelo M, Mansouri E I, Mercado J A, et al. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar chandler[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 54(1): 29—36.
- [26] 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.
- [27] 张志宏, 吴禄平. 草莓主栽品种 Tudla 遗传转化体系的建立[J]. *农业生物技术学报*, 1998, 6(2): 200—204.
- [28] Nyman M, Wallin A. Plant regeneration from strawberry (*Fragaria* × *Ananassa*) mesophyll protoplasts[J]. *J Plant Physiol*, 1988, 133: 375—377.
- [29] Nyman M, Wallin A. Improved culture technique for strawberry protoplasts and determination of DNA content in protoplasts derived plants[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 30: 127—133.
- [30] 侯喜林. 不同品种和激素条件对草莓花药培养的影响[J]. *南京农业大学学报*, 1992, 15(2): 21—28.
- [31] Kathen A, Cobson H J. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Pium sativum* L. using binary and cointegrate vectors[J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 9: 276—279.
- [32] 李 卫, 郭光沁, 郑 昌. 根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展[J]. *科学通报*, 2000, 45(8): 798—807.

Progress in research on strawberry genetic transformation

Y IN Shu-ping, J IN Wan-mei, MENG Fan-hong

(Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China)

Abstract: Progress and problems on the strawberry genetic transformation were reviewed. Agrobacterium-mediated transformation was discussed with emphases, and foreign genes of genetic involved were enumerated. Some factors that influence the transformation frequency were summarized as well as difficulties and expectations.

Key words: strawberry; genetic transformation; *Agrobacterium*