

的相互作用^[19]。

结 语

神经系统和免疫系统无论从解剖方面还是从功能方面都有许多相似之处。从解剖方面来看,两者均由中枢和远隔的周围部分组成;均包括细胞和递质;递质最后通过效应器官和/或细胞发挥作用。从功能方面来看,两者均能接受刺激,而后呈现兴奋或抑制;均有识别功能,免疫系统识别自己/非己,神经系统识别有意义/无意义的刺激;均有记忆功能。更为重要的是,在免疫活性细胞和神经细胞上有着相同的表面标志和受体,如神经肽、神经递质和细胞因子受体等,从而使种类繁多、功能复杂的各种信息分子在神经系统和免疫系统中发生交互调节作用。神经系统 IgSF 分子据其结构不同分为两组,即含有 IgSF V 样结构域的分子和含有 IgSF C2 样结构域的分子,主要参与轴突的伸长、束状化和髓磷脂化,突触的形成,神经元间的相互作用和血脑屏障的形成等功能。众多 IgSF 分子在神经系统的分布及其发挥不同的功能为我们研究神经免疫学提供了一个新的视角,探索和发现新的神经系统 IgSF 分子及其功能已成为神经免疫学研究领域中一个新课题。

参 考 文 献

[1] Yoshihara Y., et al., 1991, *Neuroscience*

Research, 10: 83-105.

- [2] Bernhardt G., et al., 1994, *Virology*, 203 (2): 344-356.
- [3] Nakana R., et al., 1991, *Biochem-Biophys-Res-Column.*, 178(1): 282-290.
- [4] D'Urso D., et al., 1990, *Neuron*, 4: 449-460.
- [5] Morris RJ., et al., 1987, *Dev. Neurosci.*, 9: 33-44.
- [6] Spaltmann F., et al., 1996, *J. Neurosci.*, 16 (5): 1770-1779.
- [7] Nakajima O., et al., 1997, *Neuroreport.*, 8 (14): 3005-3008.
- [8] Struyk AF., et al., 1995, *J. Neurosci.*, 15 (3Pt2): 2141-2156.
- [9] Butler SJ., et al., 1997, *Development*, 124 (4): 781-792.
- [10] Yamakawat K., et al., 1998, *Hum. Mol. Genet.*, 7(2): 227-237.
- [11] Taira E., et al., 1998, *Neurochem. Int.*, 32 (1): 23-29.
- [12] Hassel B., et al., 1997, *J-Biol-Chem.*, 272 (45): 28742-28749.
- [13] Owens GC., et al., 1989, *Glia.*, 2: 119-128.
- [14] Attia J., et al., 1989, *Clin. Chem.*, 35: 717-720.
- [15] Franssen E., et al., 1997, *Hum. Mol. Genet.*, 6(10): 1625-1632.
- [16] Plagge A., et al., 1997, *Gene*, 192(2): 215-225.
- [17] Yoshihara Y., et al., 1994, *Neurosci. Res.*, 21(2): 119-124.
- [18] Walsh FS., et al., 1997, *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 13: 425-456.
- [19] Chuong CM., et al., 1994, *Dev. Biol.*, 164 (2): 383-97.

转基因技术在切花育种中的应用

任祝三 张慧玲译

(浦东孙桥现代农业联合发展公司 上海 201203)

尽管世界花卉市场上已有成千上万的品种,但是消费者仍在不断地寻求新产品,追寻新的颜色,奇异的花型,好闻的香气和更长的瓶插时间,作为种植者则要求品种有更好的农艺特性,例如产量和抗病虫害能力。这要求育种家每年都要推出一些新品种。

常规育种是基于种内或种间杂交,如今大量新花卉品种的产生和新品性的导入仍依赖于这种育种方

法。虽然常规育种是一项十分有用的工具,但是获得新品性的基因来源是有限的,而且育种周期长,使常规育种受到限制。

把外源基因导入植物的新方法的发展,加上基因

中科院上海植物生理研究所周荣仁研究员对本文进行了校阅,谨此致谢。

鉴别与分离技术方面知识的增长,使我们能够将某一优良品种的单一性状予以特意的改变,不再受植物亲缘关系远近的限制。基因转化技术方面取得进展正在把这些花卉推进到分子育种时代。

本文介绍重要切花育种上应用的转基因技术和组织的最新进展,以及把新的性状导入这些花卉所适用的技术。

玫瑰、菊花、郁金香、百合和香石竹是世界销量最大的五种切花(占世界销量的68%,1996年)。近年来,转基因育种的热点相对集中到玫瑰、香石竹、菊花和非洲菊上。

玫瑰(*Rosa ssp.*)

组织培养 长期以来玫瑰一直是花卉产业中最重要的种类。由于玫瑰的商业价值,人们采用各种方法以建立玫瑰有效的丛生芽再生系统。已经能从叶片、花丝、花瓣产生的胚状体中培养出小植株,并且在茎切片上诱导出根。用节间组织,幼胚经愈伤组织也能产生器官分化。马修斯(1991,1994)报道说用根或节间组织经胚状体悬浮培养后取得原生质体,从原生质体已能培养出小植株。用叶和叶柄可以直接培养出丛生芽。最近,杜鲍斯和维雷斯发展了从叶外植体培养丛生芽的技术^[1]。

大多数玫瑰的组织培养是十分耗时而且芽的发生率甚低,具有高度的品种专一性而且不易重复。

基因转化 在众多玫瑰的再生系统中只有胚状体培养技术被成功地用来培养转基因玫瑰^[2]。使用两种不同的基因转化方法:一种方法是把由叶或花丝培养出来的愈伤组织与农杆菌一起共培养。另一种方法用茎段作为初始的外植体,然后与农杆菌一起共培养。可以生根和长出能产生胚状体的愈伤组织。两种方法都应用了报告基因葡糖苷酸酶(uidA)或荧光素酶(luc)并结合使用筛选基因 npt I 和一些不同的农杆菌菌株系,如 LBA4404, GV3101 超毒性的 EHA101 和毛根农杆菌 15834 (*A. rhizogenes* 15834)。

菊花(*Dendranthema grandiflora*)

组织培养 菊花是最著名的花卉之一。用不同的外植体均能建立菊花的再生系统。用叶片,茎尖,头状花序产生愈伤组织然后再生出小植株。用花梗,花瓣,茎和叶片也可直接再生出不定芽。

其中用茎可获得较高的再生率。严格选择外植体可保证获得最高的芽再生率。外植体的发育程度也是一个重要因素,切条的近顶端区域是最合适的。菊花品种间的再生能力的差异也是很明显的。

基因转化 现已有数个研究小组用菊花的叶、叶柄,或茎的外植体成功地完成了基因转化。利德格(1991)首次详细报道了用野黄菊(*D. indicum*)叶圆片作基因转化并再生成功。使用农杆菌 LBA4404 和双质粒 PGA643,携带选择标记基因 npt I,转化率约 1%。1993 年瑞诺使用超级毒性的 EHA101 菌株。用节、节间和叶的外植体接种后共培养一段时间,然后用潮霉素进行筛选,获得了转基因菊花。与农杆菌共培养的时间过长会威胁外植体的存活。

钟等(1994)提出了一种用菊花叶柄外植体的基因转化方法。三个栽培品种被用来研究影响基因转化效率的关键因素。超毒性菌株 AGLO 的转化率高于菌株 LBA9404。由于菊花对卡那霉素高度敏感,对抗生素的彻底解毒是很重要的。没有突变的 npt I 基因能保护在卡那霉素培养基上的外植体并有效地选择转基因组织。最后,这些作者都认为菊花栽培品种的再生能力与转化率之间有一明显的相关性。钟等(1994)也强调把选择标记基因放在近左端的重要性,以便使筛选有效,防止 T-DNA 截断而丢失基因。基于从该研究中获得的资料,作者建立了一套方案,能从 100 个叶柄外植体中筛选出 13—24 个所需基因呈正反应的芽。

富凯等(1995)报道了用菊花的茎外植体获得高转化率。把菊花外植体与 AGLO 菌株共同培养后转入高浓度吲哚乙酸(IAA)中 7 天,然后再转入低浓度的 IAA 培养基中,结果得到约 15% 的转化率^[3]。

香石竹(*Dianthus caryophyllus*)

组织培养 香石竹是另一种主要的花卉,是世界上花销售支数最多的商品花。可以从营养体和花组织上培养出不定芽。用茎段作外植体时,芽原基是从外植体周围表皮组织中产生的,位于叶-茎过渡区域的分生组织内。与菊花相似,香石竹叶和茎段的发育程度明显影响再生率。最幼嫩的外植体可获得最多的不定芽。腋芽的再生率则与组织年龄无关。

花瓣常用作培养不定芽的器官。芽是从花瓣绿色基部产生的。另外,从雄蕊、胚珠、花托也能培养出不定芽。用下胚轴、节间、叶的外植体经愈伤组织也能培养成功,不过,成功率较低。

基因转化 用茎、叶和花瓣外植体已得到了香石竹的转基因植株。

鲁等(1991)首次叙述了用茎外植体进行基因转化的方案。建立一种通常的转化条件,使用含有双质粒的 PKIWI110 野生型农杆菌菌株 ICMP8302。把三个大花型的品种的茎外植体与农杆菌一起共培养,最终得到

转基因香石竹。转化率是高的,从160个外植体中获得约17个npt I呈正反应的植株。使用去毒的农杆菌菌株AGLO代替野生型农杆菌菌株,对植物没有癌基因表达的负作用,结果从290个外植体中获得约8个正反应的芽。采用共同整合代替双链载体可以明显提高转化率。配合较长的共同培养时间(5天)和高浓度的生长素(5mg/L NAA)可以进一步提高转化率。

朱柯等(1995)用基因枪也使香石竹组织产生了转基因植株。由于使用两种不同的激动素6-苯氨基嘌呤(BAP)和噻重氮苯基脲(TDZ)所以分两步来培养不定芽。经过带bar基因微粒轰击过的芽用bialaphos进行筛选。用这个方法从100个大花型品种的茎段中可获得大约2个转基因植株。最近报道了把基因枪技术与农杆菌转化方法结合起来的新方案。先用基因枪使茎的外植体受伤然后与超毒性农杆菌AGLO共同培养。然后用卡那霉素筛选,从White Sim.和Desio品种的100个茎外植体中分别获得约25和约8个转基因植株。用基因枪使组织受伤和用幼嫩外植体(第一、二节茎段)是获得高转化率的关键^[4]。

范·阿塔尔孚斯德等(1995)成功地从三个大花型品种和一个多花型品种的叶外植体获得转基因植株。叶外植体与超毒性农杆菌AGLO共同培养,然后用卡那霉素进行筛选。GUS的分析结果表明,经14天的培养,最幼嫩的叶子最适合于基因转化,从这些外植体获得转基因植株的最高产生率。阿尔瓦斯特(1995)也报道双质粒对转化率有明显影响。PCGN7001从100个外植体中可得到0.1—0.4个转基因组织。这些结果强调了选择转基因载体的重要性,因为前者双链质粒携带35SCaMV驱动的非突变的npt I,而后者携带ros驱动的突变的npt I。

大概是由于外植体分离方便和再生率高的缘故,几个小组都选用花瓣做基因转化材料。但是,迄今还没有一种转化方法是成功的。鲁等(1991)和富鲁扎巴迪(1995)报道,无论是用根癌农杆菌还是毛根农杆菌,从150个花瓣的基因转化中只得到一个GUS呈正反应的芽。范·阿塔尔孚斯德等(1996)从560个外植体中也只转化成功一株转基因植株。

非洲菊(*Gerbera hybrida*)

组织培养 与其他主要切花相比,培育非洲菊的不定芽较为困难。所有的再生方法均有品种的专一性。

已经能从花梗和花序的组织中培养不定芽。如果从微繁的小苗上切取叶片和叶柄,芽的发生率可明显

提高。也可经愈伤组织产生出芽。用芽的顶端组织同样可以培养出再生苗。

基因转化 爱略马等(1993)用栽培品种Terra regina的叶柄外植体获得转基因非洲菊。外植体是从组培苗上取得的,然后与携带去毒Ti质粒PGV2260的农杆菌58和一个含有npt I基因的双链质粒共同培养。经过卡那霉素的筛选,转基因的芽从愈伤组织中产生。这一方法的效率是100个外植体获得0.1—0.2个转基因植株^[5]。

兰花(Orchids)

兰科是植物界中最大、种类最多的科。其中许多植物被作为切花和盆花。转基因的石斛兰(*Dendrobium*)和虾脊兰(*Calanthe*)是通过基因枪和外源DNA的电泳方法得到的。这两种兰花的原球茎和原球茎状组织被用作初始的外植体。库恩勒等(1992)从大约280个石斛兰的原球茎中得到13个抗新霉素的植株。但是当被推断为转基因的石斛苗进行抗番木瓜环斑病毒筛选时仅有一株呈正反应。

洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*)

用农杆菌和基因枪都能使洋桔梗的叶外植体或细胞悬浮培养物分别产生转基因植株。在前一方法中,从组培苗上取得幼叶外植体,然后与野生型A722I双链质粒的农杆菌一起培养,对GUS呈正反应的细胞和生长的转基因芽都主要位于主脉周围区域。由于能高度再生的细胞不是易于基因转化的细胞,因此只获得很低的基因转化率。相比之下,非生物方法则相当有效。每个培养皿中有4个抗卡那霉素的愈伤组织。从这些愈伤组织中再生出来的植株都是uidA和npt I呈正反应的^[6]。

郁金香、百合和唐菖蒲(Tulip, Lily and Gladiolus)

至今还没有关于这三种主要球根花卉基因转化方法的报道。一般的尝试都用基因枪。威尔明克(1995)报道了把郁金香花梗切段用携带uidA基因质粒的钨粒轰击,能有效地再生出不定芽,在有强烈分生活动的组织里测到了GUS的表达。这是一种很有希望的系统。铁炮百合(*L. longiflorum*)的小鳞片用带有uidA和pat基因的质粒的钨粒轰击,产生的愈伤组织用bialaphos进行选择,最终获得转基因芽^[7]。

不同的唐菖蒲再生组织,包括小球茎切成薄片,细胞悬浮液和愈伤组织用基因枪的方法已获得转基因的唐菖蒲植株。从小球茎薄片衍生的细胞悬浮液和愈伤组织或是组培苗,再生能力与品种密切相关。相比之下,用小鳞茎再生则与品种的关系较少。

安祖花 (*Anthurium hybrids*)

陈和库耐勒(1996)成功地对安祖花的两个品种进行了基因转移。他们用农杆菌菌系 LBA4404 对黄化的茎段进行基因转化。转基因芽在卡那霉素上筛选。用高浓度抗生素的筛选可以在愈伤组织发生时期有效地减少混杂^[8]。

切花转基因育种的几个重点

花的颜色 花青素、类胡萝卜素和花黄素是花的主要色素,研究得最多的是花青素。对后者的兴趣是因为它们在许多植物和微生物之中,并且它们的作用是决定颜色。在花颜色的遗传学和生物化学方面的丰富知识使人们可以从两个方面来改变花的颜色。一个方法是调节原有基因的表达包括花青素生物合成基因的表达。另一种方法是导入外来基因使生物合成途径改变。后一种方法的应用已得到证实,转基因矮牵牛表达了从玉米中分离出来的二氢黄酮醇-4-还原酶基因的活性。产生了世界上首次出现的含天竺葵色素的砖红色矮牵牛。范德·克瑞尔等(1988)采用不同的方法来改变花的颜色,把矮牵牛的查尔酮合成酶基因以反义方向重新导入同一种植物体,结果查尔酮合成酶基因的表达完全被抑制,得到开白花的转基因矮牵牛。另外还育成了花冠呈不同深浅的红色和红白相间花纹的矮牵牛。当查尔酮合成酶基因以正义方向导入植物体,由于共抑制作用获得了与反义方向导入相类似的改变。

菊花的 Moneymaker 栽培品种的花色改变也取得成功。从菊花花瓣中分离出查尔酮合成酶基因,从正义和反义方向产生转基因菊花,结果,这种典型粉红色菊花变成白色,在 133 个正义方向的转基因菊花中仅获得三株全白的,83 个反义方向的转基因菊花中也得到三株全白的。对开白花的转基因菊花进行无性繁殖,然后分析转基因的稳定性,结果发现环境因子起着某种程度抑制转基因效果的作用,导致有些花由白变粉红。正义和反义转基因表型稳定性方面没有发现明显的差别。反义技术在非洲菊上也证明是有效的。反义方向都使转基因非洲菊改变了颜色。改变非洲菊花色的效率比矮牵牛烟草和菊花高得多。非洲菊的查尔酮合成酶基因的抑制作用使 4 棵转基因植株中有两株的颜色由原来的红色变成淡粉红和奶白色。在 4 棵反义二氢黄酮醇-4-还原酶基因的转基因非洲菊中有两棵呈粉红色。这说明二氢黄酮醇-4-还原酶基因的表达减弱了。

德罗勒斯等(1995)得到了携带反义查尔酮合成酶基因的转基因洋桔梗。在 35 个无性系中,有 20 个颜色发生变化。从花冠中心变白色至整朵花呈白色。在一些

失去色素的转基因花中也伴随有花瓣形状和花型的改变。

把查尔酮合成酶的正义和反义基因方法应用到玫瑰上,使开暗红色的 Royalty 栽培种与 Madame 栽培种的花色改变。用正义方法获得的转基因玫瑰花的颜色从红到粉红,用反义方法则得到亮红到洋红的花色。两种方法都没有得到白花^[9]。

人们也用能调节花青素生物合成途径的基因来改变花色,爱罗马用 myc 调节基因——从玉米中得到的 Lc 基因和从金鱼草中得到的 del 基因。在转基因非洲菊中 del 基因得到表达,叶子和花茎明显着色。但是没有表现出花朵的色素生成的促进作用^[10]。

伯拉德雷等(1995)用 Lc 基因促进矮牵牛栽培种 Mitchell 的色素生成。Lc 转基因矮牵牛的花是红的,相比之下野生型的花是白的。红色主要显示在花瓣的脉上,幼蕾时尤为明显。随着花的成熟,色素逐渐减少。

花型与植物形态 在自然界,花结构和花色是吸引授粉者的重要因素。而在切花市场上,这些特征成了吸引顾客的要害。因此,培育新花型是育种的目标。因为花和绿色部分是一个整体,不同形态的营养体也可以创造出一个新品种。

随着对调控开花过程的分子生物学的兴趣的增加,科学家从花顶端组织中分离出一些控制花器官分化的关键基因。现在已详尽了解一些植物的同源异型基因,其中包括拟南芥、金鱼草、矮牵牛。积累的知识也使我们能从其他植物中分离出同源基因。

同源异型转基因切花不仅能产生新花型,也加深了对花的复杂结构的了解。例如,在一次研究十分复杂的非洲菊花器官分化的工作中,分离出几个原有的 MADS 盒基因。把反义方向的 gglo (*Gerbera globosa* ortholog), gdefl (*Gerbera deficiens* ortholog), galag (*Gerbera c-class MADS-box gene*) 和 Rcd1 (矮牵牛中 ortholog of fbpz) 基因导入非洲菊,结果使转基因植株的花结构发生了许多改变。带有拟南芥 *agamous* 基因的转基因非洲菊也已育成。

毛根农杆菌的 rol 基因的表现型比根瘤农杆菌基因的表现型更明显和更富有变化。降低顶端优势,雄性不育,增强生根能力和产生香气是 rol 基因在转基因植物中表达出来的一些表现型的改变。

Souq 等(1996)证实了 rolC 基因在原有启动子作用下,对玫瑰品种 Madame 的作用。转基因植株矮化,叶片起皱,茎基部长出很多侧枝。基于 rol 基因有促进生根的作用,rol 基因被用来提高砧木的发根能力。范

德·沙尔姆等(1997)把 rolB 和 rolABC 基因导入玫瑰花的砧木品种 Moneyway 中。转基因插条不定根的生根率是对照的三倍。rolABC 转基因插条再用生根粉处理,生根率会进一步提高。而 rolB 的转基因插条再用外源生长素,不但不能提高生根率反而会使生根率下降。有趣的是 rol 基因也影响香叶天竺葵的芳香油含量。rol 转基因植株显示出几种芳香油的浓度比对照植株提高了。

瓶插寿命 鲜切花从产地的温室经由拍卖市场,花店才会到顾客手中,此时鲜花仍要有很长的瓶插寿命,这样才能使顾客满意。假如鲜切花不具备最起码的瓶插寿命,单靠花色和花型是很难在商场上获胜的。因此,控制花瓣和花朵的衰老过程是育种家十分感兴趣的。

乙烯在调节花衰老过程中的重要性已经清楚。乙烯生物合成途径的关键酶的基因,ACC 合成酶和 ACC 氧化酶,已经分离出来并已鉴定。同时把乙烯信号转导途径的基因也分离出来。这为应用分子育种方法延迟花衰老铺平了道路。至今,通过调控乙烯的合成和反应,已能在一些植物上实现延迟衰老,这些植物包括矮牵牛和香石竹。

使用反义技术,两种大花香石竹被导入 ACC 氧化酶基因。从 9 株红色大花香石竹和 36 株白色大花香石竹中,每一品种仅有一个无性系表现了所需的表型。这些转基因香石竹的瓶插寿命几乎二倍于原品种,增加了 5—9 天。在这两种转基因香石竹中 ACC 氧化酶的 m-RNA 水平显著下降,累积的乙烯量不到对照的 10%。最近应用 ACC 合成酶的共抑制技术也成功地延迟了香石竹花的寿命。

转基因切花的未来

分子育种对于一些作物而言正在变成现实,带有香味的番茄,抗除草剂的大豆,抗虫的玉米是一些成功的例子。相比之下通过田间试验和测试的转基因切花只占全部切花的极少数,切花在国际作物市场上的价值估计达 30—40 亿美元,到本世纪末将至少增加 4%。因此培育新品种是很有前途的。

随着发展中国家在花卉生产领域的崛起。将来,荷兰和其他西方国家所占的市场份额会被发展中国家分去一些。这些国家可能大量生产一般花卉品种。为了对付这样的竞争,发达国家的研究部门和大公司把重点放到基因工程技术上,开发适用于主要切花品种的转基因技术与再生技术。由于显著的经济效益,西方一些

大花卉生产者和大公司,对在这一领域里取得的成就是严加保密的。

迄今还没有报道说切花中已成功导入抗病虫害基因。大量的抗虫、抗病毒、抗细菌、抗真菌的基因将会为培育有抗性的转基因切花作出贡献。

数 10 年来,传统的观赏植物育种的努力主要集中在花色和花型、花的产量和抗病虫害的能力,而切花香气的正在减退。为了克服遗传上的这种退化,增加切花的香气,必须弄清花香气成分的生物合成途径,并把关键基因分离出来。最近的一项次生代谢的研究工作者着重于单萜的合成,单萜是花香气的重要成分。克隆的 Lis 基因表明是编码 S-linalool 合成酶,这种酶可一步反应把牻牛儿焦磷酸(GPP)转化为 S-linalool,这个基因可能用于使转基因切花产生新的香气。

参 考 文 献

- [1] Dubois, L. A. N. and de Vries, D. P., 1995, *Gartenbauwissenschaft*, **60**: 249—253.
- [2] Souq, F., Coutos-Thevenot, P., Yean, H., Delbard, G., Maziere, Y., Barbe, J. P. and Boulay, M., 1996, *Acta Hort.*, **424**: 381—388.
- [3] Fukai, S., de Jong, J. and Rademaker, W., 1995, *Breeding Science*, **45**: 179—184.
- [4] Zuker, A., Ahroni, A. and Vainstein, A., 1997, In *Acta Hort.*, A highly efficient method for carnation transformation.
- [5] Elomaa, P., Honkanen, J., Puska, R., Seppanen, P., Helariutta, Y., Mehto, M., Kotilainen, M., Nevalainen, L. and teeri, T. H., 1993, *Biotechnology*, **11**: 508—511.
- [6] Semeria, L., Vaira, A. M. Accotto, G. P. and Allavena, A., 1995, *Euphytica*, **85**: 125—130.
- [7] Rashid, H., Yokoi, S., Toeiya, K. and hinata, K., 1996, *Plant Cell Rep.*, **15**: 727—730.
- [8] Chen F. C. and Kuehnle, A. R., 1996, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **121**: 47—51.
- [9] Firoozabady, E., Moy, Y., Courtney-Guterson, N. and Robinson, K. 1994, *Biotechnology*, **12**: 609—613.
- [10] Bradley, M., Davies, K., Deroles, S., Schwinn, K. and Manson, D., 1995, *Acta Hort.*, **420**: 23—25.