



月季组织培养和遗传转化体系的研究进展

李 进, 阮 颖*, 刘春林, 邓荟芬, 范亚丽

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

摘 要: 月季通过器官和体细胞胚发生途径都可以获得再生植株, 在遗传转化中主要是利用体细胞胚作为转化受体。目前, 利用农杆菌介导法和基因枪法已成功将外源基因如报告基因、抗病基因和改变花色的基因等导入月季基因组中。本文对近年来月季组织培养和转基因研究进展进行了综述, 为建立月季高效遗传转化体系奠定了理论基础。

关键词: 月季; 组织培养; 植株再生; 遗传转化

中图分类号: Q813.1 **文献标识码:** A

Progress in Tissue Culture and Genetic Transformation of Roses

LI JIN, RUAN Ying*, LIU Chun-lin, DENG Hui-fen, FAN Ya-li

(College of Bio-Science and Technology, Hunan Agricultural University, Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha 410128, China)

Abstract: Plants can be regenerated by tissue culture either organogenesis or somatic embryogenesis, and the latter is mostly used for the regeneration of transgenic rose plants. Exogenous genes, such as reporter genes, disease-resistant genes or color-related genes, have been successfully transferred into rose plants via *Agrobacterium tumefaciens* or micro projectile bombardment. In order to provide a high efficient transformation system, we reviewed the research progress in plant regeneration and genetic transformation of roses.

Key words: *Rosa hybrida* L.; tissue culture; plant regeneration; genetic transformation

月季(*Rosa hybrida* L.)是蔷薇科(Rosaceae)蔷薇属(*Rosa* L.)植物, 是世界上最重要的观赏植物之一。月季育种的目标主要集中在对花色、花香、花形、开花习性、鲜切花寿命、株型、抗病性等的改良上, 在花卉育种中更受关注。由于月季基因资源有限、缺乏纯系以及由倍性和染色体数目差异造成的高度不亲和性, 因而传统的方法存在着一定的局限性。基因工程技术因能保持品种其它性状的相对稳定, 只在外源基因所控制的性状上发生改变, 并能利用来自其它生物类型的基因, 从而为月季品种改

良提供了新途径。而通过体细胞进行月季组织培养和建立遗传转化体系是基因工程育种的重要基础工作。本文就近年来在这方面的研究进展进行综合回顾, 为月季基因工程改良研究提供参考。

1 月季组织培养研究进展

为了进行基因转化、突变育种、快速繁殖和品种保存, 必须建立植株的再生系统。1967年 Hill^[1]首次报道月季的组培再生器官研究, 随后又有多篇论文报道: 在‘Soraya’、‘Baccara’等品种上实现了通

收稿日期: 2006-11-22; 修改稿收到日期: 2007-06-07

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(20050203)

作者简介: 李 进(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事月季再生和转基因研究。E-mail: lijn@163.com

* 通讯作者: 阮 颖, 博士, 副教授, 硕士生导师。E-mail: yingruan@hotmail.com

过体细胞胚状体发生和器官发生途径再生完整植株直至开花。Rout 等^[2]对国外近年来月季生物技术的研究成果进行了概述,但相关报道在国内极少见到。植株的再生一般经历从愈伤诱导、愈伤分化(体细胞胚状体发生或器官发生)、胚状体成熟萌发或芽的发育、到植株再生、完整植株的移植等步骤。下面将从影响植株快繁、愈伤诱导、体细胞胚状体和器官发生、植株再生等方面阐述月季的组织培养研究进展。

1.1 丛生芽的诱导

以往月季的繁殖方式主要靠嫁接、扦插和压条等,繁殖系数低^[3],远远满足不了市场的需要。1970年, Elliott^[4]首次在聚花月季(*Rosa multiflora*)上成功地进行了芽的繁殖和诱导幼苗生根。1976年, Zieslin 等^[5]报道细胞分裂素有利于提高丛生芽的数量,但也增加了诱发花器官败育或退化的频率。而 Bressan^[6]研究发现,采用 6-BA 质量浓度为 0.03~0.3 mg/L 的 MS 培养基时可促进“Gold Glow”侧芽的发育,但当 BA 质量浓度超过 0.3 mg/L 则显著推迟芽萌发,毕艳娟^[7]也报道了低浓度的细胞分裂素(BA、ZT)有利于提高月季的萌芽率。不同种类的细胞分裂素对月季茎增殖的影响也不同。Marcelis 等在添加相同浓度(0.44 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的细胞分裂素 BA、ZTKT、ZR、2iP、ipA 研究表明,KT 实际上对茎增殖没有多少影响;而 BA、ZT、ZR 都可显著促进茎的重量和长度增加;2iP 和 ipA 虽也可促进茎的形成,但效果不如 BA、ZT、ZR 的明显^[8]。细胞分裂素配合一定的生长素可共同促进月季侧芽的萌发与生长,最常用的是 NAA^[9]。在 6-BA 质量浓度相同的情况下,随 NAA 质量浓度的升高(0.05~0.20 mg/L)月季小芽生长速度加快。但 NAA 用量同时会影响芽增殖速度,当 NAA 用量达 0.1 mg/L 以上时,芽增殖的速度有下降趋势。培养基中添加蔗糖有增加丛芽数量的作用,加入低浓度的 GA₃ 能进一步改善芽繁殖,95%的外植体产生 7 个以上的小芽^[10]。移植植株生长均一,保留母本的优良性状。Martin 等^[11]调查了 2 125 个无菌苗 3 年间在大田生长的情况,没有发现变异植株,说明通过侧芽方式繁殖的植株性状很稳定。

1.2 愈伤组织的诱导

1967 年 Hill 最早报道从杂交茶香月季(*R. hybrid cv. Tea rose*)的茎上诱导了愈伤组织,但实验结果只到芽原基(shoot primordial)。该实验证明在培养基中添加 2,4-D 或添加 NAA 和激动素(ki-

netin, Kin) 均能很快诱导出愈伤组织。Lloyd 等^[12]曾研究 *R. persica* × *xanthina*、*R. hybrida* cv. ‘Clarissa’、*R. hybrida* cv. ‘Dame of Sark’ 和 *R. rugosa* cv. ‘Scabrosa’ 的愈伤发生能力,发现只有 *R. persica* × *xanthina* 的节间能产生愈伤,愈伤组织脆性,呈淡黄绿色,该实验是以 MS 为基本培养基,添加低浓度的 BAP 和 NAA。表明月季愈伤组织的诱导与其品种的基因型有关。

激素、糖和外植体类型也是影响愈伤生成的重要因素。Rout 等^[13]以 ‘Landora’ 为材料,在添加 BA 和 NAA、2,4-D 的 MS 培养基上,叶外植体在接种 7~12 d 后,在近轴面的叶柄和中脉处产生愈伤,愈伤组织诱导频率高达 92%;茎外植体在接种 15~20 d,切端处产生愈伤,频率为 76%。生长素种类和浓度对愈伤产生能力的影响同样很大。早期实验多采用 NAA 结合 BAP 或 BA 等,近年来多采用 2,4-D、2,4-D 对愈伤的诱导效果因月季的基因型不同而异,如 2,4-D 浓度从 11.3 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 181 $\mu\text{mol/L}$,降低了 *R. hybrida* 栽培种“Carefree Beauty”的愈伤诱导频率,但该浓度则对另一个品种“Grand Gala”无影响。Van der Salm 等^[14]证明 2,4-D 对诱导 *R. persica* × *xanthina* 和 ‘Moneyway’ 产生愈伤是非常必要的,进一步添加低浓度的 BAP 有正效应,但如果 BAP 浓度过高,则产生抑制作用。表明 2,4-D 是诱导愈伤组织的必要因素。

1.3 体细胞胚状体的发生

成功的体细胞胚状体发生体系的建立将有助于月季的试管苗快繁、冷藏保存、人工种子的生产和基因的转化操作等等。1987 年 Valles 和 Boxus^[15]首次从体细胞胚状体得到再生植株。多年的研究证明体细胞胚状体的发生是月季微繁殖潜在的非常有效的方法。体细胞胚再生的基本培养基有 MS、1/2MS、B5、SH 等。培养基中的微量元素若除去 Mg²⁺、Zn²⁺、I⁻ 或是降低三者的浓度或是提高 Cu²⁺ 浓度 10 倍,有利于愈伤形成和体细胞胚诱导。但是在体细胞胚发芽时,Cu²⁺ 浓度的提高对发芽不利^[16]。Murali 等^[17]调查 22 个品种发现,只有 2 个品种能进行体细胞胚状体的发生诱导。de Wit 等^[18]也发现在供试的 7 个品种中,只有 ‘Domingo’ 和 ‘Victory Brown’ 具有产生体细胞胚状体的能力,表明月季的体细胞胚状体发生能力与基因型的关系密切。因此,至今为止,还没有一种单独的方案可以诱导出多倍体月季基因型体细胞胚^[19]。Kintzios 等^[20]认为,培养时的光照强度对体胚的形成影响很

大,光强低于 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光照条件体胚的发生频率最高。绝大多数进行体细胞胚的诱导实验都是在培养基中添加细胞分裂素(BA、BAP、Zeatin 或 Kin)和生长素(2,4-D、NAA)。Kintzios 等^[21]则证明在供试材料上使用 NAA、BA 和 GA_3 对诱导产生体细胞胚状体无效,CPA 才是诱导体细胞胚状体的决定因素。以上结果表明月季的体细胞胚状体发生能力也因品种以及外植体的类型随激素类型和浓度不同而有所变化。

1.4 器官发生

月季的芽器官(shoot)发生表现为两种类型:一类直接起源于外植体,不需经过愈伤组织阶段;而另一类需要经历愈伤阶段的过程。1967年,Hill 首次报道从愈伤组织再生了芽原基,但最终未能得到真正的芽,以后 Tweddle 等^[22]和 Llody 等分别报道 *R. persica* × *xanthina* 的愈伤组织在含 BA 和 NAA 的 MS 培养基中能再生不定芽,Arene 等^[23]证明在 MS 培养基中添加 BAP 也能诱导愈伤组织分化芽。而 Rosu 等^[24]则以增殖的无菌丛生芽为外植体,在含 BA 和 NAA 的培养基上直接再生了芽,当这些不定芽移至含 NAA、 GA_3 和硝酸银的培养基中,能诱导出丛生芽。另外,Ishioka 和 Tanimoto^[25]证明,在 MS 培养基中只添加硝酸铵,70%的外植体产生不定芽。Rout 等^[26]报道 GA_3 和 adenine sulfate 加速了再生芽的产生。表明以茎为外植体可能更适合于进行芽器官再生的诱导。

1.5 再生植株的生长特性

一般无菌苗移植到室外的成活率达 80%以上。通过芽快繁途径得到的植株或不经愈伤阶段直接起源于叶、根的植株,生长情况与对照相同,无变异发生。相反,来源于营养器官的愈伤组织再生的植株存在着 21.7%的变异,外植体若为合子胚的,再生植株的变异率高达 70%,变异性状体现在花瓣的数量、形状和颜色以及植株的生长高度上^[27]。Van der Salm 等^[14]对 13 个再生植株的研究,发现其中 12 株的倍性与对照一致都是二倍体,但其中有 1 株的叶色变为嵌合色,六倍体变异率为 1/13。表明由营养器官愈伤组织再生得到的植株大多有变异现象。

2 月季的遗传转化研究

高效的植株再生体系是遗传转化成功与否的重要前提条件。目前,已有许多月季品种通过器官发生和体细胞胚发生途径成功地获得再生植株,但关于月季遗传转化的报道还不多,除 Van der Salm 等

采用不定根作为转化受体外,其它所有转化系统都采用了胚性愈伤组织^[28,29]或体细胞胚^[30,31]进行转化。1991年 Firoozabady 等^[32]首次成功地进行了农杆菌介导的月季转化。他们以 *R. hybrida* cv. Royalty 为供试材料,将其胚性愈伤与含有 pnos NPT II /p35S LUC 质粒的致瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 或与含有 pnos NPT II /p35S GUS 质粒的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenesis*) 15834 共培养,得到了很高转化愈伤频率,即每克愈伤约产生 40~60 个独立的抗卡那霉素愈伤,通过 LUC 或 GUS 和 PCR 技术检测,几乎 100%的抗性愈伤为转化体。次级体细胞胚和胚性愈伤组织因能长期保存,不断提供丰富的材料,而且再生能力持久,成为目前主要的受体材料,之后通过抗性体细胞胚或胚性愈伤组织的再生获得转化植株。唯一例外的是 Van der Salm 等^[33]采用 *R. hybrida* cv. Moneyway 节间组织与农杆菌在诱根培养基上共培养,得到转化的不定根,再经 12 个月从转化的不定根上诱导出胚状体,最终长成植株。农杆菌菌株及质粒种类对转化影响不大,根癌农杆菌 LBA4404 或发根农杆菌 15834 的转化效率无显著差异^[28],根癌农杆菌 GV3101、EHA105 和 GV2260 也都有成功报道,但农杆菌的预培养及共培养时间对转化效率有一定影响。Dohm 等^[34]报道使用根癌农杆菌 EHA105 和 GV2260 时,摇菌时间不应超过 2 h,共培养时间分别为 2 d 和 6 d。共培养的结果得到再生的转基因植株。2004 年, Kim 等^[35]将绿色荧光蛋白基因运用农杆菌介导法成功转化月季,并得到 Southern 杂交分析验证。以上结果表明农杆菌菌株及质粒种类对转化影响不大,但农杆菌的预培养及共培养时间对转化效率有一定影响。

除农杆菌介导法外,基因枪法也被应用于月季的转化。影响月季基因枪法遗传转化的因素有:发放距离(终止屏和目标组织之间的距离)、裂盘压力、调节渗透压的渗透物质以及渗透物加入的时间等。Marchant 等^[36]研究指出当发放距离为 70 mm 时,GUS 检测达到最高,而当发放距离大于 100 mm 时未检测到 GUS 表达。当裂盘压力为 9 000 kPa 时 GUS 表达最高。3 种渗透物质肌醇、山梨醇(含甘露醇)、蔗糖的比较表明,于 EP 培养基中加肌醇 0.25 mol/L,GUS 表达量高于轰击后 48 h 加 2 倍的肌醇。在轰击前 4 h 加肌醇和轰击后 24 h 加肌醇最有利于基因的转入。Marchant 等指出转入的片段整合到月季基因组的位置对转基因植株基因表达的

影响比转入片段数目的影响更重要。Marchant 等以胚性愈伤组织细胞为对象,通过转化 GUS 报告基因,将基因枪法的转化条件进行了优化。同年, Marchant 等利用基因枪法成功地几丁质酶基因导入月季,减少黑斑病发生率 13%~43%。利用基因枪法成功转化月季关键是携带 DNA 的微粒有效穿入目标组织。

月季遗传转化中 PEG 介导法也广泛应用。影响 PEG 介导法的因素有原生质体分离所用的复合物、植物材料来源和基因型、细胞悬浮预培养条件、外源 DNA 等。Schum 等^[37]研究了影响月季原生质体分离和转基因植株再生的因素,结果表明 1.5% 纤维素酶,0.5% 粗制纤维素酶和 0.5% 解析酶的复合物,分离不同月季基因型离体培养的芽和愈伤组织、非胚发生和胚发生的悬浮培养细胞中的原生质体效率最高,原生质体的产量很大程度上取决于材料来源和基因型,从叶肉提取原生质体可降低体细胞自身变异对基因转化的影响。多数情况下,非胚及胚发生的细胞悬浮培养物是分离原生质体的优选

材料。特殊的预培养条件,如培养基中生长素的类型,悬浮生长周期中的合适阶段,材料培育中的光照条件,都是成活的原生质体获得高且一致的萌发率所不可缺少的。

3 结 语

月季再生体系的建立和遗传转化的研究在国外有不少报道。但其中体细胞胚植株再生率和遗传转化率低;花色、抗病、延长衰老的研究还很少。由于月季基因转化存在以上特点及问题,因此,以后的研究重点应该通过改变一些培养基成分和培养条件,来提高分化再生频率,并应用分子生物学手段,探索不同基因型、不同类型月季之间分化和转化条件存在较大差异的分子机理,从根本上提高各种基因型月季的分化和再生频率。

月季原产我国,且拥有许多优良种质资源和基因资源,通过建立月季再生体系,利用遗传转化技术进行月季遗传改良,完全可能培育出具有商业价值和自主知识产权的新月季品种。

参考文献:

- [1] HILL G O. Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose[J]. *Nature*, 1967, 216: 596.
- [2] ROUT G R, SAMANTARAY S, MOTTLEY J, *et al.* Biotechnology of the rose: a review of recent progress[J]. *Sci. Hort*, 1999, 81: 201-228.
- [3] QIU W D. Rose product technology[M]. 北京: 农业出版社, 2001: 150-151.
- [4] Elliott R F. Axenic culture of meristem tips of *Rosa multiflora* [J]. *Planta*, 1970, 95: 183-186.
- [5] ZIESLIN N, HALEVY A H. Components of axillary bud inhibition in rose plants. I. The effect of different plant parts correlative inhibition[J]. *Bot. Gaz.*, 1876, 137: 291-296.
- [6] BRESSAN P H, *et al.* Factors affecting *in vitro* propagation of rose[J]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1982, 107(6): 979-990.
- [7] BI Y J. The plant growth regulator cultivates to germinate and the bud influence in rose plants[J]. *Hebei Agriculture Normal University of Science & Technology* (河北农业科技师范大学), 1996, 10(4): 37-40 (in Chinese).
- [8] C A M MARCELIS-VAN ACKER, H J SCHOLTEN. Development of axillary buds of rose *in vitro* [J]. *Scientia Horticulture*, 1995, (63): 47-55.
- [9] BI Y J. Plant growth regulator to stem influence in rose plants[J]. *Hebei Agriculture Normal University of Science & Technology* (河北农业科技师范大学), 1994, 8(3): 26-29 (in Chinese).
- [10] LIN Y H. Tube plantlets reproduce research in rose plants[J]. *Gansu Agricultural Science and Technology* (甘肃农业科技), 1994, (1): 36-37 (in Chinese).
- [11] MARTIN C, CARRE M, VERNY R. La multiplication vegetative *in vitro* des vegetaux ligneux cultivés: CAS des Rosiers[J]. *Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris III)*, 1981, 293: 175-177.
- [12] LLOYD D, ROBERTS A V, SHORT K C. The induction *in vitro* of adventitious shoots in *Rosa* [J]. *Euphytica*, 1988, 37: 31-36.
- [13] ROUT G R, DEBATA B K, DAS P. Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora [J]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1991, 27: 65-69.
- [14] VAN der SALM TPM, VAN der TOOM CJ G, HANISCHTEN C H, *et al.* Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the root stock *Rosa hybrida* cv. Money Way [J]. *Plant Cell Rep.*, 1996, 15: 522-526.
- [15] VALLES M, BOXUS P H. Regeneration from *Rosa* callus [J]. *Acta Hort*, 1987, 212: 691-696.
- [16] ZHEN Y M, MA Y, LIU Q L. Advances on genetic transformation of *Rosa* [J]. *Journal of Chinese Biotechnology*, 2003, 23(2): 79-82.

- [17] MURALI S, SREEDHAR D, LOIESWARI T S. Regeneration through somatic embryogenesis from petal derived calli of *Rosa hybrida* L. cv Arizona (hybrida tea)[J]. *Euphytica*, 1996, 91: 271—275.
- [18] DE WIT J C, ESENDAM H F, HORKAMEN J J, et al. Somatic embryogenesis and regeneration of flowering plants in rose[J]. *Plant Cell Rep.*, 1990, 9: 456—458.
- [19] KORBAN S S. Somatic embryogenesis in rose; gene expression and genetic transformation[J]. *Plant Cell Monographs*, 2006, 9: 247—255.
- [20] KUNITAKE H, IMAMIZO H, MII H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rose[J]. *Plant Sci.*, 1993, 90: 187—194.
- [21] KINTZIOS S, MANOS C, MAKRI O. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.)[J]. *Plant Cell Rep.*, 1999, 18: 467—472.
- [22] TWADDLE D, ROBERTS A V, SHORT K C. *In vitro* culture of roses[M]. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1994: 529—530.
- [23] ARENA L, PELLEGRINO C, GUDIN S. A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* cv. Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues[J]. *Euphytica*, 1993, 71: 83—92.
- [24] ROSA A, SKIVIN R M, BEIN A, et al. The development of putative adventitious shoots from a chimeral thorn less rose (*Rosa multiflora* Thurb. ex J. Murr.) *in vitro*[J]. *J. Hort. Sci.*, 1995, 70: 901—907.
- [25] ISHIOKA N, TANIMOTO S. Plant regeneration from Bulgarian rose callus[J]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1990, 22: 197—199.
- [26] ROUT G R, DEBATA B K, DAS P. Somatic embryo genesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora[J]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1991, 27: 65—69.
- [27] LI X, KRASNYANSKI S F, KORBAN S S. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa* [J]. *J. Plant Physiology*, 2002, 159(3): 313—319.
- [28] FIROOZABADY E, MOY Y, COURTNEY GUTTERSON N, et al. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryonic tissue[J]. *Biotechnology*, 1994, 12: 609—613.
- [29] LI X Q, KRASNYANSKI S F, KORBAN S S. Optimization of the indigene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40: 453—459.
- [30] DOHMA, LUDWIG C, SCHILLING D, et al. Transformation of roses with genes for antifungal proteins[J]. *Acta Horticulture*, 2001, 547: 223—234.
- [31] KIM C K, CHUNG J D, PARK S H, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein (GFP) gene[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 78: 107—111.
- [32] FIROOZABADY E, LEMIEUX C S, MOY Y S, et al. Genetic engineering of ornamental crops[J]. *In Vitro*, 1991, 27: 96.
- [33] VAN DER SALM TPM, VAN DER TOORN CJG, BOUWER R, HÄNISCH TEN CATE CH, DONS HJM. Production of *Rol* gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability[J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 39—47.
- [34] DOHM A, LUDWIG C, SCHILLING D, DEBENER T. Transformation of roses with genes for antifungal proteins[J]. *Acta Horticulturae*, 2001, 547: 27—34.
- [35] KIM C K, J D CHUNG, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein (GFP) gene[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 78: 107—111.
- [36] MARCHANT R, DAVEY M R, LUCAS J A, LAMB C J, DIXON R A, POWER J B. Expression of a chitinase transgenic in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of black disease (*Diplocarpon rosae* Wolf)[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 187—194.
- [37] SCHUM A, HOFMONN K, GHALIB N, et al. Factors affecting protoplast isolation and plant regeneration in *Rosa*[J]. *Garten Bauwissenschaften*, 2001, 66(3): 115—122.