

生菜生物技术育种研究进展

付雅丽¹,牛瑞生^{1*},樊建英¹,赵璇¹,王虎¹,刘铁铮²

(1. 石家庄市农业科学研究院 蔬菜研究室,河北 石家庄 050041;2. 河北省农林科学院 石家庄果树研究所,河北 石家庄 050061)

摘要:从分子遗传图谱的构建、遗传转化、基因工程改良以及生菜的原生质体培养等几个方面对国内外生菜分子育种取得的进展进行了综述,对存在的问题进行了分析,并对生物技术在生菜育种上的应用前景进行展望。

关键词:生菜;生物技术;育种;进展;组织培养;分子标记

中图分类号:S636.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8581(2007)10-0094-02

Research Advance of Biotechnology Breeding of Lettuce

FU Ya-li¹, NIU Rui-sheng^{1*}, FAN Jian-ying¹, ZHAO Xuan¹, WANG Hu¹, LIU Tie-zheng²

(1. Laboratory of Vegetable, Shijiazhuang Academy of Agricultural Sciences, Shijiazhuang 050041, China;

2. Shijiazhuang Fruit Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: The research advance of molecular breeding for lettuce at home and abroad was reviewed, including construction of molecular linkage map, genetic transformation, genetic engineering and protoplast culture. The existent problems and prospects were also presented.

Key words: Lettuce; Biotechnology; Breeding; Advance; Tissue culture; Molecular marker

生菜(*Lactuca sativa* L.)属菊科莴苣属莴苣种中的叶用类型,是叶用莴苣的俗称,为一、二年生草本植物,原产地中海沿岸。由野生种驯化而来。生菜极富营养,含有抗氧化物、胡萝卜素及维生素 B₁、B₂、B₆ 和 V_C、V_E,它还含有丰富的微量元素,如钙、磷、钾、钠、镁及少量的铜、铁、锌,此外,还富含膳食纤维,茎叶的乳状汁液还含有大量有机物,如糖、有机酸、蛋白质、苦苣素等。常吃生菜能改善胃肠的血液循环,促进脂肪和蛋白质的吸收。科学家最近发现,球形生菜中含有一种对胃癌、肝癌、大肠癌、膀胱癌、胰腺癌等有明显抑制作用的原儿茶酸物质。

生菜育种以往都是采用常规方法,即不同形态或类型间杂交,然后自交,在以后自交代中依据各个性状进行综合选择。生菜几乎没有明显的杂种优势,即使有一定的杂种优势,也由于其花器官甚小,杂交技术难度大,很难应用于生产。因而,生产上推广的品种中很少采用杂交一代。近20年来,随着生物技术的飞速发展,生菜育种方法也由传统的育种手段向现代分子育种方法迈进,并且在某些方面已经取得了很大成就。

1 种质资源与分类

种质资源是蔬菜遗传育种和品种改良的基本材料,目前,我国国家蔬菜种质资源库收集和保存叶用莴苣种质资源200余份,为生菜新品种的选育提供了物质基础。

莴苣属是菊科中的一个属,染色体数 $2n = 2x = 18$ 。叶用莴苣按植物学分类可分为3个变种:皱叶莴苣(*var. crispa* L.)叶片深裂,叶面皱缩,不结球;直立莴苣

(*var. romana* Gars.)叶狭长直立,全缘或稍有锯齿,一般不结球或卷心呈圆筒形;结球莴苣(*var. capitata* L.)顶生叶形成叶球,叶球呈圆球形或扁圆球形叠抱,整叶包住全球,叶长达叶球基部,又可分为脆叶结球、软叶结球两种。脆叶结球类型叶球大、脆嫩、结球紧实、不易抽薹;软叶结球类型叶球小、松散、质地柔软、生长期短,在高温长日照下易抽薹。

2 生物技术在生菜育种中的应用

2.1 分子遗传图谱的构建 遗传图谱是植物遗传育种及分子克隆等许多应用研究的理论依据和基础,高密度分子遗传图谱的构建有助于利用与重要基因紧密连锁的分子标记辅助育种,有助于 QTL 定位研究,有助于比较基因组学研究及重要功能基因的克隆。M. Jeuken^[1]等利用 *Lactuca sativa* × *Lactuca saligna* 杂交所得的 F₂ 代作为作图群体,利用 AFLP 技术构建了完整的生菜分子遗传图谱,整合后的图谱包含 476 个 AFLP 标记和 12 个 SSRs 标记。该图谱主要由 9 个连锁群构成,覆盖基因组总长度的 854 cM,平均图距 1.8 cM,最大图距 16 cM。该图谱有助于生菜 QTL 定位研究和分子标记辅助选择。

2.2 遗传转化体系的建立及基因工程改良 目前在生菜上的转基因方法有农杆菌介导法和电激法^[2]等,其中农杆菌介导法为主要的的方法。稳定的植物组织和细胞培养再生系统是利用农杆菌介导转化法进行植物转基因研究的重要前提。Michelmores R.^[3]1987 年报道了生菜的一个转基因系统,但转化株频率仅为 10% 左右,且程序

较复杂。刘凡等^[4]1996年研究表明,生菜大湖366以采用MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA的诱芽培养基为宜;对抗生素敏感性试验表明,100 mg/L的卡那霉素浓度是较严格的转化体筛选浓度。邓小莉等^[5]以散叶生菜大速生的子叶为外植体,确定了生菜高效诱芽培养基为MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA,出芽率最高为65%。抗生素敏感性试验表明,筛选培养基中适宜的潮霉素选择压为20 mg/L,抑菌剂羧苄青霉素的适宜质量浓度为300 mg/L。

近几年,通过农杆菌介导对生菜进行了许多的基因工程改良工作。随着现代生物技术的发展,人们试图把植物作为一种生物反应器,生产药用蛋白、抗体和疫苗。年洪娟等^[6]将胸腺肽基因(thy)导入生菜使其表达,以期培育出可生食的具有保健功能的转基因蔬菜。通过PCR和Southern杂交分析证明,胸腺肽基因已经整合到生菜基因组中。RT-PCR检测初步表明,胸腺肽基因可以在生菜中正常转录。邓小莉等^[5]通过根癌农杆菌介导的叶盘法将携带O型和A型口蹄疫抗原决定簇融合基因O₂₁-O₁₄-A₂₁-HBcAg转入大速生散叶生菜,对部分抗性植株进行PCR和PCR-Southern杂交检测,证实目的基因已经成功整合到生菜基因组中。RT-PCR检测初步表明,O₂₁-O₁₄-A₂₁-HBcAg基因可以在生菜中正常转录表达。李兴涛等^[7]将含有高赖氨酸蛋白基因的植物表达载体用农杆菌介导法进行遗传转化,获得47株转基因生菜植株。PCR和Southern-Blotting杂交检测证实,目的片段在T₀代的整合,RT-PCR检测表明目的基因的转录。左晓峰等^[8]用根癌土壤杆菌介导的叶盘法,将人小肠三叶因子(hITF)基因导入生菜中,在含有除草剂的培养基上筛选,获得抗性植株。通过PCR和Southern印迹分析证明,hITF cDNA已整合到生菜基因组中。Western印迹分析证明,hITF在生菜中的表达。ELISA检测表明:hITF在生菜新鲜叶片中的表达量最高达700 ng/g,约占总可溶性蛋白0.1%。有望培育出对胃溃疡有防治作用的保健型蔬菜。新加坡研究人员成功地将一种能生成白藜芦醇的红葡萄基因移植到了红叶生菜中,白藜芦醇在红葡萄酒中含量较高,研究表明,它可以有效降低有害胆固醇含量,提高有益胆固醇含量,并可起到预防癌症的作用。韩国庆尚南道真州市的庆尚大学教授研究组与真州产业大学教授研究组合作开发出一种可治疗糖尿病、中风的生菜。该生菜是从分解血栓的微生物枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)向生菜中注入溶解血栓基因(又名BB-kinase),从而栽培出的新型蔬菜。日本一家研究所将大豆中的铁蛋白基因植入生菜细胞中成功培育出一种可预防贫血的转基因生菜,生菜中的维生素C含量高,有利于吸收铁质。

2.3 生菜的组织培养 我国生菜的组织培养是在20世纪80年代开始的,李鹏飞等^[9]人首次报道了结球生菜莴

苣品种“New York 515”的组织培养研究情况,随后钟仲贤^[10]、刘选明^[11]等人相继报道了莴苣其他品种的组织培养情况。不少研究工作者对生菜组织培养的影响因素作了探讨。多数研究结果表明,外植体类型、基因型及植物生长调节剂对诱导生菜植株再生有显著影响。高辉^[12]等建立了下胚轴离体培养体系,通过由愈伤组织分化不定芽途径获得再生植株,分化频率高达100%。Xin-run and Conner^[13]研究表明,生菜的基因型对其再生率的影响较大,不同基因型的生菜芽的再生所需激素种类和浓度不同。周音等^[14]有研究表明,AgNO₃是良好的乙烯抑制剂,与ABA配合使用可明显抑制愈伤的产生,大大促进生菜不定芽的直接再生。

利用原生质体融合技术可以克服有性杂交障碍将野生种的抗性基因转入到栽培品种中。20世纪90年代,日本长野县蔬菜花卉试验场融合了莴苣的栽培种和野生种的细胞,培育出了抗软腐病莴苣。莴苣属野生种*L. virosa*高抗蚜虫,Matsumoto^[15]等用电融合法诱导栽培莴苣和*L. virosa*原生质体融合,获得了21个再生植株,利用同工酶和染色体分析证明这些再生植株为种间杂种,都具有正常的花,但不育。要育成完全可育的带有抗性性状的莴苣品种,还需要将获得的体细胞杂种与栽培品种进一步回交,以纯化性状。

3 存在的问题及展望

目前,由于国内叶用莴苣生菜新品种选育工作正处于起步阶段,具有自主知识产权的品种和类型很有限,我国现有的栽培品种主要靠引进国外已有品种。有研究表明,生产上栽培的同一类型间生菜的亲缘关系较近,遗传背景狭窄,因此,需要多角度、多方法开展种质资源的创新工作,开发出品质优良的生菜新品种,来满足当前生菜生产上的需要。

生菜生物技术育种仍停留在研究阶段,而且研究还不够深入。还应该加强基因定位、分子标记方面的研究,加快育种的进程。Mecabe MS^[16]等认为,转基因生菜没有进入市场是因为外源基因在生菜中表达和遗传不稳定,推测可能的原因首先是与生菜种的特异性有关。

基因工程在蔬菜遗传育种、品质改良上的应用前景是十分乐观的,目前许多国家为了鼓励和推动生物技术的发展,已经制定和采取了一些新的有利政策及措施。生菜的转基因工程虽然取得了许多的成果,但仍然存在许多不容忽视的问题,如转化率低、结果不稳定等,因此,我们还要不断加强基础研究工作,并解决好基因工程与常规育种的关系,使其尽快转化为生产力。

参考文献:

- [1] M. Jeuken, R. van Wijk, J. Peleman, et al. An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* × *L. saligna* F₂ populations[J]. Theor Appl Genet, 2001, (103): 638~647.

2.3.2 7号菇房 采用菇条配方2进行栽培,2006年3月27日脱袋覆土,4月27日开始收菇,至6月21日,两潮菇共收菇356.4 kg,生物学效率为25.5%。

3 小结与讨论

在冬季自然温度(2006年1月至3月平均日夜温差是7.4℃,平均最高温度是20.1℃,平均最低温度是12.7℃)低于巨大口蘑生长的最适温度(最适温度是27~32℃)的粤北山区南缘,用简易的加温方法(半地下式煤炉加温)和简易的通风(塑料薄膜通气管)方法,可实现全年栽培巨大口蘑。

用小麦粒培养基制种可缩短生产周期,而且用其直接接种菇条,可提前5 d发菌,菇条生长期可缩短到40 d以下。

用新鲜稻草(菇条配方1)栽培比用草菇废料(菇条配方2)栽培的产量高、质量好,室外、室内栽培的结果都是如此。虽然,7号房由于后期电源线被盗,造成无法定时通风,故产量较低,但无论从菇的长势、菇的生长密度,还是从菇的质量来看,8号房明显优于7号房。造成这种情况,是由于废稻草中适合金福菇生长要求的有关营养成分缺乏?或是由于草菇生长的代谢产物抑制巨大口蘑的生长,有待进一步探讨。

巨大口蘑在出菇生长阶段,需较大的通风量。在自然通风的室外栽培,均比室内产量高。在室内8号菇房栽培,虽然温度、湿度均控制得较好,但室内两潮菇的产

量都比不上室外一潮菇的产量。说明在上述室内栽培时,每2 h通风10 min还不够,加大通风量势必影响温、湿度的调控。故冬、春季节需进行室内栽培时,还需对工艺条件作进一步的试验研究。

在粤北山区南缘,尽管在2006年1月上旬,连续7 d出现低于10℃,最低为4.1℃的气温条件,但仅将已出一潮菇的菇条用塑料薄膜覆盖,菌丝都能顺利越冬,甚至在3月上旬曾出现过日夜温差达16.3℃的情况(最高21.8℃,最低5.5℃),但这些菌丝的生长仍未受之影响。

参考文献:

- [1] 陈士瑜. 珍稀菇菌栽培与加工[M]. 北京:金盾出版社,2003.
 - [2] 上海农业科学院食用菌研究所. 中国食用菌志[M]. 北京:中国农业出版社,1991.
 - [3] 中国食用菌商务网,食用菌市场杂志. 中国食用菌商务指南[M]. 食用菌市场杂志出版社,2003.
 - [4] 孔祥君,等. 中国蘑菇生长[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
 - [5] 李国贤,等. 珍稀食用菌的开发[M]. 上海:上海教育出版社,2004.
 - [6] 汪昭月,等. 食用菌栽培指南[M]. 北京:金盾出版社,2003.
 - [7] 郑国扬,等. 中国草菇生长[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
 - [8] 黄年来. 18种珍稀美味食用菌栽培[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
 - [9] 蔡衍山,等. 食用菌无公害生长技术手册[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- (上接第95页)
- [2] Chupeau MC, Bellini C, Guerche P, et al. Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplast[J]. Bio-technology, 1989, (7):503~508.
 - [3] Richard M, Ellen M, Susan S, et al. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Reports, 1987, (6):439~442.
 - [4] 刘凡,李岩,曹鸣庆. 高频率生菜植株再生及转化体系的建立[J]. 华北农学报, 1996, 11(1):109~113.
 - [5] 邓小莉,周岩,常景玲. 生菜遗传转化体系的建立及转基因研究[J]. 云南植物研究, 2007, 29(1):98~102.
 - [6] 年洪娟,刘玲,杨淑慎,等. 胸腺肽基因转化生菜及其表达的研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(7):1085~1088.
 - [7] 李兴涛,李霞,张金文,等. 高赖氨酸蛋白基因在转基因生菜中的表达和遗传转化[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(4):472~475.
 - [8] 左晓峰,张晓钰,单龙,等. 人小肠三叶因子(hITF)基因在生菜中的整合与表达[J]. 植物学报, 2001, 43(10):1047~1051.
 - [9] 李鹏飞,郭碧霞. 结球莴苣顶芽及叶片组织培养[J]. 华南农学院学报, 1980, 1(3):39~42.
 - [10] 钟仲贤. 结球生菜的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1988, (6):37~38.
 - [11] 刘选明. 结球生菜叶片器官发生的研究[J]. 湖南农学院学报, 1990, 1(3):233~240.
 - [12] 高辉,荀晓松,邓运涛,等. 生菜(*Lactuca sativa* var *romana* Hort.)下胚轴愈伤组织的诱导与植株再生[J]. 四川大学学报, 2002, (4):25~27.
 - [13] Xinrun Z, Conner AJ. Genotypic on tissue culture responses of lettuce cotyledons[J]. J. Genet Breed, 1992, (46):287~290.
 - [14] 周音,张智奇,张建军,等. 生菜遗传转化过程中克服玻璃苗的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(2):62~64.
 - [15] Matsumoto E. Interspecific somatic hybridization between lettuce (*Lactuca sativa*) and wild species *L. virosa* [J]. Plant Cell Reports, 1991, (9):531~534.
 - [16] Mecabe MS, Schepers F, Arend AVD, et al. Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a *petE* promoter-bar gene compared with a CaMV 35s-bar gene[J]. Theor Appl Genet, 1999, (99):587~592.