

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2013)06-0370-04

综 述

马铃薯转基因技术与应用

邢 铮¹, 秦玉芝^{1,2*}, 潘 妃¹, 曹 可¹, 王利群³, 贺热情³(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省马铃薯工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128;
3. 植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410082)

摘 要: 马铃薯转基因技术在马铃薯种质资源创新、生理机制研究中占有重要地位。目前应用于马铃薯的基因转化方法主要有基因枪法、微束激光法和农杆菌介导法。随着马铃薯转基因技术的发展, 相继获得了一批抗病毒、真菌、细菌性病害的种质资源, 并在基因功能研究材料创新上取得进展, 研究马铃薯的抗性机制, 开展马铃薯基因的功能研究将会成为趋势。

关键词: 遗传转化; 再生体系; 种质资源

Application and Technology of Potato Transformation

XING Zheng¹, QIN Yuzhi^{1,2*}, PAN Fei¹, CAO Ke¹, WANG Liqun³, HE Reqing³

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Hunan Provincial Engineering Research Center for Potatoes, Changsha, Hunan 410128, China; 3. Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Developmental Regulation, Changsha, Hunan 410082, China)

Abstract: Potato transgenic technology plays an important role in germplasm enhancement and physiological mechanism research. Currently used potato genetic transformation methods include particle bombardment, micro-beam laser method and Agrobacterium-mediated transformation. With the development of potato transgenic technology, a number of anti-viral, fungal, bacterial diseases germplasm and some gene function study materials have been accessed, which will become a trend to research potato resistance mechanisms and gene function studies.

Key Words: genetic transformation; regeneration system; germplasm

马铃薯是世界上继小麦、水稻和玉米之后的第四大粮食作物。中国是世界上马铃薯生产第一大国^[1,2]。由于遗传背景狭窄, 传统的育种技术已难以承载马铃薯种质资源创新面临的巨大挑战^[3]。转基因技术经过短短30年的发展, 大大加速了农作物更新换代的速度及种植业结构的变革^[4], 利用转基因技术在马铃薯病虫害防治、改善品质、创新种质资源、生理机制研究等方面取得了很好的成果, 陆续培育

出了一些抗病抗虫的转基因新品种^[1], 而且利用转基因技术制造马铃薯基因突变体是进行马铃薯生理机制和信号传导研究的一条重要途径^[5]。

1 马铃薯转基因技术

转基因技术就是运用重组DNA技术将外源目的基因导入受体细胞或组织, 改变其遗传组成后产生物质及其后代的一整套技术。目前应用于马铃薯的

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题“马铃薯综合育种技术研究与新品种选育”(2012BAD02B05-8); 农业部马铃薯产业技术体系“南方冬作区稻田栽培”(CARS-10-P19); 公益性行业(农业)专项“南方丘陵旱地带状复合种植系统高产高效关键技术研究”(201203096); 2012年湖南省研究生科研创新项目(CX2012B299)。

作者简介: 邢铮(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事马铃薯逆境生理方面的研究。

***通信作者(Corresponding author):** 秦玉芝, 副教授, 主要从事逆境生理与蔬菜遗传育种方面的研究, E-mail: qyuz@163.com。

基因转化方法主要有基因枪介导转化法、微束激光穿刺转化法和农杆菌介导转化法。

1.1 基因枪介导转化法

基因枪介导转化法是一种依赖高速度的金属颗粒将外源基因引入活体细胞, 然后通过细胞和组织培养技术, 再生出植株的一种转化技术。基因枪成功地应用于植物基因转化, 具有无宿主限制、可控度高、操作简便迅速、受体类型广泛等优点, 但转化成本高、嵌合体比率大、遗传稳定性差。

李昌等^[6]在2002年应用基因枪法成功转化马铃薯‘费乌瑞它’: 将携带有 *Fmdvp1* 全长基因的质粒 pBI131SP1 用金粉作微弹轰击茎段, 获得马铃薯再生植株。检测分析证明已成功地将目的基因导入马铃薯基因组中, 且其 PCR 检测得出的转化率达 7.6%。

1.2 微束激光穿刺转化法

微束激光穿刺转化法是利用微束激光照射受体材料, 外源 DNA 便借助于细胞内、外渗透压差经穿刺小孔直接进入组织细胞。这一设想首先在动物和人的细胞中实验并取得成功^[7,8]。植物实验方面, 王兰岚等^[9]利用该技术首次获得了转基因小麦植株。

随后微束激光穿刺转化法被应用在马铃薯转化实验中。付道林等^[10]利用微束激光穿刺技术, 将菜豆 I 型几丁质酶基因导入马铃薯栽培品种, 来提高马铃薯对真菌性病害的抗性。郭志宏等^[11]用微束激光穿刺将 RNA 干扰载体导入马铃薯品种‘费乌瑞它’, 其 Southern-blot 检测结果显示外源基因导入的拷贝数在 2~4 之间, 这有别于农杆菌介导转化得到的转基因植株, 农杆菌转化的转基因植株一般以单拷贝为主的特点, 导入的外源基因是多拷贝的。

1.3 农杆菌介导转化法

农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌。人们将目的基因插入到经过改造的 Ti(诱瘤)质粒或 Ri(诱根)质粒 T-DNA 区, 借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合。农杆菌介导转化马铃薯的外植体包括叶片、茎段和试管薯薄片。用叶片作外植体进行转化的时间较早, 周壮志等^[12]用马铃薯叶片作外植体实现了 *Cry3A* 和 *Vhb* 基因向马铃薯的转化。该试验中对转化再生植株进行 PCR 和 DNA 印迹分析表明, 外源基因已整合到马铃薯基因组中, 且连续三代无性繁殖后转基因仍存在。白云凤等^[13]建立了一种无标记农杆菌介导转化

马铃薯叶盘的方法。在栽培品种‘紫花白’上的试验检测结果表明, 遗传转化效率可达 5.1%。

薯片作外植体也应用得较早, 并且越来越多的实验室倾向于使用薯片作外植体。朱青等^[14]所在的实验室在 2004 年用试管薯薄片作外植体将拟南芥低温诱导 *Cor15a* 的启动子成功转入马铃薯。再生植株的 PCR 检测和 PCR-Southern 鉴定结果证明, *Cor15a* 启动子已经成功地转入到马铃薯植株基因组中。该实验室至今仍然使用薯片作为外植体, 并有很好的技术经验积累。

随着实验技术的发展, 去除腋芽的马铃薯茎段被用作外植体, 且实验证明比叶片更适合侵染转化。辛翠花等^[15]进行的遗传转化体系的优化及转基因植株获得的实验, 以‘Desiree’叶片和茎段为外植体, 分别比较了不同转化条件对遗传转化效率的影响。结果表明: 以茎段为外植体, 预培养 2 d 后以 $OD_{600} = 0.5$ 的菌液侵染 10 min, 在加有 1.0 mg/L 反式玉米素(ZT-t)的 MS(加蔗糖 20 g/L)选择培养基上的遗传转化率最高, 其愈伤诱导率可达 80%, 芽分化率可达 70%。茎段材料的高分化率有助于提高转化阳性率。

农杆菌介导转化法的转化效率相比基因枪法略低, 但其对仪器设备要求较低, 反而在实际操作中得到了更多的应用。以上农杆菌介导实验所用的外植体、诱导培养基组成等总结于表 1。

2 马铃薯转基因技术在种质资源创新中的应用

2.1 抗病毒性病害资源创新

马铃薯因病毒侵染使其种性退化和严重减产, 而将病毒外壳蛋白基因转入马铃薯, 合成的无毒病毒外壳可以诱导产生过敏反应, 激发一系列防卫反应, 产生组织或全株抗性。

自首次报道转入烟草花叶病毒外壳蛋白基因的烟草和番茄具有抵抗病毒侵染的能力后^[16], 相继报道了转入马铃薯 X 病毒(PVX)、Y 病毒(PVY)、卷叶病毒(PLRV)外壳蛋白基因以及同时转入 PVX+ PVY 外壳蛋白基因的马铃薯株系^[17-21]。宋艳茹等^[22]将 PVY 外壳蛋白基因通过致瘤农杆菌介导转化马铃薯品种‘Favorita’、‘虎头’和‘克新 4 号’。试验结果表明: 转基因马铃薯植株染色体上整合有 PVY-CP 基因, 并且转基因马铃薯植株中 PLRV 增殖情况较未转入

表1 部分试验中农杆菌介导转化马铃薯所用外植体、培养基组成

Table 1 Explants and medium composition in some Agrobacterium-mediated transform experiments

外植体 Explant	愈伤诱导/预培养培养基 Medium of callus induction / pre-culture	芽分化培养基 Medium of shoot differentiation	根分化培养基 Medium of root differentiation
茎段 Stem	MS 20+1.0 mg/L ZT-t	MS 20+1.0 mg/L ZT-t	MS 30
叶片 Leaf blade	MS 20+1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L ZT-t	MS 20 +1.0 mg/L ZT-t	MS 30
叶片 Leaf blade	MS 30+0.25 mg/L NAA+2.25 mg/L 6-BA+10 mg/L GA ₃	MS 30+2.25 mg/L 6-BA+10 mg/L GA ₃	MS 30
叶片 Leaf blade		MS 30+0.02 mg/L NAA+0.02 mg/L GA ₃ +2.0 mg/L ZT-t	MS 30
试管薯薄片 Microtuber disc		MS 30+1.0 mg/L IAA+0.2 mg/L GA ₃ +0.5 mg/L 6-BA+ 2.0 mg/L ZT-t	MS 30

注: MS指基础MS培养基, MS 20指MS+20 g/L糖, MS 30指MS+30 g/L糖, 且均未标注琼脂和抗生素含量; 空白处表示该体系未进行此步操作。

Note: MS is based on MS medium. MS 20 means MS medium+20 g/L sucrose; MS 30 means MS medium +30 g/L sucrose; agar and antibiotics were unmarked. Blank indicates that the system does not perform this step.

基因的对照有所降低, 同时转基因马铃薯生长发育正常。南相日等^[23]用PLO(Poly -L-Ornithine)将外源PLRV-CP基因导入到‘大西洋’原生质体中, 获得了转化后代。蚜虫接种PLRV, 结果比对照明显抗PLRV, 说明PLRV-CP基因已经整合到马铃薯基因组中。

2.2 抗真菌性病害资源创新

转基因技术使植物获得抵抗真菌性病害能力的机理有: 降解真菌细胞壁; 阻碍真菌蛋白质合成; 渗透蛋白杀菌; 引起过敏反应^[24]。马铃薯真菌病以晚疫病为主。目前利用转入降解细胞壁物质基因来提高马铃薯抗晚疫病的能力。

李汝刚等^[25]将缺失C端信号肽序列的Osmotin和在第96位氨基酸处发生琥珀突变的Osmotin置于CaMV双35S启动子驱动下转化马铃薯, 获得NPT II抗性植株。且其研究表明: Osmotin蛋白的胞外分泌赋予转基因马铃薯叶片抗晚疫病的能力。李先平等^[26]通过根癌农杆菌介导, 用Harpin转化马铃薯四倍体品种‘大西洋’(Atlantic), 获得107个马铃薯转化株系, 其中7株的抗病性与对照相比差异极显著($P < 0.01$)。结果初步表明, Harpin已整合到马铃薯的基因组中并得到表达, 提高了植株的晚疫病抗性。

2.3 抗细菌性病害资源创新

马铃薯细菌性病害主要有青枯病、黑胫病、软腐病、环腐病、疮痂病和红芽病。其中青枯病的致

病机理是致病菌通过伤口侵入, 进入木质部并扩散至植物上部, 通过脂多糖识别寄主, 产生大量胞外多糖造成维管束堵塞, 分泌胞外蛋白酶降解细胞壁, 从而导致寄主植物快速萎蔫^[27, 28]。目前主要向马铃薯转入抗菌肽基因来提高抗细菌性病害能力。

贾士荣等^[29]将抗菌肽Cecropin B、Shiva A的单价基因Cecropin B、Shiva A及Cecropin B/Shiva A双价基因通过农杆菌介导法导入中国7个马铃薯主栽品种(系)中, 获得了1050个转基因株系。抗病性鉴定从75个株系中筛选得到了3个比起始品种抗病性提高1~3级、达到中抗的株系。邢小萍^[30]对马铃薯四倍体普通栽培种‘甘农薯1号’通过农杆菌介导转化抗菌肽Shiva A基因进行了初步研究, 环腐病菌接种实验初步测定表明转基因植株均具有一定的抗性。

2.4 基因功能研究材料创建

随着马铃薯基因组测序工作取得的进展, 马铃薯基因功能的研究也进入了一个崭新的阶段。2013年沈云龙等^[5]用pBI载体, 以‘鄂马铃薯3号’为受体, 通过农杆菌介导, 获得一批T-DNA插入突变体, 其中包含一个长薯形突变体株系。

3 转基因技术在马铃薯种质资源创新上的展望

随着转基因技术的发展, 现在的研究者在导入目的基因片段的同时, 越来越多地倾向于避免和减少不必要核酸片段进入受体植物, 这样不仅在一定

程度上保证了生物安全性问题,也能减少非必要核酸片段对试验的影响,提高了研究成果的可靠性和真实度。转基因技术在马铃薯种质资源创新上得到了很多的应用,在获得更多优质高效的品种的同时,研究马铃薯的抗性机制,以及开展马铃薯基因的功能研究将会成为未来的发展趋势。

[参 考 文 献]

- [1] 王永锋, 栾雨时. 马铃薯转基因研究进展 [J]. 中国马铃薯, 2004, 18(4): 227-231.
- [2] 王岩, 吴禹, 李兆波, 等. 种质资源创新与利用途径分析 [J]. 农业科技与装备, 2011, 5: 10-12.
- [3] 陈珏, 秦玉芝, 熊兴耀. 马铃薯种质资源的研究与利用 [J]. 农产品加工(学刊), 2010(8): 70-73.
- [4] 储成才. 转基因生物技术育种: 机遇还是挑战? [J]. 植物学报, 2013, 48(1): 10-22.
- [5] 沈云龙, 谢婷婷, 柳俊. 马铃薯薯形突变体T-DNA插入侧翼序列分析 [J]. 中国马铃薯, 2013, 27(3): 129-135.
- [6] 李昌, 金宁一, 王罡, 等. 基因枪法转化马铃薯及转基因植株的获得 [J]. 作物杂志, 2003(1): 12-14.
- [7] Tsukakoshi M, Kurata S, Nomiya Y, *et al.* A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery [J]. Appl Phys B, 1984, 35: 135-140.
- [8] Tao W, Wiikinson J, Stanbridge E J, *et al.* Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 4180-4184.
- [9] 王兰岚, 傅荣昭, 宋桂英, 等. 利用激光微束穿刺法将外源基因导入小麦的研究 [J]. 遗传学报, 1995, 22(5): 394-399.
- [10] 付道林, 王兰岚, 蓝海燕, 等. 将抗真菌病基因导入马铃薯的研究 [J]. 激光生物学报, 2000, 9(3): 189-193.
- [11] 郭志宏, 张金文, 陈正华, 等. 利用RNA干涉技术及微束激光转化法培育抗病毒马铃薯 [J]. 激光生物学报, 2006, 15(5): 525-531.
- [12] 周壮志, 周永刚, 何朝族, 等. *cry3A* 和 *vhb* 基因在转基因马铃薯中的表达 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(8): 741-745.
- [13] 白云凤, 张维锋, 白冬梅, 等. 一种马铃薯高效无标记转基因技术的建立 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(12): 2361-2365.
- [14] 朱青, 宋波涛, 柳俊, 等. 拟南芥低温诱导 *cor15a* 基因的启动子克隆及在转基因马铃薯中的表达 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 500-504.
- [15] 辛翠花, 郭江波, 黄三文, 等. 马铃薯 Desiree 遗传转化体系的优化及转基因植株的获得 [J]. 中国蔬菜, 2011(6): 15-21.
- [16] Powell A P, Nelson R S, De B, *et al.* Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene [J]. Science, 1986, 232: 738-743.
- [17] Homenway C, Fang R X, Kaniewski W K, *et al.* Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA [J]. EMBO J, 1988, 7: 1273-1280.
- [18] Hoekema A, Huisman M J, Molendijk L, *et al.* The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X [J]. Bio/Technology, 1989, 7: 273-278.
- [19] Farinelli L, Malno P, Collet G F. Heterogenous encamps ideation of potato virus Y strain O (PVY^O) with the transgenic coat protein of PVY rain N (PVY^N) in *Solanum tuberosum* cv. Bintje[J]. Bio/Technology, 1992, 10: 1020-1025.
- [20] Kawchuk L M, Martin R R, McPherson J. Resistance in transgenic potato expressing the potato leaf roll virus coat protein gene [J]. Mol Plant-Microbe Interact, 1990, 3: 301-307.
- [21] Lawson C, Kaniewski W, Haley L, *et al.* Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank [J]. Bio/Technology, 1990, 8: 127-134.
- [22] 宋艳茹, 马庆虎, 侯林林, 等. 转 PVY 外壳蛋白基因马铃薯及其田间试验 [J]. 植物学报, 1996, 38(9): 711-718.
- [23] 南相日, 刘文萍, 韩玉琴, 等. PLO 介导 PLRV-CP 基因转化马铃薯获转基因抗性植株 [J]. 黑龙江农业科学, 2004(3): 1-3.
- [24] 舒群芳, 孙勇如. 抗真菌植物基因工程的策略和进展 [J]. 植物学报, 1997, 39(1): 91-96.
- [25] 李汝刚, 伍宁丰, 范云六, 等. 表达 Osmotin 蛋白的转基因马铃薯对晚疫病的抗性分析 [J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 135-140.
- [26] 李先平, 何云昆, 陈善娜, 等. 表达 *HarpinEa* 基因的转基因马铃薯的晚疫病抗性分析 [J]. 云南农业大学学报, 1994, 15(2): 135-140.
- [27] Etchebar C, Trigalet-Demery D, van Gijsegem F, *et al.* Xylem colonization by an HrcV-mutant of *Ralstonia solanacearum* is a key factor for the efficient biological control of tomato bacterial wilt [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11, 869-877.
- [28] Vasse J, Frey P, Trigalet A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8, 241-251.
- [29] 贾士荣, 屈贤铭, 冯兰香, 等. 转抗菌肽基因提高马铃薯对青枯病的抗性 [J]. 中国农业科学, 1998, 31(3): 5-12.
- [30] 邢小萍. 抗菌肽基因导入马铃薯“甘农薯1号”的初步研究 [J]. 甘肃农业科技, 2004(11): 12-15.