

综 述

马铃薯基因转化的研究进展

双 宝 吕文河

(东北农业大学 哈尔滨 150030)

1 前 言

生物工程技术经过几十年的发展, 现在已经取得了长足的进展。其中植物的外源基因转化已经开始在作物遗传育种研究中得到了广泛的运用, 成为这一研究领域不可缺少的补充。据1993年10月份《日经生物技术》的一项报道, 美国、加拿大等15个国家到1992年已批准的重组植物野外试验数为864项。其中得到认可最多的试验对象为油菜290项, 其次是马铃薯133项, 接下来是烟草、番茄。

马铃薯是世界上主要作物之一, 继小麦、玉米和水稻之后排在第4位。它粮菜兼用、生育期短、单位面积产量高, 而且适应性强、营养丰富。又由于马铃薯组织、细胞培养再生植株较容易, 其外源基因转化的研究进展也较快, 生物技术在马铃薯育种中也已开始得到了实际应用。目前, 用来进行马铃薯基因工程的有用外源基因有抗病毒、抗细菌、抗昆虫的抗性基因; 用来改良马铃薯品质的淀粉合成基因以及蛋白质合成基因; 还有给马铃薯品种以抗除草剂能力的抗除草剂基因和其它一些基因。

本文将针对不同的外源基因来谈谈马铃薯基因工程近几年的研究进展。

2 马铃薯目的基因转化的进展

2.1 抗性基因工程

目前, 随着马铃薯加工业的不断发展, 对马铃薯生产提出了更高的要求, 但其产量仍受到许多因素的限制, 其中最明显的是病虫害。这些病害包括: 晚疫 (*Phytophthora infestance*)、环腐 (*Corynebacterium sepe-donium*)、黑胫 (*Erwinia carotovora* var. *atroseptica*) 和病毒侵染等。由于马铃薯栽培种具有同源四倍体遗传分离的特点, 并存在不完全育性, 所以用常规杂交育种很难在较短时间内育成具有抗性的优良品种。但新兴的基因工程技术, 通过外源基因转化方法, 向马铃薯栽培品种导入有效的抗性基因不断获得了具有抗性的新品种。

2.1.1 抗虫基因工程

通过基因工程技术, 将外源抗虫基因整合到马铃薯的基因组上, 并在植株进行有效表达, 使马铃薯自身能够合成具有杀虫效果的外源基因产物, 可以有效地抵御某些昆虫的危害, 达到防治的目的。目前已发现并用于植物抗虫基因工程的抗虫基因主要有二类: 一类是来源于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的 δ -内毒素 (δ -endotoxin) 基因; 另一类是来自一些高等植物的蛋白酶抑制剂 (因子) (Proteinase Inhibitor 基因, 简称PI基因)。

2.1.1.1 δ -内毒素基因

苏云金芽孢杆菌属革兰氏阳性菌, 它在形成芽孢的同时能产生伴孢晶体蛋白 (即 δ -内毒素), 称为前毒素。前毒素经昆虫消化道蛋白水解酶激活后, 能杀死鳞翅目和双翅目害虫的幼虫。

1993年 Sticklen 等报道^[1], 利用根癌土壤杆菌 (二元载体) 转化了马铃薯, 它含有编码苏云金芽孢杆菌变种 Kurstaki HD-73 晶体蛋白与新霉素磷酸转移酶 (NPT-II) 之间转译融合子的 DNA。在转基因植株中检测出了外源基因的整合与转录。转化植株上马铃薯麦蛾死亡率为 10%, 但其存活幼虫的食叶量却几乎与对照相同。转化植株里玉米螟的存活率明显地低于对照植株。

1994年 Gulina 等人^[2], 构建了修饰的苏云金芽孢杆菌 var. *tenebrionis* 晶体蛋白基因 (Bt77), 并将其克隆到质粒 p^{MON}505 中。将该二元转化载体导入含有不同的辅助脱毒 Ti 质粒 (解除武装的质粒) A281 和质粒 CBE21 的根癌农杆菌 LBA4404 菌株。用这些土壤杆菌菌株转化马铃薯 (栽培种 Desiree、Resy、Temp 和 Granat) 茎段, 在含卡那霉素培养基上筛选再生植株。通过 PCR 分析确证在植物基因组 DNA 中存在 Bt77 序列。在繁殖的转基因植株中研究了 Bt 基因的表达。Western 印迹分析显示, 转基因植株产生的 Bt 蛋白占总蛋白的 0.005~0.02%。在实验室条件下对这些植株叶组织抗科罗拉多马铃薯甲虫侵害的保护性进行了生物测定, 转化植株获得了对幼虫侵害的不完全保护。

2.1.1.2 植物蛋白酶抑制因子 (PI) 基因

植物蛋白酶抑制因子一般为 60~120 个氨基酸组成的多肽, 分子量为 8000~25000Da。能抑制昆虫蛋白酶 (Trypsin) 或胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) 的活

性, 从而使农作物有害昆虫得不到必需的营养而死亡。

1993年 Hilder 等报道^[3], 用半胱氨酸型蛋白酶抑制因子基因转化了马铃薯, 发现转基因马铃薯具有控制主要害虫之一的科罗拉多马铃薯甲虫 (CPB) 的潜在能力。1995年 Benčekroun 等用水稻色氨酸型蛋白酶抑制因子 (OCI) 基因转化了马铃薯^[4]。他们用 OCI 基因 cDNA 连到 CaMV35S 启动子上, 再通过农杆菌介导的方法转化了马铃薯品种 Kennebec 的叶片。在转基因植株的叶片中积累有效的 OCI, 其叶片提取物能抑制木瓜蛋白酶的活性, 还对 CBP 消化蛋白酶产生不完全的、但十分重要的抑制作用, 这种作用与纯的 OCI 相似。重组的 OCI 不改变马铃薯叶片内主要内源蛋白酶的活性, 看上去属于丝氨酸型。因此, OCI 的 cDNA 可用于创造抗 CPB 的马铃薯转化品种。

2.1.2 抗菌基因工程

目前用于植物基因工程的抗菌基因种类较多, 但在马铃薯转化的研究中应用的不多。最初有人发现, 杀菌肽-B (Cecropin-B) 和家禽溶菌对胡萝卜素软腐欧文氏菌各个亚种 (软腐病病原体) 有致死效应。1993年 Sindén 等报道^[5], 通过导入 Cecropin-B 和溶菌酶基因, 试图使马铃薯产生软腐病抗性。结果发现导入 Cecropin-B 基因作用较小或不起作用, 但表达水平为马铃薯总蛋白的 0.1% 时, 转化品系块茎里可存在 30~50 μ g/g (鲜组织)。在这水平上溶菌酶可对软腐病产生部分抗性。

1994年 Liu 等报道^[6], 将烟草渗透素 (Osmotin) 基因导入马铃薯, 在转化马铃薯中组成性表达渗透素 (约为细胞总蛋白的 2%)。转化植株叶片经致病疫霉孢子悬浮物接种后显示出病症发育的推迟。离体试验表明纯化渗透素对致病疫霉抗性更强。

2.1.3 抗病毒基因工程

马铃薯是无性繁殖作物, 是依靠薯块维持品种特性, 而正是这种特性导致病毒的积累, 引起品种退化, 产量逐代降低。

到目前为止, 还没有很有效的方法来防止病毒危害。通常采用农药喷施来控制传染病毒的昆虫, 从而保护马铃薯免受病毒侵染; 还可以用组织培养脱毒的方法。但农药喷施易造成环境污染, 组培脱毒成本高、工作量大, 而且最重要的一点是, 它们没有从遗传物质基础上给马铃薯品种以病毒抗性, 所以能维持的无毒有效期短。由于病毒的田间侵染, 几年或更短的时间内产量又开始降低。因此, 找到一种有效的马铃薯抗病毒育种途径已成为提高

其产量的重要研究课题, 而植物基因工程为此提供了一种新的手段。

2.1.3.1 外壳蛋白途径

利用病毒外壳蛋白 (CP) 基因获得抗性的尝试是以病毒的交叉保护作用为根据进行的。早期的工作认为其抗性机制是在外壳蛋白水平上抑制病毒颗粒脱壳, 使其不能进行复制, 这叫病毒外壳蛋白介导的抗性 (Coat Protein-Mediated Resistance, CPMR)。但后来随着工作的不断深入, 发现在这种抗性机制中不是外壳蛋白起作用, 而是它们的 RNA 转录体与入侵病毒之间的相互作用, 称之为病毒外壳蛋白 RNA 介导的抗性。马铃薯在这方面的新近研究成果如下表。

表 病毒外壳蛋白 RNA 介导的抗性研究进展

作 者	发表年	受体品种	导入基因	效 果	文献号
Newell et al	1991	Russet Burbank	PVX-CP PVY-CP	经 ELISA 和 Western 分析, 证明在转化植株中 PVX-CP 和 PVY-CP 的表达。	7
Attila et al	1992	Desirce 和 Gracia	PVX-CP	转化植株 PVX-CP 表达量很低	8
Del vas et al	1993	Huinknl-MAG	PLRV-CP	用带有 PLRV 的桃蚜侵染转化基因型, 一个月后发现有些植株的病毒病症较轻。	9
崔晓江等	1994	Favorita 和虎头	PLRV-CP PVX-CP PVY-CP	经 PCR 检测发现马铃薯的三价转化率为 20% 左右, 其它为一价或二价的转化株。	10
Pooggin et al	1994	Byclorusski-3	PVY-CP	转基因植株合成出了可检测的 PVY-CP。	11
Sokolova et al	1994	Byclorusski-3	PVY-CP	转基因植株低水平表达 PVY-CP RNA 和未检测到 CP 的转化植株有较强的 PVY 抗性。抗性主要归因于 PVY-CP RNA 的存在, 而不是 V-CP 的积累。	12

注: PVX—马铃薯病毒 X; PVY—马铃薯病毒 Y; PLRV—马铃薯卷叶病毒; CP—外壳蛋白。

使用转病毒的外壳蛋白基因方法培育出来的抗病毒植物比较安全。因为外壳蛋白本身没有毒性, 我们平日吃的马铃薯里就有这些病毒, 只是到目前为止我们还没有足够的证据证明这个方法能够解决所有种类的病毒危害。也许这种方法有一定的限度, 但是到目前为止我们还未曾发现它有什么副作用。

另一个问题是, 如果某种病毒的外壳蛋白能够装配虫传的它种病毒的 RNA 的话, 也许会发生危险。但目前有些研究发现病毒外壳蛋白的积累不是这种抗性的主要因子, 而是其 RNA^[12]。所以这种危险也可以通过表达调控来避免。

2.1.3.2 其它途径

除了外壳蛋白这一有效途径外, 近来还开创出了多种抗病毒基因工程的方法。

1993 年 Lodge 等报道^[13], 将美国商陆抗病毒蛋白的基因导入马铃薯和烟草中。结果, 表达抗病毒蛋白或双突变衍生体的转基因植株抗马铃薯 X 病毒、Y 病毒和黄瓜花叶病毒的侵染, 对机械传递和蚜虫传递均有效。他们还发现抗病毒蛋白在叶细胞内液中富集。抗病毒蛋白通过抑制侵染中的早期事件抗病毒病。这种基因的导入, 使通过一个外源基因转化获得多价病毒抗性成为可能。

同年 Truve 等报道^[14], 用大鼠 2'-5'-寡腺苷合成酶基因转化了马铃薯。然后在田间条件下对转化马铃薯进行马铃薯 X 病毒侵染。结果其叶片和薯块中的 PVX 浓度低于非转化对照, 在同样情况下, 也低于表达 PVX 外壳蛋白的马铃薯植株。

1994 年 Baulcombe 等报道^[15], 培育出了表达马铃薯病毒 X (PVX) 复制酶基因的转基因马铃薯植株, 并发现这些植株具有 PVX 抗性。同时表明其抗性机制不依赖于蛋白的表达, 转基因的 RNA 或蛋白产物的累积与抗性大小非线性相关, 其机制可能与细胞核外的协同抑制机制有关。将抗性原生质体与 PVX 和一个非相关病毒共培养, 第二种病毒的累积被抑制。

2.2 品质改良基因工程

2.2.1 淀粉改良

目前世界上约 3%~5% 的淀粉作物用于生产淀粉。2/3 的淀粉用于医药、食品和饮料生产, 另 1/3 用做造纸、包装、纺织和化工原料等。而马铃薯块茎中含 16%~22% 的淀粉, 是主要的产淀粉作物。

近年来, 随着植物生理生化和分子生物学研究的进展, 人们对淀粉生物合成途径中不同的酶及其在生化和分子水平上作用机理

的了解不断深化, 并可以利用基因工程的手段来改变淀粉合成途径, 以调节淀粉含量, 改良淀粉品质。

植物中存在的淀粉含量及其结构取决于三种淀粉生物合成酶: ADP—葡萄糖—焦磷酸化酶(ADP—Glc—PPase)、淀粉合成酶(SS)及淀粉分支酶(SBE)。这些酶含量及其特性的改变将影响合成淀粉的特性^[16]。

2.2.1.1 淀粉含量的提高或改变

1993 年 Salchuzaman 等报道^[17], 用携带木薯颗粒结合淀粉酶(GBSS, 蜡质蛋白)的根癌土壤杆菌转化野生型马铃薯克隆 K₈₉₂₀₀₂, 它是位于马铃薯 GBSS 启动子和胭脂碱合酶终止子间反义向融合。内源 GBSS 基因在这些转基因植株中的表达部分或完全受抑制。木薯反义基因对 GBSS 活性的完全抑制导致 GBSS 蛋白和淀粉酶的缺失, 形成几乎无淀粉酶的马铃薯淀粉。这表明, 可用异源基因在其它植物中产生反义效果。

运用此方法提高植物淀粉含量的报道最早是 1992 年^[18]。是 Stark 等人, 通过提高植物体内 AGPase 活性来实现这个目的的。他们使用了一个从突变的大肠杆菌 K₁₂ 株系而来的编码 AGPase 基因—g'gC₁₆。以 g'gC₁₆ 连接来源于拟南芥菜的 RuBP 羧化酶小亚基的叶绿体转运肽基因和 CaMV35S 启动子转化烟草, 烟草愈伤组织淀粉含量增加显著。但叶片中淀粉过量积累可能阻碍了能量物质蔗糖的向外运输, 导致植物体活跃生长部位碳源缺乏, 使转化植株只有在含蔗糖的培养基中才能正常生长, 而不能在土壤中存活。为克服这个困难, 同年 Heincke 等报道^[19], 他们把 CTP—g'gC₁₆ 基因接在块茎特异性表达的 patatin 启动子后, 获得了表型正常的转化马铃薯, 其块茎中淀粉含量比对照株平均增加 35%, 有些株系块茎淀粉含量甚至比对照高 60%。

目前人们正在研究新的细胞、器官特异

性的启动子以及叶绿体固定碳过程有关的转运蛋白基因, 并在马铃薯上已取得了一些进展^[19-22], 这将更有力地推动马铃薯提高淀粉含量的基因工程的研究。

2.2.1.2 淀粉结构的修饰

1994 年 Shewmaker 等人^[23], 利用一含 Patatin 启动子和小亚基羧化酶转运肽区的嵌合基因控制大肠杆菌糖原合成酶 ($g'g^A$) 在马铃薯品种 Russet Burbank 块茎淀粉质体中的表达。 $g'g^A$ 基因产物的表达率为总蛋白的 0.007%~0.028%。四个转化马铃薯品系的块茎比重降低, 淀粉百分率降低 30%~50%, 直链淀粉与支链淀粉的比率也降低。总可溶性糖含量提高 80%, 淀粉里的磷含量减少, 同时也检测到高度分支的支链淀粉组分。利用勃氏淀粉粘性测定仪和差式扫描量热法分析表明, 在转化马铃薯中产生了新型马铃薯淀粉。

1994 年 Krohn 等^[24], 也采用块茎组织特异性 Patatin 启动子, 使 Russet Burbank 马铃薯淀粉体表达大肠杆菌的糖原合成酶 (GS) 和糖原分枝酶 (GBE) 基因。GS 基因的表达使块茎淀粉含量、淀粉颗粒大小及直链淀粉含量和支链淀粉分枝点间的距离显著减小。淀粉粒状表型也急剧变化, 脐点消失。相反, 在大多数组织中 GBE 对淀粉含量和结构影响很小, 但支链淀粉含量略有提高。

2.2.2 其它

2.2.2.1 蛋白质方面

1994 年杨美珠等人^[25], 选用三个马铃薯栽培品种“85T-14-3”、“86-2”、及“Favorita”的块茎、微型薯和试管薯为起始材料, 应用根癌农杆菌 Ti 质粒系统成功地建立了一种快速、简便、频率高的转化体系。并同时把带有甜蛋白基因和胭脂碱合成酶标记基因的 Ti 质粒导入马铃薯, 获得大量转化植株。叶片抗性检测和 nopaline (胭

脂碱) 检测量阳性, 可推断甜蛋白基因已导入马铃薯基因组。

同年 Utsumi 等人^[26], 采用载体质粒 p^{RK2013} , 通过根癌农杆菌 LBA4404 介导转化马铃薯, 将正常型和改良型大豆球蛋白 cDNA 导入块茎薄壁组织细胞, 获得了转译产物。其产物部分与 Patatin 启动子调控的表达专一性一致, 两种大豆球蛋白的表达量为总可溶性块茎蛋白的 0.2%~1.0%, 在块茎中表达为 proglycinin 三聚物。

2.2.2.2 抑制块茎酶解褐变

马铃薯块茎的收后酶解褐变所引起的损失是其生产、加工和经营者值得注意的问题。1994 年 Bachem 等人^[27], 证明可以利用马铃薯块茎专一性多酚氧化酶 (PPO) 基因 (cDNA) 的表达反义抑制转化植株块茎的酶解褐变, 消除褐变导致的伤痕。用适当的启动子表达 PPO RNA, 能在马铃薯块茎中特定地抑制黑色素的形成, 转化马铃薯的块茎无擦伤敏感性和任何明显有害的副作用。这使不采用加热或抗氧化剂来防止多种食用作物酶解褐变成为可能。

2.3 抗除草剂的基因工程

目前在作物栽培中采用除草剂来消除杂草已经是现代化农业不可缺少的一种措施。但由于除草剂本身的特性, 多种情况下对所种植的作物也产生有害作用。所以选用适当的除草剂或使作物品种产生除草剂抗性也成为重要的研究课题。人们采用基因工程手段, 已培育出了具有特定除草剂抗性的多种作物。

1993 年 Perl 等人^[28], 将编码番茄细胞溶质 (Cyt) 和叶绿体定位 (Chl) 的 Cu、Zn-SOD (过氧化物歧化酶) 的两个 cDNA 分别克隆进双元载体质粒 P^{31A} 和 P^{T1} 中, 并导入到根癌农杆菌菌株, 再用这两个菌株感染马铃薯品种 Désirée 块茎盘, 并培养在含卡那霉素的选择培养基上。

转化植株 Southern 印迹试验证实了 Cyt 或 Chl-SOD 基因的整合。几个转化马铃薯品系对产生过氧化物的除草剂百草枯的耐性提高, 其中表达 Cyt-SOD 基因的品系根培养物耐高达 $10\ \mu\text{m}$ 的百草枯, 而 Chl-SOD 的耐性较低。

1994 年 Filho 等人^[29], 采用含有 bar 基因的双元质粒载体转化 cv. Mantiqueira (巴西马铃薯品种), 获得了在温室条件下对除草剂 Finale (20% a. i.; Hoechst) 具有抗性的转化植株。这里 bar 基因对具有非选择性除草剂 glufosinat 或 phosphinothricin 有抗性。在温室中设转化对照, 对 Finale (同样条件) 无抗性, 马上就死去, 而转化植株仍保持绿色。

3 结束语

马铃薯的基因工程研究, 虽然取得了一些进展, 而且正向应用性转化发展, 但仍受到以下两点限制。

(1) 理论限制: 分子生物学等基础理论学科的发展限制着基因工程的进一步发展。一方面植物基因表达与调控研究关系着外源基因在马铃薯当中有效表达与对马铃薯基因组的正常表达; 另一方面, 所能分离、鉴定并应用到马铃薯基因工程当中的目的基因有限, 这限制了人们有目的地改良马铃薯品种的各种进程。

(2) 技术限制: 由于基因转化技术的不够完善阻碍了对马铃薯有目的地改良。有些目的基因转化不够稳定, 甚至转化频率偏低, 还有表达水平上也不能顺利地产生目的产物等问题经常出现。

随着分子生物学等学科的进一步发展和转化技术的不断改进, 马铃薯的外源基因转

化将带来更高的经济效益和社会效益。

参 考 文 献

- 1 Sticklen M B et al. *Biotechnol Agric*, 1993, 233~236
- 2 Gulina I V et al. *Mol Biol (Moscow)*, 1994, 28(5): 1166~1175
- 3 Hilder V A et al. In: *Transgenic Plants*, 1993, 1:317~338
- 4 Benckekroun A et al. *Plant Cell Rep*, 1995, 14: 585~588
- 5 Sinden S L et al. *Acta Hort*, 1993, 336: 79~84
- 6 Liu D et al. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1994, 91(5): 1888~1892
- 7 Newell C A et al. *Plant Cell Rep*, 1991, 10:30~34
- 8 Attila F et al. *Plant Cell Rep*, 1992, 11:48~52
- 9 Del vas M et al. *Plant Physiol*, 1993, 102(1):174
- 10 崔晓江等. *科学通报*, 1994, 39(21):1992~1995
- 11 Pooggin M M et al. *Mol Biol (Moscow)*, 1994, 28(4):752~760
- 12 Sokolova M A et al. *Mol Bio (Moscow)*, 1994, 28(5):1002~1008
- 13 Lodge J K et al. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1993, 90(15): 7089~7093
- 14 Trure E et al. *Bio / Technology*, 1993, 11(9):1048~1052
- 15 Bawlbcombe D C et al. *J Cell Biochem*, 1994, Suppl-74
- 16 Preiss J et al. *J Cell Biochem*, 1994, Suppl 18A-120
- 17 Salchuzzaman S N I M et al. *Plant Mol Biol*, 1993, 23(5): 947~962
- 18 Stark D M et al. *Science*, 1992, 258:287~292
- 19 Heincke D et al. *Plant Physiol*, 1992, 100:301~308
- 20 Steege G V D et al. *Plant Mol Biol*, 1992, 20:19~30
- 21 Schulz B et al. *Mol Gen Gent*, 1993 238:357~361
- 22 Ricsmeier T W et al. *Plant Cell*, 1993, 5:1591~1598
- 23 Shewmaker C K et al. *Plant Physiol*, 1994, 104(4):1159~1166
- 24 Krohn B M et al. *Plant Physiol*, 1994, 105, 1, Suppl-37
- 25 杨关珠等. *植物学报*, 1993, 34(1):31~36
- 26 Utsumi S et al. *Plant Sci*, 1994, 102(2):181~188
- 27 Bachem C W B et al. *Bio / Technology*, 1994, 12(11):1101~1105
- 28 Perl A et al. *Theor Appl Gent*, 1993, 85(5): 568~567
- 29 Filho E S F et al. *Plant Cell Rep*, 1994, 13:666~670