

甘薯遗传转化及其抗病毒转基因研究进展

张磊^{1,2}, 邢国珍¹, 郑文明¹, 张振臣²

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 甘薯病毒病是影响甘薯生产的重要因素之一。传统的抗病育种由于缺乏抗源材料和育种周期长等原因不能满足生产需要, 转基因技术的发展为抗病毒甘薯的培育提供了新的途径。鉴此, 综述了近年来甘薯遗传转化及其抗病毒基因工程方面的研究进展。

关键词: 甘薯; 遗传转化; 抗病毒基因工程

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)06-0028-04

Genetic Transformation of Sweet Potato and Progress in Antiviral Transgenic Sweet Potato

ZHANG Lei^{1,2}, XING Guozhen¹, ZHENG Weiming¹, ZHANG Zhenchen²

(1. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Virus disease is a severe constraint in sweet potato production. Traditional breeding for disease resistance can not meet the requirement of production, due to lack of resistant material and demand for long breeding cycle. The development of transgenic technology provides a new way for breeding of antiviral sweet potato. This paper reviews recent research progress of genetic transformation and antiviral gene engineering of sweet potato.

Key words: Sweet potato; Genetic transformation; Antiviral genetic engineering

中国是世界上甘薯种植面积最大的国家, 2009 年种植面积约为 460 万 hm^2 , 占世界甘薯种植面积的 50% 以上^[1]。甘薯具有高产、耐旱等特性, 是保证我国粮食安全的底线作物, 同时也是新兴的能源作物^[2,3]。甘薯病毒病是影响甘薯生产的重要限制因素之一, 其危害可导致甘薯减产 20% ~ 57%^[4]。由于病毒对寄主植物的高度依赖性, 对于植物病毒病害目前尚无特别有效的化学防治药剂。种植脱毒甘薯是防治甘薯病毒病最有效的方法之一^[5], 但脱毒甘薯也存在病毒再感染的问题。传统的抗病育种由于缺乏抗源材料和育种周期长等原因, 不能满足生产需要, 转基因技术的发展为抗病毒甘薯的培育提供了新途径。鉴此, 简要综述了近年来甘薯遗传转化及其抗病毒基因工程方面的研究进展, 旨在为抗病转基因甘薯的进一步研究提供参考。

1 甘薯的遗传转化方法

甘薯的遗传转化主要利用农杆菌介导法、基因枪法和电击法, 目前报道最多的是采用农杆菌介导法^[6]。

1.1 农杆菌介导法

1987 年, Suseelan 等^[7] 研究证明了农杆菌可侵染甘薯, 为农杆菌介导法转化甘薯提供了可能性。1991 年, Prakash 等^[8] 利用农杆菌介导法将 *GUS* 基因转入甘薯品种 Jewel 和 TIS-70357 中, 获得了表达 *GUS* 基因的转基因甘薯植株。此后, 国内外研究人员分别利用不同的外植体进行转化, 获得了多种转基因甘薯。

1.1.1 以叶片、茎段和叶柄等植物组织为受体
2001 年, 高峰等^[9] 分别以甘薯的茎段、叶片和叶柄

为外植体,利用玉米醇溶蛋白基因(*zein*)和新霉素磷酸转移酶基因(*NPT-II*),在农杆菌介导下,对甘薯品种新大紫进行遗传转化,经含75 mg/L 卡那霉素(Kan)的培养基筛选,茎段外植体抗性芽的获得率为6.2%,其中30.1%的抗性芽形成植株,而叶片和叶柄均未能获得抗性芽。2002年,罗红蓉等^[10]取带叶柄的完整叶片与乙酰丁香酮共培养过夜后,利用人乳铁蛋白基因(*hLFC*),在农杆菌介导下,对8个甘薯品种进行遗传转化,经50 mg/L Kan 筛选,获得了抗性愈伤组织,8个品种的平均转化频率为26.1%,其中最高的品种为69.35%。2004年,阎文昭等^[11]利用农杆菌介导法,将水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因(*OCl*)和*NPT-II*基因转入甘薯中,共转化了12个甘薯品种,其中7个品种获得抗性植株,经PCR检测,有4个品种得到转基因植株。

1.1.2 以愈伤组织为受体 1996年,Gama等^[12]首次将胚性愈伤用于甘薯转化,利用农杆菌介导法将*GUS*基因和*NPT-II*基因转入甘薯品种White Star中,得到抗性植株,并证明了*GUS*基因的表达。2001年,Kimura等^[13]利用农杆菌介导法将淀粉粒附着性淀粉合成酶I基因(*GBSS I*)导入甘薯品种Kokei 14的胚性愈伤组织,获得26株经Southern blot验证为阳性的转基因植株。

1.1.3 以胚性悬浮细胞为受体 1997年,刘庆昌等^[14]建立了甘薯胚性悬浮培养体系,其主要步骤是剥取0.5 mm甘薯茎尖于MS固体培养基上培养,培养6~8周后获得愈伤组织,将愈伤组织破碎置于MS液体培养基,在100 r/min的摇床上培养,得到直径约1 cm的胚性悬浮细胞团,将细胞团在MS固体培养基上培养,获得完整植株。目前,已建立了适合20多个主要甘薯品种的悬浮培养体系,植株再生率达到100%^[15]。翟红等^[15]和Yu等^[16]进一步利用该体系进行遗传转化研究,通过农杆菌介导法将*GUS*基因和*NPT-II*基因导入甘薯品种栗子香的胚性悬浮细胞中,对*GUS*基因的表达分析表明,将悬浮细胞进行1~3 d的预培养后,再与农杆菌共培养4~5 d有利于遗传转化。2006年,蒋盛军^[17]利用该方法将水稻*OCl*基因导入甘薯品种栗子香中,获得了表达水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂的转基因甘薯植株。2007年,臧宁等^[18]利用胚性悬浮细胞系,在农杆菌介导下将*bar*基因转入甘薯品种徐薯18中,经PCR、Southern blot和Northern blot检测证明,获得转基因植株,除草剂喷洒试验证明转基因植株有除草剂抗性。2006年,王欣等^[19]首次将超声波辅助的农杆菌介导法(SAAT)应用于甘薯胚性悬浮细

胞的转化,超声波处理可以使外植体上产生许多易于农杆菌进入的微小伤口和通道,从而提高转化率。将*GUS*基因和*NPT-II*基因转入甘薯品种栗子香中,对*GUS*基因的表达分析表明,经超声波处理30 s的胚性悬浮细胞,*GUS*基因的瞬时表达率最高,为86.7%,稳定表达率为37.9%。

1.2 基因枪法

基因枪法多用于单子叶植物的遗传转化,目前在甘薯上的应用还不多。1992年,Prakash等^[20]利用基因枪法将*NPT-II*基因和*GUS*基因导入甘薯品种Jewel和TIS-70357中。2002年,Simon等^[21]利用*GUS*基因研究了基因枪法转化甘薯悬浮细胞体系的最适条件,结果表明:金粒微弹大小为1 μ m,氦气压为600 kPa,轰击距离为12 cm,每枪的DNA量为10 μ g时,转化效率最高。2007年,Lim等^[22]利用基因枪法成功将铜/锌超氧化物歧化酶基因(*CuZnSOD*)和抗坏血酸过氧化物酶基因(*APX*)转入甘薯品种Yulmi的叶绿体中,获得经RT-PCR验证为阳性的转基因植株,通过喷洒甲基紫罗碱和低温处理,证明转基因植株的抗逆性明显增强。

1.3 电击法

1998年,Tonya等^[23]研究了电击法转化甘薯胚性愈伤的适宜条件,结果表明,最适条件为电场强度500 V/cm, DNA质量浓度20 mg/L,处理1 h;处理前用纤维素酶、果胶酶和聚乙烯乙二醇预处理能提高转化效率。1998年,Noshiguchi等^[24]利用电击法将甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)外壳蛋白(CP)基因和*NPT-II*基因导入甘薯品种Chikei 628-11中,经Southern blot和Northern blot证明获得转基因植株,接种SPFMV 3个月后进行ELISA检测,结果表明,转基因植株表现明显的SPFMV抗性。

2 抗病毒转基因甘薯研究

目前已报道的侵染甘薯的病毒至少有19种,其中有11种在病毒分类系统中有正式的分类地位。据统计,甘薯上发生最普遍的病毒是马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*)的病毒,包括甘薯羽状斑驳病毒(SPFMV)、甘薯G病毒(SPVG)、甘薯潜隐病毒(SPLV)、甘薯脉花叶病毒(SPVMV)等^[25]。因此,当前抗病毒转基因甘薯的研究中,针对*Potyvirus*的报道较多。用于甘薯遗传转化的抗病毒基因,分为病毒来源的基因和非病毒来源的基因2类^[26-27]。

2.1 利用病毒来源的抗性基因

利用外壳蛋白基因介导的抗病性是植物抗病基因工程研究最早、应用最多的策略^[28],该方法也

较早的应用于抗病毒转基因甘薯研究中。2001 年, Okada 等^[29] 利用电击法将 *SPFMV-CP* 基因导入甘薯品种 Chikei 628 11 中, 获得 3 个转基因植株, 并通过杂交获得种子。对种子形成的植株进行分子检测, 确认 T_1 代植株含有 *SPFMV-CP* 基因; 接种 *SPFMV* 3 个月后, 利用 PAS-ELISA 检测病毒含量, 对比未转化的 T_1 代植株, 转基因植株的 T_1 代表现出很高的 *SPFMV* 抗性, 与 T_0 代转基因株系相当, 证明该抗性可稳定的遗传。

RNA 沉默是植物抵抗外来核酸(病毒、转基因等)入侵, 并保护自身基因组完整性的一种防御机制, 近年来已应用于多种抗病毒转基因植物的研究中^[26], 目前在抗病毒转基因甘薯上也有应用。2008 年, Kreuze 等^[30] 利用 RNA 沉默的原理, 将 *SPFMV* 和甘薯褪绿矮化病毒(*SPCSV*)的复制酶基因片段融合在一起, 以反向重复的方式插入到内含子两侧, 构建反向重复的发卡状结构表达载体, 利用农杆菌介导法导入甘薯品种 Huachano 中, 获得 28 个独立的经分子鉴定为阳性的转基因株系。分子杂交结果表明, 大部分的转基因株系均有小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA) 的积累; 接种 *SPCSV* 和 *SPFMV* 后, 转基因植株的症状轻于普通植株, 经 ELISA 检测证明, 转基因植株中 *SPCSV* 的积累量明显低于非转基因植株。

2.2 利用非病毒来源的抗性基因

在利用非病毒来源基因培育抗病毒转基因甘薯方面, 国内外也进行了一些探索。2001 年, Cipriani 等^[31] 利用农杆菌介导法将水稻 *OCI* 基因导入甘薯品种 Jonathan, 获得 25 个独立的经 PCR、Southern blot 检测确认的转基因株系。通过嫁接法接种 *SPFMV*, 其中 18 个株系未表现感染症状, 经 NCM-ELISA 检测, 无症状株系中有 17 个株系表现为 *SPFMV* 阴性。2004 年, 蒋盛军等^[32] 利用农杆菌介导法将 *OCI* 基因导入甘薯品种栗子香中, 获得 13 株再生植株, 经 PCR 和 PCR-Southern 检测, 其中 7 株为转基因植株。2004 年, 阎文昭等^[11] 将 *OCI* 基因导入 12 个甘薯品种, 经 PCR 检测, 其中 4 个品种获得了转基因植株。

总体来说, 甘薯遗传转化及其抗病毒转基因研究取得了一定的进展, 尤其是甘薯胚性悬浮细胞体系的建立, 大大提高了转化的效率和植株的再生率^[14-16]。然而, 还存在许多问题。例如, 甘薯基因型对遗传转化影响较大^[10-11], 目前获得的抗病毒转基因甘薯多为栗子香、Jonathan 等非主栽品种, 不利于大面积的推广种植; 抗病基因匮乏, 主要利用 *OCI*

基因、病毒 CP 基因获得病毒抗性, 有很大的局限性; 病毒变异及病毒混合侵染导致抗性丧失; 转基因植株对周围环境及人类的健康存在潜在的风险等。至今, 尚未有转基因甘薯品种应用于生产。但是, 随着研究的深入, 转化方法会不断地完善, 并应用于主栽甘薯品种; 新的转化方法和标记基因的出现将减少转基因植株对人与环境的风险; 功能基因组研究的进展有望提供更多的抗病毒基因; RNA 沉默也为甘薯抗病毒基因工程的研究提供了一条新的途径。随着研究的深入, 转基因甘薯必将在提高病毒病抗性, 以及提高甘薯产量和改善甘薯品质等方面发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 马代夫, 李洪民, 唐君, 等. 中国甘薯产业的发展现状与发展趋势[C]//马代夫. 甘薯与粮食安全——中国徐州第四届国际甘薯学术讨论会暨第四届中日韩甘薯学术讨论会论文集. 北京: 中国农业大学出版社, 2010: 3-10.
- [2] 阎文昭, 王大一. 四川发展能源专用甘薯生产的问题与对策[M]//阎文昭. 能源专用甘薯与燃料乙醇转化. 成都: 四川科学技术出版社, 2010: 1-12.
- [3] 武宗信, 冯文龙, 解红娥. 山西省甘薯生产现状及发展对策[J]. 山西农业科学, 2004, 32(4): 29-32.
- [4] 马丽, 张庆春, 周玉亮. 甘薯病毒病检测技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 88-91.
- [5] 施立善, 张玉梅, 孙庆伟. 脱毒甘薯的特点及其优质高产栽培技术[J]. 现代农业科技, 2009(13): 51.
- [6] 李强, 刘庆昌, 马代夫, 等. 甘薯遗传转化研究现状、问题及展望[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 99-106.
- [7] Suseelan K N, Bhagwat A, Mathews H. A *grobacterium tumefaciens* induced tumor formation on some tropical dicot and monocot plants[J]. Current Science, 1987, 56(17): 888-889.
- [8] Prakash C S, Varadarajan U, Kumar A S. Foreign gene transfer to sweet potato[J]. Hortscience, 1991, 26(5): 429.
- [9] 高峰, 龚一富, 林忠平. 根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化及转基因植株的再生[J]. 作物学报, 2001, 27(6): 751-756.
- [10] 罗红蓉, 张勇为, 张义正. 根癌农杆菌转化甘薯高频获得抗性愈伤组织的研究[J]. 四川大学学报, 2002, 39(S1): 21-24.
- [11] 阎文昭, 吴洁, 王大一, 等. 将水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因(*Oryz acytain I*) 导入甘薯品种[J]. 分子植物育种, 2004, 2(2): 203-207.
- [12] Gama M I C S, Leite R P J, Cantliffe D J. Transgenic sweetpotato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation[J]. Plant Cell Tissue

- Organ Cult, 1996, 46(3): 237-244.
- [13] Kimura T, Otani M, Ideta O, *et al.* Absence of amylase in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) following the introduction of granule bound starch synthase I cDNA [J]. Plant Cell Rep, 2001, 20(7): 663-666.
- [14] 刘庆昌, 鲁迪慧, 马彪, 等. 甘薯细胞悬浮培养及有效植株再生[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(3): 238-242.
- [15] 翟红, 刘庆昌. 甘薯胚性悬浮细胞遗传转化的研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 487-491.
- [16] Yu B, Zhai H, Wang Y P, *et al.* Efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2007, 90: 265-273.
- [17] 蒋盛军. 甘薯胚性悬浮细胞的遗传转化和转基因植株的有效再生[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [18] 臧宁, 翟红, 王玉萍, 等. 表达 *bar* 基因的抗除草剂转基因甘薯的获得[J]. 分子植物育种, 2007, 5(4): 475-479.
- [19] 王欣, 周忠, 李强, 等. 甘薯 SAAT 法遗传转化条件的优化[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(1): 14-18.
- [20] Prakash C S, Varadarajan U. Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11: 53-57.
- [21] Simon D, Mary A L S, Carmella L. Factors affecting transformation of cell cultures from there dicotyledonous pigment producing species using microprojectile bombardment [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 70(1): 69-76.
- [22] Lim S, Kim Y H, Kim S H, *et al.* Enhanced tolerance of transgenic sweetpotato plants that express both CuZnSOD and APX in chloroplasts to methyl viologen mediated oxidative stress and chilling [J]. Mol Breeding, 2007, 19: 227-239.
- [23] Tonya D M, Ajmer S B, Peggy O A, *et al.* Electroporation mediated transient gene expression in intact cells of sweetpotato [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1998, 34: 319-324.
- [24] Noshiguchi M, Mori M, Okada Y, *et al.* Virus resistant transgenic sweet potato with the CP gene: current challenge and perspective of its use [J]. Phyto protection, 1998, 79: 112-116.
- [25] 王关林, 刘娟. 甘薯病毒病的分子生物学研究进展 [J]. 商丘师范学院学报, 2009, 25(3): 7-15.
- [26] 刘佳, 吴忠义, 张秀海, 等. 植物抗病毒基因工程研究进展 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 30-38.
- [27] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in post transcriptional gene silencing in plants [J]. Science, 1999, 286: 950-952.
- [28] Beachy R N, Loeschries S, Tumer N E. Coat protein mediated resistance against virus infection [J]. Ann Rhtol, 1990, 28: 451-474.
- [29] Okada Y, Saito A, Nishiguchi M. Virus resistance in transgenic sweet potato expressing the coat protein gene of sweet potato feathery mottle virus [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 743-751.
- [30] Kreuze J F, Klein I S, Lazaro M U, *et al.* RNA silencing mediated resistance to a crinivirus (Closteroviridae) in cultivated sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) and development of sweetpotato virus disease following co infection with a potyvirus [J]. Molecular plant pathology, 2008, 9(5): 589-598.
- [31] Cipriani G, Fuentes S, Bello V, *et al.* Transgene expression of rice cysteine proteinase inhibitors for the development of resistance against sweet potato feathery mottle virus [C] // Scientist and farmer partners in research for the 21st century. Lima: CIP Press, 2001: 267-271.
- [32] 蒋盛军, 刘庆昌, 翟红, 等. 水稻巯基蛋白酶抑制剂基因 (*OCI*) 转化甘薯获得转基因植株 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 34-37.