

# 木薯组织培养和遗传转化研究进展

姚庆荣<sup>1</sup>, 郭运玲<sup>2</sup>, 郭安平<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>甘肃行政学院, 甘肃兰州 730000; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

**摘要:** 综述了国内外木薯组织培养和遗传转化研究进展, 重点介绍了以分生组织培养、成熟器官发生、体细胞胚状体以及原生质体培养为基础的4个木薯再生体系; 分析总结了木薯基因工程育种的研究现状; 提出了木薯组织培养及遗传转化研究中存在的问题和未来的发展方向。

**关键词:** 木薯; 组织培养; 遗传转化

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 又称树薯、木番薯, 属大戟科 (*Euphorbiaceae*) 木薯属 (*Manihot* P. Mill.) 植物, 是世界三大薯类作物之一, 也是继水稻、玉米、高粱之后的第四大粮食作物, 是热带、亚热带重要的热能来源, 为全球6亿多人口提供基本的食物。目前, 国家制定的“十一五”再生能源发展战略和新颁布的《国家可再生能源法》中, 将玉米、木薯和甘蔗列入未来生产燃料酒精的主要原料。由于木薯遗传背景复杂及其种质资源 (如抗性和不含氰化物等) 匮乏, 使得传统育种方法受到一定限制。近年来, 随着生物技术的快速发展, 通过转基因方法培育具有抗病、抗逆、低氰化物、高蛋白和高淀粉等优良农艺性状的木薯新品种已经成为可能。建立一套高效的植株再生和遗传转化体系是利用生物技术成功进行木薯改良的关键, 经过多年的努力, 这方面的研究已取得了长足进展。本文对国内外木薯组织培养和遗传转化研究现状进行综述, 以期对木薯的组培快繁和遗传改良提供一定的参考。

## 1 木薯的组织培养

组织培养是植物基因转化的前提和基础。自20世纪70年代以来, 木薯的组培工作得到广泛的发展。根据选用外植体种类的不同, 现已形成几个不同的木薯再生体系。

### 1.1 分生组织培养

1974年, Kartha等人首次进行了木薯的分生组织培养, 在附加低浓度激素 (BAP 0.1 mg/L, GA<sub>3</sub> 0.04 mg/L, NAA 0.2 mg/L) 的培养基上得到了5个品种的再生植株<sup>[1]</sup>。Konan等人研究发现先用高浓度的激素 (BAP 2~10 mg/L) 促进侧芽分生组织快速增殖, 然后在含低浓度BAP的培养基上可获得再生植株<sup>[2]</sup>。在丛生芽诱导培养基中加入表面活性剂Pluronic-F68还可增强诱导效果。另外, 在诱导前用低浓度的Thidiazuron (TDZ) 进行预处理, 则会产生更多的丛生芽。

### 1.2 成熟器官培养

目前, 已有2个研究小组利用不同的外植体成功地进行了高频器官发生并获得再生植株。Li等以木薯品种MCol22的体细胞胚子叶为外植体诱导产生次生胚状体, 转入附加BAP 0.1 mg/L的MS培养基中待其成熟后, 取子叶切碎, 置于诱导培养基上诱导器官发生, 20

基金项目: 中国热带农业科学院科技基金项目资助 (No.RKY0724)。

作者简介: 姚庆荣 (1978—), 女, 博士, 讲师, 主要从事农业生物技术研究。E-mail: yaoqingronglzh@163.com。

\* 通讯作者: 郭安平 (1962—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 国家农业转基因安全委员会委员。研究方向为植物基因工程, 农业转基因生物安全。E-mail: gap211@126.com。

d后将形成的叶状结构、芽原基及愈伤组织转移到含BAP 0.4 mg/L的MS培养基上获得再生苗,在含低浓度NAA或不含NAA的培养基上得到再生植株。该体系适合于多个木薯品种,已经在来自亚洲、非洲和南美洲的16个品种上得到成功应用。在体细胞胚子叶诱导器官发生过程中,添加AgNO<sub>3</sub>可提高植株再生频率,也可减少愈伤组织的形成,但添加的AgNO<sub>3</sub>浓度过高时,长时间培养组织会产生钝化现象。另外,麦芽糖和蔗糖在诱导器官发生和植株再生方面优于其它碳源(山梨醇、乳糖、葡萄糖、果糖或纤维素)<sup>[3]</sup>。马国华等以木薯品种“南植188”的嫩叶为外植体,用NAA 10~80 mg/L直接诱导初生体细胞胚胎发生和芽的形成。与2,4-D诱导的方法相比,用NAA诱导速度较快(9~13 d),并可直接产生芽(10~14 d),植株再生频率可达48%。不过,此方法也具有基因型依赖性,在16个供试木薯品种中,只有12个能从嫩叶直接诱导初生体细胞胚胎发生或芽的形成。一旦产生胚性细胞,生长素则会促进体细胞胚状体的形成,而6-BA促进不定芽的发生<sup>[4]</sup>。

### 1.3 体细胞胚状体培养

自Stamp和Henshaw以木薯合子胚的子叶和胚轴为外植体首次成功诱导出胚状体以来,多种外植体(如合子胚的子叶、幼叶、茎尖或腋芽分生组织以及花组织)已被运用于木薯初生胚状体的诱导<sup>[5]</sup>。所用激素通常是Picloram (1~12 mg/L)和2,4-D (1~8 mg/L)。但对某些基因型来说,用dicamba (1~66 mg/L)和NAA诱导效果更好。木薯胚状体发生能力主要和基因型有关。用2,4-D或ABA对外植体进行预处理,或在诱导培养基中补充少量的硫酸铜,可以提高胚状体的诱导效率。

在与上述相同或不同(含高浓度的NAA)的培养基上,木薯初生胚状体经继代培养能诱导出更多的次生胚状体。依此类推循环诱导,可大大提高胚状体的增殖效率。有研究表明,以固体成熟培养基上生长15天的胚状体子叶为外植体,次生胚状体产率最高;在诱导阶段,以麦芽糖代替蔗糖为碳源,能提高次生胚状体产量<sup>[6]</sup>。在不含激素或含低浓度BAP 0.1 mg/L的培养基上,初生胚状体或次生胚状体可发育成带绿色子叶的成熟胚状体。一般来说,成熟胚状体直接发育成再生植株的频率较低,所

以多采用两步法,先在含BAP的培养基上促进胚状体芽的伸长,后在含低浓度NAA的培养基上促进根的发生。为了提高胚状体的再生频率,也可先在含0.5%活性炭的培养基上待其成熟,经脱水处理,转到不含激素的培养基上促其萌发,再生频率可达到85.4%。其它处理,如添加AgNO<sub>3</sub>或2,4-D与PP<sub>333</sub>配合使用均能提高植株的再生频率。另外,以麦芽糖代替蔗糖,不仅可以提高植株再生频率,还可以提高次生胚状体产率<sup>[7]</sup>。

某些木薯品种,如“TMS60444”,循环胚状体在含有维生素和Picloram 10~12 mg/L的GD培养基中可产生一种由细小的球形胚组成的脆性胚性愈伤(FEC)。将这种愈伤分离出来扩增,一旦获得纯的脆性愈伤,即可在SH液体培养基中进行悬浮培养,转入成熟培养基中待其成熟,在固体培养基上即可得到再生植株。但是,该方法再生频率较低,而且因组培时间过长(20~30周)可能会导致高频的体细胞变异。脆性胚性愈伤(FEC)的产生具有很强的基因型依赖性。Nigel等曾报道,在供试的14个木薯品种中,有11个成功地建立了脆性胚性愈伤悬浮体系,但脆性愈伤产生的时间和植株的再生频率却存在很大的差别<sup>[8]</sup>。

### 1.4 原生质体培养

对木薯而言,利用原生质体培养再生植株是相当不易的。Shahin等曾经报道从木薯叶肉组织原生质体中得到了再生芽,但植株的再生一直未见报道。从胚性组织(如顶端分生组织、幼叶、体细胞胚)分离到的原生质体,在50种不同的培养基上,绝大多数仅仅产生绿色的愈伤组织,最好的也只是形成了不定芽。近年来,研究发现在含有NAA 0.5 mg/L和ZT 1 mg/L的培养基上,从“TMS60444”的胚性悬浮物中分离到的原生质体易产生愈伤,在培养2个月后,大约60%的具有脆性胚性愈伤(FEC)特性。

## 2 木薯的遗传转化

自1983年首次获得转基因植物以来,植物的遗传转化发展迅速。但是木薯的遗传转化难度较大,进展缓慢。其转化方法多采用农杆菌介导法和基因枪转化法,以前者为主。

## 2.1 农杆菌介导法转化木薯

农杆菌介导法是目前应用最广泛的基因转化方法,农杆菌中Ti质粒质体中有一段T-DNA会穿过受伤的植物细胞壁,进入植物并表达。1996年,木薯的遗传转化首次取得成功。Li等以次生胚状体子叶为外植体,与农杆菌LBA4404(pTOK233)共培养后,在含15 mg/L的选择培养基上可诱导抗性愈伤、芽原基的形成。GUS染色表明:30株潮霉素抗性芽中,6株表现为GUS阳性。对抗性植株相继进行了PCR、Southern和Northern检测。为了提高转化效率,他们还影响农杆菌介导的木薯遗传转化因素进行了全面研究。并在此基础上将异戊烯基转移酶基因(*ipt*)由衰老特异启动子驱动成功导入木薯,以期延长叶片光合作用,进一步提高产量<sup>[9]</sup>。Zhang等利用含pCASP1工程质粒的LBA4404农杆菌转化木薯,通过体细胞胚胎发生途径获得转基因植株。PCR、Southern、RT-PCR以及Western斑点杂交等分子检测表明,*asp1*基因已经整合进木薯基因组,并在转录和翻译水平上得到表达<sup>[10]</sup>。

同年,Siritunga等采用拟南芥叶片特异表达启动子,利用农杆菌介导法在木薯品种“Col2215”中反义表达了CYP79D1和CYP79D2基因。离体分析表明:转基因植株叶片中的亚麻苦苷含量比对照减少34%~94%,但块根中仅仅减少了1%。原因还不可知,推测是库—源系统中,因氰化物的向下运输受阻所致<sup>[11]</sup>。证实这一假设的后续研究正在进行。据White等人报道,在同一木薯植株中,块根中羟基裂解酶的含量仅占叶片的6%,过量表达羟基裂解酶可以降低块根丙酮氰醇的含量,从而加快解毒进程<sup>[12]</sup>。为了实现这个目标,Siritunga等将编码羟基裂解酶基因的cDNA在35S启动子的驱动下转化木薯品种“Col2215”,检测结果表明,转基因植株叶片的羟基裂解酶活性比对照增加40%~135%,块根的增加800%~1300%,但整个植株的亚麻苦苷和百脉根苷的总量却没有变化<sup>[11]</sup>。2005年,Zhang等以AC1、AC2和AC3(编码非结构蛋白)的mRNA为靶基因,利用反义技术将其转入供试木薯品种,转基因植株的抗花叶病能力大大提高。田间接种试验发现,在较低的剂量下(100 ng毒性DNA/株),转化植株不感病,而较高的剂量,症状也大大减

轻<sup>[13]</sup>。

## 2.2 基因枪法转化木薯

基因枪法又称为微弹射击法,是近年来兴起的一种新的基因转化方法。Schopke等以体细胞悬浮培养系统为基础,用基因枪法转化木薯品种TMS60444,经Southern证实获得转基因植株<sup>[14]</sup>。2000年,Zhang等利用“TMS60444”的脆性胚性愈伤悬浮培养系,用基因枪法将载体质粒pHMG导入具有再生能力的单个细胞。转化体的筛选可用负选择标记巴龙菌素、潮霉素,用正选择标记甘露糖。通过优化脆性胚性愈伤悬浮培养体系,不到15周就可得到转基因木薯植株<sup>[15]</sup>。

## 3 问题与展望

木薯是我国热带和亚热带地区的一种重要作物,经遗传改良的木薯新品种在食用、饲料、特别是发展能源酒精方面都有着非常广泛的应用前景。近年来,木薯组织培养与遗传转化研究已取得了不小成就,但仍存在着很多亟待解决的问题,笔者认为以后应加强以下几个方面的研究。

### 3.1 进一步优化木薯再生体系和遗传转化体系,提高转化效率

在木薯的遗传转化中,转化率偏低仍然是存在的主要问题。究其原因,除与转化方法、筛选条件有关外,主要是再生体系的不高效。脆性胚性愈伤(FEC)悬浮培养系统虽然便于转化,但再生完整植株的周期较长,频率较低,而且实验操作难度较大。Li等采用的器官发生系统虽然能获得多个转化植株,但转化频率也只有0.2%~0.4%,且存在较多的假阳性和嵌合体<sup>[3]</sup>。所以,在现有的工作基础上,应进一步优化再生体系,提高转化效率,稳定实验结果,为生产大量的转基因植株进行木薯的遗传改良建立一个快速高效的转化平台,真正服务于生产。

### 3.2 积极探索更加高效的遗传转化方法

纵观国内外文献,目前在木薯遗传转化研究中应用最多的是农杆菌介导法和基因枪转化法。前者具有低成本、少拷贝或单拷贝,插入位点较固定,后代遗传较规律等特点,而基因枪法转化率较高,所以可以尝试将两者结合起来,先用基因枪轰击外植体,再与农杆菌共培

养的方法提高转化效率。另外,还可积极尝试其他的转化方法,比如电击法和聚乙二醇法等。

### 3.3 进一步拓展木薯育种方向

目前,木薯基因工程育种主要集中在抗虫、抗病和降低氰化物等方面,抗寒、抗旱、改善品质以及提高产量方面的研究还相对薄弱。通过转基因技术将上述相关基因导入木薯主栽品种,提高其抗逆性,进而提高块根蛋白和淀粉含量,这将对我国大力发展木薯产业,增加农民收入,壮大区域经济具有重大意义。

### 3.4 开展转基因植株的后续研究工作

目前,木薯的转基因研究已取得了很大进展,但绝大多数还处于实验室研究阶段。在进行基础研究的同时,还需大力开展转化植株的后续研究工作(如观察目的基因的稳定表达以及田间释放等),以促进科研成果的及时转化,真正为热区人民服务。

总而言之,木薯组织培养和遗传转化已取得令人鼓舞的成果,相信随着转化体系的进一步完善和生物技术研究的不断深入,用基因工程全面改良木薯品种将会在新世纪显示出强大的生命力,推动热区经济的迅速发展。

## 参考文献

- [1] Kartha K K. Regeneration of cassava plants from apical meristems[J]. *Plant Sci Lett*,1974,2: 107 - 113
- [2] Konan N K,Sangwan R S,Sangwan-Norreel B S. Efficient in vitro shoot regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Plant Breed*,1994,113: 227 - 236
- [3] Li H Q,Huang Y W,Liang C Y,et al. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis[J]. *Plant Cell Rep*,1998,17: 410 - 414
- [4] 马国华,许秋生,姜蕴兰. 从木薯嫩叶直接诱导初生体细胞胚胎发生和芽的形成[J]. *植物学报*,1998,40(6): 503 - 507
- [5] Stamp J A,Henshaw G G. Somatic embryogenesis in cassava[J]. *Z. Pflanzenphysiol*,1982, 105: 183 - 187
- [6] 李洪清,梁承邨,黄毓文. 影响木薯次生胚状体发生及植株再生因素的研究[J]. *广西植物*,1999,19(3): 246 - 250
- [7] Ma G H. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants[J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1998,54: 1 - 7
- [8] Nigel J,Taylor, Munyaradzi V,et al. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Euphytica*, 2001,120: 25 - 34
- [9] 李洪清,李美茹,刘鸿先. 木薯抗叶片早衰的基因工程育种[J]. *中国科学院研究生院学报*,2000,17(2): 75 - 80
- [10] Zhang P,Jaynes J,Potrykus I,et al. Transfer and expression of an artificial storage protein (ASP1) gene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Transgenic Res*, 2003,12: 243 - 250
- [11] Siritunga D,Sayre R T. Generation of cyanogenfree transgenic cassava[J]. *Planta*,2003,217: 367 - 373.
- [12] White W L B,Arias-Garzo D,Mahon J M,et al. Cyanogenesis in cassava: the role of hydroxynit-687 rileyase in root cyanide production[J]. *Plant Physiol*,1998, 116: 1229 - 1225
- [13] Zhang P,Vanderschuren,Herv, et al. Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes[J]. *Plant Biotechnology*,2005,3(4),385 - 397
- [14] Schopke C,Taylor N J,Carcamo R,et al. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot Esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures[J]. *Nature biotechnol*,1996,14: 731 - 735
- [15] Zhang P, Legris G,Coulin P,et al. Production of stably transformed cassava plants via particle bombardment. *Plant[J]. Cell Rep*,2000,19: 939 - 945