

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)06-0341-05

发根农杆菌介导抗菌肽 Shiva1 基因转化马铃薯的初步研究

刘春元, 殷宪平, 邢小萍*

(河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州, 450002)

摘要: 利用已构建载体 530 Shiva, 转化马铃薯普通栽培种甘农薯 1 号、澳布、HLS 和夏波蒂的试管苗及块茎盘的研究。结果表明, 以 $\text{Kan } 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为筛选转基因细胞和植株的剂量。对于发根农杆菌感染马铃薯试管苗应采用新鲜菌落直接涂抹伤口进行感染, 这种方法诱导生根率高且易于操作, 根诱导率、成愈率及分化率远高于浸泡法; 发根农杆菌转化试管苗, 后期愈伤组织分化产生 5 个幼苗。发根农杆菌菌液感染甘农薯 1 号和夏波蒂两品种的块茎盘, 7 d 后就有很小的毛状根突起产生, 2 周后即有大量毛状根产生, 3 周后毛状根产生量有所减少, 产生的毛状根 3 周时其成愈率分别为 31.0% 和 27.0%, 愈伤组织分化成苗比较困难, 分化出 3 个幼苗, 分化率分别为 6.45% 和 3.70%。转化材料进行冠瘿碱检测表明, 分化苗均为胭脂碱阳性反应。环腐病菌接种试管苗结果表明, 分化植株与对照相比抗性明显增强。

关键词: 发根农杆菌; Shiva1; 转化; 马铃薯

在农业生产中, 马铃薯受到多种病害的危害, 仅细菌性病害造成的损失占年产量的 25%, 约合 40 亿美元^[1]。马铃薯环腐病在所有的马铃薯栽培种和一些野生种上都严重发生, 病原细菌主要通过伤口传染, 常规防治难度较大, 费时耗力, 防治效果有一定的局限性, 所以利用抗病品种来防治此病害是最经济、最有效的途径, 但目前还没有免疫和高抗品种, 用常规育种选育马铃薯抗病品种十分困难, 而近年发展迅速的基因工程技术则为马铃薯抗病育种开辟了广阔的途径。随着基因工程技术的发展, 人们利用该技术进行作物品质的改良, 培育出抗病、抗虫、抗逆性较强的工程植物已取得较大的进展。而在大量的基因工程操作过程中, 利用农杆菌作为介体进行介导转移的实例占绝大多数。究其原因主要是利用土壤杆菌具有质粒 (Ti 或 Ri), 转化植物后可以使植物产生冠瘿瘤或毛状根, 冠瘿瘤和毛状根都容易再生植株, 所以在基因工程研究过程中人们将 Ti、Ri 质粒作为基因工程载体。目前, 运用 Ti 或 Ri 质粒

进行遗传研究的科研工作比较多, 而且这项转化工作将越来越受到人们的关注^[2-5]。本研究运用发根农杆菌 (含有 Ri 质粒) 介导将抗菌肽 shiva1 导入马铃薯外植体材料中。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料

甘农薯 1 号、澳布、HLS、夏波蒂。用上述材料试管苗、茎段、块茎作为外植体材料。

试管苗采用切段保存和繁殖, 将带有 2~3 个腋芽的茎段扦插于 MS0 培养基上, 置于 25℃ 左右, 室内散射光下培养和保存, 每月继代繁殖一次。

1.1.2 供试菌株

本试验所用的农杆菌菌株 R1000 含有改建质粒 530 Shiva, 所携带目的基因为 Shiva1, 报告基因是新霉素磷酸转移酶基因 (NPTII) 和胭脂碱合成酶基因。由中国农业科学院生物工程中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌的培养

将各菌株在相应加了激素的培养基上平板划线培养, 每 36 h 划线一次, 挑取生长好的单菌落连续划线 2~3 次进行菌种活化培养, 培养皿置 28℃

收稿日期: 2007-06-18

作者简介: 刘春元 (1962-), 女, 高级实验师, 硕士, 主要从事植物病害防治研究。

* 通讯作者: E-mail: xxpl68@163.com

恒温箱中培养。

1.2.2 菌液的制备

将在 28℃ 黑暗条件下连续培养 36 h 的具有农杆菌特征的新鲜菌落用接种针挑于 LB 液 (pH 7.0) 悬浮, 振荡过夜培养之后, 取 1 mL 菌液接种到 50 mL LB 液体培养基中 (pH 5.5), 150~200 r·min⁻¹ 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.4~0.5。然后再在 4 000 r·min⁻¹ 的离心机上离心 5 min 后, 将菌体用 MS (pH 5.8) 液重悬至 OD₆₀₀ ≤ 0.2, 作为侵染转化用, 此时的浓度一般为每毫升含 10⁸~10⁹ 个细菌。

1.2.3 试管苗对 Kan (卡那霉素) 抗性的测定

对试验所用试管苗作 Kan 抗性试验。设 Kan 的 5 个不同浓度梯度: 25, 50, 75, 100, 150 mg·L⁻¹。将试验用试管苗分别接种于附加有不同浓度的 Kan 的 MS 培养基上, 以不加 Kan 的处理为对照。

1.2.4 发根农杆菌对试管苗的侵染及共培养方法

本试验采用涂抹法和菌液浸泡法两种方法。涂抹法是用经过灭菌的剪刀蘸取制备好的菌液或新鲜菌落, 然后直接剪取试管苗顶端造成伤口, 将经菌液或新鲜菌落涂抹伤口的植株在 MS0 培养基上继续培养, 诱导产生毛发状根。浸泡法是指将经过 48 h 预培养的外植体材料投入预先制备好的菌液中浸泡 15~20 min, 然后取出置吸水纸上吸干外植体表面的菌液, 后置 MS0 培养基上共培养, 经 48 h 共培养后置于附加有 Kan 和 Cb 的相应培养基上诱导毛状根产生。将诱导产生的毛状根剪成 1 cm 左右的小段, 之后转到附加有 Kan (50 mg·L⁻¹) 和 Cb (500 mg·L⁻¹) 的 MS+NAA (2.0 mg·L⁻¹) +6BA (2.25 mg·L⁻¹) 培养基上诱导产生愈伤组织。将上述形成的愈伤组织转到附加有 Kan (100 mg·L⁻¹) 和 Cb (500 mg·L⁻¹) 的分化培养基 [MS+6BA (3.0 mg·L⁻¹) +IAA (0.1 mg·L⁻¹)] 上分化成苗。

1.2.5 发根农杆菌对马铃薯块茎的侵染转化方法

将在 4℃ 下贮藏的甘农薯 1 号和夏波蒂两品种的块茎表面清洗干净并消毒处理, 之后用灭菌的刀削去表皮, 用直径 9 mm 的无菌打孔器打成条, 削去两端, 再用灭菌的刀切成 4 mm 左右厚的圆片。将切好的圆片分别浸入制备好的菌液中, 轻微地振荡溶液, 使切块的各部分都能与菌液充分接触。浸泡约 20~30 min 后, 将切块取出置于无菌滤纸上吸干表面菌液, 然后平放于 0.8% 的水琼脂培养基平板上, 培养皿直径 9 cm, 每皿中放 7~9 块, 每处

理 3 皿, 用 Parafilm 膜封口。以无农杆菌的 LB 液浸泡为对照。然后将封好的培养皿放在 25℃、光强为 2 000 lx、光照 14 h/黑暗 10 h 的光照培养箱中培养, 诱导毛状根产生。将诱导产生的毛状根剪成 1 cm 左右的小段, 之后转到附加有 Kan (50 mg·L⁻¹) 和 Cb (500 mg·L⁻¹) 的 MS+NAA (2.0 mg·L⁻¹) +6BA (2.25 mg·L⁻¹) 培养基上诱导产生愈伤组织。将上述形成的愈伤组织转到附加有 Kan (100 mg·L⁻¹) 和 Cb (500 mg·L⁻¹) 的分化培养基 [MS+6BA (3.0 mg·L⁻¹) +IAA (0.1 mg·L⁻¹)] 上分化成苗。

1.2.5 冠瘿碱分析

按 Otter (1978)、Horscl (1986) 的方法^[6-7]。首先将愈伤组织和植株在含 0.5 mm 的精氨酸的 MS 培养基上培养约 1 周左右, 以刺激冠瘿碱的合成。试验之前首先将新鲜组织约 0.5 g (愈伤组织、茎、叶) 在冰箱中冰冻 20 min 左右, 取出在研磨器中压碎、研磨、挤出原液, 置于离心管中, 在 6 000~7 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min, 取上清液点样。用胭脂碱 (Napoline)、章鱼碱 (Octopine)、甘露碱 (Mannopine) 作标样, 每一样品点 4 μL, 距边缘 7 cm 作起点线, 样点之间距为 1.5 cm, 每点一次样都用热吹风机吹干。用 20 cm×30 cm 新华 1 号滤纸进行电泳, 所用电泳液为甲酸 乙酸 水 = 5 15 80 的缓冲液, 在 400 V 的直流电压下电泳 1~1.5 h, 将滤纸吹干后用 0.01% 的菲醌 + 2% NaOH 的 80% 酒精溶液染色。染色后立即将滤纸吹干, 在紫外灯下观察并拍照。

1.2.6 KanR 植株抗性的初步测定

用毛细管吸取马铃薯环腐病菌菌液 (菌液浓度为 10 cfu·mL⁻¹), 在转化得到的 Kan 抗性试管苗的叶腋处进行接种, 并用灭过菌的手术刀蘸取上述菌液对 Kan 抗性试管微型薯进行切刀传染^[8], 接种数均为 10。观察记载发病情况并计算发病率。

2 结果与分析

2.1 Kan 对马铃薯植株的影响

将试管苗接种于加 kan 的培养基上, 接种 5 d 后观察, Kan 不同浓度处理的马铃薯植株生长情况不同, 25 mg·L⁻¹ 的处理苗子生长良好, 有大量根产生, 50 mg·L⁻¹ 与 75 mg·L⁻¹ 的处理苗子生长受到抑制, 只有极少的根产生, 100 mg·L⁻¹ 与 150 mg·L⁻¹ 的处理无根产生, 并且剪刀造成的伤口严重褐化, 逐渐死亡。接种后两周 Kan 对植株的影响情况见表 1。

表 1 不同浓度 Kan 在接种两周后对马铃薯植株的影响

Kan 浓度 ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	Kan 对植株生长的影响
0	苗子生长旺盛, 生长快, 产生大量根
25	苗子生长状况良好, 与对照相比生长较缓, 产根稍少
50	苗子生长缓慢, 只有少量根产生
75	苗子有明显受抑制现象, 生长缓慢, 只有零星根产生, 叶色发黄
100	苗子生长严重受抑制, 无根产生, 剪刀伤口褐化, 叶及茎均发黄, 陆续死亡
150	苗子生长严重受抑制, 无根产生, 剪刀伤口严重褐化, 叶及茎均发黄, 陆续死亡

由表 1 可以得出: 随着 Kan 浓度的增加, 植株的生长速度由快减慢, 当 Kan 浓度 $>50\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 就已对植株的生长及根的发生有抑制; 当 Kan 浓度 $>100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对植株的生长及根的发生有明显的抑制作用, 所以本实验在诱导愈伤组织及愈伤组织的分化阶段采用 Kan $50\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 而到抗性芽诱导生根阶段才将 Kan 浓度增加到 $100\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 不同侵染方法对试管苗诱导生根及转化愈的结果

本试验在发根农杆菌侵染试管苗时采用涂抹法和浸泡法。涂抹法起初用制备好的菌液涂抹于植株的伤口处诱发毛状根, 但因为这种方法菌液易流到培养基上而引起快速污染, 所以后来改用培养的新鲜菌落涂抹在植株的伤口上, 这种方法诱导生根率高且易于操作。在侵染 10 d 后, 从致伤部位就有毛根发生, 而到 1 个月时, 产生的毛状根有的可达 5 cm 长。涂抹法和浸泡法不同侵染方法对试管苗诱导生根、毛状根成愈及分化的影响见表 2。由表 2 可以看出发根农杆菌的侵染采用涂抹法根诱导率、成愈率及分化率远远高于浸泡法, 所以, 对于发根农杆菌的侵染应采用新鲜菌落涂抹伤口进行侵染。

2.3 发根农杆菌对马铃薯块茎侵染转化结果

在水琼脂培养基上, 经制备菌液侵染的块茎 7 d 后即有很小的毛状根突起产生, 2 周后即有大量毛状根产生, 三周后毛状根产生量有所减少, 有些根上有分枝。毛状根的向地性减弱, 往往平行或向上生长。实验结果见表 3。

表 2 不同侵染方法对试管苗诱导生根、成愈及分化的影响

品 种	侵染方法	毛状根诱导情况		毛状根成愈情况		愈伤组织分化成苗情况	
		幼根数 / 处理数	频率	成愈数 / 处理根数	成愈率 %	成苗数 / 处理数	分化率 %
甘农薯 1 号	涂抹法	69/15	4.62	19/50	38.01	2/19	10.53
	浸泡法	7/27	0.25	3/27	1.11	0/3	0
澳布	涂抹法	65/15	4.30	10/50	20.0	1/10	10.0
	浸泡法	4/34	0.11	1/10	10.0	0/1	0
HLS	涂抹法	71/15	4.75	13/50	26.0	1/13	7.69
	浸泡法	7/32	0.22	2/10	20.0	0/2	0
青薯 1 号	涂抹法	72/15	4.80	17/50	34.0	1/17	5.88
	浸泡法	9/37	0.24	1/10	10.0	0/1	0

注: 频率 = 幼根数 / 处理数; 成愈率 % = 成愈数 / 处理根数 $\times 100$; 分化率 % = 成苗数 / 处理愈伤组织块数 $\times 100$;

表 3 发根农杆菌对甘农薯 1 号、夏波蒂块茎盘诱发毛状根、成愈及分化的结果

处 理	品 种	毛状根诱导情况		毛状根成愈情况		愈伤组织分化成苗情况	
		幼根数 / 处理数	频率	成愈数 / 处理根数	成愈率 %	成苗数 / 处理数	分化率 %
菌液	甘农薯 1 号	316/27	11.70	31/100	31.0	2/31	6.45
	夏波蒂	373/27	13.81	27/100	27.0	1/27	3.70
CK	甘农薯 1 号	0/18	0	-	-	-	-
	夏波蒂	0/18	0	-	-	-	-

将经上述诱发产生的毛状根转到愈伤组织诱导培养基上(附加 Kan、Cb)后约 1 周左右根段两端就有微小愈伤组织产生, 3 周时其成愈率分别为 31.0%和 27.0%。转化愈伤组织分化成苗比较困难, 所有处理得到的愈伤组织共分化出 3 个苗子, 分化率分别为 6.45%和 3.70%。

2.4 转化材料的冠瘿碱分析

对于转化得到的具有 Kan 抗性的植株及愈伤组织进行冠瘿碱分析, 均有胼脂碱合成, 而对照则无胼脂碱合成(图 1), 初步表明转化材料整合了农杆菌具有的胼脂碱合成基因的 T-DNA, 目的基因获得了表达。



图 1 转化材料冠瘿碱检测电泳图

注: 图中由左至右依次为甘农薯 1 号、HLS、发根诱导的愈伤组织、Napoline 标样, CK。

2.5 转化材料的抗病性鉴定

对转化的试管苗经过继代扩繁后的小植株进行接种, 初步测定表明转基因植株均具有一定的抗性, 结果见表 4; 但对于成株抗性及贮藏块茎的抗性表达情况尚待进一步测验。

表 4 转化试管苗及微型薯抗性测定

处理	接种株数 (个)	5d 后发病 株数(个)	发病率 (%)
甘农薯 1 号	10	1	10.0
澳布	10	1	10.0
HLS	10	2	20.0
夏波蒂	10	1	10.0
CK ₁	10	9	90.0

注: 发病率(%) = 发病株数 / 接种株数 × 100; CK₁ 未经转化的试管苗直接接种。

3 小 结

该研究所用的抗性筛选系统中, 不同时期加入 Kan 的量是决定选择有效性的的重要因素。在筛选早期只要加入能够抑制正常植株生长、生根的 Kan 剂量(50 ng·L⁻¹), 就可基本达到筛选之目的, 而到抗性芽生根阶段为防止假阳性转化体的出现, 应将 Kan 的量增加到 100 ng·L⁻¹, 以达到更有效地选择。本研究结果表明, 对于发根农杆菌侵染马铃薯试管苗应采用新鲜菌落直接涂抹伤口进行侵染, 这种方法诱导生根率高且易于操作, 根诱导率、成愈率及分化率远远高于浸泡法。发根农杆菌菌液侵染甘农薯 1 号和夏波蒂两品种的块茎盘, 7 d 后就有很小的毛状根突起产生, 2 周后即有大量毛状根产生, 3 周后毛状根产生量有所减少, 产生的毛状根 3 周时其成愈率分别为 31.0%和 27.0%, 愈伤组织分化成苗比较困难, 分化出 3 个苗子, 分化率分别为 6.45%和 3.70%。转化材料进行冠瘿碱检测表明, 分化苗都是胼脂碱阳性反应。环腐病菌接种试管苗及微型薯结果表明, 分化植株与对照相比抗性明显增强。

本研究论文得到戴朝曦、孙顺娣教授的指导帮助, 特此致谢。

[参 考 文 献]

- [1] 中国农作物病虫害编辑委员会. 中国农作物病虫害(上册)[M]. 北京: 农业出版社, 1979.
- [2] 张艳霞, 刘伟华, 姜静, 等. Ri 质粒诱导的植物发根培养系及其应用[J]. 生物技术, 1997, 7(3): 4-6.
- [3] 刘伟华, 姜静, 石锐, 等. 发根土壤农杆菌 Ri 质粒对黄瓜进行遗传转化的研究[J]. 植物研究, 1997, 17(4): 436-440.
- [4] Khan A N A, Hetty K S, Patil R B. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in Rhizosphere and root tissue of susceptible and resistant varieties of *Solanum melongena*[J]. Phytopathol, 1988, 121: 313-317.
- [5] Hanisch ten Cate C H, Loonen A E H M, Ottaviani L M P, et al. Frequent Spontaneous deletions of Ri T-DNA in *Agrobacterium rhizogenes* transformed potato roots and regenerated plants[J]. Plant Molecular Biology, 1990, 14: 735-741.
- [6] Otten L. A rapid microscale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities[J]. Bioch Biophys Acta, 1978, 527: 497-500.
- [7] Horsch R B. Detection of nopaline and octopine in transformed tissue[J]. Proc Natl Amer Sci USA, 1986, 83: 4428-4432.
- [8] 方中达. 植病研究法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.

Agrobacterium rhizogenes- mediated Transformation of Potato with Shiva1

Liu Chunyuan, Yin Xianping, Xing Xiaoping

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: The potato cvs. Gannongshul, Aobu, HLS and Shepody were transformed using the bacterium strain containing Ri plasmid 530 shiva with Shiva1 gene. In this research, the 50 ng·L⁻¹ and 100 ng·L⁻¹ were used as the selection dosages for selecting the transgenic plants(Kan^R). The results showed that the wounded potato tube- seedling should be directly transformed using fresh colony. This method was easy to operate and the hair-root, calli and regenerated plantlets were higher than dipping method. Five plantlets were regenerated using this method. When dipping method was used to transform the tuber- disc of Grannongshul and Shepody, very small hair- root was formed after 7 days of inoculation, and plentiful hair- roots was produced after 2 weeks. However, the production of hair- root was reduced after 3 weeks. The ratio of calli was 31.0% and 27.0%, respectively, for these two cultivars. Three plantlets were regenerated, the ratio of regeneration being 6.45% and 3.70%, respectively. The transformed material contained the opine when tested. Furthermore, the transgenic test- tube plantlets were proved to have resistance to potato ring- rot disease.

Key Words: Agrobacterium rhizogenes; Shiva1; transformation; Solanum tuberosum

关于征集 2008 年中国马铃薯大会会议论文的通知

为落实 2007 年中国作物学会马铃薯专业委员会学术年会会议纪要精神, 专业委员会决定于 2008 年 4 月在北京延庆召开中国马铃薯大会 马铃薯专业委员会年会暨学术研讨会), 会议主题为“马铃薯产业——更高、更快、更强”。现开始征集论文, 具体要求如下:

- ①内容新颖, 文字简练, 数据可靠, 图表清晰。
- ②反映近年来各地科研、生产、开发等方面的成果、信息。
- ③学术论文要求不超过 5 000 字 (含图表), 一般论文 3 000 字以内。
- ④要求提供电子版文档, 另寄打印稿一份。
- ⑤来稿请注明第一作者简介, 包括性别、出生年、职务职称、研究方向等, 同时提供联系电话。
- ⑥来稿及电子邮件请务必注明“年会论文”字样。
- ⑦学术论文书写格式: 标题、作者姓名、单位、邮编、中文摘要、关键词、前言、材料与方法、结果与分析、结论与讨论、参考文献、英文摘要、英文关键词。

截稿日期: 2008 年 3 月 1 日 来稿请寄: 哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部
邮政编码: 150030 E- mail: china- potato@163.com potatojb@mail.neau.edu.cn

中国作物学会马铃薯专业委员会