

中图分类号: S532, Q311 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)02-0077-04

利用农杆菌介导法将 PVA-CP 基因导入 马铃薯品种东农 303 的研究

于凤丽, 卢翠华*, 李文斌, 石 瑛, 邬震坤, 梁彦涛

(东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 以马铃薯早熟品种东农 303 的微型薯为受体材料, 对其再生和农杆菌介导的遗传转化体系进行了研究, 成功地将 PVA-CP 基因导入马铃薯中。结果表明: 在加入 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZT 和 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 的培养基上微型薯再生频率最高达 95%; 农杆菌侵染薯块时, 用浓度为 $\text{OD}_{600}=0.5$ 的菌液, 侵染 5 min, 共培养 2 d 转化频率最高; 在诱导芽阶段加入 $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的卡那霉素, 采用延迟筛选的方法。得到的抗性芽有 22 株在含 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的培养基上生根。经 PCR 和 PCR-Southern 杂交检测, 15 株为阳性植株。初步证明了 PVA-CP 基因已导入并整合到马铃薯品种东农 303 的基因组中。

关键词: 农杆菌; PVA-CP 基因; 马铃薯; 遗传转化

马铃薯 A 病毒 (potato virus A, PVA) 是危害马铃薯的主要病毒之一, 它可使受侵染的马铃薯的产量降低 40% 以上^[1]。PVA 可随种薯的引进而进行传播, 由于至少有 7 个种的蚜虫可以非持久的方式传播该病毒, 而这些蚜虫在国内又很普遍, 该病毒的扩散可能性就很大。PVA 还常与 PVY 或 PVX 复合侵染, 引起叶片斑驳皱缩, 严重时早期枯死, 减产十分严重^[2]。目前已知马铃薯抗病毒途径有多种, 而转 CP 基因途径被认为是最有应用潜力的途径之一。多数用 CP 基因转化马铃薯的试验都获得了抗病毒株系^[3]。

本试验利用农杆菌介导法将 PVA-CP 基因导入马铃薯品种东农 303 中, 获得了大量转基因植株。试验转化过程中对农杆菌侵染浓度、预培养时间、抗生素浓度的改变, 进行了系统的研究, 期望通过基因工程手段来提高马铃薯对病毒病的抗性, 为马铃薯育种提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 植物材料与外源基因

本试验以马铃薯品种东农 303 的微型薯为转化

收稿日期: 2005-01-05

作者简介: 于凤丽 (1978-), 女, 东北农业大学硕士研究生, 从事马铃薯生物技术研究。

* 通讯作者: cuihualu2000@yahoo.com.cn

受体, 外源基因为 PVA-CP 基因 (图 1)。

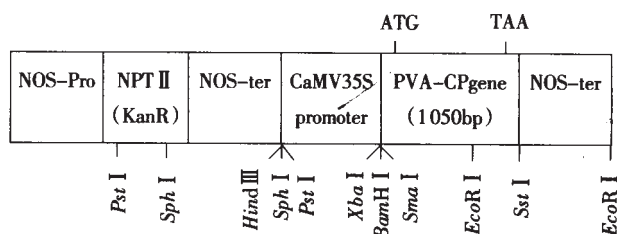


图 1 PVA-CP 基因植物表达载体图谱

1.2 外植体的转化与再生

1.2.1 外植体再生系统的优化

外植体的再生频率是影响遗传转化效率的主要因素之一。本试验设四种不同激素配比的培养基 (表 1), 比较微型薯的再生频率。

表 1 再生培养基不同的激素浓度

培养基	ZT ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	2.0	1.0	-
2	3.5	0.88	-
3	5.0	1.0	-
4	1.0	1.0	1.0

1.2.2 诱导芽与生根选择压的确定

将马铃薯微型薯消毒后削去表皮, 切成厚度为1 mm, 大小约0.3 cm²×0.5 cm²的薄片, 分别接种于附加0、25、50、75、100 mg·L⁻¹ Kan的诱导培养基上。培养4周后, 调查试验结果并确定抑制芽分化的最低Kan浓度。

将无菌苗幼嫩茎尖插入附加0、25、50、100、150 mg·L⁻¹ Kan的无激素MS培养基, 3周后观察无菌苗的生根状况, 并确定抑制生根的最低Kan浓度。

1.2.3 农杆菌工程菌液的准备

从YEB固体培养基上选取新鲜单菌落接种于50 mL含卡那霉素50 mg·L⁻¹和利福平(50 mg·L⁻¹)的YEB液体培养基中, 于28℃, 在摇床上避光振荡培养至对数生长期。取部分倒入无菌离心管中, 4000 r·min⁻¹离心5 min收集菌体, 用液体MS洗涤菌液2次后, 重悬于该培养液中即可用于转化。

2.2.4 外植体的侵染和植株的再生

制备好的薯片与农杆菌工程菌液混和, 室温下不断轻轻摇动, 使菌液与薯片充分接触。无菌滤纸吸去多余菌液, 黑暗条件下共培养2 d后。转入光下培养3周左右即可分化出芽。待芽长1.5~2.0 cm时切下转入生根培养基, 进行生根筛选扩繁。为了比较侵染过程中不同处理对外植体形成抗性芽的影响, 试验共设8种处理(表2)。

表2 不同的试验处理

处 理	菌液浓度	感染时间 (min)	共培养时间 (d)
1	0.1	5	2
2	0.5	5	2
3	0.1	10	2
4	0.5	10	2
5	0.1	5	4
6	0.5	5	4
7	0.1	10	4
8	0.5	10	4

1.3 转基因植株的鉴定

1.3.1 PCR 检测

将待检测植株和对照植株的叶片用CTAB法提

取植物总DNA。参照Sambrook等^[4]的方法对22株Kan抗性植株进行PCR检测, 设阳性对照(质粒DNA为模板)、阴性对照(未转化的东农303为模板)和水空白对照。PCR反应总体积为25 μL, 反应参数为: 94℃ 7 min, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环35次, 72℃ 5 min, 4℃终止。反应终止后, 经溴乙锭-琼脂糖电泳并摄影记录。

1.3.2 PCR-Southern 杂交

PCR反应产物经溴乙锭-琼脂糖电泳后, 将DNA转移至硝酸纤维素膜上。以地高辛标记的PVA-CP基因为探针, 采用Southern检测试剂盒进行分子杂交。

2 结果与分析

2.1 再生系统的优化

外植体在4种培养基上的芽诱导率基本都在75%以上, 3号培养基的诱导率达95%, 这表明植株再生频率最高的培养基为3号。这样, 为后续转化试验确立的最佳培养基是3号。

2.2 微型薯遗传转化条件的确定

2.2.1 选择压的确定

外植体经过4周的培养, 对照组的外植体能长出绿色健壮小芽, 随着选择压力的增高, 外植体逐渐变黄, 长出的芽也是弱小的。在Kan浓度为20 mg·L⁻¹的压力下, 外植体愈伤化情况与对照差异不显著; 在50 mg·L⁻¹压力下, 外植体有些黄化, 出芽较晚且弱; 而在75 mg·L⁻¹的压力下, 外植体出现黄化进而死亡。因而确定芽诱导时的选择压力为75 mg·L⁻¹。

马铃薯植株经过3周生根培养, 对照组的根毛较长, 根白而且纤细, 数量多。随Kan浓度的增高, 根毛数量逐渐减少, 生长迟缓。在75 mg·L⁻¹的培养基中也能生根, 但生长缓慢, 根短且黄, 根毛少。当Kan浓度为100 mg·L⁻¹时, 植株出现黄化不能生根。因而确定转化植株生根时的Kan浓度为100 mg·L⁻¹。

另外, 试验中发现共培养完成后, 将薯块转到无选择压的培养基恢复培养5~7 d, 然后再转到含75 mg·L⁻¹ Kan的筛选培养基上, 这种延迟筛选的方法可使转化率提高。

2.2.2 侵染和共培养时间的确定

试验结果表明(表3), 菌液浓度、感染时间和

共培养时间对马铃薯的转化有明显的影 响。菌液浓度太低, 在共培养未见到外植体四周出现菌液, 经在含 Kan 的培养基上筛选后, 获得的抗性芽也较少。然而, 侵染时间或共培养时间太长 (4 d) 常会因残留在外植体表面的根癌农杆菌生长过旺, 以致掩埋整个外植体, 最终导致外植体变褐并死亡。

表 3 不同的侵染处理对植株再生的影响

处理	感染薯片数 (个)	产生芽总数 (个)	Kan 抗性芽数 (个)
1	80	2	0
2	80	113	83
3	80	6	1
4	80	11	7

菌液浓度 $OD_{600}=0.5$ 、侵染 5 min 和共培养 2 d 为最佳转化条件, 其转化频率为 35% (图 2 和图 3)。转化频率=生芽外植体数/感染总外植体数 $\times 100\%$ 。

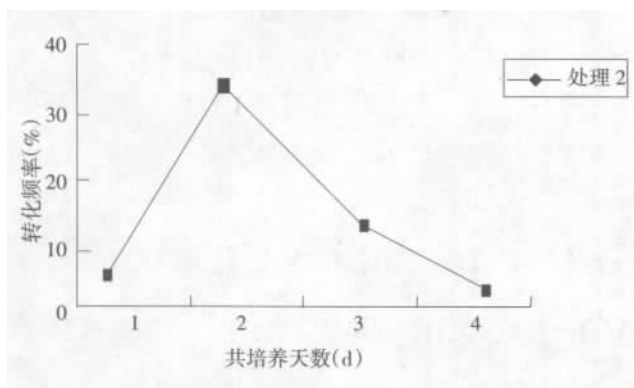


图 2 共培养时间对马铃薯转化频率的影响

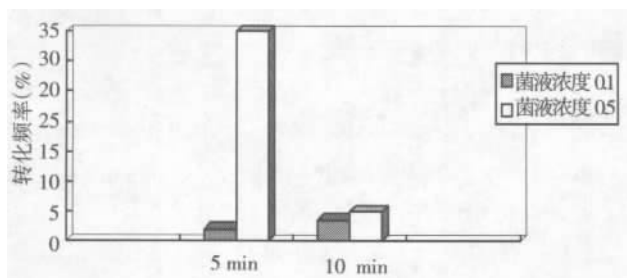


图 3 侵染时间和菌液浓度对马铃薯转化频率的影响

2.3 抗性植株的再生

将长度在 1.5~2.0 cm 的抗性芽插入到成苗培养

基 $MS+100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Kan}+80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ cef}$ (进口)) 培养, 2 周后发现, 在获得的 91 个 Kan 抗性芽中有 22 株长出不定根, 根系发育良好, 植株生长正常。

2.4 Kan 抗性植株的 PCR 和 PCR-Southern 检测

PCR 扩增产物的电泳分析结果表明 (图 4), 待鉴定的 22 株 Kan 抗性植株中, 有 15 株的 DNA 能扩增出分子量约为 1050 bp 的特异条带, 阳性率为 68.2%; 而未转化的对照植株及其余的待测植株则无此条带, 从而初步证明这 15 株再生植株为转基因植株。

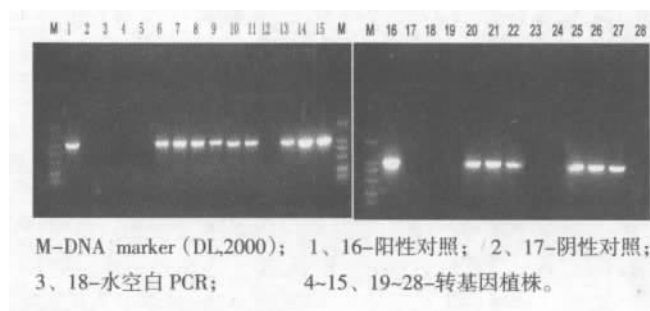


图 4 转基因植株的 PCR 检测结果

PCR-Southern 检测结果表明 (图 5), 15 株再生植株的 PCR 扩增条带均可特异性地与 PVA-CP 基因的探针杂交。而对对照植株的扩增产物却无此杂交带。由此证明了 PCR 扩增出条带确为目的基因, 同时进一步证实了此目的基因已被导入并整合到转化植株的基因组中。

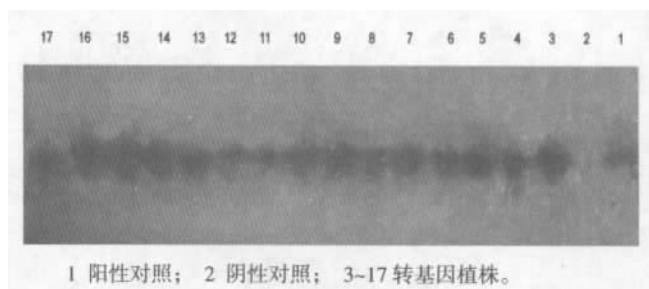


图 5 转基因植株的 PCR-Southern 杂交结果

3 讨论

利用农杆菌介导法进行马铃薯遗传转化, 外植体主要以叶片、茎段、试管薯和微型薯为主。使用马铃薯微型薯作为转化起始材料有以下优点: (1) 取材容易, 转化过程简便, 易于操作; (2) 周期短,

与叶片相比, 薯块的基因启动表达快且整齐^[5], 3~4周即可得到抗性芽; (3)再生频率高, 本试验获得了91个Kan抗性芽, 其中有22株通过了生根筛选。

本试验中经过分化和生根两轮筛选, 转化植株的PCR阳性率为68.2%。薯块与农杆菌共培养后放在不含Kan的培养基中恢复培养5~7d, 然后再移入选择培养基筛选转化芽, 这种延迟筛选的方法既有利于转化细胞生长又不会产生更多的嵌合体, 可以提高转化率。

在遗传转化过程中, 抗生素的使用是影响外植体生长发育的主要因素之一。使用国产头孢噻肟钠或羧苄青霉素作为抑菌剂浓度需在 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 这样大剂量的药物会造成外植体生长及分化困难, 得到的再生植株长势弱^[6]。本试验采用进口头孢噻肟钠, 在脱菌过程中浓度在 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即可控制农杆菌生长, 对外植体分化未发现不良影响。

作为好的遗传操作系统其组织培养的再生频率至少应在80%以上, 且每块外植体必须再生丛生芽^[7]。建立高效稳定的组织培养体系是提高转化频率的必要条件之一。本试验从植物培养基激素配比、农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间等因

素进行摸索和改进, 建立了一套较高效的遗传转化体系。优化的再生系统95%的薯块上都有丛生芽产生, 经遗传转化后其再生率最高能达到35%, 说明此遗传转化系统适用于微型薯的高频率转化。

[参 考 文 献]

- [1] Hooker W J. Compendium of potato diseases[M]. The American Phytopathological Society, 1981.
- [2] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所. 中国马铃薯栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990, 266-290
- [3] 赵福宽, 张鹤龄, 哈阿古拉, 等. 马铃薯转CP基因育种研究进展[J]. 北方园艺, 1994, 4: 40-41.
- [4] Sambrook J, E F Frisch, T Maniatis. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press [M]. 1989.
- [5] 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.
- [6] 苏俊峰, 卢翠华, 田兴亚, 等. Bt基因导入马铃薯品种大西洋的研究[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(5): 257-259.
- [7] 贾士荣, 屈贤铭. 马铃薯抗菌肽基因工程[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996, 167-175.

Introduction of PVA-CP Gene into Potato Cultivar Dongnong 303 by Agrobacterium-mediated Transformation

YU Feng-li, LU Cui-hua, LI Wen-bin, SHI Ying, WU Zhen-kun, LIANG Yan-tao

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Various factors influencing Agrobacterium-mediated genetic transformation and regeneration were investigated. The PVA-CP gene was introduced into microtuber explants of potato cultivar Dongnong 303. The highest frequency of regeneration was obtained on the medium with $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZT and $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA. The optimum genetic transformation system was as following: the Agrobacterium concentration was $\text{OD}_{600} = 0.5$; infection time, 5 min; co-cultivated time, 2 days; and the concentration of kanamycin used in resistant buds selection, $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Twenty two resistant buds rooted on the medium containing $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kanamycin. Results of PCR and PCR-Southern hybridization indicated that 15 regenerated plants were positive. These evidences suggested that the PVA-CP gene had been introduced and integrated into the genome of Dongnong 303.

Key Words: *Agrobacterium tumefaciens*; PVA-CP gene; potato; genetic-transformation