

Bt 基因导入马铃薯品种大西洋的研究

苏俊峰, 卢翠华*, 田兴亚, 李 晶, 于凤丽, 邸 宏, 高丽娜

(东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要: 通过基因工程手段, 利用农杆菌介导法, 将 Bt 基因导入马铃薯品种大西洋, 同时对马铃薯品种大西洋的叶片再生体系进行优化, 探讨了影响植株再生频率和遗传转化效率的因素, 确立了最佳植株再生体系和遗传转化条件, 获得了转基因植株。

关键词: 马铃薯; 再生; 遗传转化; Bt 基因

中图分类号: S532.Q343.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3635 (2004) 05-0257-04

1 前 言

在马铃薯的生产过程中, 虫害是造成马铃薯减产的重要原因之一。据不完全统计, 全世界农作物每年因病虫害造成的损失约占其总产量的 37%, 其中 13% 是由虫害引起的。化学药剂易造成对生态平衡的破坏, 培育抗虫品种育种周期长, 可供利用的抗源匮乏而使其应用受到了很大的限制。随着分子生物学的迅速发展, 利用基因工程技术, 将外源基因导入农作物, 提高农作物的抗虫能力, 解决了常规技术无法解决的问题^[1,2]。

本试验利用农杆菌介导法将 Bt 基因导入马铃薯普通栽培种大西洋中, 研究了影响马铃薯转化效率的主要因素及培养条件, 建立了适于马铃薯遗传转化的体系, 为马铃薯抗虫育种寻求一条快速有效的途径。

2 材料与方 法

2.1 试验材料

生产上主栽的马铃薯品种大西洋 (Atlantic) 脱毒试管苗为试验材料。

收稿日期: 2004-07-30

作者简介: 苏俊峰 (1977-), 男, 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

菌株 EHA105, 含 PGBI4A2B 质粒, 双元载体 PGBI4A₂B 含有两个双向人工合成的 GFMcry I 杀虫基因, npt II 基因和 gus 基因, 启动子为 CaMV35S, 终止子为 nos(图 1)。

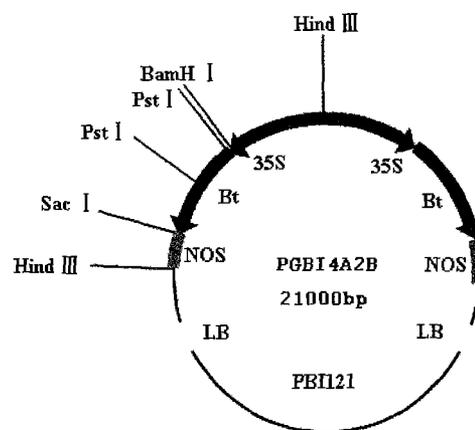


图 1 质粒 PGBI4A2B 图谱

2.2 试验方法

2.2.1 菌株的活化

从抗性平板上挑取单菌落接种于含 25 mg/L 的氯霉素 (Chl) 和 50 mg/L 的卡那霉素 (Kan) 的 50 mL 的 YEB 液体培养基中, 28 °C、140 r/min 振荡培养过夜, 然后取 5 mL 接种于 50 mL 含同样抗生素的 YEB 液体培养基中, 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.5 即可用于侵染。

2.2.2 叶片转化方法

取叶片在叶脉中部垂直切 2~3 个切口, 光面朝下, 置于培养基中 (MS+0.2 mg/L NAA+5 mg/L GA₃+2.25 mg/L BA) 预培养 2 d, 取出外植体, 浸入重悬菌液, 5~10 min 后, 放于培养基中暗处共培养 3 d。用无菌水清洗 3 次, MS 培养基清洗 2 次, 转入含 50 mg/L 的卡那霉素、200 mg/L 的进口头孢噻肟钠的愈伤培养基上进行培养, 20 d 后观察愈伤诱导和芽诱导情况, 待抗性苗长至 1.0~1.5 cm 高时, 切下转入 MS+75 mg/L 卡那霉素+200 mg/L 的进口头孢噻肟钠的生根培养基中选择生根, 对生根的植株进行分子鉴定。

2.2.3 转基因植株的鉴定

(1) PCR 检测方法: 采用 SDS 微量法提取转基因植株叶片的总 DNA; 利用碱裂解法提取质粒 DNA; 以转化后再生植株叶片为模板, 质粒 DNA 为阳性对照, 未转化植株叶片 DNA 为阴性对照, 分别对两个引物进行 PCR 扩增, 从分子水平上鉴定目的基因转化情况。

primer I: 5'-AGCATGCCATACAACACTGC-3'

primer II: 5'-TCAAGATGTCCATCAAGTG-3'

(2) PCR 反应体系: 25 μL (10×Buffer 25 μL, dNTP 2.0 μL, primer I (10 pmol/μL) 0.5 μL, primer II 0.5 μL, 模板 1.0 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 超纯水 18 μL, 终体积 25 μL)

(3) PCR 反应条件: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 50 s; 52℃ 退火 50 s; 72℃ 延伸 2 min; 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 终止反应。

(4) PCR-Southern 杂交: 采用地高辛标记和检测试剂盒; 质粒 DNA 的纯化与回收采用小量胶回收试剂盒; 探针标记采用随机引物法; 以阳性抗性植株幼嫩叶片提取植物总 DNA, 以其为模板, 用 Bt 基因的特异引物进行 PCR 检测, 阴性对照为未转化的同一品种植株 DNA, 以质粒作为阳性对照, 与用地高辛标记的 Bt 基因探针进行 Southern 杂交检测。

3 结果与分析

3.1 遗传转化因素探讨

3.1.1 菌液浓度的确定

菌液浓度对于不同植物的不同外植体有一定的差异, 一般浓度范围是 OD₆₀₀=0.05~0.70 之间, 本试

验以大西洋为转化材料, 根据有关资料设置了 4 个浓度^[24], 分别为 OD₆₀₀=0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 结果表明, 农杆菌浓度 OD₆₀₀=0.5 时抗性愈伤诱导率最高, OD₆₀₀=0.8 和 1.0 时, 外植体伤口变黑, 很难在愈伤组织诱导过程中将农杆菌除去。

3.1.2 侵染时间的确定

设置侵染时间为 5、8、10、12、15 min, 研究表明, 叶片最佳侵染时间为 10 min。

3.1.3 预培养时间的确定

设置预培养时间为 1、2、3、4 d, 与不进行预培养的对照组进行比较, 结果表明, 预培养时间以 2 d 为最佳, 这时抗性愈伤诱导率最高。

3.1.4 共培养时间的确定

设置了共培养 1、2、3、4 d 的试验组, 以不进行共培养的外植体作为对照组, 结果表明, 不进行共培养, 农杆菌侵染效率低, 外植体在培养基中很快黄化, 说明外源基因未能整合到马铃薯基因组中; 共培养时间长, 农杆菌繁殖过于旺盛, 使材料严重污染, 无法除去农杆菌, 很快发黑死亡。试验表明, 叶片合适的共培养时间为 3 d, 此条件下抗性愈伤诱导率最高。

3.1.5 抑菌剂的筛选

吸取 100 mL 菌液于含有国产头孢噻肟钠和进口头孢噻肟钠的抗性平板上, 浓度梯度为 0、100、200、300、400、500 mg/L, 28℃ 培养过夜。结果表明, 国产头孢噻肟钠在 400 mg/L 时, 进口头孢噻肟钠在 200 mg/L 时可抑制农杆菌的生长。

3.1.6 选择压力的确定

(1) 愈伤诱导选择压力的确定共设计了 5 个浓度梯度 (0、25、50、75、100), 将叶片外植体转入含有不同浓度 Kan 的愈伤诱导培养基中, 经 10~20 d 的培养, 结果表明, 50 mg/L 的浓度下, 外植体愈伤部位发黄、干而疏松, 为最适宜的选择压。

(2) 生根培养选择压力的确定共设计了 5 个浓度梯度 (0、25、50、75、100), 将叶片外植体转入含有不同浓度 Kan 的愈伤诱导培养基中, 经 10~20 d 的培养, 结果表明, Kan 浓度为 75 mg/L 的培养基中, 外植体不能生根, 茎部不生长, 为最适宜的选择压力。

3.3 抗性植株的 PCR 检测

将获得 101 株再生植株, 接种于含 75 mg/L 的生根培养基中进行抗性筛选, 对筛选获得的抗性植

株进行继代培养形成株系, 取抗性植株幼嫩叶片提取植物总 DNA, 以其为模板, 用 Bt 基因的特异引物进行 PCR 检测, 阴性对照为未转化的同一品种植株 DNA, 以质粒作为阳性对照, 扩增出 0.9 Kb 大小片段的样品为阳性株, 其中 PCR 检测呈阳性的有 3 株, 转化率为 2.96%(图 2)。

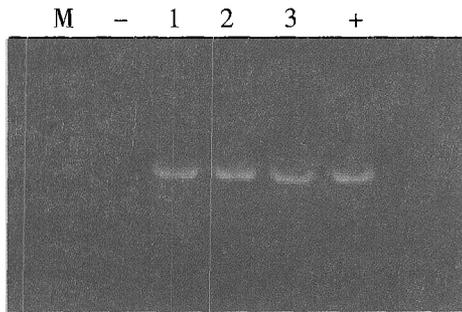


图 2 转 Bt 基因抗性植株的 PCR 检测

3.4 PCR-Southern 杂交

以阳性植株的总 DNA 为模板进行 Bt 基因的 PCR 扩增, 以未转化的同一品种植株 DNA 为阴性对照, 以质粒为阳性对照, 与用地高辛标记的 Bt 基因探针进行 Southern 杂交检测。结果如图 3 和 4, 3 个阳性株系均呈现与质粒 DNA 相同的杂交带, 而阴性对照无杂交带, 证明 Bt 基因已经整合到受体马铃薯的基因组中。

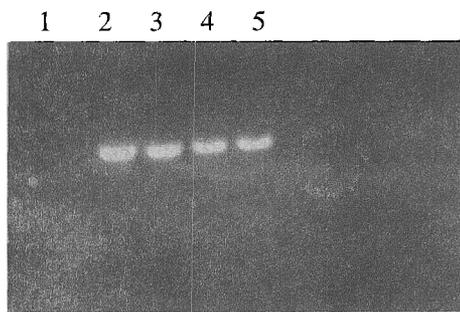


图 3 转膜前凝胶电泳

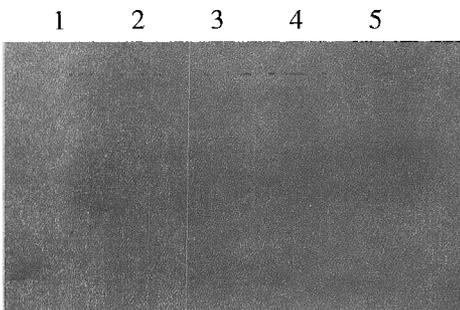


图 4 PCP-Southern 杂交结果

泳道 1: 阴性对照; 泳道 2~4: 转 Bt 基因的阳性株;
泳道 5: 阳性对照。

4 讨论

以大西洋叶片为转化体, 采用农杆菌介导法成功地进行了遗传转化, 获得了经 PCR-Southern 杂交检测的转 Bt 基因的 3 株转基因植株。

试验采用国产头孢噻肟钠在 400 mg/L 时可抑制农杆菌的生长, 但采用国产头孢噻肟钠作为抑菌剂时, 愈伤分化困难, 所得再生植株长势弱, 且后期农杆菌污染严重, 很难获得转化植株。而进口头孢噻肟钠在 200 mg/L 时既可抑制农杆菌的生长, 且对愈伤的分化无不良影响, 脱菌效果好。

本试验采用四种普通栽培种材料进行转化, 大西洋表现最好, 获得了 3 株再生转化体植株, 进一步说明了农杆菌的遗传转化基因型的依赖性, 其原因和解决方法还在进一步的研究中, 这也成为农杆菌遗传转化的限制因素。

本试验在分化和生根阶段采用卡那霉素两轮筛选后采用 PCR 和 PCR-Southern 检测, 有部分转化体未扩增出特异条带, 说明出现了非转基因植株。非转基因植株的出现在遗传转化中是不可避免的, 其原因可能是:

(1) 外植体的再生部位与选择培养基未充分接触, 由于外植体的生长和体积扩大, 其一部分仍可能翘于培养基之上, 特别是叶片这种现象非常明显, 使这一部分的选择压力不足。

(2) 转化细胞的代谢产物可能转至邻近的非转化细胞中, 使非转化细胞能在一定程度上耐受选择压力, 继续分化成植株。

(3) 出现了生理抗性植株。因此为了减少后期的工作量, 前期必须进行严格筛选, 以最大限度的淘汰非转基因植株。

参 考 文 献

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] 郭三堆. 植物 Bt 抗虫基因工程研究进展[J]. 中国农业科学. 1995, 28(5): 8-13.
- [3] 卢翠华 李晶, 石瑛, 等. 几丁质酶基因导入马铃薯品种东农 303 的研究[J]. 中国马铃薯, 2003, 17(5): 277-279.
- [4] 王丹, 朱常香, 郑成超, 等. 根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化条件的优化 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版). 2002, 33(1): 23-27.

营养元素的缺乏与过量对马铃薯脱毒苗生长的影响

陈永波, 李卫东, 赵清华, 钟刚琼

(湖北恩施南方马铃薯研究中心, 恩施 445000)

摘要: 以 EM3-1 营养液为基础研究了 N、P、K、Ca、Mg、S、微量元素的缺乏、适量和过量三个水平对马铃薯脱毒苗生长状况的影响。结果表明: N、P、K、Ca、Mg 和微量元素的缺乏导致薯苗均不能正常生长并完成其生活史, S 在薯苗生长初期可以缺乏, 但中期即开始表现症状, 过量会对薯苗前期生长造成危害; 相对 EM3-1 营养液, Ca 需适量增加, 而 S 和 Mg 需适量减少; 薯苗到生长中期需及时补充或更换营养液, 否则会造成营养元素的缺乏; 在营养液中, 微量元素是不可缺少的。

关键词: 营养元素; 缺乏; 过量; 马铃薯脱毒苗

中图分类号: S532,Q94691*1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3635 (2004) 05-0260-04

1 前言

营养元素的缺乏与过量对于不同的植物不同时期有不同的表现^[1], 不平衡营养液培养法是研究植物营养元素缺乏与过量症状最为有效的方法, 但由于受以往块茎作物不宜水培的观念影响^[2], 马铃薯脱毒苗营养元素缺乏与过量的症状研究尚未见报道。

在马铃薯脱毒苗营养液壮苗快繁技术研究中, 已明确地提出了营养液中营养元素的合理性配比是影响马铃薯壮苗的决定性因素, 但尚没有系统地研究脱毒马铃薯苗对各种营养元素的适应范围。为了验证各种营养元素在马铃薯苗生长过程中的重要性, 以及营养元素的缺乏与过量对马铃薯脱毒苗生长的影响, 进一步调整营养液的配方, 我单位组培研究室在以前研究较为成熟的 EM3-1 营养液的基础上, 进行了该项试验。因限于篇幅, 在该文中我们仅讨论 N、P、K、Ca、Mg、S 等 6 种大量元素

收稿日期: 2004-04-07

作者简介: 陈永波 (1967-), 男, 大学本科, 高级农艺师, 从事分析检测及组织培养研究工作。

INTRODUCTION OF BT GENE INTO THE POTATO CULTIVAR ATLANTIC

SU Jun-feng, LU Cui-hua, TIAN Xing-ya, LI Jing, YU Feng-li, DI Hong, GAO Li-na

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: In this study, Bt gene was introduced into cv. Atlantic successfully with *Agrobacterium*-mediated method. At the same time, the regeneration system of the cultivar Atlantic was optimized for leaf explants. We discussde the factors which effect the regeneration rate and the transformation rate. A high frequency of re-generation system *in vitro* and genetic transformation system of potato were established, and transgenic plants were gained.

KEY WORDS: potato; regeneration; genetic transformation; Bt gene