

根癌农杆菌介导的马铃薯高效遗传转化体系的研究

张 宁, 司怀军, 李学才, 王 蒂*

(甘肃农业大学农学院, 兰州 730070)

摘 要: 通过根癌农杆菌介导的遗传转化方法, 建立了马铃薯栽培品种 费乌瑞它 (Favorita) ”茎段和试管薯的遗传转化体系, 其转化频率分别可达 25.6%和 36.8%。实验结果表明, 玉米素有助于茎段和试管薯转化再生芽的分化, 乙酰丁香酮可以提高茎段的转化率, 但对试管薯的转化作用效果不明显。卡那霉素生根筛选和 PCR 鉴定结果显示, 在分化培养基上再生的转化植株假阳性率较高, 在遗传转化工作中要加大转基因植株的数量, 才有可能获得所期望的转基因植株群体。

关键词: 马铃薯; 根癌农杆菌; 茎段; 试管薯; 遗传转化

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2004) 03-0132-04

1 前 言

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 为同源四倍体无

收稿日期: 2004 - 03 - 31

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2001AA241132)

作者简介: 张宁 (1975-), 女, 博士, 讲师, 从事马铃薯生物技术及遗传育种研究。

* 通讯联系人: 王蒂, 教授, 博士生导师。

性繁殖作物, 由于其高度杂合性, 常导致自交不亲和和雄性不育, 从而降低了用常规育种方法进行马铃薯改良的效率。近 20 多年发展起来的基因工程技术为马铃薯的遗传改良提供了一条新的途径, 无论是利用基因工程手段创造优质马铃薯育种材料或进行品种改良, 还是进行未知基因功能的研究, 基因的遗传转化技术已成为必不可少的下游技术。

目前已发展了几种方法用于马铃薯转基因的研

为马铃薯种植、加工、销售等各个环节提供良好的环境设施; 加强建立马铃薯行业协会组织和市场信息系统, 保证市场信息的畅通, 引导各市场主体的经营行为; 改善马铃薯产业的投、融资环境, 促进马铃薯产业化的换代升级。

其次, 要重视产业化各环节的有机结合, 形成

产供销一体化。培育和发展一批规模较大、经济实力较强的马铃薯加工企业, 通过“公司+农户”等形式, 联合广大马铃薯种植户, 实现产供销一条龙经营方式, 做到统一规划、统一技术操作规程、统一管理、统一加工和销售, 确保马铃薯及其加工品的质量。

AN ANALYSIS ON THE COMPARATIVE ADVANTAGES AND EXPORT COMPETITIVE CAPABILITY OF POTATOES IN CHINA

LI Qin-zhi, XIE Cong-hua, FENG Zhong-chao

(Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: Based on the history and present situation of potatoes' production and trade in the world, the present situation of potatoes' production and international trade were discussed, and its comparative advantages were analyzed in China. Then, according to the comparison of export competitive capability of potatoes and its proceeds between China and other countries in the world, the paper draws its own conclusion and gives some suggestions.

KEYWORDS: potatoes; comparative advantages; export competitive capability

究, 包括农杆菌介导法^[1-3]、DNA 直接转化原生质体^[4]和基因枪法^[5]等。自从 1983 年第一例农杆菌介导的转基因马铃薯问世以来^[6], 马铃薯基因转化技术不断完善, 但还没有完全程序化。本实验在综合前人研究的基础上, 对影响马铃薯遗传转化效率的几个重要因素做了进一步的探讨, 以期马铃薯基因工程和分子生物学的研究提供高效的遗传转化技术平台。

2 材料与方法

2.1 实验材料

本实验以马铃薯栽培品种“费乌瑞它”试管苗为材料, 试管苗培养基为 MS 基本培养基附加 3%蔗糖。选取苗龄 3 周的试管苗茎段、叶片及膨大一个月的试管薯为转化的受体材料。

2.2 农杆菌菌株

农杆菌菌株为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 含有 pBI121 质粒, 质粒携带 35S 启动子驱动的 GUS 报告基因, 选择标记基因为卡那霉素(kan)抗性基因 *npt II*。

2.3 转化方法

2.3.1 农杆菌活化

将供试农杆菌的单菌落接种于液体 LB 附加 50 mg/L Kan 和 25 mg/L 利福平(Rif)的培养基中, 在摇床上于 28℃, 250 r/min 条件下培养过夜。待菌液混浊时, 取 1 mL 菌液接种于 50 mL 新鲜的上述液体培养基中, 置于摇床上继续振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5 左右时, 离心并用等体积的 MS 液体培养基重新悬浮菌体。

2.3.2 转化方法

剪取无腋芽茎段和去边缘叶盘, 经 24℃、黑暗条件进行预培养 3 d, 培养基为 MS 附加 3%蔗糖和 0.5%琼脂以及不同组合的激素(表 1)。该马铃薯培养基是在综合分析目前已有高效马铃薯转化体系培养基的基础上修改而成。试管薯切成约 1~2 mm 厚的薄片, 不进行预培养。三种外植体在农杆菌悬浮液中分别浸泡 10 min, 取出后用无菌滤纸吸干表面菌液, 然后转入黑暗、28℃条件下共培养 2 d, 再将外植体转入相应的分化培养基上(附加 50 mg/L Kan 和 500 mg/L 羧苄青霉素), 于 25℃, 连续光照下诱导芽分化。4 周后统计愈伤率和分化率。

$$\text{愈伤率} = \frac{\text{愈伤化的外植体数}}{\text{总接种的外植体数}}$$

$$\text{分化率} = \frac{\text{分化芽的外植体数}}{\text{总接种的外植体数}}$$

分别选取茎段和试管薯薄片的最适宜转化培养基, 在菌体二次活化和共培养时, 向体系中分别添加 100 μmol/L 乙酰丁香酮(AS), 来研究 AS 在茎段和试管薯薄片转化中的作用。

表 1 马铃薯分化培养基组成

培养基编号	组成(mg/L)
1	MS+2 BAP+2 NAA
2	MS+2 BAP+5 GA ₃
3	MS+2 BAP+5 GA ₃ +2 ZT
4	MS+1 IAA+2 ZT
5	MS+1 IAA+0.2 GA ₃ +0.5 BAP+2 ZT

2.4 转基因植株抗性筛选

当再生芽长至 1.0 cm 高时, 切下转入 MS+50 mg/L Kan+200 mg/L 羧苄青霉素(Carb)的抗性筛选培养基上, 进行阳性转化植株生根筛选。

2.5 转基因植株 PCR 检测

按小量 DNA 快速提取法^[7]从转基因马铃薯植株中提取总 DNA, 用转化植株的总 DNA 为模板, 以 *npt II* 基因的两个引物 5' -GCTATGACTGGGCA CAACAG -3' 和 5' -ATACCGTAAAGCACGAGGAA -3' 进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件为 94℃, 3 min; 94℃, 45 s; 56℃, 45 s; 72℃, 1 min; 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 预期扩增片段大小为 676 bp。以未转化植株作阴性对照。

3 结果与分析

3.1 激素组合对转化率的影响

表 2 的实验结果显示, 所用的 1 号培养基具有细胞分裂素 BAP 和生长素 NAA 时, 诱导茎段和试管薯薄片抗性愈伤组织的频率都比较高, 但该培养基组分不能使脱分化的组织再分化出不定芽。在 2 号培养基中将 NAA 替换为 GA₃ 后, 高浓度 GA₃ 的作用虽然降低了愈伤率, 但明显促进了茎段愈伤组织芽的再生。在 3 号培养基中由于 2.0 mg/L ZT 的加入, 促进了茎段和试管薯愈伤组织的分化能力。通过 3 号、4 号和 5 号培养基中 ZT 分别与生长素、细胞分裂素及赤霉素的组合实验, 发现 3 号培养基有利于茎段抗性芽的分化, 其分化率可达

18.3%; 而 4 号培养基中 2.0 mg/L ZT 和 1.0 mg/L IAA 的激素组合可以较高频率地提高试管薯薄片的分化率, 可达 26.2%。5 号培养基中的激素组合效果更好, 能够诱导试管薯薄片不经愈伤组织阶段而直接再生抗性芽。

3.2 外植体对转化率的影响

从表 2 还可以看出, 在适宜的培养基上, 试管薯作为遗传转化的受体材料时可以得到较高频率的转化再生芽, 这可能与组成试管薯的薄壁细胞具有较强的分裂能力以及对农杆菌有较好

表 2 激素组合对马铃薯转化外植体愈伤率和分化率的影响

培养基编号	激素组合(mg/L)	茎段		试管薯	
		愈伤率(%)	分化率(%)	愈伤率(%)	分化率(%)
1	2 BAP + 2 NAA	92.2	0.0	38.6	0.0
2	2 BAP + 5 GA ₃	88.5	4.3	12.8	0.0
3	2 ZT + 2 BAP + 5 GA ₃	88.9	18.3	10.2	12.4
4	2 ZT + 1 IAA	87.6	12.4	16.1	26.2
5	2 ZT + 1 IAA + 0.2 GA ₃ + 0.5 BAP	87.6	13.5	0.0	36.8

的感受能力有关。茎段抗性愈伤组织发生较容易, 但其芽的分化频率却不高。对叶盘的转化实验结果显示, 在所研究的 5 种培养基中, 1 号培养基的愈伤率最高, 可达 56.7%, 但愈伤组织状态不理想, 易褐化, 并且在 5 种培养基上分化率均为 0% (未列表)。

这一结果只是说明, 所选用的实验材料费乌瑞它的叶片在所使用的培养基上表现不佳, 并不完全证实叶片不是很好的转化受体, 另有文献报道过适合叶片的转化体系^[8]。

3.3 乙酰丁香酮对转化的影响

实验结果表明, 乙酰丁香酮 (AS) 能明显地提高茎段在抗性培养基上的愈伤率和分化率, 但对马铃薯试管薯薄片的转化效果影响不明显 (表 3)。这可能是由于 AS 这类酚类物质的存在, 有助于农杆菌的趋化以及外源基因在马铃薯茎段受体中的整合过程, 而在马铃薯薯片中酚类物质的本底水平较高, 因此转化效果对外源 AS 的依赖性不强, 这也许是用马铃薯薯块适宜作高效转化受体材料的因素之一。

表 3 乙酰丁香酮对茎段和试管薯转化效果的影响

受体材料	转化方法	愈伤率(%)		分化率(%)	
		不加 AS	加 AS	不加 AS	加 AS
茎段	1 号培养基上诱导 3 周后置于 3 号培养基上分化	92.2	100	18.9	25.6
试管薯	5 号培养基直接分化	0.0	0.0	36.8	36.2

3.4 卡那霉素的筛选结果

在浓度为 50 mg/L Kan 的持续选择压下, 筛选的抗性再生芽需再次用 50 mg/L Kan 培养基进行抗性生根筛选。对本实验得到的 40 株转化植株, 经第一次 Kan 筛选后, 有 28 株转化体生根, 经两次相同浓度 Kan 抗性生根筛选后, 植株生长正常, 获得的可生根阳性转化植株有 22 株, 阳性植株占 55%, 其假阳性率可达 45%。

3.5 转基因植株 PCR 鉴定

对 Kan 初步筛选获得的阳性转化植株进行 PCR 扩增鉴定, 从 22 株植株的 DNA 中都扩增到了转化体特有的 npt II 特异片段, 表明外源基因已整合到受体植株的基因组中。部分扩增结果如图 1。

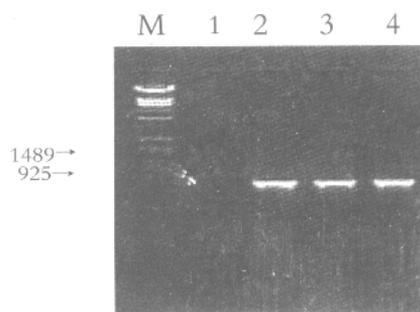


图 1 部分转基因植株 PCR 检测结果

M. λ -Eco t14 I digest DNA marker (TaKaRa);
1. 未转基因植株 PCR 扩增产物;
2-4. 转基因植株 PCR 扩增产物。

4 讨论

农杆菌介导的植物基因转化方法具有操作简便, 转化效率高, 能够转化大片段 DNA, 转基因

拷贝低且遗传稳定等优点^[9], 受到了人们的极大关注。但即使对转化条件已比较成熟的植物如烟草、马铃薯、拟南芥等, 针对不同的基因型、不同的外植体, 转化频率差异仍然很大。本研究筛选了适合马铃薯茎段、试管薯转化较为理想的培养基成分, 其中玉米素的促分化作用相当重要, 配合适当浓度的赤霉素和细胞分裂素, 在 Kan 抗性选择压力下, 转化的茎段和薯片的分化率可高达 25.6%和 36.8%。

早在 1985 年, AS 就被从代谢活跃的烟草根、叶和愈伤组织的提取物中分离得到, 并证明它是 vir 基因的天然诱导剂^[10], 而 vir 基因的表达是 T-DNA 向受体细胞转移所必须的。本研究在茎段的转化系统中添加 AS, 使受浸染的茎段愈伤率和分化率都明显提高, 可见 AS 提高了外植体转化细胞的百分数。但也注意到 AS 对本已高频率转化的薯片几乎没有作用, 推测原因可能为马铃薯薯块受到创伤后, 伤流液中酚类物质含量较多, 而所产生的酚类物质可能起着与 AS 等同的作用。

根据本实验结果, 在持续 50 mg/L Kan 筛选压作用下, 获得的分化植株再经 Kan 生根筛选后, 发现在分化培养基上再生的转化植株的假阳性比例很高, 考虑到从中还要剔除诸如假阳性、转化引起的形态变异、代谢异常、外源基因表达受阻等植株, 所剩余的期望的转基因植株数量会有限, 提示在将来的遗传转化工作中, 一定要扩大转化植株群体, 以便得到所期望的转基因植株数量。

参 考 文 献

- [1] An G, B D Watson, C C Chiang. Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system [J]. Plant Physiology, 1986, 81: 301-305.
- [2] 杨美珠, 潘乃璁, 陈章良. 高效马铃薯遗传转化体系的建立及甜蛋白基因的导入[J]. 植物学报, 1992, 34 (1): 31-36.
- [3] 司怀军, 谢从华, 柳俊. 农杆菌介导的马铃薯试管薯遗传转化体系的优化及反义 class I patatin 基因的导入(英文)[J]. 作物学报, 2003, 29 (6): 801-805.
- [4] Fehér A, K Felföldi, J Preiszner, et al. PEG-mediated transformation of leaf protoplasts of *Solanum tuberosum* L. cultivars [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 27: 105-114.
- [5] Romano A, K Raemaker, R Visser, et al. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment [J]. Plant Cell Rep, 2001, 20: 198-204.
- [6] Ooms G, A Karp, J Roberts. From tumour to tuber; tumour cell characteristics and chromosome numbers of crown gall-derived tetraploid potato plants (*Solanum tuberosum* cv. 'Maris Bard'). Theor Appl Genet, 1983, 66: 169-172.
- [7] Edwards K, C Johnstone, C Thompson. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl Acids Res, 1991, 19: 1349.
- [8] Trujillo C, E Rodriguez-Arango, S Jaramillo, et al. One-step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*) [J]. Plant Cell Rep, 2001, 20: 637-641.
- [9] 李卫, 郭光沁, 郑国昌. 根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展[J]. 科学通报, 2000, 45: 798-807.
- [10] Stachel S, E Messens, M Montagu, et al. Identification of the signal molecules-produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Nature, 1985, 318: 624-629.

AN EFFICIENT TRANSFORMATION SYSTEM OF POTATO MEDIATED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

ZHANG Ning, SI Huai-jun, LI Xue-cai, WANG Di

(College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT: An efficient transformation system has been established for *Agrobacterium*-mediated transformation of potato cultivar "Favorita" with transformation efficiency of 25.6% and 36.8% for internode and microtuber, respectively. The results showed that zeatin is beneficial to shoot regeneration of transformed internode and microtuber. Acetosyringone could increase transformation efficiency of internode while has not an apparent effect on microtuber. Rooting selection on kanamycin and PCR identification demonstrated that the false positive efficiency of transformation is higher among the putative transgenic plants from the differentiation media, and suggested that the desired transgenic plants could be obtained from a large number of transgenic plants in potato transformation.

KEY WORDS: potato; *Agrobacterium tumefaciens*; internode; microtuber; genetic transformation