

几丁质酶基因转入马铃薯品种东农 303 的研究*

卢翠华, 李 晶, 石 瑛, 陈伊里, 王凤义, 吕文河, 秦 昕, 苏俊峰

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 以马铃薯极早熟品种东农 303 的试管薯为外植体, 通过农杆菌介导法成功地将几丁质酶 (PBch) 基因导入马铃薯中。薯块培养基 MS+1 mg/L NAA+2 mg/L ZT, 共培养 3 d 后, 转到含卡那霉素 50 mg/L, 头孢噻肟钠 200 mg/L 的相同的培养基, 待抗性芽长到 1~2 cm 时, 转入含卡那霉素 75 mg/L 的生根培养基进行生根筛选。对获得的 4 株转基因植株进行 PCR 检测及 PCR-Southern 杂交检测, 有 3 株呈阳性, 转化率为 3.2%。

关键词: 马铃薯; PBch; 遗传转化; 农杆菌

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2003) 05-277-03

1 前 言

马铃薯育种周期长是限制其发展的主要因素。成功的基因转化首先依赖于良好的植物受体系统的建立, 马铃薯是以无性繁殖为主, 外植体再生比较容易。本试验在做了大量的不同基因型筛选、不同外植体的组织培养及不同培养基的筛选的基础上, 选用块茎抗晚疫病而植株不抗晚疫病的极早熟马铃薯品种东农 303 为试材^[1], 将广谱抗真菌的几丁质酶基因导入了马铃薯品种东农 303, 达到改良品种的目的, 试图为马铃薯抗病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

试验选用生产上主栽马铃薯极早熟品种东农 303 的脱毒试管薯为试材。

所用的农杆菌菌株为 EHA105, 质粒 pBch 携带几丁质酶的基因及选择标记基因 npt-II, 几丁质酶基因上游为 35S 启动子, 下游为 NOS 终止子 (图 1)。

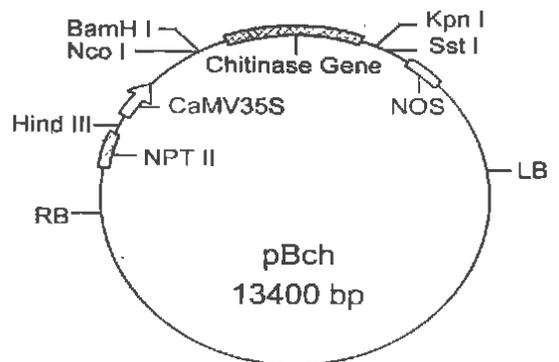


图 1 质粒 pBch 图谱

2.2 试验方法

2.2.1 菌株的活化

将农杆菌化线培养在含有 50 mg/L 卡那霉素和 25 mg/L 氯霉素的 YEB 培养基上, 待长出菌落后, 挑取单菌落接种于 10 ml YEB 液体培养基中, 28 °C 振荡培养过夜。然后取 5 ml 接种于 50 ml 液体培养基中振荡培养, 进行二次活化。当 OD₆₀₀ = 0.5~0.6 时即可用于侵染。

2.2.2 薯块的遗传转化

脱毒试管薯经 75% 的酒精消毒 30 s、0.1% 升汞消毒 10 min 后, 无菌水冲洗 3 遍。去皮切成厚度 1~2 mm 的薄片, 在农杆菌液中浸泡 5 min, 用消毒滤纸吸干, 放入培养基 (MS+2 mg/L ZT+1 mg/L IAA), 在黑暗下共培养 3 d 后, 取出用无菌水冲洗几遍, 转入含 50 mg/L 的卡那霉素 (Kan)、

收稿日期: 2003-05-10

* 黑龙江省科技厅“十五”科技资助项目, 编号: GA01B101-04.

作者简介: 卢翠华 (1957-), 女, 研究员, 主要从事马铃薯生物技术研究

中国知网 <https://www.cnki.net>

200 mg/L 的进口头孢噻肟钠的愈伤培养基上, 进行培养, 培养条件为温度 25 °C, 光照强度 1500 lux, 16 h 光照, 8 h 黑暗, 20 d 后观察愈伤诱导和芽诱导情况^[2]。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 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: 采取 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 DNA 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^[3]。Chi 基因检测:

引物 I: 5' -AGCAGTGTGGAAGGCAAGCAG-3'

引物 II: 5' -CTGAGAGGTGACAAGCTCAG-3'

PCR 反应体系: 25 μl (10 × Buffer 2.5 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)。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 7 min; 94 °C 变性 30 s; 60 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 80 s; 30 个循环。72 °C 延伸 10 min; 4 °C 终止反应。

(2) PCR-Southern 杂交: 采用地高辛标记和试剂盒。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; 以阳性植株的总 DNA 为模板进行 Chi 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 PBch 为阳性对照, 与用地高辛标记的 Chi 基因探针进行 Southern 杂交检测。

3 结果与分析

3.1 遗传转化影响因素探讨

3.1.1 侵染时间的确定

薯片侵染农杆菌时间为 5 min 和 10 min, 经过大量的试验比较, 由于薯片接触菌液的面积大, 如果侵染 10 min, 培养时不易脱除农杆菌, 而侵染 5 min 是最佳侵染时间。

3.1.2 杀菌剂的筛选

分别吸取 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 °C 培养过夜。

结果是进口头孢噻肟钠在 200 mg/L 时便可以抑制农杆菌生长。

3.1.3 选择压力的确定

(1) 愈伤诱导选择压力的筛选: 共设计了 5 个浓度梯度, 当 Km 浓度在 50 mg/L 时, 即能抑制愈伤形成。

(2) 生根培养中选择压力的筛选: 共设计了 5 个浓度梯度, 当 Km 浓度在 75 mg/L 时, 外植体不能生长 (表 1)^[4]。

表 1 卡那霉素浓度对愈伤的影响

卡那霉素浓度 (mg/L)	0	25	50	75	100
薯块愈伤形成情况	正常	正常	黄化	褐化	死亡
植株生根情况	生根	生根	根毛少	不生根	死亡

3.2 抗性植株的 PCR 检测

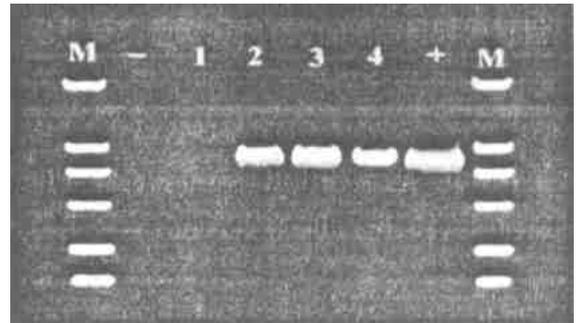


图 2 转 Chi 基因抗性植株的 PCR 检测

M 为 Maker; - 为阴性对照; + 为阳性对照; 1、2、3、4 为待测样品。

对得到的 55 株转化植株, 通过生根抗性筛选, 获得 4 株抗性植株。对其按株系进行继代培养, 提取叶片总 DNA, 以其为模板, 用 Chi 基因的特异引物进行 PCR 检测, 阳性对照为未转化的同一品种植株 DNA, 阳性对照为 PBch 质粒, 扩出 0.9 Kb 大小片段的样品为阳性植株, 其中 PCR 检测呈阳性的为 3 株, 转化率为 3.2% (图 2)。

3.3 PCR-Southern 杂交

以阳性植株的总 DNA 为模板进行 Chi 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 PBch 为阳性对照, 与用地高辛标记的 Chi 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 Chi 基因已经整合到受体马铃薯的基因组中。

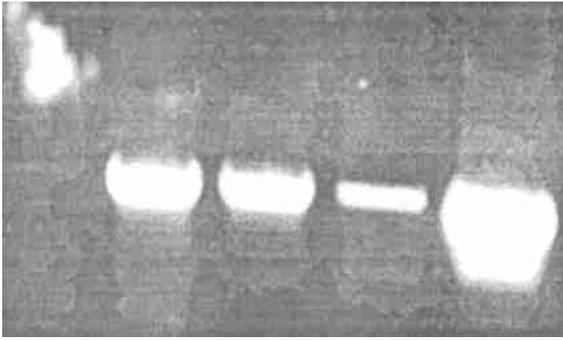


图 3 转膜前凝胶电泳图

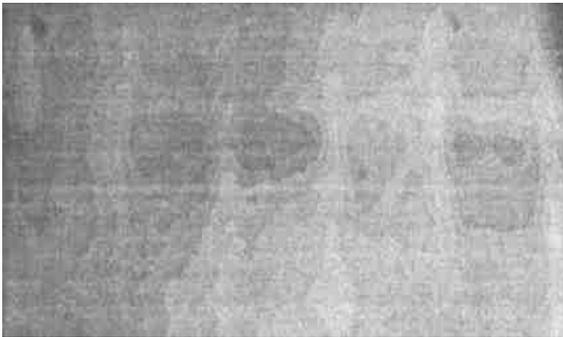


图 4 PCR—Southern 杂交结果

泳道 1 为阴性对照; 泳道 2~4 为转 Chi 基因阳性株; 泳道 5 为阳性对照。

4 讨 论

试验以东农 303 的薯块为转化受体, 采用农杆菌介导法成功地对马铃薯进行了转化, 获得了经 Southern 杂交检测的转菜豆几丁质酶基因的转基因植株 3 株。

试验中使用进口头孢噻肟钠, 由于其纯度高, 在组织培养过程中, 对愈伤及芽分化的形成抑制作用小。尽管价格昂贵, 但使用量少, 200 mg/L, 抑菌效果非常好。

对转化细胞的选择, 经过分化和生根两轮抗性的筛选的 4 株植株, 经 PCR 检测有 3 株呈阳性反应, 说明卡那霉素 50 mg/L 和 75 mg/L 对分化和生根筛选是可靠的。本试验采取的是延迟选择方法, 延迟选择方法即当愈伤组织和不定芽诱导培养开始时, 不加选择压, 过 10 d 后, 有分化芽时再加选择压, 这样有利于转化细胞的生长, 而不至于被卡那霉素抑制。生根筛选加大了卡那霉素浓度, 从而减少了分子检测的工作量。

由于马铃薯作物的特殊性, 利用试管苗可以进行快速繁殖, 目前已得到大量的转化材料, 有关抗病性研究, 正在进行当中。至于是否抗晚疫病, 有待看田间试验和室内接种鉴定结果。

参 考 文 献

- [1] 卢翠华, 陈伊里, 石瑛等. 马铃薯不同品种再生系统的筛选初报. 陈伊里主编. 高新技术与马铃薯产业 [C]. 哈尔滨工程大学出版社, 2002, 107—109.
- [2] 杨美珠, 潘乃穗, 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] 蓝海燕, 田颖川, 王长海等. 表达-1, 3-葡聚糖酶基因的转基因烟草及抗真菌病的研究 [J]. 遗传学报, 2000, 27 (1): 70—77.
- [4] 周思君, 李希臣, 刘昭军. 通过农杆菌介导将菜豆几丁质酶基因导入马铃薯 [J]. 中国马铃薯, 2000, 14 (2) 70—72.

STUDIES ON TRANSFERRING CHITINASE GENE INTO POTATO VARIETY NEA 303

LU Cui-hua, LI Jing, SHI Ying, CHEN Yi-li, WANG Feng-yi

LU Wen-he, QIN Xin and SU Jun-feng

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

ABSTRACT: Microtubers of NEA 303, an extra early variety, were used as explants, and chitinase gene was introduced into the variety by means of agrobacterium-mediated transformation. Firstly, microtubers as receptors and plasmid pBch as donor were co-cultured for 3 days in MS + NAA 1mg/+ZT 2mg/L, then were transferred to the same medium plus kanamycin 50 mg/L and cefotaxime 200 mg/L. When shoots were 1~2 cm in length, they were transferred to radication medium containing kanamycin 75 mg/L for rhizogenesis. Tests of PCR and PCR-Southern hybridization were made on 4 transgenic plants and 3 of those were positive reaction. Transformation rate was 3.2% in this study.

KEY WORDS: potato; chitinase gene; transformation; *Agrobacterium tumefaciens*