

马铃薯遗传转化影响因素的探讨

巩慧玲¹, 王 蒂²

(1. 甘肃工业大学, 兰州 730050; 2. 甘肃农业大学, 兰州 730070)

摘 要: 经农杆菌介导对马铃薯普通栽培种进行 Mtld 基因的遗传转化, 分析了影响转化效率的因素。结果表明: 外植体的生理状态、类型和基因型以及培养基中蔗糖和 Ca^{2+} 浓度对转化效率均有影响。以预培养两天、且生理状况较好的茎段外植体为转化受体时, 可显著提高转化率; 培养基中适宜的蔗糖和 Ca^{2+} 浓度有利于转化效率的提高。

关键词: 马铃薯; 农杆菌; 遗传转化; 转化率; 再生率

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2003) 05-284-03

1 前 言

马铃薯是一种分布广泛、适应性强、产量高、营养丰富的经济作物, 具有鲜食和加工等多种用途。现有马铃薯栽培品种由于遗传背景狭窄, 导致通过常规育种技术难以选育出满足多种用途的品种。转基因技术的应用克服了马铃薯常规育种的不足, 为培育具有多种用途的新品种提供了可能。但是, 在利用转基因技术进行品种改良的研究中, 遗传转化效率低、基因型依赖性等^[1,2]问题影响了转基因马铃薯植株的获得。因此, 建立高效的遗传转化体系对马铃薯的品种改良具有重要意义。本文对马铃薯遗传转化的几个影响因素进行了探讨, 旨在建立一套高效转化体系, 提高马铃薯遗传转化率。

2 材料与方 法

2.1 材 料

2.1.1 受体材料

转基因受体材料为多种双单倍体和马铃薯普通栽培种 Atlantic、Snowden 的试管苗。

2.1.2 农杆菌工程菌

农杆菌工程菌采用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404, 所含质粒为 pBIMTL, 其上带有 35S 启动子、NPT II 基因和

Mtld (1-磷酸甘露醇脱氢酶) 基因。

2.2 方 法

剪取马铃薯试管苗茎段、叶片, 未经预培养或预培养 2 d 后浸入农杆菌工程菌液中 (根癌农杆菌预先在 YEB 培养基中培养至对数期), 浸染 10 min, 在无菌滤纸上吸去过量的菌液, 置于脱分化培养基 ($\text{MS} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg/L} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg/L}$) 上, 黑暗共培养 2~3 d, 再转至选择培养基 ($\text{MS} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg/L} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg/L} + \text{Km } 100 \text{ mg/L}$) 中培养, 当抗性愈伤组织长出后, 统计抗性愈伤组织产生率 (称为转化率, 即产生抗性愈伤组织的外植体数/侵染的外植体总数 $\times 100\%$), 然后将抗性愈伤组织转至分化培养基 ($\text{MS} + \text{GA}_3 \text{ } 5.0 \text{ mg/L} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg/L} + \text{Km } 100 \text{ mg/L}$) 上, 统计抗性苗的产生率 (称为再生率, 即产生不定芽的愈伤组织块数/接种的抗性愈伤组织总块数 $\times 100\%$)。

3 结果与分析

3.1 预培养对转化效率的影响

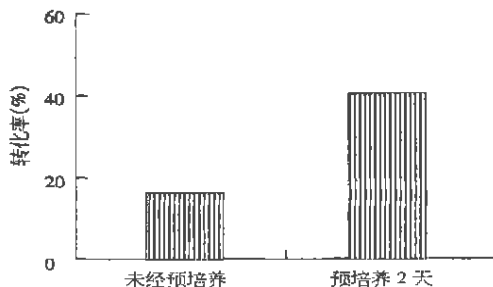


图 1 预培养对转化效率的影响

收稿日期: 2003-03-26

作者简介: 巩慧玲 (1973—), 女, 硕士, 现从事作物遗传育种研究。

图 1 可以看出, 外植体经过预培养 2 d 后, 转化率极显著 ($p^{0.01}$) 地高于未经预培养的外植体。说明预培养可调整外植体的生理状态, 促进细胞分裂, 减轻伤害胁迫, 从而使受体细胞更易整合外源 DNA, 提高遗传转化率。

3.2 蔗糖浓度对转化效率的影响

当脱分化培养基和选择性培养基中蔗糖浓度为 0 时, 转化率较低。说明蔗糖是细胞分裂和代谢活动的能源和碳素来源, 它的缺乏直接影响培养材料的生长, 从而进一步影响遗传转化效率; 但是, 当蔗糖浓度过高, 达 30 mg/L 时, 培养基中营养物质丰富, 农杆菌生长过快, 致使外植体过度污染, 转化率也较低; 只有当蔗糖浓度适度, 为 15 mg/L 时, 转化率和再生率均较高 (表 1)。因此, 脱分化培养基和选择性培养基中适宜的蔗糖浓度可提高受体材料的转化率和再生率。

表 1 蔗糖浓度对转化效率的影响*

蔗糖浓度 (mg/L)	转化率 (%)	再生率 (%)
0	20	2.5
15	47.5	12.5
30	37.5 (部分外植体污染)	大多数外植体污染

注: 蔗糖浓度指脱分化培养基和选择培养基中的蔗糖浓度。

3.3 Ca^{2+} 浓度对转化效率的影响

在预培养培养基和脱分化培养基中进行了不同浓度 $CaCl_2$ (表 2) 对遗传转化效率的研究。发现经培养后, 外植体在含较高浓度 Ca^{2+} (2200 mg/L) 的培养基中的生长状况明显好于对照, 进一步在选择性培养基上生长两周后, 在添加 2200 mg/L $CaCl_2$ 培养基中生长过的外植体生长状况明显好于未添加 $CaCl_2$, 转化率较高; 但 Ca^{2+} 浓度过高 (4400 mg/L), 外植体褐化严重。表明适宜浓度的 Ca^{2+} 有利于转化率的提高, 这与张根义等^[3]的研究结果一致。

表 2 Ca^{2+} 对转化效率的影响

$CaCl_2$ 浓度 (mg/L)	外植体生长状况	转化率 (%)
0 (CK)	生长状况良好	39.6
2200	生长状况良好, 愈伤组织体积较对照大	53.4
4400	褐化严重	—

3.4 外植体生理状况对转化效率的影响

多次转化实验均发现苗龄和植株健壮程度也极显著地 ($p^{0.01}$) 影响着遗传转化率, 表现为苗龄在两周左右, 生长健壮的外植体具有较高的转化率和再生率, 当苗龄超过一个月或试管苗生长较细弱的外植体转化率较低, 再生成苗率则更低。

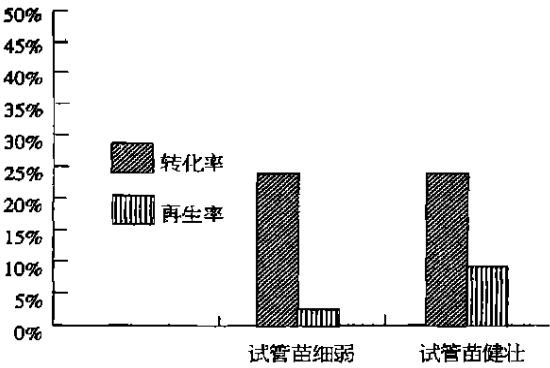


图 2 外植体的生理状况对转化效率的影响

3.5 外植体类型对转化效率的影响

以茎段和叶片两种外植体为受体材料进行遗传转化时发现叶片转化率极显著 ($p^{0.01}$) 地低于茎段 (表 3), 究其原因可能是叶片较柔嫩, 对农杆菌的侵染过于敏感, 造成受体材料的胁迫伤害, 从而影响了转化效率。因此在转化前, 应试用其他外植体, 如微型薯、试管薯等作为转化受体材料, 探讨其转化效果。

表 3 外植体类型对转化的影响

外植体类型	转化率 (%)	再生率 (%)
叶片	23.3	—
茎段	43.6	12.5

3.6 基因型对转化的影响

在以多种双单倍体和普通栽培种的不同外植体作为遗传转化受体材料时发现, 仅在 Atlantic、Snowden 两个普通栽培种材料中获得转化植株, 表明了农杆菌介导的遗传转化具有染色体倍性差异和基因型依赖性, 这一现象在多种植物中都有报道^[4], 并成为农杆菌介导的植物遗传转化的限制因素。

4 讨论

植物在受到带有外源基因的农杆菌侵染后, 能

马铃薯脱毒苗双株扦插生产微型薯

王秀英, 郭 尚, 杨 忠

(山西省农科院高寒作物研究所, 大同 037008)

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2003) 05-286-02

1 前 言

马铃薯生产实践证明, 脱毒种薯有十分显著的

收稿日期: 2002-11-06

作者简介: 王秀英 (1967—), 女, 在读硕士研究生, 助理研究员, 从事马铃薯脱毒微型薯生产研究。

否实现外源基因的转化, 植物受体系统的反应是其主要决定因素, 这种反应主要表现在细胞的感受态和 Vir 基因的活化^[3]。1985 年 Stachel 等证明 AS、OH-AS 是 Vir 基因的天然诱导剂; 1986 年 Bolton 证实儿茶酚、没食子酸、焦性没食子酸、对羟苯甲酸、3-4-二羟苯甲酸、香草醛七种酚类化合物也可以诱导 Vir 基因表达^[4]。此外, 培养基中的糖或高浓度的肌醇可促进 Vir 基因的表达, 当缺少酚类化合物时, 这种糖效应更加明显。本研究通过向培养基中添加适当浓度的蔗糖, 提高了转化率, 其原因可能是激活了 Vir 基因的表达。

处于旺盛分裂及代谢的植物细胞常常处于最佳感受态, 易于接受外源基因的转移, 预培养外植体两天, 且生理状况较好的外植体则具有这种特性, 因此将其作为转化受体材料时, 明显提高了转化率。

张根义等^[5]的研究表明, 在植物转化时, 适当的生长素和细胞分裂素处理使植物细胞的感受态增强, 而高浓度的 Ca^{2+} 则大大提高了转化率。说明植物细胞的感受态与植物激素及 Ca^{2+} 的关系密切, 植物激素是信息传递的第一信使, 其功能的发挥还有赖于第二信使 Ca^{2+} 的参与, 所以培养基中添加一定浓度的 CaCl_2 可以明显提高遗传转化率, 这与本研究结果相一致, 但不同作物对 Ca^{2+} 浓度的需

增产效果, 一般可增产 30%~80%, 甚至成倍增长, 但是生产脱毒种薯繁殖系数低, 成本高昂, 推广脱毒种薯受到制约。我们通过温室试管苗植株加快扦插繁殖速度, 由过去的单株扦插改为双株扦插, 效率提高了 1 倍, 此方法简单, 便于操作, 省工、省投资, 实用性强, 为生产脱毒微型薯创造出一条新途径, 将为提高脱毒种薯的覆盖面起到积极作用。

求是不同的, 在烟草的遗传转化中, 以培养基中添加 4400 mg/L 的 CaCl_2 转化效果好^[3], 此浓度对马铃薯遗传转化却不适宜, 而 2200 mg/l 的 CaCl_2 则具有较好的转化效果。

农杆菌介导的植物遗传转化的转化频率与植物的基因性具有很大的关系, 即使在转化频率比较高的植物 (如马铃薯、烟草、拟南芥等) 中, 也有很大的基因型依赖性^[5]; 不同植物种所要求的外植体种类可能不同, 同一植物上, 不同外植体会有不同的转化效果^[6]。本研究中, 通过对不同基因型和不同外植体类型的马铃薯进行遗传转化, 也表明了这一点。

参 考 文 献

- [1] 何洪智等. 基因转化马铃薯合适条件的研究 [J]. 农业生物技术学报, 1999, 7 (2): 186, 192.
- [2] 侯林林等. 马铃薯转化效率的因素探讨 [J]. 植物学通报, 1996, 13 (1): 34-36.
- [3] 王景雪, 孙毅. 农杆菌介导的植物基因转化研究进展 [J]. 生物技术通报, 1999, 第 1 期, 7-13.
- [4] 莽克强主编. 农业生物工程 [M]. 化学工业出版社, 1998.
- [5] 张根义等. 植物细胞感受态初探. 农业生物技术学报, 1997, 5 (1): 100-102.
- [6] 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1998.