

PVY CP 基因导入加工型马铃薯甘农薯 1 号的研究

师桂英

(甘肃农业大学园艺系, 甘肃兰州 730070)

摘要: 利用整合有马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基 (PVY CP 基因) 的改建质粒 PEY3, 以土壤农杆菌为载体转化加工型马铃薯新品种甘农薯 1 号叶盘, 细菌侵染 14 d 后用 100 ml/L KM 在愈伤组织水平上选择, 转化率最高可达 21.3%。转化效率与细菌生理状态、NAA 浓度、叶盘预培养天数有关。转化体分化 2 株再生植株。冠瘿碱分析证明转化体整合了 PVY CP 基因。

关键词: PVY CP 基因; 马铃薯; 遗传转化

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2001) 02-0078-03

1 前言

自 1996 年首次报道将 PVY CP 基因通过致癌农杆菌介导转化马铃薯后^[1], PVY CP 基因遗传转化马铃薯至少涉及 Favorita、虎头、克新 4 号等 3 个以上传统品种^[2], 转基因植株在田间获得了不同程度的 PVY 抗病性^[2,3]。品种遗传背景不同, 转化效率不同。本文仅就新品种甘农薯 1 号通过叶盘愈伤组织途径转化 PVY CP 基因的方法作一探讨。

2 材料和方法

2.1 农杆菌株及其培养

本研究所用农杆菌株含有改建质粒 PEY3, 该质粒携带有目的基因 PVY CP 基因、报告基因新霉素磷酸转移酶基因 (NPT II) 和胭脂碱合成酶基因。细菌培养用 YEM 固体培养基, 侵染前将细菌在 YEM 液中黑暗振荡培养 6 h 以活化。

2.2 马铃薯叶片愈伤组织对 KM 耐受性测定

剪取大小为 0.5 cm 的甘农薯 1 号试管苗叶盘置于附加有 NAA (1.0 mg/L)、6-BA (2.25 mg/L) 的 MS 培养基上培养不同天数后, 给培养基中附加不同浓度的 KM 继续诱导愈伤组织, 测定愈伤组织对 KM 的耐受性。

收稿日期: 2000-10-01

项目来源: 甘肃省自然科学基金资助项目。

作者简介: 师桂英 (1970-), 女, 中级职称, 现在甘肃农业大学园艺系从事遗传育种教学和科研工作。

2.3 转化方法

外植体用农杆菌液浸泡 20 min, 细菌与受体材料黑暗共培养 48 h, 愈伤组织诱导 14 d 后加入卡那霉素 (KM) 选择转化体, 后转入分化培养基上诱导分化再生植株。

2.4 冠瘿碱分析

按 Otten 及 Shipperoot (1987 年) 方法, 对 KM 抗性材料进行冠瘿碱分析。

3 结果与分析

3.1 愈伤组织对不同浓度 KM 耐受性

经过不同诱导天数愈伤组织的 KM 耐受性测定, 结果表明, 愈伤组织诱导 14 d 之后加入 100 mg/L 的 KM 是合适的选择压。大于 100 mg/L 的 KM 对所有愈伤组织生长均有明显的抑制作用, KM 剂量过小或加入时间太晚, 愈伤组织对其表现较强的耐受性 (表 1)。

表 1 不同浓度 KM 诱导不同天数的愈伤组织生长的影响

培养 天数	KM 浓度					
	25 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L	0
0	B	C	C	C	C	C
7	A	B	C	C	C	C
14	A	A	C	C	C	C
21	A	A	B	C	C	C

注: A 表示无抑制作用, 100%愈伤组织生长良好; B 表示略有抑制作用, 50%以下愈伤组织失绿, 黄化硬化死亡; C 表示抑制作用完全, 50%以上愈伤组织失绿, 黄化硬化死亡。

3.2 预培养天数对转化率的影响

经过对不同预培养天数处理的外植体转化率测定, 结果表明, 侵染前对受体材料预培养, 能够提高转化率。预培养 4 d 转化率最高, 此时叶盘边缘可见细小的愈伤组织颗粒。预培养时间超过 4 d, 细胞分裂处于低峰期, 转化率反而下降 (表 2)。

表 2 不同预培养天数对转化率的影响

预培养天数	侵染外植体数	转化外植体数	转化率 (%)
0	278	44	15.8
1	251	41	16.3
2	203	34	16.7
3	212	39	18.3
4	264	51	19.3
5	221	30	13.7

注: 转化率=转化外植体数/侵染外植体数×100%

3.3 不同 NAA 浓度对转化率的影响

经过对不同 NAA 浓度处理的外植体的转化率测定, 结果表明, 利于愈伤组织诱导的 NAA 浓度利于转化, 转化率与外植体成愈率呈线性正相关 (相关系数为 $R=0.820979$)。在 $NAA=2.0 \text{ mg/L}$ 时成愈率为 96% 以上, 转化率最高, 过高或过低的 NAA 浓度均不利于愈伤组织诱导和转化 (表 3)。

抗性愈伤组织在附加 GA_2 (5 mg/L 、 6-BA (3 mg/L) 的 MS 培养基上容易分化成根, 但分化成苗困难, 仅得到 2 株完整的再生植株。

3.4 YEM 细菌活化液 pH 值对转化率的影响

经过对 2 个 pH 值的 YEM 液活化细菌后转化率的测定, 结果表明, 细菌的生长条件及生理状态是影响转化率的重要因素。较高的 pH 适合细菌生长繁殖, 细菌生活力强, 代谢旺盛, 利于 Vir 基因的活化, 细菌侵染能力增强, 转化率高 (表 4)。

表 3 NAA 浓度对叶盘成愈率及转化率的影响

NAA 浓度 (mg/L)	菌液处理					CK		
	处理外植体数	成愈外植体数	转化外植体数	成愈率 (%)	转化率 (%)	处理外植体数	成愈外植体数	成愈率 (%)
0.2	276	221	17	80.1	6.1	134	117	83.7
0.5	298	255	21	85.6	7.0	156	139	89.1
1.0	254	247	25	97.2	10.1	142	137	96.4
2.0	278	267	44	96.0	15.8	143	137	95.6
4.0	221	131	8	59.2	3.6	128	84	65.6

注: CK 为不加菌液侵染的处理; 成愈率=成愈外植体数/侵染外植体数×100%。

表 4 细菌活化液 pH 值对转化率的影响

pH 值	处理外植体数	转化外植体数	转化率 (%)
5.8	145	14	9.7
6.9	278	43	15.8

3.5 冠纒碱分析

冠纒碱分析证明转化组织整合了含有 PVY CP 基因的 T-DNA, KM 抗性再生植株检测到有胭脂碱合成, 说明受体材料整合了胭脂碱合成酶基因并且此基因在植株水平上表达 (图片略)。

4 结论与讨论

研究表明, 100 mg/L 的 KM 在接种 14~15 d 加入, 是适合的选择压。受体材料预培养 4 d, 用 $\text{pH}=6.9$ 的 YEM 液活化细菌, 在 2.0 mg/L 的 NAA 浓度下诱导叶盘愈伤组织, 可以提高转化率。这种建立在组织水平上的转化方法易于操作, 快速

简便, 可重复性好。

在 KM 选择过程中, 易出现正常部分和黄化、褐化部分的愈伤组织嵌合体, 将正常部分剥离单独培养, 生长良好, 这种现象的出现是因为不同细胞对转化感受态不一致, 同一块愈伤组织上只有一部分细胞发生了转化进而获得了 KM 抗性。此外, 因为 KM 作为选择性试剂是通过解毒的作用实现其功能的, 加之 KM 通过细胞间隙的扩散距离十分有限^[4], 所以, 这种建立在组织水平上的筛选系统因转化细胞分泌的解毒物质的保护或愈伤组织过大而使 KM 不能达到其中部, 极易出现假转化体或嵌合体。因此, 除考虑 KM 加入时间及加入量之外, 使筛选体微型化可能有利于提高选择效果。

冠纒碱分析证明转化植株整合了 PVY CP 基因。进一步分子杂交实验和田间抗病性试验正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] 曹晓岚. 马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因在转基因马铃薯中表达. 植物学报 [J]. 1996, 38 (5): 416-420.
- [2] 宋艳茹, 马庆虎. 转 PVY 外壳蛋白基因马铃薯及其田间试验. 植物学报 [J]. 1996, 38 (9): 711-718.
- [3] 张鹤龄. 我国马铃薯抗病毒基因工程研究进展 [J]. 马铃薯杂志, 2000, 14 (1): 25-30.

STUDIES ON THE TRANSFORMATION METHODS OF PVY CP GENE TO A NEW PROCESSING POTATO STRAIN “GANNONG POTATO 1”

SHI Guiying

(Horticulture Department of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

ABSTRACT: In this study, we used the disarmed Ti plasmid PEY³ integrated potato virus Y coat protein (PVY CP) gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens* to transfer the leaf disc of a new processing potato strain “Gannong potato 1”. The transformed calli were selected in the medium with KM=100 mg/L after they were induced 14 days. The result showed that the following factors affected the transformation efficiency: the bacterium physiology state, NAA concentration and the explant preculture days. The highest transformation rate was 21.3%. Two plants were regenerated from the KM resistant calli. The opine assay was positive, which demonstrated that the KM resistant plant were integrated with PVY CP gene.

KEY WORDS: PVY CP gene; potato; genetic transformation

BOSIDA

呼和浩特博思达淀粉工程公司

——向您提供最新的、世界一流的封闭式全旋流
 高品质马铃薯淀粉加工全套生产线

公司简介

呼和浩特博思达淀粉工程公司是一家多年来长期专门致力于高品质马铃薯淀粉加工工艺研究、开发、机械设备制造为一体的专业性工程公司, 公司从成立的第一天起就积极紧密的围绕着高品质马铃薯淀粉的加工和机械设备的制造。如今, 博思达公司已发展成为国内唯一一家专门从事高品质马铃薯淀粉工艺设备的开发、制造、淀粉加工工程建设及成套设备提供的综合性工程公司!

技术优势

博思达公司聚集了一批国内最优秀的淀粉机械制造专家, 我们最新开发、研制成功的封闭式全旋流制造工艺可与在该领域代表世界一流水准的西欧技术相媲美, 而价格仅为进口设备的 15%! 我们不仅能承揽新项目的建设, 而且还能对国内现有旧的落后生产工艺及加工设备进行技术改造, 进一步降低生产成本, 提高产品档次, 增强产品竞争力!

产品目录

- 鼠笼式逆流清洗设备
- 四级高效逆流筛分系统
- 精制提纯旋流站 (12~14 级)
- 脉冲式气流烘干机
- 超级锉磨机
- 脱汁浓缩旋流站 (4~5 级)
- 真空脱水机 (不锈钢滤布)

地址: 内蒙古呼和浩特市大学西路绿洲大厦五楼
 电话 (传真): 0471-6959871 13804743035

邮 编: 010020
 总 经 理: 马 斌

(我们备有非常详尽的项目投资可行性分析报告及其相关资料, 随时恭候您的垂询!)