

根癌农杆菌介导的马铃薯遗传转化体系的研究

张萍

(咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:以NHD3、NC、NF三种马铃薯品种的茎段为外植体,对其愈伤组织诱导培养基进行了初步筛选,探讨不同转化条件对马铃薯遗传转化效率的影响。结果表明:在1.0mg/L 6-BA浓度不变情况下,愈伤诱导培养基中NHD3、NC、NF茎段分别在NAA浓度为0.2、0.3、0.4mg/L时愈伤形成及生长最好;在茎段预培养2d,农杆菌菌液在OD₆₀₀=0.6的条件下转化所得抗性愈伤诱导率最高。

关键词:马铃薯;农杆菌;遗传转化

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2018)03-05

马铃薯是粮菜兼用型作物,产量高且含有丰富的营养物质,在农业生产和人民生活中占有极其重要的地位。随着马铃薯加工企业和快餐业的发展和壮大,马铃薯品种也由鲜食型向加工型、专用型等方向发展,成为一类具有多种用途的经济作物。在马铃薯新品种的研究培育中,利用基因工程技术可以定向改造基因以改变其性状,获得具有新品质特征的马铃薯。马铃薯转基因工程最大的优势是通过块茎无性繁殖,将转基因特性传递给后代。科研工作者于1983年首次通过根癌农杆菌转化获得马铃薯再生植株,目前,通过实验成功获取的马铃薯转化植株已有20多个品种^[1]。

本实验以马铃薯NHD3、NC、NF的茎段为外植体,用根癌农杆菌对马铃薯进行遗传转化研究,筛选出适合诱导马铃薯新品种NHD3、NC、NF愈伤组织生长的培养基,进而研究农杆菌介导的转化遗传体系,分别比较菌液浓度、预培养时间、共培养时间等因素对马铃薯遗传转化效率的影响,以便为相关研究提供参考及我们后续转化实验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 马铃薯栽培品种NHD3、NC、NF无菌试管苗。

(2) 根癌农杆菌LBA4404(植物表达载体:

pARTG F1-2)。

1.2 试剂及其配制

抗生素、MS培养基以及激素的配制^[2],具体操作如下。

(1) MS培养基母液配制:

①母液 I (20×): 每升含33gNH₄NO₃、38gKNO₃、8.8gCaCl₂·2H₂O、7.4gMgS·7H₂O、3.4gKH₂PO₄;

②母液 II (200×): 每升含166mg、1240mgBO₃、4460mgMnSO₄·4H₂O、1720mgZnSO₄·7H₂O、50mgNa₂MoO₄·2dH₂O、50mgCaSO₄·5H₂O、5mgCoCl₂·6H₂O;

③母液 III (100×): 每升含5560mgFeSO₄·7H₂O、7400mgNa₂·EDTA·2H₂O;

④母液 IV (200×): 每升含100mg烟酸、100mg盐酸吡哆醇、400mg甘氨酸、20mgVB₁;

(2) 激素配制:

①NAA (1 mg/ml): 称取100mg固体NAA,溶于适量0.1mol/L的氢氧化钠溶液中,用蒸馏水定容至100 ml, 0.22um滤膜过滤灭菌, 4℃保存。

②IAA (1mg/ml): 称取100mg固体IAA,溶于适量0.1mol/L的氢氧化钠溶液中,用蒸馏水定容至100 ml, 0.22um滤膜过滤灭菌, 4℃保存。

③6-BA (0.5mg/ml): 称取100mg固体6-BA,溶于少量稀盐酸中,用蒸馏水定容至200ml, 0.22um滤膜过滤灭菌, 4℃保存。

1.3 培养基

(1) YEB培养基: 每升含5.0 g牛肉浸膏、1.0 g酵母浸膏、5.0 g蛋白胨、0.5 gMgSO₄·7H₂O、0.8 %琼脂 (pH值7.2)。

(2) 植物培养基:

愈伤组织诱导培养基: 以MS培养基为基础, 调整NAA浓度, 配制成A、B、C、D、E、F六种愈伤组织诱导培养基, 用于筛选愈伤组织诱导培养基, 具体组成如下:

A: MS+1.0mg/L 6-BA +0.1mg/L NAA

B: MS+1.0mg/L 6-BA +0.2mg/L NAA

C: MS+1.0mg/L 6-BA +0.3mg/L NAA

D: MS+1.0mg/L 6-BA +0.4mg/L NAA

E: MS+1.0mg/L 6-BA +0.5mg/L NAA

F: MS+1.0mg/L 6-BA +0.6mg/L NAA

1.4 仪器

双面超净工作台(SW-CJ-ZF, 苏州净化设备有限公司); 小型高压灭菌锅 (TH-1020, 台湾TIAOHTSTN公司); 光照培养箱 (GZP-250型, 上海精宏实验设备有限公司); 生化培养箱 (SHP-250型, 上海精宏实验设备有限公司); 气浴式振荡器 (ZJS-1320, 科大创新股份有限公司中佳分公司); 实验室专用超纯水机 (KL-RO-20, 成都康宁实验专用纯水设备厂); 电热恒温水浴锅 (HH-S4型, 北京科伟永兴仪器有限公司)等。

2 实验方法

2.1 马铃薯愈伤组织诱导培养基的筛选

(1) 组织培养苗的复壮

无菌条件将三种马铃薯NHD3、NC、NF组培苗茎段 (1.0~2.0cm, 含一个腋芽), 接种于MS培养基中, 每瓶接种茎段6~8个, 每个品种接种5~7瓶, 培养条件: 25±1℃、1500~2000Lx光照。培养时间: 15d左右。

(2) 愈伤组织诱导培养基的筛选

无菌条件剪取生长健壮的组培苗茎段 (1.0~2.0cm, 无腋芽), 分别接种于1.3.2中所制六种不同愈伤诱导培养基中, 每瓶接种6~8个茎段, 每个品种接种5~7瓶, 培养条件: 25±1℃、1500~2000Lx光照。培养时间: 20d。统计愈伤发生率。

2.2 农杆菌介导的马铃薯转化遗传体系的研究

(1) 复壮

无菌条件剪取NHD3马铃薯组培苗茎段 (1.0~2.0cm, 含一个腋芽), 接种在MS培养基中, 培养条件: 25±1℃、1500~2000Lx光照。培养时间: 15d左右。

(2) 预培养

无菌条件剪取生长健壮的复壮组培苗茎段 (0.8~1.5cm, 无腋芽), 接种于预培养基中, 预培养条件: 25±1℃、1500~2000Lx光照。培养时间: 10d左右。

(3) 根瘤农杆菌菌液制备

将农杆菌LBA4404 (含有pARTGF1-2) 放入含Kan (70mg/L)、Rif (80mg/L)、Str(40mg/L)的YEB培养基溶液中, 避光振荡培养, 培养条件: 28℃, 260rpm。培养时间: 24~36h。活化菌液后, 按1:50的比例进行放大培养, 培养时间分别为4、6、8、10、12、14、16h, 取不同培养时间的菌液各取2ml, 测定OD600值, 确定出农杆菌达到对数生长期的最适振荡培养时间。将达对数生长期的菌液转入无菌离心管中, 5000 rpm离心5分钟后收集菌体, 加入MS液体培养基稀释至所需浓度。

(4) 转化方法

剪取健壮外植体组培茎段 (约0.5cm, 无腋芽), 接种于培养基上, 置于人工气候箱 (条件: 16h/d、25±1℃、光照强度2000Lx) 预培养2d, 预培养后对农杆菌悬液进行侵染, 并不断摇晃使菌液与外植体充分接触, 数分钟后取出, 拭去表面菌液, 再转入共培养培养基中, 置于黑暗环境28℃进行共培养。

(5) 农杆菌转化马铃薯遗传转化体系的优化^[4,5]

为研究不同转化条件如: 菌液浓度、浸染时间、预培养及共培养时间等因素对马铃薯遗传转化效率的影响, 分别进行以下实验:

①农杆菌浓度的影响

不同离心条件培养过夜的农杆菌菌液, 调整OD600值分别为0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0, 加入MS液体培养基中, 分别转化培养马铃薯无菌苗。

②茎段预培养时间的影响

剪取生长健壮的NHD3组培苗茎段 (0.8~1.0cm, 无腋芽), 接种于预培养基中, 在25+1℃、1500Lx光照下预培养。

③共培养时间的影响

预培养的外植体在 $OD_{600}=0.5$ 的农杆菌菌液中浸染8~10min后,接种于MS固体培养基上,黑暗条件下共培养时间分别为1d、2d、3d、4d、5d、6d。

3 结果与分析

3.1 马铃薯茎段愈伤组织诱导培养基筛选

马铃薯茎段在A、B、C、D、E、F六种马铃薯

愈伤组织诱导培养基上培养10天后,茎段边缘开始长出愈伤,20d后,外植体分化出愈伤组织基本完成时,统计各品种马铃薯在不同培养基上出愈外植体个数(结果见表1)。从中可以看出NC、NF、NHD3依次在B、D、C型培养基上出愈率最高,诱导率分别为94.44、97.50、97.56,且愈伤组织生长状态非常良好,呈新绿色、结构致密。

表1 马铃薯茎段愈伤诱导结果统计

培养基	接种数(个)			出愈数(个)			诱导率(%)			愈伤组织生长状态		
	NC	NF	NHD ₃	NC	NF	NHD ₃	NC	NF	NHD ₃	NC	NF	NHD ₃
A	36	34	38	8	10	9	22.22	29.41	23.68	+	++	++
B	36	33	40	34	20	26	94.44	60.61	65.50	+++	++	++
C	37	36	41	24	25	40	64.86	69.44	97.56	+++	+++	+++
D	34	40	36	28	39	30	82.35	97.50	83.33	+++	+++	+++
E	36	33	37	20	21	24	55.56	63.64	64.86	++	+++	+++
F	37	36	36	16	14	17	43.24	38.89	47.22	++	++	++

注:+++ : 生长呈新绿色,结构致密; ++ : 生长呈浅绿色,结构较为致密; + : 生长呈新绿色,结构疏松。

3.2 菌液浓度的影响

离心收集农杆菌对数生长期时的菌体,制备系列浓度梯度的菌液MS培养基,研究不同浓度农杆

菌对转化的影响。结果表明,菌液浓度在 OD_{600} 为0.6的浓度时诱愈率最高,形成愈伤组织数最多。浓度在 OD_{600} 为0.2~1.0时可形成愈伤组织。

表2 菌液浓度对转化的影响

菌液浓度(OD_{600})	接种数(个)	抗性愈伤数(个)	诱愈率(%)
0.2	79	29	36.71
0.3	87	43	49.43
0.4	96	54	56.25
0.5	113	87	76.99
0.6	102	89	87.25
0.7	98	72	73.47
0.8	112	65	58.04
0.9	96	35	36.46
1.0	99	32	32.32

3.3 预培养时间的影响

为减轻农杆菌侵染时对外植体的伤害,促进细胞分裂,调整细胞生理状态,在侵染前会对外植体

进行短时间的预培养,使其更容易整合外源DNA,提高转化效率^[6]。由表3可知,茎段抗性愈伤率达最高,预培养的最佳时间为2d。

表3 预培养时间对转化的影响

预培养时间(d)	接种个数(个)	抗性愈伤数(个)	愈伤诱导率(%)
1	36	3	8.33
2	36	32	88.88
3	35	30	70.27
4	37	24	64.86
5	35	10	28.57
6	34	0	0.00

3.4 共培养时间的影响

外植体被农杆菌浸染后受体细胞不能立即整合外源基因,需经过一定时间的“细胞调节期”来完成转移整合^[7]。共培养时间过短或过长,均会影响

到转化效率。所以,确定共培养时间是遗传转化效率的重要因素。由表4可知,共培养2d,愈伤组织诱导率最高。

表4 共培养时间对转化的影响

共培养时间 (d)	接种个数 (个)	抗性愈伤数 (个)	愈伤诱导率 (%)
1	35	16	45.71
2	36	28	77.77
3	37	20	54.05
4	36	15	41.66
5	35	9	25.71

4 小结与讨论

4.1需要具备较高的再生率,才可能高效地实现遗传转化,因此建立高效的马铃薯再生体系是马铃薯遗传转化的首要条件。本实验对马铃薯茎段的再生能力进行了研究,以便建立高效的马铃薯再生体系,为后续实验奠定基础。研究表明诱导不同品种马铃薯茎段形成愈伤组织所需的激素种类和浓度不同^[8-9],但大多使用激素的种类多为6-BA、NAA、IAA等,其中6-BA使用的浓度范围为1.0~2.0mg/L之间,并且在该浓度范围内浓度变化对诱导马铃薯茎段愈伤组织的影响不明显,所以本实验中将6-BA的使用浓度定为1.0mg/L。而细胞生长素在NAA比IAA活力高3~4倍,耐高温高压不易被光分解破坏,所以实验选用NAA。从试验结果来看,“NC”、“NF”、“NHD3”品种在6-BA浓度一致、培养时间较长的情况下(20d),分别以NAA为0.2 mg/L、0.3mg/L、0.4 mg/L时愈伤组织的诱导效果较好,本试验结果与李娟等报道^[13]的相一致。

4.2研究影响转化效率因素得出结论:(1)转化马铃薯茎段都需要经过适当时间预培养。农杆菌浸染前对外植体进行一段时间的预培养,可促进外植体细胞分裂^[10],使受体细胞易于整合外源DNA,提高转化效率^[11]。适时的预培养可增强外植体耐受农杆菌浸染的能力,减少外植体在转化过程中受到的伤害,而未经预培养的外植体很难筛选到抗性植株。但预培养时间过长,会增强外植体对选择压力的耐受力,形成愈伤组织后会影响到农杆菌的浸染,降低转化率,同时也增加假阳性植株出现的机率^[12-13]。(2)确定共培养时间是遗传转化效率重要的影响因

素,恰当的共培养时间是农杆菌实现其所携带的外源基因向外植体转化成功的关键^[14],时间过短,细菌还没来得及附着就可能被抗菌素杀死;时间过长,细菌在材料周围生长过多,会导致植物材料坏死。

(3)合适的农杆菌浓度影响外植体形成转化植株^[5]。农杆菌浓度过低使外植体上附着的菌体较少,浸入农杆菌数量少;农杆菌浓度过高导致外植体上生长大量细菌对植株造成伤害,且在后续培养中农杆菌的污染很难控制。本实验在浓度为OD600=0.6的农杆菌菌液中浸染10 min,抗性愈伤诱导率最高,达87.25%。

参考文献

- [1]熊伟,马耀华,胡碧波,陈保善.根瘤农杆菌介导的马铃薯转化系统的优化,广西农业生物科学学报,2007,26(1).
- [2]王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002.
- [3]朱永莉,戴朝曦.野生型根瘤农杆菌对马铃薯的遗传转化研究[J].安徽农业科学,2007,(27).
- [4]陈再刚,周大祥,胡廷章.影响农杆菌介导植物遗传转化的因素[J].重庆工学院学报(自然科学版),2007,(03).
- [5]张根义,徐武,李明.植物细胞感受态研究初探.农业生物技术学报,1997,5(1):100~102.
- [6]王丹,温孚江.马铃薯组培条件快速优化方法的研究,山东农业大学学报,1998 ,29(1):25~31.
- [7]王丹,朱常香,郑成超,温孚江.根瘤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,(01).
- [8]李娟,程智慧,张国裕.马铃薯叶片高效再生体系的建立[J].西北植物学报,2004,24 (4):610~614.
- [9]栾雨时,徐品三,夏秀英,等.适于马铃薯茎段再生的植物激素配比选择[J].中国马铃薯,2004,18(3) :143~144.
- [10]丁玉梅,杨正安,吴毅歆,等.用于叶绿体基因组转化的

- 马铃薯高效再生体系的建立[J].西南农业学报,2006,19(B 09):98-102.
- [11]王丹,宋云枝.影响马铃薯叶圆片植株再生因素的研究[J].山东农业大学学报:自然科学版,2000,31(2):139-42.
- [12]BOU CO IRAN C F, CAMLLO C, TRONO K. Iso Lat ion and part ial characterizat ion of thermo stable isoperoxidases from po tato (S oLanum tuberosum L.) tuber sp routs [J]. J A gric Food Chem, 2000, 48 (3) : 7012707.
- [13]巩慧玲,王蒂.马铃薯遗传转化影响因素的探讨[J].中国马铃薯,2003,(05).
- [14]贾笑英,路平,王蒂.农杆菌介导的马铃薯茎段遗传转化体系优化研究[J].中国农学通报, 2006,(07).
- [14]NJUM M A, ANCORA G, BENV ENU TO E, et al. Select ion of hydroxyproline-resistant cell Lines from S oLanum tuberosum L. cells II, Plant regeneration and frost to Lurance of regenerated plants [J]. A cta Bio techno L,1998, 18 (3) : 361-365.
- [15]方卫国,张永军,杨星勇.根瘤农杆菌介导真菌遗传转化的研究进展[J].中国生物工程杂志,2002,22(5):40-44.

[责任编辑:王军利]

On Agrobacterium Tumefaciens Mediated Transformation System of Potato

ZHANG Ping

(Xianyang Vocational & Technical College, Xianyang 712000,China)

Abstract: This article takes stems from three different kinds of potatoes (NHD3, NC, NF) as the ex-plant, and pre-screens the callus-Inducing medium to discuss the impact to potatoes genetic transformation efficiency under different transformation conditions. The results show that in 1.0mg/L 6-BA concentration, the three stems can get the best callus formation and growth in 0.2mg/L NAA, 0.3mg/L NAA and 0.4mg/L NAA concentration. In 2D pre-culture and co-culture, the agrobacterium s induction rate was the highest when OD600=0.6.

Key words: potatoes, agrobacterium, genetic transformation

(上接第43页)

The Development and Application of Santana 3000 Engine Electric Control Training Platform

XIAN A-man

(Xianyang Vocational & Technical College, Xianyang 712000,China)

Abstract: In view of the present domestic various problems existing in the engine electronic control training platform in higher vocational colleges, combined with the practice of our idle Santana car but the actual situation of the engine electronic control training platform sought-after, design modification to develop a new type of multifunctional engine electronic control training platform, for the use of student experiment training.

Key words: engine, training platform, development and application