

# 多抗转基因马铃薯植株的获得及农杆菌介导 试管薯遗传转化体系优化

齐恩芳<sup>1,2,3</sup>, 贾小霞<sup>1,2,3</sup>, 刘石<sup>1,2,3</sup>, 陈晓艳<sup>4</sup>, 黄伟<sup>1,2,3</sup>, 刘世海<sup>5</sup>

(1. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省马铃薯种质资源创新工程实验室, 甘肃 兰州 730070; 3. 农业部西北旱作马铃薯科学观测实验站, 甘肃 渭源 748201; 4. 哈密市伊州区种业研究开发中心, 新疆 哈密 839001; 5. 榆中百稼汇农业种植农民专业合作社, 甘肃 榆中 730100)

**摘要:** 以马铃薯品种陇薯 11 号试管薯为受体材料, 通过农杆菌介导法, 将 PVX、PVS、PVY 和 PLRV 4 种病毒 CP 融合基因导入马铃薯, 并对影响遗传转化的因素进行了优化。结果表明, 薯片分化和生根阶段的选择压分别为 Kan 50、75 mg/L, 薯片分化和生根阶段有效抑菌浓度分别为 Cb 500、200 mg/L, 农杆菌活化时间为 4.5 h、侵染时间为 7 min、共培养时间为 2 d 时利于遗传转化。通过该体系将 4 种病毒 CP 融合基因导入马铃薯, 获得了具卡那霉素抗性的转化植株, 经 PCR 检测, 外源基因已导入马铃薯基因组中。

**关键词:** 马铃薯; 试管薯; 农杆菌介导; 遗传转化

**中图分类号:** S532 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)11-0001-06

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2020.11.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2020.11.001)

## Obtaining of Multiple Resistance Transgenic Potato Plant and Optimization of Agrobacterium-mediated Genetic Transformation System of Potato in Vitro

QI Enfang<sup>1,2,3</sup>, JIA Xiaoxia<sup>1,2,3</sup>, LIU Shi<sup>1,2,3</sup>, CHEN Xiaoyan<sup>4</sup>, HANG Wei<sup>1,2,3</sup>, LIU Shihai<sup>5</sup>

(1. Institute of Potato, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Gansu Engineering Laboratory of Potato Germplasm Resources Innovation, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. The Ministry of Agriculture, Scientific Observation and Experiment Stations in of Dry Potato in the Northwest, Weiyuan Gansu 748201, China; 4. Seed Industry Research and Development Center of Yizhou District, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Hami Xinjiang 839001, China; 5. Yuzhong Baijihui Agricultural Planting Farmers Professional Cooperative, Yuzhong Gansu 730100, China)

**Abstract:** The CP fusion genes of PVX, PVS, PVY and PLRV were transferred into Longshu 11 test tube potato through the agrobacterium-mediated method, and conditions of which was also optimized. The results showed the optimal Kan selective concentration is 50 mg/L and 75 mg/L for potato chip differentiation and root germination respectively, and Cb is 500 mg/L and 200 mg/L. The optimal transformation conditions: agrobacterium should be activated for 4.5 hours, transfection for 7 minutes, and co-cultivation time for 2 days, it was beneficial to genetic transformation. Via this system, four viral CP fusion gene were introduced into potatoes, and later transformed plants with kanamycin resistance were obtained. PCR detection confirmed the fusion gene had been successfully introduced into those potato genome.

**Key words:** Potato; Tube potato; Agrobacterium mediated; Genetic transformation

收稿日期: 2020-08-31

基金项目: 国家自然科学基金(31360353、31860401); 甘肃省科技重大专项计划(19ZD2WA002); 兰州市人才创新创业项目(2018-RC-40)。

作者简介: 齐恩芳(1974—), 女, 甘肃宕昌人, 研究员, 硕士, 主要从事马铃薯遗传育种工作。Email: qefang@126.com。

马铃薯是一种产量高、适应性强、分布广、营养丰富、经济价值高的宜粮、宜菜、宜饲、宜作工业原料的经济作物<sup>[1-2]</sup>。马铃薯在生长期易受多种病毒的危害,病毒侵染造成马铃薯种质退化,产量严重降低。迄今为止,几乎没有有效的化学药剂来防治病毒病,目前解决马铃薯退化的有效途径是组培脱毒,但该法成本高且工作量大,不能解决病毒的再侵染问题,能维护无毒或低毒的有效期不长,2~3 a 后产量又会严重下降。马铃薯是同源四倍体作物,若采用常规方法选育抗病毒品种,则存在天然抗性基因资源缺乏,且育种周期长、抗性基因的遗传不稳定以及远缘杂交种间障碍等问题。马铃薯抗病毒基因工程的发展解决了这一难题,通过基因工程改良马铃薯品种具有基因明确、产物已知、目标具体、准确快速、可预见性强等优势,且马铃薯是无性繁殖植物,转基因植株无性后代不发生分离,给转基因植株的检测、鉴定带来诸多方便。

建立高效的遗传转化体系对于获得转基因植株至关重要。在马铃薯遗传转化中以叶片、茎段、薯片作为受体已广泛应用,其中试管薯片作为受体材料伤口面积大,且薯块本身含有较高含量的酚类物质,有助于农杆菌的侵染和转化<sup>[3-5]</sup>,不经愈伤化可直接诱导芽再生。薯片转化过程中不需要预培养,操作简单方便,周期短,但针对不同基因型转化的适宜条件有一定差异。我们以马铃薯品种陇薯 11 号脱毒试管苗为材料,采用农杆菌菌株 LBA4404 为介导,将 PVX、PVS、PVY 和 PLRV 4 种病毒外壳蛋白融合基因导入马铃薯,并通过选择压、抗菌素浓度、农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间等因素进行选择,建立了一套优化的高效转化体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为马铃薯品种陇薯 11 号脱毒

苗,由甘肃省农业科学院马铃薯研究所种质资源与生物技术研究室提供。供试菌株 LBA4404 含有质粒 pART27-XSYV-rh(甘肃省马铃薯种质资源创新工程实验室构建)<sup>[6]</sup>,pART27-XSYV-rh 含 4 种病毒(PVX、PVS、PVY 和 PLRV)CP 基因片段,抗性标记为卡拉霉素(Kan)。DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、植物总 RNA 提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司。培养基基础成分、植物激素、抗生素、添加剂均购自美国 Sigma 公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 培养基

YEP 液体培养基为 10 g/L 酵母提取物 + 10 g/L 蛋白胨 + 5 g/L 牛肉膏。试管薯诱导培养基为 MS 培养基 + 6-苄氨基嘌呤(6-BA)5 mg/L。试管薯片分化培养基为 MS 培养基 + 吲哚乙酸(IAA)1.0 mg/L + 赤霉素(GA<sub>3</sub>)0.2 mg/L + 6-苄氨基嘌呤(6-BA)0.5 mg/L + 玉米素核苷(ZT)2.0 mg/L。生根培养基为 1/2 MS 培养基。

### 1.3 转化外植体的获得

将陇薯 11 号试管苗在 MS 固体培养基上培养 21 d,长成壮苗后用于诱导试管薯。参照“固体 + 液体”的方法诱导试管苗结薯<sup>[7]</sup>。

### 1.4 遗传转化体系优化

1.4.1 诱导芽与生根选择压确定 无菌条件下取直径约为 0.5 cm 的陇薯 11 号试管薯,切成厚度为 2 mm 左右的薄片,分别接种于附加 0、25、50、75、100 mg/L 卡拉霉素(Kanamycin, Kan)的试管薯片分化培养基中,每处理接种 20 块,3 次重复,间隔 14 d 继代 1 次,接种 28 d 后观察薯片生长情况并统计出芽率,确定抑制芽分化的最低 Kan 浓度。将陇薯 11 号试管苗剪成带 2 个腋芽的茎段,分别接到含 Kan 浓度 0、25、50、75、100 mg/L 的生根培养基中,3 个重复,21 d 后观察并记录生根状况,确定抑制生根最适 Kan 浓度。

1.4.2 农杆菌工程菌生长曲线 挑取农杆菌菌种, 接种于含 Kan 50 mg/L、链霉素(Streptomycin, Str)50 mg/L 和利福平(Rifampicin, Rif)20 mg/L 的 YEP 平板上, 置 28 ℃ 暗培养, 2 d 后挑取单菌落放入 5 mL 含有同样抗生素的 YEP 液体培养基中, 于 28 ℃、260 rpm 条件下避光振荡培养约 24~36 h。将活化好的菌液按 1:50 放大培养(即取 1 mL 活化好的菌液加入到 50 mL 含 Kan 50 mg/L、Str 50 mg/L、Rif 20 mg/L 的 YEP 液体培养基中, 再置于 28 ℃ 恒温摇床, 260 rpm 条件下避光振荡培养), 分别设 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 h 共 13 个时间梯度, 每个时间段各取 2 mL 菌液, 在波长 600 nm 下用分光光度计测定其紫外吸收值  $OD_{600}$ , 每处理 3 次重复, 用未加菌液的 YEP 液体培养基调零, 计算 3 次重复样品的  $OD_{600}$  平均值, 最终确定农杆菌达到对数生长期所需的摇菌时间(即  $OD_{600}=0.5$  左右的临界点)。

1.4.3 侵染时间 用  $OD_{600}=0.5$  的农杆菌菌液侵染薯片, 侵染时间设为 3、5、7、9、11、13、15 min, 接种于试管薯片分化培养基上, 每个培养皿 20 块, 每处理 3 次重复, 20 d 后统计薯块出芽率、污染率及褐化率。

出芽率=(出抗性芽薯块数/接种薯块总数)×100%

污染率=(污染的薯块数/接种薯块总数)×100%

褐化率=(褐化的薯块数/接种薯块总数)×100%

1.4.4 共培养时间 选择侵染 7 min 的处理置于 28 ℃、黑暗条件下共培养, 共培养时间设为 1、2、3、4 d, 30 d 后观察薯块生长状态, 统计出芽率。

1.4.5 抑菌剂浓度 将共培养后的薯块分别转接到附加羧苄青霉素(Carbenicillin, Cb) 100、150、200、250、300、350、400、450、

500 mg/L 的试管薯片分化培养基中, 光照时间为 14 h/d, 培养温度为  $(25 \pm 2)$  ℃, 7 d 后观察农杆菌溢出情况。将分化出的芽分别转接到附加 Cb 100、150、200、250、300、350、400、450、500 mg/L 的生根培养基中, 7 d 后观察农杆菌溢出情况。

## 1.5 转基因植株鉴定

采用 CTAB 法提取待检测植株和对照植株叶片总 DNA, 参照贾小霞等<sup>[8]</sup>的方法对转基因马铃薯植株进行 PCR 鉴定。以非转基因马铃薯植株为阴性对照, pART27-XSYV-rh 质粒为阳性对照。反应程序: 98 ℃ 10 s, 55 ℃ 5 s, 72 ℃ 60 s, 循环 35 次, 72 ℃ 10 min。取 5 uL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分离并观察扩增产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 Kan 浓度对试管薯片芽分化及生根的影响

观察发现, 试管薯片在芽分化培养基上培养 14~21 d 后, 不加 Kan 的薯片直接分化长出绿色健壮小芽。Kan 浓度为 25 mg/L 时, 薯片增厚、变大、颜色鲜绿, 分化出芽情况与不加 Kan 无明显差异; Kan 浓度为 50 mg/L 时, 薯片稍有膨大, 颜色暗绿, 不能分化出芽; Kan 浓度为 75 mg/L 时, 部分薯片膨大, 颜色发暗, 褐化严重; Kan 浓度为 100 mg/L 时, 薯片全部褐化死亡。因此确定芽诱导时 Kan 浓度为 50 mg/L。

在抗性芽生根阶段仍需要加入 Kan, 以防止产生大量假阳性植株。接种 28 d 后, 不加 Kan 的植株生长旺盛, 根系发达, 而加入 Kan 的处理虽然也有植株生长, 但是随着 Kan 浓度的增加生根受限。Kan 浓度为 25 mg/L 时, 植株生根正常; Kan 浓度为 50 mg/L 时, 能正常生根, 但植株生长缓慢; Kan 浓度为 75 mg/L 时, 部分植株生根, 叶片发黄; Kan 浓度为 100 mg/L 时, 几乎没有根系, 叶片全部发黄。因此确定生根时 Kan

浓度为 75 mg/L。

## 2.2 农杆菌工程菌活化时间确定

农杆菌液活化时间对于遗传转化的效果至关重要，活化时间短，菌液浓度过低，不利于侵染，转化率较低，菌液浓度过高，容易使薯片伤口褐化死亡。从含有质粒 pART27-XSYV-rh 的农杆菌 LBA4404-pART27-XSYV-rh 的生长曲线测定结果(表 1)。可以看出，活化培养时间为 4.5 h 左右时农杆菌生长最快。

表 1 农杆菌 LBA4404-pART27-XSYV-rh 的生长曲线测定结果

时间 /h	OD <sub>600</sub> 值			
	重复1	重复2	重复3	平均值
1.0	0.119	0.115	0.117	0.117
1.5	0.159	0.137	0.128	0.141
2.0	0.182	0.182	0.138	0.167
2.5	0.199	0.247	0.204	0.217
3.0	0.232	0.272	0.219	0.241
3.5	0.300	0.324	0.291	0.305
4.0	0.339	0.428	0.333	0.367
4.5	0.402	0.498	0.412	0.437
5.0	0.469	0.654	0.509	0.544
5.5	0.601	0.722	0.634	0.652
6.0	0.707	1.016	0.784	0.836
6.5	0.807	1.112	0.989	0.969
7.0	0.955	1.461	1.137	1.184

## 2.3 侵染时间对转化的影响

侵染时间影响转化效率，时间太短不利于农杆菌的附着，时间过长，容易导致菌的滋生，溢出的菌液会过多而无法控制，下一步除菌时不容易清除干净，易导致薯片褐化死亡。通过表 2 可以看出，侵染时间为 7 min 时出芽率达到 50.0%，褐化率、污染率相对较低，因此选择侵染 7 min 为转化条件。

表 2 不同侵染时间对遗传转化的影响

侵染时间 /min	接种薯块 /块	出芽率 /%	褐化率 /%	污染率 /%
3	60	15.0	3.0	1.6
5	60	43.3	3.3	1.6
7	60	50.0	6.6	3.3
9	60	26.6	15.0	8.3
11	60	10.0	18.3	16.6
13	60	8.3	25.0	31.7
15	60	0	30.0	33.3

## 2.4 共培养时间对转化的影响

共培养时间对薯块诱导出芽有很大影响，随着共培养时间的延长，污染加重，出芽率下降。可能是因为农杆菌与外植体共培养的时间过长，农杆菌过度繁殖使其生长速率远远超过外植体细胞的分裂分化能力，致使外植体发生重度感染而出现软腐现象，最终失去再生愈伤能力。通过表 3 可以看出，试管薯块最佳共培养时间为 2 d 时最佳，出芽率达到 75.0%，污染率为 10.0%。

表 3 不同的共培养时间对遗传转化的影响

共培养时间 /d	接种薯块数 /块	出芽率 /%	污染率 /%
1	60	50.0	5.0
2	60	75.0	10.0
3	60	20.0	30.0
4	60	8.3	90.0

## 2.5 Cb 对转化的影响

抗性愈伤筛选过程中需要及时去除农杆菌，否则整个外植体将会腐烂致死，无法再生，严重影响转化。为了抑制和杀死农杆菌菌株，需要在抗性愈伤筛选过程中加入一定浓度的抗生素。不同抗生素对农杆菌的抑制效果不同，同种抗生素不同浓度对农杆菌的抑制效果也不同。在芽分化和生根阶段加入不同浓度 Cb 的结果(表 4)表明，当 Cb 浓度为 500 mg/L 时，才能有效抑制薯块芽分化阶段的农杆菌溢出，植株生长表面无不良反应，生长变慢，但基本上不影响出芽；而在生根阶段，Cb 浓度为 200 mg/L 时就能很好地抑制农杆菌的溢出，不影响植株生长。

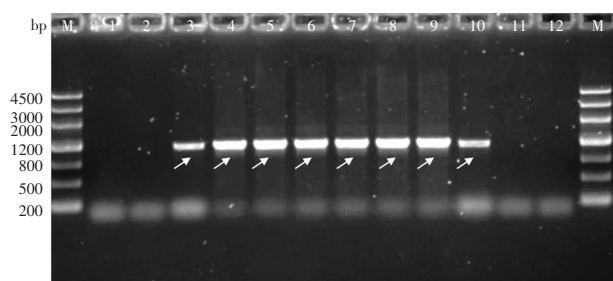
表 4 Cb 浓度对农杆菌 LBA4404-pART27-XSYV-rh 的抑制效果<sup>①</sup>

不同阶段	Cb浓度/(mg/L)									
	100	150	200	250	300	350	400	450	500	
芽分化阶段	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
生根阶段	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

① “+”出现农杆菌菌落；“-”未出现农杆菌菌落。

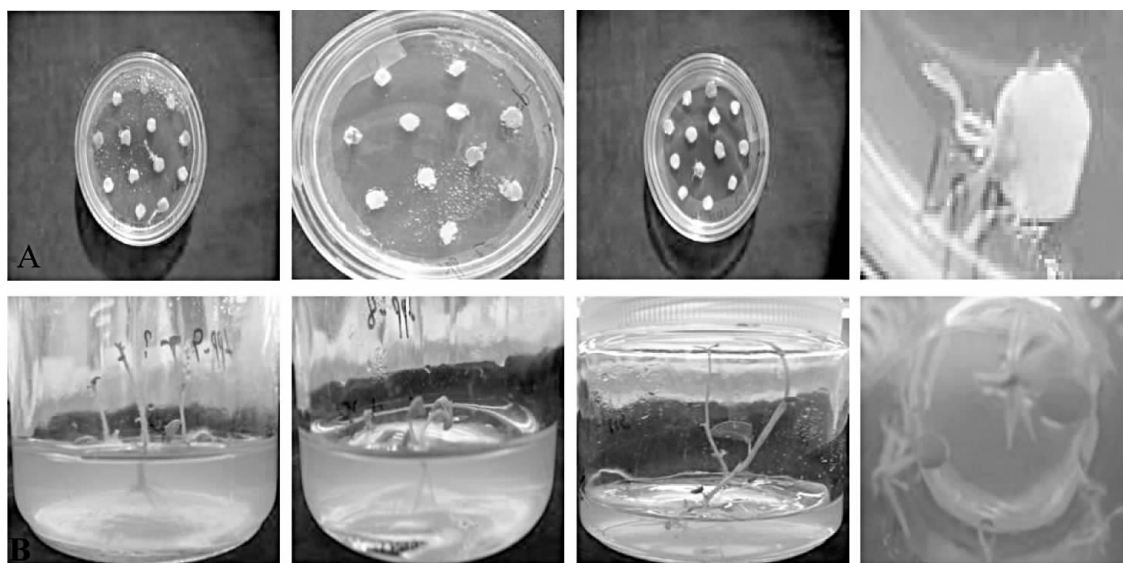
## 2.6 转基因植株的 PCR 检测

试管薯薄片分化出芽后(图 1A), 待抗性芽长至 1~2 cm 时剪下接入附加有 Kan 75 mg/L 和 Cb 200 mg/L 的生根培养基上培养, 14 d 后生根生长则继续转接, 经 3 次相同浓度 Kan 抗性生根筛选后, 获得正常生长的 20 株抗性植株(图 1B)。PCR 扩增产物的电泳分析结果(图 2)表明, 6 株抗性苗 DNA 能扩增出分子量约为 1 200 bp 左右的特异性目的片段, 而非转化植株未扩增出相应条带, 初步证明这 6 株再生植株为转基因植株。



M 为 Marker III, 1 和 12 为空白对照(以 ddH<sub>2</sub>O 为模板), 2 和 11 为阴性对照(以非转基因植株的 DNA 为模板), 3 和 10 为阳性对照(以质粒 pART27-XSYV-rh 为模板), 4-9 为转化植株 DNA PCR 鉴定。

图 2 转基因植株的 PCR 检测



图版 A 为试管薯薄片在含有 75 mg/L Kan 分化培养基上再生出绿色小芽; 图版 B 为转化植株在附加 75 mg/L Kan 培养基上生根。

图 1 薯片外植体的遗传转化

## 3 小结与讨论

农杆菌介导马铃薯遗传转化方法已广泛应用, 但针对不同的基因型、不同的外植体, 转化效果差异仍很大, 要根据具体基因型和外植体进行优化选择。作为遗传转化的受体材料, 必须具备来源充足、再生频率高、再生稳定、遗传稳定性好、培养时间短和对标记选择性抗生素敏感等特点<sup>[9]</sup>。在马铃薯的遗传转化体系中, 以茎段、叶片、块茎和试管薯为受体的 Ti 质粒转化均已获得成功。李晶等<sup>[10]</sup> 对马铃薯再生培养基、基因型、外植体类型进行了系统筛选, 将几丁质酶(chi)基因成功导入马铃薯东农 303; 邢小萍<sup>[11]</sup> 以叶盘、茎段、叶柄为外植体, 将抗菌肽基因导入马铃薯甘农薯 1 号, 并对影响转化效率的主要条件进行了筛选; 尤佳等<sup>[12]</sup> 用马铃薯栽培品种陇薯 3 号和甘农薯 2 号试管薯为外植体, 获得了转基因植株; 李珺等<sup>[13]</sup> 用蜡质马铃薯突变植株的茎段作为外植体, 获得了转基因植株, 其转化率约为 34%。本试验以马铃薯品种“陇薯 11 号”试管薯为外植体, 通过根癌农杆菌介导的方法成功转化马铃薯, 并对遗传转化体系中关

键因素进行了优化。

在植物转化过程中,既能够有效地去除农杆菌侵染所造成的污染又要不影响植株正常生长,同时又能够有效选择出转基因阳性植株。此过程涉及抗生素种类和浓度的正确选择过程,该阶段也是转化试验顺利进行的一个前提条件。抑菌素种类的选用与农杆菌的类型有关,有研究表明 Cb 对多个农杆菌菌株都有较强的抑制作用<sup>[13]</sup>。本试验选用 Cb 来抑制遗传转化过程中农杆菌的滋生,在芽分化和生根阶段分别用 Cb 500 mg/L 和 200 mg/L 来抑制农杆菌的生长,与张宁等<sup>[4]</sup>、尤佳等<sup>[12]</sup>的研究结果一致。因为本试验选用的载体 pBI121 所含的选择标记基因为新霉素磷酸转移酶基因(npt-II),该基因为 Kan 抗性基因,其转化的组织或器官能在含有一定浓度的 Kan 培养基上生长,反之未被转化的组织或器官将会死亡。试验选用 Kan 50 mg/L 作为芽分化阶段的筛选压力,选用 Kan 75 mg/L 作为生根阶段筛选压力。侵染和共培养时间在遗传转化中举足轻重,侵染时间太短,共培养时无农杆菌生长,转化失败;侵染时间太长,常因农杆菌毒害缺氧而软腐,确定农杆菌活化时间为 4.5 h,薯块侵染时间为 7 min,有助于减轻后续培养中细菌对植物的毒害作用,提高转化效率。共培养过程是为了使农杆菌能够很好地在外植体上附着,在恰当的时间将质粒 T-DNA 转移到外植体的细胞中,从而完成转化过程。最佳共培养时间的确定是为了使农杆菌附着外植体表面后有足够的时间在创伤部位诱发肿瘤,因此共培养时间不能太短;若共培养时间过长则会由于农杆菌的过度生长而使外植体受到毒害死亡,即便不死亡也会在后续培养中难以控制。本试验确定共培养时间为 2 d,此时外植体周围刚出现白色菌落,选择这个时间既能提高转化效率,又易去除农杆菌。

#### 参考文献:

- [1] 裴怀弟,刘润萍,林玉红,等. NaCl 胁迫对马铃薯试管苗 POD 酶活性及同工酶的影响[J]. 甘肃农业科技, 2020(6): 12-15.
- [2] 罗爱花,陆立银,胡新元,等. 种植方式对高寒阴湿旱作区马铃薯的影响[J]. 甘肃农业科技, 2020(3): 73-77.
- [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[J]. 作物学报, 2003, 29(6): 801-805.
- [4] 张宁,司怀军,李学才,等. 根癌农杆菌介导的马铃薯高效遗传转化体系的研究[J]. 中国马铃薯, 2004, 18(3): 132-135.
- [5] 李有忠,刘海英,张宁,等. 马铃薯试管薯诱导及其遗传转化体系的优化[J]. 生物技术, 2008, 18(3): 65-68.
- [6] 陈晓艳,孟亚雄,贾小霞,等. 四价抗马铃薯病毒植物表达载体构建及其对烟草的转化[J]. 广西植物, 2017, 37(1): 87-95.
- [7] 齐恩芳,王一航,文国宏,等. ‘陇薯3号’和‘陇薯7号’试管结薯关键条件优化[J]. 中国马铃薯, 2015, 29(3): 141-145.
- [8] 贾小霞,齐恩芳,王一航,等. 转录因子 DREB1A 基因和 Bar 基因双价植物表达载体的构建及对马铃薯遗传转化的研究[J]. 草业学报, 2014, 23(3): 110-117.
- [9] 贾笑英. 利用转基因技术培育马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 高淀粉及抗病新品系[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
- [10] 李晶. 马铃薯再生体系的建立及遗传转化的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.
- [11] 邢小萍. 抗菌肽基因导入马铃薯“甘农薯1号”的初步研究[J]. 甘肃农业科技, 2004 (11): 12-14.
- [12] 尤佳,张宁,文义凯,等. Cry III A 基因植物表达载体构建及马铃薯遗传转化[J]. 草业学报, 2014, 23(1): 248-256.
- [13] 李璐,马力通. 马铃薯淀粉体表达载体的构建及其转基因植物的培养[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 22-24.

(本文责编:陈伟)