

# 农杆菌介导 *P2300-pa-8e* 抗虫基因转化马铃薯的研究

杨志超<sup>1</sup> 张丽莉<sup>1</sup> 卢翠华<sup>1\*</sup> 邸宏<sup>1</sup> 姜丽丽<sup>1</sup> 张正国<sup>1</sup> 林忠平<sup>2</sup>  
胡鸞雷<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学农学院, 黑龙江哈尔滨 150030; <sup>2</sup>北京大学生命科学学院, 北京 100871)

**摘要:** 以马铃薯品种早大白和克新 18 号微型薯为外植体, 利用根癌农杆菌介导法, 将来源于 Bt 菌株 Bt185 的 *P2300-pa-8e* 抗虫基因转入马铃薯, 并对其遗传转化的影响因素进行研究。获得抗性植株早大白 19 株、克新 18 号 21 株; 经 PCR 检测, 5 株早大白、9 株克新 18 号呈阳性; 经 Southern-blot 杂交分析, 4 株早大白、6 株克新 18 号呈阳性, 证明 *P2300-pa-8e* 基因已整合到马铃薯基因组中。在网室内对转基因植株进行抗虫试验, 转基因材料对鞘翅目害虫暗黑鳃金龟和华北大黑鳃金龟幼虫表现出抗性。

**关键词:** 马铃薯; 根癌农杆菌; *P2300-pa-8e* 抗虫基因; 遗传转化

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 ( 2011 ) 18-0036-05

## Studies on Agro-bacterium-mediated Transformation of Potato with *P2300-pa-8e* Gene

YANG Zhi-chao<sup>1</sup>, ZHANG Li-li<sup>1</sup>, LU Cui-hua<sup>1\*</sup>, DI Hong<sup>1</sup>, JIANG Li-li<sup>1</sup>, ZHANG Zheng-guo<sup>1</sup>, LIN Zhong-ping<sup>2</sup>, HU Yuan-lei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract:** *P2300-pa-8e* gene was originated from Bt185, which exists in insect resistance transcription factor. In this study, *P2300-pa-8e* gene was transferred into the potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars, 'Zaodabai' and 'Kexin No.18' by agro-bacterium-mediated transformation, and influence factors of genetic transformation were optimized. Microtuber discs were used as explants. 19 resistant plants of 'Zaodabai' and 21 resistant plants of 'Kexin No.18' were obtained. Resistant plants were blot analyzed by PCR detection, of which 5 and 9 plants were positive. And these resistant plants were analyzed by Southern-blot, of which 4 and 6 plants had a positive amplification. Southern blot showed that single copies of the *P2300-pa-8e* gene were inserted into the genome of the transgenic plants. By the result of insect-resistant experiment, the transgenic materials showed resistance to coleopteran pests *Holotrichia parallela* and the larvae of *Holotrichia oblita* (Fald.).

**Key words:** Potato; Agro-bacterium; *P2300-pa-8e* gene; Genetic transformation

收稿日期: 2011-05-10; 接受日期: 2011-06-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 ( 2009AA10Z103 )

作者简介: 杨志超, 硕士研究生, 专业方向: 马铃薯生物技术, E-mail: Evilx@126.com

\* 通讯作者 ( Corresponding author ): 卢翠华, 研究员, 硕士生导师, 专业方向: 马铃薯生物技术, E-mail: cuihualu2000@yahoo.com.cn

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是茄科茄属双子叶植物, 是世界四大粮食作物之一, 由于它具有适应性强、产量高、营养成分全和加工产业链长等特点, 受到了全世界的广泛重视。我国是世界马铃薯生产第一大国, 面积和总产量占全世界的 1/4 (卢翠华 等, 2009)。

虫害是造成马铃薯减产的主要原因, 其中金龟子科害虫金龟子 (幼虫俗称蛴螬) 是世界范围内广泛分布的地下害虫之一。金龟子成虫、幼虫均可危害马铃薯, 但幼虫危害较大。传统化学药剂防治不仅危害人类健康, 而且造成环境污染 (姚庆学 等, 2003)。自 1996 年转基因作物商业化以来, 全球种植的抗虫转基因作物面积已经达到 2 625 万  $\text{hm}^2$  (James, 2008)。其中对金龟子科害虫具有杀虫作用的苏云金芽胞杆菌 *cry* 类基因的相继发现和克隆, 为害虫的防治提供了新的途径。Yu 等 (2006) 从 Bt185 中克隆了 *P2300-pa-8eal* 基因。

本试验将来源于 Bt 菌株 Bt185 的 *P2300-pa-8e* 基因导入马铃薯中, 期望获得抗虫的马铃薯材料, 为马铃薯抗性育种提供新资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和菌株

试验于 2009 年 7 月 ~ 2010 年 5 月在东北农业大学马铃薯实验室进行。

供试马铃薯品种为早大白和克新 18 号 (东北农业大学提供)。

供试农杆菌菌种为 LBA4404 (北京大学生命科学学院提供), 植物表达载体质粒 *P2300-Pa-8e* (图 1), 利用 Patatin 启动子驱动 *P2300-pa-8e* (500 bp) 基因的表达, 质粒由北京大学生命科学学院林中平教授提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 工程菌液的制备** 挑取含有质粒 *P2300-Pa-8e* 的农杆菌 LBA4404 单菌落接种于含有卡那霉素 (Kan)、链霉素 (Str) 和利福平 (Rif) 的 YEB 培养基中, 避光震荡培养。从中取 500  $\mu\text{L}$  菌液接种于 50 mL 相同的 YEB 培养基中, 以相同条件震荡培养。到对数生长期, 在  $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下离心 5 min, 弃上清液, 重悬于 MS 液体培养基中, 为工程菌液。

**1.2.2 薯块再生培养基的筛选** 将马铃薯早大白和克新 18 号脱毒微型薯灭菌、去皮, 切成薄片, 放入工程菌液中进行定时侵染, 转入共培养基, 28  $^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下培养 2~3 d。分别接种于 9 种再生培养基上 (表 1), 诱导薯块出芽。待芽长到 2~3 cm 时剪下, 转入生根培养基生根 (丛培琳 等, 2008; 姜丽丽 等, 2009)。

**1.2.3 共培养时间对遗传转化的影响** 在菌液  $\text{OD}_{600}$  值为 0.5、浸染时间为 5 min 的条件下, 用农杆菌感染薯片, 置于 28  $^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下分别培养 1、2、3、4、5 d, 在诱导培养基上培养 20 d, 统计抗性愈伤的诱导率。

**1.2.4 PCR 检测** 使用索来宝公司的植物总

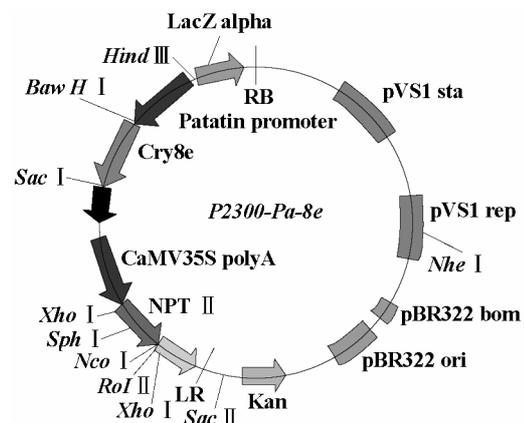


图 1 *P2300-Pa-8e* 植物表达质粒结构示意图

表 1 不同薯块再生培养基的激素配比

培养基	ZT/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
M <sub>1</sub>	3.0	0.5
M <sub>2</sub>	3.0	1.0
M <sub>3</sub>	3.0	1.5
M <sub>4</sub>	3.5	0.5
M <sub>5</sub>	3.5	1.0
M <sub>6</sub>	3.5	1.5
M <sub>7</sub>	4.0	0.5
M <sub>8</sub>	4.0	1.0
M <sub>9</sub>	4.0	1.5

DNA 提取试剂盒提取马铃薯植株的总 DNA, 以转化植株的总 DNA 为模板, 未转化植株的总 DNA 作阴性对照, 以 *P2300-pa-8e* 质粒为阳性对照, 根据 *P2300-pa-8e* 基因序列, 设计特异性引物 (Primer I: 5'-GGCGGCAGCATTCAAACACTCAA-3', Primer II: 5'-ATCTCCACCAAGATAGTGTCC-3'), 对目标基因进行扩增。PCR 体系 (25  $\mu$ L): 超纯水 16.5  $\mu$ L, 25 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L, 10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 2.0  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Primer I 0.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> primer II 0.5  $\mu$ L, 50 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> 模板 1.0  $\mu$ L, 5 U  $\cdot$   $\mu$ L Taq 酶 0.5  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 8 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52.5  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min; 4  $^{\circ}$ C 终止反应。1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 Southern-blot 杂交检测 用 Sac I 酶切转基因植株 DNA, 将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 经变性、中和, 用高盐转移法 (萨姆布鲁克, 2002) 将胶上的样品转移到尼龙膜上, 以目的基因 *P2300-pa-8e* 为探针, 采用地高辛试剂盒进行杂交、洗膜、显影。

1.2.6 转基因植株的移栽 将通过 Southern-blot 杂交检测的转基因植株培养 15~20 d, 炼苗后移入小盆中, 放入温室培养, 7 d 左右转入网室培养。

1.2.7 抗虫试验 用转基因小薯与对照小薯分别喂养暗黑鳃金龟幼虫 (3~4 日龄)、华北大黑鳃金龟幼虫 (3~4 日龄)、黄粉虫幼虫和超级大麦虫幼虫。暗黑鳃金龟 (3~4 日龄)、华北大黑鳃金龟 (3~4 日龄) 的幼虫采用室内杀虫活性测定 (王容燕等, 2007), 黄粉虫、超级大麦虫的幼虫采用饲料混合法 (张杰等, 2002) 进行生物测定。每处理 24 头初孵幼虫, 3 次重复, 置于光照培养箱中培养, 分别于 48、72、96 h 记录死虫数, 并计算校正死亡率。

$$\text{死亡率} = \text{死虫数} / \text{总虫数} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = (\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}) / (1 - \text{对照死亡率}) \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 共培养时间的确定

共培养时间的长短对遗传转化效率有影响, 而且不同物种及外植体材料与农杆菌的最佳共培养时间也不同。从图 2 可以看出, 早大白和克新 18 号薯片的共培养时间均在第 3 天时抗性愈伤组织诱导率最高, 分别为 92.16% 和 97.77%。

### 2.2 薯块再生培养基的确定

以 MS 为基本培养基, 以早大白为试材, 研究添加 IAA 和 ZT 两种激素对诱导马铃薯再生率的影响。试验结果表明 (表 2), 使用 M<sub>8</sub> 培养基时, 获得的出芽率最高, 高达 93.55%; 而使用 M<sub>1</sub> 培养基培养的薯块出芽率最低, 仅有 33.33%。因此, 本试验条件下最优薯块再生培养基为 M<sub>8</sub> (MS+4.0 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ZT +1.0 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> IAA)。

### 2.3 转基因植株与薯块的获得

马铃薯薯块经培养 20~30 d 后分化出芽。早大白接种薯块 36 块, 诱导产生再生植株 42 株, 有 19 株通过生根阶段筛选, 抗性植株再生频率为 52.78%; 克新 18 号接种薯块 32 块, 诱导产

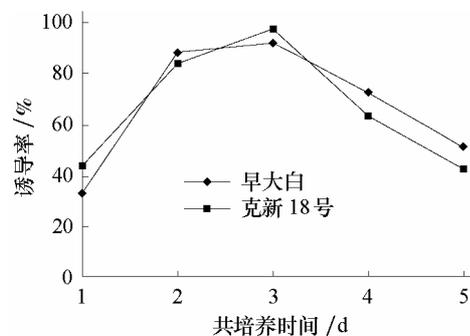


图 2 共培养时间对遗传转化的影响

表 2 不同激素浓度对比对早大白薯块生长的影响

培养基	接种薯块数/个	出芽外植体数/个	出芽率/%
M <sub>1</sub>	30	10	33.33
M <sub>2</sub>	32	14	43.75
M <sub>3</sub>	31	12	38.71
M <sub>4</sub>	29	17	58.62
M <sub>5</sub>	36	20	55.56
M <sub>6</sub>	32	22	68.75
M <sub>7</sub>	36	23	63.89
M <sub>8</sub>	31	29	93.55
M <sub>9</sub>	30	17	56.67

生再生植株 54 株, 有 21 株通过生根阶段筛选, 抗性植株再生频率为 65.63%。将抗性植株移入网室, 9 月收获薯块 (图 3)。



图 3 农杆菌介导克新 18 号薯块遗传转化再生植株与小薯的获得

A, 薯块抗性愈伤诱导; B, 薯块愈伤组织分化出芽; C, 抗性植株; D, 网室移栽; E, 单株移栽苗; F, 收获薯块。

## 2.4 PCR 检测

对早大白和克新 18 号所获得的抗性植株进行 PCR 鉴定, 得到了约 500 bp 的特异性条带 (图 4), 与阳性对照质粒的扩增结果一致, 阴性对照没有特异性扩增条带。PCR 检测结果初步表明, *P2300-pa-8e* 基因已整合到受体基因组中。

## 2.5 Southern-blot 杂交检测

将 PCR 检测呈阳性的植株进行 Southern-blot 杂交, 使用 *Sac* I 对转基因植株 DNA 进行酶切, 在 5 株早大白、10 株克新 18 号 PCR 阳性植株中, 4 株早大白、6 株克新 18 号有杂交信号 (图 5), 其中 4 株为双拷贝, 6 株为单拷贝。不同植株外源基因插入位点不同, 说明不同植株之间是相对独立的转基因植株。

## 2.6 抗虫试验

以非转基因马铃薯为对照, 测定 *P2300-pa-8e* 基因表达产物对暗黑鳃金龟、华北黑鳃金龟、黄粉虫、超级大麦虫幼虫的毒力。结果表明, 对暗黑鳃金龟、华北黑鳃金龟龄幼虫 7 d 的校正死亡率分别为 26.38%、34.72%; 14 d 的校正死亡率分别为 47.22%、55.56%; 而对黄粉虫、超级大麦虫幼虫均未表现活性。

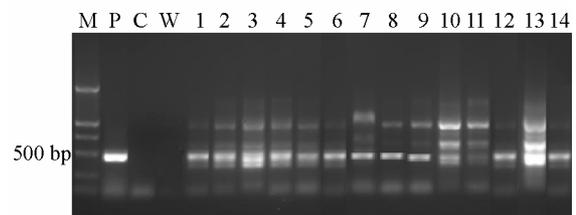


图 4 抗性植株 PCR 检测

M, DNA Marker (DL2000); P, 阳性对照; C, 阴性对照; W, 水空白对照; 1~5, 早大白转基因植株; 6~14, 克新 18 号转基因植株。

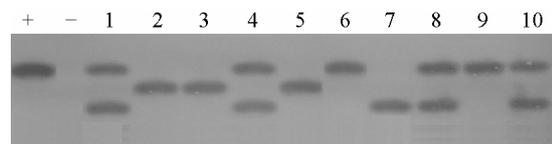


图 5 转化植株 Southern-blot 杂交检测

+, 阳性对照; -, 阴性对照; 1~4, 早大白转基因植株; 5~10, 克新 18 号转基因植株。

### 3 结论与讨论

选择马铃薯微型薯作为外植体,遗传转化过程中具有再生速度快、出芽率高、易于操作等优点。

培养基中激素的组成和浓度是影响植株再生的关键,生长素和分裂素比例合适可以提高胚状体发生频率。从诸多马铃薯再生培养的报道中可以看出,所使用的外源激素大相径庭(张宁等,2004),用一种或几种培养基并不适合所有的品种。因此,需针对不同基因型选择诱导再生的激素种类和浓度。本试验使用  $MS+4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ ZT}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$  为薯块再生培养基时获得的出芽率最高,高达 93.55%。

适当的共培养时间能提高转化效率,本试验结果表明,共培养时间以外植体周围刚出现白色菌落时为最佳(一般共培养 2~3 d),早大白和克新 18 号最佳共培养时间均为 3 d。这样既可提高转化频率,又易于去除农杆菌。达到最佳生长状态的共培养时间则由农杆菌菌液的生长状态、菌液浓度、外植体类型及培养条件等决定。

对诱导生根的 40 株马铃薯抗性植株进行 PCR 检测,有 14 株呈 PCR 阳性反应,但都出现了非特异性扩增条带,其原因可能是:① 引物与靶序列不完全互补或引物聚合形成二聚体。②  $\text{Mg}^{2+}$  离子浓度过高、退火温度过低,及 PCR 循环次数过多。③ 酶的质和量,有些来源的酶易出现非特异条带,而另一来源的酶则不出现;酶量过多有时也会出现非特异性扩增。

经 Southern-blot 检测,有 10 株为转基因植株,表明在本试验中存在假转化体。分析原因可能有:① 外植体的表层细胞稳定表达外源选择抗性基因,为其他一些非转化细胞提供了一道屏障,逃避了选择压力的影响而继续分裂和分化。② T-DNA 进入细胞后并没有整合到受体基因组中,而是以游离状态存在,导致 PCR 呈阳性反应。因此只有进行植物基因组的 Southern-blot 分析,才可以准确地了解外源基因在转化植株基因组中的整合情况。

本试验通过对薯块的抗虫试验,结果表明转基因马铃薯对鳞翅目害虫黄粉虫、超级大麦虫无活性,对鞘翅目害虫暗黑鳃金龟和华北大黑鳃金龟表现出抗性,为马铃薯抗性品种的培育提供了新的材料和方法。

#### 参考文献

- 丛培琳,卢翠华,邸宏,石瑛,张丽莉,姜丽丽,李文滨. 2008. *Bt-CryIV* 基因对马铃薯的遗传转化. 东北农业大学学报, 39(9): 16-20.
- 姜丽丽,邸宏,林忠平,胡鸾雷,吴韩英,崔少彬,姜丽静,卢翠华. 2009. 蓝铜蛋白类似基因 *BcBCP1* 转化马铃薯及其抗旱性的改良. 中国蔬菜, (2): 7-11.
- 卢翠华,邸宏,张丽莉. 2009. 马铃薯组织培养原理与技术. 北京:中国农业科学出版社.
- 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 2002. 分子克隆试验指南. 3版. 北京:科学出版社.
- 王容燕,王金耀,宋健,曹伟平,杜立新,冯书亮,宋福平,张杰. 2007. 铜绿丽金龟的室内人工饲养. 昆虫学报, 50(1): 20-24.
- 姚庆学,张勇,丁岩. 2003. 金龟子防治研究的回顾与展望. 东北林业大学学报, 31(3): 64-66.
- 张杰,宋福平,李长友,陈中义,檀建新,黄大昉. 2002. 对鞘翅目害虫高毒力 Bt 基因 *cry3Aa7* 的分离克隆及表达研究. 中国农业科学, 35(6): 650-653.
- 张宁,司怀军,李学才,王蒂. 2004. 根瘤农杆菌介导的马铃薯高效遗传转化体系的研究. 中国马铃薯, 18(3): 132-135.
- James C. 2008. Global status of commercialized Biotech/GM crops. ISAAA Brief No. 39. Ithaca NY: ISAAA
- Yu H, Zhang J, Huang D F, Gao J G, Song F P. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian cockchafer: *Holotrichia parallela*. Curr Microbiol, 53(1): 13-17.