

马铃薯遗传转化体系的优化及玉米淀粉分支酶基因 *SBE II b* 的导入

范亚丽¹, 阮颖^{2*}, 刘春林²

(1. 阜阳师范学院 生命科学学院, 安徽 阜阳 236037; 2. 湖南农业大学 作物基因工程省重点实验室, 长沙 410128)

摘要: 以马铃薯脱毒试管苗茎段为转化受体材料, 建立并优化了农杆菌介导的马铃薯遗传转化体系。通过农杆菌介导法将玉米淀粉分支酶基因(Starch branching enzyme b, *SBE II b*)的过表达载体转化马铃薯, 接种762个茎段, 共获得35株抗性植株。经PCR检测获得了4株转基因阳性植株; 对转基因植株进一步进行GUS活性组织化学染色, 发现转基因植株的茎段与试管薯均被染上蓝色, 表明外源 *SBE II b* 基因已整合到马铃薯基因组, 且正常表达。

关键词: 玉米淀粉分支酶基因; 马铃薯; 遗传转化; 淀粉

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)02-0226-05

Optimization of genetic transformation system of potato and introduction of maize starch branching enzyme gene *SBE II b* into potato

FAN Ya-Li¹, RUAN Ying^{2*}, LIU Chun-Lin²

(1. School of Life Sciences, Fuyang Teachers College, Fuyang 236037, China; 2. Crop Gene Engineering Key Laboratory, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: The highly effective potato transformation systems were established and optimized using tube potato plantlets as transformation materials in this study. The maize starch branching enzyme gene(*SBE II b*) was transformed into potato using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. 762 stem sections were infected by *Agrobacterium*-mediated tumefacien method. 4 transgenic plants were obtained by PCR measurement, implying that *SBE II b* gene had been integrated into potato genome. It was also found that *GUS* gene could normally be expressed in stem sections and potato microtubers of the trasgenetic potato plants.

Key words: maize starch branching enzyme gene; potato; genetic transformation; starch

淀粉占玉米籽粒总重的64%~78%, 是籽粒最主要的成份。玉米淀粉的生物合成涉及4类酶-ADPG 焦磷酸化酶(AGP)、淀粉合成酶(SS)、淀粉分支酶(SBE)和去分支酶(SDBE), 淀粉分支酶(SBE)催化葡萄糖以 α -1,6-糖苷键连接, 形成分支结构(Smith等, 1997)。目前淀粉生物合成途径中

的几个主要酶的基因相继被克隆, 其中玉米分支酶基因 *SBE II a*、*SBE II b* 也已克隆(Hannah & James, 2008)。玉米的淀粉分支酶 SBE 有三种同工酶即 SBEI、*SBE II a* 和 *SBE II b*, *SBE II a* 主要存在于叶片中, 而 SBEI 和 *SBE II b* 主要存在于胚乳中(Jeon等, 2010)。遗传研究表明高支链淀粉主要是

① 收稿日期: 2011-08-21 修回日期: 2011-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(31000132); 阜阳师范学院校级自然科学基金(2010FSKJ12)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(31000132); Natural Science Foundation of Fuyang Teachers College(2010FSKJ12)]

作者简介: 范亚丽(1982-), 女, 河南商丘人, 硕士, 讲师, 主要从事植物生物技术, (E-mail)fanyali0601@163.com。

* 通讯作者: 阮颖, 女, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学研究, (E-mail)yingruan@hotmail.com。

由 *SBE II b* 基因控制。因此,通过反义技术将玉米淀粉分支酶 *SBE II b* 基因的全长 cDNA 转化到玉米中,发现转基因籽粒中直链淀粉含量显著提高(姚新灵等,2005)。随着我国马铃薯淀粉工业的发展,选育出高淀粉含量的品种尤为重要。马铃薯含有 8%~34% 的淀粉,其中支链淀粉占 75%~80%(Burton 等,1997)。直链淀粉与支链淀粉的比例及支链淀粉的特性决定了淀粉粒的结构,进而影响着淀粉的质量、功能和应用。改变淀粉的质量,如高支链、低支链、低直链或高直链的比例,无论在食品还是工业应用上都有很大的潜力(王琴等,2006)。

SBE 是支链淀粉合成的关键,在植物淀粉生物合成过程中起重要调节作用,一方面它能切开以 α (1-4)糖苷键连接的葡萄糖,另一方面它能把切下的

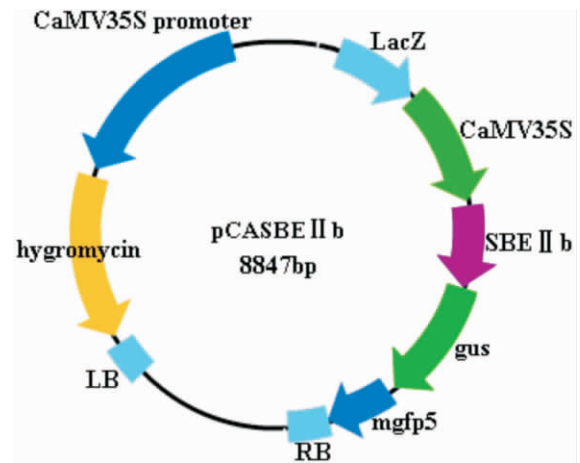


图 1 表达载体 pCASBE II b 结构
Fig. 1 Construction of plant expression vector pCASBE II b

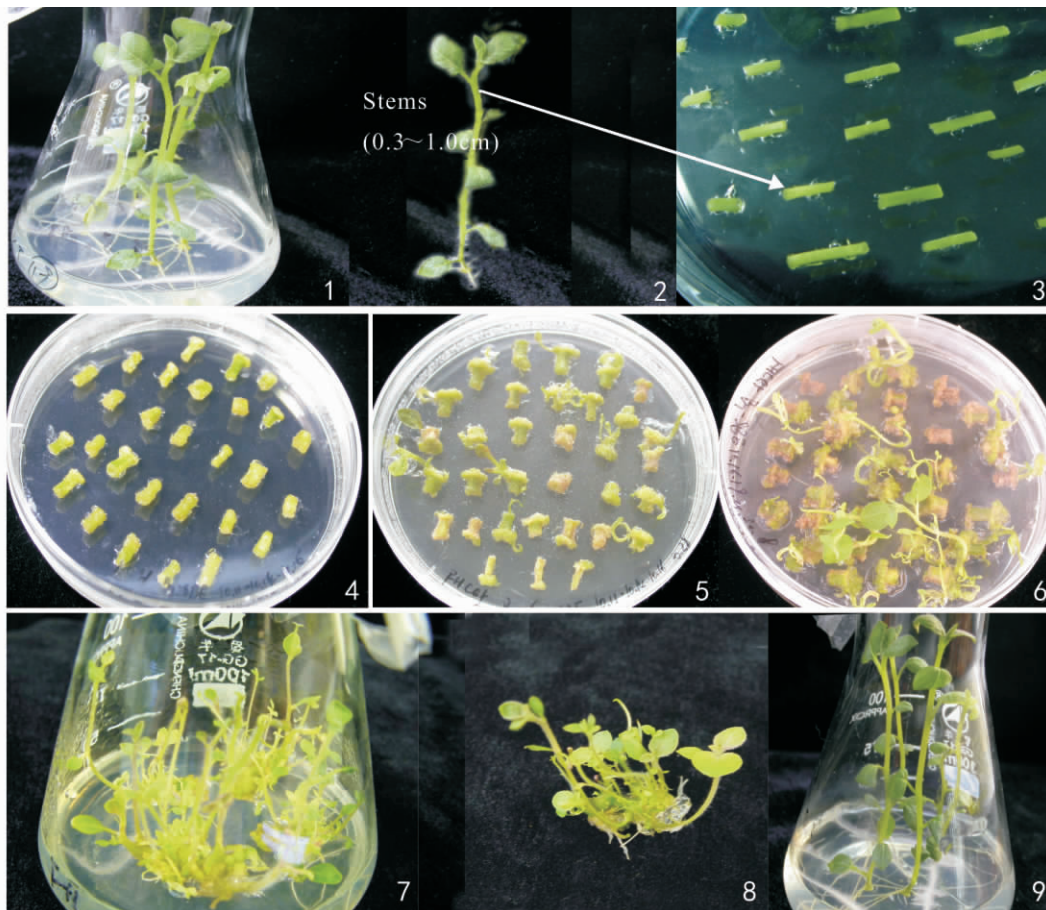


图 2 马铃薯遗传转化实验流程

Fig. 2 The genetic transformation procedures of potato

- 1-2. 15 d 的马铃薯试管苗; 3. 预培养的茎段; 4. 茎段抗性愈伤组织段诱导; 5-8. 抗性不定芽的诱导; 9. 抗性不定芽的生根。
1-2. Potato plantlets after 15 days; 3. Pre-culture of stem sections; 4. Induction of stem sections resistance calli; 5-8. Induction of resistance shoots; 9. Radication of resistance shoots.

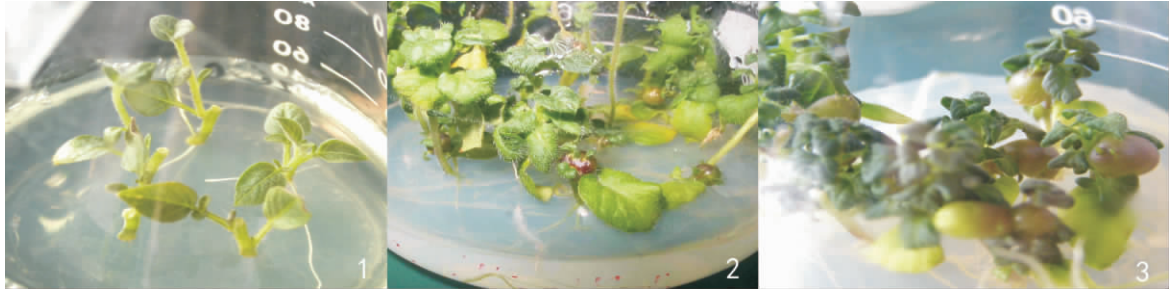


图 3 抗性试管薯的诱导 1. 马铃薯试管苗茎段; 2-3. 诱导的试管薯。

Fig. 3 Induction of potato resistance microtuber *in vitro* 1. Potato plantlets stem sections; 2-3. Induction of the potato microtubers.

短链通过 $\alpha(1-6)$ 糖苷键连接于受体链上, 形成分支结构。其活性高低影响了直、支链淀粉的比例, 还可改变支链淀粉的结构, 形成分支程度不一的支链淀粉, 从而赋予淀粉新的理化特性。本研究以马铃薯脱毒试管苗茎段为转化受体材料, 建立并优化农杆菌介导的马铃薯遗传转化体系, 进而利用农杆菌介导法, 将玉米淀粉分支酶 *SBE II b* 基因导入到马铃薯普通栽培种大西洋 (*Atlantic*) 中, 旨在增强淀粉分支酶基因的表达, 提高马铃薯块茎支链淀粉的含量, 为进行马铃薯品种改良和分子育种探索新方法。

大西洋 (*Atlantic*)。菌株为含目的 DNA 片段表达

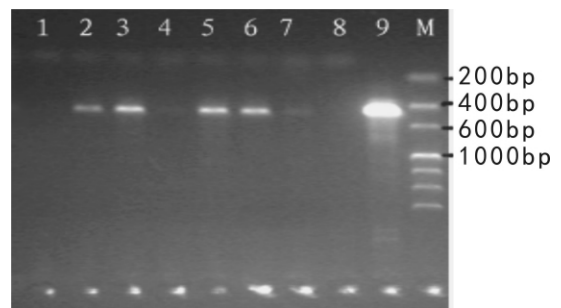


图 4 马铃薯转基因植株部分 PCR 检测结果

Fig. 4 PCR detection of transgenic potato plants

M. Marker; 1-7. 抗性植株; 8. 阴性对照 (非转基因苗); 9. 阳性对照 (质粒 PCR)。

M. Marker; 1-7. Resistant plants; 8. Non-transgenic plant; 9. Positive control.

1 材料与方法

1.1 材料

采用生产上主栽的马铃薯脱毒试管苗, 品种为

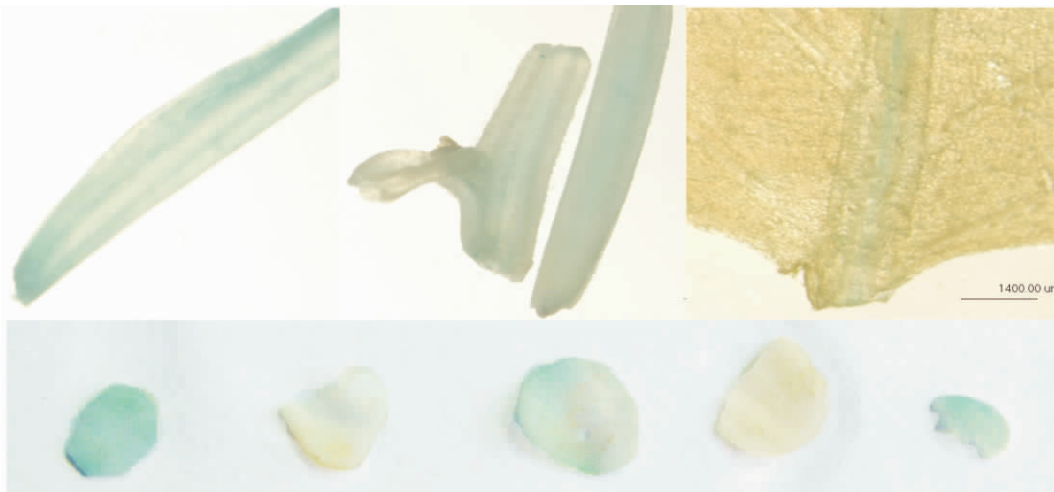


图 5 马铃薯转基因植株的 GUS 检测

Fig. 5 Detection of expression of GUS in transgenic potato plants

1-2. 转基因苗茎段 GUS 基因表达检测; 3. 转基因苗叶片 GUS 基因表达检测; 4. 试管薯 GUS 基因达检测; A、B、C. 转基因试管薯; CK1、CK2. 非转基因试管薯。

1-2. GUS gene expression detection of transgenic stem; 3. GUS gene expression detection of transgenic leaf; 4. GUS gene expression detection of Transgenic potato microtuber; A, B and C. Transgenic potato microtuber; CK1 and CK2. non-transgenic potato microtuber.

载体的农杆菌菌株: *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, 湖南农业大学作物基因工程实验室提供; 质粒载体为 pCASBE II b, 结构如图 1。

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯转化系统的建立和优化 以马铃薯脱毒试管苗茎段为转化受体材料, 研究潮霉素(Hy-gromycin B, Hy)选择压、预培养时间、侵染时间、共培养时间及农杆菌浓度, 对农杆菌介导的马铃薯遗传转化体系进行建立和优化。将马铃薯脱毒试管苗剪成不含腋芽长 0.5 cm 左右的茎段, 接种于含 Hy 浓度为 0、1、2、3、4、5、6 和 7 mg/L 的诱导培养基中, 进行愈伤诱导中选择压力的优化; 取脱毒试管苗带腋芽的茎段, 分别插入含 Hy 浓度为 0、1、2、3、4、5、6 和 7 mg/L 的生根培养基中, 进行生根过程中选择压力的优化; 预培养 0、1、2、3 和 4 d 后, 用菌液侵染, 通过观察愈伤生长情况, 从而优化预培养时间; 取预培养 3 d 的茎段, 接种于愈伤培养基中, 分别共培养 0、1、2、3 和 4 d 后, 进行共培养时间的优化。从抗性平板上挑取单菌落接种于含 25 mg/L 的利福霉素(Rif)、50 mg/L 的链霉素(Str)和 50 mg/L 卡那霉素(Kan)50 mL 的 YEB 液体培养基中, 28 °C、250 rpm 震荡培养过夜, 然后取 5 mL 接种于 50 mL 含同样抗生素的 YEB 液体培养基中, 振荡培养至 $OD_{600} = 0.2、0.5、0.8$ 与 1.0 时, 对菌液浓度的确定。

将预培养后的马铃薯组培苗茎段投入准备好的菌液中进行浸染, 室温下不断的摇动菌液使外植体与菌液充分接触, 浸染时间分为 3、5、10、15 和 20 min 5 个平行组。对照预定时间, 将转化材料取出, 再用灭菌滤纸拭去表面菌液, 转入共培养培养基 MS₀ (MS 无激素培养基)。28 °C 暗培养, 共培养后转到加有适当浓度 Hy 和 Cef 的愈伤培养基上, 待愈伤组织长到适当时间转入到抗性分化培养基上诱导分化。将分化苗转入抗性生根培养基上诱导生根。

1.2.2 马铃薯试管薯的诱导 待试管苗壮苗后进行切段, 将单节茎段或带有 3~5 个腋芽的多节茎段切段置于试管薯诱导培养基 MS+CCC 200 mg/L+2.0 mg/L 6-BA+白糖 8%+琼脂粉 0.8%。转基因植株试管薯诱导过程中, 进行相应的抗性筛选。培养条件 pH 值 5.8, 光照 1 500 lx, 培养温度 25 °C 培养, 40 d 后收获。

1.2.3 转化子的筛选 PCR 检测: 根据表达载体启动子和插入的目的片段设计检测引物, 即选取启动子的一段序列和目的片段的一段序列来设计引物。

对于 pCASBE II b 载体启动子为 pCAMBIA1303 自身携带的 35S 启动子。引物序列为: 5'-CCAAA-GATGGACCCCCACCCACGAG-3' (Forward), 5'-CCCAAGTTGAAGTCCAGCCGTGAAT-3' (Reverse)。引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μ L, PCR 程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 40 s; 60 °C 退火 40 s; 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 7 min。GUS 检测: 采用 GUS 活性组织化学染色法, 参照植物基因工程与技术的方法。把共培养后的愈伤组织、抗性植株的叶片及茎段, 放入 X-Gluc 底物缓冲液中, 37 °C 温浴过夜, 75% 乙醇脱色 1 次; 无水乙醇脱色 2~3 次, 每次 20 min, 解剖镜下观察, 阳性反应材料出现蓝色斑点。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导马铃薯转化体系的建立和优化

本试验采用农杆菌介导法, 筛选出马铃薯遗传转化的最佳组织培养方法。茎段愈伤诱导培养基为: MS+0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA, 芽诱导培养基: MS+5 mg/L GA3+2.5 mg/L 6-BA。通过外植体 Hy 敏感性试验, 确定了筛选马铃薯茎段的 Hy 适宜使用浓度, 即 Hy 浓度为 4.0 mg/L 为临近值。此外, 对转化过程中预培养时间、共培养时间、农杆菌侵染时间和侵染浓度进行优化, 结果发现外植体预培养 3 d、共培养 2 d 最佳。在侵染过程中, 农杆菌的浓度 (OD_{600}) 为 0.5~0.8, 感染时间为 10 min, 愈伤组织长势最强, 转化效率最佳。在抗性筛选过程中, 加入 Cef(200 mg/L), 能有效抑制培养过程中的污染问题。农杆菌介导马铃薯遗传转化过程实验流程如图 2 所示。

2.2 抗性试管薯的诱导

选取壮苗后 20 d 左右的抗性植株为材料, 将单节茎段或带有 3~5 个腋芽的多节茎段切段置于试管薯诱导培养基。40 d 后可观察到抗性植株腋芽处诱导微型试管薯, 60 d 后抗性试管薯的平均直径达 3.6 mm, 平均重量达 246 mg, 薯表皮略显紫色。抗性试管薯的诱导过程如图 3。

2.3 抗性植株的 PCR 检测

本试验采用农杆菌介导法对大西洋茎段外植体进行 SBE II b 基因的转化, 接种了 762 个茎段, 共获得 35 株抗性再生植株。取抗性植株幼嫩叶片和幼

嫩茎段提取总 DNA,以其为模板,用 *SBE II b* 基因的特异引物进行 PCR 检测,阴性对照为未转化的同一品种植株 DNA,以质粒作阳性对照,检测出 4 株阳性转基因植株(图 4)。

2.4 转化马铃薯的 GUS 检测

取抗性植株的 PCR 检测中成阳性的植株和未经转化的植株,进行 GUS 活性组织化学染色。染色结果如图 5 所示,对照未经转化的试管苗的茎段,阳性植株茎段被染上蓝色。叶片中的纤维束部分也被染上蓝色,而叶肉部分没有被染上蓝色。对阳性植株在抗性诱导培养基上诱导的试管薯切薄片进行 GUS 染色,其中 A、B、C 是 3 个抗性试管薯的被切薄片,对照未经转化收获的试管薯,A、B、C 薄片均被染上蓝色。结果表明,GUS 基因在转基因植株组织中正常表达。

3 结论与讨论

建立良好的受体系统是实现基因转化的先决条件,关系到基因转化的成败。受体系统的建立主要依赖于植物组织培养技术。与一般的植物组织培养相比,受体系统的要求更高、复杂。首先要建立一个高频再生系统,包括外植体的选择、最佳培养基的确立、外植体抗生素敏感测定等。本试验对马铃薯试管苗茎段进行了再生能力的研究,发现马铃薯试管苗茎段具有生长状况确定、愈伤充分接触培养基(压入培养基表层)、诱导率高、分化能力强的突出特点,因此认为是马铃薯基因转化的良好受体材料。进而以马铃薯茎段为材料,研究了影响农杆菌介导的马铃薯遗传转化的各种因素。通过对受体材料的潮霉素(Hy)敏感性鉴定,确定了针对茎段的合适的筛选剂量为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在整个的筛选转化体系中,前期使用较低浓度的抗生素,后期再用较高浓度的抗生素筛选,且在高浓度选择的时间达到 8 周,可淘汰大量的非转化体而得到较多的转化植株。此外,在农杆菌侵染前必须让外植体进行一段时间的预培养,茎段如果预培养 3 d,抗性愈伤率达到 81.08%。对于茎段来说,共培养 2 d 处理后的愈伤组织诱导率最高,共培养 4 d 后,农杆菌过度生长而引起了毒害,从而影响了转化的效率。

利用上述方法,经过 PCR 筛选和 GUS 检测,我

们得到了马铃薯阳性 *SBE II b* 转基因植株。在支链淀粉合成过程中,*SBE II b* 发挥着重要作用,尤其对 A 链淀粉的合成(Jeon 等,2010)。抑制 *SBE II b* 的表达,能显著降低水稻和小麦籽粒中支链淀粉含量,提高直链淀粉比例(Nishi 等,2001; Regina 等,2005)。而提高 *SBE II b* 的表达,能显著提高水稻支链淀粉中短链 DP 6-11 的比例(Tanaka 等,2004)。因此,下一步的实验是测定转基因马铃薯块茎中淀粉的理化特性,从而检测转玉米 *SBE II b* 基因对马铃薯淀粉特性的影响。

参考文献:

- 王关林,方宏筠. 2002. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社:738
- Burton RA, Martin C. 1995. Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development[J]. *Plant*, **7**:3-15
- Fan YL(范亚丽), Ruan Y(阮颖), Li J(李进), et al. 2008. Cloning of the maize starch branching enzyme *SBEIIb* gene and constructing of its over-expression vector (玉米淀粉分支酶基因 *SBEIIb* 的克隆与过表达载体的构建)[J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), **24**(4):72-75
- Hannah LC, James J. 2008. The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperm[J]. *Curr Opin Biotech*, **19**:160-165
- Jeon J, Ryoo N, Hahn T, et al. 2010. Starch biosynthesis in cereal endosperm[J]. *Plant Physiol Biochem*, **48**:383-392
- Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, et al. 2001. Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm[J]. *Plant Physiol*, **127**:459-472
- Regina A, Kosar-Hashemi B, Li Z, et al. 2005. Starch branching enzyme Iib in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at non-synthetic locus [J]. *Plant*, **222**:899-909
- Smith AM, Denyer K, Martin C. 1997. The synthesis of the starch granule[J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**:67-87
- Tanaka N, Fujita N, Nishi A, et al. 2004. The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm[J]. *Plant Biotechnol J*, **2**:507-516
- Wang Q(王琴), Feng YZ(冯颖竹), Wen QB(温其标), et al. 2006. Application of Waxy maize starch and its modified starch in the light industry(糯玉米淀粉的改性及其在轻工业中的应用)[J]. *J Maize Sci* (玉米科学), **14**(2):170-174
- Yao XL(姚新灵), Ding XZ(丁向真), Chen YY(陈彦云), et al. 2005. Functions of genes encoding starch branch enzyme and debranch enzyme(淀粉分支酶和去分支酶编码基因的功能)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **41**(2):253-259