

转 *BADH* 基因马铃薯无性繁殖二代耐盐性检测

李东魁¹, 王蒂^{1,2,*}, 张俊莲^{1,2}, 司怀军^{2,3}, 柳娜¹

¹甘肃农业大学农学院, 兰州 730070; ²甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 兰州 730070; ³甘肃农业大学生命科学技术学院, 兰州 730070

摘要: 在 0%、0.3%、0.6% NaCl 胁迫下, 检测转 *BADH* 基因马铃薯及其受体亲本 ‘甘农薯 2 号’ 的盆栽植株耐盐性的结果表明: *BADH* 基因的遗传性稳定且转基因植株的耐盐性比非转基因的强。

关键词: 马铃薯; *BADH* 基因; 耐盐性; 转基因植株

Determination of Salt-tolerance of the Second Asexual Multiplication Generation of Transgenic Potato (*Solanum tuberosum* L.) with *BADH* Gene

LI Dong-Kui¹, WANG Di^{1,2,*}, ZHANG Jun-Lian^{1,2}, SI Huai-Jun^{2,3}, LIU Na¹

¹College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ²Gansu Key Laboratory of Crop Improvement & Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China; ³College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: PCR analysis and salt tolerance of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with *BADH* gene and the recipient parent potato ‘Gannongshu 2’ were conducted under 0%, 0.3% and 0.6% NaCl stresses. The results showed that the *BADH* gene had higher genetic stability, and the NaCl tolerance of transgenic plant was higher than that of untransgenic plant.

Key words: potato (*Solanum tuberosum*); *BADH* gene; NaCl tolerance; transgenic plant

植物适应环境胁迫的生理机制之一是渗透调节, 甜菜碱(betaine)被认为是最有希望的渗透调节物质之一。另外, 马铃薯对盐碱比较敏感, 且自身并不能积累甜菜碱(McCue和Hanson 1990)。如果采用基因工程技术把与甜菜碱合成相关的基因转入马铃薯中, 使其积累甜菜碱, 将有可能达到增强其耐盐性的目的。张宁(2004)从菠菜(*Spinacia oleracea*)中分离到合成甜菜碱的关键酶——甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, *BADH*)基因, 并转化马铃薯获得转基因植株。本文选用该转基因植株无性繁殖二代4个株系及其受体亲本 ‘甘农薯 2 号’ 种薯为材料, 检测 *BADH* 基因在马铃薯无性繁殖二代中的遗传稳定性和植株的耐盐性, 观察转 *BADH* 基因马铃薯株系是否有耐盐性, 以期转 *BADH* 基因耐盐马铃薯新品系的培育提供参考。

材料与amp;方法

材料为转 *BADH* 基因马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)无性繁殖二代 4 个株系(GN-1、GN-

2、GN-3 和 GN-4)种薯及其受体亲本 ‘甘农薯 2 号’(GN-对照)种薯, 由甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室提供。选取大小均一的薯块, 用蛭石在防虫网中盆栽, 生长期间进行 3 个浓度(0%、0.3%、0.6% NaCl)胁迫处理, 水肥管理按常规。每个株系种 3 盆, 每盆 2 株, 重复 3 次, 随机排列。盐胁迫期间, 盆下加塑料小盘, 收集盆中渗漏的溶液循环浇灌以保证盆中盐浓度平衡, 防虫网上加遮塑料薄膜以防雨, 加遮阳网以防强光照射。整个生长期间, 每 7 d 浇 250 mL 营养液, 营养液为 MS, 并添加 20 g·L⁻¹ 磷二胺。

以十六烷基三乙基溴化铵(cetyltriethyl ammonium bromide, CTAB)法提取马铃薯 DNA, 具体操作步骤参照王关林和方宏筠(2002)

收稿 2007-06-06 修定 2007-08-20
资助 高等学校博士学科点专项科研基金(20050733003)、甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2006-01)、国家科技支撑计划(2006BAD21B05)。

* 通讯作者(E-mail: wangd@gsau.edu.cn)。

书中的方法。用于 PCR 检测的引物及序列: 引物 1, 5' TTTCTTCGCATTTAACCAAG 3'; 引物 2, 5' CTTAACAAAAACAACACCGT 3' (甘肃农业大学张宁先生提供), 预期扩增片段大小 1.5 kb。具体反应体系及条件参照张宁(2004)博士论文。

测定转基因植株的耐盐性, 于盐胁迫 20 d 后按株系分别随机采取相同部位的功能叶片若干, 按株系混合并参照李合生(2000)书中的方法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)、叶绿素(chlorophyll)和细胞膜透性(cell membrane permeability), 取平均值比较。盐胁迫 2 个月后, 观察不同盐浓度下的转 *BADH* 基因马铃薯和非转基因植株的生长差异。所有数据均用 DPS (data processing system) 进行统计分析(唐启义和冯明光 1997)。

结果与讨论

1 马铃薯转基因植株的 PCR 检测

转 *BADH* 基因马铃薯无性繁殖二代植株 PCR 检测表明, 4 个转基因株系和质粒阳性对照均能扩增出约 1.5 kb 的特异性条带, 且无杂带, 而非转基因植株的无此条带, 说明 *BADH* 基因在转基因马铃薯中的遗传是稳定的(图 1)。

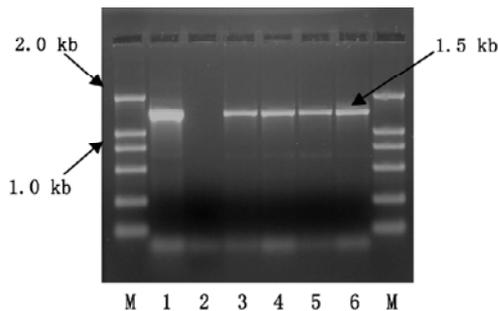


图 1 马铃薯无性繁殖二代中 *BADH* 的 PCR 检测

Fig.1 Detection of *BADH* by PCR in the second asexual multiplication generation of transgenic potato

M: 标准分子量 DNA (DL2000); 1: 质粒阳性对照; 2: 非转基因植株(GN-对照); 3~6: 转基因植株 GN-1、GN-2、GN-3 和 GN-4。

2 NaCl 胁迫下转基因马铃薯植株的几种与 NaCl 胁迫有关的生理指标的变化

图 2 显示: 随着 NaCl 浓度的升高, 马铃薯

植株体内 MDA 含量总体上表现为上升, 而转基因植株的 MDA 含量均显著低于非转基因植株, 说明转基因植株受 NaCl 伤害的程度相对较轻。

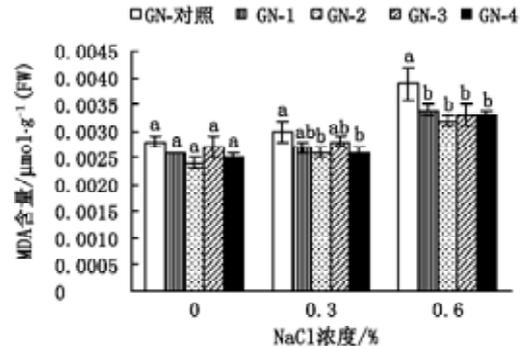


图 2 NaCl 胁迫下马铃薯植株中的 MDA 含量变化

Fig.2 Changes in MDA content of potato under NaCl stress
大小写字母分别代表 1% 和 5% 水平差异显著性, 图 3、图 4 同此。

随着 NaCl 浓度的升高, 马铃薯植株叶片中的叶绿素含量总体上呈下降趋势, 但在 0.6% NaCl 下, 转基因植株叶绿素含量均极显著高于非转基因植株(图 3), 高出 23%~33%, 说明转基因植株受 NaCl 伤害的程度相对较轻。

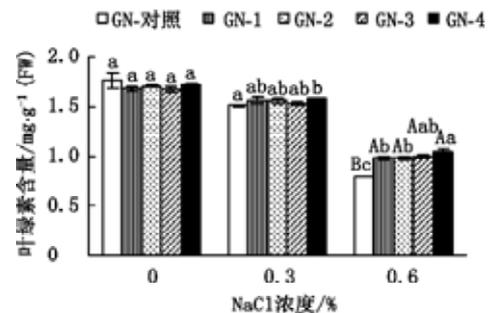


图 3 NaCl 胁迫下马铃薯植株中的叶绿素含量变化

Fig.3 Changes in chlorophyll content of potato under NaCl stress

随着 NaCl 浓度的升高, 马铃薯植株的细胞膜透性总体上呈上升趋势(图 4), 说明植株细胞膜受伤害逐渐增大。而在 0.6% NaCl 下, 转基因植株的细胞膜透性均显著低于非转基因植株(图 4), 其原因可能是外源基因导入后清除自由基的能力提高和细胞膜得到保护之果。

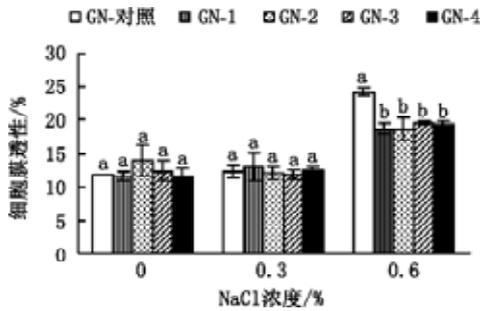


图4 NaCl胁迫下马铃薯植株中的细胞膜透性变化
Fig.4 Changes in cell membrane permeability of potato under NaCl stress

3 NaCl胁迫下马铃薯转基因植株的生长观察

将转基因植株和非转基因植株分别用0%、0.3%、0.6% NaCl胁迫2个月后,观察植株生长的结果显示,在0.3% NaCl下,叶片开始变黄甚至萎蔫,而转基因植株的大部分叶色较绿,但非转基因植株与转基因植株两者的整体长势差别不大,植株较健壮;在0.6% NaCl下,非转基因植株明显萎蔫,而转基因植株的长势则比非转基因植株好(图5)。



图5 NaCl胁迫下马铃薯植株的生长比较

Fig.5 Comparison on growth of potato under NaCl stress

参考文献

- 李合生(2000). 植物生理生化实验原理与技术. 北京: 高等教育出版社
唐启义, 冯明光(1997). 实用统计分析及其计算机处理平台. 北京: 中国农业出版社

- 王关林, 方宏筠(2002). 植物基因工程. 第2版. 北京: 科学出版社
张宁(2004). 应用甜菜碱醛脱氢酶基因工程提高马铃薯抗逆性的研究[博士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学
McCue KF, Hanson AD (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends Biotechnol, 8: 358-362