

## 转根癌农杆菌介导的 *AtNHX1* 基因马铃薯的获得

张俊莲<sup>1,2</sup> 王丽<sup>3</sup> 王蒂<sup>1,2,\*</sup> 张金文<sup>2</sup> 陈正华<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>甘肃农业大学甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃兰州 730070; <sup>2</sup>甘肃农业大学农学院, 甘肃兰州 730070; <sup>3</sup>甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃兰州 730070; <sup>4</sup>甘肃亚盛集团博士后科研工作站北京分站, 北京 100101)

**摘要:** 构建重组表达质粒 pBI12135-GZ + *AtNHX1* (带有 CaMV 35S 启动子), 通过农杆菌将其携带的液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因 (*AtNHX*) 转化马铃薯栽培品种“甘农薯 2 号”试管薯薄片和“克新 2 号”茎段。经根癌农杆菌侵染和共培养后, 用 50 mg L<sup>-1</sup> 卡那霉素 + 300 mg L<sup>-1</sup> 头孢霉素筛选抗性芽, 试管薯薄片获得 30 株抗性植株, 抗性植株再生率为 37%; 茎段未获得抗性植株。抗性植株的总 DNA 用 *AtNHX1* 基因的特异性引物进行 PCR 检测, 结果 27 株为阳性, 占 90%。Southern 杂交结果证实, 外源基因多以双拷贝整合到马铃薯的基因组中。Northern 杂交结果表明, 转基因植株可以进行 *AtNHX1* 基因 mRNA 的正常转录, 但植株间存在着转录量的差异。该研究为耐盐马铃薯的培育奠定了良好的基础。

**关键词:** 马铃薯; 根癌农杆菌; 转基因植株; *AtNHX1* 基因

## Generation of Transgenic Potato Plants Harboring *AtNHX1* Gene Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

ZHANG Jun-Lian<sup>1,2</sup>, WANG Li<sup>3</sup>, WANG Di<sup>1,2,\*</sup>, ZHANG Jin-Wen<sup>2</sup>, and CHEN Zheng-Hua<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> Gansu Key Laboratory of Crop Genetic & Germplasm Enhancement, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, Gansu; <sup>2</sup> Agronomic College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu; <sup>3</sup> Life Sciences and Technology College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu; <sup>4</sup> Postdoctoral Workstation of Yasheng Industrial Ltd, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Drought and soil salinization harm are a major challenges that compromise crops growth and lead to soil degeneration and desertification of natural environments. Most of food crops are glycophytes with high susceptibility or low tolerance to soil salinization. Development of new salt-tolerant crop varieties is important to production in large area of saline soils. It is known that the adaptation of plant cells to salt stress requires an improved cellular ion homeostasis that involves organic solute accumulation in cytosol, vacuolar compartmentalization of ions and exclusion of extra Na<sup>+</sup> from the cells. The latter two functions are implemented by a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter located on both plasma membrane and tonoplast. In particular, the compartmentalization of Na<sup>+</sup> can help to absorb and reserve in the ions into the vacuoles, which is necessary to improve their osmotic adjustment and eventually enhance the salt tolerance of the plants. Potatoes are widely cultivated as a dual-purpose crop for food and vegetable consumption in the world. They are also one of the most important economic crops in arid and semi-arid areas in China. However, they are salt sensitive, and difficult to be selected and developed for a new variety with a stronger salt tolerance from limited genetic resources using traditional methodology. In this study, we constructed a pBI12135-GZ + *AtNHX1* expression plasmid carrying a constitutive promoter (CaMV 35S), *npt II* gene (the resistance gene to Kanamycin) and *AtNHX1* gene (the tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene), and then attempted to introduce this constructed expression plasmid into the slices of microtubers of “Gannongsu 2” and the stems of “Kexin 2” potato cultivars mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. After screening the transformed slices and stems on a medium containing 50 mg L<sup>-1</sup> Kanamycin and 300 mg L<sup>-1</sup> Cefotaxime, we obtained 30 transgenic plants from the slices at a regeneration rate of 37%, but none from stems. We further used specific primers to amplify the full-length of the *AtNHX1* gene from total genomic DNA of the transgenic plants, of which 27 plants had a positive amplification, indicating 90% of successful transformation. Southern blot showed that two copies of the *AtNHX1* gene were inserted into the genome of the transgenic plants and Northern blot hybridization detected a normal expression of the *AtNHX1* gene at different levels among the transgenic plants. These results pave the way for the generation of a new potato variety with a stronger salt tolerance.

**基金项目:** 国家科技支撑计划 (2006BAD21B05); 甘肃省科技攻关项目 (2GS054-A41-005-01); 甘肃省农业生物技术项目 (GNSW-2006-01)

**作者简介:** 张俊莲 (1961-), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物遗传育种研究。E-mail: zhangjunlian99@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 (Corresponding author): 王蒂 (1955-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事马铃薯遗传育种研究。E-mail: wangd@gsau.edu.cn

Received (收稿日期): 2006-10-16; Accepted (接受日期): 2007-01-19.

**Keywords:** Potato; *Agrobacterium tumefaciens*; Transgenic plant; *AtNHX1* gene

干旱盐碱已成为全球范围内危害作物生长、土壤荒漠化和自然生态环境恶化的主要原因之一。目前,全世界已有盐碱地 10 亿公顷,约占陆地面积的 1/3<sup>[1]</sup>,并有大量的次生盐渍化土壤在不断产生,因此,如何提高植物的抗盐性、增加盐胁迫下作物的产量一直是人们关注的焦点<sup>[2]</sup>。

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是世界上广为种植的粮菜兼用型作物,也是我国干旱和半干旱地区重要的经济作物,属盐敏感型<sup>[3]</sup>。盐渍化土壤严重制约着马铃薯的生长发育<sup>[3-9]</sup>,目前推广应用的品种大多耐盐性差,个别耐盐品种因综合性状差、不适应市场需求而不宜大面积推广<sup>[5]</sup>,因此,培育符合不同育种目标的耐盐马铃薯新品种就显得十分重要。然而,起源单一的普通栽培品种马铃薯为同源四倍体无性繁殖作物,其遗传背景狭窄、抗性基因缺乏、基因分离复杂、花粉败育率高、杂交结实较难等,制约着马铃薯品种的选育。在我国 50 多年的马铃薯育种历程中,目标主要集中在抗病、产量和高淀粉含量等方面<sup>[10]</sup>,未见抗盐品种中获得。

为了评价马铃薯的耐盐性,曾用试管苗<sup>[4-5]</sup>、试管移栽苗<sup>[6]</sup>、实生苗<sup>[7]</sup>和普通块茎苗<sup>[3,8,9]</sup>对我国广为种植的品种或亲本材料进行盐胁迫下植株生长、生物学产量、块茎产量、块茎淀粉含量、生理指标以及死亡率等方面的研究。结果发现,马铃薯的抗盐能力很差<sup>[3]</sup>,0.2% 的盐逆境就可见胁迫效果,使出苗迟缓、芽势降低、植株矮小甚至死亡,严重影响其产量和品质。说明利用常规育种手段无法从资源匮乏的栽培马铃薯群体中选育出高抗盐品种。

盐对植物的伤害表现为离子毒害、水分亏缺和离子不平衡<sup>[11]</sup>, $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白具有将  $\text{Na}^+$  区隔化于液泡或将  $\text{Na}^+$  排出细胞的功能,起细胞质  $\text{Na}^+$  解毒、调节渗透压和平衡离子的作用<sup>[12-13]</sup>,从而赋予植物抗盐性。应用来自拟南芥液泡膜的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因进行拟南芥的遗传转化,发现过量表达该基因的植株在 200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl 溶液中可正常生长发育<sup>[14]</sup>;将该基因转入番茄和油菜中,也使植株的耐盐性明显提高<sup>[15-16]</sup>,表明转单一的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因是培育高耐盐作物新品种的有效手段。

目前,外源基因导入马铃薯的方法有农杆菌介导法、基因直接转化原生质体法和基因枪法。农杆

菌介导法以其简便、高效、低拷贝数等特点得到普遍应用,使用的外植体主要有叶片、茎段、块茎、微型薯和试管薯等,其中试管苗的茎段和叶片以及试管薯具有取材方便、无需灭菌的特点,被广泛使用,特别是试管薯又具周期短(4~5周)、转化效率高和不定芽直接再生的特点<sup>[17]</sup>,成为马铃薯遗传转化较理想的外植体。

利用 RT-PCR 技术从盐胁迫下的拟南芥叶片总 RNA 中反转录得到液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因 (*AtNHX1*) 的 cDNA<sup>[18]</sup>,以添加 *Xho* I 酶切位点的 pBI121 质粒为载体,构建成植物表达质粒<sup>[19]</sup>。本研究通过农杆菌介导法,首次将 *AtNHX1* 基因高频率导入马铃薯,为抗盐马铃薯种质资源的创新和高抗盐新品种的培育奠定了良好的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料 以马铃薯普通栽培品种“甘农薯 2 号”试管薯和“克新 2 号”试管苗茎段为外植体,在 MS 基本培养基 (pH 5.8) 上培养,每 15 d 继代繁殖 1 次。将茎切段转入有滤纸支持物的 MS 液体培养基 (pH 5.8) 培养 25 d,倒出培养基,加入试管薯诱导培养基,在 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  下连续光照 2 d 后于黑暗中诱导试管薯。试管薯繁殖培养条件为 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  连续光照和 (22 ± 1) °C。试管薯诱导条件为 (22 ± 1) °C 黑暗培养。

1.1.2 质粒和菌株 *AtNHX1* 基因来源见文献 [18]。菌株为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404,抗性标记为 Rif<sup>r</sup> 和 Str<sup>r</sup>,含有植物表达质粒 pBI12135-GZ + *AtNHX1*,抗性标记为 Kan<sup>r</sup>。pBI12135-GZ + *AtNHX1* 质粒信息见图 1,其构建过程见文献 [19]。

1.1.3 酶和试剂 各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; *Taq* DNA 聚合酶购自鼎国公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自北京天为时代公司;抗生素为 Sigma 产品,其他生化试剂为国产分析纯。Southern 杂交试剂盒 DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I 和 RNA 探针标记试剂盒 DIG RNA labeling kit (SP6/T7) 购自德国 Roche 公司。

1.1.4 培养基 (1) 农杆菌培养所用培养基为 YEP,每升培养基中含 10 g 酵母提取物、10 g 胰蛋白

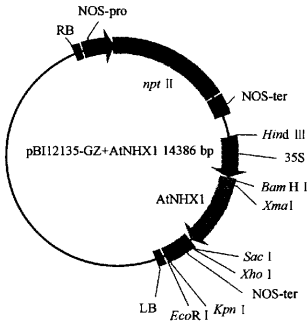


图 1 pBI12135-GZ + *AtNHX1* 植物表达质粒结构示意图  
Fig.1 Sketch map of construction of pBI12135-GZ + *AtNHX1* expression plasmid

胨和 5 g NaCl, pH 7.0; (2) 茎段繁殖培养基为 MS 液体或固体基本培养基(含 3% 蔗糖); (3) 试管薯诱导培养基为 MS + 5 mg L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.15% 活性炭 + 8% 蔗糖的液体培养基<sup>[20]</sup>; (4) 试管薯茎段分化培养基为 MS + 0.25 mg L<sup>-1</sup> NAA + 0.25 mg L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.25 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D 的固体培养基<sup>[21]</sup>; (5) 试管薯薯片分化培养基为 MS + 1 mg L<sup>-1</sup> IAA + 0.2 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0.5 mg L<sup>-1</sup> 6-BA + 2 mg L<sup>-1</sup> ZT 的固体培养基<sup>[17]</sup>。

## 1.2 方法

1.2.1 农杆菌活化 挑取培养皿平板上含质粒 pBI12135-GZ + *AtNHX1* 的单菌落, 接种于 25 mL YEP 培养基(含 50 mg L<sup>-1</sup> Kan + 50 mg L<sup>-1</sup> Str + 25 mg L<sup>-1</sup> Rif), 在 28℃、214 × g 摇床上振荡培养过夜。第 2 天取 1 mL 上述培养液, 转移至相同的 50 mL 新鲜 YEP 培养基中, 在 28℃、214 × g 摇床上振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.5, 在 4 900 × g 下离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用同体积 MS 基本培养基重新悬浮备用。

1.2.2 侵染和共培养 当试管薯长至直径约 0.8 cm, 颜色为深紫色时取下, 除薯皮与芽眼, 切成 1~2 cm 厚的薄片; 试管薯茎段剪成 1 cm 左右。将薄片和茎段在农杆菌重悬液中浸泡 10 min(期间不断摇动菌液使侵染充分), 无菌滤纸吸干后转入试管薯或茎段分化培养基, 在 28℃ 条件下黑暗共培养 2 d。

1.2.3 Kan 抗性筛选和植株再生 将暗培养 2 d 的薯片或茎段转入含 300 mg L<sup>-1</sup> Cef 和 50 mg L<sup>-1</sup> Kan 的薯片或茎段分化培养基上(将薯片或茎段嵌入培养基中, 减少假转化体产生), 培养条件为 25℃

和 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 连续光照(期间每 2 周换 1 次新鲜培养基)。当分化的抗性芽长 1.0~1.5 cm 时, 切下小芽转入含 50 mg L<sup>-1</sup> Kan 和 200 mg L<sup>-1</sup> Cef 的 MS 基本培养基进行抗性植株生根筛选, 以获得完整植株。

1.2.4 DNA 提取 利用 CTAB 法提取植株幼嫩组织总 DNA<sup>[22]</sup>。

1.2.5 PCR 检测 利用 1 对 *AtNHX1* 基因全长序列两端的特异性引物 JCP1(5'-CGATGTTGATTCTCTAGTGTGAAACTG-3') 和 JCP2(5'-CGTCAAGCCTTA CTAAGATCAGAGGG-3') 进行 PCR 检测, 以非转基因植株和 pBI12135-GZ + *AtNHX1* 质粒分别为阴性和阳性对照。PCR 扩增体系为 25 μL, 扩增程序为 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分离并观察扩增产物。

1.2.6 Southern blot 检测 分别取 30~40 μg 转化和对照植株的基因组 DNA, 限制性内切酶 *EcoR* I (*AtNHX1* 基因中没有该酶切位点) 在 37℃ 下酶切 12 h。酶切产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离(1 × TAE 缓冲液)。电泳结束后, 转移 DNA 到尼龙膜(Roche, Germany)上, 与 *AtNHX1* 基因探针杂交<sup>[23]</sup>。探针标记、标记效率检测、膜杂交及显色处理等按 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Germany) 使用说明进行。

1.2.7 Northern blot 检测 用异硫氰酸胍法抽提转基因植株和对照植株幼嫩组织的总 RNA<sup>[22]</sup>, 1% 琼脂糖凝胶电泳。取 40 μg 总 RNA, 加 2 倍体积新鲜配制的 Loading buffer, 65℃ 变性 10 min, 在 2% 甲醛-MOPS 琼脂糖凝胶电泳, 然后转至尼龙膜上。根据 T-载体上 *AtNHX1* 基因连接方向, 对 pGEM-*AtNHX1* 载体进行 *Noc* I 酶切, 酚抽提后用乙醇沉淀回收。取 1 μg 回收产物用 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Germany) 对载体上 *AtNHX1* 基因的反义 mRNA 片段进行标记, 获得 RNA 探针<sup>[23]</sup>。然后利用该探针与尼龙膜上的 RNA 进行杂交。探针标记和标记效率检测按 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Germany) 使用说明进行, 膜杂交和显色处理同 Southern blot 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株的获得

薯片和茎段经农杆菌侵染和共培养后, 分别置

含  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Kan +  $300 \text{ mg L}^{-1}$  Cef 的薯片或茎段分化培养基上培养。10 d 后薯片开始膨大并逐渐变绿, 20 d 后薯片中央有绿色凸起, 30 d 后凸起处直接分化出绿色芽点(图 2-a), 40 d 后绿色芽点抽出绿色单芽或丛生芽(图 2-b)。薯片抗性芽分化频率较高, 达 37%。但茎段在含卡那霉素的分化培养基上, 外层细胞虽逐渐膨大, 但多产生絮状疏松组织(图 2-c), 失去分化能力, 致使转接的 2 300 多个外植体均未产生抗性植株。

抗性芽经生根诱导培养, 5 d 后切口处生根(图 2-d), 形成完整植株。而未转基因植株、白化苗和芽眼苗均不能在切口处生根。经芽分化和诱导生根 2 个阶段筛选, 获得 30 株抗性植株。

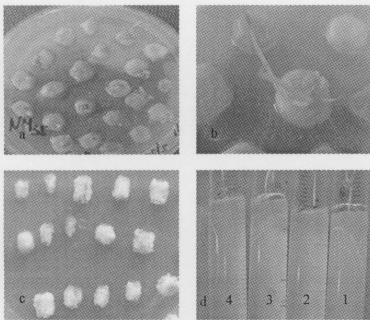


图2 不同转基因外植体在 Kan 选择培养基上芽分化和植株再生

### Fig.2 Shoot differentiation and plant regeneration from

transgenic explants on the selective medium containing kanamycin

a: 试管薯片分化出芽点; b: 试管薯片芽分化; c: 茎段形成的絮状组织; d: 转基因植株在 Kan 培养基上生根; 1: 非转基因对照植株在 MS 培养基上; 2: 非转基因对照植株在含  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Kan 的 MS 培养基上; 3-4: 转基因植株在含  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Kan +  $200 \text{ mg L}^{-1}$  Cef 的 MS 培养基上。

a: Bud regeneration from microtuber discs; b: Shoot regeneration from microtuber discs; c: Wadding tissue formation from stems; d: Rooting of transgenic potatoes on MS medium containing Kanamycin; 1: Non-transgenic potato on MS(CK); 2: Non-transgenic potato on MS +  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Kan (CK); 3-4: Transgenic potatoes on MS +  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Kan +  $200 \text{ mg L}^{-1}$  Cef.

## 2.2 PCR 分析

抗性植株 DNA 扩增到 1.6 kb 的特异性片段, 与试验预期片段和阳性对照吻合, 而非转化植株则无该片段的产生(图 3)。30 株抗性植株中有 27 株扩增到特异性条带, 占 90%, 说明马铃薯转化植株的抗性检测十分有效。

## 2.3 Southern blot 分析

为明确外源 *AtNHX1* 基因在马铃薯基因组中的

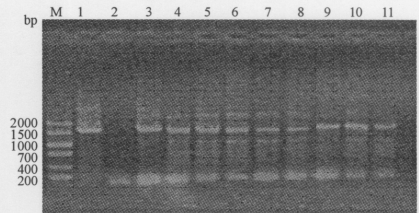


图3 转化植株的 PCR 检测

### Fig.3 Detection of transgenic potatoes by PCR

M: DNA 分子量标记 V; 1: pGEM-A1NHX1 质粒;  
2: 非转基因马铃薯植株; 3-11: 转基因马铃薯植株。  
M: DNA marker V; 1: plasmid of pGEM-A1NHX1;  
2: non-transgenic potato; 3-11: transgenic potato.

整合拷贝数, 提取部分(8 株)PCR 鉴定阳性植株的基因组 DNA, 酶切后产物进行电泳转膜, 以标记的 *AtNHX1* 基因探针与其进行 Southern 杂交。结果发现 2 株各有 1 条杂交带, 5 株各有 2 条杂交带, 1 株和非转基因植株无杂交信号, 表明外源基因已整合到马铃薯基因组的 DNA 中, 且外源基因多以双拷贝形式插入(图 4)。

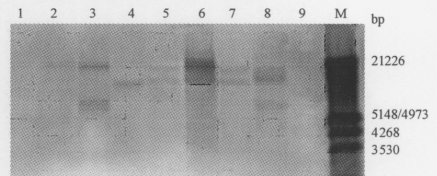


图4 转化植株 Southern blot 检测

### Fig.4 Detection of transgenic potatoes by Southern blot

M: DNA 分子量标记 III, 地高辛标记; 1-8: 用 *EcoRI* 酶切的转基因马铃薯植株的基因组 DNA; 9: 用 *EcoRI* 酶切的非转基因马铃薯植株的基因组 DNA。M: DNA marker III, digoxigenin-labeled; 1-8: Genome DNA of transgenic potatoes was digested by *EcoRI*; 9: Genome DNA of non-transgenic potato was digested by *EcoRI*.

## 2.4 Northern blot 分析

为了鉴定转基因植株中 *AtNHX1* 基因能否进行正常转录, 利用 DIG RNA Labeling Kit(SP6/T7) 标记 T 载体上 *AtNHX1* 基因的反义 mRNA 获得探针, 提取 Southern 杂交鉴定为阳性的部分转基因植株(选取 3 号、7 号和 8 号转化植株)和对照植株的总 RNA(约  $40 \mu\text{g}$ ) (图 5-a) 进行 Northern 杂交。结果 2 株转基因植株显示出较强的杂交信号(7 号、8 号), 1 株杂交信号较弱(3 号)(图 5-b), 对照无杂交信号, 表明整合在马铃薯基因组中的 *AtNHX1* 基因已转录出相应的 mRNA, 但转录量不同。结合 Southern 和 Northern 杂交结果分析发现, 所选用的 3 株转化植株在马铃薯

薯基因组中均插入 2 个拷贝,但插入位点存在差异,外源 *AtNHX1* 基因在转基因植株中的表达差异是否与插入位点不同相关,尚需进一步研究。

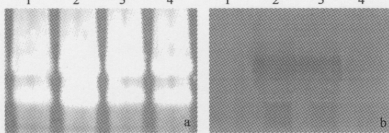


图5 转基因马铃薯的 Northern 杂交鉴定  
Fig.5 Northern blotting of transgenic potato

a: 马铃薯植株的总 RNA;1: 非转基因植株的总 RNA; 2-4: 转基因植株的总 RNA。  
b: 马铃薯植株的 Northern blotting 检测;1: 非转基因植株的 Northern blotting 鉴定;2-4: 转基因植株的 Northern blotting 鉴定。  
a: Total RNA of potato; 1: Total RNA of non-transgenic potato; 2-4: Total RNA of transgenic potato.  
b: Northern blotting of potato;1: Northern blotting of non-transgenic potato;2-4: Northern blotting of transgenic potato.

### 3 讨论

马铃薯育种中存在倍性高、基因分离复杂、遗传背景狭窄等问题,利用外源基因进行马铃薯定向遗传改良、培育新的种质资源或品种是解决问题的有效途径。目前,通过基因工程已获得了一些抗病毒、抗真菌、抗细菌、抗虫、抗除草剂、品质改良等转基因马铃薯新品系<sup>[24]</sup>。

马铃薯对盐害很敏感,盐渍化土壤不利其生长,常常造成出苗困难,植株矮化,产量下降,甚至死亡<sup>[3-9]</sup>。目前,利用基因工程进行马铃薯耐盐性改良的研究较少。已有报道分别将海藻糖合成酶基因 *TPS*、磷酸甘油醛脱氢酶基因 *GPD*、1-磷酸甘露醇脱氢酶基因 *MiD* 以及甜菜碱脱氢酶基因 *BADH* 导入马铃薯,使植株的耐盐性得到一定的改善<sup>[25]</sup>。然而,由于逆境下植物积累的有机渗透调节物质多种多样,仅仅通过某 1 种或 2 种渗透调节物质的积累或过量表达来提高植物的抗逆性有一定限度。

$\text{Na}^+$  区隔化是植物在盐环境中生存的必要保障,这一功能的实现由液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因 (*NHX1*) 来完成。已有的研究证实,转 *AtNHX1* 基因的拟南芥、番茄和油菜的耐盐性明显提高<sup>[14-16]</sup>。本研究将外源 *AtNHX1* 基因整合到马铃薯的基因组中,得到转录。并发现尽管目的基因的插入拷贝数都是 2 个,但转基因植株间却存在着基因转录量的明显差异,这种差异是否是插入位点的不同所致尚需进一步研究。转 *AtNHX1* 基因植株的获

得将有望得到高耐盐马铃薯新品系。

外源基因导入受体植物是基因工程育种的瓶颈。虽然以农杆菌介导的马铃薯叶片、茎段、块茎、微型薯和试管薯等的转化均已获得成功,但仍存在转化效率低下、具基因型依赖性问题。本研究在已筛选的茎段和薯块芽分化培养基上<sup>[17,21]</sup>,进行“克新 2 号”茎段和“甘农薯 2 号”试管薯的转化,结果发现在含卡那霉素的分化培养基上,茎段外层组织极易发生膨胀“絮化”现象,失去分化能力,不能获得转化植株,究其原因可能是基因型依赖性和培养基不适所致。而试管薯却能高频率地接受外源 DNA,并直接从薯片中部产生抗性芽,具有较高的转化率。说明,试管薯是马铃薯遗传转化的理想外植体。

### 4 结论

利用农杆菌介导法,导入拟南芥的液泡膜  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因 (*AtNHX1*),在以试管薯薄片为受体的转化体系中,抗性芽直接从薯片中部产生,获得 30 株转化植株,抗性植株再生率为 37%;在以试管苗茎段为受体的转化体系中,茎段外层组织发生“絮化”,未获得转化植株。表明试管薯是马铃薯遗传转化的理想外植体。

对 30 株抗性植株的总 DNA 进行 PCR 检测,有 27 株为阳性,占 90%。Southern 杂交结果证实,外源基因多以双拷贝整合到马铃薯的基因组中。Northern 杂交结果表明,转基因植株可以进行 *AtNHX1* 基因 mRNA 的正常转录,但植株间存在着转录量的差异。转 *AtNHX1* 基因植株的获得将有望得到高耐盐马铃薯新品系。

### References

- [1] Zhao J-S(赵军胜),Xue Z-Y(薛哲勇),Zhi D-Y(支大英),Xia G-M(夏光敏). Research on festuca arundinacea transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2005, 32(6): 579-585 (in Chinese with English abstract)
- [2] Xu X-M(许祥明),Ye H-C(叶和春),Li G-F(李国凤). Progress in research of plant tolerance to saline stress. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2000, 6(4): 379-387 (in Chinese with English abstract)
- [3] Gong J-D(龚家栋). Study on salt-tolerance of potato varieties. *J Desert Res* (中国沙漠), 1996, 16(1): 61-66 (in Chinese with English abstract)
- [4] Wang P-L(王培伦),Sun H-S(孙慧生),Zhang Z-H(张振鸿),Ma W-Q(马伟青),Guo Y-M(郭奕明). Screening salt tolerant potato clones in vitro. *J Potato* (马铃薯杂志), 1997, 11(4): 197-200 (in Chinese with English abstract)
- [5] Yin J(尹江),Ma H(马恢),Cui H-J(崔红军). Salt tolerance of plantlets in vitro in some potato germplasm. *Chin Potato J* (中国马铃薯), 2005, 19(1): 13-16 (in Chinese with English abstract)
- [6] Zhang J-L(张俊莲),Chen Y-S(陈勇胜),Wu J-L(武季玲),Wang D

- (王蒂), Zhang G-B (张国斌), Quan D-L (权冬玲). Studies on physiological index under salt stress in potato (*Solanum tuberosum* L.). *China Potato J* (中国马铃薯), 2002, 16(6): 323-327 (in Chinese with English abstract)
- [7] Kang Y-L (康玉林), Xu L-Q (徐利群), Zhang C-Z (张春震), Tian C-P (田翠苹). The effects of different salt rate on the growth of TPS seedlings. *J Potato* (马铃薯杂志), 1996, 10(1): 17-19 (in Chinese with English abstract)
- [8] Kang Y-L (康玉林), Zhang C-Z (张春震), Xia D-R (夏佃仁), Zhang Y-C (张永成). Potato response to soil salinity. *J Potato* (马铃薯杂志), 1997, 11(1): 7-10 (in Chinese with English abstract)
- [9] Wang W-X (王伟新), Xu L-C (徐龙臣), Tian Z-Y (田中艳), Teng W-L (滕伟丽), Sun Y-L (孙彦良), Li X-B (李宵白). Testing for salinity tolerance of high starch potato genetic resources. *China Veget* (中国蔬菜), 1999, (1): 25-28 (in Chinese with English abstract)
- [10] Sun H-S (孙慧生). Breeding of Potato (马铃薯育种学). Beijing: China Agriculture Press, 2003. pp 1-16 (in Chinese)
- [11] Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T. Isolation and characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol Biol*, 2001, 46: 35-42
- [12] Lu H-Y (吕慧颖), Li Y-X (李银心), Chen H (陈华), Liu J (刘晶), Li P (李平), Yang Q-K (杨庆凯). Molecular cloning and characterization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene in halophyte *Tetragonia tetragonioides*. *Chin High Technol Lett* (高技术通讯), 2004, (11): 26-31
- [13] Barkla B J, Pantoja O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 159-184
- [14] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 1256-1258
- [15] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 765-768
- [16] Zhang H X, Joanna N H, John P W, Blumwald E. Engineering salt-tolerant *Brassica* plant: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increase vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(22): 12832-12836
- [17] Si H-J (司怀军), Xie C-H (谢从华), Liu J (柳俊). An efficient protocol for agrobacterium-mediated transformation with microtuber and the introduction of an antisense class I patatin gene into potato. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(6): 801-805 (in Chinese with English abstract)
- [18] Zhang J-L (张俊莲), Zhang J-W (张金文), Chen Z-H (陈正华), Wang D (王蒂). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (*AtNHX1*) from *Arabidopsis thaliana* under NaCl stress. *Acta Pratac Sin* (农学学报), 2005, 14(6): 87-93 (in Chinese with English abstract)
- [19] Zhang J-L (张俊莲), Wang D (王蒂), Zhang J-W (张金文), Chen Z-H (陈正华). Modification of pBI121 vector and expression vector construction Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2006, 4(6): 811-818 (in Chinese with English abstract)
- [20] Zhang T-Y (张天宇), Zhang J-L (张俊莲), Wang D (王蒂), Wang L (王丽), Cui Y-S (崔炎森), Du X-M (杜喜梅), Liu Y-H (刘玉汇), Li Y-Z (李有忠). Study on the optimization of inducing potato microtuber system in different varieties. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2006, 22(10): 85-88 (in Chinese with English abstract)
- [21] Peng X-L (彭晓莉). Study on the potato transformation with leaf senescence-inhibition gene P<sub>3AG2</sub>-IPT. MS Dissertation of Gansu Agricultural University, 2005
- [22] Wang G-L (王关林), Fang H-J (方宏筠). Plant Genetic Engineering (植物基因工程), 2<sup>nd</sup> edn. Beijing: Science Press, 2002. pp 742-744; 750-752 (in Chinese with English abstract)
- [23] Zhang J-L (张俊莲). Improving salt-tolerance of potato by the *AtNHX1* gene of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport of *Arabidopsis thaliana*. PhD Dissertation of Gansu Agricultural University, 2006
- [24] Zhang J-L (张俊莲), Wang D (王蒂). Changed of breeding procedure and progression of transgenic potato on China. *China Potato J* (中国马铃薯), 2005, 19(3): 163-167 (in Chinese)