

马铃薯 *StERF3* 超量表达载体 转基因植株矮化原因初探

刘影 田振东 宋波涛 柳俊 谢从华

国家蔬菜改良中心华中分中心/华中农业大学湖北马铃薯工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 基于马铃薯 *StERF3* 超量表达载体转基因株系中出现了部分矮化植株, 通过基因表达量检测、组织切片分析和转基因试管苗添加外源生长调节剂等方面对矮化原因进行了初步探讨。结果表明: 矮化株中 *StERF3* 基因表达比对照降低; 矮化株木质部和薄壁细胞明显变小, 栅栏组织和海绵组织较致密; 培养基中添加 0.5 mg/mL GA_3 能够使矮化株明显增高, 但添加 IAA 效果不明显; 转基因矮化株含有 3~4 个拷贝, 多拷贝导致了目标基因的沉默; 在干涉株系中 *StERF3* 基因表达比对照降低, 但并未出现矮化株; 推测植株矮化并不是由于 *StERF3* 表达量引起, 很可能是由于多拷贝插入导致与 GA_3 合成或其调控有关基因受到干扰引起。

关键词 马铃薯; 转基因; *StERF3* 基因; 矮化; 超量表达载体; 基因沉默

中图分类号 S 532.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0663-04

转基因过程中经常会出现一些表型变异, 例如在转基因拟南芥、水稻、番茄中表现出植株矮化、超高、畸形、叶形皱缩、叶色变化、叶丛生等变异性状^[1-4]。这些表型变异有可能是目标基因本身转基因超量表达或干涉抑制导致基因沉默而引起的性状变异, 也可能是由于 T-DNA 插入到基因组中, 导致其他基因激活或失活引起^[5-6]。我们在研究马铃薯乙烯应答因子基因 *StERF3* 功能时, 发现超量表达载体转基因株系中出现了 6 株矮化植株, 这些转基因株系含有 3~4 个拷贝, 试管苗和温室盆栽时都表现出明显的矮化现象, 表现为植株矮小、茎节缩短、叶片变小。为探明矮化是否是由于 *StERF3* 基因本身超量表达引起, 本试验从基因表达量检测、组织切片分析和转基因试管苗添加外源生长调节剂等方面对矮化原因进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试验材料

表现矮化的鄂马铃薯 3 号(E3)超量表达载体转基因矮化株系 *StERF3*-E3-42、43、46、62、64, 生长正常的转基因植株 *StERF3*-E3-17、69 和非转基因对照 E3。矮化转心乌(J)超量表达载体转基因矮

化株系 *StERF3*-J-3 及生长正常的转基因植株 *StERF3*-J-11、19 和非转基因对照 J。

1.2 矮化株表型观察

将供试材料在附加 3% 蔗糖的 MS 固体培养基上进行离体扩繁, 于光照强度 2 500 lx, 光周期 16 h/d, 温度 20 °C 培养室生长 1 个月。一部分试管苗用于添加外源生长调节剂生长试验; 一部分于华中农业大学蔬菜改良中心隔离大棚塑料钵中盆栽(3 月), 每份材料种植 5 钵, 试验期间的土壤、肥料、水份同常规管理, 进行株高、株型、色泽、叶形等方面的观察。

1.3 基因表达量分析

采用 RT-PCR 方法, 通过抽提矮化株和生长正常的转基因植株和对照株的 RNA, 进行反转录 PCR, 确定其表达量差异。

逆转录使用 TOYOBO 公司的逆转录酶, 反应体系为 25 μ L, 于 0.25 mL 管中加 3 μ g RNA(约 0.5 μ L), 4 μ L Oligo d(T) (25 pmol/ μ L), 12 μ L DEPC \cdot H₂O, 用枪头吹吸几次混匀; 65 °C 孵育 5 min, 立即置于冰上 1 min; 加 1 μ L 逆转录酶, 5 μ L 5 \times Buffer, 2 μ L dNTP(10 mmol/L), 0.5 μ L RNA 抑制剂, PCR 仪中 42 °C 孵育 1.5 h, 取出后置

收稿日期: 2010-09-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971833)和湖北省自然科学基金杰出青年人才项目(2010CDA102)

刘影, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜生物技术. E-mail: ly388@126.com

通讯作者: 田振东, 博士, 教授, 研究方向: 马铃薯抗病分子生物学. E-mail: tianzhd@mail.hzau.edu.cn

于冰上待用。合成的 cDNA 用水稀释 5 倍,用看家基因 *EF1a* 引物作为内参,进行 26 个循环数的扩增,将要分析的 cDNA 模板浓度调整一致。然后分别用 *StERF3* 基因的特异引物进行相应循环数的 PCR 扩增,重复 3 次。

1.4 马铃薯叶片组织切片的制作与观察

矮化株的细胞组织观察采用石蜡组织切片法,参照文献[7]进行。

表 1 外源生长调节剂质量浓度梯度设置

Table 1 Gradient of exogenous growth regulator

处理编号 Treatment No.	培养基配方 Medium formula	处理编号 Treatment No.	培养基配方 Medium formula
1	MS	6	MS+0. 50 mg/L GA ₃
2	MS+0. 25 mg/L IAA	7	MS+0. 75 mg/L GA ₃
3	MS+0. 50 mg/L IAA	8	MS+0. 25 mg/L IAA+0. 25 mg/LGA ₃
4	MS+0. 75 mg/L IAA	9	MS+0. 5 mg/L IAA+0. 50 mg/LGA ₃
5	MS+0. 25 mg/L GA ₃	10	MS+0. 75 mg/L IAA+0. 75 mg/LGA ₃

2 结果与分析

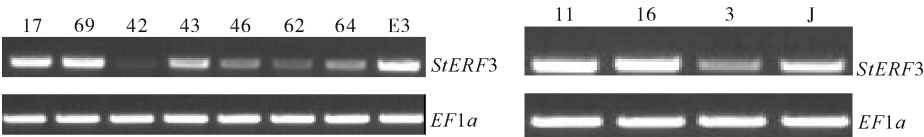
2.1 矮化株中 *StERF3* 表达量分析

为了解矮化株的 *StERF3* 表达量是否与生长正常的植株表达量有无差异,进行了 RT-PCR 分析,结果(图 1)显示:除了 *StERF3*-E3-43 ,E3 转基因矮化株(42、46、62、64)比正常的转基因株系(17、69)和

1.5 添加外源生长调节剂生长试验

通过在 MS 固体培养基(3%蔗糖+ 8%琼脂)中加入不同质量浓度的 GA₃ 和 IAA,质量浓度梯度设置如表 1 所示,非转基因对照 J 在 MS 培养基上生长,矮化株在 1~10 号培养基上培养,转化苗节位一致,每个方形培养盒转接 5 个切段,每个材料 5 盒,然后在组培室培养,30 d 后测量试管苗高度,每份材料测量 25 株。

非转基因对照 E3 表达量明显下降;矮化转心乌(J)超量表达载体转基因矮化株系 3 比正常的转基因株系(11、16)和非转基因对照 J 的表达量也有明显下降。表明这些超量表达载体转基因株系目标基因并未超量表达,而是出现了基因表达部分沉默。通过对这些矮化植株转基因拷贝数检测发现,一般为 3~4 个拷贝,为多拷贝转基因植株。



17、69:生长正常的 E3 转基因株系 E3 transgenic lines with normal phenotype; 42、43、46、62、64:矮化的 E3 转基因株系 Dwarf transgenic E3 Lines; E3:非转基因对照 Notransgenic E3 control; 11、16:生长正常的 J 转基因株系 Transgenic J lines with normal phenotype; 3:矮化的 J 转基因株系 Dwarf transgenic J plant;J:非转基因对照 Notransgenic J control.

图 1 超量表达载体转基因 *StERF3*-E3 与 *StERF3*-J 矮化系和生长正常株系基因表达量检测

Fig. 1 Expression of *StERF3* in dwarf and normal transgenic plants

2.2 矮化株系叶片组织切片观察

图 2-A 是试管苗移栽到大棚中生长 1 个月后的表型变化,可以看出矮化株明显表现出生长迟缓、植株严重矮化的症状,叶片皱缩、表皮毛稠密。组织切片显微镜观察显示,矮化株 *StERF3*-J-3(图 2-B)与生长正常的植株 J(图 2-C)相比,木质部和薄壁细胞明显变小,且栅栏组织和海绵组织较致密。

2.3 添加外源生长调节剂对试管苗生长的影响

通过对大棚种植和培养基中生长的矮化株观察发现,6 个矮化株在大棚中生长均比正常株矮, *StERF3*-J-3 株系尤其明显,在培养基中*StERF3*-J-3

也比对照明显矮化,因此选择 *StERF3*-J-3 株系进一步进行生长调节剂添加试验。对照 J 在没有添加生长调节剂的 MS 培养基上生长,矮化株分别转入表 1 所示 10 种培养基上生长。在试管苗节位和状态一致的前提下,培养室生长 30 d 后测量、统计试管苗高度。结果表明:与对照相比,矮化株系 *StERF3*-J-3 中除添加 0. 5 mg/L IAA 外,其余 IAA 处理矮化株增高不明显,而添加外源 GA₃ 植株明显增高(图 3),0. 5 mg/L 为效果最明显;IAA 与 GA₃ 的组合株高虽然都比对照高,但其株高均比添加 0. 5 mg/L 的 GA₃ 的培养基上生长的矮小(图 3)。

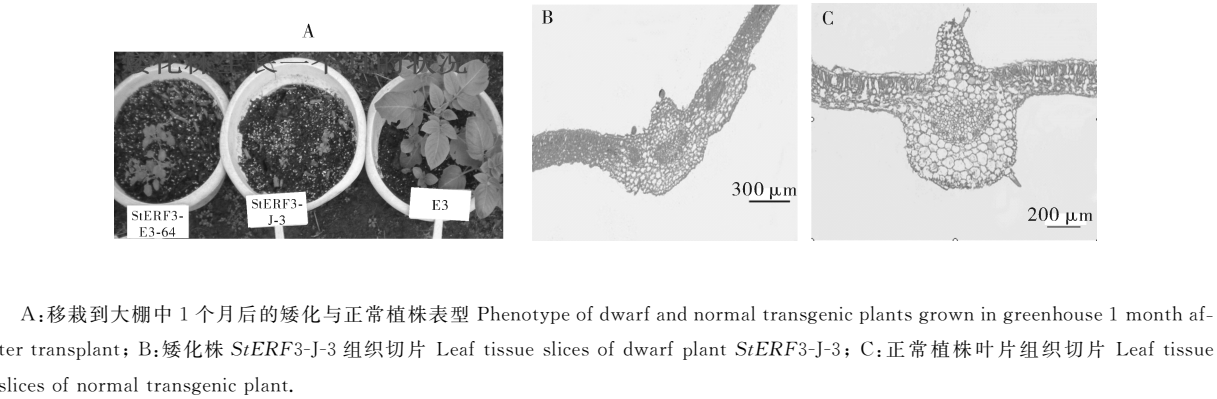


图 2 矮化株生长状态及矮化株 *StERF3*-J-3 和正常植株叶片组织切片
Fig. 2 Phenotype and leaf tissue slices of dwarf and normal transgenic plants

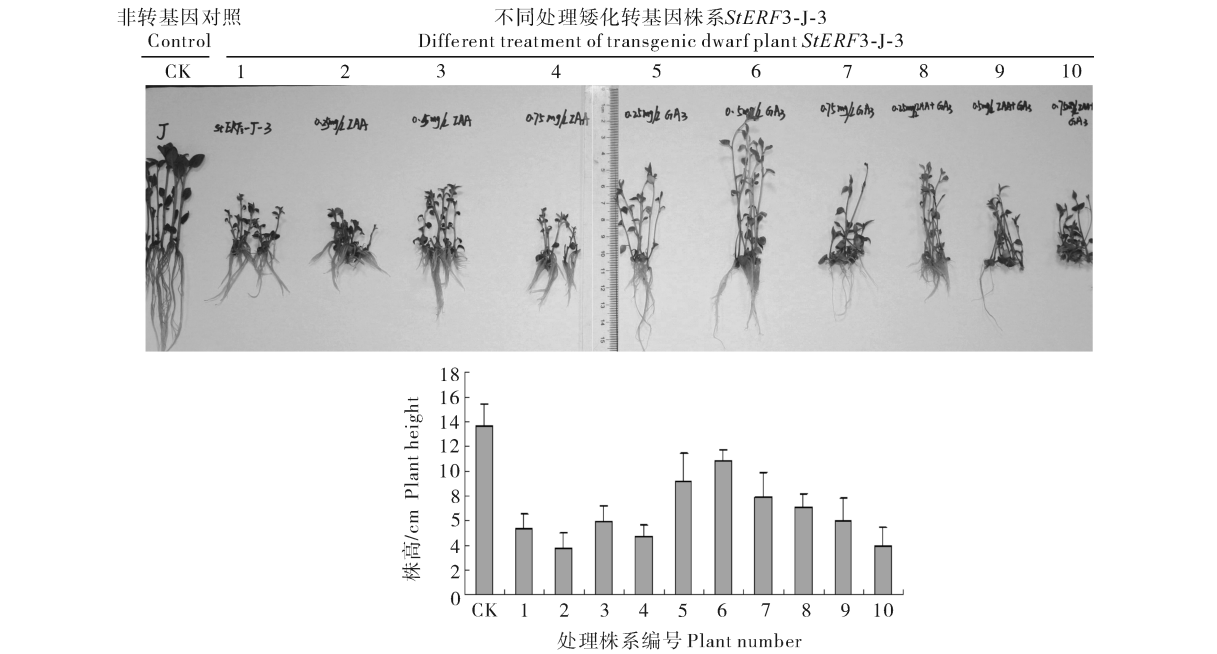


图 3 矮化株 *StERF3*-J-3 在添加不同质量浓度 IAA 和 GA_3 的 MS 培养基上的生长情况
Fig. 3 Growth performance of the dwarf plant *StERF3*-J-3 on MS supplemented with different concentration of IAA and GA_3

所有的处理组合都没有未转基因对照植株健壮,根系发育也不如对照,但添加一定质量浓度的生长调节剂,特别是添加 GA_3 能够较为明显地促进矮化植株生长。

3 讨 论

转基因植株后代中经常会出现非目标基因性状的变异,变异产生原因^[5-6]有以下几个方面:(1)目标

基因本身超量表达或沉默引起；(2) T-DNA 插入导致其他基因激活或失活；(3) 转基因植株生理失调引起。本研究中,矮化转基因材料通过多代离体继代培养和 2 a 温室盆栽,2 个马铃薯材料共 6 个株系都表现出稳定的矮化症状,因此,矮化不可能是由于转基因植株暂时的生理失调引起。这些转基因植株有一个共同特点,都是 *StERF3* 超量表达载体转化得到的植株,而且拷贝数都在 3~4 个。基因表达检测显示这些矮化植株基因表达量都有明显下降(图 1),研究表明转基因多拷贝常引起基因沉默或失活^[8],这些超量表达载体转化矮化植株基因表达反而比对照下降,很可能是由于多拷贝引起的基因部分沉默。然而,在我们以前的研究中,干涉株系中基因表达下调的株系并未出现矮化植株(未发表数据),可见这些植株矮化原因与 *StERF3* 基因表达量无直接关系。矮化植株表现为植株矮小、茎节短的现象,在培养基中添加 0.5 mg/L 外源 GA₃ 能够明显促进矮化植株生长,节间伸长,由此可以推断,转基因矮化植株体内 GA₃ 受到了干扰,这种效应很有可能是由于多拷贝插入导致与 GA₃ 合成有关或其调控基因受到干扰引起。我们试图扩增矮化植株 T-DNA 插入区域两侧的基因组序列,可能是由于多拷贝的干扰,未获得理想结果,有待进一步优化引

物和扩增条件。

参 考 文 献

[1] HENIKOFF S, TILL B J, COMAI L. Traditional mutagenesis meets functional genomics[J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 630-635.

[2] MUIR S R, COLLINS G J, ROBINSON S, et al. Over expression of *Petunia* chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavones[J]. *Nature Biotechnol*, 2001, 19: 470-474.

[3] 唐祚舜, 李良材, 田文忠. 基因枪法转基因水稻后代农艺性状的表现[J]. *中国农业科学*, 2001, 34(6): 581-586.

[4] 杨礼香, 王正询, 柯德森, 等. 拟南芥血红蛋白 1 (AtGLB1) 超量表达载体和 RNAi 表达载体的构建及转化[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(4): 413-416.

[5] DALE P J, MCPARTLAN H C. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 585-591.

[6] 金万梅, 潘青华, 尹淑萍, 等. 外源基因在转基因植物中的遗传稳定性及其转育研究进展[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(6): 864-868.

[7] 李和平. 植物显微技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009.

[8] LI X G, CHEN S B, LU Z X, et al. Impact of copy number on transgenic expression in tobacco [J]. *Atca Botanica Sinica*, 2002, 44(1): 120-123.

Factors leading to dwarfism of transgenic potato plants transformed with *StERF3* over expression vector

LIU Ying TIAN Zhen-dong SONG Bo-tao LIU Jun XIE Cong-hua

National Center for Vegetable Improvement (Central China)/Potato Engineering and Technology Research Center of Hubei Province, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Several dwarf plants occurred in potato lines transformed with *StERF3* over expression vector and the influencing factors of the dwarfism was investigated. Gene expression test revealed that *StERF3* expression level in dwarf plants was lower than that of control. *StERF3* gene expression decreased in the interference transgenic lines, but no dwarf plants appeared. The results indicated that the dwarfism was not related with the expression of *StERF3* gene. Medium supplemented with 0.5 mg/mL exogenous GA₃ could improve the growth of dwarf plants *in vitro* to some extent. Most of the dwarf lines contained 3-4 copies. Multi-copy integration always led to transgenic silencing. In conclusion, the dwarf might be caused by multiple copies integration into the genomic DNA which interrupted the genes associated with GA₃ pathway.

Key words potato; transgene; *StERF3*; dwarf; over expression vector; gene silencing

(责任编辑: 张志钰)