

提高农杆菌介导番茄遗传转化效率的研究

曹慧颖, 夏润玺, 吕淑霞, 马 镒, 姜义仁, 秦 萍

(沈阳农业大学 生物科技学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:利用农杆菌介导法对番茄进行遗传转化, 比较了不同的农杆菌种类、农杆菌侵染时间、外植体种类及番茄品种对农杆菌侵染效率的影响。转化后得到的再生植株, 利用 PCR、Southern 杂交检测 GUS 基因是否整合进入基因组。结果表明: 农杆菌介导法成功介导了 GUS 基因导入番茄。农杆菌 EHA105 侵染番茄的效率明显高于 LBA4404, 侵染时间 3 min 较好。子叶外植体的转化明显优于下胚轴, 黄色串珠樱桃番茄的遗传转化效率高于中蔬 5 号; 优化的转化条件可以使番茄获得较高的遗传转化效率。

关键词:番茄; 遗传转化; 农杆菌; 转基因植物; 组织培养; 植株再生

中图分类号:S 154.38⁺3; S 641.203.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)01-0178-03

番茄(*Lycopersicon esculentum*, Mill)是世界上重要的蔬菜作物之一, 在世界各地均有广泛种植。由于番茄栽培广泛, 需求量大, 并且遗传理论研究较为深入, 已经成为蔬菜基因工程研究的模式植物之一。目前尽管已有报道可以利用花粉管通道^[1-3]等方法将外源基因导入番茄基因组中, 但是在番茄的遗传转化中使用最多、技术最成熟的还是农杆菌介导法。

农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌, 它能在自然条件下趋化性地感染大多数双子叶植物的受伤部位, 并诱导产生冠瘿瘤或发状根。根癌农杆菌和发根农杆菌的细胞中有一段 T-DNA, 农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后, 可将 T-DNA 插入到植物基因组中。如果将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区, 外源基因就可以经过农杆菌介导进入植物细胞并整合于基因组中。然后通过细胞和组织培养技术, 最终可以得到转基因植株。现在利用农杆菌介导法已经成功向番茄中导入了多种外源基因^[4-7]。但对于不同番茄基因型、不同操作方法转化效率会有很大差异。现结合 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因向黄色串珠樱桃番茄和中蔬 5 号番茄的导入, 研究了番茄品种、农杆菌种类及农杆菌侵染时间对番茄转化效率的影响。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌种和质粒

供试番茄为中蔬 5 号、黄色串珠樱桃番茄 2 个品

种, 种子购于中国农业科学院蔬菜花卉研究所。以 2 个品种番茄的子叶、下胚轴为转化受体。

根癌农杆菌菌株为 LBA4404 及 EHA105, 由沈阳农业大学生物化学教研室保存, 所含质粒为双元植物表达载体 pBIGUS。质粒 pBIGUS 构建有目的基因 GUS 和植物抗性筛选标记新霉素磷酸转移酶基因 nptII, 其结构示意图见图 1。

卡那霉素为 Sigma 公司进口分装产品, PCR DIG Labelling Mix 为 Roche 公司产品。GUS 基因的引物: 上游引物 5' ATGTT ACGTC CTGTA GAAA3', 下游引物 5' TCATT GTTTG CCTCC CTGCT3'。

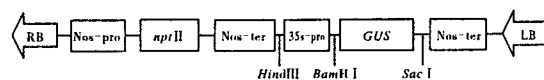


图 1 表达载体 pBIGUS 的结构示意图

1.2 番茄遗传转化过程

将番茄种子消毒后, 播种于 MS 培养基上, 待无菌苗的 2 片子叶完全展开后, 子叶切成 5 mm×5 mm 大小, 下胚轴切成 5 mm 左右, 在准备好的农杆菌菌液中浸泡。侵染好的外植体置于含有 0.1 mg/L 玉米素的 MS 培养基中暗培养 2 d。共培养后, 培养基中添加 50 mg/L 卡那霉素进行筛选, 并将玉米素的浓度调整至 1 mg/L, 诱导抗性愈伤组织的产生, 同时加入 500 mg/L 羧苄青霉素抑制农杆菌的生长。每天光照 16 h, 温度控制在 25~28℃, 每 2 周继代 1 次。当愈伤组织上有抗性芽生长后, 将其移入出芽培养基, 即 MS+0.1 mg/L 玉米素+100 mg/L 卡那霉素+500 mg/L 羧苄青霉素。芽长 1~2 cm 时, 将去除愈伤组织的芽移到生根培养基 (MS+

第一作者简介: 曹慧颖(1975-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为植物基因工程。

基金项目: 沈阳农业大学青年教师科研基金资助项目 (2005008)。

收稿日期: 2007-07-31

100 mg/L卡那霉素+500 mg/L羧苄青霉素)中,7 d左右会有根生成,待根系发达后将小苗移到灭菌土中,获得再生植株。

1.3 不同农杆菌对番茄的侵染

取中蔬5号番茄生长7 d的无菌苗,分别用农杆菌LBA4404、EHA105侵染3 min,然后避光共培养2 d,再转入选择培养基中。培养20 d后,观察外植体上愈伤组织生成情况。

1.4 农杆菌侵染时间的比较

挑取农杆菌EHA105单菌落,于28℃、YEB培养基中培养过夜,然后将菌液在6 000 rpm条件下离心5 min,收集菌体。用MS培养基重悬菌体,使其在600 nm波长下的光密度值为0.6。用此菌液侵染中蔬5号番茄子叶外植体,侵染时间分别为1、3、5、7、10 min,然后用灭菌滤纸吸干多余菌液,转入培养基中进行培养,20 d后观察愈伤组织生成情况。

1.5 不同番茄品种的比较

分别取中蔬5号、黄色串珠樱桃番茄的无菌苗子叶作为外植体,用农杆菌EHA105侵染3 min,然后转入培养基中。20 d后统计抗性愈伤组织生长情况。

1.6 GUS基因导入番茄的分子检测

采用CTAB法^[8]分别提取抗性植株和未转化对照植株叶片总DNA,用于再生植株的PCR检测和Southern杂交。PCR反应条件为94℃预变性5 min;94℃变性1 min,53℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环;最后72℃延伸10 min。质粒为阳性对照,未转化植株DNA为阴性对照。Southern杂交^[9]使用20 μg DNA,用Hind III在37℃消化12 h,然后进行0.8%的琼脂糖凝胶电泳。凝胶中的DNA片段电转移至尼龙膜与DIG标记的GUS基因探针杂交。

2 结果与分析

2.1 不同种类农杆菌侵染番茄外植体效果

农杆菌LBA4404、EHA105分别侵染番茄子叶、下胚轴,培养20 d后,子叶外植体有愈伤组织生成,而下胚轴外植体只在伤口处略有膨大,并未有愈伤组织生成,结果见表1。

表1 不同农杆菌侵染对番茄分化率的影响

农杆菌	外植体数/个		分化数/个		分化率/%	
	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
LBA4404	135	126	36	0	26.7	0
EHA105	119	134	67	0	56.3	0

从表1可以看出,2种不同农杆菌菌株,虽然都能够成功侵染番茄子叶外植体,但侵染效率差别很大。菌株EHA105侵染后愈伤组织分化率可达56.3%,而菌株LBA4404侵染后愈伤组织分化率只有26.7%,所以菌株EHA105更适于番茄的侵染转化。

2.2 农杆菌侵染时间

表2 不同农杆菌侵染时间对番茄分化率的影响

侵染时间/min	1	3	5	7	10
外植体数/个	79	86	93	83	72
分化数/个	24	45	47	38	37
分化率/%	30.3	52.3	50.5	45.7	51.4

表2结果显示,在不同侵染时间条件下,除侵染1 min的子叶外植体生成的愈伤较少外,其它侵染时间所得到的愈伤生成率都较高,且数值相近,因此为了缩短操作时间,减少污染,本研究认为3 min的侵染时间比较适合。

2.3 不同番茄品种转化率

表3 不同番茄品种的转化率比较

番茄品种	外植体数/个	分化数/个	分化率/%
中蔬5号番茄	128	67	52.3
黄色串珠樱桃番茄	139	108	77.6

根据表3的结果,农杆菌侵染后,中蔬5号番茄的抗性愈伤生成率明显低于黄色串珠樱桃番茄,说明黄色串珠樱桃番茄更适于农杆菌的侵染转化。由于农杆菌侵染条件都是相同的,所以二者转化率的差别应该就是基因型的差异造成的。

2.4 GUS基因导入番茄的分子检测

研究共得到再生植株26株,图2为部分再生植株的PCR检测结果。从图2可以看出,阴性对照未转基因植株的总DNA没有扩出条带,那么与阳性对照pBIGUS扩增出相同大小条带的再生植株就可以初步判断为转基因植株。

取PCR检测呈阳性的再生植株8株进行Southern杂交检测,图3为检测结果。从图3可以看出,有4株再生植株出现了杂交信号,表明GUS基因已经整合到番茄基因组中。并且GUS基因很多不是以单拷贝的形式整合的,拷贝数最多的达到了4个。



图2 再生植株PCR检测结果

注:DNA分子质量标准;2: pBIGUS阳性对照;
3:未转基因阴性对照;4~9:再生植株。

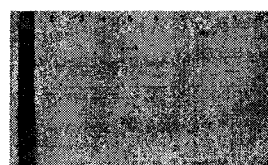


图3 转基因植株的Southern检测结果

注:质粒pBIGUS;2:未转基因对照;3~10:再生植株。

3 讨论

3.1 农杆菌的侵染能力与转化率有着直接的关系,也

是转化成败的主要因素。研究中使用了 2 种农杆菌 LBA4404 和 EHA105; LBA4404 是植物遗传转化中的常用菌株,它的寄主范围广,不但能够侵染双子叶植物,还能够侵染一些单子叶植物,但是毒力不及菌株 EHA105。EHA105 是超毒力(hypervirulent)菌株,在试验对番茄的侵染中,侵染效率明显高于 LBA4404,这一结果与王关林的观点一致^[10]。

3.2 研究中番茄下胚轴外植体经农杆菌侵染后没有长出愈伤组织,但根据已有的研究报道,番茄下胚轴是一种很好的遗传转化的材料^[11-13]。这一现象是由外植体培养过程中使用了不同的激素造成的,还是由于番茄种类不同造成的,还有待于进一步研究。

3.3 试验中农杆菌 EHA105 侵染后,中蔬 5 号番茄的抗性愈伤生成率明显低于黄色串珠樱桃番茄,说明基因型对转化的影响很大。一般认为,基因型的特异性与细胞的生理状态有关。具体来说与细胞受伤后的生理反应(如小分子酚类化合物的分泌,该类化合物可诱导农杆菌 vir 基因表达,增强 T-DNA 转移)、细胞内源激素水平(影响细胞的生长、分化)、细胞壁的结构(细菌吸附)等有关^[14]。所以要想获得高的转化率必须对植物的基因型进行选择。

3.4 在对 PCR 反应呈阳性的植株进行进一步的 southern 杂交检测时,有的再生植株 DNA 没有出现杂交信号。这可能是由于试验进行的番茄遗传转化使用的是农杆菌介导法, T₀代植株可能会含有农杆菌,所以 PCR 检测结果有一定程度假阳性。因此转基因植物的 PCR 检测只是一个初步验证,真正能说明外源基因整合进入基因组的还是 Southern 杂交。但是 Southern 杂交试验操作烦琐,费用较高,所以必须先通过灵敏快捷的 PCR 反应进行初步筛选。

3.5 试验用农杆菌介导法获得的再生植株,外源基因拷贝数为 1~4,相对来说少于基因枪等其它的转化方

法。拷贝数低则 DNA 重排率也低,有利于外源基因的稳定遗传和表达。试验建立的农杆菌介导的方法可以很好的介导番茄遗传转化。

参考文献

- [1] Sanford J C, Reisch B I, Reisch B I. Attempted pollen-mediated plant transformation employing genomic donor DNA[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1985, 69: 571-574.
- [2] 黄永芬,赵晓祥. 美洲拟蝶抗冻蛋白基因(afp)导入番茄的研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(4): 418-422.
- [3] 田长恩,黄自然. 抗菌肽 D 基因导入番茄及转基因植株的鉴定[J]. 遗传, 2000, 22(2): 86-89.
- [4] Van Eck J, Kirk D D, Walmsley A M. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Methods Mol Biol, 2006, 343: 459.
- [5] Pozueta-romero J, HOULNE G, CANAS L, et al. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for Agrobacterium-mediated transformation[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2001, 67: 173-180.
- [6] Van Roekel J S C, Damm B, Melchers L S, et al. Factors influencing transformation frequency of tomato[J]. Plant Cell Rep, 1993, 12: 644-647.
- [7] Frary A, Earle E D. An examination of factors affecting the efficiency of Agrobacterium-mediated transformation of tomato[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16: 235-240.
- [8] Wang H, Qi M, Cutler A J. A simple method of preparing plant samples for PCR[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(17): 4153-4154.
- [9] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂等译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 45-68, 487-512.
- [10] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 498-500.
- [11] Park S H, Morris J L, Park J E, et al. Efficient and genotype-independent Agrobacterium-mediated tomato transformation[J]. J Plant Physiol, 2003, 160(10): 1253.
- [12] Mansouri I E, Mercado J A, Santiago-domenech N, et al. Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase[J]. Physiologia Plantarum, 1999, 106: 355-362.
- [13] 欧阳波,李汉霞,张俊红,等. 番茄下胚轴转化获得转基因植株[J]. 华中农业大学学报, 2002(21): 206-209.
- [14] 李洪清,李美茹. 影响农杆菌介导植物基因转化的因素问题[J]. 1999 (35): 145-151.

Enhanced Regeneration of Tomato Explants for *Agrobacterium*-mediated Transformation

CAO Hui-ying, XIA Run-xi, LV Shu-xia, MA Di, JIANG Yi-ren, QIN Ping

(College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: Tomato plants were transformed via *Agrobacterium tumefaciens*. We evaluated some critical factors influenced transfer efficiency, including *Agrobacterium* strain, infection time, explant, genotype. The integration of the GUS gene into tomato genome was determined by PCR and southern blot. GUS gene had been introduced into tomato with *Agrobacterium*-mediated transformation successfully. Tomato was susceptible to agroinfection by *Agrobacterium* strain EHA105 than LBA4404. A suitable incubation time is about 3 minutes for application of *A. tumefaciens*. for transformation frequency, cotyledon explant was higher than hypocotyl, and yellow cherry tomato Chuanshu was higher than tomato Zhongshu 5. Transformation frequency would be enhanced with suitable factors.

Key words: Tomato; Genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; Transgenic Plant; Tissue culture; Plant regeneration