

番茄组织培养及其农杆菌介导类胡萝卜素合成酶基因 *LycB* 的遗传转化

任永霞^{1,2}, 王 罡¹, 郭郁频², 王 萍³, 季 静¹

(1. 天津大学农业与生物工程学院, 300072; 2. 河北北方学院, 张家口 075131; 3. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005)

摘要: *LycB* (番茄红素 β -环化酶) 基因是类胡萝卜素生物合成过程中关键酶之一, 位于合成代谢的重要分枝点上, 直接影响 β 胡萝卜素的合成。通过农杆菌介导法, 利用 *LycB* 基因转化重要果菜两用作物——番茄。经 PCR 及 PCR—Southern 分子检测证明, 目的基因 *LycB* 已整合进番茄基因组中。

关键词: *LycB* 基因; 番茄; 根癌农杆菌; 类胡萝卜素; 组织培养

中图分类号: S641.203.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2006)01-0098-03

类胡萝卜素是广泛存在于自然界的一类色素, 通常是指胡萝卜素和叶黄素两大类色素的总称。绝大多数类胡萝卜素呈现绚丽的红、橙或黄色, 至今已发现 600 多种天然的类胡萝卜素。类胡萝卜素, 尤其是 β -胡萝卜素不仅是维生素 A 的前体, 还具有延缓衰老、增强人体免疫力、预防心血管疾病和防癌抗癌等作用。

类胡萝卜素与人类的健康密切相关, 随着人们对其认识的加深, 人类对其需求也越来越大。但人体自身不能合成类胡萝卜素, 果蔬是其重要来源。番茄是人们喜食的果菜两用作物, 类胡萝卜素的含量是番茄品质和营养价值高低的主要标志。本实验采用根癌农杆菌介导技术, 将 *LycB* 基因导入番茄, 通过基因工程手段调控其类胡萝卜素的合成, 提高番茄 β -胡萝卜素的含量, 满足人类对健康的需求, 以期对番茄品质基因工程育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为东农 704、东农 708、东农 709 三个品种, 种子由东北农业大学李景富教授惠赠。

1.2 菌株和质粒

根癌农杆菌菌株为 EHAI01, 所含质粒上构建有目的基因 *LycB* 和植物抗性筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 *Hyg*。均由季静教授提供。

1.3 方法

1.3.1 植物材料的培养 3 个番茄品种的种子用 70% 酒精、0.1% 升汞溶液消毒后, 接种到 1/2MS 培养基上, 于 25℃、光照 16 h(小时)条件下培养。待无菌苗两片子叶完全展开, 取子叶(切成 5 mm×5 mm 大小)、茎段(5 mm 左右)作为外植体, 预培养后用于转化。

1.3.2 潮霉素筛选浓度的确定 取东农 704、东农 708、东农 709 三个品种的子叶和茎段进行潮霉素浓度筛选试验。潮霉素浓度分别为 0 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L、25 mg/L 和 30 mg/L(毫克/升), 三次重复。培养 2~3 周后调查出愈率。

1.3.3 农杆菌介导转化 实验采取改良“叶盘法”进行农杆

菌转化。从 YEB 平板上挑取单菌落接种于液体 YEB 培养基(YEB 液体培养基+100 μ mol/L 乙酰丁香酮, 含卡那霉素 30 mg/L(毫克/升), 壮观霉素 100 mg/L(毫克/升))中, 于 28℃、160 rpm 振荡培养过夜。菌液培养至对数生长期时, 离心搜集菌体, 制备成 OD₆₀₀ 值为 0.5~0.6 的农杆菌菌液。在诱导培养基上(参照张秀海等)预培养的外植体放入农杆菌菌液中浸泡 10 min~15 min(分钟), 然后转入共培养基(诱导培养基+100 μ mol/L 乙酰丁香酮)黑暗条件下共培养 2 d(天), 再转移到脱菌筛选培养基(诱导培养基+10~15 mg/L 潮霉素+400 mg/L(毫克/升)头孢霉素)上, 在 25℃、日光照 16 h(小时)条件下诱导抗性愈伤组织和抗性芽的产生, 待抗性芽的茎长至 2 cm~3 cm(厘米)时, 从基部切下转入生根培养基(1/2MS+IBA 1.0 mg/L+5 mg/L(毫克/升)潮霉素), 生根后的抗性植株再移栽至花盆培养。

1.3.4 抗性植株的 PCR 检测 按 SDS 方法提取抗性植株和未转化对照植株基因组 DNA 进行 PCR 检测。

LycB 基因的引物为: 引物 1: 5'-CTC GAG AAAAGA GAG GCT GAA GCT GGA TCC ATG GATACT TTA GTG AAAACT CCA-3', 引物 2: 5'-GC GGC GCG TTA TTC TTT GTC CCG CAA TAA GTT-3'。

LycB 基因 PCR 反应程序: 94℃变性 2 min(分钟); 94℃变性 1 min(分钟), 61℃退火 1 min(分钟), 72℃延伸 2 min, 设置 30 个循环; 72℃延伸 10 min(分钟)。扩增产物在含 EB 的 0.8% 的琼脂糖凝胶上 40 V 电泳 1 h(小时), 凝胶成像仪观察并照相。

1.3.5 抗性植株的 PCR—Southern 检测 采用地高辛标记和检测试剂盒以随机引物法标记探针。PCR 扩增阳性质粒、PCR 阳性植株与未转化植株基因组 DNA 片段, 然后经转膜、预杂交、杂交、洗膜、封闭、平衡、自显影, 最后观察并照相。

2 结果与分析

2.1 番茄不同品种和外植体对愈伤组织形成及分化的影响

番茄作为一种模式植物, 其组织培养得到了广泛研究。已有的研究证明, 激素是影响番茄愈伤形成的重要因素, 并且, 不同品种和外植体的诱导率存在较大差异。本试验选用 3 个品种、两种外植体诱导出愈和芽的产生, 结果见表。

由表可知, 3 个品种的番茄的两种外植体都以高频率形成愈伤组织, 出愈率均达 100%; 而分化率却有差别, 3 品种中

* 基金项目: 国家植物转基因技术研究所开发与中试基地建设专题课题 J99-B-001

收稿日期: 2005-06-22

东农 704 分化率较高, 子叶、茎段分化率分别为 91%、95%, 东农 708 较低, 其子叶、茎段的分化率为 72%、81%, 且三品种茎段的分化率均高于子叶。目前, 番茄遗传转化受体多采用子叶, 从本研究结果看, 茎段也是很好的取材部位, 将对其作进一步的研究。

不同品种和外植体对番茄愈伤形成及分化的影响表

品种	出愈率(%)		分化率(%)	
	子叶	茎段	子叶	茎段
东农 704	100	100	91	95
东农 708	100	100	72	81
东农 709	100	100	84	90

2.2 潮霉素(Hyg)筛选浓度对番茄出愈率的影响

3 个品种的番茄子叶与茎段在 没有加入潮霉素时愈伤的诱导率均达 100%, 而当加入不同浓度的 Hyg 时对番茄子叶与茎段愈伤组织的诱导有明显的不同程度的抑制作用(图 1)。当 Hyg 浓度为 5 mg/L(毫克/升)时, 东农 704、东农 708、东农 709 茎段出愈率分别为 44.4%、33.3%、38.1%, 子叶出愈率分别为 23.3%、21.1%、23.3%, Hyg 浓度为 10 mg/L(毫克/升)时, 三者的茎段、子叶出愈率分别为 8.9%、6.7%、6.7%和 8.7%、3.3%、3.3%, 而当 Hyg 浓度达到 15 mg/L(毫克/升)时, 三者出愈率均为 0, 愈伤形成完全受到抑制, 且外植体开始变白、变褐并萎缩。因此, 可选择 15 mg/L(毫克/升) Hyg 浓度为筛选浓度。

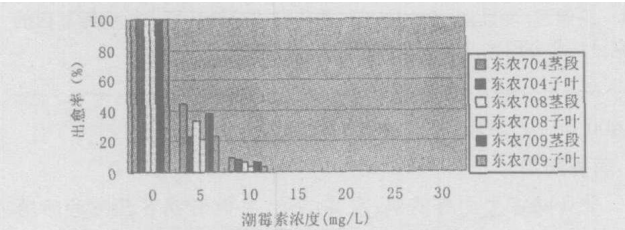


图 1 潮霉素浓度对番茄出愈率的影响

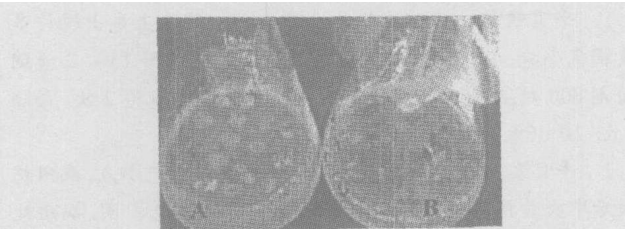


图 2 转化番茄子叶形成抗性愈伤组织
A: 对照(未转化筛选) B: 转化子叶

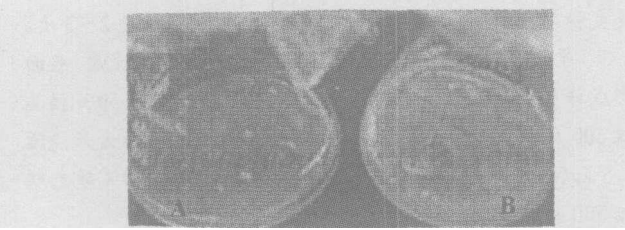


图 3 转化番茄(茎段)形成抗性芽
A: 对照(未转化筛选) B: 转化茎段

2.3 抗性植株的获得及分子检测结果

转化后的子叶、茎段经 2~3 周潮霉素筛选产生抗性愈伤(图 2), 4~5 周获得抗性芽(图 3、4), 进一步发育成抗性苗(图 5)。

从抗性植株和未转化对照植株叶片提取总 DNA 作为模

板进行 PCR 扩增, 未转化植株为阴性对照, 质粒为阳性对照。图 6 结果表明, 转基因植株扩增出的片段与质粒扩增出的目的片段 2kb 大小一致, 而阴性对照植株却未扩增出相应的特异条带, 由此初步证实, 目的基因 LycB 已转入到番茄中。

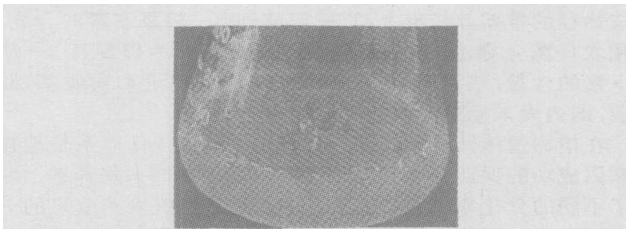


图 4 抗性愈伤形成抗性芽

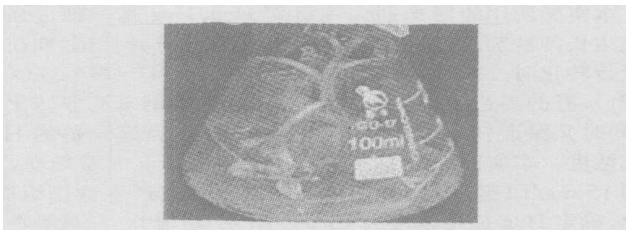


图 5 转化植株

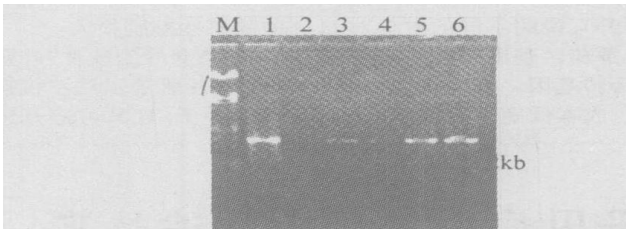


图 6 转基因番茄的 PCR 检测

M: λDNA/ E_{co}RI+ Hind III

1: 阳性质粒 2: 未转化植株 3~6: 转化植株

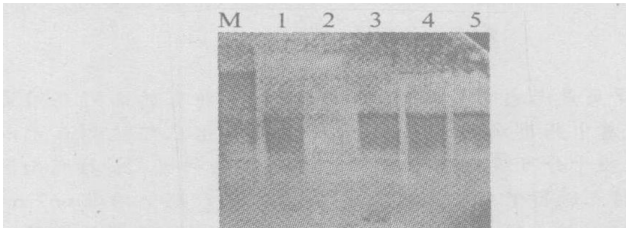


图 7 转基因番茄的 PCR-Southern 检测

M: λDNA/ E_{co}RI+ Hind III

1: 阳性质粒 2: 未转化植株 3~5: 转化植株

对 PCR 阳性植株提取基因组 DNA 进一步做 PCR-Southern 检测, 结果见图 7, PCR 阳性植株 DNA 扩增片段与质粒 DNA 扩增特异片段处于同一位置, 而阴性对照植株则没有杂交信号, 说明被检测阳性植株扩增出的 PCR 条带确实为特异性的目标带, 证明 LycB 基因确实已整合进番茄再生植株基因组中。

3 讨论

番茄是一种人们十分喜爱的果菜两用作物。自从 1993 年美国 Calgene 公司延熟保鲜转基因番茄被批准商业化生产后, 番茄的遗传转化研究在抗病毒、抗病虫害、抗除草剂、抗冻、延长贮存期、改善风味等方面得到了发展, 在改进番茄品

质方面也取得进展,且品质特性已成为一个番茄品种市场竞争力的首要因素。在国外人们对类胡萝卜素的研究已相当活跃,而我国起步晚,发展缓慢。本实验所用的 *LycB* 基因是类胡萝卜素生物合成过程中关键酶之一,位于类胡萝卜素生物合成途径的重要分枝点上,直接影响到 β -胡萝卜素的合成。利用农杆菌介导法,将 *LycB* 基因导入番茄,为提高其 β -胡萝卜素的含量,培育优质番茄品种奠定了理论和物质基础。目前,国内尚未见这方面的研究报道。

在植物遗传转化中,高效而完整的遗传转化体系是植物转基因成功的保证。本实验不同番茄品种在同一培养基上获得了不同的分化率,说明材料是影响番茄组织培养效果的一个重要因素。因此,对不同材料选择适宜的、高效的组织培养体系尤为重要。

本实验所用的筛选剂为潮霉素 Hyg, Hyg 是一种很强的细胞生长抑制剂,普遍用作对单子叶植物的选择标记,如在玉米遗传转化时, Hyg 的使用浓度一般在 5 mg/L~20 mg/L(毫克/升),有的高达 50 mg/L(毫克/升)。为抑制杀死非转化细胞,同时又保证转化细胞能正常生长,必须确定合适的 Hyg 筛选浓度。本实验研究结果表明,番茄对 Hyg 非常敏感,当达到 15 mg/L(毫克/升)时,外植体根本不能产生愈伤组织。因此,确定 Hyg 使用浓度为 15 mg/L(毫克/升)。马英等在用 Hyg 作为番茄转化筛选剂时,使用浓度为 10 mg/L~20 mg/L(毫克/升),说明不同的材料对 Hyg 的敏感性差别很大。

在番茄转基因研究中,主要采用农杆菌介导的改良“叶盘法”进行转基因。与农杆菌介导法相比,花粉管通道法不仅操作简便、成本低廉,转化受体可直接得到种子,且又可避开组

织培养继代繁琐,再生植株移栽成活较难等障碍。自 1988 年周光宇等报道了通过花粉管通道法进行分子育种的方法以来,已在棉花、水稻、大豆、茄子、黄瓜等作物中应用,番茄也有成功报道,黄永芬(1997)将一美洲拟鲈抗冻蛋白基因(*alp*)导入番茄,王傲雪(2002)将抗病毒基因导入番茄。因此,利用花粉管通道法将 *LycB* 基因导入番茄可能也是一种简便有效的转化方法,值得进一步探讨。

影响类胡萝卜素生物合成的酶较多,本实验仅研究了其中关键酶之一——*LycB*,而将多个基因一起导入番茄将是进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 陶俊,张上隆,徐昌杰,等.类胡萝卜素合成的相关基因及其基因工程[J].生物工程学报,2002,18(3):276~281.
- [2] 韩雅珊.类胡萝卜素的功能研究进展[J].中国农业大学学报,1999,4(1):5~9.
- [3] 张秀海,郭殿京,等.兔防御素 NP-1 基因在转基因番茄中表达的初步研究[J].遗传学报,2000,27(11):953~958.
- [4] 王关林,方宏筠主编.植物基因工程原理与技术[M].科学出版社,北京:1998.
- [5] 邹礼平.基因工程在番茄改良方面的研究进展[J].孝感学院学报,2001,21(3):71~74.
- [6] 马英,林顺权,高毅,等.乙肝病毒表面抗原基因转化番茄[J].福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(2):223~227.
- [7] 黄永芬,王清胤,付桂荣,等.美洲拟鲈抗冻蛋白基因(*alp*)导入番茄的研究[J].生物化学杂志,1997,13(4):418~422.
- [8] 王傲雪,李景富,徐香玲,等.番茄自花授粉后导入抗病毒基因的研究[J].北方园艺,2000,31(3):233~240.

600 m²(平方米)畦面进行封闭除草。

2 病害防治

平贝病害主要有锈病、灰霉病等,要做好病害预防和防治工作。

2.1 平贝锈病 锈病症状为叶背、叶柄、茎基上先出现许多黄褐色小疱,小疱成熟后散发黄色孢子。防治用 15%三唑酮粉剂 800 倍液或 20%三唑酮乳油 1 000 倍液喷施 2 次,每隔 7 d~10 d(天)一次。

2.2 平贝灰霉病 症状为叶片染病初生暗绿色小点,病斑扩展后中央黄褐色,四周暗绿色,病斑四周有黄色晕圈,病斑处叶脉坏死,病斑向两端扩展,形成长条枯死斑。茎部染病时初生暗绿色病斑,扩展后绕茎一周致植株枯死。防治用 50%速克灵粉剂 800 倍液或 50%扑海因粉剂 600 倍液喷施 2~3 次。

2.3 平贝鳞茎黑腐病 症状为鳞茎变黑,严重时干腐表面形成许多粒大小的黑色颗粒。防治方法在苗期用 50%福美双 500 倍和 50%多菌灵 500 倍混合药液浇灌,每平方米浇灌 1.5 kg(公斤)药液。如结合 80%磷铝 600 倍或 69%琥乙磷铝 500 倍液喷施 2~3 次效果更佳。

3 虫害防治

平贝虫害主要是红蜘蛛和蚜虫。要采用高效低毒或生物杀虫剂,如 5%氟氰菊酯 1 000 倍液、1%阿维菌素 3 000 倍液或 800 倍液强敌 312 喷施,效果表现良好。

(黑龙江省尚志市亚布力镇农业综合服务中心, 150631)

平贝病、虫、草害防治技术

李永慧,鹿冬梅
刘艳,顾言

平贝是尚志市冷凉湿润气候条件下特有的山野药用资源,随着中药市场的日益活跃,其干贝价格已经达到百元以上,效益十分可观。近年来,尚志市的农业科研人员按照山区气候特点进行平贝仿生栽培获得成功,盛产期平均每 667 m²(平方米)效益可以达到 0.6 万元以上,为农民致富开辟了一条新路。在平贝栽培中,病、虫、草害防治是栽培平贝成功的关键技术,现将主要技术要点做以简要介绍。

1 田间除草

1.1 早春除草 平贝除草采用封闭型除草剂。由于平贝出苗早,喷施封闭除草剂时,喷到苗上产生药害,所以可以采用毒土施药。当平贝出苗 5 cm(厘米)高前未放叶时用 33%施田补 250 ml(毫升),兑 15 kg(公斤)水拌 300 kg(公斤)细土,闷 2 h~3 h(小时)撒于 300 m²(平方米)平贝畦上。如果平贝畦面土壤干燥撒完毒土后,可小量浇一次水效果更好。

1.2 夏季除草 当平贝地上部分自然落秧后除掉死秧和杂草或平贝起收后,平整畦面,可种植早熟品种大豆、绿豆、红小豆类,并用 33%的施田补 125 ml(毫升)兑水 15 kg(公斤)喷施