

LycE 基因对番茄的遗传转化

抗艳红^{1,2}, 季静¹, 吴东³, 王罡¹

(1. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072; 2. 河北北方学院, 张家口 075131; 3. 防化指挥工程学院, 北京昌平 102205)

摘要: 本研究以影响番茄遗传转化的 4 个因子基因型、外植体类型、菌液浓度和是否添加 AS 进行了试验, 结果表明不同基因型间、不同菌液浓度间、是否添加 AS 对番茄抗性愈伤率的影响都存在显著差异, 以东农 704 菌液浓度为 0.6~0.8, 添加 AS 有利于番茄的遗传转化。以 *LycE* 为目的基因, 应用根癌农杆菌介导法对番茄进行了遗传转化, 获得了完整的抗性植株, 有 3 株经 PCR 和 PCR—Southern 分析鉴定, 初步证明外源基因 *LycE* 已整合到番茄的基因组中。

关键词: *LycE* 基因; 番茄; 基因型; 转化

中图分类号: S641.209.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001—0009(2006)05—0001—03

类胡萝卜素(carotenoids)通常是指 C₄₀的碳氢化合物(胡萝卜素)和它们的氧化衍生物(叶黄素)两大类色素的总称。类胡萝卜素具有许多不同的生物功能和生物活性, 可增强人免疫力, 延缓机体衰老, 预防癌症, 减少因缺乏维生素 A 而引起的夜盲症、幼儿弱视等^[1], 也是所有光合生物的基本成分。

本试验通过农杆菌介导法, 将类胡萝卜素生物合成过程中关键酶番茄红素ε—环化酶基因 *LycE* 导入番茄, 用以调控其类胡萝卜素的生物合成, 提高番茄中类胡萝卜素的含量, 达到改善番茄品质的目的^[2]。

1 材料与方法

1.1 植物材料、质粒和菌株

植物材料东农 704、东农 709、东农 906 和利生一号 4 个番茄品种的种子由东北农业大学李景富教授惠赠。取 4 个番茄品种的子叶和下胚轴作为转化受体。根癌农杆菌 EHA 101 由季静教授提供, 质粒 pEbisLycEHyg 上构建有目的基因 *LycE* 和植物抗性筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 *Hpt*。

1.2 培养基

农杆菌培养基: 农杆菌 EHA101 的培养用 YEB 培养基; 番茄组织培养及农杆菌转化所用培养基, 见表 1。

表 1 番茄组织培养及农杆菌转化所用培养基

培养基	成分
预培养基	MS+6-BA1.0 mg/L+IAA 0.05 mg/L
感染培养基	YEB 液体培养基+100 μmol/L AS
共培养基	MS+6-BA1.0 mg/L+IAA 0.05 mg/L+100 μmol/L AS
脱菌筛选培养基	MS+6-BA1.0 mg/L+IAA 0.05 mg/L+G4400 mg/L+Hyg10 mg/L
生根培养基	1/2MS+IBA1.0 mg/L+Hyg5 mg/L

1.3 植物材料的准备

将番茄种子用 75% 酒精浸泡 1~2 min, 用无菌水洗两次, 然后在 0.1% 升汞溶液中浸泡 8 min, 再用无菌水洗 3~4 次后, 接种于 MS 培养基, 于 25℃、光照 16 h 条件下培养。待下胚轴伸长到 5 cm 左右时, 在无菌条件下切取子叶和下胚轴, 经预培养后用于转化。

1.4 农杆菌介导的番茄遗传转化因子的优化(P36)

试验采用 L₁₆(4⁴×2³)正交设计, 设基因型、外植体部位、农杆菌菌液浓度、是否添加乙酰丁香酮(AS)4 个因素, 3 次重复, 设计方法与各因素的水平见表 2。

表 2 农杆菌介导的番茄遗传转化因子的正交试验设计

处理	基因型	外植体部位	菌液浓度 OD ₆₀₀	AS (100 μmol/L)
1	东农 704	下胚轴上部	0.4	加
2	东农 704	下胚轴中部	0.6	加
3	东农 704	下胚轴下部	0.8	不加
4	东农 704	子叶	1.0	不加
5	东农 709	下胚轴上部	0.4	不加
6	东农 709	下胚轴中部	0.6	不加
7	东农 709	下胚轴下部	0.8	加
8	东农 709	子叶	1.0	加
9	东农 906	下胚轴上部	0.4	加
10	东农 906	下胚轴中部	0.6	加
11	东农 906	下胚轴下部	0.8	不加
12	东农 906	子叶	1.0	不加
13	利生一号	下胚轴上部	0.4	不加
14	利生一号	下胚轴中部	0.6	不加
15	利生一号	下胚轴下部	0.8	加
16	利生一号	子叶	1.0	加

1.5 抗性选择标记适宜浓度的确定试验

以东农 704 的子叶和下胚轴为外植体, 在诱导培养基 MS+6BA1.0 mg/L+IAA0.05 mg/L 中分别加入 0.5、10 和 15 mg/L 潮霉素(Hyg), 进行番茄子叶和下胚轴对潮霉素的敏感性试验。每处理接种 3 个平皿, 每平皿 20 个外植体, 15 d 继代一次, 30 d 后调查外植体生长状况与褐化率。

褐化率(%)=(褐化的外植体数/接种的外植体数)×100

1.6 农杆菌介导的转化与抗性筛选

将外植体在诱导培养基上预培养 2 d, 然后用制备好的农杆菌菌液浸泡 8~10 min。经 3 d 共培养后, 将番茄外植体转移到脱菌筛选培养基上, 两周后进行继代筛选培养, 诱导抗性愈伤组织和抗性芽的产生。待抗性芽长至 2~3 cm 时, 从基部切下转入生根培养基进行生根培养, 生根后将完整的抗性植株移栽至花盆中培养。

收稿日期: 2006—02—14

1.7 分子检测

按照王关林的 SDS 方法提取植物基因组 DNA^[3]。

LycE 基因的 PCR 反应程序为: 94 ℃预变性 2 min, 后 94 ℃变性 1 min, 61 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 2 min 进行 30 个循环, 再 72 ℃延伸 10 min, 最后 4 ℃保温。

PCR 产物的检测: 取 5~10 μl PCR 扩增产物 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 以 λDNA/EcoRI + Hind III 双酶切 DNA 分子为标准分子量, 电泳结果在 Bio-Rad 凝胶成像系统下分析。

PCR-Southern 检测: 用电洗脱的方法进行膜转移后, 采用地高辛标记和检测试剂盒以随机引物法标记探针并进行分子杂交检测。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的番茄遗传转化因子的优化

以影响番茄遗传转化的因子基因型、外植体类型、菌液浓度和是否添加 AS 4 个因素, 采用 $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ 正交设计, 进行了多因素试验, 试验结果经方差分析可知, 抗性愈伤率不同基因型间 ($F=4.829$)、不同菌液浓度间 ($F=4.230$)、以及是否添加 AS ($F=9.384$) 都存在显著差异, 而不同外植体部位间差异未达显著水平。对差异达显著水平的因素做进一步的差异显著性测验, 结果见表 3、表 4。

表 3 不同基因型间番茄抗性愈伤率差异显著性测验

基因型	抗性愈伤率 (%)	差异显著性	
		0.05	0.01
东农 704	27.72	a	A
东农 906	23.24	ab	A
利生一号	19.53	b	A
东农 709	17.15	b	B

从表 3 可看出, 东农 704 的抗性愈伤率最高为 27.72%, 而东农 704 和东农 906 差异未达显著水平, 东农 709 抗性愈伤率最低, 极显著地低于其它 3 个品种。

表 4 不同菌液浓度间番茄抗性愈伤率差异显著性测验

菌液浓度 OD ₆₀₀	抗性愈伤率 (%)	差异显著性	
		0.05	0.01
0.6	25.19	a	A
0.8	23.69	ab	A
0.4	23.20	b	A
1.0	15.55	b	B

从表 4 看出, 菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.4、0.6、0.8 条件下, 番茄的抗性愈伤率极显著地高于 OD₆₀₀ 为 1.0 的; 菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.6 时, 番茄的抗性愈伤率显著地高于 OD₆₀₀ 为 0.4 的, 而与 OD₆₀₀ 为 0.8 水平间无显著差异。试验结果还表明添加 100 μmol/L AS 可显著地提高抗性愈伤率。

因此, 我们以东农 704 为转化受体, 以 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 的菌液浓度侵染外植体, 同时添加 100 μmol/L AS 进行番茄的遗传转化。

2.2 番茄对抗生素的敏感性试验

以东农 704 的子叶和下胚轴为外植体, 进行的潮霉素敏感性试验, 结果见图 1。

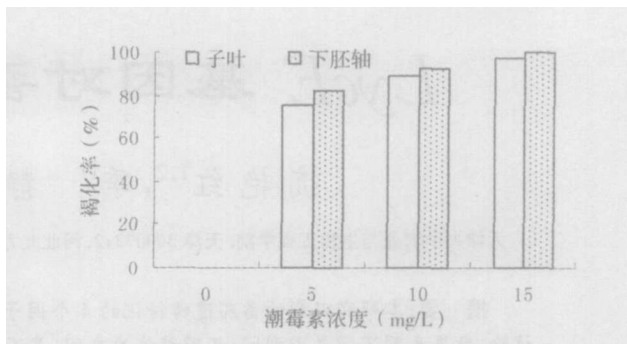


图 1 潮霉素对番茄子叶和下胚轴的影响

从图 1 可以看出, 当潮霉素浓度为 0 时, 子叶和下胚轴无褐化; 当潮霉素浓度为 5 mg/L 时, 子叶的褐化率为 75.5%、下胚轴的褐化率为 82.2%; 当潮霉素浓度为 10 mg/L 时, 子叶的褐化率为 89.2%、下胚轴的褐化率为 93.0%, 此时两种外植体只有少量愈伤形成; 当潮霉素浓度为 15 mg/L 时, 子叶褐化率为 97.4%、下胚轴的褐化率为 100%, 此时子叶白化, 下胚轴完全褐化。从番茄子叶和下胚轴对 Hyg 的敏感性实验的结果看, 当 Hyg 浓度达到 15 mg/L 时, 可完全抑制番茄子叶和下胚轴的芽诱导。为了不影响转化细胞的正常生长, 本试验采用的 Hyg 筛选浓度是 10 mg/L。

2.3 转基因植株的 PCR 检测

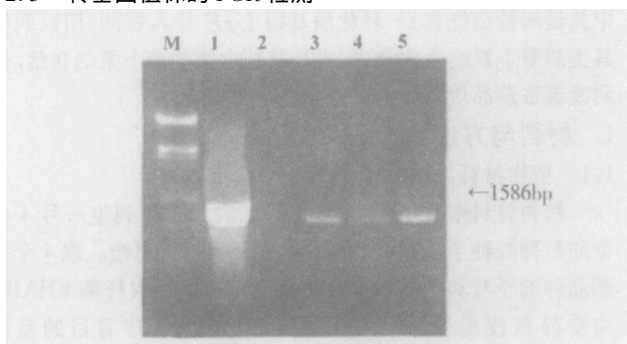


图 2 转基因番茄的 PCR 检测

M: λDNA/EcoRI + Hind III

1: 阳性质粒对照; 2: 未转化植株; 3~5: 转化植株



图 3 转基因番茄的 PCR-Southern 检测

M: λDNA/EcoRI + Hind III

1: 阳性质粒对照; 2: 未转化植株; 3~5: 转化植株

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, 含目的基因的质粒为阳性对照。取 5~10 μl PCR 扩增产物于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 以 λDNA/EcoRI + Hind III 双酶切 DNA 分子为标准

分子量,电泳结果在 BIO RAD 凝胶成像系统进行分析(图2)。电泳结果表明,转基因植株和质粒都在 1.6 kb 附近扩增出特异条带,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 *LycE* 已转入到番茄中。

本试验经 Hyg 筛选获得的番茄抗性植株,经 PCR 检测 3 株转 *LycE* 基因阳性株中东农 704 2 株,东农 906 1 株。

2.4 转基因植株的 PCR—Southern

对 PCR 阳性植株提取基因组 DNA 进一步做 PCR—Southern 检测,结果见图 3,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,而阴性对照植株则无杂交信号,说明被检测阳性植株扩增出 PCR 条带确实为特异性目标带,证明 *LycE* 基因已整合进番茄植株基因组中。

3 讨论

3.1 影响农杆菌介导番茄转化的因子

在农杆菌侵染的正交实验所设置的 4 个因素中,方差分析的结果表明,不同基因型、不同菌液浓度和是否添加 AS 之间番茄的抗性愈伤率存在显著差异,而外植体部位间无显著差异,这说明农杆菌对番茄的转化频率主要与基因型、菌液浓度和是否添加 AS 有关。所以要获得大量转基因植株,就必须选择合适的基因型、菌液浓度并添加 AS。不同基因型转化频率不同,这很可能是由于不同基因型对农杆菌的敏感程度不同引起的。在菌液浓度方面,OD₆₀₀ 的值从 0.4、0.6、0.8 到 1.0,随着菌液浓度的提高,抗性愈伤率由增加到降低,OD₆₀₀ 为 0.1 时极显著地低于其它 3 个水平。这说明菌液浓度太大会抑制番茄抗性愈伤组织的产生,而且浓度太大易造成污染,很难除菌,影响外植体的分化。在正交试验中,外植体的部位与转化率关系不大,可能是由于所选取的外植体部位差异比较小,感受状态处于同一水平所致。许多研究表明,酚类化合物的添加对农杆菌向植物细胞的附着、转移有较大的促进作用,因而有助于转化频率的提高,本试验的结果与此一致。

3.2 探针的标记

本试验选择用地高辛进行标记,因为地高辛标记探针具有使用安全、快速、敏感、稳定性好、一次制备可长期使用的优点,同时避免放射性同位素探针存在的成本高,半衰期短,对人危险性大以及对环境造成污染等问题,也避免了生物素标记的探针因生物样品中常有内源性生物素及生物素结合蛋白存在,常发生非特异性结合而影响检测结果的问题^[4]。

3.3 转基因植物中基因沉默问题

转基因植物中基因沉默现象是指利用遗传转化方法导入并稳定整合进受体细胞的完整的、DNA 序列未发生歧变的外源基因在当代转化体或其后代中表达受到抑制的现象。其主要表现是:外源基因在转基因植株中不表达或表达水平大幅度降低,各独立转化体间表达不稳定,差异显著。自 1986 年 Peerbolte 首次报道转基因烟草中发生基因沉默以来,转基因沉默的例子屡见不鲜。1994 年 Jean Finnegan 等对 30 多家从事转基因植物商品化公司的调查结果就显示几乎所有的公司都碰到了转基因沉默现象。植物中转基因沉默现象的存在已经成为遗传转化技术走向商品化和实用化的巨大障碍。本实验中 *LycE* 基因经 PCR、PCR—Southern 分子检测证实已整合进番茄基因组中,外源基因能否表达,是否发生基因沉默现象,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 龚学臣,季静,抗艳红,等.八氢番茄红素合成酶基因(PSY)对大豆的遗传转化[J].大豆科学,2005,24(1):30-33.
- [2] 高蓝,傅建熙,王建华.转基因番茄研究进展[J].西北农业大学学报,2000,6(3):90-95.
- [3] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学技术出版社,2002.386-389.
- [4] 郭大为.地高辛标记探针与生物素标记探针用于斑点杂交检测 HBV DNA 的初步研究[J].泸州医学院学报,1997,20(2):94-97.

Transfer Gene(*LycE*) into Tomato

KANG Yan—hong^{1,2}, JI Jing¹, WU Dong³, WANG Gang¹

(1. Tianjin University, Tianjin 300072; 2. Hebei North University, Zhangjiakou 075131; 3. Institute of Chemical Defence, Beijing 102205)

Abstract Four factors including genotype, the concentrations of bacterial suspension, explants and adding AS or not which effect the genetic transformation of tomato had been studied in this paper. The results showed that the effect of different genotype, different concentrations of bacterial suspension and adding AS or not on frequency of resistant callus inducing in tomato had significant differences. Using Dongnong 704 species as acceptor, the suitable OD₆₀₀ of bacterial suspension was 0.6 ~ 0.8 and the addition of AS were beneficial to the genetic transformation of tomato. Then *LycE* gene was transformed into tomato via agrobacterium tumefaciens. Resistant regeneration plants of tomato were obtained in selective condition. PCR and PCR—Southern analysis of 3 resistant plants originally proved that *LycE* has been transferred into genome of tomato.

Key words: *LycE*; Tomato; Genotype; Transformation