

不同 GO 基因植物表达载体对番茄遗传转化效率的研究

王 全 华¹, 李 素 梅¹, 尹 国 香¹, 曹 守 军¹, 张 焕 春¹, 李 云²

(1. 山东省烟台市农科院蔬菜所, 265500; 2. 山东省烟台市福山区蔬菜办, 265500)

摘 要: 通过 PPT 质量浓度的梯度试验, 筛选出番茄子叶出愈、芽分化和再生植株生根的最适宜 PPT

浓度均为 1.0 mg/L。pCPGO 和 pCBGO 两个植物表达载体转化 8 个番茄自交系材料的试验结果表明, 不同番茄自交系对这两种表达载体的遗传转化效率存在较大的差异; 相同的载体转化不同的番茄自交系, 其遗传转化率也存在较大的差异; 同一番茄品系, 由于转化载体不同, 遗传转化率也不同。pCPGO 和 pCBGO 转化率最高的分别为 Pr5 76.47% 和 Pr1 72.4%; 而低的分别仅为 Pr3 13.89% 和 Pr4 2.7%。

关键词: 番茄; GO 植物表达载体; 遗传转化

中图分类号: S641.203.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2006)06-0004-03

葡萄糖氧化酶(GO)可以催化β-D-葡萄糖氧化生成过氧化氢。很多研究表明 H₂O₂ 能有效地抑制细菌和真菌的生长^[1,2]。GO 的这种特性为抗病植物的选育提供了一条新途径^[3~5]。转 GO 基因植物显示出对病原菌的广谱抗病性已在很多试验中得到证实。例如转基因马铃薯抗 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 晚疫病、软腐病、黄萎病^[3] (Gusui Wu et al. 1995)和早疫病、黄萎病^[6] (Gusui Wu et al. 1997); 转基因烟草抗立枯丝核菌病、疫病, 转基因甘蓝抗黑腐病 *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* 转基因棉花抗黄萎病和立枯病^[7]; 转基因水稻抗稻瘟病^[8]。

番茄是我国主栽蔬菜之一, 种植面积持续扩大, 尤其是保护地面积日益剧增, 但由于连年重茬种植, 病害已相当严重, 极大地影响了番茄的产量和品质。用化学药剂防治病害, 用药不当常常造成污染, 且药剂防治会因病原菌生理小种的变化而失去作用。因此选育广谱抗性的番茄品种, 在生产实践中意义重大。本研究拟通过 PPT 浓度的试验, 筛选出番茄子叶出愈、芽分化和再生植株生根的最适宜浓度, 并通过将 pCPGO 和 pCBGO 转入番茄自交系材料中, 研究不同番茄自交系对这两种表达载体的遗传转化效率, 为今后不同基因型的番茄自交系的遗传转化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

番茄 (*lycopersicum*) 自交系 Pr1、Pr3、Pr4、Pr5、Pr6、Pr7、Pr10 由烟台农科院蔬菜所提供。大肠杆菌 DH5α, 农杆菌 LBA4404 pCPGO 和 pCBGO 分别由北京大学蛋白质工程与植物基因工程国家重点实验室构建和提供。羧苄(Cb)和除草剂 PPT 均为 Sigma 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的准备 先用 70% 的酒精浸泡 30~60 min, 再用 0.7% 的次氯酸钠溶液表面消毒灭菌 20 min 左右, 用无菌水冲洗 3~4 次, 播种在 1/2MS 培养基上, 25~28 °C 培养

2~4 d, 种子萌发 6~10 d 子叶展开完全。

1.2.2 PPT 梯度试验 设置除草剂 PPT 的质量浓度梯度为 0、0.25、0.5、0.75、1.0 mg/L。诱导愈伤组织阶段, 每瓶接种 10 块外植体; 芽分化阶段, 每瓶接种 6 块; 生根阶段, 每瓶接种 5 株。以上各阶段均设置对照, 每个质量浓度接种 3 瓶, 设置 3 次重复, 每 2 周继代 1 次, 并观察记载其生长情况。每隔 7 d 调查出愈率、分化率及试管苗生根率。

1.2.3 不同品系番茄的遗传转化 用叶盘法将载有 pCPGO 和 pCBGO 的农杆菌 LBA4404 转化番茄叶盘。将事先培养好的番茄子叶切去叶尖和基端, 切成 0.5 cm², 正面朝下置于 MSI 培养基(MS+ ZT 2 mg/L+ IAA 0.5 mg/L)上, 28 °C 暗培养 2 d。之后将预培养的外植体浸入用 MS 液体培养基稀释的根癌农杆菌悬浮液中, 30 min 后, 用无菌纸吸去外植体表面多余的菌液, 转回到 MSI 培养基上共培养 2~3 d。转移至筛选培养基 MSII (MS+ ZT 2 mg/L+ IAA 0.5 mg/L+ PPT 1.0 mg/L+ Cb 300 mg/L) 上筛选分化芽。20~30 d 当转化的抗性芽长至 1.5 cm 时, 将芽切下放入 MSIII 培养基 (1/2MS+ IAA 0.5 mg/L+ PPT 1.0 mg/L+ Cb 300 mg/L) 中诱导生根。

2 结果与分析

2.1 不同 PPT 浓度对愈伤组织和芽分化的影响

表 1 PPT 浓度对番茄叶片出愈和芽分化的影响

PPT	0(mg/L)		0.25(mg/L)		0.5(mg/L)		0.75(mg/L)		1.0(mg/L)	
	出愈率	分化芽	出愈率	分化芽	出愈率	分化芽	出愈率	分化芽	出愈率	分化芽
品系	%	率%	%	率%	%	率%	%	率%	%	率%
Pr1	100	99.3	72.3	68.4	68.5	63.8	40.8	28.8	0	0
Pr3	99.2	93.5	66.8	61.3	59.4	59.2	30.7	25.9	0	0
Pr5	86.5	75.6	36.7	35.9	30.3	33.5	27.5	20.9	0	0
Pr6	96.5	93.1	65.5	57.2	61.1	53.8	29.6	20.4	0	0
Pr10	100	98.7	81.7	75.6	77.8	72.9	38.4	30.7	0	0

由表 1 可知, 不同浓度的 PPT 对 5 个番茄自交系愈伤组织诱导和芽分化的差异很大。在不加 PPT 的 CK 培养皿中, 所有自交系的叶盘 3~4 d 开始膨大, 向外反卷, 叶脉变淡绿色, 伤口泛白, 均能形成愈伤组织并在 18~20 d 即可分化出芽。当 PPT 的质量浓度加至 0.25 mg/L 时, 叶盘均形成愈伤组织, 但分化率显著降低。当 PPT 浓度为 0.5 mg/L 时, 叶盘颜色淡化, 少量叶盘形成愈伤, 两端伤口处变褐。当 PPT 浓

* 基金项目: 山东省良种产业化开发项目资助, 项目号为鲁科字 [2001] 500 号
收稿日期: 2006-08-10

度达到 0.75 mg/L 时, 只有极少量叶盘形成愈伤组织, 且部分叶盘开始褐死, 继续增加至 PPT 浓度为 1.0 mg/L 时, 叶盘完全褐化并枯死。PPT 对芽分化也具有很强的抑制作用, 当浓度为 0.75 mg/L 时, 愈伤组织分化出芽量极少, 并且在 20 d 时大多数开始褐变死亡。当浓度为 1.0 mg/L 时, 愈伤组织全部变褐死亡。因此, 子叶出愈和芽分化阶段合适的 PPT 筛选浓度均为 1.0 mg/L。

2.2 不同 PPT 浓度对番茄再生植株生根的影响

表 2 的试验结果表明, PPT 质量浓度对番茄再生植株生根的影响存在较大的差异。在不加 PPT 的 CK 培养基中植株均生长良好, 根系发达, 植株生长旺盛, 叶片浓绿; 当增加 PPT 时, 所有品系的生根率都有明显的降低, 并且植株生长缓慢, 侧根不发达; 当 PPT 浓度增至 0.75 mg/L 时, 只有少部分植株生根, 且生长极慢, 部分叶变黄; 当 PPT 浓度继续增至 1.0 mg/L 时, 所有自交系试管苗在 25 d 左右白化枯死。因此, 选择 PPT 浓度为 1.0 mg/L 作为番茄遗传转化时再生植株生根的最佳浓度。

表 2 PPT 浓度对番茄再生植株生根的影响

PPT 品系	0 (mg/L)	0.25 (mg/L)	0.5 (mg/L)	0.75 (mg/L)	1.0 (mg/L)
	生根率 %	生根率 %	生根率 %	生根率 %	生根率 %
Pr1	100	52.3	30.8	0.8	0
Pr3	100	46.8	29.2	0.6	0
Pr5	100	26.7	13.5	0.4	0
Pr6	100	45.5	23.8	0.4	0
Pr10	100	61.7	32.9	0.7	0

2.3 番茄的遗传转化

表 3 pCPGO 和 pCBGO 载体对番茄的遗传转化

载体/菌株	受体品系	接种外植体数	获得 ipr 植株数	再生植株的外植体数	生根的外植体数	转化频率 % *
pCPGO/LBA4404	Pr1	36	21	18	10	50.0
pCBGO/LBA4404		58	51	42	8	72.4
pCPGO/LBA4404	Pr3	36	10	5	5	13.89
pCBGO/LBA4404		25	5	2	1	8.0
pCPGO/LBA4404	Pr4	41	21	16	14	39.02
pCBGO/LBA4404		22	19	5	2	2.7
pCPGO/LBA4404	Pr5	34	28	26	13	76.47
pCBGO/LBA4404		27	18	5	2	18.5
pCPGO/LBA4404	Pr6	27	15	13	13	48.15
pCBGO/LBA4404		12	8	8	2	66.7
pCPGO/LBA4404	Pr7	40	28	16	11	40.0
pCBGO/LBA4404		30	16	12	10	33.3
pCPGO/LBA4404	Pr10	67	38	33	12	49.25
pCBGO/LBA4404		34	19	17	7	50.0
pCPGO/LBA4404	Pr11	24	13	8	5	33.3
pCBGO/LBA4404		22	16	13	5	59.1

* 转化率 = (生根的外植体数 / 接种外植体数) × 100%

将构建好的植物表达载体 pCPGO 和 pCBGO 经热击法转入大肠杆菌 DH5α, 冻融法转入农杆菌 LBA4404, 用叶盘法转化番茄自交系材料, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 同一番茄品系, 由于转化载体不同, 遗传转化率也不同; 相同的转化载体转化不同的番茄自交系, 其遗传转化率也存在较大的差异。pCPGO 和 pCBGO 转化率最高的分别为 Pr5 76.47% 和 Pr1 72.4%, 而最低的分别为 13.89% 和 2.7%。另外在番茄自交系的转化过程中发现, 不同自交系间由于遗传型不同, 愈伤组织的诱导也不同, 抗性愈伤分化芽和生根的时间明显长于已往用杂合体进行的转化。

3 讨论

3.1 PPT 对番茄子叶外植体再生能力的影响

转化细胞的筛选是获得转基因植株的关键。如果选择压力过高, 则已经转化的细胞也会死亡, 但是选择压力太小, 又会出现大量逃逸芽 (escaped bud), 给筛选带来许多麻烦, 因此进行各试材对植物选择标记敏感性的试验是非常重要的。本试验所用转化载体带有 PPT 抗性基因, 通过进行 PPT 压力筛选即可获得转化植株。选择压力结果表明, PPT 1.0 mg/L 可以完全抑制子叶外植体的再生。但如果外植体一开始就经历高压选择, 已经转化的细胞也可能由于选择压力过大而死亡, 反之又会产生大量逃逸芽。经过多次试验, 采用循序渐进的加大选择压力的方法, 取得了较好的效果。根据选择的自交系材料对 PPT 抗性不同, 选择压力大小。比如 Pr2 对 PPT 特别敏感, 共培养后先选择 PPT 0.5 mg/L 进行筛选, 每 7 d 继代一次, 最终在 PPT 浓度达到 1.0 mg/L 的筛选培养基上进行筛选培养, 这样既减少逃逸芽的量, 又可使已转化细胞保留下来, 提高了转化效率。而 Pr10 对 PPT 的敏感性不强, 初次筛选压力可加大到 0.7~0.8 mg/L, 以减少后续检测的工作量。

3.2 基因型对番茄遗传转化的影响

基因型是影响番茄组织培养再生频率的重要因素。Behki 和 Lesley(1976)研究了番茄 15 个突变系和两个商业品种在各种培养基上的形态建成反应, 发现芽再生率在供试遗传品系间有相当大的差异。在我们的试验中也观察到这一点。供试的 8 个自交系材料在相同的表达载体上, 遗传转化率差异较大, 变化幅度分别在 13.89%~76.47% 和 2.7%~72.4% 之间, 其中 Pr5 最高为 76.4%, 而 Pr4 才只有 2.7%。说明培养材料之间在基因型上的差异, 会明显的影响遗传转化率。因此, 筛选出遗传转化率高的基因型材料作为转化对象, 对于今后开展基因工程育种是非常重要的。

参考文献:

[1] Frederick KR, Tung J, Emerick RS, et al. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme[J]. J. Biol. Chem, 1990, 265: 3793-3802.

[2] Kim KK, Flavel DR, Papavizas. Identification of a metabolite Produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 1988, 78: 488-492.

[3] Gusui Wu, Barry J. Shortt, Ellen B. Disease Resistance conferred by Expression of a Gene Encoding H₂O₂-Generating Glucose Oxidase in Transgenic Potato Plants[J]. The Plant Cell, 1995, 7: 1357-1368.

[4] Kazan K, Murray F, Goulter K, et al. Induction of cell death in transgenic plants expressing a fungal glucose oxidase[J]. Mol. Plant-Microbe Interact, 1998, 11: 555-562.

[5] Murrat F, Lewellyn D, Mcfadlen H, et al. Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also Phytotoxic[J]. Mol. Breed, 1999, 5: 219-232.

[6] Gusui Wu, Barry J. Shortt, Ellen B L, et al. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants[J]. Plant Physiol, 1997, 115: 427-435.

[7] 巩万奎, 吴家和, 姚长兵, 等. 葡萄糖氧化酶基因在棉花中的高效转化——转基因再生棉株的获得[J]. 棉花学报, 2002, 14(2): 76-79.

[8] 彭昊, 王志兴, 窦道龙, 等. 由根癌农杆菌介导将葡萄糖氧化酶基因转入水稻[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(1): 16-19.

玛瓦番茄(冬春茬)育苗技术

宋兆军¹, 李云波², 宋金荣²

(1. 辽宁省北票市蔬菜站, 122100; 2. 北票市五间房镇农业站)

中图分类号: S641.2 文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2006)06-0006-01

玛瓦番茄是荷兰瑞克斯旺公司选育的一代杂交种。无限生长型, 早熟, 长势中等, 坐果率高, 丰产性好。耐低温弱光, 适合大棚和温室冬春季节栽培。果实扁圆形, 中大型果, 平均单果重 200~220 g, 熟果大红色, 色泽鲜艳, 光滑, 整齐美观。硬度好, 耐贮运, 货架寿命长, 是超市及加工出口的优选品种, 深受生产者、经营者、消费者的欢迎。为满足广大栽培户的需要, 特将该品种冬春茬育苗技术介绍如下。

1 播种期

该品种苗龄以 40~55 d 为宜, 播种期为 9 月末至 11 月中旬。为确保形成良好的花芽, 在寒冷季节育苗(播种期较晚的)应采取保温为主, 加温为辅的育苗方式。在育苗地段打好隔段, 移苗后上方加扣拱棚, 温室夜间盖纸被草帘等保温。

2 播种量

温室用种量 2 000 粒/667 m²(100 延长米)为宜。

3 播种前准备

3.1 营养土配制

大田土(肥沃的玉米地土或肥沃的大豆地土)5~7 份, 充分腐熟的马粪或猪粪 3~5 份(最好是隔年的农家肥, 如不是隔年的, 应于播种前 2 个月开始沤制, 使其充分腐熟), 土曲子 3%~5%, 草木灰 3%~5%, 以上 4 种搅拌均匀后过筛。

3.2 育苗床的制作

在温室内选择保温条件好, 光照充足的地带做育苗场所, 如培育每 667 m² 地秧苗(2 000 粒), 所需育苗面积为 5 m²(规格长 4 m, 宽 1.3~1.5 m)。方法: 在温室内的地平面上, 按所需育苗面积, 直接将地整平, 先在底部铺一层厚 3 cm 的粘土, 用平底鞋踩实刮平(目的是使苗床底部形成硬板, 防止床水下渗, 起苗时伤根), 然后上铺 7 cm 厚的营养土, 踩实刮平(踩实的目的防止浇水播种后床土断裂。刮平是为了覆土均匀一致, 出苗整齐), 四周用土或砖围成床埂(高 12~15 cm)。

3.3 防害虫

取足量秕谷炒熟后, 加适量敌百虫水拌匀, 阴干后撒布在苗床四周, 切忌撒在苗床上。防老鼠: 苗的四周撒耗子药, 同时用塑料或纱网将苗床围住。

4 播种

干籽撒播, 用增产菌拌种(2 000 粒种子用一小袋拌在散土中使用), 播前用 600 倍液多菌灵(50 g 多菌灵加 30 kg 水)将苗床喷透, 然后用泥抹子抹平苗床, 再用铁线划成 2~3 cm 见方的方格线, 将种子平放在方格中间(平放目的: 防止秧苗“带帽”出土, 子叶不能及时展开, 形成徒长苗), 然后覆盖 0.5~0.8 cm 厚的营养土(为使覆土厚度均匀一致, 可在苗床表面横放几根 0.5~0.8 cm 厚的木棍, 刮土时将土刮至与木棍等高), 最后用地膜覆盖床面(如中午遇高温或放风不及时, 应在地膜上铺报纸遮阴, 防止烧芽)。

5 移苗前管理(播种至 1~2 片真叶)

播种后适当升温, 促出苗, 白天 28~30 ℃, 夜间 18~20 ℃, 地温 20 ℃。当小苗有 50%~70% 露头时, 将地膜撤掉(最好在傍晚进行, 防止膜水滴在叶片上)。全苗后适当降温控徒长, 白天 22~24 ℃, 夜间 10~12 ℃, 放风以顶风为主, 防扫地风。药剂: 全苗后喷一遍 2 000 倍的普力克和 3 000 倍的虫螨克混合液, 防猝倒病和潜叶蝇。移苗: 当秧苗长到 1~2 片真叶时, 选择晴天将秧苗带坨移入 8 cm×10 cm 的育苗钵中(营养土配制同上)。培土时, 培至距离钵顶端 1.5 cm 处(土面与坨面相平), 然后逐株顺钵沿浇透水, 不要将水浇到秧苗上, 防猝倒病发生。3~4 d 后向育苗钵培营养土, 培到距钵顶 1 cm 处。

6 移苗后管理

摆钵场所, 选择温室保温好, 光照充足的中间地带, 将地面做成高台, 上铺酵素菌堆肥或草帘(提高地温), 将钵均匀摆在上方。

移苗后用生根粉一小包, 白酒一两, 将其化开后, 再加水 15 kg 喷洒秧苗, 余下的药水再加 35 kg 水灌根。

温光管理: 白天 25 ℃, 夜间 15 ℃, 地温 20 ℃为宜。当室温达不到时, 应用透明塑料打好隔段或加扣小拱棚(早揭晚盖), 并及时上草帘和纸被, 温室达不到 10 ℃时, 进行加温。经常保持棚膜光洁。

水份管理: 当秧苗生长速度明显减慢、叶色浓绿时, 可浇宝力丰水(每袋加水 100 kg), 并通过表面撒施一些细潮土起到保墒作用。

为提高秧苗素质, 可用宝力丰 600 倍液或摩力壮 300 倍液或者益农宝 1 袋兑 15 kg, 每隔 7~10 d 喷一次。在生理苗龄达到四叶一心至五叶一心时, 日历苗龄达到 40~55 d 时定植。

Transformation Rate of Two Plant Expression Vector pCPGO and pCBGO with *GO* Gene in Tomato

WANG Quan-hua¹, LI Su-mei¹, YIN Guo-xiang¹, CAO Shou-jun¹, ZHANG Huan-chun¹, LI Yun²

(1. Yantai Academy of Agricultural Sciences, Shandong 265500; 2. Yantai Fushan District Vegetable Office, Shandong, 265500)

Abstract Four concentration of PPT was tested in tomato. Results showed the optimistic PPT concentration of calus, shoot formation and rootage of tomato explants were 1.0 mg/L. Eight tomato lines were transformed using plant expression vector pCPGO and pCBGO. The results demonstrated transformation frequency of various tomato lines was roughly different in two expression vector. That was in same vector and transformation frequency of same tomato line duing to various plant expression vector. The highest transformation frequency of pCPGO and pCBGO in all lines were Pr5 76.47% and Pr1, 72.4%, the low est of those were Pr3, 13.89% and Pr4 2.7%.

Keywords Tomato; *GO* plant expression vector; Transformation