

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 镝, 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' ATGTTT ACGTC CTGTA GAA A3', 下游引物 5' TCATT GTTTG CCTCC CTGCT3'。

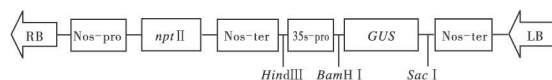


图 1 表达载体 pBIGUS 的结构示意图

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 6000 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 EHA 105 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 20μg DNA, 用 Hind II 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、EHA 105 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。

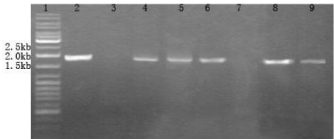


图 2 再生植株 PCR 检测结果

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

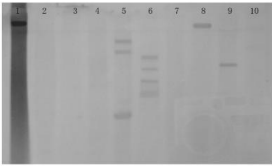


图 3 转基因植株的 Southern 检测结果

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 EHA 105。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 LBA 4404, 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 EHA 105 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和进入基因组的还是 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 G, 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. 美洲拟鲈抗冻蛋白基因(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 Chuazhu 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