

农杆菌介导番茄基因转化常见的问题与对策

徐翠莲^{1,2}, 胡文明¹

(1. 塔里木大学 植物科技学院, 新疆 塔里木 843300; 2. 莱阳农学院 山东 青岛 266109)

中图分类号: S 641.203.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)03-0053-02

番茄营养丰富, 产量高, 适应性广, 是世界各国的主要蔬菜作物之一。近年来番茄红素抗氧化功能与抗癌抗癌等功能的发现, 使番茄的食用价值和经济价值倍受关注^[1]。随着生物技术的发展, 利用基因工程进行番茄品种特性改良的研究取得了很大进展, 迄今为止, 已获得了抗病毒、抗病虫害、抗除草剂、抗冻、贮藏期延长和雄性不育转基因番茄^[2]。然而在番茄的基因转化过程中, 褐变严重及转化率低等问题一直困扰着广大科研工作者。现在分析前人进行番茄基因转化的基础上, 同时借鉴其他作物基因转化的结果, 针对影响褐变和基因转化率的诸多因素进行了深入细致地探讨, 并提出了相应的对策。

1 外植体的褐变

1.1 褐变的原因

外植体褐变的发生归根结底是由于酚类物质被氧化成醌类物质所致。在完整的组织和细胞中酚类化合物与多酚氧化酶分离存在而比较稳定。在切割外植体时, 切口附近的细胞受到伤害, 酚类化合物发生外溢并与多酚氧化酶接触, 迅速被氧化成棕褐色的醌类物质, 这些醌类物质又会进一步引起其它酶系统失活, 从而影响细胞的正常代谢, 严重时可导致组织死亡。

由于番茄中含有较多的酚类物质, 所以在组织培养, 尤其是在转基因操作过程中褐变问题非常严重, 其褐变症状为外植体表面或边缘切口变黑, 愈伤组织形成和不定芽发生率很低甚至为零, 褐变严重时整个外植体全部变黑, 然后死亡。

1.2 影响褐变的因素及对策

在番茄基因转化过程中, 褐变的发生及其严重程度受诸多因素的影响。首先褐变与农杆菌菌液浓度和侵染时间有很大关系。有些材料在组织培养时褐变很轻, 但在农杆菌介导的基因转化过程中, 褐变程度会因为农杆菌的杀伤毒害作用而加重, 并且菌液浓度越大, 侵染时间越长, 褐化程度就会越重。

尹明安^[3]在利用农杆菌介导法对番茄进行抗寒基因转化的过程中发现, 当侵染时间超过 8 min, 外植体褐化严重, 出愈率在 30% 以下, 出芽率在 6% 以下, 侵染时间越长, 褐变现象越重。当农杆菌侵染时间缩短为 5 min 时, 褐变程度明显减轻。梁丽琨^[4]在进行花生基因转化研究中也发现, 一般情况下花生上胚轴的褐化率达 7.17%, 当侵染浓度过高、外植体组织块切割较小时, 褐化现象就会加重。因此, 在农杆菌侵染外植体时, 要注意农杆菌的菌液浓度不能过高, 同时尽可能缩短侵染时间, 以减轻褐变的发生。

其次, 褐变程度与外植体的苗龄、材料的大小以及外植体受伤害程度有关。一般幼龄材料作为外植体接种后褐变很轻, 随着苗龄增长, 褐变会逐渐加重。外植体的大小如果小于 0.5 cm×0.5 cm 或受伤程度很大褐变就会加重。因此在番茄基因转化过程中应注意选择苗龄合适的材料, 接种的外植体不宜过小, 切割时尽可能减少外植体的伤口面积, 缩短切口暴露在空气中的时间。梁丽琨^[4]为降低褐化对花生转化率的影响, 在侵染时加入烟草、马铃薯的提取物, 在共培养基和分化培养基中添加还原型谷胱甘肽或维生素 C、维生素 E。另外, 还可以通过缩短转瓶周期, 或是加入活性炭来控制褐变的发生。

2 影响番茄转化率的因素及对策

长期以来, 农杆菌介导番茄基因转化的转化率普遍很低。叶志彪等^[5]在番茄的基因转化过程中, 通过三亲交配法转化农杆菌, 经过多次转化试验, 子叶的平均转化效率只有 7.6%; 汤福强等^[6]在转化 ACC 合成酶基因及其反义基因时, 子叶的再生频率分别达 9.8% 和 12.7%。外源基因的转化率除了受农杆菌株型、Ti 质粒的构建、外植体的再生率、筛选标记等因素影响外, 还受预培养和共培养时间、菌液浓度、侵染时间及筛选方式等转化操作的影响。基因转化确立后, 可以通过调节预培养和共培养时间、菌液浓度、侵染时间等方法来提高转化率。

2.1 预培养对转化率的影响

预培养可增强外植体对农杆菌侵染的承受能力, 使植物组织代谢活跃, 细胞分裂旺盛, 处于分裂状态的细胞更容易整合外源 DNA, 因而适当的预培养时间可提高

第一作者简介: 徐翠莲(1979-), 女, 硕士, 讲师, 现从事植物抗病毒基因工程研究。

收稿日期: 2007-09-07

外源基因的转化率;随着预培养时间的延长,外植体伤口逐渐愈合,不利于农杆菌的侵染和 T-DNA 的转移,转化率就会降低。

有研究表明番茄子叶不经过预培养阶段转化率为 7%,预培养 1 d 的转化率达 25%。随着预培养时间的延长转化率逐渐降低^[7]。但也有研究发现番茄子叶经预培养后转化率反而会降低^[8],他们认为,预培养后外植体伤口减少,进入细胞的 T-DNA 就少,从而导致转化率降低。以上研究同样以番茄的子叶作外植体进行基因转化,研究结果却不一致,其可能的原因是所用材料基因型不同或取材时子叶的生长状态及其幼嫩程度不同。因此外植体在转化前是否进行预培养以及培养时间的长短问题要据不同基因型、不同外植体、外植体不同生长状态及其幼嫩程度而定。

2.2 农杆菌菌液浓度和侵染时间对转化率的影响

农杆菌菌液浓度和侵染时间除了对外植体褐变有很大影响外,对其番茄转化率的提高也有一定影响。这都是由于外植体细胞受细菌毒害产生过敏反应,导致伤口褐化,从而导致转化率降低的缘故。

申琳等^[9]在 ACC 基因导入番茄时,采用 MS 培养基将菌液稀释 10 倍,侵染时间为 5 min,外植体愈伤组织形成和不定芽发生率得到了明显提高。曾黎琼等^[10]以番茄子叶为外植体进行侵染,发现当侵染时间超过 3 min,子叶在培养过程中就会逐渐死亡。并且菌液浓度越高,外植体表面农杆菌繁殖越多,致使死亡率越高;菌液浓度过低,则转化率降低。他认为菌液 OD₆₀₀=0.1、侵染 1~2 min 转化结果较理想。

因此,农杆菌介导基因转化时菌液浓度和侵染时间应视不同材料而定,并且在不影响转化率提高的前提下尽量采用较低的浓度和较短的侵染时间。另外在一些转化试验中,培养农杆菌时加入乙酰丁香酮、羟基乙酰丁香酮及植物细胞培养物来诱导 vir 基因的表达,也达到了提高转化率的良好效果^[11-13]。

2.3 共培养时间对转化率的影响

基因转化试验中,农杆菌的附着、T-DNA 的转移及外源基因的整合都需要在共培养时期完成,所以农杆菌与外植体的共培养这一过程在整个转化中非常重要。一般来说,农杆菌侵染外植体后,在伤口处生长 16 h 后,才能完成 T-DNA 的转移。因此,适当延长共培养时间可以增加 T-DNA 的转移率,提高转化率。随着共培养时间的延长,转化率反而会下降,这是由于共培养时间的延长使农杆菌在外植体表面过度生长,不但不利于以后的除菌及抑菌培养,而且也使植物细胞受到细菌的严重毒害,外植体的生长分化受到抑制。所以,在基因转化过程中,共培养时间一般控制在 16~24 h 范围内。

2.4 其他因素

除以上因素外,延迟筛选对转化率的提高也有一定

的影响。延迟筛选是外植体经农杆菌侵染和共培养后,先接种到抑菌培养基中培养一段时间再加入抗生素进行筛选。它可以保证大部分已转化的细胞能够再生形成转化体,不会因来不及表达被筛选掉。陆万香等^[14]在以农杆菌介导玉米几丁质酶基因导入甘蓝型油菜的研究中,采用延迟筛选的方法提高了油菜下胚轴的转化率。董娜等^[15]在农杆菌介导反义油酸脱饱和酶基因转化甘蓝型油菜时,延迟筛选 3、5、7、9 d 均比对照的绿芽率高,其中延迟 7 d 筛选的抗性芽率最高,达 9%。由此可见,延迟筛选能提高抗性愈伤组织和不定芽的诱导率,从而提高转化率。

基因转化时,由于细胞受到农杆菌的杀伤毒害作用,加上一段外源基因的插入与整合,致使愈伤组织的启动时间和不定芽的分化时间比单纯组织培养时明显滞后,外植体分化能力也降低,所以外植体的植株再生要比单纯组织培养时困难。因此有必要对培养基中激素浓度与配比做适当调整^[9],以尽快启动愈伤形成和不定芽的发生,最终达到提高转化率的目的。

参考文献

- [1] 梁智慧,王祯丽.番茄红素的研究生产现状及发展趋势[J].新疆石油教育学院学报,2003,7(2):28-30,34.
- [2] 黄锡志,寿森炎,廖乾生.转基因番茄研究进展[J].北方园艺,2001(3):29-31.
- [3] 尹明安,郭立,刘华伟,等.番茄 ZF 遗传转化再生体系的研究[J].西北农林科技大学学报,2002,30(5):27-30.
- [4] 梁丽琨,林荣双,肖显华,等.添加物影响花生外植体再生及基因转化[J].生物技术,2002,12(3):6-8.
- [5] 叶志彪,李汉露,周国林.番茄多聚半乳糖醛酸酶反义 cDNA 克隆的遗传转化与转基因植株再生[J].园艺学报,1994,21(3):305-306.
- [6] 汤福强,刘愚,施教耐,等.ACC 合成酶基因及其反义基因转化番茄获得转基因植株[J].科学通报,1994,39(24):2280-2283.
- [7] 任春梅,高必达,张学文,等.细菌几丁质酶基因转化番茄的研究[J].湖南农业大学学报,2002,28(4):298-301.
- [8] 刘艳军,杨静慧,杨恩芹,等.提高农杆菌基因转化率方法的研究[J].西南农业大学学报,2003,25(2):144-146,171.
- [9] 申琳,生吉萍,罗云波.番茄外源基因转化系统的研究[J].中国农业大学学报,1998,3(5):101-105.
- [10] 曾黎琼,张绍松,柴红梅,等.反义 ACC 合成酶基因导入番茄的研究[J].云南大学学报(自然科学版),2002,24(5):393-396.
- [11] Hiei Y, Ohta S, Komari T et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. Plant J, 1994(6): 271-282.
- [12] Van Roekel JSC, Damm B, Melchers LS et al. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*)[J]. Plant Cell Rep, 1993(12): 644-647.
- [13] Chan M T, Chang H H, Ho S L, et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric amylase promoter/ β -glucuronidase gene[J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 491-506.
- [14] 陆万香,李名扬,裴炎,等.玉米几丁质酶基因导入甘蓝型油菜的研究[J].西南农业大学学报,2001,23(2):130-133.
- [15] 董娜,林良斌,马占强.农杆菌介导反义油酸脱饱和酶基因转化甘蓝型油菜[J].分子植物育种,2004,2(5):65-69.