

花粉管通道法在番茄转基因上的应用

陈冬朋, 于丽杰

(哈尔滨师范大学 生命与环境科学学院, 生物系 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘 要: 为提高花粉管通道法遗传转化率, 现设计了自交授粉后对番茄的花柱分别进行 4 种依次加大切割深度并滴加外源基因的处理, 待转化果实成熟后收获转化种子。对各处理的坐果率和结籽数/果进行统计分析。结果表明: 随着花柱切割深度的加大, 坐果率和结籽数/果均显著下降; 对 T₁ 代植株进行 PPT 抗性筛选、PCR 检测阳性率后表明, 不同深度切割处理对植物材料的转化率差异不显著。切除柱头+1/3 花柱的处理方式进行花粉管通道法遗传转化操作, 能获得较好的效果。

关键词: 花粉管通道转化; 遗传转化; 番茄
中图分类号: S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)14-0131-05

人白细胞介素 4 (Interleukin-4, IL-4) 是 T 细胞产生的一种淋巴因子, 是 T 细胞产物中反应性最强的产物之一^[1]。IL-4 基因定位于第 5 号染色体, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 约 10 kb, 是已知淋巴因子基因中较大的一个。IL-4 是一种结构复杂、功能广泛的免疫调节因子, 对于 B 细胞、T 细胞、肥大细胞、巨噬细胞都有免疫调节作用, 而且可以治疗银屑病、哮喘气管炎等。

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 是一种世界性蔬菜, 具有很高的经济价值^[2]。因此, 人们对番茄遗传转化、外源基因检测和育种利用等方面进行了深入细致的研究, 并取得了重大进展。目前, 已获得抗病毒、抗虫、抗除草剂、抗冻、延长贮存期、改善风味的转基因番茄, 而且第一个商品化的转基因植物—耐贮番茄已进入消费者家庭。这标志着利用基因工程进行蔬菜作物品种改良已进入实用阶段。

花粉管通道法是在植物授粉后, 花粉在柱头形成花粉管, 采用微量注射或柱头切除滴加等方法将外源 DNA 导入胚囊的过程。由于对花粉管通道法的途径缺乏确切的认识, 致使实验人员对于如何利用花粉管通道法进行遗传转化没有一个统一而规范的操作规程。这不但增加了试验的盲目性和误差, 也大大降低了花粉管通道

技术的转化效率。该试验室通过不同深度切除花柱处理, 对番茄花粉管通道转化效果进行了研究, 以期为解决花粉管通道技术转化率有待提高的问题提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.), 品种为串珠, 种子来源于哈尔滨市农业科学院。

该品种花器较大, 易于进行遗传转化操作。植物表达载体 P4IL4 (图 1), 由课题组实验室构建。

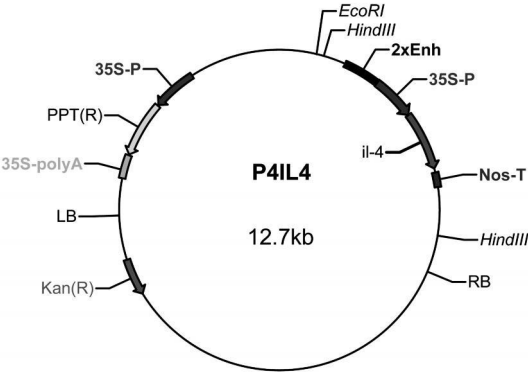


图 1 P4IL4 质粒载体

1.2 试验方法

1.2.1 外源基因的导入 选择当天完成自花授粉的花 (花瓣展开达到 180°), 用锋利刀片切除花柱, 然后用微量移液器在切口处滴加外源基因载体, 使其在柱头上形成 1 个液滴。外源基因载体的滴加量为 5 μL, 浓度为 1 μg/μL。滴加外源基因载体后, 在相应的花柄上注明转化的处理、时间和日期。该试验实施 4 种转化处理: 对照 CK: 未切除花柱; 处理 A: 用锋利刀片切除柱头, 并

第一作者简介: 陈冬朋 (1983-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: chenchendongpeng@126.com。
通讯作者: 于丽杰 (1961-), 女, 博士, 教授, 现从事植物分子生物学研究工作。E-mail: yulijie1961@126.com。
基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (C0014); 哈尔滨市学科后备带头人基金资助项目 (0071007002); 黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助项目。
收稿日期: 2010-04-29

在切口处滴加外源基因载体; 处理 B: 用锋利刀片切除柱头+1/3 花柱, 并在切口处滴加外源基因载体; 处理 C: 用锋利刀片切除柱头+1/2 花柱, 并在切口处滴加外源基因载体; 处理 D: 用锋利刀片切除柱头+ 整个花柱, 并在切口处滴加外源基因载体。

1.2.2 T₀ 代植株果实采收 果实成熟后按不同处理采收果实。经发酵、洗种、晾晒、分装等系列操作后, 统计分析各处理的坐果率和单果结籽数。

1.2.3 T₁ 代番茄的 PPT 抗性筛选 在 T₁ 代番茄幼苗长出 2 片真叶时, 用 250 mg/L 浓度的 PPT(爱诺园草净)进行叶面喷洒。在喷洒液中可加入 0.1% 土温-20, 以增加 PPT 的附着力。强日照条件下反应 14 d 左右, 淘汰叶片黄化、枯死的 PPT 敏感植株, 然后将 PPT 抗性植株定植于哈尔滨师范大学标本园, 常规露地田间管理。统计分析各处理的 PPT 抗性筛选的阳性率。

1.2.4 T₁ 代番茄总 DNA 的提取 取筛选出的 T₁ 代抗性植株的幼嫩叶片, 放于 1.5 mL 无菌的 Eppendorf 管中, 于 4℃ 黑暗中饥饿 2 d。叶片经液氮研磨后, 加入 650 L 65℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液迅速混匀。65℃ 水浴 30 min, 期间轻轻颠倒使缓冲液与材料充分接触。冷却后加入等体积的氯仿/ 异戊醇(24 : 1), 轻轻颠倒混匀, 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min。吸取上清液约 300 μL, 加入 2 倍体积的-20℃ 预冷的无水乙醇-20℃ 放置 30 min。4℃ 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液。沉淀用-20℃ 预冷的 70% 乙醇清洗 2 次, 室温晾干。每管中加入 50 μL TE 溶解。取 2 μL DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 T₁ 代番茄的 PCR 检测 内对照检测引物: rbcL-F: 5'-AATCTTCTACTGGTACATGGAC-3', rbcL-R: 5'-TCA-TCATCTTTGGTAAAATCAAG-3', IL-4 基因检测引物: 上游引物: 5'-TGACCGTAACAGACATCTTTGC-3', 下游引物: 5'-TACTCTGGTTGGCTTCCTTCAC-3'。以提取的质粒 DNA 为模板, 以植物叶绿体 DNA 编码的 rbcL 为内参, 目的基因的质粒为阳性对照, 以未转化植株的总 DNA 为阴性对照, 无菌水为空白对照, 进行 PCR 扩增。反应体系为: 模板 DNA 1 μL, 10× PCR buffer 1 μL, dNTP(各自浓度为 2.5 mmol/L)0.8 μL, 上游和下游引物各 0.1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.08 μL, 最后用无菌去离子水将终体积定容至 10 μL。PCR 反应循环参数: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55.4℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保温。用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。统计分析各处理的 PCR 检测的阳性率。

2 结果与分析

2.1 不同深度切除花柱处理对结实性的影响

有学者指出, 利用花粉管通道法导入外源基因时,

导入的部位离胚囊越近越有利于转化, 建议最适的外源基因导入部位是从花柱基部进行横切, 在其切面上滴加外源基因溶液^[3]。

为了研究切除花柱程度对番茄结实情况的影响, 进行了不同深度切除花柱处理, 试验结果见表 1。

表 1 不同深度切除花柱处理的坐果和结籽情况

处理	处理花数/朵	坐果数/个	坐果率/%	结籽数/粒·果 ⁻¹		
				最小值	最大值	$\bar{x} \pm s$
CK	61	53	87	37	92	61.750±15.657
A	220	104	47	8	88	52.950±26.120
B	216	90	42	8	94	51.300±24.387
C	257	77	30	7	79	40.950±22.104
D	210	51	24	2	72	31.400±20.775

2.1.1 不同深度切除花柱处理对坐果率的影响 对表 1 中各处理坐果率与对照组(CK)坐果率的差值进行 χ^2 独立性检验。结果显示不同处理的坐果率与对照组(CK)差异极显著($\chi^2=15.54^{**}$, $\chi^2_{0.01}=13.227$)。对照组(CK)明显高于其它各处理, 说明对番茄进行切除花柱并滴加外源基因处理对坐果率影响很大。切除柱头、切除柱头+1/3 花柱、切除柱头+1/2 花柱和切除柱头+整个花柱处理的坐果率分别是 47%、42%、30%、24%, 依次下降, 表明随花柱切割深度的加大, 坐果率下降。

2.1.2 不同深度切除花柱处理对单果结籽数的影响 采用单向分组资料方差分析法对单果结籽数性状进行统计分析。SAS 统计软件分析结果见表 2。对不同处理随机抽取 20 个果统计其单果结籽数, 利用字母标记法进行多重比较。切除柱头+1/2 以下花柱(A、B 与 CK)的结籽数/果差异不显著; 而切除柱头+1/2 以上花柱(C、D)与切除柱头+1/2 以下花柱(A、B 与 CK)的结籽数/果差异极显著; 切除柱头+1/2 以上花柱(C 与 D)结籽数/果差异不显著。切除整个花柱处理(D)的结籽数/果的平均数为 31.40 粒/果, D 处理与对照组(CK)相比已经达到极其显著水平。切除整个处理的单果结籽平均数最低, 对照组平均数最高。结果表明, 随着切除花柱深度的加大, 结籽数/果的平均值呈递减趋势; 切除柱头、切除柱头+1/3 花柱处理与对照组结籽数/果差异不显著, 可见当切除花柱达到 1/3 以下时, 对子房的发育和胚珠的受精作用影响不大; 切除柱头+1/2 花柱与切除整个花柱与对照组结籽数/果差异极显著, 可见当切除花柱达到 1/2 以上时, 对子房的发育和胚珠的受精作用影响加大。

表 2 多重比较检验的结果

处理	平均数	显著水平	
		0.05	0.01
CK	61.750	a	A
A	52.950	ab	AB
B	51.300	ab	AB
C	40.950	bc	BC
D	31.400	c	C

2.2 T₁ 代番茄幼苗 PPT 抗性植株的筛选及 PCR 检测

2.2.1 转基因植株的适宜 PPT 筛选浓度的确定 为了确定番茄转化植株种植苗的 PPT 筛选浓度, 将 PPT 稀释为 200、300、400、500 mg/L 的水溶液, 并各自加入 1% 吐温-20 当未转化的番茄幼苗长出 2 片真叶时, 对其喷洒 PPT, 14 d 记录反应结果(表 3)。大部分植株枯黄死去, 一部分植株与未喷 PPT 的对照植株一样正常生长。根据既要降低转化背景, 又要保证转化植株不受药害, 而且节约药品的原则, 该试验确定番茄 T₁ 代植株的 PPT 筛选浓度为 250 mg/L。

2.2.2 T₁ 代番茄的 PPT 抗性筛选 对收获的 T₀ 代种子进行消毒, 浸种过夜后在温室内播种于 288 孔育苗盘内。共播 5 111 粒种子, 获得 T₁ 代幼苗 4 068 株; 用 PPT 作为抗性筛选标记, T₁ 代植株喷洒 PPT 14 d 后, 敏感植株叶片黄化(图 2), 共获得 PPT 抗性呈阳性的植株共 870 株(表 4)。

表 3 不同浓度 PPT 处理未转化种植苗的结果				
PPT/mg · L ⁻¹	存活株数	死亡株数	总数	存活率/%
200	61	83	144	42.36
300	22	122	144	15.28
400	0	144	144	0.00
500	0	144	144	0.00



图 2 T₁ 代番茄幼苗的 PPT 抗性筛选
注: A: 喷洒 PPT 之前; B: 喷洒 PPT 14 d 后

表 4 转 IL-4 番茄 T ₁ 代植株检测结果与统计分析						
转化 类型	鉴定 种子数	待测 株数	PPT 抗性筛选		IL-4 基因 PCR 检测	
			阳性株数	阳性率/%	阳性株数	阳性率/%
A	1 076	1 015	209	20.59	1	0.10
B	1 084	892	202	22.64	1	0.11
C	1 412	959	217	22.63	2	0.21
D	1 539	1 202	242	20.13	3	0.25
总数	5 111	4 068	870	21.39	7	0.17

2.2.3 T₁ 代番茄的 PCR 检测 利用 CTAB 法提取番茄总 DNA, 质量可以满足 PCR 扩增需要(图 3)。以 PPT 抗性植株总 DNA 为模板, 以 *RbcL* 特异性引物进行 PCR 扩增, 得到了 *RbcL* 基因特异条带, 证明 PCR 反应体系恰当(图 4)。以 PPT 抗性植株总 DNA 为模板, 以 *IL-4* 特异性引物进行 PCR 扩增, 在 870 株 T₁ 代 PPT 抗性植株中, 共获得 7 株 *IL-4* 基因阳性植株(图 5, 表 4), T₁ 代转 *IL-4* 基因植株 PCR 扩增的阳性率仅为 0.17%, 远远低于 75% 的理论比率。

2.3 不同深度切除花柱处理对阳性率的影响
2.3.1 PPT 筛选对不同处理后代阳性率的影响 为分析在 PPT 筛选时不同深度切除花柱处理对后代阳性率的影响, 将表 5 中 4 种不同处理结果进行 χ^2 独立性检验。结果表明, 4 种处理对后代阳性率的影响差异不显著。随着花柱切割深度的加大, 其后代 PPT 筛选阳性率在切除柱头+1/3 花柱时达到最大, 但差异不显著。

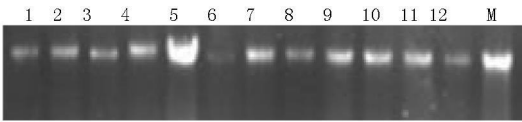


图 3 T₁ 代部分植株 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图
注: 1 ~ 12; 转基因植株 M: Marker。

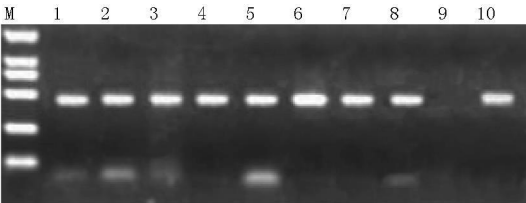


图 4 部分转基因植株的 *RbcL* 基因 PCR 扩增结果
注: *RbcL* PCR 1 ~ 8 为转基因植株; 9: 空白对照; 10: 非转基因植株。

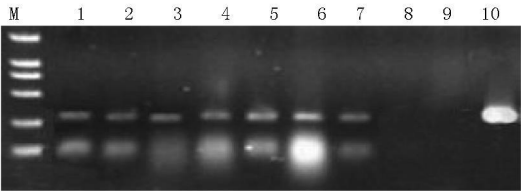


图 5 部分转基因植株的 *IL-4* 基因的 PCR 扩增结果
注: *IL-4* PCR 1 ~ 7; *IL-4* 阳性植株; 8: 阴性对照; 9: 空白对照; 10: 质粒阳性对照; M: DL2000 marker。

表 5 不同处理对后代 PPT 阳性率的影响				
转化类型	阳性株数	阴性株数	总和	阳性率/%
A	209	806	1015	20.59
B	202	690	892	22.64
C	217	742	959	22.63
D	242	960	1 202	20.13
总和	870	3 198	4 068	$\chi^2=3.07$

注: $\chi^2_{0.05,3}=7.815$; $\chi^2_{0.01,3}=11.345$ 。

2.3.2 PCR 检测对不同处理后代阳性率的影响 在 PCR 检测时, 为分析不同深度切除花柱处理对后代阳性率的影响, 将表 6 中 4 种不同处理结果进行 χ^2 独立性检验, 结果表明, 4 种处理对后代阳性率的影响差异不显著。随着花柱切割深度的加大, 其后代 PCR 阳性率逐渐增加, 但差异不显著。根据不同程度切除花柱对坐果率、单果结籽数以及对转化阳性率的影响, 可以选择切除柱头+1/3 花柱的处理方式进行遗传转化操作。

表 6 不同处理对后代 PCR 阳性率的影响

转化类型	阳性株数	阴性株数	总和	阳性率/%
A	1	1 014	1 015	0.10
B	1	891	892	0.11
C	2	957	959	0.21
D	3	1 199	1 202	0.25
总和	7	4 061	4 068	$\chi^2=1.00$

注 $\chi^2_{0.05, 3}=7.815$; $\chi^2_{0.01, 3}=11.345$ 。

3 讨论

3.1 植物 DNA 提取质量影响因素

模板质量的高低是 PCR 能否成功的关键。在番茄叶片的采集过程中, 若材料较老, 提取的 DNA 样品质量会受到番茄生长过程中积淀的杂质的影响, 同时大量色素的残留会影响后续的反应; 叶片的研磨过程没有在低温条件下进行, 就会使 DNA 降解, DNA 提取过程动作不温和, 而且没注意控制低温条件, 也会造成 DNA 的降解, 同时在 DNA 提取过程中, 若选用的方法不当, 残留的酚、氯仿、EDTA 也会对 PCR 扩增的结果产生影响^[4]。

3.2 影响 PCR 检测的因素

PCR 检测技术存在假阳性和假阴性现象产生。因此在 PCR 检测中应注意下面几点: ① Mg^{2+} : Mg^{2+} 浓度是影响 PCR 扩增的 2 个最重要的因素之一^[5]。 Mg^{2+} 是 PCR 反应 *Taq* 酶活性所必需的, 合适的 Mg^{2+} 浓度能使 *Taq* 酶活性得到最大限度的发挥, 从而扩增出较亮的特异性条带。②引物: 在 PCR 反应体系中加入的上下游引物浓度若不一致, 可能导致 PCR 扩增条带弥散或扩增失败。引物浓度在一定范围内降低, 反应特异性增加; 引物浓度升高, 反应特异性降低。③dNTP: dNTP 浓度过低, PCR 扩增会出现假阴性的现象; 浓度过高会导致错误掺入。④模板 DNA 质量: DNA 模板稀释 10 ~ 100 倍再进行 PCR 扩增, 其原因可能是模板中 *Taq* 酶抑制剂和杂质的含量较高, 当模板被稀释后 *Taq* 酶抑制剂和杂质浓度变小, 从而减少了对 PCR 结果的影响。⑤ *Taq* 酶活性: 浓度过低会降低扩增效率, 反之, 会使延伸不完全并可能造成非特异性扩增。⑥为了保证 PCR 扩增结果的可靠性和准确性, 在扩增的过程中要始终控制污染^[6], 试验一开始就要防止污染的发生, 设立阳性和阴性对照。

3.3 不同深度切除花柱处理对结实及转化率的影响

有学者认为利用花粉管通道法导入外源基因时, 导入部位离胚囊越近, 外源基因运行路径越短, 因此应尽可能的切除花柱, 就越有利于更多外源基因进入生殖细胞, 从而提高转化率^[7-8]。以甜瓜为试材, 对柱头和花柱进行不同切割处理后, 分别导入外源基因, PCR 检测表明, 均获得了较高的转化频率, 阳性率为 18.3% ~ 33.3%。随着花柱切割深度的加大, 转化率显著提高^[9]。目前切除花柱对番茄子房和受精过程的影响尚不明确, 所以设计了不同深度切除花柱处理, 以期对切除花柱深度与结实情况、转化率的关系进行研究。

3.3.1 不同深度切除花柱处理对结实情况的影响 为了比较不同深度切除花柱处理对坐果率和结籽数/果的差异, 对 T_1 代不同深度切除花柱处理对坐果率和结籽数/果分别进行了统计分析。结果表明, 不同深度切除花柱处理的坐果率与对照组(CK)比较差异极显著; 切除柱头+1/2 以上花柱与切除柱头+1/2 以下花柱处理的结籽数/果差异显著。这种现象可能由如下几方面的原因造成: ① *IL-4* 基因在转基因番茄中的表达产物 *IL-4* 并不是番茄的生命活动过程不可或缺的, 而 *IL-4* 表达是要消耗机体内能量的, 可能使机体内能量消耗和供给失去平衡, 从而影响种子的生长发育。②在切除花柱并滴加外源基因过程中, 因为操作的原因使花柱不可避免地受到损伤, 进而影响到花粉粒在柱头上的发育与花粉管的生长, 从而使果实生长受到影响, 进而影响种子产量下降。③外源基因 *IL-4* 转化番茄时, *IL-4* 基因整合到植物基因组的过程是随机的, 若 *IL-4* 的插入位点刚好位于与种子发育相关的结构基因中, 就可能影响该基因的表达, 进而影响种子的发育。

3.3.2 不同深度切除花柱处理对转化率的影响 为了比较不同深度切除花柱处理的转化率差异, 对 T_1 代不同深度切除花柱处理的转化率分别进行了统计分析, 结果表明, 不同深度切除花柱处理的转化率大致呈现随着切割深度的增加, 转化率逐渐变大, 但统计分析表明, 各处理之间差异不显著。原因可能是: ①由于自花授粉不能准确把握花粉管进入胚囊以及受精时间, 对转化率有影响。②在进行转化操作时, 有些虽已将外源基因导入花中, 但花柱不可避免地受到损伤, 进而影响到花粉粒在柱头上的发育与花粉管的生长, 从而使果实生长受到影响甚至死亡, 进而无法得到阳性植株。③由于外源基因 *IL-4* 转化番茄时, *IL-4* 基因整合到植物基因组的过程是随机的, 各处理的转化率都很低, 得到的阳性植株都很少, 因此不同处理间的差异不显著。④外源基因的丢失^[10], 造成转基因后代阳性率偏低^[11]。 *IL-4* 的导入

也会影响配子的存活能力, *IL-4* 可能插入到影响花粉活力的基因位点^[12], 使得转基因植株花粉的发芽力、花粉管伸长能力与受精能力降低, 造成后代阳性率偏低。除此之外, 还有一些人为因素导致阳性率过低^[13]。⑤转基因沉默、重排、丢失和异常分离等现象也是转基因过程中普遍存在的问题。目前为止人们在实践摸索中, 找到了一些对转基因异常遗传和表达的有效措施, 如利用转基因沉默突变体^[14], 使用 MARs 序列^[15] 等这些措施有利于克服转基因沉默, 提高转基因表达水平和遗传稳定性。

由于选择的是自然授粉的花(花瓣展开达到 180°), 在进行不同深度切除花柱处理前, 少数花可能已经完成受精作用, 此时切割花柱的处理对其子房的发育和果实成熟的不利影响就会大大减小, 但对试验结果存在着一定的干扰。根据不同程度切除花柱对坐果率、单果结籽数以及对转化阳性率的影响, 可以选择切除柱头+1/3 花柱的处理方式进行遗传转化操作。

今后, 在研究不同深度切除花柱对结实性影响时, 可以采用蕾期人工授粉的方式, 以降低试验误差, 提高试验结果的准确性。

参考文献

- [1] 于善谦, 王洪海, 朱乃硕, 等. 免疫学导论[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [2] 吴志刚, 宋明, 王志敏, 等. 番茄组织培养中无菌苗培养条件的优化[J]. 中国农学通报, 2006(4): 89.

- [3] 王艳杰, 申家恒. 花粉管通道法转基因技术的细胞胚胎学机理探讨[J]. 西北植物学报, 2006, 26(3): 628-634.
- [4] 赵阳国, 高崇洋, 王继华, 等. 如何解除 PCR 反应中的抑制现象[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2003, 19(3): 81-84.
- [5] Henegani O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23(3): 504-511.
- [6] Tony S M. Applications and Limitations of Polymerase Chain Reaction Amplification[J]. Chest, 1995, 108(5): 1393-1404.
- [7] 刘明, 杨君, 安利佳. 花粉管通道法转化影响因素的分析[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(12): 3483-3523.
- [8] 冯沙沙, 杜国强, 师校欣, 等. DNA 浓度及注射时间对苹果花粉管通道法基因转化率的影响[J]. 农业生物技术科学, 2007, 23(4): 64-66.
- [9] 哈斯阿古拉, 牛一丁, 张丽, 等. 花粉管通道法转基因技术在甜瓜品种河套蜜瓜上的应用[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2007, 38(4): 419-423.
- [10] Huaijun, Michael L. Identification of a Gene in the Process of Being Lost from the Genus *Agrostis* [J]. Plant Physiology, 2005, 138(4): 2386-2395.
- [11] WANG Guanlin, FANG Hongjun. The Plant Genetic Engineering [M]. Science Press Beijing, 2002: 654.
- [12] Hua Z H, Huang D N. Genetic mode of exogenes in transgenic plants [J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(1): 1-5.
- [13] 贾庆利. 外源基因在拟南芥转基因植株中的遗传研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [14] Butaye K M, Goderis I J, Wouters P F, et al. Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions [J]. Plant J, 2004, 39: 440-449.
- [15] Petersen K, Leah R, Knudsen S, et al. Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequencies and reduce variance of transgene expression in barley [J]. Plant Mol Biol, 2002, 49(1): 45-58.

Establishment of Tomato Transformation Technique Via the Pollen tube Pathway Method

CHEN Dong-peng YU Li-jie

(College of Biological Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: For improving the genetic transformation efficiency of the pollen tube pathway method, we designed treatment which cut style with 4 kinds of different depth and drop into the foreign gene after self pollination, harvesting the transformation seeds when the fruit ripened. The results showed that with the style cutting depth of the increase, percentage of fruit and seeds/fruit were significantly decreased; resistant selection by PPT, PCR amplification were used to detect the T₁ generation plant, it appeared the transformation efficiency of plants was not observably differ from each other style cutting depth. We choose cutting stigma+1/3 style approach genetic transformation operation by pollen tube pathway method, should be able to get a better effect.

Key words: pollen tube pathway method; genetic transformation; tomatoes