

根癌农杆菌介导外源基因转化番茄体系优化

潘永明

(牡丹江师范学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

摘要:为建立优化的番茄外源基因转化体系,提高番茄的外源基因转化率,以番茄叶盘预培养时间和农杆菌与番茄叶盘的共培养温度、共培养时间为试验要素,摸索相对适宜的预培养及共培养的时间和温度范围,其余操作按常规步骤进行。结果表明:农杆菌与番茄叶盘的预培养适宜时间为 27℃ 下 32~48 h;农杆菌与番茄叶盘的共培养的最适宜条件是:22~24℃ 下暗培养 48 h。

关键词:番茄;根癌农杆菌;体系优化

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0142-03

番茄以其营养丰富、风味独特而成为全世界栽培最为普遍的果菜之一。番茄栽培过程中常因病虫害的发生影响果实品质和产量,其中番茄病毒病是番茄的主要病害之一,发生普遍、危害严重。我国南北各番茄产区均有发病,其发病率轻者为 30%、重病区高达 70%~100%,严重时可使整个地区失收^[1-2]。防治番茄病毒病目前尚无有效的药剂^[3],主要措施是通过培育抗病品种。传统育种在番茄抗病毒病方面效果往往周期较长,效果不显著。生物技术的应用特别是基因工程在番茄抗病毒病育种中得到了广泛应用,取得了显著成绩。根癌农杆菌介导的基因转化系统是目前研究最多、理论机理最清楚、技术方法最成熟的基因转化途径。与其它基因转化体系相比,具有很多突出的优点^[4-7]。由于品种间对转化体系的自身差异,故在转化之前首先进行针对性的转化试验,从中筛选最优化体系是必要的。该研究以番茄叶盘预培养时间和农杆菌与番茄叶盘的共培养温度、共培养时间等差异较显著的转化条件为试验要素,其余转化条件按常规步骤进行。摸索相对适宜的预培养及共培养的时间和温度范围。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄种子:牡丹江市售;含 CMV-cp 基因的载体农杆菌 LBA4404,由黑龙江省烟草科学研究所中心实验室提供;试验用试剂为国产分析纯。

1.2 试验仪器

PTC200 热循环仪(美国 MJ 公司)、日立 Z-3000 紫

外分光光度仪、美国 BECKMAN 高速冷冻离心机、无菌操作台、水浴锅、天平、电泳仪、培养箱等。

1.3 试验方法

试验针对根癌农杆菌介导的基因转化过程中,番茄叶盘预培养时间和农杆菌与番茄叶盘的共培养温度、时间为试验要素。按每 1℃ 1 个梯度,从 21~24℃ 分别设计 4 个共培养温度,每个共培养温度下交叉设计 1~4 d 4 个共培养时间;同时外植体预培养时间按 4 h 为 1 个梯度从 0~56 h 分别设计 15 个处理。其余条件按常规操作程序处理。即:农杆菌浸泡叶盘时间按 5 min 计,诱导愈伤组织及芽分化的培养基为 MS 固体培养基。卡那霉素培养基作为筛选转化芽的选择培养基。初期为 50 mg/L 的继代培养加大选择压力到 100 mg/L,目的在于筛选掉非转化的细胞愈伤组织产生的分化芽。

1.3.1 番茄外植体预培养条件优化 番茄外植体预培养:按预培养试验设计的 0~56 h 内的 15 个时间梯度,每过 4 h 取无菌番茄幼苗叶片,剪成四周有伤口的叶盘,正面朝上摆在有 MS 固体培养基(含 NAA 0.1 mg/L + BA 1.0 mg/L)的培养皿上,每次做 2 盘培养皿,每皿 5 片番茄叶盘,放入培养室内 27℃ 光照预培养,共 30 盘培养皿。番茄转化:含 CMV-cp 基因的工程菌 LBA4404 活化后,菌液 OD₆₀₀ = 0.3~0.7 时,用 IMS 培养液替换 YEB 培养液,开始转化。无菌操作台中将 15 个时间梯度的预培养的番茄叶盘分别浸入工程菌 LBA4404 中,5 min 后倒出菌液,用含 MS 培养液(含 NAA 0.1 mg/L + BA 1.0 mg/L)无菌卫生纸覆盖,放入培养箱 22℃ 暗培养 3 d 后转入选择培养基中(MS 固体培养基,含 NAA 0.1 mg/L、BA 1.0 mg/L、卡那霉素 50 mg/L、头孢 500 mg/L),伤口与培养基充分接触,27℃ 下,光照培养。结果调查:培养 7~8 d 后记录各叶盘形成愈伤,10~15 d 记录分化芽,分化芽长到 0.5 cm 左右换新选择培养基

作者简介:潘永明(1968-),男,硕士,研究员,研究方向为分子生物学遗传育种。

基金项目:牡丹江市科技局科研资助项目(G2009n2015)。

收稿日期:2010-05-12

(MS 固体培养基,含 NAA 0.1 mg/L、BA 1.0 mg/L、卡那霉素 100 mg/L、头孢 500 mg/L)继代培养。继续定期观察叶芽的变化,记录叶芽黄化情况,根据黄化结果计算转化率。

转化率(%)=未黄化的叶芽数/叶芽总数×100%。

1.3.2 番茄外植体与工程菌共培养条件优化 番茄外植体与工程菌共培养,根据 1.3.1 筛选结果,重新剪取无菌番茄叶盘,预培养 44 h 后转化,转化方法同上,共培养条件从 21~24℃ 分别设计 4 个共培养温度,每个共培养温度下交叉设计 1~4 d 4 个共培养时间,共计 16 盘试验培养皿;每盘材料达到试验要求后分别转至选择培养基中(MS 固体培养基,含 NAA 0.1 mg/L、BA 1.0 mg/L、卡那霉素 50 mg/L、头孢 500 mg/L),伤口与培养基充分接触,27℃ 下,光照培养。试验结果调查:同上。

1.4 数据处理

待全部数据记录并整理结束,采用 Excel 作图,DPS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外植体不同预培养时间的比较

从图 1 可看出:预培养时间对基因转化率的变化有明显影响。从 32~48 h 预培养条件下(处理 9、10、11、12)转化率明显比其它时间段的转化率高。且差异极显著(表 1),以 44 h 预培养条件转化率达最大值 34.52%。

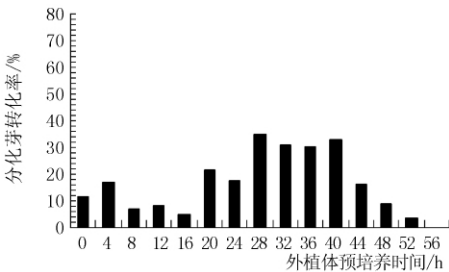


图 1 转化率与番茄外植体预培养时间之间关系

表 1 不同预培养时间对转化率影响差异显著性

处理	5%显著水平	1%极显著水平
处理 9	a	A
处理 12	ab	AB
处理 10	ab	AB
处理 11	b	B
处理 7	c	C
处理 8	cd	CD
处理 3	d	D
处理 13	d	D
处理 2	e	E
处理 14	ef	EF
处理 1	efg	EF
处理 5	efg	EF
处理 4	fgh	FG
处理 6	gh	FG
处理 15	h	G

2.2 番茄外植体与农杆菌共培养温度、时间对转化率的影响

图 2 显示,在 21℃ 条件下番茄外植体与工程农杆菌无论共培养时间长短,转化均不理想;在 22℃ 条件下,适宜的共培养时间为 48~96 h,以 72 h 的转化率最高,达 33.6%;在 23℃ 条件下,适宜的共培养时间为 48~72 h;在 24℃ 条件下,适宜的共培养时间为 48 h;随着温度的升高可适当缩短共培养时间,表现出明显的规律性。

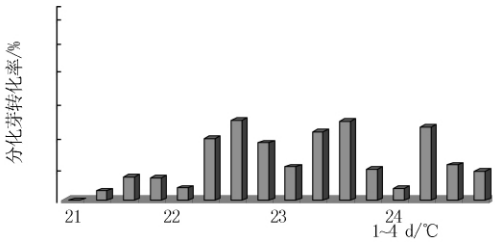


图 2 番茄外植体与工程农杆菌共培养时间
及温度对转化率影响

从表 2 可知,番茄外植体与工程农杆菌共培养温度对转化率的影响差异极显著($F=7.752, P=0.0073<0.01$);番茄外植体与农杆菌共培养时间对转化率的影响同样差异极显著($F=7.671, P=0.0075<0.01$),当 2 种因素同时交互作用时对转化率的影响更是差异极显著($F=11.93, P=0.0000<0.01$),说明不同共培养温度 and 不同温度下的共培养时间对转化率有极显著影响。

表 2 不同共培养温度、时间对转化率
影响的差异显著性

方差分析表(随机模型)				
变异来源	平方和	自由度	F 值	显著水平
A 因素间(温度)	1 682.4	3	7.752	0.0073
B 因素间(湿度)	1 664.7	3	7.671	0.0075
A×B	651.0	9	11.93	0.0000
误差	290.9	48		
总变异	4 289.1	63		

3 结论

通过试验及对数据的统计分析,初步得出结论:番茄叶盘预培养时间以 27℃ 条件下 32~48 h 为最佳;而农杆菌与叶盘的共培养在 4 种温度下,以 22~24℃ 条件较适宜。其中 21℃ 条件下共培养叶盘转化率均较低,说明 21℃ 条件不利于工程菌质粒上的 T-DNA 区向番茄基因组的转移。而 22~23℃ 条件下转化率最高,表现出明显的规律性。即随温度的升高共培养时间可适当减少,为了便于操作,适宜条件应选择在 22~24℃ 条件下共培养 48 h。可获得相对较高的转化率,初步证实了筛选适宜转化体系的必要性,为外源基因的转化提供了理论依据。

参考文献

[1] 冯兰香,穆淑云. 银川地区番茄病毒病主要毒原种类研究[J]. 宁夏农林科技,1994(4):24-27.
[2] 杨悦俭,姚建明. 我国番茄病毒病主要毒原种类研究及抗病育种的进展[J]. 浙江农业科学,1992(2):183-185.
[3] 裴维蕃. 植物病毒学[M]. 北京:中国农业出版社,1984:127-146.

薹菜的花粉形态及其演化和分类的探讨

宋廷宇¹, 吴春燕¹, 宋述尧¹, 何启伟², 徐苑芳³

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 山东省农业科学院 蔬菜研究所, 山东 济南 250100;

3. 济南北方农艺科学研究所, 山东 济南 250100)

摘要:利用扫描电镜对 4 个薹菜的花粉形态进行了系统观察和比较分析。结果表明:在 4 个薹菜品种中‘南京小叶’薹菜的极轴最长,‘花叶薹菜’的极轴最短;品种之间赤道轴的长短差异不明显。花粉形态较为单一,均呈长球形,萌发沟较长,属于 $N_3P_4C_5$ 型花粉。4 个薹菜品种的花粉壁表面均具有清晰的网状纹饰,但网脊宽窄不一,不同品种间网脊的宽窄及网孔大小、形状等特征存在一定的差异。通过聚类分析表明‘南京小叶’薹菜和‘麻叶黑菜’亲缘关系较近,‘京研薹菜’其次,而‘花叶薹菜’单独聚在一起。花粉特征与表型特征之间存在一定相关性,具有重要的分类学意义。

关键词:薹菜;花粉形态;演化;分类

中图分类号:S 634.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0144-04

薹菜(*Bruassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino var. *tai-tsai* Hort)原产于中国,是我国黄淮地区的地方特产蔬菜之一,尤以山东和江苏等地种植较多^[1]。目

前,薹菜一直被认为是十字花科芸薹属芸薹种白菜亚种的一个变种^[2],但是由于长期的自然选择和人工选择,薹菜品种类型变异较大,亲缘关系比较复杂。而当前针对薹菜的研究尚少,影响了薹菜的利用。因此,对薹菜的演变、进化和分类进行研究是十分必要的。

植物的花粉形态特征是在长期的进化过程中不断演化和发展形成的,带有大量的演化信息,它是由基因控制的,受外界环境条件的影响很小,具有很强的遗传保守性和稳定性,是探讨植物起源、演化及亲缘关系的重要依据之一^[3]。因此,该研究在对收集的 29 份薹

第一作者简介:宋廷宇(1977-),男,吉林德惠人,博士,讲师,现主要从事蔬菜种质资源创新与利用方面的研究工作。E-mail: ty-song422@163.com。

通讯作者:何启伟(1940-),男,研究员,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: hqw1215@sohu.com。

收稿日期:2010-06-12

[4] 陈谷,叶长明,李宝健. 植物抗病毒基因工程的研究进展[J]. 生物技术通讯,1999(6):17-22.

[5] Kim M., Canio W., Wessler S., et al. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato [J]. Science, 2001, 293: 287-289.

[6] 王傲雪,李景富. 转基因番茄的机理及现状[J]. 辽宁农业科学, 1998(6): 33-36.

[7] 王文静,李怀方. 现代分子生物学技术在植物抗病毒育种中的作用[J]. 山西农业科学, 2002, 30(3): 76-79.

The Condition Optimization for Tomato Gene Transform by *Agrobacterium Tumefaciens*-introduced

PAN Yong-ming

(Mudanjiang Normal University College, Mudanjiang, Heilongjiang 157012)

Abstract: It was used as the experimental essential factor that the pre-culture time of tomato leaves and the co-culture time and temperature of the agrobacterium tumefaciens and the tomato leaves of grass plate altogether raise, then designed experiment. Tried to find out relative suitable time and temperature range, other operations carry on according to the conventional operation, the empirical datum indicated that the agrobacterium tumefaciens and the tomato leaves of grass plate pre-culture time was 32~48 hours; the most suitable condition of agrobacterium tumefaciens and the tomato leaves of grass plate was: cultured in 22~24℃ under raises darkly for 48 hours.

Key words: tomato; *Agrobacterium tumefaciens*; condition optimization