

DOI:10.11937/bfyy.201614048

# 农杆菌介导的番茄遗传转化研究进展

高 佩, 尹 锐, 林彦萍, 张美萍, 王康宇, 王 义

(吉林农业大学 人参基因资源工程研究中心, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**介绍了农杆菌介导的番茄遗传转化影响因素,包括番茄的基因型、农杆菌类型、外植体类型、预培养时间、菌液浓度、侵染时间、共培养时间、分化培养基中的生长调节剂与抗生素浓度、筛选剂浓度、乙酰丁香酮浓度及外源基因等重要因素。同时综述了番茄转基因技术的应用及研究成果,以期农杆菌介导的番茄遗传转化奠定理论基础。

**关键词:**遗传转化;番茄;研究进展;农杆菌;转化效率

**中图分类号:**S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0192-06

番茄(*Solanum lycopersicon* L.)属于茄科家族,是世界范围内广泛种植的蔬菜和经济作物,具有基因组较小(950 Mb)、生长周期短(45~100 d)、自花授粉等特点,是生产转基因植物和植物生物制药产品的模式植物。近年来,全球生产的番茄总量增长了10%,是许多国家的维生素和矿物质的重要来源。此外,番茄中富含的番茄红素被证明具有抗氧化性,且有助于预防疾病,比如癌

症和心血管疾病等<sup>[1]</sup>。1986年, MCCORMICK等<sup>[2]</sup>首次用农杆菌介导的叶盘法转化番茄,以番茄的子叶和下胚轴为外植体,以单一序列和多拷贝序列为外源基因,成功获得了8个番茄品种的300多株转基因苗。以番茄为受体的研究屡见报道,包括研究基因的功能、生产抗虫、抗疾病、抗除草剂的植物品种,提高果实品质,延迟果实成熟,生产外源蛋白,以及建立高效快速的农杆菌转化体系<sup>[3]</sup>。2000年, VIDYA等<sup>[4]</sup>利用农杆菌介导法转化番茄子叶,转化率仅为8%。2003年, PARK等<sup>[5]</sup>利用农杆菌介导的叶盘法转化番茄,转化效率达到20%。2015年, SUN等<sup>[6]</sup>利用农杆菌介导法转化番茄的子叶和下胚轴,转法效率高达40%。影响番茄遗传转化效率的因素很多,如番茄基因型、农杆菌类型、外源基因的选

**第一作者简介:**高佩(1988-),女,硕士研究生,研究方向为植物细胞工程与细胞全能型表达。E-mail:876418958@qq.com.

**责任作者:**王义(1964-),男,博士,教授,硕士生导师,现主要从事药用植物细胞工程等研究工作。E-mail:wanglaoshi0606@163.com.

**基金项目:**中国科学技术部863计划资助项目(2013AA102604-3)。

**收稿日期:**2016-03-07

**Abstract:** Taking the serious problems as research objects concerning continuous cropping obstacle and high-level soil alkalization in Ningxia Province, and 10-year-old continuous cucumber cropping soil was used. By adjusting the acidity to pH 2, and taking the furfural residue and vinegar residue as its main material, while the soil amendments were setting as comparison stander(CK), 200 kg (T1), 400 kg(T2), 600 kg(T3), 800 kg(T4), 1 000 kg(T5), 1 300 kg(T6), 1 600 kg per 667 m<sup>2</sup> (T7), taking the pot experiment which was to figure out the influence in different dosage of soil amendment on the soil nutrient, salt ions, and the number of microorganisms. The results showed that during full fruit period, soil pH and EC value were decreased with the increase of dosage of soil amendment, in which the pH of T7 declined significantly, its pH was declined 4.29% comparing with CK. The EC of T5 decreased most significantly comparing with CK, 37.72% was decreased. During full fruit period, soil total nitrogen T6 and T7 were significantly higher than CK, which increased by 42.11% and 48.54% respectively. More than 800 kg per 667 m<sup>2</sup> dosage of soil amendment could increase the amount of soil organic matter significantly. T1, T2, T4 and T5 treatment were significantly increased by 20.00%, 20.00%, 23.33% and 26.67% of the total phosphorus in soil compared with CK. The Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> content of T4 declined most obviously, the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> of T3 declined most significantly. The bacteria and actinomycetes quantity of T4 increased most obviously, fungi quantity was reduced the most obviously, and actinomycetes quantity of T3 was increased the most obviously at engraftment period. Comprehensive analysis, 600 kg per 667 m<sup>2</sup> dosage of soil amendment was the most suitable way.

**Keywords:** cucumber; continuous cropping soil; soil amendment; soil nutrients

择、预培养和共培养时间等,现分析了影响番茄遗传转化的几种重要因素,以及农杆菌介导的番茄遗传转化的应用,以期为番茄遗传转化效率的提高和应用提供理论参考。

目前较为常见的植物遗传转化方法有基因枪法、PEG 法、显微注射法、超声波法及农杆菌介导的遗传转化法等。在以上方法中,农杆菌介导的遗传转化因其操作方便,成本较低,在植物中广泛应用<sup>[7]</sup>。尤其是双子叶植物作为植物遗传转化受体时,通常选用农杆菌介导法,这种方法有许多优点,比如高效稳定的外源基因插入效率、转化相对较长的 DNA 片段、外源基因的低拷贝数插入并且符合孟德尔遗传规律<sup>[8]</sup>。

## 1 影响番茄遗传转化的因素

### 1.1 番茄的基因型

据研究表明,不同基因型的番茄品种在同样的转化条件下,转化效率有较大差异<sup>[9-10]</sup>。SHARMA 等<sup>[9]</sup>以 3 个不同品种的番茄子叶为外植体,Pusa Ruby 的转化率为 40.5%,Sioux 的转化率达到 41%,而 Arka Vikas 的转化率仅是 22.0%。陈珍等<sup>[10]</sup>以“中蔬 4 号”“T03 号”2 种基因型的 7~13 d 番茄幼苗子叶为遗传转化的受体,在相同条件下,“中蔬 4 号”的转化率高达 51.40%,而“T03”的转化率仅为 28.17%。不同基因型的番茄品种对生长调节剂的敏感程度有较大差异,导致不同基因型的番茄品种对生长调节剂具有专一性,从而影响遗传转化的效率,因此在番茄遗传转化的过程中,要对不同基因型的番茄进行合理的生长调节剂筛选。

### 1.2 农杆菌类型

在植物遗传转化中,常用的根癌农杆菌有农杆菌碱型、章鱼碱型和胭脂碱型 3 种不同类型。对于不同类型的植物,农杆菌的侵染能力有较大差异,因此应该筛选对不同基因型的番茄品种最为敏感的农杆菌菌株<sup>[11]</sup>。李立芹<sup>[12]</sup>用携带有植物双元表达载体 pBI121 的农杆菌菌株 EHA105 和 LBA4404 在相同条件下分别转化番茄品种“美粉 1 号”7 d 无菌苗的子叶,结果显示,EHA105 菌株的转化率可达 68.4%,LBA4404 菌株的转化率是 42.2%。CHETTY 等<sup>[13]</sup>用农杆菌 AGL1、GV3101、EHA105、MP90 4 种菌株在相同条件下转化番茄 Micro-Tom, GV3101 的转化率高达 65%,EHA105 的转化率为 40%,AGL1 的转化率为 35%,而 MP90 的转化率仅 15%,试验证明农杆菌菌株 GV3101 具有较高的转化效率和较低拷贝数,菌株 MP90 具有较低的转化效率和较高的拷贝数,而菌株 EHA105 同时具有相对较高的转化效率和较高的拷贝数。结果表明,在植物遗传转化的过程中,应该筛选合适的农杆菌菌株,只有外植体和菌株合理搭配才能达到较高的转化效率。

### 1.3 外植体

番茄转化效率的主要影响因素是外植体的选择,番茄无菌苗的苗龄、外植体类型(包括子叶、子叶节、叶片、下胚轴等)、大小及外植体在培养基上放置的块数、叶片正反等都对转化效率有影响。7 d 无菌苗遗传转化效率较高,番茄苗龄越大,木质化程度越高,组织硬化,越不利于遗传转化,但苗龄过小,农杆菌对外植体的毒害作用较大,因此应选择合适的无菌苗苗龄,以提高番茄的遗传转化效率<sup>[14-15]</sup>。

YASMEEN<sup>[14]</sup>以番茄的叶片和子叶为外植体,叶片的转化率高达 42.5%,子叶的转化率仅为 8.89%。AJENIFUJAH-SOLEBO 等<sup>[15]</sup>以番茄 7 d 无菌苗的子叶节、子叶、下胚轴为外植体做农杆菌介导的遗传转化,发现子叶节的转化率为 60.50%,子叶的转化率为 23.85%,下胚轴的转化率为 16.25%。VINOTH 等<sup>[16]</sup>用农杆菌介导法转化番茄的子叶和子叶节,子叶的转化率是 46.28%,子叶节的转化率高达 65.90%。多篇研究结果显示用番茄无菌苗的不同组织(如叶片、子叶节、子叶、胚轴)作外植体,子叶节的生长速度快且转化效率最高,子叶的分化速度较快,转化效率相对次之,下胚轴转化率较低<sup>[6,15-17]</sup>。试验方法和番茄基因型的差异,也可能导致转化率的差异。

### 1.4 预培养时间

农杆菌介导的叶盘法转基因试验常用到预培养技术,预培养可以促进植物细胞分裂,使植物组织恢复正常代谢,处于分裂状态的植物细胞较易整合外源 DNA,进而提高遗传转化效率<sup>[18]</sup>。预培养时间不同对外植体的转化效率有很大影响,未经预培养的外植体直接用农杆菌侵染,由于外植体伤口大,幼嫩柔弱,侵染后易褐化、萎蔫并死亡,很难继续脱分化。预培养 1 d 后,外植体略显膨大,胚轴和子叶向光面呈现红褐色,但切口处细胞未分裂,伤口未愈合,侵染后褐化现象明显;预培养 2 d 后的外植体切口处细胞分裂明显,有少量愈伤组织形成,切口部分愈合,外植体膨大,侵染后切口处有轻微褐化,但外植体可以正常生长;预培养时间过长,外植体的切口愈合,T-DNA 很难整合到植物基因组中,转化效率较低,而且切口处细胞开始脱分化生成芽,后期生成大量的假阳性苗,所以外植体预培养时间以 2 d 最适<sup>[19]</sup>。

### 1.5 菌液浓度、侵染时间及共培养

菌液浓度、侵染时间和共培养时间是影响农杆菌转化效率的决定性因素,农杆菌 28 ℃,200 r·min<sup>-1</sup>,过夜培养到对数期(OD<sub>600</sub> = 0.2~1.0),离心。弃上清液,用 MS 培养液重悬菌体,菌液浓度达到 OD<sub>600</sub> = 0.1~1.0,侵染时间 10~60 min,共培养时间 1~4 d 不等<sup>[3,20-22]</sup>。

QIU 等<sup>[20]</sup>以 Micro-Tom 番茄品种的子叶为外植体,农杆菌 OD<sub>600</sub> = 0.2, 侵染 20 min, 共培养 3 d, 转化率为 20%。CRUZ-MENDIVIL 等<sup>[21]</sup>以 Micro-Tom 番茄品种的叶片为外植体,农杆菌 OD<sub>600</sub> = 0.5, 侵染 10 min, 共培养 2 d, 转化率为 19.1%。SIVANKALYANI 等<sup>[22]</sup>以番茄品种 PKM1 的下胚轴为外植体,农杆菌 OD<sub>600</sub> = 0.4, 侵染 40 min, 共培养 2 d, 转化率为 48.3%。农杆菌本身对外植体有一定的毒害作用,菌液浓度过高,繁殖速度快,会导致外植体死亡,菌液浓度过低,达不到预期效果;严格控制侵染时间,侵染时间过长,因农杆菌毒害作用以及外植体缺氧,外植体软腐死亡,侵染时间过短农杆菌尚不能接触切口;外植体和菌液共培养的时间一般为 1~3 d,细菌附着,T-DNA 转移以及整合都在此过程中发生,时间过长农杆菌大量繁殖,后期除菌困难,植物细胞损伤严重<sup>[23-24]</sup>。因此应以菌液浓度,侵染时间及共培养时间 3 个因素,设计多梯度正交实验,选择最优的转化条件。

#### 1.6 分化培养基中的生长调节剂与抗生素

番茄的遗传转化常用 MS 培养基或以 MS 为基础改善的培养基,同时添加一定比例的植物细胞分裂素和生长素,生长素和细胞分裂素可以改变植物的生理过程,进而影响植物的形态建成。生长素和细胞分裂素的比例可以影响番茄的愈伤组织诱导和芽的分化<sup>[14]</sup>。常用的生长素主要有吲哚乙酸(IAA)、吲哚-3-丁酸(IBA)、 $\alpha$ -萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)等,常用的植物细胞分裂素主要有 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、玉米素(ZT)、激动素(KT)等。番茄基因型、外植体和试验方法不同,分化培养基中使用的细胞分裂素和生长素比例不同导致番茄转化效率的差异(表 1)。常用的细胞分裂素和生长素组合是 6-BA + IAA<sup>[24-27]</sup>、ZT + IAA<sup>[29-32]</sup>、6-BA + NAA<sup>[22]</sup>,细胞分裂素也可以单独使用<sup>[15,26,31]</sup>。ZT 和 IAA 的组合不仅能够高效诱导抗性芽的分化,而且更能保证番茄转化后抗性芽的分化率。

为防止农杆菌过度繁殖对外植体的毒害,应在分化培养基中加入适量的抗生素除菌,加入的抗生素种类和用量应不影响外植体的正常生长,常选用的抗生素是头孢噻肟(Cefotaxime)、特美汀(Timentin)和奥格门汀(Augmentin)。头孢噻肟的浓度一般在 250~500 mg · L<sup>-1</sup>除菌效果较好<sup>[13]</sup>。奥格门汀是阿莫西林和棒酸钾羟苄苄青霉素的混合物,价格低廉,常被用于除去共培养后的外植体上的农杆菌,奥格门汀相较于头孢噻肟对外植体的再生能力影响较小。因此,奥格门汀是番茄大规模遗传转化常用的抗生素,浓度一般在 375 mg · L<sup>-1</sup>左右<sup>[31]</sup>。

#### 1.7 筛选剂

卡那霉素(Kan)是一种有效的氨基糖甙抗生素,它

表 1 外植体、植物生长调节剂对转化效率的影响

Table 1 Effect of explant, plant growth regulator on tomato transformation

编号 No.	基因型 Genotype	外植体 Explant	植物生长调节剂 Plant growth regular /(mg · L <sup>-1</sup> )	转化效率 Transformation efficiency/%	参考文献 Reference
1	Arka Vikas	子叶	IAA(0.1)+6-BA(4)	15.40	[25]
2	PKM1	下胚轴	NAA(0.5)+6-BA(3.0)	30.70	[22]
3	Ife	叶片 子叶	ZT(1.5)	42.50 8.89	[15]
4	Arka Vikas	子叶	6-BA(1.0) IAA(0.1)+6-BA(2)	75.00 62.56	[26]
5	Yuhuang401 Pusa Ruby	子叶	IAA(0.2)+6-BA(2.0)	21.00	[24]
6	Pusa Uphar DT-39	子叶	IAA(0.5)+6-BA(1.0~2.5)	2.80~68.50	[27]
7	Rio Grande	子叶节 胚轴	IAA(0.5)+ZT(1.0)	54.00~85.00	[14]
8	CastleRock	下胚轴 子叶	ZT(1.0)+6-BA(1.0)	34.00 6.80	[28]
9	981 XTY-6	下胚轴	ZT(1.0)+IAA(0.1)	4.60	[29]
10	Micro-Tom	子叶	ZT(2.0)+IAA(0.1)	29.63	[20]
11	Urfa-2	子叶	ZT(2.0)+IAA(0.1)	16.00	[30]
12	Hezuo 908	子叶 下胚轴	IAA(0.5)+6-BA(0.5) IAA(0.5)+6-BA(2.0)	45.00 33.00	[6]
13	Micro-Tom	子叶	ZT(1.0)+folie acid(0.05)	15.00~35.00	[13]
14	Micro-Tom	叶片	ZT(2);6-BA(2)	28.10~69.20	[21]
15	Micro-Tom	子叶	ZT(1.5)	25.00~48.80	[31]
16	PED	叶片	ZT(1.0~2.5); 6-BA(1.0~2.5)	21.15~28.20	[32]

作为一种筛选剂在 50~100 mg · L<sup>-1</sup> 范围内成功的被运用于筛选番茄转基因幼苗,当前研究表明,当 Kan 浓度达到 50 mg · L<sup>-1</sup> 时可以完全抑制未转化的愈伤组织再分化生成芽以及不定芽生根,当 Kan 浓度达到 100 mg · L<sup>-1</sup> 时抗性芽可以正常生存,但是非抗性芽逐渐黄化死亡<sup>[33]</sup>。侵染后的外植体在 Kan 浓度 50 mg · L<sup>-1</sup> 作为初始筛选,不定芽转移到 Kan 浓度 100~150 mg · L<sup>-1</sup> 的抗性培养基上进行进一步筛选,这样可以防止假阳性的产生<sup>[22]</sup>。因此,卡那霉素是一种有效的选择性标记。

#### 1.8 乙酰丁香酮(AS)

农杆菌介导的植物遗传转化常加入 AS 或与其类似的酚类化合物,AS 作为信号分子可以诱导农杆菌的 *vir* 基因活化及高效表达,从而促进外源基因整合到植物细胞。研究表明,AS 含量为 100~200 mg · L<sup>-1</sup> 可以显著提高番茄的转化效率,而当 AS 含量高于 300 mg · L<sup>-1</sup> 时,则显著降低番茄的转化效率。因此,一般认为 AS 含量 200 mg · L<sup>-1</sup> 更有利于提高番茄的遗传转化效率<sup>[25,34]</sup>。

#### 1.9 外源基因

FRARY 等<sup>[35]</sup>研究了 T-DNA 插入片段对转化效率的显著影响,在所有遗传背景相同的条件下,空载体的



转化效率为 4.7%, 插入片段大小为 30 kb 时转化效率为 1.5%, 插入片段大小为 150 kb 时转化效率仅为 0.6%。SUN 等<sup>[6]</sup>以大小分别为 310、241 bp 的外源基因 AC1 和 AC3 转化番茄品种‘Hezu0 908’的下胚轴, AC1 的转化率为 41.1%, AC3 的转化率为 42.2%。以上研究表明, 外源基因大小显著影响转化效率, 外源基因越大, 转化效率越低。目前对于外源基因大小对转化效率的影响研究较少, 还有待于进一步研究外源基因对转化效率的影响。

## 2 番茄转基因研究的应用

### 2.1 利用转基因技术研究和鉴定基因功能

陈双臣等<sup>[36]</sup>以玉米的抗除草剂 *bar* 基因和抗卡那霉素 *nptII* 基因转化番茄品种 Micro-Tom, 发现番茄阳性植株具有抗除草剂功能。因几丁质酶基因有很强的抗病能力, 于慧敏等<sup>[37]</sup>通过农杆菌介导法将含有  $\beta$ -1,3-聚糖酶基因和几丁质酶基因转入番茄 7 d 无菌苗的子叶中, 通过病原真菌的接种试验, 共得到 3 株具有较强抗病反应的转基因阳性植株。徐艳<sup>[38]</sup>将通过人工改造的 miR159 转化番茄, 初步建立了人工 miR159 介导的番茄抗黄瓜花叶病毒遗传转化体系, 花叶病毒(CMV)能引起宿主花叶、爱花、黄花、绿岛、褪绿等症状, 影响番茄的正常生长, 对转基因阳性番茄接种靶标病毒 CMV-Fny, 阳性植株相较于普通番茄病症减轻或不感病, 从而验证了 miR159 的功能。赵岑等<sup>[39]</sup>研究了利用农杆菌介导法以花青素调节基因 *VlmybA2* 转化番茄 Micro-Tom, 转基因阳性植株的花青素含量增加显著, 而叶绿素含量降低, *VlmybA2* 基因可增加抗衰老物质花青素的含量, 也可以作为转基因植株的报告基因。

### 2.2 利用转基因技术改良番茄品质

链格孢菌和尖孢镰刀菌能引起番茄的早疫病和维管束萎蔫病, 番茄早疫病是危害番茄产量重要的疾病之一, UPADHYAY 等<sup>[40]</sup>研究了利用微阵列分析与番茄早疫病发病机制相关的蛋白质和转录因子, 有望通过转基因技术获得抗性植株阻止病原体对番茄的危害。ARSHAD 等<sup>[41]</sup>研究了 *rolB* 基因对番茄营养成分和抗真菌感染的影响, 结果显示, *rolB* 基因极大的改善了转基因番茄的营养品质, 抗性植株番茄红素含量增加了 62%, 抗坏血酸含量增加了 225%, 酚醛树脂总量增加了 58%, 而自由基清除活性增加了 26%; 此外, 转化植株显著降低了真菌 *A. solani* 和 *F. oxysporum* 病原体对番茄叶片的危害。邹礼平等<sup>[42]</sup>将八氢番茄红素脱氢酶基因(*PDS*)通过农杆菌介导法转化番茄, 获得了 10 株阳性苗, 对转基因植株的番茄红素含量测定结果显示转基因番茄中番茄红素含量是对照组的 1.4 倍, 说明 *PDS* 基因超表达有增加番茄中番茄红素含量的功能, 为改良番

茄品种、增加番茄品质奠定了基础。

### 2.3 利用转基因技术培育番茄抗病新品种

*pto* 基因参与编码丝氨酸或苏氨酸蛋白激酶, 其在细菌信号识别植物细胞中扮演着重要角色, 有抗菌性斑点病的作用, KOC 等<sup>[30]</sup>把从野生型番茄品种 *pimpinellifolium* 中克隆出的抗菌性斑点病 *pto* 基因转入不抗病的番茄品种 *Urfa* 中, 成功获得了抗菌性斑点病的番茄新品种 *P. syringae* pv. *tomato*。Bt 基因是苏云金芽孢杆菌基因的简称, 其表达产物 Bt 毒蛋白具有杀虫效果好、安全、高效等优点成为应用广泛的转杀虫基因, 多篇文献报道了转 Bt 基因番茄品种具有抗鳞翅目和鞘翅目害虫的功能<sup>[32,43-45]</sup>。KOUL 等<sup>[32]</sup>研究了 *cryIAb* 转基因番茄品种具有抗 2 种鳞翅目害虫的功能。TABASHNIK 等<sup>[44]</sup>研究了转 Bt 基因在不同遗传机制上抵抗害虫。GAO 等<sup>[45]</sup>研究了含有耐药基因 *Ol-1* 的番茄具有抵制番茄白粉病的功能, 番茄基因组含有 3 个 *ALS* 基因编码序列, 当 *ALS1* 和 *ALS2* 基因表达下调或基因沉默时, 导致 *Ol-1* 基因不表达而失去抗番茄白粉病能力。李轶女等<sup>[46]</sup>初步建立了利用农杆菌介导法转化半夏凝集素抗虫基因(*Pta*)和苏云金芽孢杆菌毒蛋白基因(*CryIAC*)双价抗虫基因对番茄遗传转化的研究, 结果显示转基因阳性植株具有抗虫害、提高番茄品质的功能。利用转基因技术培育番茄抗病新品种, 为减少使用有毒农药、创新种质资源以及降低环境污染等方面奠定了基础。

### 2.4 利用转基因番茄作为生物反应器生产药物

近年来, 利用转基因番茄作为生物反应器生产生物制药备受关注, 包括抗凝血剂、人类表皮生长因子、疫苗、重组抗体和干扰素等。SUN 等<sup>[6]</sup>首次将乙肝表面抗原基因(*HBsAg*)转入番茄, 经 PCR 和 Southern blot 技术检测乙肝表面抗原基因成功转入番茄基因组中, 并通过 Western blot 和 ELISA 技术进一步验证了转 *HBsAg* 番茄成功表达了乙肝表面抗原蛋白。李轶女等<sup>[46]</sup>构建了丙型肝炎病毒融合抗原基因 *NS3CE* 对番茄的遗传转化体系, 并证明了其在转录水平上成功表达, 丙型肝炎病毒是危害人类健康的重要病原体之一, 研制出经济有效, 安全可靠的疫苗是预防抗丙型肝炎的有效手段。CHEN 等<sup>[47]</sup>将可引起幼童手足口病的肠道病毒 EV71 外壳蛋白基因 *VP1* 导入番茄, 并在番茄果实中成功表达, 将含有 *VP1* 蛋白的转基因番茄果实作为口服疫苗饲喂小白鼠, 分别从体液免疫和细胞免疫 2 个方面成功证明了小鼠抗 EV71 感染。梁宏伟等<sup>[48]</sup>研究了人胰高血糖素样肽 1(*GLP1*)在转基因番茄中的表达, 通过 PCR 技术和 Southern blot 技术证明 *GLP1* 基因成功整合到番茄基因组中, 并得到 9 株阳性植株, 通过 Ni-NTA 亲和

层析技术分离纯化转基因番茄中表达的 hGLP1 融合蛋白,饲喂小鼠试验证明转基因番茄表达的 hGLP1 融合蛋白具有显著降血糖功能。付宏岐等<sup>[49]</sup>利用转基因番茄成功表达了人成纤维细胞生长因子 21(FGF21),得到 5 株阳性克隆,Western blot 分析结果显示,FGF21 蛋白在转基因番茄叶片中成功表达,并具有良好的抗原性。张玉英<sup>[50]</sup>利用番茄为受体成功表达了重组牛凝乳酶,通过 *bar* 基因和 RT-PCR 检测其在转录水平上的表达,提取转基因番茄中的蛋白,测定了重组牛凝乳酶的活性。刘凤娟等<sup>[51]</sup>研究了卡介苗分泌型 Ag85A 基因 *fbpA* 在番茄中的转化情况,Southern blot 技术检测到 9 株阳性植株,Western blot 技术检测到其中 5 株番茄果实成功表达了 *fbpA* 蛋白,其蛋白与结核病人血清发生了特异性免疫反应。

### 3 展望

番茄作为植物转基因研究的主要模式植物之一,其遗传转化体系已经报道了很多,但仍存在很多问题,如转化率低、转基因后代遗传不稳定、外源基因沉默、操作复杂等问题。由于转基因番茄的应用前景广泛,如鉴定基因功能、改良番茄品质、培育番茄抗病新品种,尤其是转基因番茄作为生物反应器生产药物的应用。现代生物技术的飞速发展,使转基因植物基因工程疫苗逐渐走进人们的生活,因其独特的可食性特点,展现了广阔的应用前景和诱人的开发利用价值。因此建立一个高效、高产的番茄遗传转化体系是一个亟待解决的问题。

### 参考文献

- [1] BARONE A, DI MATTEO A, CARPUTO D, et al. High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency[J]. *Curr Genomics*, 2009, 10(1):1-9.
- [2] MCCORMICK S, NIEDERMEYER J, FRY J, et al. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Rep*, 1986, 5(2):81-84.
- [3] 梁美霞, 刘守伟, 李景富. 农杆菌介导的番茄遗传转化研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2014, 35(2):244-248.
- [4] VIDYA C S S, MANOHARAN M, KUMAR C T R, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* var. Pusa Ruby) with coat-protein gene of Physalis mottle tymovirus[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 156(1):106-110.
- [5] PARK S H, MORRIS J L, PARK J E, et al. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(10):1253-1257.
- [6] SUN S, KANG X P, XING X J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency[J]. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2015, 29(5):861-868.
- [7] 苗青, 李正国, 杨迎伍. 农杆菌介导的番茄遗传转化的研究进展[J]. *热带亚热带植物学报*, 2011, 19(6):585-590.
- [8] WU Y F, CHEN Y, LIANG X M, et al. An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation in tomato[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2006, 53(2):252-256.
- [9] SHARMA M K, SOLANKE A U, JANI D, et al. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato[J]. *Journal of Biosciences*, 2009, 34(3):423-433.
- [10] 陈珍, 朱诚. 农杆菌介导的番茄遗传转化体系优化研究[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2008, 34(6):615-620.
- [11] 张录霞, 牛建新, 马兵钢. 根癌农杆菌介导转化番茄的影响因素[J]. *生物技术通报*, 2008(1):10-19.
- [12] 李立芹. 农杆菌介导番茄“美粉 1 号”遗传转化体系优化研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(9):5107-5108.
- [13] CHETTY V J, CEBALLOS N, GARCIA D, et al. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(2):239-247.
- [14] YASMEEN A. An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande)[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2009, 31(6):1271-1277.
- [15] AJENIFUJAH-SOLEBO S O A, INGELBRECHT I, ISU N R, et al. Reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation of Nigerian cultivars of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2014, 4(7):797-808.
- [16] VINOTH S, GURUSARAVANAN P, JAYABALAN N. Optimization of factors influencing microinjection method for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(4):1173-1187.
- [17] PARK S H, MORRIS J L, PARK J E, et al. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(10):1253-1257.
- [18] 贺强玺, 徐恒戡, 赵汝凤. 番茄遗传转化影响因素及其应用研究进展[J]. *北方园艺*, 2013(20):185-189.
- [19] 王玲, 孙亮, 冷平, 等. 番茄果实 ABA 合成酶 NCED 基因的克隆及其 RNAi 遗传转化体系的建立[J]. *中国农业大学学报*, 2009, 14(5):54-60.
- [20] QIU D, DIRETTO G, TAVARZA R, et al. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD[J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 112(2):172-175.
- [21] CRUZ-MENDIVIL A, RIVERA-LOPEZ J, GERMAN-BAEZ L J, et al. A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv. Micro-Tom from leaf explants[J]. *Hort Science*, 2011, 46(12):1655-1660.
- [22] SIVANKALYANI V, TAKUMI S, THANGASAMY S, et al. Punctured-hypocotyl method for high-efficient transformation and adventitious shoot regeneration of tomato[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 165:357-364.
- [23] KRASNYANSKI S F, SANDHU J, DOMIER L L, et al. Effect of an enhanced CaMV 35S promoter and a fruit-specific promoter on uida gene expression in transgenic tomato plants[J]. *in vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2001, 37(4):427-433.
- [24] LI T, SUN J K, LU Z H, et al. Transformation of HBsAg (Hepatitis B surface antigen)[J]. *Czech J Genet Plant Breed*, 2011, 47(2):69-77.
- [25] SOMAYAJI P, DODDANANJAPPA T P, BYRAPPA S M. *Agrobacterium*-mediated transformation for development of transgenic tomato with *ySAMdc* gene[J]. *Indian Journal of Biotechnology*, 2014(13):19-25.
- [26] MYTHILI J B, SAIPRASAD G V S, NAVEENA C, et al. Differential response of tomato and tobacco to *Agrobacterium* mediated transformation

- with cytokinin independent-1 (CKI-1) gene as influenced by cytokinin levels [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2011, 49(12): 909.
- [27] KAUR P, BANSAL K C. Efficient production of transgenic tomatoes via *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(2): 344-348.
- [28] ABU-EL-HEBA G A, HUSSEIN G M, ABDALLA N A. A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system [J]. Landbauforschung Volkenrode, 2008, 58(1/2): 103.
- [29] HUSSAIN A F, ANFOKA G H, HASSAWI D S. Transformation of tomato with TYLCV gene silencing construct using optimized *Agrobacterium*-mediated protocol[J]. Biotechnology, 2008, 7(3): 537-543.
- [30] KOC N K, KAYIM M, YETISIR H, et al. The improvement of resistance to bacterial speck in transgenic tomato plants by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2007, 54(1): 89-96.
- [31] SUN H J, UCHII S, WATANABE S, et al. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics[J]. Plant and Cell Physiology, 2006, 47(3): 426-431.
- [32] KOUL B, SRIVASTAVA S, SANYAL I, et al. Transgenic tomato line expressing modified bacillus thuringiensis *cry1Ab* gene showing complete resistance to two lepidopteran pests[J]. Springer Plus, 2014(3): 84-96.
- [33] YING C Y, HUANG X Q, GUO Y Q, et al. Optimization of tomato genetic transformation, kanamycin-resistant screening and seed selection[J]. Journal of Southern Medical University, 2008, 28(7): 1117-1122.
- [34] PADMANABHAN P, SAHI S V. Genetic transformation and regeneration of *Sesbania drummondii* using cotyledonary nodes[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(1): 31-40.
- [35] FRARY A, HAMILTON C M. Efficiency and stability of high molecular weight DNA transformation, an analysis in tomato [J]. Transgenic Research, 2001, 10(2): 121-132.
- [36] 陈双臣, 刘爱荣, 王凤华, 等. 农杆菌介导的番茄 Micro-Tom 遗传转化体系的建立[J]. 华北农学报, 2010, 25(2): 112-115.
- [37] 于慧敏, 石竹, 邵洪伟, 等. 农杆菌介导的抗病基因对番茄的遗传转化[J]. 山东大学学报, 2011, 46(11): 1-4.
- [38] 徐艳. 人工 miR159 介导的番茄抗黄瓜花叶病毒遗传转化研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2011.
- [39] 赵岑, 吕立堂, 赵德刚. 花青素调节基因 *VlmybA2* 对番茄遗传转化[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(3): 270-275.
- [40] UPADHYAY P, RAI A, KUMAR R, et al. Microarray analyses during early stage of the tomato/*Alternaria solani* interaction[J]. Genomics Data, 2015(6): 170-172.
- [41] ARSHAD W, WAHEED M T, MYSORE K S, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with *rolB* gene results in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens[J]. PloS One, 2014, 9(5): e96979.
- [42] 邹礼平, 高和平, 钟亚琴. 八氢番茄红素脱氢酶基因超表达载体的构建及表达鉴定[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(2): 393-399.
- [43] SANAHUJA G, BANAKAR R, TWYMAN R M, et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(3): 283-300.
- [44] TABASHNIK B E, HUANG F, GHIMIRE M N, et al. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(12): 1128-1131.
- [45] GAO D, HUIBERS R P, LOONEN A E H M, et al. Down-regulation of acetolactate synthase compromises Ol-1-mediated resistance to powdery mildew in tomato[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 32.
- [46] 李轶女, 张中林, 苏宁, 等. 丙型肝炎病毒融合抗原基因 NS3CE 对番茄的遗传转化[J]. 作物学报, 2003, 29(3): 360-363.
- [47] CHEN H F, CHANG M H, CHIANG B L, et al. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71[J]. Vaccine, 2006, 24(15): 2944-2951.
- [48] 梁宏伟, 杜景川, 陆海, 等. 人胰高血糖素样肽 1 在转基因番茄中的表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(4): 325-330.
- [49] 付宏岐, 李海燕, 庞实锋, 等. 利用转基因番茄表达人成纤维细胞生长因子 21 (FGF21)[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(7): 163-170.
- [50] 张玉英. 利用番茄表达重组牛凝乳酶的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [51] 刘凤娟, 陈清, 俞守义. 卡介苗分泌性 Ag85A 基因 *fbpA* 转化番茄的检测与鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(4): 254-259.

## Research Progresses of *Agrobacterium*-mediated Transformation on Tomato

GAO Pei, YIN Rui, LIN Yanping, ZHANG Meiping, WANG Kangyu, WANG Yi

(Research Center for Ginseng Genetic Resources, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** This article reported the factors for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the tomato, such as tomato genotypes, *Agrobacterium tumefaciens*, pre-culture time, concentration of bacterium, infection time, co-cultivation time, the ratio of plant growth regulators and antibiotics in regeneration medium, the concentration of screening reagent, the concentration of acetosyringone and different target genes. This paper summarized the application and research results for transgenic technology of the tomato at the same time. In order to lay a theoretical foundation for the tomato *Agrobacterium*-mediated transformation.

**Keywords:** genetic transformation; tomato; research progress; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation efficiency