

发根农杆菌介导番茄遗传转化研究

黄彩红¹, 孙洪祥², 周淑香³, 于广建¹

(1. 东北农业大学 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省鹤岗市东山区蔬园乡, 154101; 3. 黑龙江省农业经济学校 牡丹江 157041)

摘要: 本实验设置基因型、菌液浓度、外植体部位和感染方法四个因素, 利用发根农杆菌的 Ri 质粒介导将 TMV 外壳蛋白和 CMV 外壳蛋白基因按 $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ 正交表转化番茄。用共培养的方法, 诱导愈伤组织, 经卡那霉素的抗性筛选, 进一步培养得到转化再生的植株。经 PCR 检测证明目的基因已被导入。卡那霉素抗性愈伤组织频率的结果表明: 不同品种不同菌液浓度的转化频率存在着显著性差异, 而外植体部位感染方法之间差异不显著。

关键词: 番茄; 转基因

中图分类号: S603. 641. 2 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2001)03-0032-02

番茄病毒病是一种世界性病害, 分布广, 毒源种类多, 严重危害着番茄生产。其中危害最严重的是 TMV (烟草花叶病毒) 和 CMV (黄瓜花叶病毒)。就 TMV 来说目前我国栽培的大部分番茄品种都抗 TMV, 其中抗性基因大部分源于强力米寿和 Manapal。因病毒株系是不断分化的。所以抗性品种也需要不断更新。对 CMV 来讲, 由于缺失抗原而难以通过常规育种方法培育出抗 CMV 品种, 因此将外源基因利用基因工程法导入现有番茄品种, 从而产生具有多抗性的番茄种质资源, 这项工作重要而具有实际意义的。本实验利用发根农杆菌介导, 研究影响番茄遗传转化的因素, 初步建立适合转基因番茄的转化系统, 为基因工程法创建番茄种质资源打下理论基础并提供实践依据, 为番茄生产提供有效的抗病途径, 同时寻求番茄育种上的新突破。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌种为发根农杆菌 R_{1000}^+ 内含 PBTC-8 质粒, 该质粒中含 TMV-cp 基因 CMV-cp 基因和 NPT-II 基因。植物材料为 P_{26} 组培大黃 P_{118} 和 T_{093} 四个多代自交并遗传稳定的番茄品种。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒检测 采用碱解法提取, 在含溴化乙锭 0.8% 的琼脂糖上 40V (伏) 电泳 1h (小时), 紫外灯下观察。

1.2.2 植物材料的准备 用四个品种饱满粒大的种子, 在超净工作台上用 95% 酒精消毒 30s (秒), 无菌水冲洗

三遍, 10% NaClO 浸泡 15-20min (分), 再用无菌水冲洗三遍, 播种于 2% 琼脂蔗糖培养基上, 25℃ 下培养, 16h (小时) 光照, 光照强度为 4000lux (勒), 8h (小时) 黑暗。9d (天) 后, 无菌条件下将无菌苗切成子叶、下胚轴上部、中部和下部四段, 预培养 24h (小时) 后用于转化。

1.2.3 细菌菌株及培养 在超净工作台上, 从 YEB 培养平板上挑取单细胞克隆菌落, 加入含有 Km 等三种抗生素的液体 YEB 培养基上, 再于 28℃ 条件下的摇床振荡 24~36h (小时) 后, 用于感染。

1.2.4 外植体的转化及驯化 将外植体预先在 MS+玉米素 ZT 2mg/l (毫克/升) 的培养基上预培养 1d (天), 然后按正交表 (见表 1) 所提供的处理进行感染。共培养 24h (小时), 将外植体放入 Km 50mg/l (毫克/升)+MS+ZT 2mg/l (毫克/升) 的培养基上, 用于诱导愈伤组织或不定芽, 并在感染 2h (小时) 后, 加入 Km 进行筛选, 产生不定芽到 2cm 左右, 插入 MS0 上诱导生根, 生根后放入珍珠岩中, 浇 100 倍液体 MS 培养基, 待苗壮后转入田间。

1.2.5 PCR 检测 按 SDS 法提取番茄总 DNA, 设计引物进行 PCR 扩增, 95℃ 预变性 5min 后, 加入 $luTag$ 酶, 按 94℃、50s (秒), 55℃、60s (秒), 72℃、90s (秒) 设置 35 个循环, 反应结束后, 再含溴化乙锭 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳 1h (小时), 紫外灯下观察。

2 结果与分析

2.1 转化频率的方差分析

番茄外植体从感染开始计算, 两周后检测其在筛选培养基上愈伤组织诱导频率。对照全部不能萌发并逐渐死亡, 而没加 Km 的培养基上的对照全部萌发。计算出抗性愈伤组织的诱导频率 (%) = 萌发愈伤组织的外植体

收稿日期: 2001-01-11

数 * 100/感染的外植体数作为观察值, 并将各因子相同水平所对应的 T_i 相加, 以公式 $R = T_{\max} - T_{\min}$ 计算各因子不同水平极差, 同时进行方差分析和各因素及处理组合间的差异显著性测验(表略), 重复三次。

正交实验结果列表

组合	列号				重复		
(16)	1	2	3	4	1	2	3
1	P ₂₆	下胚轴下部	5倍	浸泡	27.45	18.87	33.33
2	P ₂₆	下胚轴中部	10倍	浸泡	29.63	20.37	36.36
3	P ₂₆	下胚轴上部	15倍	穿刺	3.17	13.51	11.76
4	P ₂₆	子 叶	20倍	穿刺	47.62	12.5	50.00
5	P ₁₁₈	下胚轴下部	10倍	穿刺	10.00	18.42	17.86
6	P ₁₁₈	下胚轴中部	5倍	穿刺	25.00	19.05	13.64
7	P ₁₁₈	下胚轴上部	20倍	浸泡	0.00	0.00	0.00
8	P ₁₁₈	子 叶	15倍	浸泡	0.00	10.00	19.05
9	组培大黄	下胚轴下部	15倍	浸泡	20.00	26.23	20.90
10	组培大黄	下胚轴中部	20倍	浸泡	16.28	20.00	18.52
11	组培大黄	下胚轴上部	5倍	穿刺	25.00	22.58	25.86
12	组培大黄	子 叶	10倍	穿刺	20.83	26.83	16.00
13	T ₀₉₃	下胚轴下部	20倍	穿刺	12.5	11.76	10.42
14	T ₀₉₃	下胚轴中部	15倍	穿刺	0.00	0.00	9.09
15	T ₀₉₃	下胚轴上部	10倍	浸泡	25.00	18.18	17.24
16	T ₀₉₃	子 叶	5倍	浸泡	3.33	15.00	14.89

2.2 PCR 检测结果

质粒含目的基因, 具有 PCR 扩增带, 转基因植株也有扩增带, 而非转基因植株无扩增带, 证明目的基因已被导入番茄。

3 讨论

3.1 实验所设置的四个因素中, 基因型、菌液浓度是主要因素, 外植体部位和感染方法是次要因素且转化频率差异不显著。这说明通过发根农杆菌介导对植株转化频率的影响主要与植株本身固有特性及农杆菌的浓度有关。

3.2 番茄不同基因型的转化率差异极显著, 四个品种中, 以 P₂₆ 最优。不同品种的转化频率存在差异可能与品种对发根农杆菌的敏感程度有关。

3.3 不同的菌液浓度条件下转化频率差异极显著, 在本实验设计的浓度梯度中, 以 10 倍转化诱导的效果最好。

3.4 在本实验中, 最好的组合为组合 4, 即品种为 P₂₆、外植体部位为子叶、菌液浓度为 20 倍、采用穿刺法进行感染。这与从正交实验上预测的最佳组合 (P₂₆+ 下胚轴下部+ 10 倍菌液浓度+ 穿刺法) 不相符, 故应进一步做二者的比较实验。

参考文献

[1] Williams J. G. et al., 1990, Nucleic Acids Res, 18: 6531-6535.
[2] 何玉科. 高等植物在发根农杆菌介导下的遗传转化[J]. 细胞生物学杂志, 1991, 13(3): 97-101.
[3] Gamer H. R. et al., 1993, Plant J., 3: 729-738.

树下积雪好处多

御寒防冻, 由于雪层中含有充分的空气, 是热的不良导体, 它即可防止土壤中的热量向外扩散, 又能阻止冷空气侵入下层土壤, 使土壤中的温度较为稳定, 对越冬果树有防寒保温作用。培肥地力, 空气中的氨气、硫化氢、二氧化硫和二氧化碳等对果树有利的浮游气体能被雪水吸收, 融化后渗入土中, 可提高土壤肥力, 有利于果树补充营养。蓄水抗旱, 积雪不仅可以避免地面水分蒸发, 而且随着积雪的融化, 土壤含水量明显增加, 为果树春季萌芽提供一定水分, 提高抗旱能力。冻死害虫, 融雪可吸收大量溶解热, 使土壤表层维持较长时间低温, 致使潜伏在果树残体上和土壤表层越冬的害虫冻死, 降低害虫越冬基数, 减轻危害。促进生长, 重水对植物生长有抑制作用, 而雪水中的重水含量要比普通水少 1/4, 果树下的积雪融化后可促进果树生长和发育。积雪厚度, 一般要 30 厘米以上, 宽度不小于树冠垂直投影所占面积。如果降雪量小, 可将果园或果树周围的雪收集起来堆积在果树下面, 或扫雪归园。

[4] 施骏. 农杆菌介导的病毒侵染方法在植株和病毒分子生物学基础研究中的应用[J]. 细胞生物学杂志, 1993, 15(2): 71-75.
[5] 徐香玲. 利用发根农杆菌介导二元载体向番茄导入 TM VCM T 外壳蛋白基因的初步研究[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1994, 10(6): 22-26.
[6] 董延瑜、洪业辉. 外源 DNA 导入技术在植株分子育种学上的应用研究[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(6): 513-521.
[7] 秦明波. Ri 质粒转化植株细胞的机理[J]. 生物工程进展, 1995, 15(3): 41-44.
[8] 王关林. 外源基因转基因植株中的遗传特性, 遗传, 1996, 18(6): 37-41.
[9] 李子银、胡会庆. 农杆菌介导的植株遗传转化进展[J]. 生物工程进展, 1998, 18(1): 16, 22-26.
[10] 孙乃恩、孙东旭、朱德熙. 分子遗传学[M]. 南京大学出版社, 1999, 1.
[11] 郭亚华、徐香玲、邓立平等. Ri 质粒介导 TMV 和 CMV 外壳蛋白基因转化甜椒研究[J]. 北方园艺, 2000, 4: 17-18.



第一作者简介: 黄彩红, 女, 1976 年 9 月生, 硕士研究生, 现就读于东北农业大学园艺学院蔬菜学专业, 师从于广建教授。