

根癌农杆菌介导的番茄高效遗传转化体系的研究

梁 超, 王景雪, 裴雁曦, 杨 婷

(山西大学 生命科学与技术学院, 山西 太原 030006)

摘要:以番茄无菌苗的子叶和下胚轴为外植体, 通过农杆菌介导法, 对其遗传转化条件进行了优化, 建立了高效番茄子叶和下胚轴农杆菌介导的遗传转化体系。结果表明: 在农杆菌浸染前(浸染浓度为 $OD_{600}=0.13$)进行 2 d 的预培养浸染 6 min 的外植体在 MS+ 210 mg/L 6-BA+ 0.5 mg/L IAA 的培养基上转化效率最高。PCR 检测初步证明, NPTII 基因已整合到番茄再生植株中。

关键词: 农杆菌介导法; 遗传转化; 番茄

中图分类号: S641.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)02-0071-04

Study on Transformation Efficiency by Agrobacterium-mediated in Tomato

LIANG Chao, WANG Jing-xue, PEI Yan-xi, YANG Ting

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars, Texuan-28, Taiyuan 823 were used as the materials, and cotyledon and hypocotyls were cultured to optimize the transformation system via Agrobacterium. The results showed that the highest transformation efficiency was obtained when the explants were preconditioned on preconditioning medium for 2 d prior to infect with Agrobacterium ($OD_{600}=0.13$) for 6 min growing on the culture medium of MS+ 210 mg/L 6-BA+ 0.5 mg/L IAA. It was proved that the target NPTII gene had been integrated into the genome of regenerated plants by PCR analysis.

Key words: Agrobacterium tumefaciens; Transgenic transformation; Tomato

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 是茄科番茄属植物, 属一年生或多年生草本, 营养丰富。番茄是典型的双子叶植物, 具有自花授粉、染色体图谱较清楚、较易栽培等优点, 因而是生物学研究最多的模式植物之一, 也是栽培面积最大的蔬菜作物之一^[1,2]。目前, 番茄的遗传转化主要是农杆菌介导的遗传转化, 该方法简单、快速、多为单拷贝插入以及遗传稳定性较好。早在 1986 年, Koomeel^[3]、McCormick^[4] 和 Shanin^[5] 等就开始将农杆菌转化番茄, 研究了不同的基因型、外植体生长调节因子和农杆菌浓度等因素对转化效率的影响, 但是转化率都很低, 最高也只有 6%。1993 年, Hamza 等^[6] 用农杆菌转化番茄, 将转化率提高到 10%。2003 年, Ellul P 等^[7] 用农杆菌转化番茄子叶, 转化效率达到 11.3%。2004 年, Carolina Cortina 等^[8] 优化了农杆菌转化番茄子叶的条件, 转化效率提高到 12.5%。不同番茄品种的再生体系存在一定的差异, 太原 823 和特选 28 均是山西

省品质好、产量高的番茄品种, 以此为材料建立高效的遗传转化体系, 可以为利用转基因技术进行植物生物反应器研究奠定良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 品种为太原 823 和特选 28, 种子由山西省农业科学院提供。

1.1.2 菌株和质粒 植物表达载体 pBI121(宿主菌株为根癌农杆菌 LBA4404) 由山西大学生命科学与技术学院植物基因工程实验室保存。质粒 pBI121 的物理图谱见图 1。其中 NPTII 基因为植物筛选标记基因, 赋予植物对卡那霉素的抗性。NOS P 和 NOS T 分别为胭脂碱合酶基因的启动子和转录终止序列。

1.1.3 培养基 所用的基本培养基均为 MS^[9], 每

收稿日期: 2008-12-28

基金项目: 山西省太原市科技项目(0603030)

作者简介: 梁超(1984-), 女, 山西晋城人, 在读硕士, 主要从事植物基因工程研究。

通讯作者: 王景雪(1961-), 女, 山西新绛人, 教授, 主要从事植物基因工程研究。

升MS培养基中附加30 g 蔗糖和7 g 琼脂, pH 5.8。

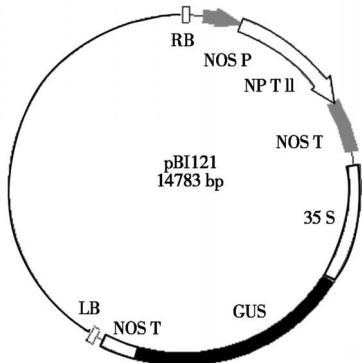


图1 植物表达载体 pBI121 的结构

Fig.1 Schematic diagram of vector pBI121

1.2 方法

1.2.1 番茄无菌苗的获得 将番茄种子先用70%的酒精处理1 min,再用0.1%的HgCl₂处理3 min,然后用无菌水冲洗5次,将消毒过的种子播种在琼脂加水的培养基上,琼脂为0.7%,pH 5.8。

1.2.2 番茄再生体系的建立 1.2.1中获得的番茄幼苗刚抽出一片真叶时,取番茄无菌苗的子叶切成0.5 cm @0.5 cm的小块,同时将无菌苗的下胚轴切成0.5~1.0 cm长的切段,分别在不同激素组合的培养基上培养(表1)。

1.2.3 抗生素敏感试验 将番茄外植体接种于筛选出来的最佳组合培养基上,同时该培养基附加不同浓度的卡那霉素(浓度分别为0,15,25,50,75,100 mg/L),观察外植体分化对卡那霉素的敏感性,统计其外植体分化率。

表1 再生芽苗诱导培养基

Tab.1 The components of induction culture media				
培养基编号 No. of culture medium	基本培养基 Basic culture medium	植物生长调节剂/(mg/L) Plant growth regulators		
		6-BA	IAA	KT
S1	MS	2	0.1	
S2	MS	2	0.5	
S3	MS	3	0.1	
S4	MS	3	0.5	
S5	MS		0.1	2
S6	MS		0.1	3
S7	MS		0.1	4

1.2.4 农杆菌介导的番茄遗传转化 无菌苗的获得同1.2.1,将番茄无菌苗的外植体放在芽分化培养基MS₀(MS+210 mg/L 6-BA+015 mg/L IAA)上预培养2 d;将预培养的外植体分别浸于制备好的菌液中3,6,10 min。处理结束后,取出外植体用无菌滤纸吸干多余菌液;之后转入MS₀培养基,26℃下黑暗共培养2 d;共培养结束后,将外植体用无菌水冲洗3次,并用无菌滤纸吸干多余的水,转入到MS₀+500 mg/L 羧苄青霉素的培养基上26℃培养5 d后,将外植体转入到培养基MS₁(MS₀+500 mg/L 羧苄青霉素+50 mg/L 卡那霉素)上诱导愈伤组织和芽的分化;每隔20 d用原培养基继代一次,待芽长到2~3 cm,将其切下在生根培养基MS₂(MS+015 mg/L IAA+50 mg/L 卡那霉素)上,待根长到2~3 cm时,将试管苗转到营养土中培养。

所有的番茄组织培养过程均在26℃,光照3 000 lx,光照时间16 h/d条件下进行。

表2 不同激素组合对番茄子叶和下胚轴不定芽诱导的影响

Tab.2 Effect of different combinations of hormones on the regeneration of tomato explants

基型 Genotype	编号 No. of media	子叶 Leaf			下胚轴 Hypocotyl		
		叶盘数 No. of leaf dish	生芽数 No. of regenerated shoots	生芽率/% Frequency of differentiated	切段数 No. of explants	生芽数 No. of regenerated shoots	生芽率/% Frequency of differentiated
特选 28 Texuan28	S1	26	8	301.8	33	11	33.3
	S2	38	33	86.8	48	40	83.3
	S3	32	17	53.1	21	13	61.9
	S4	30	19	63.3	37	22	59.5
	S5	28	8	28.6	36	7	19.4
	S6	30	6	20.0	16	3	18.8
	S7	30	6	20.0	15	3	20.0
太原 823 Taiyuan 823	S1	33	15	45.5	38	16	42.1
	S2	36	32	88.9	32	27	84.4
	S3	28	17	60.7	26	14	53.8
	S4	19	12	63.2	20	10	50.0
	S5	22	8	36.4	22	6	27.2
	S6	30	6	20.0	34	7	20.6
	S7	28	6	21.4	23	4	17.4

1.3 转化植株的 PCR 检测

抗性植株的 PCR 扩增检测: 再生植株移入温室后, 按照5分子克隆6方法提取幼嫩叶片总 DNA, 进行 PCR 扩增, 检测 NPTII 基因是否转入到再生植株。PCR 扩增的引物分别为: 引物 1: 5c- CGACCAC2 CAAGCGAAACATC- 3c; 引物 2: 5c - CGGGACTC2 TAATCATAAAAA - 3c。两引物间的片段大小为 948 bp。PCR 扩增程序为: 94 e 预变性 5 min; 94 e 变性 0.5 min; 54 e 退火 015 min; 72 e 延伸 1 min。重复 30 个循环。最后 72 e 延伸 10 min。PCR 反应体系为 25 LL, 模板 DNA 为 1 LL。扩增结束后, 取 5 LL PCR 产物用 110% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 激素对诱导生芽和生根的影响

接种 6 d 后外植体膨大, 20 d 后在同一培养基上开始出现绿色芽点, 芽点不断分化形成不定芽, 继代后形成再生植株。不定芽分化速度和分化百分率在两种激素的不同浓度组合间存在很大差异。在供试的 7 种培养基中, 所有材料的下胚轴和子叶均能形成不定芽, 但是生芽率有着很大的差异。6- BA 和 KT 虽属于同一类植物激素))) 细胞分裂素, 但表 2 的统计数据显示, 前者对芽诱导效果较后者要

好。当 6- BA 为 2 mg/L 和 IAA 为 015 mg/L 时, 诱导的不定芽率最高, 对于子叶不定芽率可以达到 85% 以上, 下胚轴相对子叶低一点, 分别达到 8313% 和 8414%。说明子叶作为外植体要比下胚轴更容易诱导出不定芽。

筛选得到的抗性芽在 MS₂(MS+ 015 mg/L IAA + 50 mg/L 卡那霉素) 培养基上就能生根, 生根率达到 90% 以上。

2.2 抗生素筛选浓度的确定

本试验所用的植物表达载体含有 NPTII 基因, 基因组整合有该基因的转化植株对卡那霉素具有抗性, 而非转基因植株因不抗卡那霉素在含卡那霉素的培养基上逐渐黄化死亡, 由此来初步筛选出转基因植株。

从表 3 可知, 卡那霉素对外植体的出愈率有很强的作用。在对照组不加卡那霉素的情况下, 子叶和下胚轴的不定芽率分别为 8615% 和 8218%; 随着卡那霉素浓度的增加, 子叶和下胚轴的不定芽分化率都有明显的下降, 当卡那霉素浓度为 50 mg/L 时, 子叶和下胚轴的不定芽率分别为 416% 和 0; 当卡那霉素浓度超过 50 mg/L 时, 子叶和下胚轴的不定芽率都为 0。随着培养时间的增长, 生长出不定芽的外植体逐渐由绿变黄, 最终死亡。

表 3 不同浓度卡那霉素对番茄特选 28 子叶和下胚轴的影响

Tab. 3 Effect of Kan on the regeneration of tomato cotyledons and hypocotyls				
卡那 霉素质量浓度/(mg/L) Concentration of Kan	子叶 Leaf		下胚轴 Hypocotyl	
	叶盘数 No. of leaf dish	不定芽率/% Frequency of regenerated shoots	切段数 No. of explants	不定芽率/% Frequency of regenerated shoots
0	50	86.5	50	82.8
15	50	64.3	50	52.3
25	50	20.0	50	12.0
50	50	4.6	50	0
75	50	0	50	0
100	50	0	50	0

2.3 农杆菌浸染时间对番茄遗传转化的影响

在农杆菌浸染外植体的过程中, 菌液浓度过大过小、浸染时间过长过短都会对转化造成不利影响。

本试验将预培养 2 d 的外植体用 OD₆₀₀ 值为 0.3 的菌液浸染不同的时间, 从表 4 可以看出, 当浸染时间为 6 min 时抗性芽的生成率最高。

表 4 农杆菌不同浸染时间对番茄遗传转化的影响

Tab. 4 Effect of different infection time on transformation of tomato explants							
菌液浓度 (OD ₆₀₀) Bacterium concentration	浸染时间 /min Inoculation time	子叶 Leaf			下胚轴 Hypocotyl		
		接种叶盘数 No. of leaf dish	抗性愈伤率/% No. of callus produced	抗性芽生成率/% Frequency of resisted shoots	接种切段数 No. of explants	抗性愈伤率/% No. of callus produced	抗性芽生成率/% Frequency of resisted shoots
0.3	3	160	32.0	8.6	352	28	9.4
	6	158	29.6	24.8	306	26	23.4
	10	150	7.0	1.4	300	9	0.9

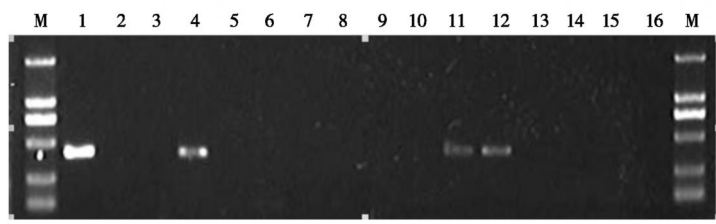
2.4 转基因番茄植株的 PCR 分析

提取抗性植株的总 DNA, 以质粒 DNA 和所提取

的 DNA 为模板进行 PCR 扩增检测。在试验的 360 个外植体中共 128 株抗性植株进行了 PCR 检测, 得

到67株阳性植株。图2是部分植株的PCR检测的电泳图,4,11,12泳道扩增出了大小约948 bp的片

段,和质粒DNA所扩增出的完全相同,而未转化的植株没有扩增出相应的条带,说明为假阳性。



M. Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 4, 11, 12. 转化植株; 其他. 未转化植株。
M. Marker; 1. Positive control; 2. Negative control; 4, 11, 12. Transformed plants; Others. Untransformed plants.

图2 转基因番茄 DNA 的 PCR 检测结果.

Fig. 2 PCR Amplification results of transgenic tomato

3 讨论

番茄遗传转化体系的优化,对于利用植物转基因技术生产植物基因工程疫苗有很重要的意义。本研究对太原两个番茄品种的遗传转化体系进行了优化,建立了一个高效的遗传转化体系。在外植体高效再生体系确立的情况下,能否获得转基因植株,转化、筛选过程中各个因素对转化率的影响非常重要^[10]。在遗传转化中,合适的卡那霉素浓度至关重要。但卡那霉素的毒性不能太高,因为卡那霉素对未转化的植株具有强毒性,会导致细胞快速死亡,死亡的或将要死亡的细胞对于临近的细胞会产生抑制作用,即使临近细胞是转化细胞也会受到某种抑制^[11,12]。在本试验中,确立的卡那霉素对子叶的筛选浓度为60 mg/L,下胚轴为50 ng/L,这可能是由于不同的外植体对卡那霉素的敏感程度不同。此外,菌液的浸染时间在转化过程中也很重要,浸染时间过短过长都会影响到转化效率,本试验得出最佳浸染时间是用OD₆₀₀为0.3的菌液浸染6 min。

参考文献:

[1] 叶志彪,李汉霞,周国林. 番茄子叶离体培养与再生植株[J]. 华中农业大学报,1994,13(3): 291- 295.
[2] Poonam B, Nanjappa A, Tissa S, et al. Tissue culture studies of tomato(*Lycopersicon esculentum*)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 78: 1- 21.
[3] KooneefM, Hanhart C, Jongsma M, et al. Breeding of a toma2 to genotype readily accessible to genetic manipulation [J].

Plant Sci, 1986, 45: 201- 208.
[4] McComick S, Niedermeyer J, Fry J, et al. Leaf disc transfo2 mation of cultivated tomato(*L. esculentum*)using *Agrobacteri2 um tumefaciens* [J]. Plant Cell Rep, 1986, 5: 81- 84.
[5] Shanin E A, Sukhapinda K, Simpson R B. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhiz2 genes*: transgenic plants with normal phenotypes harbour bina2 ry vector T- DNA, but no R_i- plasmid T- DNA [J]. Theor Appl Gen, 1986, 72: 770- 777.
[6] Hamza S, Chupeau Y. Re- evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium* - mediated transformation from tomato(*Lycopersicon esculentum*) [J]. Exp Bot, 1993, 269: 1873- 1845.
[7] Ellul P, Garcia- Sogo B, Pineda B, et al. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*- mediated transformation of tomato cotyledons(*Lycopersicon esculentum* L Mill)is geno2 type and procedure dependent [J]. Theor Appl Genet, 2003, 1 (6): 231- 238.
[8] Carolina Cortina, Francisco A. Culli Ì ez- Maci . Tomato transformation and transgenic plant production [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 76: 269- 275.
[9] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473- 497.
[10] 裴忠有,孙守钧,李玲,等. 农杆菌介导粳稻高效转化体系的研究[J]. 华北农学报,2005,20(3): 10- 13.
[11] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 第2版. 北京: 科学出版社,2002: 527- 528.
[12] 邵敏,周鹤峰,葛正龙. 农杆菌介导的 hIL- 12 基因转化马铃薯的研究[J]. 华北农学报,2008,23(3): 46- 49.