

# 农杆菌介导的番茄 Micro-Tom 遗传转化体系的建立

陈双臣, 刘爱荣, 王凤华, 王 菲, 周 洲

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** Micro-Tom 番茄植株矮小, 生长密度高, 生命周期短, 转化效率高, 成为功能基因组学研究的新模式植物。对影响 Micro-Tom 遗传转化频率的共培养时间、AS 的添加、工程菌液浓度和抑制农杆菌所用抗生素种类进行了分析, 建立了 Micro-Tom 稳定高效的遗传转化体系。以 *bar* 基因设计引物对转化群体进行 PCR 检测, 阳性率为 72.3%, 平均插入位点数为 1.8 个。遗传体系的建立为 Micro-Tom 在植物生物学研究中提供理论基础。

**关键词:** Micro-Tom 番茄; 模式植物; 根癌农杆菌; 遗传转化

**中图分类号:** S641.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)02-0112-04

## Establishment of Agrobacterium mediated Genetic Transformation System of Micro-Tom

CHEN Shuang-chen, LIU Ai-rong, WANG Feng-hua, WANG Fei, ZHOU Zhou

(Department of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** Micro-Tom is a miniature dwarf tomato, which can grow at a high density, has a short life cycle, and can be transformed efficiently. As a result, it became a new model plant for functional genomics study. Co-cultivation time on regeneration, effects of AS on the regeneration frequency, *Agrobacterium* titer and GFP expression, antibiotic concentration selection were studied to establish stable protocol. It indicated that the average T-DNA inserted sites were 1.8 and positive rates were 72.3% through PCR detection.

**Key words:** Micro-Tom; Model plant; *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation

作为重要的模式经济作物, 番茄基因组较小 (950 Mb, 编码 35 000 个基因, 大部分基因位于占整个基因组 25% 的常染色质部分), 遗传学基础雄厚, 并且具有许多拟南芥、水稻等模式植物所不具备的生物学现象 (如果实的发育、成熟过程等)<sup>[1]</sup>。番茄突变体库的建立将为具有重要农艺性状基因的克隆及具有自主知识产权的相关基因的获得奠定基础。

Micro-Tom 是一种番茄突变体, 它保留了普通番茄作为模式植物的基本特征。与普通番茄相比, Micro-Tom 更适合应用于高通量诱变, 其植株矮小的特征节省了植株培育所需的空间和管理用工, 生命周期较短的特点可加快研究进程, 易于遗传转化的优势利于 T-DNA 或 *Ac/Ds* 转座子插入突变研究的开展<sup>[2,3]</sup>。鉴此, 对 Micro-Tom 的遗传转化中的共培养时间、乙酰丁香酮 (AS) 的添加、工程菌液浓度

和抑制农杆菌所用抗生素种类对转化频率的影响进行了研究, 以期 Micro-Tom 在植物生物学研究中的应用提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

番茄受体材料为 Micro-Tom (*Lycopersicon esculentum*)。转化用农杆菌菌株为 AGL1, 所用载体质粒 pD<sub>5</sub>Bar 是以 pB<sub>in</sub>plus 为基本质粒构建 (图 1)。其中质粒含 35S 启动子、玉米 *Ds* 转座因子和抗除草剂的 *bar* 基因以及抗卡那霉素的 *npt II* 基因。所用的基本培养基均为 MS。

### 1.2 遗传转化方法

番茄种子先用 75% 的乙醇灭菌 2 min, 无菌水冲洗 3~4 次; 用 10% 的 NaClO 灭菌 12 min, 无菌水

收稿日期: 2009-10-20

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD11A10); 国家自然科学基金 (30700002); 河南省教育厅自然科学基金 (2008B210002; 2009B210004); 校基金 (2007QN008; 2007QN029); 河南科技大学大学生研究训练计划 (SRTP) 资助

作者简介: 陈双臣 (1978-), 男, 山东嘉祥人, 副教授, 博士, 主要从事蔬菜生理与生物学研究。

冲洗 3~4 次,于无菌水中在 100~120 r/min 摇床上摇至露白,然后挑取露白的种子置于 1/2MS 培养基上,光照下 26 发芽。

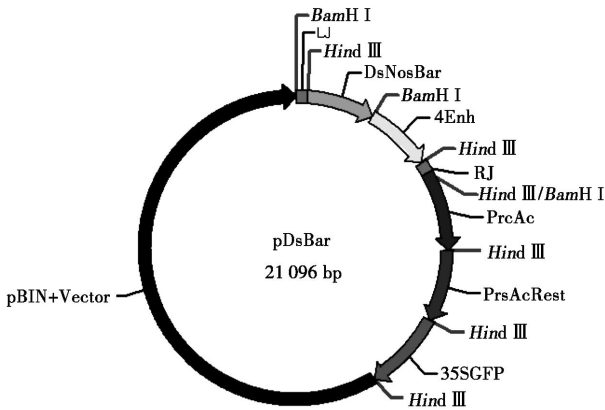


图 1 表达载体 pDsBar 的 T-DNA 区结构

Fig. 1 Schematic diagram of the T-DNA region of vector pDsBar

参照 Fillati 等<sup>[4]</sup>建立的番茄遗传再生体系,用叶盘法将载体分别导入 Micro-Tom。将无菌番茄子叶切成 0.5 cm<sup>2</sup> 的小块,正面朝下置于预培养 M<sub>1</sub> 培养基上 (MS + 2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + sucrose 15 g/L + 0.6% agar), 28 暗培养 2 d 后,将预培养的外植体浸入用 MS 液体培养基稀释的根癌农杆菌悬浮液中 10 min (浸染浓度 OD<sub>600</sub> 设 0.05, 0.1, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 共 6 个浓度;添加 AS, 设 0, 50, 100, 200 μmol/L 共 4 个浓度梯度),用无菌滤纸吸去外植体表面多余菌液,在 M<sub>1</sub> 上共培养 (设 1, 2, 3, 4 d 4 个培养时间处理)。

根据已有试验基础,设计 4 个抗生素浓度处理: A: Kan 0 mg/L + Cef 0 mg/L; B: Kan 150 mg/L + Cef 150 mg/L; C: Kan 100 mg/L + Cef 250 mg/L; D: Kan 100 mg/L + Cef 350 mg/L。外植体经共培养后,转移至筛选培养基 M<sub>2</sub> 上筛选分化芽 (MS + 2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA + Kan + Cef + sucrose 20 g/L + 0.6% agar + AS)。转化的抗性芽长至 1.5~2.0 cm 时,将芽切下放入 M<sub>3</sub> 培养基中诱导生根 (MS + IAA 2.0 mg/L + Kan 100 mg/L + Cef + sucrose 20 g/L + 0.6% agar)。将生根良好的 T<sub>0</sub> 植株移栽,遮荫保湿炼苗 3~5 d,自然光照下生长。

1.3 目的基因的 PCR 检测

取在卡那霉素抗性培养基上长势良好的植株,采用 CTAB 法提取转基因及非转基因植株的总 DNA,与含有 bar 基因的质粒 (阳性对照) 同时进行 PCR 检测。取 5 μL 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外检测仪检测。

1.4 GFP 基因的表达检测

在 Leica MPS 60 荧光显微镜下观察 T<sub>0</sub> 抗性株不同组织部位绿色荧光,检测 GFP 基因的表达情况。选用 BP355 激发滤光片,用 Leica DMRA2 自动成像系统拍照<sup>[5,6]</sup>。

2 结果与分析

2.1 共培养时间对再生频率的影响

番茄的遗传转化共培养时间大多是 2~3 d。从表 1 可知,不同共培养时间子叶再生频率差异较大。共培养 2 d 转化后再生频率最高。共培养 2 d 以后,子叶切口处便开始褐化、软腐。共培养 3 d,虽然再生频率也较高,但出芽时,幼芽长势差,可能是幼芽四周的子叶外植体软腐,造成运输养分能力差或产生有毒物质。共培养少于 2 d,时间太短,农杆菌对植物细胞不能有效转化,转化效率低。

表 1 共培养时间对子叶再生频率的影响

Tab 1 Effects of co-cultivation time on regeneration			
共培养时间 / d Time for co-cultivation	接种外 植体数 No. of explants	出芽外植体数 No. of regenerated explants	再生频率 / % Frequency of regeneration
1	152	36	23.68
2	198	157	79.29
3	189	138	73.02
4	188	21	11.17

2.2 乙酰丁香酮浓度对转化频率的影响

由表 2 可知,在重悬农杆菌的 MS 培养液和共培养培养基中添加 AS 对于 Micro-Tom 的遗传转化是必需的,其浓度对转化的影响相对较小,50 μmol/L 的 AS 即可。同时,仅在重悬培养液中添加 AS,再生频率很低。这可能是因为农杆菌对植物的转化是一个较长的过程,在此过程中某些植物需要 AS 对其进行持续活化诱导,而短时间的活化不足以引发转化发生。

2.3 工程菌液浓度对 GFP 表达的影响

由表 3 可以看出,随菌液浓度的增加,GFP 表达强度增加,但 OD<sub>600</sub> 为 0.5~0.6 时,外植体的生长状况得到改善,伤口多处膨胀,部分外植体有不定芽分化,GFP 为阳性的不定芽百分比最高,当 OD<sub>600</sub> 大于 0.8 时,在筛选培养基中,外植体褐化严重,没有不定芽的分化,而且高浓度的菌液浸泡过的外植体在共培养阶段,多数叶片由于农杆菌在其四周过度增殖,而深受毒害,致使褐化死亡,转化失败,加大 Cef 的浓度可以控制农杆菌的增殖,但抑制了叶片不定芽的分化。当菌液的 OD<sub>600</sub> 值在 0.05 时,GFP 表达量及转化率均最低。农杆菌 OD<sub>600</sub> 为 0.5,侵染时间为 15 min 适宜于 Micro-Tom 子叶转化。

表 2 乙酰丁香酮浓度对转化频率的影响

Tah 2 The effects of AS concentration on the regeneration frequency

AS浓度 / (μmol/L) AS concentration		接种外植体数 No of inoculated explants	出芽外植体数 No of regenerated explants	再生频率 / % Frequency of regeneration
重悬培养 Suspension culture	共培养 Inoculation			
200	200	189	47	24.87
100	100	170	126	74.12
50	50	156	119	76.28
200	0	159	29	18.24
100	0	162	45	27.78
50	0	143	37	25.87
0	0	147	10	6.80

表 3 农杆菌菌液浓度对 GFP表达的影响

Tah 3 Effect of Agrobacterium titer and GFP expression using cotyledon explants

OD <sub>600</sub>	菌液浓度 / (cfu/mL) Bacterium concentration	GFP表达强度 Level of transient GFP expression	GFP <sup>+</sup> 百分比 Percent of GFP positive explants
0.05	1 × 10 <sup>6</sup>	1	5
0.1	1 × 10 <sup>7</sup>	2	15
0.5	3 × 10 <sup>8</sup>	4	20
0.6	5 × 10 <sup>8</sup>	4	20
0.8	3 × 10 <sup>9</sup>	5	10
1.0	5 × 10 <sup>10</sup>	6	0

2.4 不同抗生素浓度对比对番茄叶盘生长的影响

从表 4 可以看出,不含抗生素的培养基中,番茄叶盘因为没有受到抗生素的胁迫能够正常分化,长出愈伤组织。在 4 种不同抗生素浓度下叶盘的生长受到不同程度的抑制,随着抗生素浓度的增加叶盘白化死亡率呈上升的趋势,D 处理死亡率最高,只有 32.3% 的叶盘能形成愈伤组织。根据不影响叶盘正常生长又能达到筛选效果为原则,选择 Kan 100 mg/L + Cef 350 mg/L 作为最佳浓度组合。

表 4 不同抗生素浓度对比对番茄叶盘生长的影响

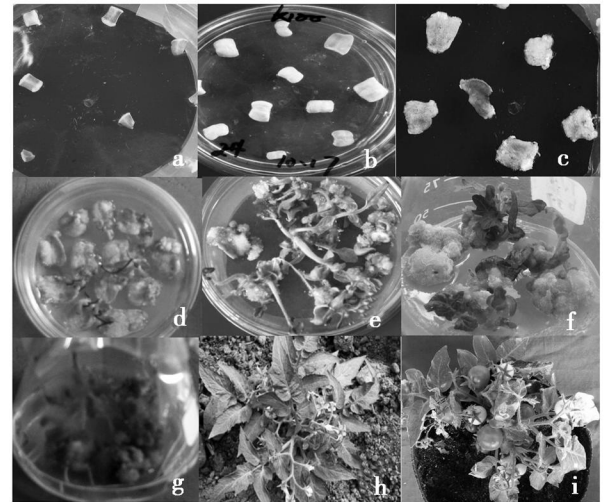
Tah 4 Antibiotic concentration selection in transgenic plants

叶盘生长 Leaf explants growth	抗生素浓度配比 Antibiotic concentration composition			
	A	B	C	D
叶盘总数 No of leaf explants	46	50	41	62
白化死亡叶盘数 No of death leaf explants	0	6	8	18
出愈伤总数 Regenerated callus	43	38	30	20
抗性愈伤率 Resistant callus rate	0.930	0.760	0.732	0.323
白化死亡率 Rate of albino and death	0	0.120	0.195	0.290

2.5 转基因植株的获得

将生根的 T<sub>0</sub> 小植株直接移入营养钵中(草炭蛭石 = 3 : 1),遮荫保湿炼苗 3 ~ 5 d,在温室自然光照下生长。图 3 显示了 Micro-Tom 遗传转化过程中的分化、生根和移栽的全过程。与传统转化方法相

比,本试验所建立的转化体系效率明显提高(表 5)。



a 预培养; b - d 子叶在筛选培养基上分化出芽; e, f 继代培养; g 在筛选生根培养基上生根; h, i 正常开花、结果。

a Preculture; b - d Differentiation of tomato cotyledons on selection medium; e, f Transferred culture; g Rooting stage on selective medium; h, i Normally flowering and fruiting of transgenic plants in field

图 2 Micro-Tom 遗传转化的不同生长阶段

Fig 2 Different development stages of transgenic Micro-Tom

表 5 所建立转化体系与传统转化方法效率比较

Tah 5 Comparison of transformation frequency of Micro-Tom versus previous standard protocol %

不同时期 Different stages	传统转化效率 Standard protocol frequency	Micro-Tom 转化效率 Micro-Tom protocol frequency
共培养期 Co-cultivation stage	24.4	88.0
抗性芽分化期 Differentiation period	44.6	89.3
生根期 Rooting stage	13.2	29.3
转化效率 Transformation frequency	11.0	56.7

2.6 目的基因的 PCR 检测

为证明目的基因已整合到番茄基因组中,以 T<sub>0</sub> 转基因植株的总 DNA 为模板,根据 bar 基因设计引物进行 PCR 检测。结果表明:转基因植株均扩增出

与阳性对照相同的 560 bp 目的片段 (图 3), 而未转化植株未扩增出任何条带, 初步确定目的基因已整合到番茄基因组中, 阳性率为 72.3%, 平均插入位点数为 1.8 个。

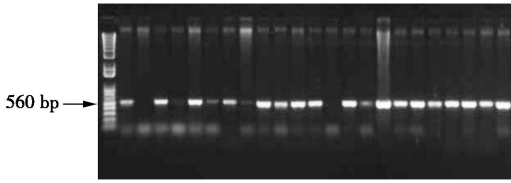


图 3 T<sub>0</sub> 转基因植株的 PCR 检测

Fig 3 Detection of target gene in T<sub>0</sub> transgenic cucumber by PCR

### 3 讨论

自 Yoder 等<sup>[7]</sup>利用农杆菌介导将 *Ac/Ds* 标签转化番茄以来, 利用转座子标签应用于番茄已有诸多报道, 本试验对 Micro-Tom 的转化体系进行了优化, 将含有 *Ac/Ds* 的基因转入 Micro-Tom, 转化效率较高, 初步构建了一定规模的番茄转座子标签插入群体。

在农杆菌选择方面, 选择了琥珀碱型改良超毒力菌株 AGL1, AGL1 转化效率明显高于菌株 LBA4404 和 EHA105<sup>[8]</sup>。农杆菌种类不同, 对 T-DNA 的插入拷贝数也有一定的影响。

在转化体系的优化方面, 影响受体材料转化效率的因素主要有培养基成分、菌株和载体的类型、选择标记的种类和浓度、共培养条件、菌液浓度、AS 的添加、外植体种类、激素种类与浓度、抗生素浓度<sup>[9]</sup>等, 本研究选取共培养条件、菌液浓度、AS 的添加、抗生素浓度 4 个因素进行了分析。

在 T-DNA 由农杆菌向植物细胞的转移过程中, 一系列 *vir* 基因的活化至关重要<sup>[10]</sup>。许多环境因素参与 *vir* 基因的活化, 包括低 pH 值、低温、高渗透压和一些酚类化合物如乙酰丁香酮等。研究表明, 农杆菌的侵染在 19~22 最为活跃, 温度升高至 29 以上后, 侵染便不会发生<sup>[11]</sup>, 因此本试验中共培养温度从普通的 28 降低到了 20 左右, 以有利于农杆菌的有效侵染。稍高的菌液 pH 值不利于 T-DNA 的转移, 但 Turk 等<sup>[12]</sup>研究发现胭脂碱型农杆菌 *vir* 基因在 pH 5.8 时有最高的诱导活性。本试验中菌液的 pH 值为 5.6。

选择培养基的培养时间和继代培养的时机对抗性愈伤组织的产生有明显的影 响。最佳的选择继代时间是 10~15 d。原因可能是继代培养可以减少老的愈伤组织对新生的抗性愈伤组织的影响, 保持愈伤组织的活力, 同时也有利于摒除在共培养的愈伤

组织内部微量生长的农杆菌的污染<sup>[13]</sup>。抗性愈伤组织的继代培养对其分化率也具有很明显的影响, 抗性愈伤组织在选择培养基上培养 8 d 时, 分化率最高, 达到 85%。

在转化过程中, 对强光与弱光下 Micro-Tom 的分化效率也进行了研究。结果表明: Micro-Tom 在弱光下愈伤分化率要好, 而同时所转化的栽培种 M82, 在较强的光照环境下分化较好, 这可能与其生长习性有关, 具体光照强度及机理还有待进一步探讨。

### 参考文献:

- [1] Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, *et al* Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 1441 - 1456
- [2] Yano K, Watanabe M, Yamamoto N, *et al* M BASE: A database of a miniature tomato cultivar Micro-Tom [J]. *Plant Biotechnology*, 2006, 23: 195 - 198
- [3] 刘小花, 张岚岚, 朱长青, 等. Micro-Tom 番茄矮化微型机制及其在植物功能基因组研究中的应用 [J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1 - 11.
- [4] Fillati J J, Kiser J, Rose R, *et al* Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector [J]. *Nature Biotechnology*, 1987, 5: 726 - 730.
- [5] Held M A, Boulaflos A, Brandizzi F. Advances in fluorescent protein-based imaging for the analysis of plant endomembranes [J]. *Plant Physiology*, 2008, 147: 1469 - 1481.
- [6] Cho M J, Choi H W, Jiang W, *et al* Endosperm-specific expression of green fluorescent protein driven by the hordein promoter is stably inherited in transgenic barley (*Hordeum vulgare*) plants [J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115(1): 144 - 154.
- [7] Yoder J I, Palys J, Alpert K, *et al* Ac transposition in transgenic tomato plants [J]. *Mol Gen Genet*, 1988, 213: 291 - 296.
- [8] Ouyang B, Li H X, Ye Z B. Increased resistance to *Fusarium* wilt in transgenic tomato expressing bivalent hydrolytic enzymes [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, 29(3): 179 - 184.
- [9] Hiei Y, Komari T, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 205 - 218.
- [10] Zupan J, Muth T R, Draper O, *et al* The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights [J]. *Plant J*, 2000, 23(1): 11 - 28.
- [11] Fullner K J, Nester E W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(6): 1498 - 1504.
- [12] Turk S C H J, Melchers L S, den Dulk-Ras H, *et al* Environmental conditions differentially affect *vir* gene induction in different *Agrobacterium* strains role of the VirA sensor protein [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16: 1051 - 1059.
- [13] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.