

根癌农杆菌介导番茄‘白果强丰’遗传转化体系优化

李立芹^{1,2}

¹四川农业大学农学院,四川雅安 625014;

²中国农业大学生物生理学与生物化学国家重点实验室,北京 100193)

摘要:以番茄无菌苗的子叶为外植体,通过农杆菌介导法对其遗传转化体系进行了优化,结果表明:外植体在MS+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA的进行2天的预培养后,用农杆菌EHA105(浸染浓度为OD₆₀₀=0.6)浸染6 min,转化效率最高,经过PCR检测初步证明NPTII基因已整合到番茄再生植株中,本研究建立了高效番茄‘白果强丰’子叶农杆菌介导的遗传转化体系。

关键词:根癌农杆菌;番茄;遗传转化

中图分类号:Q812

文献标志码:A

论文编号:2010-3235

Study on Transformation Optimization by *Agrobacterium tumefaciens* Mediated in Tomato

Li Liqin^{1,2}

¹Agronomy Department of Si chuan Agricultural University, Ya'an Sichuan 625014;

²China Agricultural University State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Beijing 100094)

Abstract: Tomato cultivars were used as the materials, and cotyledon was cultured to optimize the transformation system via *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that the highest transformation efficiency was obtained when the explants were preconditioned on preconditioning medium for 2 days prior to infect with *Agrobacterium tumefaciens* (OD₆₀₀=0.6) for 6 min growing on the culture medium of MS+2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA. It was proved that the target NPTII gene had been integrated into the genome of regenerated plants by PCR analysis. This study established a high efficient genetic transformation system of tomato cotyledons by *Agrobacterium tumefaciens* mediated.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; tomato; transgenic transformation

0 引言

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill) 属茄科番茄属植物,因其果实营养丰富,加工方便,已成为世界范围内栽培最为普遍的果菜之一^[1]。近年来随植物转基因技术影响的日益扩大,番茄因其具有自花授粉、染色体图谱较清楚、较易栽培等优点,已成为基因工程领域重要的模式植物之一^[2-3]。

农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌,它能在自然条件下感染大多数双子叶植物的受伤部位,并诱导产生冠瘿瘤或发状根。农杆菌侵染植物伤口进入细胞后,可将T-DNA插入到植物基因组中^[4]。

利用这一特性可将目的基因插入到T-DNA区,经过农杆菌介导整合于基因组中。然后通过组织培养技术,获得转基因植株。利用转基因技术,已在番茄育种中获得了抗虫、抗冻、抗除草剂、延长储存期、改善果色等的转基因番茄^[5]。研究表明,基因型是影响番茄高效再生体系建立的一个重要因素,在相同的培育条件下,不同的番茄品种间存在着截然不同的分化率^[6]。因此对于不同基因型番茄、不同操作方法转化效率会有很大差异。本文利用农杆菌介导的遗传转化方法将PBI121载体向番茄白果强丰进行转化,研究了农杆菌种类及农杆菌侵染浓度和时间对番茄转化效率的影响。

基金项目:植物生理学与生物化学国家重点实验室开放课题“番茄钾营养效率的分子改良”(SKLPPBKF09011)。

作者简介:李立芹,女,1974年出生,山东省东阿县人,讲师,博士,研究方向为植物基因工程。通信地址:625014 四川省雅安市四川农业大学农学院, E-mail: liliqin@sicau.edu.cn。

收稿日期:2010-11-10, **修回日期:**2010-12-26。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌种和质粒

供试番茄为‘白果强丰’品种,种子购于中国农业大学博通农艺科技中心。根癌农杆菌菌株LBA4404、EHA105和植物双元表达载体pBI121,由四川农业大学农学院生物技术系保存。卡那霉素为Sigma公司进口分装产品,ExTaqDNA聚合酶购于大连宝生物工程。*npt II*基因的引物:上游引物5'-GCT ATG ACT GGG CAC AAC AG-3',下游引物5'-ATA CCG TAA AGC ACG AGG AA-3',引物在上海Invitrogen生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 番茄遗传转化过程

番茄种子用蒸馏水浸泡24 h后,用20%次氯酸钠溶液进行消毒20 min,无菌水冲洗5次,并用无菌吸水纸略微吸干,按25粒/瓶播于MS+蔗糖30 g/L+琼脂8 g/L(pH值5.8)的培养基上。放入恒温电热培养箱25℃暗培养萌发,出芽后放入25℃光照培养箱,培养条件为光照强度1600 lx,光周期16 h(光)/8 h条件下进行培养7天。待无菌苗的2片子叶完全展开后,剪成约5 mm×5 mm的小块,在含有2 mg/L 6-BA和0.2 mg/L IAA的MS培养基预培养2天后,在准备好的农杆菌菌液中浸泡。侵染好的外植体置于含有2 mg/L 6-BA和0.2 mg/L IAA的MS培养基中暗培养2天。共培养后,培养基中添加50 mg/L卡那霉素和500 mg/L羧苄青霉素进行筛选,诱导抗性愈伤组织的产生,培养条件同上,每2周继代1次。当愈伤组织上的抗性芽生长到2 cm后,将去除愈伤组织的芽移到生根培养基(MS+50 mg/L卡那霉素+500 mg/L羧苄青霉素)中,7天左右生根,待小苗长至6 cm左右,将培养瓶的瓶口打开,加水少许炼苗3天后取出,洗去根部培养基残渣,将幼苗移栽至经高温灭菌的营养土中,盖塑料薄膜保湿,在25~27℃条件下光照培养。待小苗有新叶长出时,可去掉塑料薄膜。获得再生植株。

1.3 不同农杆菌对番茄的侵染

取番茄生长7天的无菌苗子叶,预培养2天后分别用农杆菌LBA4404和EHA105菌液稀释至OD_{0.6}侵染5 min,然后避光共培养2天后,转入选择培养基中。培养20天后,观察外植体上愈伤组织生成情况。

1.4 农杆菌侵染时间的比较

挑取农杆菌EHA105单菌落,于28℃在YEB培养基中培养饱和过夜,然后按照1:100进行转接,培养至合适的OD值后,在6000 rpm条件下离心5 min,收集菌体。用灭菌MS液体培养基重悬菌体,使其在600 nm波长下的光密度值为0.6。用此菌液侵染番茄子叶外

植体,侵染时间分别为2、4、6、8和10 min,然后用两层高压灭菌滤纸吸干多余菌液,外植体转入选择培养基中进行培养,20天后观察愈伤组织生成情况。

1.5 农杆菌侵染浓度的比较

培养至饱和的农杆菌按照1:100进行转接,培养至所需的OD值,即OD_{0.2}, OD_{0.4}, OD_{0.6}, OD_{0.8}和OD₁后,取已预培养2天的无菌苗子叶和农杆菌共侵染6 min,然后避光共培养2天,再转入选择培养基中。培养20天后,观察外植体上愈伤组织生成情况。

1.6 *npt II*基因导入番茄的分子检测

采用CIAB法分别提取再生抗性植株和正常植株叶片总DNA,以此为模板进行PCR检测。PCR反应体系以1 μL DNA为模板,加入10×ExTaq缓冲液2 μL(含Mg²⁺),两个引物各1 μL(10 μmol/L),40 mmol/L dNTP 0.5 μL, ExTaq DNA聚合酶0.1 μL(5 U/μL),加水至20 μL。PCR反应条件为94℃预变性5 min;94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环;最后72℃延伸10 min。

2 结果与分析

2.1 不同种类农杆菌侵染番茄外植体效果比较

分别用农杆菌LBA4404和EHA105侵染番茄子叶,培养20天后,统计外植体愈伤组织的生长情况,结果表明,2种农杆菌菌株侵染效率差别很大。菌株EHA105侵染后愈伤组织分化率可达70.3%,而菌株LBA4404侵染后愈伤组织分化率只有30.2%,所以菌株EHA105比LBA4404更适于番茄的侵染转化。

2.2 农杆菌侵染不同时间比较

表1结果显示,菌株EHA105在不同侵染时间条件下,外植体分化率明显不同。在侵染2 min和4 min后外植体分化率分别为40%和48%。在侵染6 min后外植体分化率最高,达到60%。侵染8 min和10 min后外植体分化率分别为56%和54%,同时侵染8 min和10 min有一些农杆菌污染,因此为了获得较高愈伤生成率,减少污染,6 min的侵染时间最适合。

2.3 农杆菌侵染浓度的比较

表2结果显示,在侵染时间6 min不变情况下,农

表1 农杆菌侵染不同时间对番茄分化率的影响

	侵染时间/min				
	2	4	6	8	10
外植体数/个	50	50	50	50	50
分化数/个	20d	24c	30a	28b	27b
分化率/%	40d	48c	60a	56b	54b

注:采用DPS极差统计方法进行分析,显著水平 $P \leq 0.05$ 。表2同。

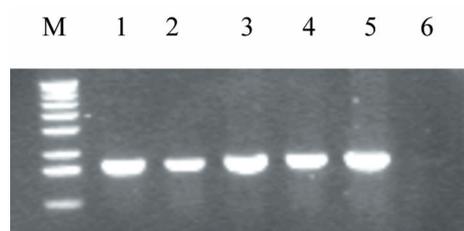
杆菌EHA105不同侵染浓度对外植体分化率存在明显差异。在OD0.2和OD0.4侵染后外植体分化率分别为40%和46%。在OD0.6侵染后外植体分化率最高,达到64%。在OD0.8和OD1侵染后外植体分化率分别为54%和48%,同时随着侵染浓度加大,在后续操作中农杆菌不容易洗掉,出现污染现象。因此为了获得较高愈伤生成率,本研究认为OD0.6的侵染浓度比较适合。

表2 不同浓度农杆菌侵染对番茄分化率的影响

	侵染浓度OD				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1
外植体数/个	50	50	50	50	50
分化数/个	20d	23c	30a	27b	24c
分化率/%	40d	46c	60a	54b	48c

2.4 *nptII* 基因导入番茄的分子检测

本研究共得到再生植株30株,图1为部分再生植株的PCR检测结果。图1上1—4泳道为再生植株的PCR结果,能够看到*nptII*基因扩增条带,5泳道为阳性对照,模板是载体pBI121质粒。PCR扩增条带大小与前四泳道一样。6泳道为阴性对照即未转基因植株的PCR结果没有扩出条带,因此可以初步判断获得的再生植物为转基因植株。



M. DNA分子质量标准; 1—4.再生植株;
5.阳性对照; 6.未转基因阴性对照

图1 再生植株PCR检测结果

3 结论与讨论

番茄遗传转化体系的优化,对于转基因植株获得具有重要的意义。其中转化效率主要受到各种因素例如菌株和双元载体的类型、共培养条件、菌液浓度、外植体种类等影响^[7]。番茄子叶因其再生能力较强,因此常常作为番茄高效植株再生体系建立和遗传转化的外植体^[8-9]。Velcheva等认为生长7天的子叶在转化后能获得较多的抗性芽^[10],本实验表明,7天苗龄的子叶转化后能获得较高的转化率。原因可能是此时子叶比较幼嫩,在外源激素的影响下容易进入脱分化状态,进而分化成植株。在番茄遗传转化过程中,由于农杆菌

菌株类型不同导致其侵染能力表现出很大差异。目前常用的农杆菌菌株有LBA4404和EHA105等^[11],在本试验对番茄的侵染中,EHA105侵染效率明显高于LBA4404,可能是EHA105是超毒力(hypervirulent)菌株,这一结果与王关林的观点一致^[12]。此外农杆菌的侵染时间和浓度对遗传转化率的影响非常重要,菌液浓度过高易导致外植体切口处褐化,影响再生能力。如果外植体在菌液中浸泡时间过长,会受到农杆菌毒害而逐渐死亡。而浸泡时间过短会导致转化效率过低甚至没有转化。研究表明番茄遗传转化所用农杆菌菌液浓度多为OD值=0.2~0.6^[13],关于农杆菌侵染时间,有的采用5 min^[14],有的10 min^[15],15 min^[2]。甚至有20 min^[16]。这可能是由于不同试验所用番茄基因型和外植体的种类不同造成的。通常情况下对获得的抗性植株鉴定采用PCR方法,主要是该方法具有灵敏快捷等优点,但是在实验的过程中发现有假阳性的情况,可能所检测的植株中含有农杆菌,所以下一步实验可采用Southern杂交方法进一步确认阳性植株。在本试验中,所使用的番茄品种是白果强丰,外植体类型是生长7天的无菌苗子叶,得出最佳转化体系是利用农杆菌菌株EHA105侵染浓度(OD0.6)侵染时间6 min,为今后优良基因导入该品种奠定了坚实基础。

参考文献

- [1] 卫志明,许智宏.番茄叶片组织培养中植株再生的初步研究[J].植物生理学通讯,1979,(1):10-17.
- [2] 叶志彪,李汉霞,周国林.番茄子叶离体培养与再生植株[J].华中农业大学学报,1994,13(3):291-295.
- [3] 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.
- [4] 曹慧颖,夏润玺,吕淑霞,等.提高农杆菌介导番茄遗传转化效率的研究[J].北方园艺,2008(1):178-180.
- [5] 高蓝,傅建熙,王建华.转基因番茄研究进展[J].西北农业大学学报,2000,28(3):90-93.
- [6] 于惠敏,石竹,杨俊杰.番茄的不同基因型对组培植株再生能力的影响[J].山东师范大学学报,2007,22(4): 120-121,130.
- [7] Hiei Y, Komari T, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Mol Biol, 1997,35:205-218.
- [8] 贾芝琪,崔艳红,李颖,等.马铃薯抗晚疫病基因R3a、R1和RB在番茄中的表达[J].园艺学报.2009,36(8):1153-1160.
- [9] 李伟明,王双双,姚玉新,等.由春香13苹果MdFT基因对番茄的遗传转化[J].园艺学报,2009,36(9):1255-1260.
- [10] Velcheva M, Faltin Z, Flaishman M, et al. A liquid culture system for *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill) [J]. Plant Science, 2005,168: 121-130.

-
- [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,2008,1:10-13.
- [12] 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,2002:498-500.
- [13] Ashby A M, Watson M D, Loake G J, et al. Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from mono-cotyledonous and dicotyledonous plants[J]. *Journal of Bacteriology*,1988,170(9):4181-4187.
- [14] Jia G, Zhu Z Chang F Q, et al. Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improves salt tolerance[J].*Plant Cell Repots*, 2002,21(2):141-146.
- [15] Koe 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 Phrsiology*,2007,54(1):89-96.
- [16] 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].*Science Hortieuhurae*,2007,112(2):172-175.