

番茄外源基因转化系统的研究

申琳^①

(北京市农业技术推广站)

生吉萍 罗云波^①

(食品学院)

摘要 本文结合反义 ACC 基因向番茄中的导入,就番茄外源基因转化系统建立中的几个问题做了研究。结果表明,转基因番茄的组织培养比普通番茄更复杂和困难,需要对其培养基的激素配比做系统研究,以选择更适合的培养基;抗生素的使用要掌握好剂量,在番茄的子叶上以 50 mg/L 为宜;叶盘法转化番茄子叶时采用的菌液浓度及处理时间对转化也有很大的影响,以农杆菌过夜培养液用 MS 液体培养基稀释 10 倍、浸泡时间为 5 min 为宜;转基因植株的鉴定可以从分子杂交及性状检测多方面进行,以保证鉴定结果的准确性。

关键词 番茄; 外源基因; 转化; 激素; 抗生素

中图分类号 S513

Tomato Transgenic System with Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*

Shen Lin

(Beijing Agricultural Technology Extension Centre)

Sheng Jiping Luo Yunbo

(College of Food Sci.)

Abstract Tomato transgenic system was studied with transfer of Antisense ACCase gene by Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that the plant regulators played more important role in tissue culture of transgenic plant than than of normal plant. It was found that Zeatin (1.0 mg/L) and IAA(0.5 mg/L) had great effects on the formation of callus and shooting. The suitable content of kanamycin was 50 mg/L for selecting transgenic tissue. The content of *Agrobacterium tumefaciens* for dipping leaf discs was dilution 10 times with MS liquid medium. Southern blot, RNA blot and morphological properties of plant were detected to identify the transgenic plant.

Key words tomato; extragene; transfer; plant-regulator; kanamycin

自从 1978 年 Marton 等人应用农杆菌 Ti 质粒为载体第一次成功地将外源基因转入烟草后^[1],以 Ti 质粒为载体的转化系统研究取得了很大的成绩,“叶盘法”技术的发明^[2],使植物受体范围扩大到可以用整块的植物组织,并简化了实验步骤,提高了工作效率。番茄是典型的双子叶植物,具有自花授粉、染色体图谱较清楚等优点,番茄外源基因转化系统的建立对于研究水果蔬菜成熟衰老机制具有十分重要的意义。为此,我们结合乙烯缺陷型番茄的

收稿日期: 1997-03-11

①申琳,北京市农业技术推广站,100101

培育^[3],建立了以农杆菌 Ti 质粒为载体的番茄外源基因转化系统。在系统的建立过程中有许多关键环节需要细心把握,本文就转化系统建立中应注意的几个问题做一探讨。

1 材料和方法

“丽春”番茄种子消毒后暗培养 3~5 d,点播于 1/2MS 培养基上,经 7~10 d 后获得无菌苗^[3]。含有外源基因的 Ti 质粒转入农杆菌,在含卡那霉素 50 mg/L 的 LB 培养基里培育农杆菌 24 h,最终使菌液 $OD_{600}=0.8\sim 1.0$ 。

对番茄子叶用三种培养基^[4,~6]进行培养,观察分化情况,选择较好的生芽培养基,培养温度为 $(26\pm 1)^\circ\text{C}$,光照时间 16 h,光照强度 2 500 lx。

在生芽培养基中添加不同浓度的卡那霉素 0,10,20,30,40,50,60 mg/L,观察番茄子叶对卡那霉素的抗性表现。

植物 DNA 的提取、Southern 杂交、RNA 杂交参照《分子克隆实验指导》^[7]。

叶片和果实的乙烯用 SQ-204 气相色谱仪进行测定。色谱条件:FID 检测器,温度为 110°C ;GDZ-503 填充柱,柱温 90°C ;载气为氮气,助燃气为空气。外标法测定,3 次重复。

2 结果与分析

2.3 转基因番茄组织培养中的激素选择

将 7 d 龄的番茄子叶接种到添加不同种类和浓度的培养基上培养,观察愈伤组织和芽的分化情况。

由表 1 可见 ZT 与 IAA 的组合比 BA 与 IAA 的组合促进生芽的效果好,而 BA 与 NAA 的组合与后者相当。第一种组合发芽率达到 80.8%,较高的发芽效率为提高外源基因的转化率打下基础。因此采用此培养基为生芽培养基。根的分化以采用 MS 培养基添加 IAA 0.05~0.1 mg/L 的效果好。

表 1 不同激素种类及浓度对番茄叶盘分化的影响

培养基种类	培养的叶盘数	形成愈伤组织的外植体数	生芽外植体数	生芽百分率/%
MS+IAA _{0.5} +ZT _{1.0}	120	108	97	
MS+IAA _{1.5} +BA _{0.5}	120	76	63	50.2
MS+BA _{1.0} +NAA _{2.0}	120	68	59	49.1

2.2 抗生素浓度选择

为确保再生植株为转基因植株,在组织培养时添加抗生素或用其他方法将转化和未转化的组织区分开来,而卡那霉素是常用的一种。为了弄清番茄子叶对卡那霉素的抗性,将未转化的子叶接种到添加了不同浓度卡那霉素的培养基上(见表 2)。结果表明,不同浓度的卡那霉素对番茄子叶叶盘分化有不同的抑制作用,随卡那霉素浓度的增加,愈伤组织分化率逐

渐下降。培养 2 周后,卡那霉素为 40 mg/L 的培养基上分化率只有 7.5%,卡那霉素为 50 mg/L 的培养基上叶盘萎缩变黄,已不再分化,所以选择 50 mg/L 的卡那霉素浓度作为选择未转化叶盘已是足够的,这与文献中^[8]提到的浓度相符。

表 2 不同卡那霉素浓度对番茄子叶叶盘芽分化的影响

卡那霉素浓度(mg/L)	培养叶盘个数	愈伤组织个数	分化率(%)
20	40	28	70.0
30	40	10	25.0
40	40	3	7.5
50	40	0	0.0
60	40	0	0.0

2.3 转化菌液浓度的选择

由表 3 可见,使用不同的农杆菌菌液处理叶盘,对叶盘的分化有不同的影响。LB 培养基作稀释液浸泡叶盘,可使外植体愈伤能力增强,但进一步分化成芽的能力降低,并且芽的生长势表现较弱。这可能是由于 LB 培养基的存在使农杆菌继续生长,增大了感染机会,使叶盘中被转化的细胞增多,而使愈伤组织个数增加,但过多的感染降低了芽的生长势,对进一步分化不利。MS 液体培养基作为稀释菌液,愈伤能力相对不高,但一旦生出芽体,芽的生长健旺,且进一步形成根的能力较强。因此,我们选择农杆菌过夜培养液($OD_{600}=0.8\sim 1.0$)用 MS 液体培养基稀释 10 倍为宜,浸泡外植体的时间为 5 min。

表 3 不同农杆菌菌液浓度及处理时间对转化叶盘分化的影响

处 理	2 周后生长情况	4 周后生长情况
MS 液体培养基稀释 10 倍 浸 5min	80 个叶盘有 49 个形成愈伤组织	32 个叶盘分化发芽且生长势强
MS 液体培养基稀释 20 倍 浸 10min	80 个叶盘有 31 个形成愈伤组织	11 个叶盘分化发芽且生长势强
LB 液体培养基稀释 10 倍 浸 5min	80 个叶盘有 68 个形成愈伤组织	41 个叶盘分化发芽且生长势弱
LB 液体培养基稀释 20 倍 浸 10min	80 个叶盘有 53 个形成愈伤组织	29 个叶盘分化发芽且生长势较弱

2.4 转化系统中多因素最优组合对转化效果的影响

取农杆菌过夜培养液用 MS 液体培养基稀释 10 倍,浸泡 7 d 龄的番茄子叶 5 min,吸干菌液,叶背向下放在 MS 固体培养基上暗培养 2 d 后,放在含有 50 mg/L 卡那霉素的 MS+IAA 0.5 mg/L+ZT 1.0 mg/L 上培养。

可见,本转化系统中叶盘生芽的百分率为 46.4%,在生根培养基上发芽成完整植株的

频率为 5.3%。

表 4 激素、抗生素及菌液浓度对转化效果的影响

处理叶片数	形式愈伤组织 叶盘数	生芽叶盘个数	百分率	生根叶盘数	百分率
120	106	56	46.7	6	5.0
120	101	53	44.2	8	6.7
120	108	58	48.3	5	4.2

2.5 转化体的鉴定

2.5.1 Southern 杂交 将植物的总 DNA 用限制性内切酶消化、琼脂糖电泳之后,原位转移到硝酸纤维素滤膜上,再用目的基因制成的探针进行杂交,在与探针有同源序列的部位能被杂交上,X 光片上有黑色杂交带出现,而未转化的番茄叶片 DNA 无杂交带出现,如图 1-b。Southern 杂交的阳性结果说明外源基因已经整合到番茄的染色体组上。

2.5.2 RNA 杂交 转化植株 RNA 提取以后,点于硝酸纤维素膜上,与特异性探针杂交,若有同源 RNA 存在,则形成 RNA·DNA 杂交链,在杂交过程中不能被洗去,X 光片上出现黑点,显示阳性反应,如图 1-a。RNA 杂交的阳性反应说明已经转入的外源基因已经顺利转录,合成了与外源基因配对的新的 RNA。

2.5.3 性状检测 为进一步检测外源基因是否已经表达,可以从转基因植株的表现性状上检测出来。本试验转化的是反义 ACC 合成酶基因,可以通过检测转基因番茄果实和转基因植株叶片的乙烯产量来确定外源基因的转化是否成功。表 4 显示了叶片和果实的乙烯释放量,可以判断外源基因的转化是成功的。

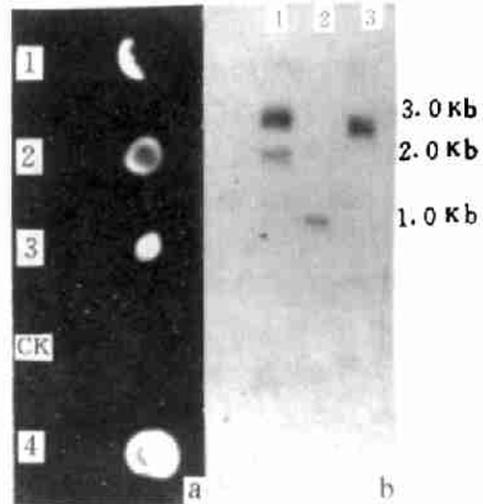


图 1 转基因材料的鉴定

a. RNA 点杂交结果 b. Southern Blot 结果
1,2,3 为转化材料 RNA(a)或 DNA(b)
CK 为普通番茄(未转化材料)RNA
4 为阳性对照

3 讨论

①转基因植物的组织培养同正常植物(非转基因植物)的组织培养相比有它自己的特点。一是,外植体的取材要求严格。转基因植物的材料要求更新鲜、分化能力更强,研究表明,用农杆菌的 Ti 质粒感染时,利用无菌苗的子叶和下胚轴作转化材料其转化率比用叶片好得

多^[3]。

二是培养基成分比较复杂。转基因植物的培养大多利用添加抗生素来选择转化的和非转化的细胞,并且为了抑制农杆菌和其它杂菌的生长添加一定量的抗生素,而抗生素不耐热,所以在配置培养基时应多加小心。

三是转基因植株生长缓慢、分化率低。转化植物细胞存在一个外源基因插入其染色体的过程,使其分化启动时间比正常植物组培细胞发育的启动时间滞后。另外由于农杆菌的感染和外源基因的导入,使伤口增多,导致生长缓慢。

②为了提高外源基因向植株的转化,应尽可能多地获得转基因植株。吕玉平把烟草花叶病毒及黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因双价载体转入番茄,在生根培养基上叶盘发育成完整植株的频率只有 3%。吴光把黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转入番茄,在生根培养基上获得的抗性植株仅为 0.3%,而谢小明转化番茄叶盘至完整植株的效率也不足 1%。本转化系统将转化及叶盘分化过程中的各个因素分别研究并优化组合,获得了转化效率较高的转化系统,这为将来其它外源基因向番茄的转化奠定了基础。

③转化植株的鉴定方法有多种^[9,10],常用与目的基因一起转入植物体的某些基因的表达来检测,如 NOS 基因、CAT 基因、GUS 基因等。分子杂交的方法更能确切地说明目的基因是否转入与表达。Southern 杂交的结果说明目的基因是否插入植物的染色体组中;Northern 杂交的结果说明插入的目的基因是否已顺利地转录产生 RNA;最终也是最为直观的鉴定方法是观察植株的性状表现,如抗病性、抗虫性、抗衰老性、耐贮性等等。

参 考 文 献

- 1 Molormick S J, Niedermeyer Fry J. Leaf discs transformation of cultivated tomato using *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell Rep*, 1986, 5: 81~84
- 2 Horsch R B, Fry S J, Horffmann N L. A simple and general methods for Lysopine and Nopaline dehydrogenase activities. *Biochem Biophys Acta*, 1985, 527: 497~500
- 3 罗云波, 生吉萍, 申琳. 番茄中反义 ACC 合成酶基因的导入与乙烯生物合成的控制, *农业生物工程学报*, 1995, 2: 38~44
- 4 陈丹. 细菌 CAT 基因在转基因番茄植株上的表达, *植物学报*, 1990, 32(8): 589~593
- 5 佟新萍. 番茄幼叶愈伤组织诱导与植株再生. *植物生理学通讯*, 1993, 29(3): 190~192
- 6 蒋有缘. 不同激素对比对番茄叶片外植体分化的影响. *华北农学报*, 1988, 3(4): 111~115
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning-A laboratory manual (second edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 汤福强, 刘愚. 植物乙烯生物合成研究进展. *植物生理学通讯*, 1994, 30(1): 3~10
- 9 陈章良, 潘乃燧. 植物基因工程的现状前景及问题. *生物工程进展*, 1989, 9(2): 20~27
- 10 陈章良主编, *植物基因工程研究*. 北京: 北京大学出版社, 1993. 3