

番茄 ZF 遗传转化再生体系的研究*

尹明安¹, 郭立², 刘华伟², 崔鸿文¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100;

2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 番茄 ZF 无菌苗出芽后 5~7 d, 子叶切成 0.5 cm × 0.5 cm 小块, 下胚轴切成 1 cm 的小段作为外植体, 以 MS 为基本培养基, 玉米素 1.0 mg/L, 6-苄基腺嘌呤 1.0 mg/L 分别与吲哚乙酸 0.05, 0.2, 0.5 和 1.0 mg/L 配成 7 个激素组合, 经诱芽比较, 确定 MS+ BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L 为最佳生芽培养基, MS 添加吲哚乙酸 0.0, 0.05, 0.1 和 0.2 mg/L 进行生根比较, 确定 MS+ IAA 0.05 mg/L 为最佳生根培养基。卡那霉素(Kan)临界浓度确定为 25 mg/L。转化培养过程为: 外植体于生芽培养基 26℃, 2600 lx 光下预培养 24 h。农杆菌 LBA 4404 过夜培养, 用 MS 培养液稀释 10~20 倍, 侵染外植体 5 min, 28℃ 黑暗共培养 48 h。然后在 MS+ BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L + Kan 25 mg/L + Cef 200 mg/L 筛选培养基上诱芽, 每 14 d 转接 1 次。芽长至 2 cm 时, 切下转至 MS+ IAA 0.05 mg/L + Kan 25 mg/L + Cef 100 mg/L 培养基上生根。

[关键词] 番茄; 组织培养; 遗传转化

[中图分类号] S641.204+.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)05-0027-04

番茄是栽培面积最大的蔬菜作物之一, 也是利用外源基因进行遗传转化的重要对象。前人^[1~8]曾对番茄外植体的再生及农杆菌介导的遗传转化体系进行过不少研究, 结果表明: 番茄真叶和子叶均可作为外植体, 但似以子叶为好; 玉米素(Zt)较 6-苄基腺嘌呤(BA)等激素的效果好; 生根培养基可用或不用吲哚乙酸(IAA); 农杆菌介导的转化频率较低; 再生及转化有明显的基因型依赖性, 至今未找到普遍适用的方法。鉴于此, 作者在用农杆菌介导法对番茄进行外源抗寒基因转化的过程中, 针对具体的番茄品种, 对番茄子叶和下胚轴的转化再生体系进行了必要的研究。

1 材料和方法

1.1 番茄品种

番茄品种 ZF, 由西北农林科技大学园艺学院蔬菜教研组提供。

1.2 培养基激素组合筛选

Zt, BA 和 IAA 均为国产试剂, Zt, IAA 过滤灭菌。MS 培养基为基本培养基, 调整 pH 至 5.8, 琼脂添加量 8 g/kg。生芽培养基激素组合参考文献^[1~5], 设计 IAA 的质量浓度水平为 0.05, 0.2, 0.5,

1.0 mg/L; Zt 的质量浓度水平为 1.0, 2.0 mg/L; BA 的质量浓度水平为 1.0 mg/L。生根培养基 IAA 质量浓度水平设计为 0.0, 0.05, 0.1, 0.2 mg/L。

1.3 外植体制备

挑选籽粒饱满, 大小一致的番茄种子, 加少许中性洗衣粉清洗, 并依次用清水、蒸馏水冲洗。质量分数 2% NaOCl 浸泡 30 min, 无菌水冲洗 5 次, 播种至 1/2 MS 培养基, 26℃ 黑暗条件培养 3 d, 出芽后, 转入 16 h/d 的光照条件(光照强度 2600 lx)培养 5~7 d。以培养 5~7 d 的番茄无菌苗为材料, 子叶切除两端, 中间部分横向一分为二, 切成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小块; 下胚轴切成 1 cm 左右的小段。

1.4 抗生素试验

卡那霉素质量浓度试验 在生芽培养基中添加卡那霉素(Kan)0, 12.5, 25, 50, 70 mg/L; 卡那霉素为 Sigma 公司产品。

头孢噻肟钠敏感性试验 在生芽培养基中添加头孢噻肟钠(Cef)200 mg/L。头孢噻肟钠为哈尔滨制药总厂产品。

1.5 农杆菌介导转化

外植体预培养 将切好的外植体放在铺有无菌滤纸的生芽培养基上, 叶面向上, 在 26℃, 光照 16

* [收稿日期] 2002-04-05

[基金项目] 西北农林科技大学科研专项经费资助项目

[作者简介] 尹明安(1956-), 男, 陕西汉中市中人, 副教授, 博士, 主要从事蔬菜采后生理与贮藏保鲜研究。

h/d, 光照强度 2 600 lx 条件下培养 24 h。

农杆菌浸染液制备 接种含有外源抗寒基因的农杆菌 LBA 4404 于 YEB 培养基中, 在 28 ℃, 180 r/min 振荡培养 10 h, 转接 1 次, 过夜培养(菌液 OD₆₀₀ = 0.8~1.0), 菌液 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用液体 MS 稀释 10~20 倍。

浸染及其培养 用浸染液浸泡外植体 5~30 min, 用无菌滤纸吸干外植体表面, 放回原预培养的培养基上, 在 28 ℃ 黑暗条件下共培养 48 h。

1.6 筛选培养

共培养后, 外植体用无菌水冲洗 5 次, 吸干水滴, 转入含 Kan 25 mg/L 和 Cef 200 mg/L 的生芽培养基, 在 26 ℃, 16 h/d 光照条件下培养。每 14 d 转接 1 次。当芽长至 2 cm 左右时, 从外植体上切下, 剔净基部愈伤组织, 转入含有 Kan 25 mg/L 和 Cef

100 mg/L 的生根培养基培养。

2 结果与分析

2.1 生芽培养基激素组合筛选

番茄外植体再生的关键问题是要形成数量多、质量好的不定芽, 这也是叶盘法转化番茄的基本前提。在基本培养基一定时, 芽的发生主要取决于细胞分裂素与生长素的种类和质量浓度。从表 1 可以看出, 各处理诱导愈伤组织的频率均很高, 都在 90% 以上, 但诱导芽的频率却有很大差别。从子叶叶盘来看, 生芽率最高的为 6 号、7 号处理, 其次为 1 号、2 号处理, 生芽率最低的为 3 号、4 号处理。从下胚轴切段来看, 生芽率最高的为 1 号处理, 其次为 7 号处理, 其余处理的诱芽率接近, 为 40%~50%。

表 1 不同激素配比对番茄子叶和下胚轴芽诱导的影响

Table 1 The effect of different hormone constitution on shoot induction in tomato cotyledon and hypocotyl

处理 Treatment	培养基激素 质量浓度/(mg·L ⁻¹) Culture concentration			子叶 Cotyledon				下胚轴 Hypocotyl			
	Zt	BA	IAA	叶盘数 No. of cotyledon disc	形成愈伤 叶盘数 No. of cotyledon disc induced calli	芽叶盘数 No. of cotyledon disc induced shoot	生芽率/% Shoot percent- tage	切段数 No. of segment	形成愈伤的 切段数 No. of segment induced calli	生芽切 段数 No. of segment induced shoot	生芽率/% Shoot percent- tage
1	1.0		0.05	100	98	63	63	100	96	93	93
2	1.0		0.2	100	90	61	61	100	97	48	48
3	1.0		0.5	100	86	22	22	100	98	47	47
4	1.0		1.0	100	97	10	10	100	100	42	42
5		1.0	0.05	100	94	49	49	100	95	40	40
6		1.0	0.2	100	96	88	88	100	98	48	48
7		1.0	0.5	100	98	86	86	100	100	69	69

注: 培养 21 d 时统计, 小芽点未计算在内。

Note: Counted at the 21st day exclusive of small shoots

在试验中观察到: (1) 从子叶叶盘上发生的芽比从下胚轴切段上发生的芽要茁壮, 表现为叶片大绿色深, 这在使用 Zt 的 1, 2, 3, 4 号处理中表现得最为明显, 而在使用 BA 的 5, 6, 7 号处理中这种差异较小。这可能是因为子叶是营养贮存器官, 它可以为芽提供较为充足的营养; (2) 使用 BA 的 5, 6, 7 号处理比使用 Zt 的 1, 2, 3, 4 号处理发生的芽要壮, 叶盘和下胚轴均有这样的趋势; (3) 虽然 7 号处理在叶盘和下胚轴上诱导芽的频率均较高, 但其从下胚轴上诱导的芽中, 有许多是畸形(细长扭曲, 无正常叶形态)。

综合考虑各方面因素, 确定 6 号处理为最佳激素组合, 即确定 MS+BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L 为以后试验的生芽培养基。

2.2 生根培养基生长素质量浓度筛选

待生芽培养基上的幼芽长至 2 cm 以上时, 从基部切下转入含有不同质量浓度生长素的生根培养基培养。由表 2 可以看出, 芽在 MS 培养基上 (IAA 质量浓度为 0) 亦可生出不定根来, 但是生根的速度较慢, 频率较低, 生根率只有其他 IAA 处理的 50% 左右。在本试验范围内, 3 个 IAA 质量浓度均能以 85% 以上的高频率从芽基部诱导出不定根来, 当质量浓度为 0.05 mg/L 时, 诱导的主根较细、较长, 侧根较多, 形态和无 IAA 处理的一样; IAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时, 诱导的主根较粗、较短, 侧根较少; IAA 质量浓度为 0.2 mg/L 时, 这种变化就更加明显了。所以尽管 IAA 0.05 mg/L 处理的生根率在测定时不如其他 2 个处理高, 但考虑到不定根的质量, 并且随着培养时间的延长, 其生根率会升至 90% 以

上, 本试验取 IAA 0.05 mg/L 为生根培养基的最佳 生长素质量浓度。

表 2 不同质量浓度生长素的诱根效果

Table 2 The effect of IAA at different concentration on root induction

IAA 质量浓度/(mg · L ⁻¹) IAA concentration	培养幼芽数 No. of cultured shoot	生根幼芽数 No. of rooted shoot	生根率/% Percentage of rooted shoot
0.0(CK)	20	9	45
0.05	20	17	85
0.1	20	18	90
0.2	20	19	95

注: 培养 21 d 时统计。

Note: Counted at the 21 days

2.3 卡那霉素质量浓度试验

在生芽培养基上添加不同质量浓度的卡那霉素, 以番茄子叶叶盘作为外植体培养, 结果显示, 卡那霉素质量浓度为零时, 所有叶盘均能诱导出愈伤组织并能分化出芽。质量浓度为 12.5 mg/L 时, 出愈率为 45%。质量浓度为 25 mg/L 时, 叶盘逐渐黄化, 完全不能诱导出愈伤组织, 出愈率为零。由此可以看出, 对本试验所用的番茄材料来讲, 25 mg/L 的卡那霉素足以完全抑制非转化体的出愈和分化。

2.4 头孢噻肟钠敏感性试验

农杆菌侵染外植体, 将其 T-DNA 导入植物细胞以后, 就完成其使命了。在以后的培养基中要加头孢噻肟钠或羧苄青霉素(Cb)来抑制其繁殖。不同的植物或不同的品种对 Cef 或 Cb 的敏感性不同, 故有必要试验之。

本研究使用的 Cef 质量浓度为 200 mg/L, 此质量浓度足以抑制农杆菌的繁殖, 所以亦用此质量浓度来进行 Cef 的敏感性试验。结果表明, 200 mg/L 的 Cef 对番茄外植体的出愈出芽均无影响。

2.5 农杆菌稀释倍数和侵染时间试验

农杆菌介导转化的基本过程是: 农杆菌经过夜培养, 离心弃上清液, 菌体用 MS 培养基稀释, 侵染外植体一段时间之后进入共培养。在预培养和共培养时间已经确定的情况下, 这一过程中影响转化效果的主要因素为农杆菌的稀释倍数和侵染时间。本试验设计稀释倍数为 10 和 20 倍, 侵染时间为 5, 8, 10, 15, 20, 30 min。结果表明, 农杆菌稀释 10 倍或 20 倍对侵染结果(或转化结果)影响不大, 在这样的稀释倍数下, 侵染时间以 5 min 为宜。当侵染时间超过 8 min 时, 表现出侵染过重的伤害现象, 并且侵染时间越长, 伤害越重。伤害的具体表现为: (1) 外植体出愈率很低(30% 以下), 尤其是下胚轴, 出愈率可低至零; (2) 出芽率更低, 在 6% 以下; (3) 外植体衰老, 叶盘逐渐黄化干枯, 带有黑色斑点; 下胚轴两端褐化

紧缩, 中部呈油浸状。下胚轴褐化现象较轻者可以多存活一段时间, 但无生机, 后逐渐发白死亡。根据试验结果, 确定农杆菌的稀释倍数为 10~20 倍, 侵染时间为 5 min。

3 讨论

3.1 细胞分裂素、生长素与芽诱导

陈丹等^[1]、许煜泉等^[2]、叶志彪等^[3]认为, 玉米素(Zt)诱导番茄外植体不定芽发生的效果比其他细胞分裂素, 如激动素(KT)和 6-苄基腺嘌呤(BA)的效果要好。叶志彪等^[3]对不同激素组合进行的比较试验表明, 番茄子叶诱芽培养基以 MS+Zt 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L 效果最好, MS+Zt 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 次之。申琳等^[4]在研究番茄子叶转化系统时发现 MS+Zt 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的生芽率最高。本试验结果却显示, 这两种生芽培养基的诱芽效果最差, 远不如 MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 为好, 这可能是由于所用番茄品种不同所引起的。这一现象再度证明, 番茄外植体诱芽的最佳激素组合有基因型依赖性, 在激素作用机理深入揭示之前, 这一问题还很难克服。李晓东^[5]在其研究中发现, 番茄“阳春”、“佳粉 2 号”的子叶叶盘和下胚轴切段在 MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 培养基中的诱芽率最高, 而“UC204C”和“美味樱桃番茄”生芽最多的是 Zt 2.0 mg/L+IAA 0.05 mg/L 组合。前一结果与本研究结果一致, 后一组合本研究也曾试验过, 发现它诱导愈伤组织的能力特别强, 愈伤组织团大色白, 诱芽率也很高, 但不定芽的质量不太好, 畸形芽比较多。

3.2 卡那霉素的使用质量浓度

卡那霉素作为遗传转化的筛选药物, 使用质量浓度依转化对象的敏感性高低而不同, 高的如小麦悬浮细胞可达到 400~800 mg/L, 低的如棉花下胚轴可为 5~50 mg/L^[9]。同是番茄外植体, 品种不同

应用 Kan 的质量浓度亦不同。陈丹等^[1]用 300 mg/L, McCom ick 等^[8]、叶志彪等^[6]和张建民^[7]用 100 mg/L, 申琳等^[4]用 50 mg/L, 李晓东^[5]因品种不同而用 50 和 70 mg/L。本研究用番茄品种 ZF 表现出对 Kan 的高度敏感性, 25 mg/L 已有足够的筛选压力。作者在遗传转化过程中也试用过 50 mg/L, 结果生芽率极低, 显然选择压力过大。

3.3 外植体的褐变

有些植物材料在组织培养时褐变较轻, 但在农杆菌介导的遗传转化过程中, 由于农杆菌的侵染杀伤作用, 褐变会加重^[10]。作者发现, 单纯进行番茄子叶或下胚轴的芽诱导培养时, 很少发生褐变现象, 但在遗传转化过程中一经农杆菌侵染, 就有褐变发生。

褐变发生的程度与农杆菌的侵染程度成正比。菌液稀释倍数小, 侵染时间长, 褐变严重; 反之, 菌液稀释倍数大, 侵染时间短, 褐变减轻。褐变与外植体的种类也有关系, 同样的侵染条件, 下胚轴切段比子叶叶盘褐变严重, 这可能与下胚轴维管组织较发达, 更易遭受农杆菌侵染有关。另外, 褐变还与外植体的状态有关。凡是较小、较薄、绿色较浅、带有机机械伤的叶盘容易发生褐变, 而较大、肥厚、浓绿、无机机械伤的叶盘不易发生褐变; 对于下胚轴而言, 较嫩的、带绿色的褐变较轻, 而较老的、颜色发白的褐变较重。基于以上的观察和认识, 笔者在试验中采取了缩短农杆菌侵染时间的措施, 从而减轻了褐变的发生。

[参考文献]

- [1] 陈丹, 米景九, 谢友菊, 等. 细菌 CAT 基因在转基因番茄植株上的表达. 植物学报[J]. 1990, 32(8): 589- 593
- [2] 许煜泉, 史益敏, 尹协芬. 番茄离体子叶培养的形态发生及过氧化物酶的动态[J]. 上海农学院学报, 1992, 10(2): 121- 126
- [3] 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
- [4] 申琳, 生吉萍, 罗云波. 番茄外源基因转化系统的研究[J]. 中国农业大学学报, 1998, 3(5): 101- 105
- [5] 李晓东. 人野生型 p53 肿瘤抑制基因的遗传转化及转基因番茄的再生[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学园艺学院, 2000
- [6] 叶志彪, 李汉霞, 周国林. 番茄多聚半乳糖醛酸酶反义 cDNA 克隆的遗传转化与转基因植株再生[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 305- 306
- [7] 张建民. 利用农杆菌介导将外源基因导入番茄的研究[J]. 东北林业大学学报, 1999, 27(1): 42- 44
- [8] McCom ick S, Niedemeyer J, Fry J, et al. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Reports, 1986, 5: 81- 84
- [9] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 88- 89, 133- 134
- [10] 李洪清, 李美茹. 影响农杆菌介导植物基因转化的因素问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(2): 145- 150

Tomato plant regeneration in genetic transformation

YIN Ming-an¹, GUO Li², LIU Hua-wei², CUI Hong-wen¹

(1 College of Horticulture; 2 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: When tomato ZF seedlings grew 5- 7 days after germination, cotyledons were cut into 0.5 cm × 0.5 cm discs and hypocotyls into 1 cm segments as explant. MS was used as basic medium, and Zeatin 1.0 mg/L and BA 1.0 mg/L were respectively combined with IAA 0.05, 0.2, 0.5 and 1.0 mg/L as additions. It was determined that MS+ BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L was the best shooting medium. IAA 0.0, 0.05, 0.1 and 0.2 mg/L were respectively added into MS medium and rooting effects were tested. Results showed that the best rooting medium was MS+ IAA 0.05 mg/L. Optimum concentration of Kan was 25 mg/L. Process of transformation culture was as follows: The discs and segments were pre-cultured in shooting medium for 24 h (26 °C, 2600 lx). *Agrobacterium* LBA 4404 was cultured overnight in YEB and diluted 10- 20 times with MS medium, in which explants were soaked for 5 minutes. Then the explants were co-cultured for 48 h (28 °C, in the dark). After that, the explants were cultured in medium MS+ BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L + Kan 25 mg/L + Cef 200 mg/L for selection with transfer every two weeks. When shoots were 2 cm high, they were cut and transferred into the medium MS+ IAA 0.05 mg/L + Kan 12.5 mg/L + Cef 100 mg/L for rooting.

Key words: Tomato; tissue culture; genetic transformation