

LYC-*b* 基因反义表达对番茄果实 番茄红素含量的影响

徐加新, 梁 燕

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究番茄红素 β -环化酶(*LYC-b*)基因反义表达对番茄果实中番茄红素含量的影响,为番茄品质育种提供新方法。【方法】以番茄品种“TT1117A”和“灵光 3 号”为材料,构建了分别由 CaMV35S 启动子驱动的 *GUS* 标记基因和反义 *LYC-b5'* 基因双价植物表达载体,通过农杆菌 GV3101 介导,将基因整合到番茄基因组中,采用 *GUS*、PCR 以及 RT-PCR、Northern 杂交进行检测,并测定了转基因植株果实中的番茄红素含量。【结果】由 *GUS*、PCR 检测结果可知,筛选出 1 株“TT1117A”和 4 株“灵光 3 号”转基因植株;RT-PCR、Northern 杂交检测结果表明,目的基因在 RNA 水平上已经表达;对番茄果实中番茄红素含量的测定结果表明,转基因植株果实中番茄红素含量均高于未转基因植株。【结论】*LYC-b* 基因的反义表达具有提高番茄果实中番茄红素含量的作用。

【关键词】 番茄;番茄红素 β -环化酶基因;反义表达;番茄红素含量

【中图分类号】 S641.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0127-06

Effect of *LYC-b* gene antisense expression on lycopene content

XU Jia-xin, LIANG Yan

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study discussed the effect *LYC-b* gene antisense expression on lycopene content in order to provide new methods for the fruit quality breeding of tomato. 【Method】 The two gene plant expression vectors including anti-*LYC-b5'* gene and *GUS* gene were constructed by using CaMV35S as a promoter and introduced into tomato cultivars TT1117A and Lingguang No. 3 by *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mediated transformation. 【Result】 *GUS*, and PCR detection showed that anti-*LYC-b5'* gene had integrated into genome of tomato. RT-PCR, and Northern blot detection indicated that anti-*LYC-b5'* gene was expressed at RNA level. Lycopene content analysis of tomato fruit showed that lycopene content in transgenic fruit was higher than that of untransgenic fruit. 【Conclusion】 *LYC-b* gene antisense expression can improve lycopene content of tomato fruit.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Miller. ; *LYC-b* gene; antisense expression; lycopene content

番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller.)是我国重要的蔬菜作物之一,其果实中的番茄红素具有许多独特的生理功能^[1],增加番茄红素的摄入量能有效降低癌症及其他慢性病的发生率^[2-3]。由于人体自身不能合成番茄红素,主要是从番茄和番茄制品

中摄取,而现今的番茄品种中番茄红素含量普遍不高,因此利用基因工程技术对番茄果实中番茄红素的代谢和积累进行调控,从而增加其含量,便成为当前的研究热点。近年来,研究人员对类胡萝卜素合成途径中的上游酶进行操作,通过上游酶的过量表

* [收稿日期] 2009-03-31

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2007ZDKG-05,2009ZDKG-14);西北农林科技大学育种专项(06YZ003)

[作者简介] 徐加新(1984—),男,山东汶上人,在读博士,主要从事番茄育种研究。E-mail: xujiaxin199815@yahoo.com.cn

[通信作者] 梁 燕(1963—),女,陕西渭南人,教授,博士,博士生导师,主要从事番茄育种与蔬菜种质资源研究。

E-mail: liangyan@nwsuaf.edu.cn

达来提高番茄果实中番茄红素含量,但未达到预期目的^[4-5]。说明要提高番茄红素含量,还需要对下游酶进行调控,而下游番茄红素的环化是类胡萝卜素合成途径中的一个重要分支点^[6],番茄红素 β-环化酶(LYC-β)是催化番茄红素形成具环类胡萝卜素的 关键酶^[7-8]。因此,可以通过抑制 *LYC-β* 基因的表 达,阻碍番茄红素向具环类胡萝卜素转化,从而提高 番茄果实中番茄红素含量。

目前,反义 RNA 技术的迅速发展和成功应用^[9-10],为进行这一研究提供了技术保证。近年来, 梁燕等^[11-12]研究了番茄红素 β-环化酶基因反义表达 对烟草、胡萝卜中番茄红素合成的影响,结果表明转 基因植株中番茄红素含量均有明显提高,说明反义 基因表达载体有效可靠。本研究采用农杆菌介导

法,将番茄红素 β-环化酶反义基因导入番茄,研究 *LYC-b* 基因反义表达对番茄果实中番茄红素含量的 影响,以期为番茄品质育种提供新的理论和方法。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 番茄品种“TTI117A”和“灵光 3 号”,由西北农林科技大学园艺学院番茄育种课题 组提供。

1.1.2 菌株和质粒 所用农杆菌菌株为 GV3101; 质粒为番茄红素 β-环化酶基因 5'端 397 bp 反义基 因和 *GUS* 报告基因的植物表达载体质粒(anti- *LYC-b*5'+*GUS*)/pBINPLUS,约 12.8 kb,质粒图 谱见图 1。

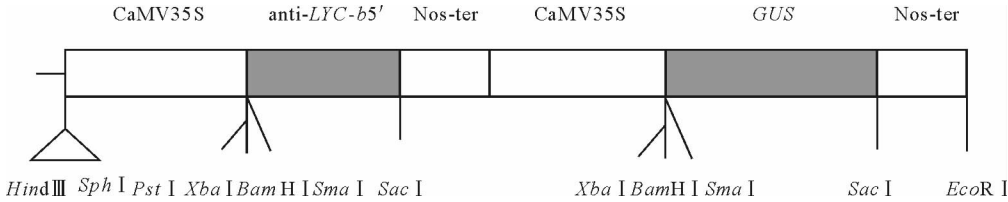


图 1 (anti-*LYC-b*5'+*GUS*)/pBINPLUS 质粒图谱
Fig.1 Diagram of (anti-*LYC-b*5'+*GUS*)/pBINPLUS

1.1.3 培养基 共培养培养基:MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L;选择培养基:MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L+Cef 500 mg/L+Kan 60 mg/L;生根培养基:MS+IAA 0.2 mg/L+Kan 30 mg/L。

1.1.4 试 剂 反转录酶 M-MLV,购自 Promega 公司,*Taq* 酶、dNTP、DNA Marker (DL 2000, 600 bp),均购自 Takara 公司。

1.2 方 法

1.2.1 番茄无菌苗的获得 选取饱满新鲜的番茄 种子,用体积分数 70%酒精和 10%次氯酸钠消毒 后,播种于不含激素的 1/2 MS 培养基上,25~28 ℃ 暗培养 2~3 d,发芽后,光培养 6~7 d(16 h/d,光照 强度 2 600 lx),待子叶完全展开时取材侵染。

1.2.2 农杆菌的培养 挑取根癌农杆菌 GV3101 单菌落,接种于 50 mL 含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,28 ℃、220 r/min 振荡培养至 *OD*₆₀₀ 值约为 0.5。

1.2.3 叶盘转化 将 GV3101 农杆菌培养液转入 无菌的 50 mL 离心管中,4 ℃、8 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用无菌的 1/2 体积的 MS 液体培养基 悬浮菌体,即为农杆菌工程菌液。

取培养 6~7 d 的番茄无菌苗的子叶,切去子叶 叶尖和叶柄,剩余部分切成 0.5 cm×0.5 cm 大小的 子叶块,接种到预培养培养基上,黑暗条件下预培养 36 h,然后将经过预培养的叶盘外植体放入农杆菌 工程菌液中侵染 10 min,取出外植体,在无菌滤纸 上吸干表面的菌液,接种于共培养培养基上,置 28 ℃暗培养 36 h。

1.2.4 选择培养 将经过共培养的叶盘外植体转 接到选择培养基上,光照培养箱内培养,温度为 (25±1) ℃,每天光照 14 h,每 2 周继代 1 次。

1.2.5 生根培养 当抗性芽长到 2~4 cm 时,将其 切下并转入生根培养基中,光照培养箱内培养,温 度为(25±1) ℃,每天光照 16 h 诱导生根,待 4~5 片 叶时开始炼苗,移入蛭石或直接移入无菌营养土中, 在温室条件下生长。

1.2.6 抗性植株的 *GUS* 检测^[13] 从具有卡那霉 素抗性的番茄植株上剪取幼嫩叶片,放入 0.25 mL 的小离心管中,加入适量 X-gluc 溶液,将叶片全部 浸泡在染液中,真空抽滤 1~5 min;37 ℃保温,染色 2 h 可看到蓝色,染色过夜;而后依次用体积分数 70%,80%,90%和 100%乙醇脱色,直至绿色褪去; 观察转化株叶片与未转化株叶片的颜色。

1.2.7 抗性植株的 PCR 检测 用 CTAB 法^[14]提取 GUS 检测阳性的番茄植株叶片基因组 DNA,用于 PCR 扩增。PCR 引物序列分别为: P₁ 5' TC-CAATCCCTCTTGCTGCTA3'; P₂ 5' GGGTTC-CAAGATATCCCAA3'。引物均由上海生物工程公司合成。PCR 循环参数为: 94 ℃ 预变性 5 min; 然后进行 30 个 PCR 循环, 即 94 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min; 72 ℃ 终延伸 5 min; 4 ℃ 终止反应。

对目的基因末端 Nos 终止子进行 PCR 检测, Nos 引物序列分别为: P₃ 5' TTAAGATTGAATC-CTGTTGCCG3'; P₄ 5' TAATTTATCCTAGTTT-GCGCGC3', 均由上海生物工程公司合成。PCR 循环参数为: 94 ℃ 预变性 3 min; 然后进行 40 个 PCR 循环, 即 94 ℃ 20 s, 54 ℃ 40 s, 72 ℃ 1 min; 72 ℃ 终延伸 3 min; 4 ℃ 终止反应。Nos 终止子所扩增的片段大小为 192 bp, 通过对该序列的扩增分析进一步验证目的基因的整合情况。

1.2.8 PCR 阳性株的 RT-PCR 检测 用异硫氰酸胍法^[15]提取 PCR 转化株的总 RNA。向灭菌的 Ependorf 管中加入 2~5 μg 的总 RNA, 加水补到 14 μL, 加入 1 μL 0.5 μg/μL 的 oligo(dT)15 Primer, 70 ℃ 保温 5 min, 然后立即置于冰上, 加入 4 μL M-MLV buffer, 1 μL 10 mmol/L dNTP, 1 μL

MLV-RT, 混匀后于 37 ℃ 保温 1 h, 合成 cDNA 第一链。以反转录产物为模板进行 PCR 扩增, 扩增所用引物及反应程序与目的基因的扩增方法相同。

1.2.9 转基因番茄植株的 Northern 杂交 分别取 0.1 g RT-PCR 阳性植株和未转化植株的番茄叶片, 采用异硫氰酸胍法^[15]提取总 RNA, 并沉淀于 1 mL 体积分数 75% 乙醇中, 于 -70 ℃ 保存备用。以 397 bp 大小的 *LYC-b*5' 基因片段作探针进行杂交^[16], 探针标记按照 Promega Promega-Gene Label 试剂盒说明进行。

1.2.10 番茄果实中番茄红素含量的测定 在转基因植株的第 2~3 穗果实达到完全成熟度时取样, 每株随机取 2 个果实, 混合打浆, 参照 Davis 等^[17]采用的正己烷浸提直接比色法测定番茄红素含量。

2 结果与分析

2.1 转基因番茄植株的 GUS 检测

对番茄抗性植株叶片进行 GUS 检测, 结果发现, 9 株“TTI117A” Kan 抗性植株中, 有 1 株呈阳性, 阳性株率为 11.1%。26 株“灵光 3 号” Kan 抗性植株中, 有 4 株呈阳性, 阳性株率为 15.3%。肉眼即可直接观察到阳性植株叶片呈蓝色, 阴性植株叶片为黄白色(图 2)。

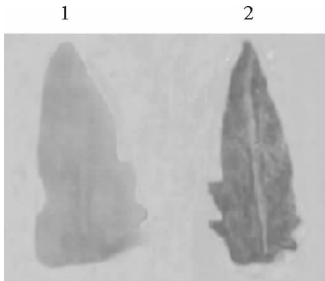


图 2 转基因番茄植株的 GUS 检测结果
1. GUS 检测阴性; 2. GUS 检测阳性
Fig. 2 GUS test of tomato plants infected by GV3101 with(anti-*LYC-b*5'+*GUS*)/pBINPLUS
1. Leaf positive to GUS test; 2. Leaf negative to GUS test



图 3 转基因番茄植株的 PCR 检测
M. 2 000 bp DNA 分子量标准; 1~4. “灵光 3 号”转基因植株; 5. “TTI117A”转基因植株; 6. 阴性对照; 7. 阳性对照
Fig. 3 PCR detection of transgenic tomato
M, DL 2000 Marker; 1-4. Transgenic plants of Lingguang No. 3; 5. Transgenic plants of TTI117A; 6. Negative control; 7. Positive control

2.2 转基因番茄植株的 PCR 检测

以番茄品种“TTI117A”和“灵光 3 号”的 GUS 检测阳性植株叶片为材料, 提取植物基因组 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。结果(图 3)显示, 1 株“TTI117A”和 4 株“灵光 3 号”GUS 检测阳性植株都扩增出了 397 bp 的特异条带; 未转化株没有扩增

出任何条带, 初步证明目的基因已导入番茄基因组中。用目的基因末端 Nos 终止子引物对转化植株作 PCR 检测, 结果(图 4)表明, 这些转化植株均能扩增出 192 bp 的条带, 进一步说明目的基因已整合到番茄基因组中。

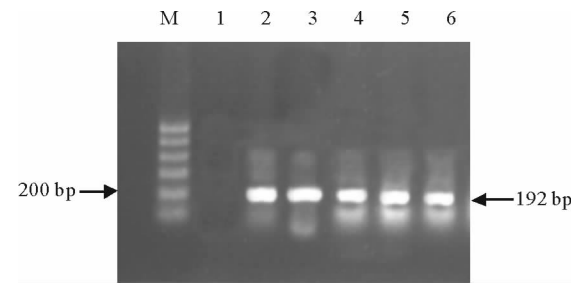


图 4 Nos 终止子引物对番茄目的基因的 PCR 检测
M. DL 600 bp DNA 分子量标准;1. 阴性对照;
2~5. “灵光 3 号”转基因植株;6. “TTI1117A”转基因植株
Fig. 4 PCR detection of positive plant of PCR
using Nos-ter primers
M. DL 600 bp DNA Marker;1. Negative control;2—5. Transgenic
plants of Lingguang No. 3;6. Transgenic plants of TTI1117A

2.3 转基因番茄植株的 RT-PCR 检测

用异硫氰酸胍法提取番茄转化株的总 RNA,紫外分光光度计测得 5 个样品的 OD_{260}/OD_{280} 均介于

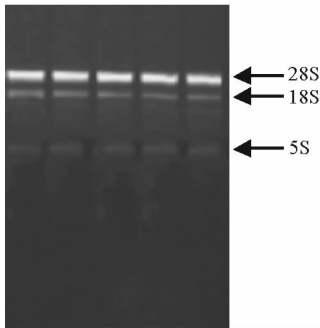


图 5 转基因番茄植株 RNA 的电泳结果
Fig. 5 RNA of transgenic tomato

2.4 转基因番茄植株的 Northern 杂交

提取转基因番茄植株叶片的总 RNA,以 *LYC-b5'* 基因片段(397 bp)为探针进行 Northern 杂交,结果(图 7)表明,4 株“灵光 3 号”和 1 株“TTI1117A”转基因番茄总 RNA 与探针的杂交信号,明显强于未转基因的阴性对照。这是由于,阴性对照植株的杂交信号是番茄内源 *LYC-b* 基因转录出的 RNA 与探针杂交的结果,而转基因植株的杂交信号比阴性对照强,说明除番茄内源 *LYC-b* 基因转录出的 RNA 外,外源 35S 启动子驱动的反义 *LYC-b5'* 基因得到了表达,转录出了对 *LYC-b5'* 特异的 RNA,因此与探针具有特异性的 RNA 的量增加,信号增强。

1.8~2.0(表 1),表明无蛋白质或酚污染。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 5)表明,28S 和 18S RNA 条带清晰可见,2 条带亮度比值在 2.0 左右,无扩散现象,说明所提 RNA 完整,质量较好,符合反转录的要求,可以进行 RT-PCR。对上述总 RNA 进行 RT-PCR 检测,结果(图 6)表明,转基因植株均能扩增出 397 bp 的目的基因片断,初步证明反义 *LYC-b5'* 基因在 RNA 水平上已经表达。

表 1 紫外分光光度计法检测转基因番茄植株的 RNA 质量

Table 1 OD_{260}/OD_{280} of total RNA by spectrophotometer		
样品 Samples	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Consistence	OD_{260}/OD_{280}
1	19.2	1.84
2	17.9	1.93
3	21.5	1.90
4	20.3	1.87
5	17.4	1.95

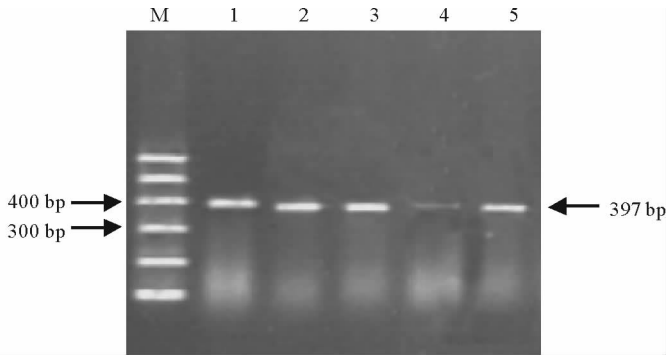


图 6 转基因番茄植株的 RT-PCR 检测结果
M. 600 bp DNA 分子量标准;1. “TTI1117A”转基因植株;
2~5. “灵光 3 号”转基因植株
Fig. 6 RT-PCR of transgenic tomato plant
M. 600 bp Marker;1. Transgenic plant of TTI1117A;
2—5. Transgenic plant of Lingguang No. 3

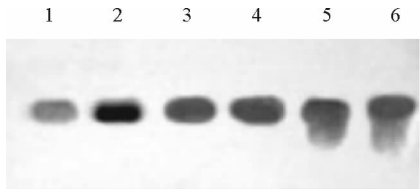


图 7 转基因番茄植株的 Northern 杂交结果
1. 阴性对照;2~5. “灵光 3 号”转基因植株;
6. “TTI1117A”转基因植株

Fig. 7 Northern blot of transgenic tomato
1. Negative control;2—5. Transgenic plants of
Lingguang No. 3;6. Transgenic plants of TTI1117A

2.5 *LYC-b5'* 基因反义表达对转基因番茄果实中番茄红素含量的影响

由图 8 可以看出, 1 株“TTI1117A”和 4 株“灵光 3 号”转基因植株果实中的番茄红素含量均明显高于未转基因植株, 其中“TTI1117A”转基因植株果实中的番茄红素含量较其对照提高了 85%, “灵光 3 号”转基因植株果实中的番茄红素含量均较其对照提高了 50% 左右。可见, *LYC-b5'* 基因反义表达明显增加了转基因植株果实中番茄红素的积累。

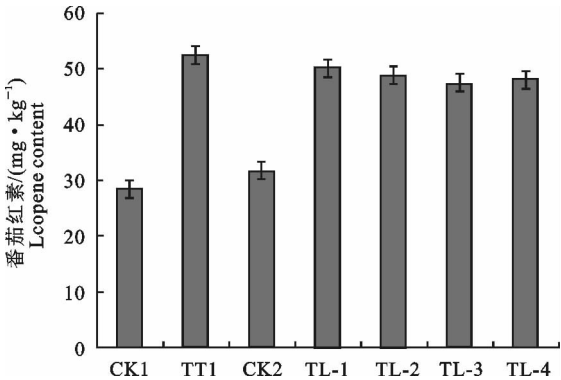


图 8 *LYC-b5'* 基因反义表达对转基因番茄果实中番茄红素含量的影响

CK1. “TTI1117A”未转基因植株; TT1. “TTI1117A”转基因植株; CK2. “灵光 3 号”未转基因植株; TL-1~TL-4. “灵光 3 号”转基因植株

Fig. 8 Effects of *LYC-b5'* antisense expression on fruit lycopene content

CK1. Untransgenic plant of TTI1117A; TT1. Transgenic plant of TTI1117A; CK2. Untransgenic plant of Lingguang No. 3; TL-1—TL-4. Transgenic plant of Lingguang No. 3

3 讨 论

本研究对类胡萝卜素合成途径中下游的关键酶番茄红素 β-环化酶进行调控, 构建了分别由 35S 启动子驱动的 *GUS* 报告基因和反义 *LYC-b5'* 基因双价植物表达载体, 通过反义 *LYC-b* 基因对番茄的遗传转化, 期望反义基因在番茄细胞中转录出一段与内源番茄红素 β-环化酶 mRNA 对应的反义 RNA, 并与番茄红素 β-环化酶 mRNA 互补结合, 研究 *LYC-b* 基因反义表达对番茄果实中番茄红素含量的影响。结果表明, 反义 *LYC-b5'* 基因已经整合到番茄基因组中, 并在转录水平上得以表达, 转基因番茄果实中的番茄红素含量均明显高于未转基因植株, 说明反义 *LYC-b5'* 基因对内源的 *LYC-b* 表现出一定程度的抑制作用, 促进了番茄红素的积累。上述研究结果证实了这一调控途径的有效性。

本研究观察发现, 转基因植株生长发育前期与

未转基因植株在外部特征和生长状况上几乎没有区别, 但移栽到大田后, 在相同的生长条件下, 与未转基因植株相比, 转基因植株出现不同程度矮化, 叶片也有黄化现象出现, 同时转基因番茄果实中的种子数目明显低于未转基因植株。推测其原因可能是, 反义 *LYC-b5'* 基因抑制了内源 *LYC-b* 的表达, 进而影响了类胡萝卜素的形成, 从而影响到转基因番茄植株的光合作用, 转基因番茄植株和果实发育因此受到抑制, 出现植株矮化、果实中种子数量降低等现象。但具体的调控机理还需要深入研究。

外源基因在转基因植物中的稳定遗传比较复杂。Azhakanandam 等^[18] 用根癌农杆菌转化水稻获得转基因植株, 通过对转基因植株自交一代的 *GUS* 活性检测分析发现, 后代中显性位点的遗传属孟德尔遗传, 而且是单基因位点插入; Budar 等^[19] 以转基因烟草为试材, 通过转基因植株自交方式研究了外源基因的遗传稳定性, 结果表明, 有 5 个转基因株系未检测到外源基因, 表现为丢失; Simon 等^[20] 研究认为, 外源基因片段大小、甲基化、共抑制、基因沉默等都会影响其稳定遗传和表达。本研究中反义 *LYC-b5'* 转基因植株已经收获种子, 目的基因能否在后代稳定遗传, 以及番茄当代和子代的园艺学性状及生化特性有何不同, 有待通过对转基因后代的观察和分析进行进一步研究。

[参考文献]

[1] 崔孟祥, 李鹏丽, 刘仲齐, 等. LeCOP1LIKE 基因的克隆、反义构建及微型番茄的转化 [J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(5): 329-337.

Cui M X, Li P L, Liu Z Q, et al. Cloning, antisense construction and tomato transformation of LeCOP1LIKE [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2007, 40(5): 329-337. (in Chinese)

[2] Di M P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher [J]. Arch Biochem Biophys, 1989, 274: 532-538.

[3] Giuliano G, Bartley G E, Scolnik P. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development [J]. Plant Cell, 1993 (5): 379-387.

[4] Bartley G E, Scolnik P A, Giuliano G. Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants [J]. Plant Physiol, 1994, 45: 287-301.

[5] Roemer S, Fraser P D, Kiano J W, et al. Elevation of the pro-vitamin A content of transgenic tomato plants [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 666-669.

[6] 梁燕, 王鸣, 陈杭, 等. 植物 LYCs 的特性功能及其相互关系 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(4): 993-998.

Liang Y, Wang M, Chen H, et al. The characteristics functions

and relationships of LYCs in plant [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2002, 22(4): 993-998. (in Chinese)

[7] Cunningham F X J, Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 49: 557-583.

[8] 徐昌杰, 张上隆. 植物类胡萝卜素合成及其调控 [J]. *植物生理学通讯*, 2000, 36(1): 64-70.

Xu C J, Zhang S L. Carotenoid biosynthesis and its regulation in plants [J]. *Plant Physiol Commun*, 2000, 36(1): 64-70. (in Chinese)

[9] 赵楠, 林静瑜, 王淑芳, 等. 过表达 B 基因的转基因微型番茄的获得 [J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2006, 39(4): 103-107.

Zhao N, Lin J Y, Wang S F, et al. Overexpression of a specific lycopene B cyclase gene B in transgenic micro-tom [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2006, 39(4): 103-107. (in Chinese)

[10] 杨美英, 贺红霞, 王艳, 等. 番茄茄红素 β -环化酶基因高效沉默载体构建 [J]. *分子植物育种*, 2007, 5(1): 43-46.

Yang M Y, He H X, Wang Y, et al. Construction of efficient gene silencing vector harboring lycopene β -cyclase gene [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2007, 5(1): 43-46. (in Chinese)

[11] 梁燕, 王鸣, 陈杭, 等. 茄红素- β -环化酶反义 RNA 基因对烟草的遗传转化 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2003, 31(3): 73-76.

Liang Y, Wang M, Chen H, et al. Transformation of anti-lycbin carrot to tobacco [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed*, 2003, 31(3): 73-76. (in Chinese)

[12] 梁燕, 陈大明, 王鸣, 等. 茄红素 β -环化酶反义基因对胡萝卜茄红素含量的影响 [J]. *西北植物学报*, 2007, 27(11): 2228-2232.

Liang Y, Chen D M, Wang M, et al. Influence of anti-sense *LYC-B* gene on lycopene synthesis in *daucus carota* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2007, 27(11): 2228-2232. (in Chinese)

[13] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. GUS 组织化学染色法: 一种快速筛选抗二化螟转 Bt cry1Ab 基因水稻的方法 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2000, 26(2): 12-15.

Wu G, Cui H R, Shu Q Y, et al. GUS histochemical assay: a rapid way to screen striped stem borer (*chilo suppressalis*) resistant transgenic rice with a cry1Ab gene from Bt (*Bacillus thuringiensis*) [J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture and Sciences*, 2000, 26(2): 12-15. (in Chinese)

[14] Theresa M F, Steven D T. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1995, 13(3): 207-209.

[15] 李立志, 邓子牛, 熊兴耀, 等. 番茄组织总 RNA 提取方法研究 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2007, 33(5): 12-15.

Li D Z, Deng Z N, Xiong X Y, et al. Study on isolation of total RNA from tomato tissues [J]. *Journal of Hunan Agricultural University: Natural Science Edition*, 2007, 33(5): 12-15. (in Chinese)

[16] 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 350-351.

Zhang X L, Tang K X. *Plant biotechnology* [M]. Beijing: Science Press, 2004: 350-351. (in Chinese)

[17] Davis A R, Fish W W, Perkins V Z. A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2003, 28: 425-430.

[18] Azhakanandam K, McCabe M S, Power J B, et al. T-DNA transfer, integration, expression and inheritance in rice; Effects of plant genotype and [J]. *Plant Physiol*, 2000, 157(4): 429-439.

[19] Budar F, Thia-Toong L, van Montagu M, et al. Agrobacterium-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single mendelian factor [J]. *Genetics*, 1986, 114: 303-313.

[20] Simon-Mateo C, Lopez-Moya J J, Guo H S, et al. Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing [J]. *Gen Virol*, 2003, 84: 2877-2883.

(上接第 126 页)

[16] Prasad M, Varshney R K, Roy J K, et al. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 584-592.

[17] Lee J A, Kaltsikes P J. The application of Mahalanobis' generalized distances to measure genetic divergence in durum wheat [J]. *Euphytica*, 1973, 22: 124-131.

[18] 陈新民, 何中虎, 史建荣, 等. 利用 SSR 标记进行优质冬小麦品种(系)的遗传多样性研究 [J]. *作物学报*, 2003(1): 13-19.

Chen X M, He Z H, Shi J R, et al. Genetic diversity of high quality winter wheat varieties (lines) based on SSR markers [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003(1): 13-19. (in Chinese)

[19] 韩微波, 刘录祥, 郭会君, 等. 高能混合粒子场辐照小麦 M1 代变异的 SSR 分析 [J]. *核农学报*, 2006, 20(3): 165-168.

Han W B, Liu L X, Guo H J, et al. SSR Analysis on M1 variation of wheat irradiated by mixed high energy particle field [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2006, 20(3): 165-168. (in Chinese)