

农杆菌介导 IPT 和 *etr1-1* 双基因转化番茄 及转基因植株再生

胡艳¹, 陈国祥¹, 李朝军¹, 刘少华²

(南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京)

(2. 南京晓庄学院生命科学系 210017 江苏 南京)

[摘要] 建立了番茄子叶高频再生体系,优化了农杆菌介导的外源基因转化番茄的条件,将 IPT 和 *etr1-1* 双基因导入番茄中,以除草剂 PPT 作为筛选标记,得到 3 株转化再生植株.通过 PCR, RT-PCR 检测证明 *etr1-1* 和 IPT 基因已整合到转基因番茄植株的基因组中,并在转录水平有一定表达.

[关键词] 番茄 *etr1-1* IPT 遗传转化

[中图分类号] Q939.9, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)03-0083-05

0 引言

乙烯(ethylene, ET)被认为是“成熟激素”.在呼吸跃变型果实成熟过程中,乙烯起着触发呼吸跃变和促进果实成熟的作用.与乙烯的作用相反,细胞分裂素(cytokinin, CTK)被称为天然抗衰老因子,研究发现细胞分裂素对大多数植物以及同一植物的不同器官具有广泛的延缓衰老作用^[1].因此,设法促进 CTK 的合成或抑制 ET 的产生和作用,能有效地延缓果实的成熟过程,延长果实采摘后的保鲜时间.

etr1-1 是拟南芥乙烯受体 ETR1 在 N 末端的三个疏水跨膜区内发生了单个氨基酸残基变化即 Cys⁶⁵ 突变为 Try 的突变体^[2],研究发现 *etr1-1* 完全丧失了乙烯的结合能力^[3],使细胞中乙烯的信号传导过程阻断,乙烯诱导效应基因不能被诱导. IPT 基因编码了细胞分裂素生物合成中第一步限速酶——异戊烯基转移酶(isopentenyltransferase, IPT).转 IPT 基因烟草已经证实了 IPT 基因能使植物体内细胞分裂素含量大大增加,有效地延缓了叶片的衰老^[4].但细胞分裂素的过量合成也会导致植株在形态发育及其生理生化过程中的畸型变化^[5].为了解决这一问题,本实验构建了嵌合基因 GH-IPT, GH 启动子是受生长素专一诱导的.在无外源生长素时, GH 启动子仅诱导 IPT 在根尖、子房和发育的种子中有一定程度的表达;当以外源生长素诱导时,几乎所有的组织和器官都有很高的表达^[6].因此可以通过施加外源性的生长素来调控 IPT 基因的表达.

我们构建了含 IPT 和 *etr1-1* 双基因的双元表达载体 dCaMV35S *etr1-1*-GHipt-pBBBast.通过农杆菌介导将 IPT 和 *etr1-1* 双基因导入番茄中,以期获得贮藏性好、品质优良的番茄品种,同时为进一步研究激素在果实成熟过程中的作用机理建立良好的模型.

1 材料和方法

1.1 材料

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)品种 TM-Cherry-94-引-1,江苏省农科院提供;根癌农杆菌菌株 EHA105,为本室保存菌株;质粒 dCaMV35S *etr1-1*-GHipt-pBBBast 由本室构建(图 1).该质粒的 T-DNA 区段携带有 GH 启动子驱动的 IPT 基因,双 CaMV 35S 启动子驱动的 *etr1-1* 基因和 CaMV35S 启动子驱动的 Bar 基因.该质粒有卡那霉素(kanamycin, Kan)抗性基因 NPT II,作为细菌和农杆菌中的筛选标记, Bar 基因编码 PPT 乙酰转移酶,作为植物组织转化筛选标记. IPT 基因来源于根癌农杆菌 Ti 质粒, *etr1-1* 基因来源于拟南芥.

收稿日期:2004-02-19.

作者简介:胡艳,女,1978-,南京师范大学生命科学学院硕士研究生,主要从事植物生理学的学习与研究, E-mail: yxchuyan@sina.com

通讯联系人:陈国祥,1963-,南京师范大学生命科学学院教授,博士生导师,主要从事植物生理学方向的教学与研究.

E-mail: gxchen@njnu.edu.cn
万方数据

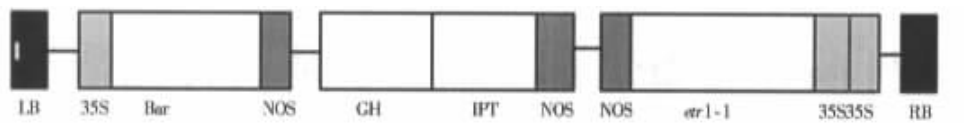


图 1 双元表达载体 dCaMV35S etr1-1-GHipt-pBBBast 中的 T-DNA 区段

1.2 PCR 引物设计

IPT 基因片断的引物,上游引物 5'GCACAGGAAAGACGACGACCG3',下游引物 5'AGCTCAGGGCTGCGCTAACCTAATA3';etr1-1 基因片断的引物,上游引物 5'TAGGGGAGGTGGTCGCTGTGAG3',下游引物 5'GTCGGGGAATGGCTGGAACCTT3'。etr1-1 基因和番茄中同源的 LeETR1、LeETR2、NR、LeETR4、LeETR5 用 clust-lax 软件进行序列比对,确定引物为 etr1-1 基因特异序列。

1.3 培养基及培养条件

植物培养基为 MS(质量分数为 3%蔗糖,8%琼脂),农杆菌培养基为 YEB、LB、YT。光照强度 2 000 lx,温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,光照周期 14 h 光/10 h 暗。

1.4 方法

1.4.1 根癌农杆菌的电激转化

参考杨华中等的方法^[7],将质粒 dCaMV35S etr1-1-GHipt-pBBBast 导入根癌农杆菌菌株 EHA105(Rif)中。在含有 Kan、Rif 的选择培养基上生长。挑单菌落培养,经菌落 PCR、电泳酶切检测,获得含质粒的工程菌株 EHA105。电激条件为:电压 2.5 kV/cm,电阻 200 Ω ,4~5 ms。

1.4.2 无菌外植体的获取

番茄种子在无菌水中预浸过夜,40℃水浴 20 min,2%次氯酸钠处理 10 min,无菌水清洗 3 次,点播于 1/2 MS 培养基中。暗培养 2~3 d 待发芽后,光照培养。10~12 d 后,当幼苗子叶充分展开,但还未有真叶生成时,选用子叶为外植体。子叶切除两端,中间部分横向一分为二,切成的小块即叶盘。

1.4.3 最佳培养基激素组合筛选

以 MS 为基本培养基,分别附加 BA(0.5,1.0,2.0,2.5 mg/L)和 IAA(0.2,0.5,1.0,2.0 mg/L)进行拉丁方正交组合设计,比较番茄子叶离体培养条件下不定芽分化情况。每种激素浓度配比接种子叶外植体 50 块,培养条件同上。观察子叶外植体的生长状况。30 d 后计算不定芽分化率。实验重复 3 次。

1.4.4 除草剂(PPT)敏感性筛选实验

以 MS + BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L 为基本培养基分别附加不同浓度的 PPT(0,1.0,2.0,3.0,4.0 mg/L)。常规方法接种叶盘。两周后观察愈伤组织生长状况。

1.4.5 农杆菌介导的转化

番茄子叶转化参照 Horsch^[8]及叶志彪等^[9]的方法并作修改。叶盘接种于预培养培养基(MS + BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L)中,叶片正面朝上,预培养 2 d。制备工程菌液用 MS 调节 OD 为 0.1~0.2 备用。用制备好的工程菌侵染液浸泡预培养 2 d 的子叶叶盘,充分浸润 5 min,无菌滤纸将叶盘适当吸干,叶片背面朝上,暗培养 48~72 h,培养温度为 28℃。将与农杆菌共培养后的叶盘转接到脱菌培养基(MS + BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L + 羧苄青霉素 500 mg/L)中,光照培养。5 d 后将叶盘转接于筛选培养基中(MS + BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L + 羧苄青霉素 500 mg/L + PPT 3.0 mg/L),每 14 d 转接 1 次。当抗性芽长至 2 cm 左右时,从外植体上切下,剔净基部愈伤组织,转入生根培养基(1/2MS + IAA 0.2 mg/L + PPT 3.0 mg/L + 羧苄青霉素 100 mg/L)中。待根系发达后,移栽到土壤中。

1.4.6 再生植株的 PCR 分析

按文献报道的方法^[10]提取转化和未转化植株叶片中总 DNA。琼脂糖电泳鉴定纯度及浓度。以此为模板分别用 IPT 基因片断、etr1-1 基因片断引物进行 PCR 扩增。PCR 反应程序分别为 94℃变性 2 min,94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 50 s,30 个循环,72℃ 7 min 和 95℃变性 2 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 7 min。

1.4.7 总 RNA 提取

以转化植株和未转化植株为材料,按 Trizol reagent(购于 Invitrogen 公司)提供的方法进行。紫外分光光

度法测定 RNA 的浓度及纯度,再进行甲醛琼脂糖电泳鉴定提取的 RNA 质量。

1.4.8 RT-PCR

按 BD 公司 PowerScript™ Reverse Transcriptase 提供的 Protocol-at-a-glance 进行,以反转录得到的 cDNA 为模板,以 *etr1-1* 基因片断引物进行 PCR 扩增。

2 实验结果

2.1 最佳生芽培养基激素组合筛选

6-BA 浓度在 0.5 ~ 2.5 mg/L 的范围内对愈伤组织的诱导没有明显的差异,子叶叶盘愈伤组织诱导率均为 100%。但当 6-BA 浓度超过 5 mg/L 时,叶盘愈伤组织的诱导受到抑制,形成愈伤组织的量比其它组合少且开始变成黄褐色。陈火英等^[11]也观察到这一现象。从统计结果(表 1)可以看出,在诱导不定芽形成方面,低浓度 IAA 优于高浓度 IAA。这可能是番茄内源性生长素浓度比较高所致。高浓度生长素促进了不定根的形成因而抑制了芽的分化。番茄品种 TM-Cherry-94-引-1 愈伤组织形成和不定芽诱导的最佳激素组合为 6-BA 1.0mg/L + IAA 0.2mg/L,此培养条件下叶盘的出愈率为 100%,不定芽形成率为 $87.4 \pm 2.0\%$ 。愈伤组织为淡绿色,结构致密,不定芽分化率高且分化较早(培养约 25 d 即开始分化出绿色芽点)形成的不定芽生长旺盛(图 2)。汤福强等^[12]在研究番茄子叶外植体芽的分化过程与乙烯释放关系时发现,培养在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L 液体培养基中的叶盘伤害乙烯释放最少。

表 1 在不同浓度 BA/IAA 组合条件下,叶盘不定芽诱导率

IAA(mg/L)	6-BA(mg/L)			
	0.5	1.0	2.0	2.5
0.2	10.1 ± 2.4 *	87.4 ± 2.0	75.6 ± 7.4	7.5 ± 1.6
0.5	71 ± 12.4	68.3 ± 4.8	16.7 ± 1.9	15.0 ± 3.0
1.0	76.6 ± 1.8	68.7 ± 4.9	57.2 ± 14.0	1.0 ± 0.1
2.0	1.33 ± 0.3	21.2 ± 0.9	3.6 ± 0.6	1.6 ± 0.2

注:实验结果为 3 次实验的平均值,* 不定芽诱导率%。



图 2 番茄子叶叶盘在 MS + BA 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L 培养基中培养 30 d 后不定芽分化

2.2 叶盘对除草剂(PPT)敏感性实验

PPT 是一种高效低毒的广谱除草剂。对于番茄品种 TM-Cherry-94-引-1,当 PPT 浓度为 1.0 mg/L 时,仅在伤口处有少量愈伤组织形成且生长缓慢,出愈率为 81%,没有不定芽形成。2.0 mg/L 时叶盘仅叶脉处稍有膨大,叶盘持绿率为 49%。至 PPT 浓度为 3.0 mg/L 和 4.0 mg/L 时,叶盘愈伤组织完全不能形成,二周内叶盘全部变黄。确定筛选选择压为 PPT 浓度 3.0 mg/L。

2.3 农杆菌感染及子叶外植体培养与再生

农杆菌感染的番茄子叶外植体在选择性芽分化培养基上培养 2 周后,大多数叶盘逐渐褪绿,变黄,最终变褐死亡。仅有少数在切口处形成少量愈伤组织且生长缓慢,叶盘其它部分逐渐坏死,形成绿岛。经过大约 4 周的筛选培养,愈伤组织上形成绿色小芽点分化出不定芽(图 3)。但有的仅分化 1 ~ 2 片叶片的畸型芽或叶状芽。待生长正常的抗性芽长到 1 ~ 2 cm 时将其切下,转接到生根培养基中生根,直至形成完整的植株(图 4)。

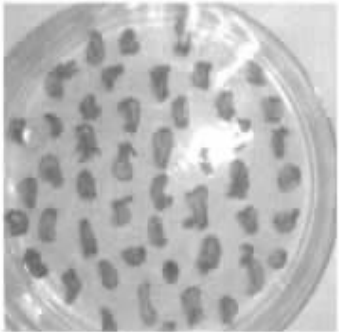


图 3 农杆菌侵染后的番茄子叶叶盘在筛选培养基中形成不定芽



图 4 番茄转化再生植株

2.4 IPT 基因的 PCR 扩增

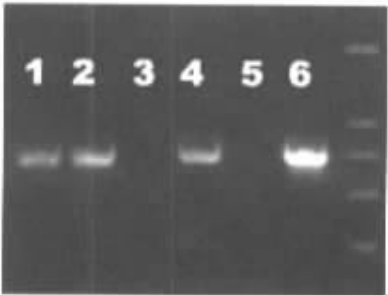
以番茄 PPT 抗性苗总 DNA 和未转化植株总 DNA 为模板 ,用 IPT 基因片断引物进行 PCR 检测(图 5).阳性对照及转化体 1 号、2 号和 4 号抗性苗扩增出约 700 bp 的 IPT 编码序列的特异条带.3 号没有扩增出 IPT 基因的特异条带.阴性对照也没有出现此条带.结果说明 IPT 基因已经整合到番茄基因组中.由于本实验采用了延迟筛选的方法 ,所以出现了假转化体.

2.5 etr1-1 基因的 PCR 扩增

用 etr1-1 序列特异性引物对 IPT 基因片断引物 PCR 检测阳性转化株 1 号 2 号 4 号进行 PCR 检测(图 6).阳性对照及 1 号、2 号和 4 号抗性苗均扩增出预期的 1 100 bp etr1-1 序列的特异性条带.未转化番茄植株没有特异性条带出现.初步鉴定 IPT 和 etr1-1 基因均已整合到植物基因组中.

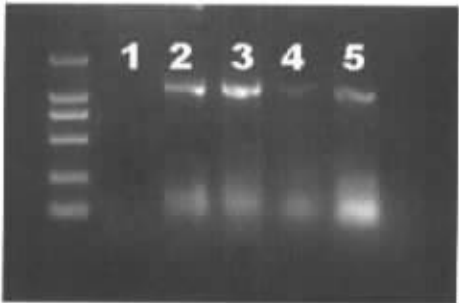
2.6 RT-PCR

提取转化体 1 号、2 号和 4 号抗性苗总 RNA.用 etr1-1 序列特异性引物以 1 号、2 号和 4 号转化株 cDNA 为模板 ,通过 PCR 扩增得到 1 100 bp 的特异性条带(图 7).以未转化株作为对照 ,没有此条带出现.



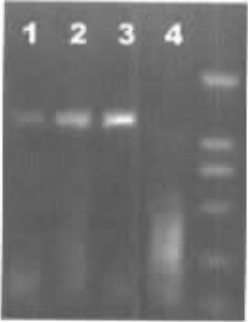
1~4:分别为 1 号泳道 2 号泳道 3 号泳道 4 号泳道 5:未转化植株对照 泳道 6:质粒 DNA 阳性对照

图 5 番茄转化再生植株(1~4 号)IPT 基因 PCR 扩增检测结果



泳道 1:未转化植株 泳道 2:质粒 DNA 阳性对照 3~5:分别为泳道 1、2、4

图 6 番茄转化再生植株(1、2、4)etr1-1 基因 PCR 扩增检测结果



1~3 分别为泳道 1、2、4 4:未转化植株对照

图 7 番茄转化再生植株(1、2、4)RNA RT-PCR 结果(etr1-1 基因引物扩增)

3 小结

在本研究中我们采用了农杆菌介导的转化方法将 IPT 和 etr1-1 双基因导入番茄中 ,以广谱性除草剂 PPT 作为筛选标记 ,获得了转化再生植株.在实验过程中我们发现 (1) 番茄种子经过预浸和 40℃ 高温处理 ,促进了种子发芽 ,而且出苗一致.(2) 子叶外植体优于下胚轴 ,子叶不定芽再生率高于下胚轴.子叶预培养 2~3 d 最好.未经预培养的子叶叶盘直接侵染时 ,切口处常有褐化现象.但预培养时间过长 ,子叶叶盘切口已经愈合 ,也不利于农杆菌吸附.(3) 农杆菌菌液浸泡后的叶盘要用无菌滤纸适当吸干.农杆菌与外植体的共培养时间以培养基上出现菌落但叶盘切口处没有明显的褐变现象为准.(4) 筛选方法以延迟筛选最好.由于番茄子叶叶盘对 PPT 比较敏感 ,采用早期筛选的方法很难获得转化植株.采用延迟筛选即在脱菌培养 5 d 后再转到筛选培养基中 ,由于非转化细胞对转化细胞的滋养作用 ,促进转化细胞的生长 ,保证了一定比率的转化植株形成而又不会产生太多的假转化体.(5) 在生根培养基中需降低羧苄青霉素的浓度.高浓度的羧苄青霉素不利于根的生长.张七仙^[12]等的研究也发现高浓度的羧苄青霉素会使甘蓝再生苗形成的不定根短而细弱.

果实的成熟是一个非常复杂的过程 ,是激素水平、矿质养分、水份代谢、脂类代谢、活性氧代谢等因素综合作用的结果.在诸多因素中 ,细胞分裂素调节衰老的作用得到了普遍的肯定 ,但是其作用机制以及与其它调节因素(其它激素、矿质营养等)的关系尚不完全清楚.研究发现 ,细胞分裂素不仅降低了植物对乙烯的敏感性 ,而且抑制了乙烯的合成.但也有观察表明 ,低浓度的细胞分裂素促进乙烯的合成.这些说明在控制衰老方面细胞分裂素和乙烯之间的相互作用相当复杂.本实验建立了含 IPT 和 etr1-1 双基因的番茄转化再生植株 ,为探明细胞分裂素和乙烯之间的作用、细胞分裂素作用机理、乙烯的信号传导提供了良好的

模型.对 IPT 和 *etr1-1* 双基因的导入带来的番茄生理性状的改变,我们将作进一步探讨.

[参考文献]

- [1] Gan S , Amasino R M. Making Sense of Senescence(Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence【 J】. Plant Physiology ,1997 ,113(2) 313—319.
- [2] Caren Chang , Shing F K , A B Bleecker , *et al.* Arabidopsis Ethylene-Response Gene ETR1 Similarity of product to Two Component Regulators【 J】. Science ,1993 ,262(5133) 539—544.
- [3] Fernando I , Rodríguez , Jeffrey J Esch , *et al.* A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from Arabidopsis【 J】. Science , 1999 ,283(5404) 996—998.
- [4] Jordy W , Schapendonk A , Davelaar E , *et al.* Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence , photosynthesis and N partitioning【 J】. Plant cell and environment 2000 ,23(2) 279—289.
- [5] Gan S , Richard M Amasino. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin【 J】. Science ,1995 ,270(5244) : 1986—1988.
- [6] Liu Z B , Ulmasov T , Shi X , *et al.* Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements【 J】. The Plant Cell ,1994 ,6(5) 645—657.
- [7] 施华中 杨宏远.根癌农杆菌的高效电激转化【 J】. 武汉大学学报(自然科学版) ,1995 ,41(6) :742—748.
- [8] Horsch R B. Leaf disc transformation【 J】. Plant Molecular Biology Manua ,1988 ,10(1) :1—9.
- [9] 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.
- [10] 毛国杰 欧阳青 蔡文启. 一种适于转基因番茄检测的高效稳定的 DNA 提取方法【 J】. 农业生物技术学报 ,2001 ,9(4) : 363—365.
- [11] 陈火英 张建华 钟建江. 番茄下胚轴离体培养植株再生及其组织学观察【 J】. 西北植物学报 ,2000 ,20(5) :759—765.
- [12] 汤福强 刘愚 施教耐,等. 番茄子叶外植体芽的分化过程与乙烯释放的关系【 J】. 植物生理学报 ,1996 ,22(2) :152—156.

Tomato Transformation and Plant Regeneration by *Agrobacterium* Harboring Binary Vector Carrying IPT and *etr1-1* Genes

Hu Yan¹ , Chen Guoxiang¹ , Li Caojun¹ , Liu Shaohua²

(1. School of Life Science , Nanjing Normal University , 210097 , Nanjing , China)

(2. Department of Life Science , Nanjing Xiaozhuang College , 210017 , Nanjing , China)

Abstract The high-frequency regeneration system of Cherry tomato(*Lycopersicon esculentum* Mill) was established. Taking orthogonal experiment , the optimal combination and concentration of hormones were BA 1.0 mg/L and IAA 0.2 mg/L. The agrobacterium-mediated transformation system was optimized : OD_{600} 0.1 ~ 0.2 was the fitful bacteria concentration for invading ; the explants and the bacteria had been best co-cultured for 48 hours ; choosing after being cultured in medium without PPT for 7 days were better ; the optimal choice press is PPT 3 mg/L. Both IPT and *etr1-1* genes were transferred into tomatoes with agrobacterium-mediated transformation. With PPT resistance as choice mark , three transgenic plants were regenerated with success. The transgenic tomato plants were confirmed by PCR analysis and RT-PCR analysis. By PCR analysis , the results indicated that the foreign genes had been integrated into the genome of cherry tomato. The RT-PCR analysis showed that the *etr1-1* gene had been transcribed.

Key words tomato , *etr1-1* , IPT , genetic transformation

[责任编辑 孙德泉]