

文章编号: 1001-411X(2002)04-0034-03

黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转化番茄的研究

胡开林, 付群梅, 汪国平, 胡志群

(华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要: 通过根癌农杆菌介导, 采用叶盘转化法, 探讨了黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-CP)基因导入番茄栽培品种‘红宝石’的适宜条件. 结果表明: 适宜的卡那霉素(Km)浓度、根癌农杆菌浓度、根癌农杆菌感染时间以及共培养时间分别为 35 mg/L, D_{600} 约 0.5、10~15 min 和 2~3 d; 将诱导形成的抗性愈伤组织转接到含有 35 mg/L Km 的分化培养基和生根培养基中使其分化不定芽和生根, 获得了抗 Km 的番茄再生植株. 对再生植株进行再次离体培养抗 Km 鉴定和 PCR 分子检测, 初步证明 CMV-CP 基因已导入番茄再生植株的基因组中.

关键词: 番茄; 根癌农杆菌介导转化; CMV-CP 基因

中图分类号: Q789

文献标识码: A

番茄病毒病是影响番茄产量和品质的主要病害之一. 已报道的危害番茄的病毒种类有 20 多种, 其中黄瓜花叶病毒(CMV)是番茄病毒病中发生最为普遍、危害最为严重的毒源种类^[1]. 长期以来, 蔬菜育种者试图通过常规育种和远缘杂交手段解决这一世界性病害, 但由于栽培品种中缺乏对 CMV 具有抗性的材料, 以及利用番茄野生种或茄属类番茄茄时存在远缘杂交诸多障碍, 致使通过该手段尚鲜见有育成品种的报道. 近 10 多年来, 随着分子生物学研究的发展, 利用基因工程技术为防治植物病毒病开辟了一条新途径. 通过根癌农杆菌介导, 将黄瓜花叶病毒外壳蛋白(CMV-CP)基因导入番茄, 已被证明是减轻番茄发生黄瓜花叶病毒病的有效方法^[2,3]. 本研究以广东和广西两省区种植面积较大的‘红宝石’番茄品种为供试材料, 探讨根癌农杆菌介导转化番茄的影响因素, 试图建立根癌农杆菌介导转化番茄的实验体系, 为利用基因工程技术提高番茄抗 CMV 能力提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 植物材料

番茄(*Lycopersicon esculentum* var. Hongbaoshi)种子经 $\varphi=75\%$ 酒精 30 s, $\varphi=7\%$ 饱和次氯酸钠 15 min 表面消毒后, 用灭菌蒸馏水冲洗 3 次, 然后接种于 1/2MS 基本培养基上进行培养. 取发芽 7~10 d 的无菌苗的子叶作为转化材料.

1.2 根癌农杆菌菌种及其培养

根癌农杆菌菌株为 LBA4404, 内含一个 NPT II 基因作为卡那霉素(Km)抗性筛选的标记基因和一个长度为 740 bp 的 CMV-CP 基因, 由华南农业大学资源环境学院李华平教授提供.

菌种接种于添加 Km 35 mg/L 的 LB 液体培养基中, 放到 28℃、150 r/min 摇床中培养 14 h, 至菌液

D_{600} 为 0.8~1.0.

1.3 番茄外植体的培养以及 CMV-CP 基因的转化

取培养 7~10 d 无菌苗的子叶, 用解剖刀切去子叶两端再横切成 2 块, 作为离体培养的外植体及转化受体. 对照的子叶外植体接种到 15 # 分化培养基^[4] (MS 大量元素、铁盐+H 微量元素、有机成分+0.2 mg/L IAA+2 mg/L 6-BA+6 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖, pH 5.8. 下同)上, 然后将分化形成的 2~3 cm 长的不定芽转到生根培养基^[4] (1/2MS+0.5 mg/L IBA+6 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖, pH 5.8. 下同)中使其生根. CMV-CP 基因转化时, 子叶外植体首先接种到添加不同浓度 Km(0.25、35、50、75 和 100 mg/L)的 15 # 分化培养基上, 筛选出适宜的 Km 浓度. 再将子叶外植体放入用 MS 液体培养基稀释不同倍数(1 倍、10 倍、20 倍、50 倍和 100 倍)的农杆菌菌液中浸泡(5、10、15、20 和 30 min). 倒掉农杆菌菌液后用灭菌滤纸吸去子叶外植体表面过多的菌液. 接种到 15 # 分化培养基上进行共培养(1、2、3 和 4 d). 随后再转到选择分化培养基(15 # 分化培养基+500 mg/L 羧苄青霉素+35 mg/L Km, pH 5.8. 下同)上培养 20 d 左右. 将获得的抗性愈伤组织转移到相同的选择分化培养基上分化不定芽. 待抗性不定芽长至 2~3 cm 时, 将其转入选择生根培养基(生根培养基+35 mg/L Km, pH 5.8. 下同)中诱导根的形成.

1.4 番茄再生植株的抗 Km 鉴定以及 PCR 检测

(1)再生植株的抗 Km 鉴定: 将在选择生根培养基中生根的再生植株叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 大小的切块, 再次接种到选择分化培养基上, 培养 30 d 后, 观察抗性愈伤组织及不定芽的分化形成情况.

(2)再生植株的 PCR 检测: 切取在选择生根培养基中生根的再生植株和对照离体培养植株的叶片 1.0 g, 参照 Hadidi 等^[5] 的方法分别提取植株总 DNA. 质粒 DNA 的提取和纯化用碱裂解法^[6]. 根据 CMV-

CP 基因序列^[7]设计并合成 PCR 2 个引物(由上海生物工程公司合成), 引物 1: 5' CATGACCATGGA-CAAATCAAC 3'; 引物 2: 5' CTCTCCATGGCGCATTCA 3'.

以抗性再生植株和对照离体培养植株的总 DNA 及质粒 DNA 为模板, 加入 2 个引物、反应缓冲剂、*Taq* 酶和 dNTP 后, 用 PCR 仪扩增 CMV-CP 基因. PCR 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳并成像.

2 结果与分析

2.1 番茄子叶离体培养再生植株

子叶外植体经培养 1 周左右, 在切口处便产生肉眼可见的愈伤组织, 第 2 周分化形成绿色小芽点, 第 3 周伸长形成不定芽, 共接种了 65 个子叶外植体, 其中 51 个分化出不定芽, 不定芽分化率达 78. 4%, 而且, 平均每个外植体可分化出 5. 6 个不定芽. 待不定芽长至 2~3 cm 时, 将其转到生根培养基中, 5 d 后开始长根, 并逐渐形成完整的再生植株.

2.2 CMV-CP 基因的转化及 Km 抗性植株的再生

(1)番茄子叶外植体对 Km 的敏感性: 不同 Km 浓度对抑制未转化子叶外植体形成愈伤组织的结果(表 1)表明, 35 mg/L 的 Km 能够完全抑制未转化的子叶外植体形成愈伤组织. 因此, 在分化培养基中可以添加 35 mg/L Km 作为抗性筛选压.

(2)根癌农杆菌浓度及感染时间对筛选获得抗性愈伤组织的影响: 用高浓度(稀释 1 倍)菌液感染 115 个子叶外植体时发现, 在 1 min 内, 几乎所有子叶外植体均出现萎蔫和颜色变暗的现象, 共培养 2 d 后, 大多数褐变死亡, 选取其余绿色外植体转接到选择分化培养基上进行培养, 随后全部也褐变死亡; 而用稀释 50 倍和 100 倍的菌液分别感染 150 和 101 个子叶外植体 15 min 后, 外观上几乎没有变化, 在随后的选择培养过程中, 子叶外植体只膨大, 没有形成愈伤组织; 当用稀释 10 倍和 20 倍的菌液感染子叶外植体 15 min 后, 在切口处出现稍稍萎蔫, 但仍然保持绿色, 分别对 159 和 180 个子叶外植体进行了稀释 10 倍和 20 倍浸菌处理, 结果在选择培养过程中分别有 3 和 9 个子叶外植体形成了抗性愈伤组织. 同时, 用稀释 20 倍的农杆菌菌液进行不同感染时间对筛选获得抗性愈伤组织的结果表明, 感染时间以 10 或 15 min 为宜, 试验分别对 841 和 783 个子叶外植体进行了 10 和 15 min 的浸菌处理, 共培养 2 d 转接到选择分化培养基上, 随后分别有 8 和 10 个子叶外植体形成了抗性愈伤组织; 但感染时间为 5、20 或 30 min 时, 子叶外植体在选择培养过程中均未形成愈伤组织, 而且, 当感染时间超过 20 min 时, 子叶外植体在选择分化培养基上培养 2 周左右, 大部分外植体褐变死亡, 培养基污染也较为严重. 因此, 初步认为用稀释 10~20 倍的根癌农杆菌菌液感染番茄子叶外植体 10~15 min 对转化番茄是适宜的.

表 1 番茄子叶外植体对卡那霉素(Km)敏感性试验
Tab. 1 Kana mycin sensitivity of tomato cotyledon explants

$\rho(\text{Km})$ / $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	接种外植 体数 no. of explants cultured	形成愈伤组织的外 植体数 no. of explants producing callus	外植体状 况 condition of explants ¹⁾
0	55	49	+++
25	66	2	+
35	66	0	—
50	64	0	—
75	65	0	—
100	63	0	—

1)' +++' 示能正常形成愈伤组织; '+' 示大多数只膨大不形成愈伤组织; '—' 示完全不能形成愈伤组织、变褐色死亡

(3)根癌农杆菌与番茄子叶外植体共培养时间对筛选获得抗性愈伤组织的影响: 分别对 102、110、83 和 105 个子叶外植体与根癌农杆菌进行共培养 1、2、3 和 4 d, 结果共培养 1 d 时, 子叶外植体在选择培养过程中只膨大, 没有形成愈伤组织; 而共培养 4 d 后, 大部分子叶外植体褐变死亡, 只有少数外植体能转到选择分化培养基上培养, 且在随后的培养过程中均未形成愈伤组织; 将子叶外植体与农杆菌共培养 2 和 3 d, 在随后的选择分化培养基上分别有 2 和 1 个子叶外植体形成了抗性愈伤组织. 表明共培养 2~3 d 较有利于筛选获得抗性愈伤组织.

(4)抗性愈伤组织分化不定芽及其生根: 将在选择分化培养基上诱导形成的其中 22 个抗性愈伤组织转到相同培养基继续培养 30 d 后, 其中 18 个愈伤组织分化形成 32 个不定芽. 再将生长良好的 9 个不定芽从基部剪下转到选择生根培养基中, 培养 10 d 后, 其中 6 个不定芽开始形成根, 随后长成完整的再生植株; 其余 3 个不定芽没有形成根, 随后死亡.

2.3 再生番茄植株的抗 Km 鉴定以及 PCR 检测

对在选择生根培养基中获得的其中 4 株抗性再生植株进行抗 Km 鉴定及 PCR 检测的结果表明, 两种方法所得结论一致, 即总共培养了来自 4 株不同再生植株的 15 个叶片外植体, 其中有来自同一再生植株的 4 个外植体形成了抗性愈伤组织并分化出不定芽, 而来自另外 3 株再生植株的 11 个外植体未能形成愈伤组织, 叶片外植体在选择分化培养基中逐渐变褐后死亡; 同样, 以质粒 DNA 为阳性对照、未转化的离体再生植株叶片的总 DNA 为阴性对照, 与上述 4 株抗性再生植株叶片的总 DNA 进行 PCR 扩增的结果表明, 阳性对照及 4 株再生植株中的 1 株(与抗 Km 鉴定出的植株相同)扩增出了预期的 740 bp 的 DNA 片段, 而未转化植株及 4 株再生植株中的另外 3 株没有扩增出该 DNA 片段(图 1). 初步证明 CMV-CP 基因已整合到其中的 1 株番茄再生植株的基因组中.

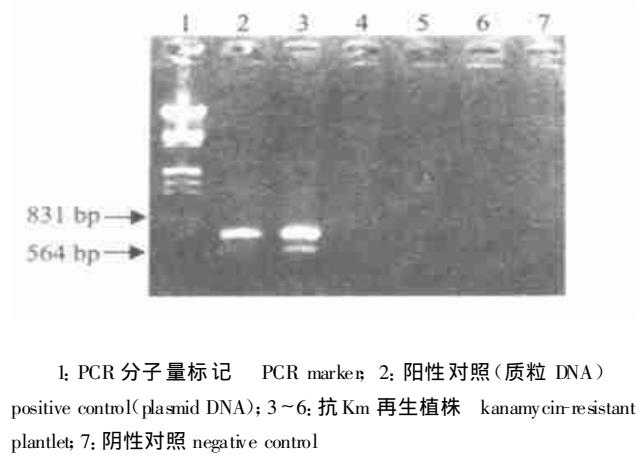


图 1 PCR 扩增检测结果
Fig. 1 PCR amplification results

3 讨论

采用根癌农杆菌介导叶盘直接浸泡法进行外源基因转化时,根癌农杆菌浓度、外植体浸菌时间及根癌农杆菌与外植体共培养时间对转化有较大影响.李华平等^[7]报道在对烟草进行转化时,转化效果较好的农杆菌浓度为稀释 10 倍,而稀释 100 倍则偏低,不稀释易造成污染.本试验结果与此基本一致.有关农杆菌感染番茄外植体的适宜时间,也存在较大差异,傅荣昭等^[8]认为感染时间在数秒至数分钟内,以叶盘边缘稍微湿润为宜.Xue 等^[2]将番茄外植体在农杆菌菌液中浸泡 15 min,获得了高抗 CMV-WL 的转基因植株.本试验中也发现,农杆菌感染时间与农杆菌浓度有关(结果待发表).农杆菌与外植体共培养时间通常以 2~3 d 为宜,但也与农杆菌浓度、温度、

植物材料有关,本试验的结果与傅向东等^[9]用农杆菌转化烟草的结果一致.关于转基因植株的检测方法,PCR 具有快速、DNA 用量少、适用于早期检测的优点,但有时会产生检测误差.本试验将获得的抗性再生植株进行再次离体培养抗 Km 鉴定取得与 PCR 检测一致的结果,它的可靠性则有待进一步研究.

参考文献:

[1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[M]. 北京: 科学出版社, 1995. 236—240.
[2] XUE B, GONSALVES C V, PROVIDENTI R. Development of transgenic tomato expressing a high level of resistance to cucumber mosaic virus of subgroup II [J]. Plant Disease, 1994, 78: 1038—1041.
[3] 杨荣昌, 徐鹤林, 龙明生, 等. 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的转基因番茄对 CMV 的抗性[J]. 江苏农业科学, 1995, 11(1): 42—46.
[4] 张长远, 吴定华. 秘鲁番茄茎段原生质体再生成株的研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(3): 15—20.
[5] HADIDI A, MONTASSER M S, LEVY L, et al. Detection of potato lesfrill and strawberry mild yellow—edge lutes viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification [J]. Plant Disease, 1993, 77: 595—601.
[6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 19—22.
[7] 李华平, 胡晋生, BARRY K, 等. 黄瓜花叶病毒香蕉株系的衣壳蛋白基因克隆和序列分析[J]. 病毒学报, 1996, 12(3): 235—242.
[8] 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. 1—12.
[9] 傅向东, 毛碧增, 李德葆. 根癌农杆菌转化抗虫基因获得转基因烟草[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(6): 663—666.

Studies on Transformation of *Lycopersicon esculentum* with Cucumber Mosaic Virus Coat Protein Gene

HU Kai-lin, FU Qun-mei, WANG Guo-ping, HU Zhi-qun
(College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: By means of the leaf disk transformation with the help of *Agrobacterium tumefaciens*, several factors for transferring cucumber mosaic virus coat protein (CMV-CP) gene into tomato cultivar ‘Hongbaoshi’ were studied. The results showed that the appropriate concentration of kanamycin(Km), the concentration of *A. tumefaciens*, the soaking time in liquid medium containing *A. tumefaciens* and the co-cultivation time were 35 mg/L, $D_{600} \approx 0.5$, 10~15 min and 2~3 d respectively. Calli from cotyledon explants grown on the medium containing 35 mg/L Km were transferred to the same medium for shoot regeneration, Km-resistant plantlets were obtained on the root-inducing medium. By testing the Km-resistant ability of transformed plantlets cultured on the medium with 35 mg/L Km again and performing PCR assay, it was confirmed preliminarily that the CMV-CP gene was integrated into the genome of tomato plantlet.

Key words: *Lycopersicon esculentum*; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; CMV-CP gene

【责任编辑 柴 焰】