

## AGPase 反义基因转化番茄研究\*

杨正安<sup>1</sup>, 张应华<sup>1</sup>, 丁玉梅<sup>2</sup>, 许彬<sup>1</sup>, 张兴国<sup>3</sup>

(1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省农业生物技术重点实验室, 云南 昆明 650203;  
3. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

**摘要:** 将含有魔芋 AGPase 反义基因的质粒 pBAGP 通过冻融法转化到根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404 中, 再采用叶盘法将其转化进番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 栽培品种“合作 908”中, 获得含 AGPase 基因的番茄抗性植株。最后, 经卡那抗性鉴定、NPT II 基因和 AGPase 基因 PCR 扩增和 PCR - Southern 杂交检测表明, 反义 AGPase 基因成功整合到番茄基因组, 为番茄改良品质育种奠定了材料基础。

**关键词:** 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶; 反义载体; 遗传转化; 番茄

中图分类号: S 641.2.032 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2008)02-0158-04

## Study on Genetic Transformation of Tomato Using AGPase Anti-Sense Gene

YANG Zheng-an<sup>1</sup>, ZHANG Ying-hua<sup>1</sup>, DING Yu-mei<sup>2</sup>, XU Bin<sup>1</sup>, ZHANG Xing-guo<sup>3</sup>

(1. Faculty of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;  
2. Biotechnology Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China;  
3. College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** Carrying an *Amorphophallus* adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase (AGPase) anti-sense gene under the drive of CaMV35S promoter, the plasmid pBAGP was transferred into tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivar “Hezuo908” via agrobacterium-mediated transformation. The results of anti-kanamycin test, PCR amplifications of AGPase gene and NPT II gene and PCR-southern blotting proved that AGPase anti-sense gene was successfully integrated into genome of tomato, which provided a material basis for improving tomato breed.

**Key words:** Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase (AGPase); anti-sense vector; genetic transformation; *Lycopersicon esculentum*

近年来, 番茄育种在抗病、抗逆和品质改良等方面, 都取得了很大的进展。这是因为番茄作为一种重要的蔬菜作物一直是蔬菜育种的重点研究对象, 另一方面是由于番茄作为一种模式植物, 在生理生化、遗传学和分子生物学方面得到了比其它蔬菜作物更广泛、更深入、更系统的研究结果。改良番茄品质, 提高番茄糖分含量, 是番茄育种目标之一<sup>[1,2]</sup>, 腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (Adenosine

diphosphate glucose pyrophosphorylase, AGPase) 是淀粉生物合成过程中的关键酶<sup>[3]</sup>, Robinson 等<sup>[4]</sup>推测如果改变 AGP 和淀粉合成酶的活性, 可能改变番茄库代谢和促进可溶性糖积累。Schaffer 等<sup>[5]</sup>的试验也证实了这一推测。但部分试验表明, 番茄蔗糖的积累受酸性转化酶活性的调节<sup>[6,7]</sup>。采用基因工程改良番茄甜度方面, 目前针对酸性转化酶研究较多<sup>[8,9]</sup>。对番茄的淀粉合成调控的研究, 主要集

收稿日期: 2007-06-14

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (30571275)

作者简介: 杨正安 (1974-), 男, 云南建水人, 讲师, 在读博士, 主要从事蔬菜生物学及生物技术研究。

中在调控途径和机理等方面, 而采用 AGPase 基因对番茄进行遗传转化, 改良番茄淀粉品质, 从而研究番茄淀粉含量与糖分二者之间的关系, 目前报道较少。本研究用 AGP 反义基因转化番茄, 可望为探讨番茄淀粉的调控机理和品质改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

番茄品种“合作 908”购自上海长征良种试验场。

### 1.2 农杆菌菌株及质粒

质粒 pBAGP 结构如图 1 所示, pBAGP (11kb) 含有来自于魔芋 AGPase 小亚基约 500bp 的反义片段, 以 CaMV35S 为启动子。筛选标记基因为 Nos 启动子驱动的 NPT II 基因。该质粒在西南农业大学南方蔬菜遗传育种与栽培重点实验室构建并保存, 并通过冻融法转入农杆菌 LBA4404 中, 用于番茄的遗传转化。

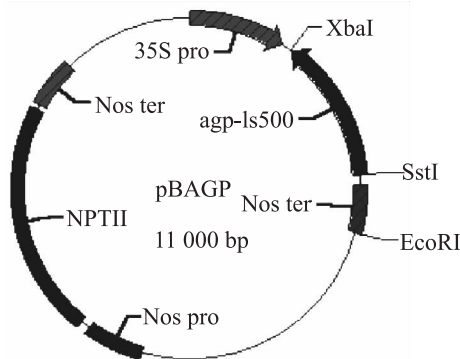


图 1 表达载体 pBAGP

Fig. 1 Expression vector of pBAGP

### 1.3 引物

AGPase 引物、NPT II 引物由上海生工合成, 序列如下:

AGPase: Primer A: 5' - CGCGAGCTCGG-TACTGCAGATGCTGT - 3'

Primer B: 5' - CGGTCTAGAG-TACCAATGTCTTCCCAGT - 3'

NPT II: Primer 1: 5' - GAGGCTATTCCGC-TATGACTG - 3'

Primer 2: 5' - ATCGGGAGCG-GCGATACCGTA - 3'

### 1.4 番茄外植材料的获得

挑选成熟饱满的番茄种子, 在无菌条件下用 75% 乙醇浸泡 3 min, 再用 0.1% 升汞灭菌 10 min,

其间不时摇动。无菌水洗涤 5~6 次, 播种于 MS0 培养上, 于 28 °C 暗培养条件下发芽, 发芽后在光照 (2 000 lx, 8 h) 条件下生长 1 周, 取带叶柄的子叶预培养一定时间后用于转化。

### 1.5 外植体浸染及植株再生

挑取含有重组质粒的农杆菌 LBA4404 单菌落, 接种于加链霉素和卡那霉素的 10 mL 液体 YEB 中, 28 °C 200 r/min 振荡培养过夜, 次日再用液体 YEB 以 1:25 比例活化培养到 OD 值为 0.6, 菌液于转化前用 MS0 稀释 10 倍。收集预培养基 (MS + ZT 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L) 上的子叶放在培养皿中, 倒入稀释好的菌液, 轻轻摇动以使外植体和菌液充分接触, 浸染 15 min 后, 取出子叶, 置无菌滤纸上吸去多余菌液, 接于共培养基上, 28 °C 暗培养 2 d。经共培养的外植体, 转入含有 Carb 500 mg/L 和 Kan 50 mg/L 的 MS + ZT 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L 培养基, 每隔 2~3 周更换新鲜培养基, 并逐渐降低 Carb 浓度至 200 mg/L。经筛选再生的抗生芽接到含有 Carb 200 mg/L + Kan 50 mg/L 的 MS + IAA 0.5 mg/L 的培养基上进行生根培养, 待幼苗生长至 2~3 片真叶时, 进行幼苗锻炼, 移栽入土。

### 1.6 抗性植株的 PCR 及 PCR-southern 验证

采用 CTAB 法, 提取番茄基因组 DNA, 分别采用 AGPase 引物 A 和 B, Npt II 引物 1 和引物 2 进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 在 100  $\mu$ L PCR 反应体系中加入 10  $\times$  PCR 反应缓冲液 10  $\mu$ L, 50 ng 模板 DNA, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5' 端和 3' 端引物各 0.1  $\mu$ mol/L, 2 units Taq DNA 聚合酶, 各种 dNTP 为 0.2 mmol/L。反应条件: 95 °C 总变性 180 s, 94 °C 变性 60 s, 55 °C 退 60 s, 72 °C 延伸 90 s, 共进行 35 个循环, 72 °C 总延伸 10 min, PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

PCR-southern 检测, 参照王关林等<sup>[10]</sup>方法进行。

## 2 结果与分析

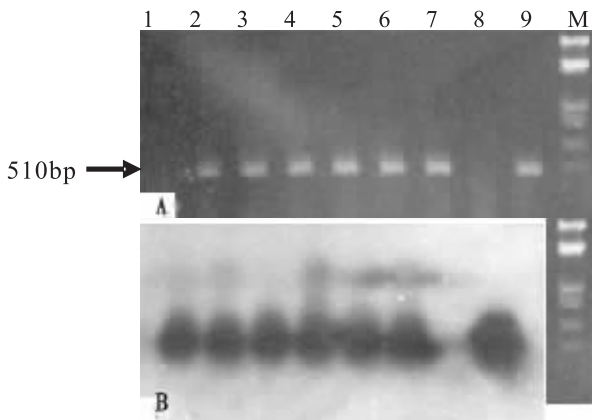
### 2.1 转基因番茄 Kan 抗性植株的获得

番茄外植体经含有 pBAGP 的农杆菌 LBA4404 侵染后, 共培养 2 d, 在含有 Carb 500 mg/L 和 Kan 50 mg/L 的 MS + ZT 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L 培养基上进行筛选培养。3 周后, 开始形成抗性愈伤组织, 抗性愈伤组织在继代过程中, 大部分失去分化能力, 变得松散, 黄化死亡, 少数愈伤组织仍保持

绿色且质地较紧密，并逐渐分化出芽，而未侵染对照则完全黄化死亡（图 2），当抗性植株生长至 3~4 片真叶时，转入含 Carb 200 mg/L 的 MS + IAA 0.5 mg/L 培养基上，进行生根培养，诱导生根，抗性植株经 2~3 d 练苗后，移栽入蛭石。分析转化及植株再生的结果表明：侵染 278 个外植体，共获得 Kan 抗性愈伤 92 个，其中分化抗性芽 30 个，分化频率为 10.79%。抽取其中 10 株抗性植株进行 PCR 检测，6 株表现了阳性，阳性率为 60%。根据外植体总数计算的转化频率为 6.4%，说明该体系是一个有效的转化体系，适用于该番茄品种，另外，造成假阳性的原因，推测是 Kan 选择压强度不足所致。

2.2 转基因番茄抗性植株的 PCR 检测

CTAB 法提取番茄基因组 DNA，分别采用 AGPase 引物 A 和 B，Npt II 引物 1 和引物 2 进行



M.  $\lambda$ -DNA *EcoR* I+*Hind* III 分子量标记；1. 无模板对照；2~7. 转化植株；8. 未转化植株；9. pBAGP对照。  
M.  $\lambda$ -DNA *EcoR* I+*Hind* III Marker；1. CK；2~7. Transgenic plants；8. negative control；9. positive control.

图 3 转基因番茄的 PCR(A)和 PCR-Southern(B)杂交检测  
Fig. 3 PCR amplification and PCR-Southern blotting of the transgenic tomato

2.3 转基因番茄抗性植株的 PCR-Southern 检测

将 PCR 电泳板照相记录后，转印硝酸纤维素滤膜，以 pBAGP XbaI + Sac I 消化片段为探针，进行 PCR-Southern 杂交，结果表明：阳性对照中出现一条约 510 bp 左右的杂交特异条带，在抗性植株中，出现杂交特异条带的位置与阳性对照相同（图 3B），进一步证明 AGPase 反义基因已整合到番茄基因组中。

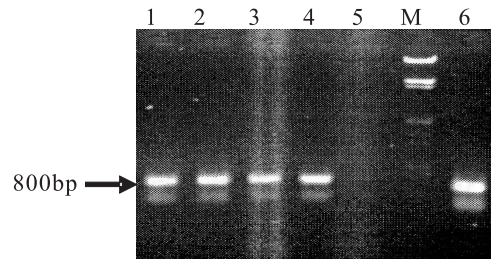
3 讨论

由于 AGPase 基因属多基因家族，基因各成

PCR 扩增，试验结果显示，番茄 Kan 抗性植株及阳性对照均有预期条带扩增出，AGPase 引物扩增产物大小为 510 bp（图 3A），NPT - II 引物扩增产物大小为 800 bp（图 4），PCR 结果表明，AGPase 反义基因已初步整合到番茄基因组中。



图 2 番茄在 Kan 筛选培养基上再生的抗性芽  
Fig. 2 The antibiotic-resistant regenerated shoots of tomato in selection medium containing kanamycin



M.  $\lambda$ -DNA *EcoR* I+*Hind* III 分子量标记；1~4. 转化植株；5. 未转化植株；6. PBAGP对照。  
M.  $\lambda$ -DNA *EcoR* I+*Hind* III Marker；1~4. Transgenic plants；5. negative control；6. positive control.

图 4 转基因番茄 NPTII 基因 PCR 检测  
Fig. 4 Confirmation of the transgenic tomato by PCR amplification of NPTII gene.

员之间的核苷酸和氨基酸的同源性均较高，且 AGPase 引物是根据 AGPase 基因保守区域设计，从理论上讲，该对引物也能扩增出番茄内源 AGPase 基因，但在本实验中，阴性对照均未能扩增出基因条带，推测其原因可能是由于番茄内源 AGPase 基因的拷贝数过低，或者是 AGPase 基因中含有内含子所致。为了进一步验证 AGPase 反义基因对番茄基因组的整合，采用了 NPT II 引物进行扩增验证，进一步证实了外源基因的整合，排除了内源 AGPase 基因影响。

PCR-Southern 杂交是一种近年来开始使用的

检测外源基因整合的方法, 该法首先对被检材料进行基因的 PCR 扩增, 然后再用目的基因的同源探针与扩增的基因片段进行杂交。国内已有多篇文献报道利用 PCR-Southern 进行转基因植株的验证<sup>[11,12]</sup>, 一般来说, Southern 杂交需要的样品量较大 (5 ~ 15  $\mu\text{g}$  DNA), 此外, 对模板 DNA 纯度要求也较高, 在转化材料少, 又需极早作出检测的情况, PCR-Southern 为外源基因整合的检测提供了极大的便利。

#### [参考文献]

- [1] 陈玉辉, 许向阳, 李景富. 转基因技术在番茄育种上的应用 [J]. 分子植物育种, 2004, 2 (1): 133 - 138.
- [2] 余延年, 吴定华, 陈竹君. 番茄遗传学 [M]. 长沙: 湖南科技出版社, 1999.
- [3] BALLICORA M A, IGLESIAS A A, PREISS J. ADP-glucose pyrophosphorylase: are gulatory enzyme for plant starch synthesis [J]. Photosynthesis Research, 2004, 79: 1 - 24.
- [4] ROBINSON N L, HEWITT J D, BENNETT A B. Sink metabolism in tomato fruit I. Developmental changes in carbohydrate metabolizing enzymes [J]. Plant Physiol, 1988, 87: 727 - 730.
- [5] SCHAFFER A A, LEVIN I, OGUZ I, et al. ADPglu-

cose pyrophosphorylase activity and starch accumulation in immature tomato fruit; the effect of a *Lycopersicon hirsutum*-derived introgression encoding for the large subunit [J]. Plant Sci, 2000, 152: 135 - 144.

- [6] KLANN E M, HALL B, BENNETT A B. Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit [J]. Plant Physiol, 1996, 12: 1321 - 1330.
- [7] FRIDMAN E, PLEBAN T, ZAMIR D. A recombination hotspotde limits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 4718 - 4723.
- [8] 潘秋红, 张大鹏. 植物酸性转化酶基因及其表达调控 [J]. 植物学通报, 2005, (2): 3 - 11.
- [9] KLANN E M, HALL B. Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in tomato fruit [J]. Plant Physiol., 1996, 112 (3): 1321 - 1330.
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 张扬勇, 李汉霞, 叶志彪, 等. 农杆菌介导 GNA 基因转化菜薹 [J]. 园艺学报, 2003, (4): 97 - 99.
- [12] 李贞霞, 张兴国. 魔芋的遗传转化研究 [J]. 园艺学报, 2006, (2): 192 - 194.

(上接第 157 页)

- [7] ZHOU Y H, ZHENG Y L, YAN J L. Relationships among species of *Hystrix* Moench and *Elymus* L. assessed by RAPDs [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2000, 47: 191 - 196.
- [8] LU B R. Biosystematic investigation of Asiatic wheatgrass-*Elymus* L. (Triticeae Poaceae) [J]. Alnarp, Sweden, 1993, 1 - 57.
- [9] AGAFONOY A, BAUM V, BAILEY B R, et al. Differentiation in the *Elymus* Dahuricus complex (Poaceae): evidence from grain proteins, DNA, and crossability [J]. Hereditas, 2001, 135: 277 - 289.
- [10] 吴征镒, 陈书坤. 云南植物志(9) [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [11] 杨锡林. 内蒙古植物志 [M]. 内蒙: 内蒙古人民出

版社, 1979.

- [12] 卢宝荣. *E. Nutans* 和 *E. sibiricus*, *E. burchanbuddae* 的形态学鉴定及其染色体组亲缘关系的研究 [J]. 植物分类学报, 1994, 32 (6): 504 - 513.
- [13] 张正茂, 王睿辉, 李立会, 等. 陕西、宁夏部分地区小麦族植物资源调查、收集与分类鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4 (4): 302 - 305.
- [14] 郭本兆, 王世金, 李健华. 我国小麦族的形态演化与分类、分布的研究 [J]. 植物分类学报. 1985, 23 (3): 161 - 169.
- [15] JEFFREY C J. An Introduction to Plant Taxonomy, (2nd Edition) [M]. London: Cambridge University Press, 1982.