

MicroTom 番茄非组培快速遗传转化方法的建立

王伟坤¹, 傅雯倩¹, 洪秋梅¹, 郑杨¹, 于嘉慧¹, 王艳¹,
刘良淼¹, 杨莉^{1,2}, 王长春^{1,2*}, 郭卫东^{1,2*}

¹浙江师范大学生命科学学院, 金华 321004; ²金华市特色经济植物生物技术重点实验室, 金华 321004

摘要 MicroTom 番茄(*Solanum lycopersicum* cv. 'MicroTom')是一种矮化模式植物, 因其具有较短的生命周期和清晰的遗传背景而广泛应用于植物基因功能研究。传统基于组培的 MicroTom 番茄遗传转化技术存在效率低、转化周期长及操作复杂等缺陷, 限制了该体系的应用。该研究以 2 周龄 MicroTom 实生苗为材料, 在切除顶端子叶与真叶后, 用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌液浸润下胚轴切口并诱导再生芽, 成功构建了一套高效的 MicroTom 番茄非组培遗传转化体系。结果显示, 切口处再生芽阳性率为 28.6%, 4–5 个月即可收获 T₀ 代番茄种子, T₁ 代植株中外源基因表达比例达 73.5%。与传统组培遗传转化体系相比, 该 MicroTom 番茄非组培转化体系转化效率显著提高, 转化时间短且操作流程简捷, 为番茄果实性状基因功能解析提供了高效的技术平台, 同时对加快番茄分子育种进程具有重要意义。

关键词 MicroTom 番茄, 遗传转化, 非组培, 基因功能, 分子育种

自 Barton 等(1983)首次利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法获得转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)以来, 遗传转化技术已广泛应用于作物种质改良、药物研发、工业原料生产及植物生长发育调控和代谢途径解析等领域(Bailey-Serres et al., 2019; Anjanappa and Gruissem, 2021; Chu and Agapito-Tenzen, 2022; Fan et al., 2025)。常用的植物遗传转化方法主要包括根癌(发根)农杆菌介导的载体转化系统、化学或物理方法介导的直接转化系统及以花粉管通道法为代表的种质转化系统(李君等, 2011; Anjanappa and Gruissem, 2021; Chu and Agapito-Tenzen, 2022; 胡丹玲和孙永伟, 2024; Cao et al., 2025)。其中农杆菌介导的遗传转化法因操作简单、成本低且转化效率高而应用最为广泛。

目前大部分植物的遗传转化依赖组织培养技术, 通过将外源基因导入受体细胞, 诱导含外源基因的细胞形成分生组织, 进而再分化形成再生苗。但这种遗传转化方法对无菌环境和无菌操作技术要求较高, 且存在抗性植株再生和鉴定困难、转化效率低及操作周期长等问题(张庆祝和韩天富, 2004; Lu et al., 2024)。此外, 在组培过程中由于使用高浓度的植物生长调节剂, 再生或转基因植株容易发生未知的基因组改变(Phillips et al., 1994)。这使得传统组织培养体系在遗传转化过程中存在非目标性状突变的缺陷, 进而成为制约植物遗传转化效率与转化株系稳定性的关键因素。

近年来, 科研人员开发出多种无需组织培养操作, 即可获得稳定遗传的转基因和基因编辑植物(Belanger et al., 2024; Wu et al., 2024)。其中, 应用较为广泛的转化方法是花粉管介导的遗传转化法、病毒侵染法及纳米材料递送技术等(Belanger et al., 2024), 但这些方法仍存在物种适用性有限及转化效率不稳定等缺点。开发不依赖组织培养的快速高效遗传转化体系, 不仅是植物遗传转化的必然趋势, 也为作物分子育种和基因功能研究提供有力的方法保障。

番茄(*Solanum lycopersicum*)因具有独特的风味和高营养价值而成为全球种植面积最

广泛的园艺作物之一，也是人类膳食的重要来源(Li et al., 2020; Lu and Zhu, 2022)。MicroTom 是一种微型矮化番茄品种，具有生命周期短、遗传背景清晰、转化效率高等特点，是研究基因功能的模式番茄品种之一，被广泛应用于果实发育调控、次生代谢物积累及植物-微生物互作机制等研究(Dan et al., 2007; 刘小花等, 2008; Li et al., 2020; Xue et al., 2023)。此外，MicroTom 植株矮小，适合高密度种植，能够显著提高单位面积的空间利用效率。

传统的 MicroTom 番茄遗传转化主要包括种子(芽和叶等)外植体消毒、在无菌条件下诱导种子萌发或再生外植体、新生子叶或外植体预培养、与农杆菌共培养、筛选培养(长芽)、生根及移栽等过程(Dan et al., 2006; Cruz-Mendivil et al., 2011; Guo et al., 2012; Khuong et al., 2013; Toth et al., 2022; Ahmed et al., 2023)。整个遗传转化过程复杂繁琐且需无菌操作，转化周期相对较长。本研究以番茄 MicroTom 种子萌发的幼苗为材料，通过根癌农杆菌介导，建立了快速、高效且稳定的非组培遗传转化体系，以期为开展果实性状相关的基因功能研究和加快遗传育种进程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及培养

植物材料 MicroTom 番茄(*Solanum lycopersicum* cv. 'MicroTom')种子由本实验室保存。遗传转化所用的根癌农杆菌菌株为 GV3101，过表达载体为 pCY-H05251，载体 T-DNA 区段如图 1 所示。T-DNA 区域携带潮霉素 B 磷酸转移酶(Hygromycin B phosphotransferase, HygR)抗性基因，以及融合增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)报告基因的蓝莓 VcDAD2 基因。

将 MicroTom 种子置于带滤纸的培养皿中，加适量自来水润湿滤纸(图 2A)，置于黑暗条件下培养至胚根萌发。将胚根萌发后的种子(图 2B)移栽至装有混合基质(泥炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1, v/v/v)的小钵中，放入光照培养箱培养，培养条件为光周期为 16 小时光照/8 小时黑暗，温度(22±1)°C，相对湿度为 70%。

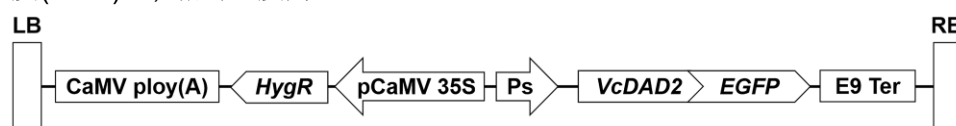


图 1 VcDAD2-EGFP 基因过表达载体 T-DNA 区示意图

Figure 1 Schematic diagram of the T-DNA region of the binary vector pCY-H05251-VcDAD2-EGFP

1.2 试剂与耗材

实验所用试剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA)、表面活性剂 Silwet L-77、潮霉素 B (hygromycin B, Hyg)、卡那霉素(kanamycin, Kan)、利福平(Rifampicin, Rif)和 MS 培养基购自北京酷来搏有限公司。蛋白胨、酵母提取物和乙酰丁香酮购自杭州昊鑫生物科技有限公司。2×TaqMaster Mix、反转录试剂盒 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。蔗糖、氯化钠、乙酸钠、乙酸钾和三氯甲烷等购自国药集团化学试剂有限公司。滤纸和无菌注射器等购自金华医药有限公司。

1.3 方法

1.3.1 根癌农杆菌侵染液制备

将携带 VcDAD2-EGFP 过表达载体的根癌农杆菌 GV3101 在含有 25 mg·L⁻¹ Rif 和 50 mg·L⁻¹ Kan 的 YEP 固体培养基上划线，倒置并于 28°C 恒温暗培养 2 天。挑取单菌落接种于含相应抗生素的 YEP 液体培养基中，于 28°C 下 200 r·min⁻¹ 振荡培养 12 小时，再次按 1:100 比例扩摇菌液 8–10 小时。离心后收集得到的菌体用 MS 液体培养基(含 30 g·L⁻¹ 蔗糖、300

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮和 0.5% Silwet L-77)重悬, 并调节菌液 OD_{600} 值为 0.6, 暗处静置 2 小时备用。

1.3.2 非组培遗传转化操作流程

将 MicroTom 实生苗培养至 2 片真叶展开(2 周龄, 图 2C), 使用洁净刀片在子叶下方 0.5 cm 处水平切断, 保留基质上方 1.0–1.5 cm 下胚轴(图 2D)。将切断处理后的下胚轴置于光照培养箱中预培养 2 天。随后将短截尖部的 200 μL 移液枪吸头轻柔套接于下胚轴(图 2E), 用 1 mL 无菌注射器吸取根癌农杆菌侵染液, 从枪头尖端缓慢注入菌液, 使菌液充分浸润切口断面 10 分钟(图 2F)。侵染处理后的下胚轴转入黑暗条件下共培养 2 天(图 2G)。为提高转化效率, 共培养 2 天后, 再次用侵染液浸润切口断面。再次共培养 3 天后, 将幼苗移入透明罩内, 置于光照培养箱中培养, 每日定时喷雾保湿(图 2H)。

第 2 次农杆菌菌液侵染处理约 45 天后, 统计下胚轴芽再生情况。当芽体长度大于 0.5 cm 时判定为有效再生芽。对产生多个分枝的植株进行多芽率统计。

$$\text{再生率}=(\text{再生芽数}/\text{总处理植株数})\times 100\%;$$

$$\text{多芽率}=(\text{再生}\geq 2 \text{ 个芽的植株数}/\text{总再生芽数})\times 100\%。$$

1.3.3 PCR 扩增鉴定

利用 CTAB 法(熊发前等, 2019)提取番茄叶片基因组 DNA, 以外源 *VcDAD2* 基因特异引物 (*VcDAD2*-F: 5'-ATGGGTCAGCCCCTACTGGA-3'; *VcDAD2*-R: 5'-CCGTGGAAGGTGTCGCCGTA-3'; 预期扩增长度 798 bp)进行 PCR 扩增鉴定; 通过扩增农杆菌染色体 *ChvA* 基因 (Chromosomal virulence gene, Genbank No: AM24198.1) (*ChvA*-F: 5'-TCCATCAGCAACGTGTCTCGGTGCT-3'; *ChvA*-R: 5'-GTGGAAAGGCGGTGAGCGATGAT-3'; 预期扩增长度 898 bp)片段检测阳性植株农杆菌残留污染情况。PCR 反应总体积 10 μL , 包含 5 μL $2\times\text{TaqMaster Mix}$, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.5 μL , 200 ng gDNA 模板, 用 ddH_2O 补足至终体积。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 分钟; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒, 62/60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 秒, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 分钟。取 5 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 根据目的条带确认阳性植株及根癌农杆菌在植株上的污染情况。

$$\text{转化率}=(\text{VcDAD2 基因扩增呈阳性植株数}/\text{总再生植株数})\times 100\%;$$

$$\text{农杆菌残留率}=(\text{ChvA 片段扩增呈阳性植株数}/\text{总再生植株数})\times 100\%。$$

1.3.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)鉴定外源基因相对表达水平

利用改良 CTAB 法(余柯达等, 2016)提取番茄叶片总 RNA, 使用反转录试剂盒合成 cDNA 一链, 应用 qRT-PCR 技术检测外源基因 *VcDAD2* 的相对表达水平。*VcDAD2* 基因定量引物为 *VcDAD2*-RT-F: 5'-GGCGGAACACGGTGGAGATGCT-3'; *VcDAD2*-RT-R: 5'-ACCGTGGAAGGTGTCTCGCGTAG-3', 以 *SlActin* 基因为内参(*SlActin*-RT-F: 5'-TGGCTCCAAGCAGCATGAAA-3'; *SlActin*-RT-R: 5'-TGTGCTGAGGGATGCAAGAATG-3')。qRT-PCR 反应体系总体积 10 μL , 包含 5 μL $2\times\text{qPCR Master Mix}$, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.5 μL , 200 ng cDNA 模板, 用 ddH_2O 补足至终体积。qRT-PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 分钟; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 秒, 40 个循环。每个样品设置 4 个技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法(Livak and Schmittgen, 2001)计算外源基因相对表达水平。

1.3.5 EGFP 荧光可视化

取 T_1 代转基因植株幼根或叶组织, 以野生型非转基因植株为阴性对照。样品经 PBS 缓冲液清洗后置于载玻片上, 使用激光扫描共聚焦显微镜(LSM880, Zeiss, 德国)检测 EGFP 荧光信号。激发光波长设为 488 nm, 发射光波长为 509 nm, 并使用 ZEN 软件采集图像。

$$T_1 \text{ 代植株 EGFP 荧光阳性率}=(\text{显示 EGFP 荧光信号的植株数}/\text{检测植株数})\times 100\%。$$

1.3.6 数据处理与分析

所有实验数据均包含 3 次以上生物学重复, 数据表示为平均值 \pm 标准差。数据分析使用 SPSS Statistics 21.0 软件, 并用 OriginPro 2022 软件绘图。组间差异显著性分析采用双尾独立样本 t 检验, 差异显著性判定标准为*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 非组培侵染法转化 MicroTom 番茄操作流程

当 MicroTom 番茄幼苗长出 2 片真叶时(图 2C), 选择下胚轴直径大于 1.5 mm 的幼苗进行去顶处理(图 2D), 预培养 2 天后应用根癌农杆菌菌液侵染下胚轴(图 2F)。为提高转化效率, 本研究用根癌农杆菌重复侵染下胚轴 1 次。侵染处理后, 将下胚轴置于透明罩中维持空气湿度, 促进愈伤组织形成和芽再生(图 2H)。侵染后 10–14 天, 下胚轴切口处开始膨大, 形成愈伤组织团(图 2I, J)。20 天后, 愈伤组织处萌发再生芽(图 2K–P)。

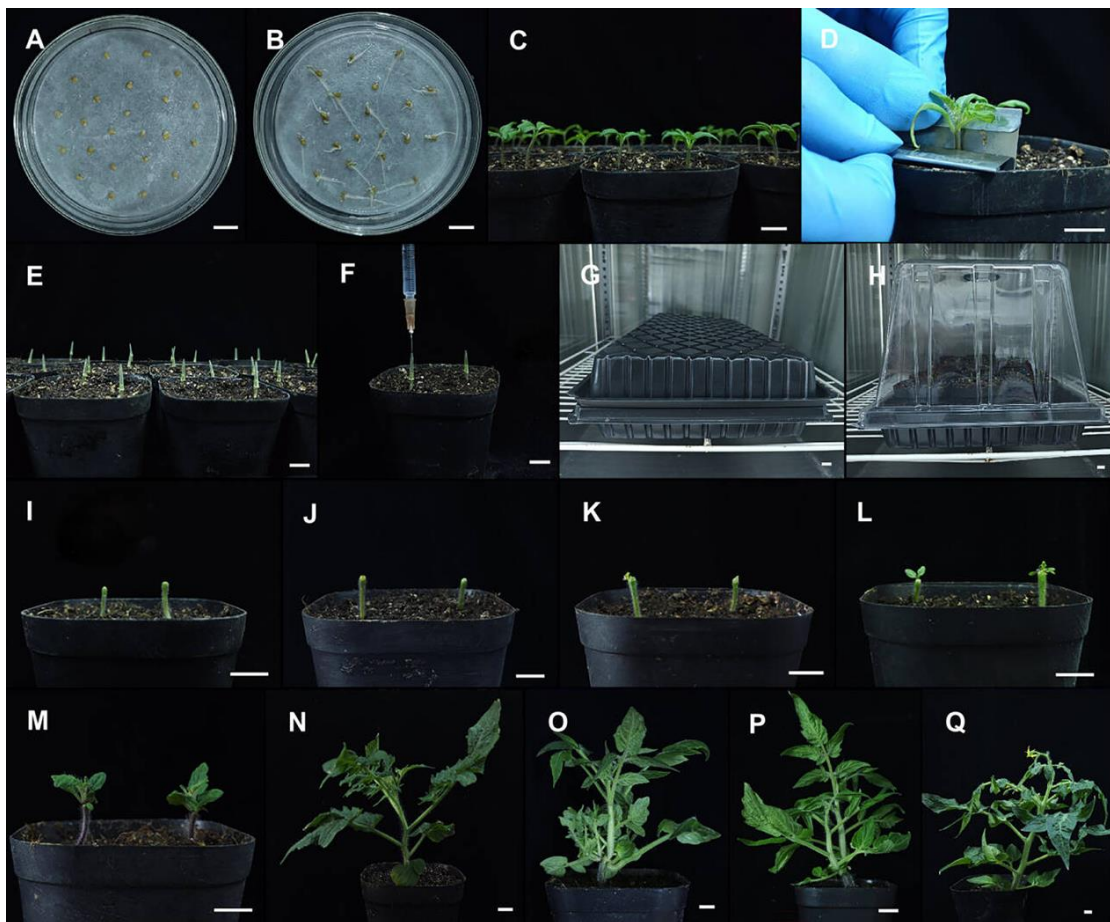


图 2 MicroTom 番茄非组培快速遗传转化流程

(A) 播种; (B) 播种 3 天后种子萌发, 胚根突破种皮; (C) 移栽后 14 天的幼苗; (D) 去除幼苗顶端子叶和真叶, 保留基质上方 1.0–1.5 cm 下胚轴; (E) 向下胚轴套接移液枪头; (F) 通过移液枪头, 根癌农杆菌菌液侵染下胚轴 10 分钟; (G) 共培养(暗处理); (H) 透明罩保湿; (I) 侵染 10 天后, 下胚轴切口处膨大; (J) 侵染 14 天后, 切口处开始形成愈伤组织团; (K) 侵染 20 天后, 愈伤组织团分化出再生芽; (L) 侵染 24 天后, 1 个或多个芽再生; (M) 侵染 35 天的幼苗; (N) 侵染 60 天的幼苗; (O) 再生的冗余芽; (P) 去除非转基因芽; (Q) 阳性植株开花。Bars=1 cm

Figure 2 *in planta* rapid and stable genetic transformation procedures for MicroTom tomato

(A) Sowing; (B) Seeds germination at 3 d after sowing, with radicle emergence from seed coats; (C) Seedlings at 14 d after transplanting; (D) Removal of apical cotyledons and true leaves, retaining 1.0–1.5

cm of hypocotyls; (E) Hypocotyls with pipette tips; (F) Hypocotyls inoculation via pipette tips using *Agrobacterium tumefaciens* suspension for 10 min; (G) Co-cultivation (dark incubation); (H) Humidity maintenance under a transparent cover; (I) Hypocotyl swelling at 10 days post inoculation (dpi); (J) Callus information at 14 dpi; (K) Shoot differentiation from callus at 20 dpi; (L) Shoot regeneration at 24 dpi; (M) Shoot growth at 35 dpi; (N) Shoot growth at 60 dpi; (O) Adventitious shoot regeneration; (P) Removal of non-transgenic shoots; (Q) Flowering of positive lines. Bars=1 cm

应用上述方法,发现约 88%的 MicroTom 下胚轴可再生幼芽(表 1)。值得注意的是,58.2%的再生位点呈现多芽现象(图 2L–P),这与 Yang 等(2024)报道的番茄创伤细胞多能性激活机制相吻合。为加速阳性再生芽的生长,可在侵染处理 45 天左右去除愈伤组织部位冗余的非转基因再生芽或枝条(图 2N–P),确保转化植株在侵染 90 天左右进入花期(图 2Q)。鉴于 MicroTom 番茄自交结实率偏低,为确保收获足量种子,可对转化植株进行人工授粉。转化后约 4–5 个月即可收获 T₀代种子。

表 1 MicroTom 番茄非组培遗传转化效率评价

Table 1 Efficiency evaluation of *in planta* genetic transformation in MicroTom tomato

Indicators	Numbers of positive plants/total plants	Frequency (%)
Regeneration efficiency of T ₀ -generation plants [#]	91/104	87.6±4.0
Multiple bud rate T ₀ -generation plants [#]	53/91	58.2±4.3
Transformation efficiency T ₀ -generation plants [#]	51/178	28.6±3.2
Residual rate of <i>A. tumefaciens</i> in T ₀ -generation plants [#]	41/60	68.3±7.6
EGFP fluorescence rate of T ₁ -generation plants	54/74	73.5±6.3

[#] 实验数据根癌农杆菌侵染后试验第 45 天统计。

[#] Data were collected at 45 days post inoculation.

2.2 转基因 MicroTom 番茄的筛选与鉴定

采用外源 *VcDAD2* 基因特异性引物对 T₀代再生芽或枝条进行 PCR 鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果显示 178 株样品中有 51 株再生芽在预期位置(798 bp)出现特异性条带,阳性率达 28.6% (表 1),而野生型植株及阴性对照均未检测到相应条带(图 3A),初步证实外源基因 *VcDAD2* 已整合至 MicroTom 基因组中。同时剔除未显示目标条带的幼芽(图 2P)。

在根癌农杆菌介导的植物遗传转化过程中,菌体侵染后将仍持续附着于外植体表面,单纯依赖外源基因/抗性基因扩增鉴定时易产生假阳性信号,这种滞留现象将影响转基因材料的评估及筛选(Yang et al., 2013)。为此,本研究同时检测了 T₀代阳性再生芽或枝条上农杆菌染色体 *ChvA* 基因片段,结果发现约 68%的再生芽呈现 *ChvA* 基因阳性信号,表明这些再生芽上均有农杆菌残留污染(表 1; 图 3B)。同时,所有被检 T₁代株系均未扩增出 *ChvA* 片段,表明根癌农杆菌不会发生传代污染。

Belanger 等(2024)报道采用非组培遗传转化方法获得的转化植株多为嵌合体,需进一步筛选和鉴定以获得纯合株系。将 PCR 鉴定呈阳性的独立株系种子置于含 25 mg·L⁻¹ 潮霉素溶液的双层滤纸培养皿上,25°C 暗培养 4–5 天后统计萌发率。通过抗性筛选,发现 38.2%–60.6%的 T₀代种子耐受抗生素筛选并萌发表 2),萌发比例不符合孟德尔遗传规律,表明应用该遗传转化方法获得的转化植株中存在一定比例的嵌合体。为提高筛选效率并有效非转化植株,在幼苗移栽前可连续喷施抗生素溶液进行二次筛选。

此外,为验证转基因植株的遗传稳定性,采用激光共聚焦显微镜观察来源于同一 T₀代株系后代的根尖组织。结果显示,73.5%的 T₁代植株呈现 EGFP 报告蛋白的特异性绿色荧光信号(表 1; 图 3C)。进一步通过 qRT-PCR 检测 T₁代植株叶片中 *VcDAD2* 基因的表达水平,发现外源基因表达量较野生型高 5–27 倍(图 3D)。

上述结果表明,本研究建立的非组培遗传转化法可实现外源基因的表达,其 T₀代阳性转化率(28.6%)和 T₁代遗传稳定性(73.5%)均显著高于已有 MicroTom 番茄遗传转化体系。

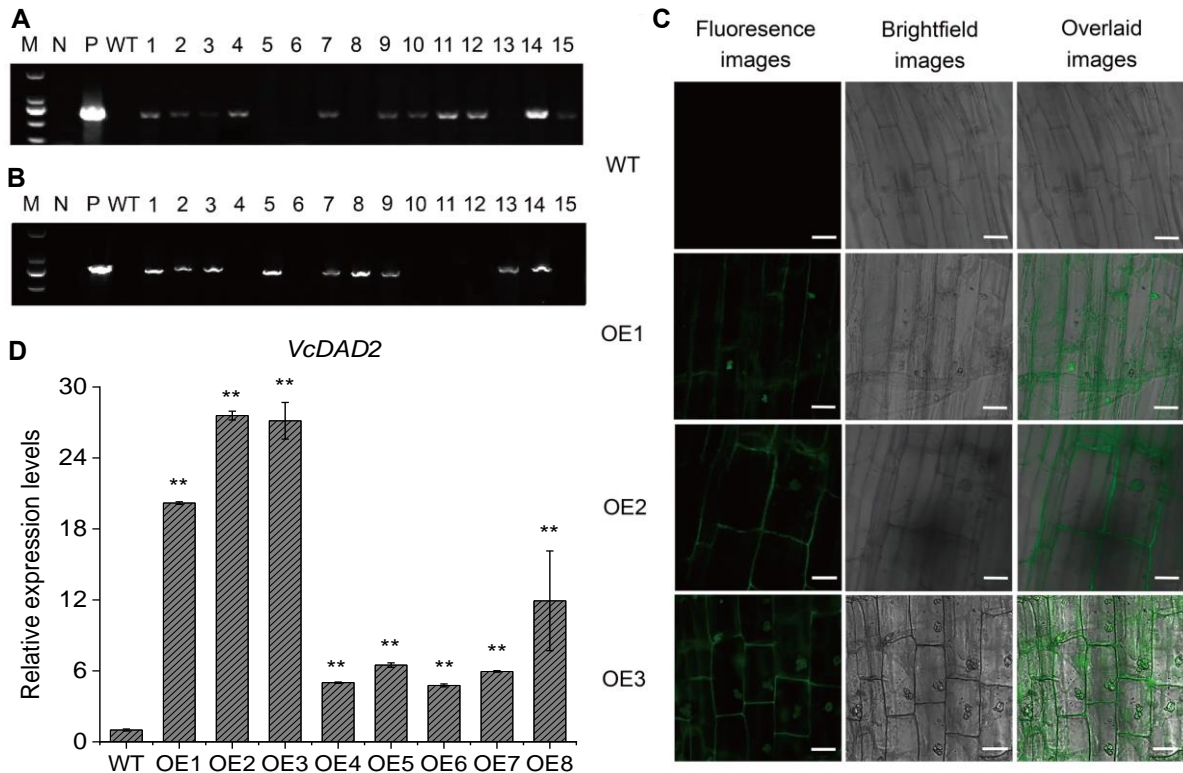


图 3 基于非组培遗传转化法的 MicroTom 番茄转基因植株筛选与验证

(A) T₀代转基因再生芽中外源 *VcDAD2* 基因扩增; (B) T₀代转基因再生芽中农杆菌 *ChvA* 基因片段扩增(M: DL2000 DNA marker; WT: 野生型; P: 含 *VcDAD2-EGFP* 过表达载体质粒 DNA 的根癌农杆菌, 阳性对照; N: 阴性对照; 1-15: 独立的 T₀代转基因再生芽); (C) T₁代转基因植株根尖融合 EGFP 荧光检测, Bars=20 μm; (D) T₁代转基因株系外源 *VcDAD2* 基因相对表达水平检测(OE1-OE8: 独立的 *VcDAD2-EGFP* 过表达 T₁代株系; *t* 检验统计分析, ** *P*<0.01)。

Figure 3 Screening and verification of transgenic MicroTom tomato plants generated by *in planta* stable genetic transformation

(A) Genotypic identification of independent T₀-generation *VcDAD2-EGFP*-overexpressing shoots by amplifying foreign *VcDAD2* gene; (B) Identification of *A. tumefaciens* residues in T₀-generation shoots by amplifying *ChvA* fragment (M: DL2000 DNA marker; WT: Wild type; P: Positive control; N: Negative control; 1-15: Independent T₀-generation shoots); (C) Fluorescence signals of fused EGFP reporter in T₁-generation transgenic roots. Bars=20 μm; (D) Quantitative analysis of exogenous *VcDAD2* expression levels in T₁-generation transgenic leaves by qRT-PCR (OE1-OE8: Independent transgenic lines in T₁-generation. The statistical significance was calculated by *t* test, ** *P*<0.01).

表 2 'MicroTom'番茄 T₀代种子筛选及萌发率统计

Table 2 Seed germination and screening of independent transgenic 'MicroTom' tomato lines in T₀-generation

independent line	Number of germinated seeds/total seeds	Germination rate (%)
WT	0/32	0
#1	30/50	60.6±4.9
#2	23/43	53.5±3.6
#3	24/52	46.1±3.4
#4	20/35	57.6±10.5
#5	19/50	38.2±5.3

WT: 野生型种子; #1-5: 独立的 T₀代株系种子。

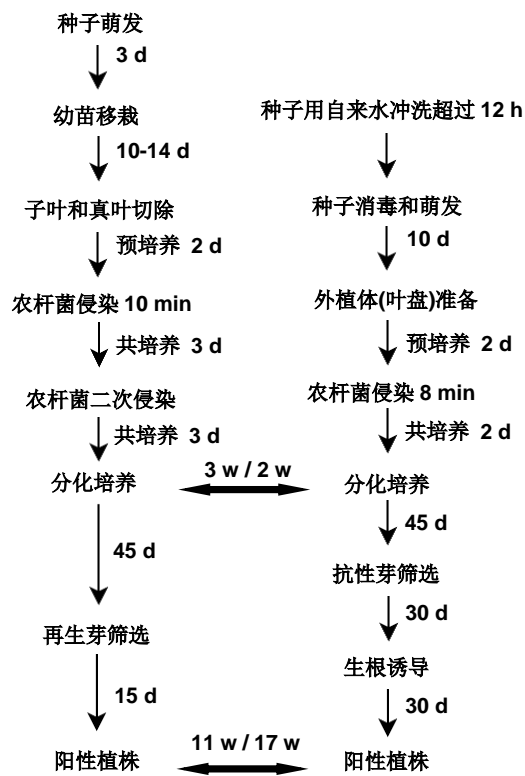
WT: seeds of wild type; #1-5: seeds of independent transgenic lines in T₀-generation.

3 讨论

番茄是经济价值和营养价值均较高的园艺作物, 同时也是用于研究基因功能的一种模式植物。自 McCormick 等(1986)首次报道番茄遗传转化体系以来, 其转化技术和体系不断得到改进和完善。目前应用于番茄遗传转化的方法主要包括农杆菌介导法、花粉管通道法、基因

枪法、激光法、电击法、微注射法以及聚乙二醇(PEG)法等(Yasmeen et al., 2009; 郑立峰, 2020)。其中技术最为成熟的是根癌农杆菌介导的 MicroTom 遗传转化体系, 其应用也最为广泛, 但需依赖组织培养体系进行抗性再生芽的筛选, 存在以下技术瓶颈: (1) 在共培养和筛选培养阶段, 农杆菌生长速率显著快于外植体细胞分裂速率, 导致农杆菌污染或杀死外植体; (2) 经抗生素筛选后, 外植体容易发生褐化且抗性芽再生困难, 转化效率低; (3) 操作周期长, 传统组培体系需 4–6 个月(Sun et al., 2006; Arias-G and Uribe, 2025)获得抗性芽, 且操作人员需具备较熟练的技术。上述限制促使非组培转化技术成为近年来遗传转化研究的热点, 目前已在 139 种植物中成功应用(Belanger et al., 2024)。因此, 建立快速、高效且稳定的 MicroTom 非组培遗传转化体系, 对开展植物基因功能研究和分子育种具有重要意义。

植物受到损伤后, 会启动受伤部位的再生机制以修复受损组织, 甚至再生新器官乃至整个植株(Mei et al., 2024)。番茄植株具有较强的再生能力。Yang 等(2024)发现切除番茄幼苗顶端后, 切口处能够形成愈伤组织, 继而分化形成再生芽, 表明通过非组培侵染法也可能获得番茄转化植株。本研究采用非组培遗传转化方式获得转化植株, 下胚轴再生率约为 88%。然而, 由于未经抗生素筛选, 再生芽可能由转基因细胞和非转基因细胞混合发育而成, 获得的再生植株是嵌合体的概率较大(Belanger et al., 2024), 后续仍需对其进行筛选。



非组培转化 MicroTom 流程 组培转化 MicroTom 流程

图 4 应用非组织培养与组织培养方法转化 MicroTom 操作流程比较

Figure 4 Comparison of genetic transformation procedures for MicroTom by *in planta* and tissue culture methods

本研究基于植物创伤介导的体细胞重编辑机制, 成功建立了 MicroTom 番茄非组培遗传转化体系。该体系采用 2 周龄幼苗作为转化受体, 通过切除顶端子叶与真叶产生伤口, 利用根癌农杆菌侵染液直接侵染伤口, 结合创伤诱导的细胞重编程特性获取转化株系。经 PCR 检测, T₀ 代植株外源基因整合阳性率为 28.6%; 通过抗生素筛选结合 EGFP 报告系统, T₁ 代植株目的基因稳定表达率达 73.5%; 整个转化周期仅需 3–4 个月(图 4)。与基于组织培养的

遗传转化体系相比,本研究建立的 MicroTom 番茄非组培遗传转化体系操作简单、转化效率高、转化周期显著缩短,且对专业设备和操作人员依赖度低。该技术体系不仅为番茄果实性状基因功能解析提供高效的技术平台,对加快番茄分子育种进程也具有重要的实践意义。

作者贡献声明

王伟坤:完成实验,分析数据和撰写论文;傅雯倩:图表制作;洪秋梅,郑杨:完成实验和论文修改;于嘉慧,王艳:分析数据;刘良淼,杨莉:完成实验;王长春,郭卫东:构思并设计实验,分析数据和撰写论文。

参考文献

- Ahmed S, Wan Azizan WAS, Akhond MAY, Juraimi AS, Ismail SI, Ahmed R, Md Hatta MA** (2023). Optimization of *in vitro* regeneration protocol of tomato cv. MT1 for genetic transformation. *Horticulturae* **9**, 800.
- Anjanappa RB, Gruissem W** (2021). Current progress and challenges in crop genetic transformation. *J Plant Physiol* **261**, 153411.
- Arias-G D, Uribe F** (2025). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated stable cotyledon transformation of *Solanum lycopersicum* var. Micro-Tom. In: Klein CS, eds. *Agrobacterium: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, vol 2911). Totowa: Humana Press. pp. 107–119.
- Bailey-Serres J, Parker JE, Ainsworth EA, Oldroyd GED, Schroeder JI** (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature* **575**,109–118.
- Barton KA, Binns AN, Matzke AJM, Chilton MDI** (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell* **32**, 1033–1043.
- Belanger JG, Copley TR, Hoyos-Villegas V, Charron JB, O'Donoghue L** (2024). A comprehensive review of *in planta* stable transformation strategies. *Plant Methods* **20**, 79.
- Cao XM, Bao Y, Zhang YX, Li RJ, Su JX, Zhang W** (2025). Tissue culture, rapid propagation and efficient transient expression systems of *Rosa multiflora*. *Chin Bull Bot* **60**, 235–245. (in Chinese)
- 曹雪敏, 包颖, 张悦新, 李瑞杰, 苏健馨, 张蔚 (2025). 野蔷薇组培快繁和高效瞬时表达体系的建立. *植物学报* **60**, 235–245.
- Chu P, Agapito-Tenfen SZ** (2022). Unintended genomic outcomes in current and next generation GM techniques: a systematic review. *Plants-basel* **11**, 2997.
- Cruz-Mendivil A, Rivera-Lopez J, German-Baez LJ, Lopez-Meyer M, Hernandez-Verdugo S, Lopez-Valenzuela JA, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A** (2011). A simple and efficient protocol for plant regeneration and genetic transformation of tomato cv MicroTom for leaf explants. *Hortic Sci* **46**, 1655–1660.
- Dan YH, Fei ZJ, Rothan C** (2007). MicroTom—a new model system for plant genomics. *Genes Genom* **1**, 167–179.
- Dan YH, Yan H, Munyikwa T, Dong J, Zhang YL, Armstrong CL** (2006). Micro-Tom—a high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Rep* **25**, 432–441.

- Fan B, Ren M, Wang YF, Dang FF, Chen GL, Cheng GT, Yang JY, Sun HR** (2025). Functions of SIWRKY45 in response to low-temperature and drought stress in tomato. *Chin Bull Bot* **60**, 186–203. (in Chinese)
樊蓓, 任敏, 王延峰, 党峰峰, 陈国梁, 程国亭, 杨金雨, 孙会茹 (2025). 番茄 SIWRKY45 转录因子在响应低温和干旱胁迫中的功能. *植物学报* **60**, 186–203.
- Guo M, Zhang YL, Meng ZJ, Jiang J** (2012). Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of MicroTom tomatoes. *Genet Mol Res* **11**, 661–671.
- Hu DL, Sun YW** (2024). Advances in virus-mediated genome editing technologies in plants. *Chin Bull Bot* **59**, 452–462. (in Chinese)
胡丹玲, 孙永伟 (2024). 病毒介导的植物基因组编辑技术研究进展. *植物学报* **59**, 452–462.
- Khuong TTH, Crete P, Robaglia C, Caffarri S** (2013). Optimisation of tomato Micro-Tom regeneration and selection on glufosinate/Basta and dependency of gene silencing on transgene copy number. *Plant Cell Rep* **32**, 1441–1454.
- Li J, Li Y, Liu DH** (2011). Alternative methods of plant genetic transformation and recent advances. *Biotechnol Bull* **27**, 31–36, 45. (in Chinese)
李君, 李岩, 刘德虎 (2011). 植物遗传转化的替代方法及研究进展. *生物技术通报* **27**, 31–36, 45.
- Li Y, Chen Y, Zhou L, You SJ, Deng H, Chen Y, Alseekh S, Yuan Y, Fu R, Zhang ZX, Su D, Fernie AR, Bouzayen M, Ma T, Liu MC, Zhang Y** (2020). Micro-Tom metabolic network: rewiring tomato metabolic regulatory network throughout the growth cycle. *Mol Plant* **13**, 1203–1218.
- Liu XH, Zhang LL, Zhu CQ, Chen KS, Xu CJ** (2008). Mechanisms for miniature dwarf characteristics of Micro-Tom tomato and its application in plant functional genomics studies. *Hereditas* **30**, 1257–1264. (in Chinese)
刘小花, 张岚岚, 朱长青, 陈昆松, 徐昌杰 (2008). Micro-Tom 番茄矮化微型机制及其在植物功能基因组学研究中的应用. *遗传* **30**, 1257–1264.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lu JH, Li SS, Deng S, Wang MG, Wu YH, Li M, Dong JS, Lu SH, Su CL, Li GF, Lang ZB, Zhu JK** (2024). A method of genetic transformation and gene editing of succulents without tissue culture. *Plant Biotechnol J* **22**, 1981–1988.
- Lu Y, Zhu HL** (2022). The regulation of nutrient and flavor metabolism in tomato fruit. *Vegetable Res* **2**, 5.
- McCormick S, Niedermeyer J, Fry J, Barnason A, Horsch R, Fraley R** (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* **5**, 81–84.
- Mei GG, Chen A, Wang YR, Li SQ, Wu MY, Hu YL, Liu X, Hou XL** (2024). A simple and efficient *in planta* transformation method based on the active regeneration capacity of plants. *Plant Commun* **5**, 100822.
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P** (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5222–5226.

- Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H** (2006). A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* **47**, 426–431.
- Toth M, Toth ZG, Fekete S, Szabo Z, Toth Z** (2022). Improved and highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation protocol: efficient tools for functional analysis of root-specific resistance genes for *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. *Sustainability* **14**, 6525.
- Wu XY, Zhang Y, Jiang X, Ma TS, Guo YT, Wu XX, Guo GS, Cheng XF** (2024). Considerations in engineering viral vectors for genome editing in plants. *Virology* **589**, 109922.
- Xiong FQ, Liu JX, Liu J, He LQ, Jiang J, Tang XM, HuangZP, Wu HN, Zhong RC, Han ZQ, Tang RH** (2019). Comparative analysis and application of five improved CTAB extraction methods for peanut DNA. *Mol Plant Breed* **17**, 2207–2216. (in Chinese)
熊发前, 刘俊仙, 刘菁, 贺梁琼, 蒋菁, 唐秀梅, 黄志鹏, 吴海宁, 钟瑞春, 韩柱强, 唐荣华 (2019). 花生 DNA 的五种改良 CTAB 提取方法的比较分析及其应用. *分子植物育种* **17**, 2207–2216.
- Xue JY, Fan HY, Zeng Z, Zhou YH, Hu SY, Li SX, Cheng YJ, Meng XR, Chen F, Shao ZQ, van de Peer Y** (2023). Comprehensive regulatory networks for tomato organ development based on the genome and RNAome of MicroTom tomato. *Hortic Res* **10**, uhad147.
- Yang L, Wang CC, Wang LH, Xu CJ, Chen KS** (2013). An efficient multiplex PCR assay for early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in transgenic plant materials. *Turk J Agric For* **37**, 157–162.
- Yang WT, Zhai HW, Wu FM, Deng L, Chao Y, Meng XW, Chen Q, Liu CH, Bie XM, Sun CL, Yu Y, Zhang XF, Zhang XY, Chang ZQ, Xue M, Zhao YJ, Meng XB, Li BS, Zhang XS, Zhang DJ, Zhao XY, Gao CX, Li JY, Li CY** (2024). Peptide REF1 is a local wound signal promoting. *Cell* **187**, 3024–3038.
- Yasmeen A, Mirza B, Inayatullah S** (2009). *In planta* transformation of tomato. *Plant Mol Biol Rep* **27**, 20–28.
- Yu KD, Ye MJ, Chen WR, Zhu KL, Zhang CJ, Guo WD** (2016). Methods for RNA isolation from blueberry tissues. *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Science)*, **39**, 60–64. (in Chinese)
余柯达, 叶美娟, 陈文荣, 朱凯丽, 张常晶, 郭卫东 (2016). 蓝莓组织RNA提取方法的研究. *浙江师范大学学报(自然科学版)* **39**, 60–64.
- Zhang QZ, Han TF** (2004). Non-tissue culture transformation of plants. *Mol Plant Breed* **2**, 85–91. (in Chinese)
张庆祝, 韩天富 (2004). 植物非组培遗传转化方法研究的进展. *分子植物育种* **2**, 85–91.
- Zheng LF** (2020). Establishment of genetic transformation system of *CmCs2* and *CmAco3* gene based on Micro-Tom tomato (*Solanum lycopersicum*) regeneration system. Master's thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. pp. 32–33. (in Chinese)
郑立峰 (2020). 基于番茄高效再生体系的柚 *Cs2*、*Aco3* 基因转化体系的建立. 硕士论文. 福州: 福建农林大学. pp. 32–33.

A Rapid *In Planta* Genetic Transformation System for MicroTom Tomato

Weikun Wang¹, Wenqian Fu¹, Qiumei Hong¹, Yang Zheng¹, Jiahui Yu¹, Yan Wang¹,
Liangmiao Liu¹, Li Yang^{1,2}, Changchun Wang^{1,2*}, Weidong Guo^{1,2*}

¹College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; ²Key Laboratory of Biotechnology on Specialty Economic Plants of Jinhua, Jinhua 321004, China

Abstract MicroTom tomato (*Solanum lycopersicum* cv. 'MicroTom') is widely used for functional characterization due to its short life cycle and clear genetic background. However, the traditional genetic transformation system of MicroTom based on tissue culture is constrained by low efficiency, long transformation period and complex operation. Based on the somatic cell reprogramming mechanism triggered by wound signaling, this study established an efficient and rapid *in planta* genetic transformation system for MicroTom tomato. Wound hypocotyl were created by removing apical cotyledons and true leaves from two-week-old seedlings, followed by direct inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* carrying binary vector pCY-H05251-VcDAD2-EGFP (enhanced green fluorescent protein) to induce shoot regeneration. Results showed that a 28.6% PCR-based positive efficiency of regenerated shoots in the T₀ generation, with seeds derived within 4–5 months post inoculation. Antibiotic and fluorescence screening revealed approximate 73.5% lines in the T₁-generation expressed the fused EGFP protein. Compared to conventional tissue culture-dependent transformation systems, this protocol enhanced transformation efficiency, shortened transformation period, and simplified sterile operational procedures. The *in planta* genetic transformation system provides a robust platform for functional genomics studies, and significantly lowers technical barriers in tomato genetic breeding.

Key words MicroTom tomato, genetic transformation, *in planta*, gene function, molecular breeding

* Authors for correspondence. E-mail: wcc@zjnu.cn; gwd@zjnu.cn