

农杆菌介导的番茄遗传转化的研究进展

苗青,李正国*,杨迎伍

(重庆大学生物工程学院基因工程研究中心,重庆市高校功能基因与调控新技术重点实验室,重庆 400030)

摘要:番茄(*Lycopersicon esculentum*)遗传转化体系对其功能基因的研究和基因工程育种有重要影响,对农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的番茄遗传转化的研究进展进行了综述,主要包括影响番茄遗传转化效率的几个因素,如番茄的基因型、外植体状态、预培养和侵染过程、分化培养基中的激素和抗生素配比以及不同的外源基因等问题。并对今后的番茄遗传转化研究进行了展望。

关键词:番茄;遗传转化;农杆菌;研究进展

中图分类号:Q785

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2011)06-0585-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.06.017

Progresses in *Agrobacterium*-mediated Transformation of Tomato

MIAO Qing, LI Zheng-guo*, YANG Ying-wu

(College of Genetic Engineering Research Center of Bio-engineering, Key Laboratory of Functional Gene and New Regulation Technologies under Chongqing Municipal Education Commission, Engineering and Technology Research Center for Fungal Insecticides of Chongqing, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: The progresses in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum*) was reviewed. Several factors were summarized, such as tomato genotypes, explants, the processes of preculture and infection, the ratio of plant growth regulators and antibiotics in regeneration medium, and different target gene. The tomato genetic transformation in future was prospected.

Key words: Tomato; Genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; Progress

植物遗传转化是将外源遗传物质导入植物受体细胞,使其在受体细胞中整合表达并且能够稳定遗传。目前植物的遗传转化是植物基因工程的核心技术,该技术的建立和发展,使人们能够根据需求将特定的基因在不同种属植物之间进行表达,为植物改良提供了新的途径。目前常见的植物遗传转化技术有以下几种:农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的遗传转化法、基因枪法、显微注射法、PEG法、花粉管通道法和超声波法等。在这些方法中,农杆菌介导的遗传转化目前在植物中应用最广泛^[1-2]。

番茄(*Lycopersicon esculentum*)是一种世界性种

植的最重要的鲜食和加工原料。它的基因组较小,是一种理想的模式植物^[3]。另外,番茄还具有自花授粉易于纯合、生长周期短(45~100 d)、在温室内可周年生长等优点,因而其遗传转化研究备受关注。自从1986年McCormick等^[4]首次用农杆菌介导的方法获得转基因番茄植株以来,番茄的遗传转化研究不断发展,但转化效率有很大差异,较低的不足10%^[5-7],较高的能达到80%以上,甚至100%^[8-11]。影响农杆菌介导的番茄遗传转化的因素有很多,如番茄基因型、外植体类型和生长时期、农杆菌菌株、分化培养基等。本文综述了农杆菌介导的番茄遗传转化方法的研究进展,旨在为提高番茄的转化效率提供科学参考。

收稿日期:2011-04-08

接受日期:2011-05-20

基金项目:国家自然科学基金项目(30972002, 31071798);中央高校基本科研业务费项目(CDJXS)资助

作者简介:苗青(1986~),女,硕士研究生,研究方向为分子生物学, email: miaoqing012@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: zhengguoli@cqu.edu.cn

1 番茄的基因型

不同基因型的番茄在再生过程中对植物生长调节剂的反应是专一的^[12],植物生长调节剂在质量和类型上的变化都会影响外植体的生长和再生芽的数量^[13]。有研究表明,不同基因型的番茄在相同的转化条件下,其转化效率差异很大^[14-17]。Prematilake 等^[9]研究了基因型不同的两种番茄品种 Marglobe 和 T-146, Marglobe 的转化率为 53.3%,而相同条件下 T-146 能够达到 89.3%。Micro-Tom、Red Cherry、Rubion、Piedmont、B6203 等番茄品种在相同条件下的转化率都在 20% 左右,它们的转化效率差异较小^[14]。因此,基因型对植物生长调节剂的专一性使转化变得较为困难,需要对每个番茄基因型的转化过程分别进行研究,以寻求不同基因型植株最适合的转化方法。

2 外植体

外植体的选择对转化效率有重要影响。番茄无菌苗的苗龄、外植体的类型(如子叶、叶片或下胚轴等)、大小以及在培养基上的放置方向等都对转化有影响。7~10 d 的番茄无菌苗最适合用于转化,苗龄越大,组织硬化,木质化程度较高,不利于遗传转化^[18-20]。曾用不同的番茄组织作为外植体来诱导再生苗,如子叶、下胚轴、叶片和顶端分生组织等,结果表明,不同的外植体转化效率不同,一般来说子叶的转化效率较高、分化速度快,可缩短转化时间,而下胚轴的转化效率相对较低^[13-14,21-24]。但也有研究报道下胚轴的转化效率高于子叶^[12,18]。Yasmeen^[20]研究了番茄顶端分生组织、子叶和下胚轴的转化效率,结果表明顶端分生组织的转化效率明显高于子叶和下胚轴。这可能是番茄基因型和实验方法有差异,导致不同外植体的转化率不同^[13]。外植体大小对番茄的再生也有重要影响,理想的外植体大小为叶片 0.5 cm²,茎段 1 cm 左右^[25]。外植体的放置方向有近轴面向上^[22]和背面向上^[13-14]两种方式,但基本原则是使外植体的伤口与培养基有较好的接触,以利于外植体愈伤组织的诱导和芽的分化。

3 预培养和侵染

预培养是将外植体在农杆菌侵染之前在预培养基上培养 1~2 d,使其膨大更利于侵染。有报道

在预培养过程中使用烟草(*Nicotiana tabacum*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)或番茄悬浮细胞做饲养层^[4,6,7,13,26-28],但这使转化过程变得较为复杂。通过对预培养基进行改进,以提高转化效率和简化转化步骤。Qiu 等^[29]在 MS 基本培养基上加入吲哚乙酸(IAA)和玉米素核苷(ZR)作为预培养基,转化效率在 20% 以上。Sharma 等^[17]在 MS 基本培养基中加入 2 mg L⁻¹的 BAP 作为预培养基,转化效率为 41.4%。孟山都公司的研究表明,利用新鲜外植体直接侵染比预培养后再进行侵染的效果要好^[30]。我们在 MS 基本培养基中添加硫胺素(VB1),2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)以及激动素(KT)作为预培养基,外植体明显膨大,生长状态良好,转化效果较好。因此要根据番茄品种和外植体的类型确定预培养过程中的培养基要素及是否需要预培养。

番茄转化的另一个重要影响因素就是农杆菌菌株,不同农杆菌菌株对植物的侵染能力不同,菌株本身的诸多因素直接影响转化的效率。T-DNA 是农杆菌 Ti(tumor inducing)或 Ri(root inducing)质粒中的一段 DNA 序列,可以从农杆菌中转移并稳定整合到植物基因组中,是植物分子生物学中广泛应用的遗传转化载体。T-DNA 插入片段的大小对转化效率有影响,插入片段越大,转化效率越低^[31]。农杆菌含有 Vir 辅助质粒和 octopine 型 Ti 质粒的菌株转化效率较高,如 LBA4404(含 pAL4404 Ti 质粒)、MOG101(含 pMOG101 Ti 质粒)和 UIA 143(含 pMOG101 Ti 质粒)的转化效率要比 nopaline 型菌株转化效率高^[31]。

侵染和共培养过程是影响转化效率甚至转化成功与否的重要阶段,这个过程中农杆菌和外植体相互作用,以实现外源基因整合进植物基因组的目,因此要控制好菌液浓度和侵染时间。农杆菌浓度过高,在培养基上繁殖过快,容易造成外植体死亡;浓度过低又不能有效实施转化。一般农杆菌经过夜培养后,需稀释到合适的浓度才能进行侵染,用于侵染的菌液浓度一般为 OD₆₀₀ = 0.01 ~ 1.0^[6,13-15,24,29-30,32-33]。Gao 等^[34]的研究表明,农杆菌过夜培养后的最佳浓度为 OD₆₀₀ 为 1.0,且将过夜培养的菌液再活化 1 次,培养 4 h 左右,稀释到 OD₆₀₀ = 0.1 时用于侵染,转化效果较好。一般侵染时间为 10~30 min,具体要依据菌液的浓度来确定。我们的研究表明,农杆菌菌液浓度为 OD₆₀₀ = 0.05,侵染 30 min,转化效果较好,侵染后共培养的时间一般不

超过 3 d,否则农杆菌会大量繁殖难以抑制^[33]。此外,研究表明侵染和共培养过程中加入 100 ~ 200 μmol/L乙酰丁香酮(AS)能够诱导农杆菌 *Vir* 基因的活化,从而促进外源基因的整合^[21,27,34-35],提高转化效率。

4 分化培养基中的生长调节剂与抗生素

番茄转化体系中一般利用 MS 培养基或以 MS 培养基为基础改进的培养基,同时添加适当的植物生长调节剂。植物生长调节剂能通过改变多种生理过程,影响植物的形态建成。番茄的再生体系研究中采用了不同种类和浓度的植物生长调节剂(表 1)。在愈伤组织诱导和再生芽分化的过程中,所用

的细胞分裂素和生长素的比例是不一样的。常用的细胞分裂素主要有玉米素(ZT),苄氨基嘌呤(BA),细胞激动素(KT)和异戊烯酰嘌呤(2-iP),它们一般单独使用或与生长素(IAA)或生长素类似物(NAA、IBA 等)配合使用^[41]。分化培养基中使用的生长调节剂种类和浓度不同,以及番茄材料和实验方法的不同,导致转化效率也不一致(表 1)。Cortina 研究了玉米素核苷(ZR)和玉米素(ZT)对番茄再生芽分化的影响,结果表明玉米素核苷诱导再生芽的效果优于玉米素^[27]。这与我们的研究结果相似,我们在分化培养基中添加 ZR (2 mg L⁻¹)诱导再生芽的效果比用同浓度 ZT 的好。

农杆菌的过度繁殖会对转化产生不良影响,会

表 1 外植体、植物生长调节剂对转化效率的影响
Table 1 Effects of explant, plant growth regulator on tomato transformation

编号 No.	品种 Cultivars	外植体 Explant	植物生长调节剂 (mg L ⁻¹) Plant growth regulator	转化效率 Transformation efficiency
1	UC82B	子叶 Cotyledon	ZT (0.5) + IAA (0.5)	14% ^[18]
	Monalbo			8% ^[18]
2	Money maker	子叶 Cotyledon	ZR (2) + IAA (0.1)	9% ^[7]
3	Money maker	子叶,下胚轴 Cotyledon, hypocotyl	ZT (2)	11% ^[13]
4	San Marzano nano, San Marzano, Principe Borghese	子叶,叶片,下胚轴 Cotyledon, leaf, hypocotyls	BA (0.1 ~ 10); Zeatin (0.1 ~ 10)	95% ~ 100% ^[8]
	ACE 55 VF, Pakmor			80% ^[8]
5	Money maker	子叶 Cotyledon	ZT (2)	7% ~ 37% ^[6]
6	Aihuang	下胚轴 Hypocotyl	BA (2.5) + IAA (0.2)	50% ~ 81.3% ^[36]
	Xianfeng		BA (1 ~ 2) + IAA (2)	50% ~ 76.3% ^[36]
7	Santa Clara	子叶 Cotyledon	Zeatin (1) + IAA (0.1); BA (2.5) + IAA (0.2)	50% ~ 100% ^[10]
	Fime mutant			50% ~ 90% ^[10]
	IPA-5			25% ~ 80% ^[10]
	IPA-6			60% ~ 95% ^[10]
8	UC82	子叶 Cotyledon	8.8 μmol/L 6-BA, 6.1 μmol/L GA ₃	25% ^[19]
9	Marglobe	叶片 Leaf	ZT (1); ZT (2); ZT (2) + IAA (0.1); NAA (0.05) + BAP (0.5)	18.7% ~ 53.3% ^[18]
	T-146			30.7% ~ 89.3% ^[18]
10	Micro-Tom, Red Cherry, Rubion, Piedmont, B6203	子叶,下胚轴,叶片 Cotyledon, hypocotyl, leaf	ZT (2) + IAA (0.1)	20% ^[14]
11	p73, UC82b, inbred lines LP0, LP2, LP4	子叶 Cotyledon	ZT (1) + KT (4) + IAA (4)	1.8% ~ 11.3% ^[22]
12	UC82B	子叶 Cotyledon	IAA (0.5) + ZR (0.5)	12.5% ^[27]
13	Premium, Hana, Money maker	子叶,下胚轴 Cotyledon, hypocotyl	ZT (1) + IAA (0.1)	75% ~ 100% ^[11]
14	Riograndea	下胚轴 Hypocotyl	ZT (1) + IAA (0.1)	64.5% ^[37]
		叶盘 Leaf disc		56% ^[37]
		茎尖 Shoot tip		80% ^[37]

续表(Continued)

编号 No.	品种 Cultivars	外植体 Explant	植物生长调节剂 (mg L ⁻¹) Plant growth regulator	转化效率 Transformation efficiency
15	Micro-Tom	子叶 Cotyledon	ZT (1); ZT (1.5)	31.3% ~ 48% ^[21]
16	Micro-Tom	子叶 Cotyledon	ZR (2) + IAA (0.1)	24% ~ 80% ^[30]
17	Riogarande	下胚轴, 叶盘 Hypocotyl, leaf disc	2-ip (1.5) + IAA (0.5)	72.5% ~ 79.22% ^[38]
18	Micro-Tom	子叶 Cotyledon	ZT (2) + IAA (0.1)	20% ^[29]
19	Pusa Ruby, Arka Vikas, Sioux	子叶 Cotyledon	BAP(2)	30.29% ^[17]
			ZT (1)	40.7% ^[17]
			BAP (2) + IAA (1)	32.9% ^[17]
			ZT (1) + IAA (0.1)	41.6% ^[17]
			ZT (1) + IAA (1)	37.3% ^[17]
20	Rio Grande	子叶, 下胚轴, 顶端分生组织	BAP (1)	12% ~ 30% ^[20]
		Cotyledon, hypocotyl, apical meristem	KT (2) + IAA (0.8)	10% ^[20]
			ZT (1) + IAA (0.5)	30.4% ^[20]
21	Zhongshu No. 4	子叶 Cotyledon	ZT (1) + IAA (0.1)	44.7% ^[34]
22	Megha	下胚轴, 子叶 Hypocotyl, cotyledon	2,4-D (1.5 ~ 2.0); KT (3) + IAA (0.3)	95% ^[39]
23	H-86, H-24, DVRT-1, Sel-7, DVRT-2	下胚轴, 子叶 Hypocotyl, cotyledon	BAP (2)	92.2% ~ 96.6% ^[40]

导致外植体在分化过程中坏死。因此,在分化培养基中除了添加必须的植物生长调节剂以外,还要附加抑制农杆菌过度繁殖的抗生素。在遗传转化研究中用于抑制农杆菌的理想抗生素应具备的首要条件就是对外植体没有毒害作用,同时又不能对转化效率造成影响。番茄的遗传转化研究中常用的抑制农杆菌的抗生素是羧苄青霉素(Cb)和头孢噻肟(Cefotaxime)^[42-43],但是研究表明这两种抗生素对愈伤组织的诱导和芽的分化有明显的抑制作用,从而影响转化效率^[44]。特美汀(Timentin)和奥格门汀(Augmentin)是另外两种用于植物遗传转化中抑制农杆菌的抗生素^[45-46]。与羧苄青霉素(500 ~ 1000 mg L⁻¹)和头孢噻肟(500 mg L⁻¹)相比,它们的抑菌效果更好,在较低浓度(Timentin 100 mg L⁻¹, Augmentin 300 mg L⁻¹)下就可达到抑菌作用,即使在较高浓度时(500 mg L⁻¹)对愈伤组织和芽的诱导也没有明显的抑制作用,而且成本较低^[621,47]。研究表明在番茄转化过程中使用特美汀和奥格门汀对器官形成有促进作用,这可能是由于它们的化学结构使它们能够释放出生长素类似物,从而促进芽和不定根的生长^[10,47]。我们在培养基中同时添加特美汀(100 mg L⁻¹)和奥格门汀(300 mg L⁻¹),结果表明在抑制农杆菌生长的同时,对番茄的愈伤组织和芽的诱

导也没有明显的抑制作用。因此在番茄的遗传转化过程中可以使用这两种抗生素来抑制农杆菌,以提高转化效率。

5 外源基因

在农杆菌介导的番茄遗传转化过程中,不同外源基因的转化效率也不同。Sun 等研究了 *GUS* 基因、调控开花的基因 *SVP* 和昼夜节律钟基因 *LHY* 在相同条件下的转化率,结果表明, *SVP* 基因的转化效率最低,为 31.3%; *LHY* 基因的为 42.5%,而 *GUS* 基因的可达 48.8%^[21]。孟山都公司研究了 33 个抗病基因在相同条件下的转化效率,结果表明,它们的转化效率具有很大差异,最低的转化率不足 5%,最高的可达到 105%^[30]。这些研究结果说明了在相同的转化条件下,不同的外源基因的转化效率差异较大,其原因可能是外源基因的大小不同,使得转化的难易程度有差别。目前对于不同外源基因的转化效率研究较少,还有待于进一步研究以明确不同基因的转化效率差异。

6 展望

番茄是植物基因工程中进行遗传转化的重要模式植物之一。目前在番茄的遗传转化过程中还

存在一些问题,如转化率低、转化体依赖抗生素的选择、外源基因的沉默或表达水平低、转化植株后代遗传不稳定、以及操作复杂等问题。这些问题阻碍了番茄基因工程的研究。因此,番茄的遗传转化体系还需要在筛选高效转化的农杆菌菌株、合适的番茄品种、最优培养基配方及添加物等方面进一步优化,从而建立高效的番茄遗传转化体系,为植物功能基因研究及基因工程改良提供高效的遗传转化平台,促进产业化发展。

参考文献

- [1] Gasser C S, Fraley R T. Genetically engineering plants for crop improvement [J]. Science, 1989, 244(4910): 1293-1299.
- [2] Birch R G. Plant transformation: Problems and strategies for practical application [J]. Ann Rev Plant Biol, 1997, 48: 297-326.
- [3] Arumuganathan K, Earle E. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry [J]. Plant Mol Biol Rep, 1991, 9(3): 208-218.
- [4] McCormick S, Niedemeyer J, Fry J, et al. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Rep, 1986, 5(2): 81-84.
- [5] Sree Vidya C S, Manoharan M, Ranjit Kumar C T, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* 'Pusa Ruby') with coat protein gene of *Physalis mottle* tymovirus [J]. J Plant Physiol, 2000, 156(1): 106-110.
- [6] Ling H Q, Krieseit D, Canal M W. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. Plant Cell Rep, 1998, 17(11): 843-847.
- [7] Roekel J S C, Damm B, Melchers L S, et al. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12(11): 644-647.
- [8] Plastira V A, Perdikaris A K. Effect of genotype and explant type in regeneration frequency of tomato *in vitro* [J]. Acta Hort, 1997, 447(1): 231-234.
- [9] Prematilake D P, Power J B, Davey M R. Genetic transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) with *Agrobacterium* [J]. Ann Sri Lanka Agri, 2002, 4(3): 207-214.
- [10] Costa M G C, Nogueira F T S, Figueira M L, et al. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19(3): 327-332.
- [11] Gubis J, Lajchova Z, Farago J, et al. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. Biologia, 2004, 59(3): 405-408.
- [12] Kurtz S M, Lineberger R D. Genotypic differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1983, 108(5): 710-714.
- [13] Frary A, Earle E D. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato [J]. Plant Cell Rep, 1996, 6(3/4): 235-240.
- [14] Park H S, Morris L J, Park E J, et al. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation [J]. Plant Physiol, 2003, 160(10): 1253-1257.
- [15] Pozueta-Romero J, Houline G, Canas L, et al. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2001, 67(2): 173-180.
- [16] Marchionni B E, Pratta G R, Zorzoli R. Genetic analysis of the *in vitro* culture response in tomato [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2007, 88(2): 233-239.
- [17] Shama K M, Solanke U A, Jani D, et al. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato [J]. J Biosci, 2009, 34(3): 423-433.
- [18] Hanza S, Chupeau Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. J Exp Bot, 1993, 44(12): 1837-1845.
- [19] Hu W, Phillips G C. A combination of overgrowth-control antibiotics improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency for cultivated tomato (*L. esculentum*) [J]. In vitro Cell Biol Plant, 2001, 37(1): 12-18.
- [20] Yasmeen A. An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv. Rio Grande) [J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31(6): 1271-1277.
- [21] Sun H J, Uchii S, Watanabe S, et al. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics [J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47(3): 426-431.
- [22] Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, et al. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(2): 231-238.
- [23] Raj S K, Singh R, Pandey S K, et al. *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection [J]. Curr Sci, 2005, 88(10): 1674-1679.
- [24] Wu Y, Chen Y, Liang X, et al. An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation in tomato [J]. Russ J Plant Physiol, 2006, 53(2): 252-256.
- [25] Chandel G, Katiyar S K. Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. Adv Plant Sci, 2000, 13(1): 11-17.
- [26] Zhang H, Blumwald W. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(8): 765-768.
- [27] Cortina C, Culiñez-Macia F A. Tomato transformation and transgenic plant production [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2004, 76(3): 269-275.
- [28] Frary A, van Eck J. Organogenesis from transformed tomato

- explants [J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 286(III): 141–150.
- [29] Qiu D, Diretto G, Tavarza R, et al. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene *CsZCD* [J]. *Sci Hort*, 2007, 112(2): 172–175.
- [30] Dan Y, Yan H, Munyikwa T, et al. Micro-Tom: A high-throughput model transformation system for functional genomics [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(5): 432–441.
- [31] Frary A, Hamilton M C. Efficiency and stability of high molecular weight DNA transformation: An analysis in tomato [J]. *Transgen Res*, 2001, 10(2): 121–132.
- [32] Lipp Joao K H, Brown T A. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^r :: pGSF Rf61 in the presence of acetosyringone [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12(7/8): 422–425.
- [33] Krasnyanski S F, Sandhu J, Donier L L, et al. Effect of an enhanced CaMV 35S promoter and a fruit-specific promoter on uida gene expression in transgenic tomato plants [J]. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 2001, 37(4): 427–433.
- [34] Gao N, Shen W S, Cao Y, et al. Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2009, 98(3): 321–330.
- [35] Ficcadenti N, Sestili S, Pandolfini T, et al. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato [J]. *Mol Breed*, 1999, 5(5): 463–470.
- [36] Chen H Y(陈火英), Zhang J H(张建华), Zhuang T M(庄天明), et al. Studies on optimum hormone levels for tomato plant regeneration from hypocotyl explants cultured *in vitro* [J]. *Acta Agri Shanghai(上海农业学报)*, 1999, 15(2): 26–29.(in Chinese)
- [37] Jabeen N, Chaudhry Z, Rashid H, et al. Effect of genotype and explant type on *in vitro* shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. *Pak J Bot*, 2005, 37(4): 899–903.
- [38] Chaudhry Z, Afroz A, Rashid H. Effect of variety and plant growth regulators on callus proliferation and regeneration response of three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*) [J]. *Pak J Bot*, 2007, 39(3): 857–869.
- [39] Paramesh H, Fakrudin B, Kuruvina shetti M S. Differential response of explants for *in vitro* plant regeneration through callus in local and improved cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. *Res Crops*, 2010, 11(2): 375–382.
- [40] Singh A, Singh M, Singh B D. Comparative *in vitro* shoot organogenesis and plantlet regeneration in tomato genotypes [J]. *Ind J Hort*, 2010, 67(1): 37–42.
- [41] Bhatia P, Ashwath N, Senaratna T, et al. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2004, 78(1): 1–21.
- [42] Tang H, Ren Z, Krczal G. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(9): 881–887.
- [43] Alsheikh M K, Suso H P, Robson M, et al. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens* [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 20(12): 1173–1180.
- [44] Nauerby B, Billing K, Wyndaele R. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Sci*, 1997, 123 (1/2): 169–177.
- [45] Vergauwe A, Van Geldre E, Inze' D. The use of amoxicillin and ticarcillin in combination with a β -lactamase inhibitor as decontaminating agents in the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. [J]. *J Biotechn*, 1996, 52(2): 89–95.
- [46] Cheng Z M, Schnurr J A, Kapaun J A. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17(8): 646–649.
- [47] Ieamkhang S, Chatchawankanphanich O. Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2005, 82(2): 213–220.