

# 反义 ACC 基因导入获得瓶插寿命长的香石竹植株

余义勋 包满珠\*

(华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 通过农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法, 利用香石竹叶片作外植体, 将反义香石竹 ACC 氧化酶基因导入香石竹 '黄星' 品种, 通过 PCR 扩增、Southern blot 检测, 证明反义 ACC 氧化酶基因已整合到香石竹基因组。研究发现, 叶龄、乙酰丁香酮等对转化率有着较大影响。通过叶片的两度选择分化, 大大减少了转化嵌合体比例。转基因植株在隔离条件下栽培, 开花正常, 切花在 25 °C 条件下瓶插寿命较对照延长了 4 d。

**关键词:** 香石竹; ACC 氧化酶 (ACO) 基因; 遗传转化; 瓶插寿命

中图分类号: S 68 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2004) 05-0633-04

## Carnation Flower Vase Life Prolonged by Transformation with Antisense ACC Oxidase Gene

Yu Yixun and Bao Manzhu\*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Taking young leaf as explants, the carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivar 'Yellow Star' was transformed with antisense genomic DNA of ACC oxidase, the key enzyme in ethylene synthesis, driven by the CaMV 35S promoter mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. PCR analysis and Southern blotting detection showed that foreign gene was integrated into the carnation genome. It is demonstrated that both leaf age and the acetosyringone are effective factors that influences the differentiation frequency on selection medium. The chimera occurring rate was effectively decreased by two times regeneration of the leaf explants under selection. The transgenic plants were transplanted to soil and flowering normally in isolated greenhouse. The vase life of transgenic plant is 4 days longer than that of control plants under 25 °C.

**Key words:** Carnation; ACC oxidase (ACO) gene; Genetic transformation; Vase life

ACC 氧化酶 (ACO), 又称乙烯合成酶 (EFE), 催化植物乙烯合成的最后一步 (即催化 ACC 生成乙烯)<sup>[1]</sup>。抑制 ACO 活性可延缓乙烯生成, 从而延缓切花衰老。香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.) 是典型的乙烯致衰植物, 传统的保鲜方法多采用含有乙烯抑制剂 (AVG、GVG、AOA) 或乙烯拮抗剂 (Ag、STS、2,5-NBD 等) 的保鲜剂, 但这些化学物质会造成环境污染<sup>[2]</sup>。国外有人分别将正义、反义香石竹 ACC 氧化酶基因 cDNA 导入香石竹, 使其花瓣衰老明显延迟<sup>[3,4]</sup>。本研究在前期工作的基础上<sup>[5]</sup>, 利用农杆菌介导法将反义 ACO 基因导入香石竹, 获得瓶插寿命长的转基因植株。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、质粒与植物材料

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 携带植物表达载体 pMOGMONACO2 (图

收稿日期: 2003-10-25; 修回日期: 2004-02-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970533)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn)

1), 该质粒含 CAMV35S 启动子的反义香石竹 ACO 基因核 DNA<sup>[5]</sup> 及潮霉素磷酸转化酶 (HPT) 基因选择标记。香石竹品种 ‘黄星’ 组培苗购自云南省农科院。



图 1 反义 ACO 基因的植物表达 pMOGMONACO2

Fig. 1 A linear map of the T- DNA region of pMOGMONACO2

## 1.2 香石竹转化及其植株再生

用香石竹组培苗叶片作外植体<sup>[6]</sup>。将叶片顺茎轴撕下, 先在培养基 (MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L, pH 5.8~6.0) 上预培养 2 d, 于 OD<sub>600</sub> 为 0.5、不含乙酰丁香酮 (AS) 的 LB 培养基中的工程菌液侵染 8 min 后取出用无菌滤纸吸干, 转入含有不同浓度 AS 的培养基 (MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L, pH 5.8~6.0), 25 ℃ 下共培养 3 d。

在共培养结束后将外植体移入外加不同浓度头孢霉素和 HPT 的选择分化培养基 (MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L, pH 5.8) 上进行筛选, 4 周后将外植体移入头孢霉素减半的选择分化培养基中。当叶片基部伤口薄壁组织分化芽 (非腋芽) 长至 1 cm 左右时, 将其切下转至含有 HPT 的选择生根培养基 (MS + NAA 0.1 mg/L) 中诱导生根及植株生长。

## 1.3 转化植株的检测及瓶插寿命比较

PCR 检测: 根据 HPT 基因序列设计一对引物, 5'-CGTCTGTCGAGAA GTTTC-3' 和 5'-TACTTC-TACACAGCCATC-3'。PCR 反应采用 20 μL 体系, 模板 DNA 20 ng, 两个引物各 0.5 μmol/L, 1 U Taq 聚合酶。94 ℃ 变性 4 min, 然后依次在 94 ℃ 变性 1 min, 57 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 循环 35 次后在 72 ℃ 保温 10 min, 最后在 4 ℃ 保存。取样 10 μL 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检查。

Southern blot 杂交分析: 取 PCR 呈阳性的植株基因组 DNA、非转化香石竹 DNA (阴性对照) 及 pMOGMONACO2 质粒 DNA (阳性对照), 37 ℃ 条件下 *EcoR* 酶切 16 h, 通过纸吸印法将酶切的 DNA 转移到 Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham) 膜上, 用上海生工 DNA 回收试剂盒回收 HPT 基因片段作探针。预杂交、杂交均参照 Sambrook 等的方法<sup>[7]</sup>。

切花瓶插寿命比较: 在转基因植株与阴性对照盛花期 (外层花瓣与茎轴垂直, 此时为 0 d) 时切下 15 cm 左右长花枝, 插入 250 mL 广口瓶蒸馏水中, 光照 1000 lx, 每天换水 1 次, 比较瓶插寿命。外层花瓣内卷萎蔫时为瓶插寿命结束。设 4 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 筛选转化体的抗生素浓度

分化培养基中加入一定浓度 (100~400 mg/L) 的抑菌剂头孢霉素对香石竹叶片不定芽的分化无显著影响, 确定头孢霉素的浓度为 400 mg/L。香石竹叶片对潮霉素很敏感, 当其浓度达到 4 mg/L 时完全抑制幼叶芽的分化, 故而确定选择分化培养基中潮霉素的浓度为 4 mg/L, 生根培养基的 HPT 浓度为 3.5 mg/L。

### 2.2 香石竹叶片的选择培养和植株再生及相关影响因子分析

叶片与农杆菌共培养之后置于选择分化培养基上培养, 1 周后叶片外植体开始膨大、伸长, 组织较疏松, 叶片基部稍膨大, 略见绿色愈伤组织。12 d 后叶片和茎节伤口处薄壁组织开始从基部出现小芽点, 外植体更加疏松, 第 3 周后开始出现小芽丛。待不定芽长至 1 cm 左右时将其切下转移到选择生根培养基中进行生根培养。2 周后开始分化不定根, 部分在选择生根培养基上不能继续生根或生长的不定芽予以淘汰。不同叶龄的叶片分化率和转化率差异很大, 将叶片分为两组进行比较, 顶芽下

第 1、2、3 对叶片 (幼叶) 作为一组, 顶芽下第 4、5、6 对叶 (老叶) 作为一组。如表 1 所示, 幼叶分化率为 38.2%, 远远高于老叶, 因此在转化试验中以幼叶为主。

另外研究中还发现乙酰丁香酮 (AS) 对转化率有极大的影响 (表 2), 共培养基不加 AS 几乎得不到抗性芽, 加 AS 后转化率显著提高, 100~200  $\mu\text{mol/L}$  对转化率无显著差异, 100  $\mu\text{mol/L}$  平均转化率最高。共培养基 AS 浓度选用 100  $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 叶龄对分化率和外加选择压时的分化率的影响

Table 1 The effect of leaf age on differentiation frequency with and without selection (%)		
叶片	分化率	外加选择压时分化率
Leaves	Differentiation frequency without selection	Differentiation frequency on selection medium
幼叶 Young leaves	38.2 $\pm$ 2.4a(4.3)	4.3 $\pm$ 0.3a(1.4)
老叶 Old leaves	13.9 $\pm$ 1.3b(1.8)	1.1 $\pm$ 0.2b(1.2)

注: 括号中为平均每个叶片分化芽数。  
Note: The number in the bracket was the means of differentiation shoots per leaf.

表 2 乙酰丁香酮 (AS) 对转化率的影响

Table 2 Effect of acetosyringone (AS) on transformation frequency	
AS ( $\mu\text{mol/L}$ )	转化率 Transformation frequency (%)
0	0.0 $\pm$ 0.0c
50	2.1 $\pm$ 0.3b
100	4.3 $\pm$ 0.3a
150	3.9 $\pm$ 0.5a
200	3.9 $\pm$ 0.4a

由于考虑到嵌合体的存在, 将抗性生根苗幼叶撕下再置于选择培养基上分化, 待分化出的抗性芽长至 1 cm 左右时重复上述生根步骤。4 周后将生根的潮霉素抗性苗移入珍珠岩的营养钵中, 在光照培养箱中培养 7~10 d, 再移到温室。在选择生根培养基上不能继续生根或生长的不定芽予以淘汰。转化植株用茎段进行继代或生根, 4 周后即可炼苗移植田间。

### 2.3 转基因植株的 PCR 分析

取 8 株抗性植株, 各取叶片约 0.1 g, 分别提取总 DNA, 用 HPT 引物进行 PCR 扩增。在 8 株抗性植株中有 5 株得到了预期分子量 947 bp 的条带, 与质粒 DNA 扩增出的条带完全相同, 而未转化的香石竹 DNA 未扩增出相应的条带 (图 2)。

### 2.4 Southern 杂交检测

用  $^{32}\text{P}$  标记的 HPT 基因片段为探针, 分别与上述 5 株 PCR 检测呈阳性的植株、未转化的植株总 DNA 和质粒 DNA (都经 *EcoR* I 酶切) 进行杂交, 结果表明: 有 3 株 (T189 株系, T335 株系和 T150 株系) 和质粒有杂交带出现, 而未转化的植株则无杂交带出现。证明反义 ACO 基因已整合到香石竹基因组中 (图 3)。

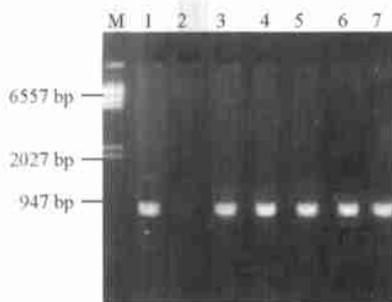


图 2 转基因香石竹 DNA 的 PCR 扩增检测结果

M.  $\lambda$ /HindIII Marker; 1. 质粒 DNA; 2. 对照; 3-7. 抗性植株。

Fig. 2 PCR Amplification results of transgenic plants

M.  $\lambda$ /HindIII Marker; 1. plasmid DNA; 2. Control; 3-7. HPT-resistant plants.

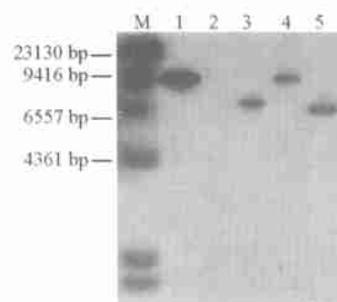


图 3 转基因香石竹 Southern blot 结果 (*EcoR* I 酶切)

M.  $\lambda$ /HindIII Marker; 1. 质粒 DNA; 2. 对照;

3-5. 转基因植株 (3. T189; 4. T150; 5. T335)。

Fig. 3 Southern blot results of transgenic plants (*EcoR* I digested)

M.  $\lambda$ /HindIII Marker; 1. Plasmid DNA; 2. Control; 3-5. transgenic plants.

### 2.5 瓶插寿命的比较

将转基因植株 T189 株系、T335 株系与未转化对照瓶插寿命比较, 转基因植株瓶插寿命都显著

延长(表3)。未转化植株的花瓣在盛花后第5天左右花瓣开始内卷,一般在第7天完全萎蔫。而转化植株花瓣在第8天时仍保持丰满状态,第9天以后才开始表现出脱水和失色(图4)。

表3 香石竹转基因植株花朵与对照瓶插寿命的比较

Table 3 Comparison of vase life of cut flowers between transgenic plant and wild type plant of carnation 'Yellow Star'

株系 Line	瓶插寿命 Vase life (d)
对照 Control	5.4 ±0.24 b
T189	9.0 ±0.32 a
T335	8.8 ±0.37 a



图4 瓶插第9天转基因植系 T189 (左) 与对照 (右) 比较

Fig. 4 Vase-life comparison of transgenic plant T189 (left) and control (right) (day 9)

### 3 讨论

叶片在从茎上撕下时往往带有腋芽,所带腋芽在4 mg/L HPT的选择培养基上开始阶段也可以生长,但其较幼叶基部分化芽先长出。一般腋芽在置于选择培养基后2周内首先长出,而叶片基部伤口薄壁组织分化芽一般则在3周以后才分化出来。因此3周以前所长出的芽必须剔除。

直接分化再生法用于遗传转化所获转基因植株会有嵌合体出现<sup>[8]</sup>。本研究通过两度选择分化培养筛选,可以有效减少嵌合体比例。所得转化植株经多次繁殖后栽培,其性状保持稳定。

香石竹切花的自然瓶插寿命为5 d左右。本研究通过将反义ACO基因导入香石竹,抑制内源靶基因的表达,使瓶插寿命达8~9 d,表现出一定的开发应用前景。由于目前转基因植株开花数量很有限,有关转基因植株与对照花瓣衰老的乙烯生物合成及ACC氧化酶活性等生理生化指标测定还在进行之中。

#### 参考文献:

- Adams D O, Yang S F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, 76: 170~174
- Bovy A G, Altvorst A C, Angenent G C. Genetic modification of the vase-life of carnation. *Acta Horticulturae*, 1995, 405: 179~189
- Savin K L, Baidoette S C, Graham M W, et al. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence. *HortScience*, 1995, 30 (5): 970~972
- Kosugi Y, Waki K, Iwazaki Y, et al. Senescence and gene expression of transgenic nonethylene-producing carnation flowers. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 2002, 71 (5): 638~642
- 余义勋, 张俊卫, 孙振元. 香石竹ACC氧化酶基因的克隆与植物表达载体构建. *林业科学研究*, 2002, 15 (3): 256~260
- 林荣呈, 包满珠. 香石竹的叶片培养及植株再生. *植物生理学通讯*, 1999, 35 (3): 205~206
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 565~572
- 王关林, 方宏筠. *植物基因工程原理与技术*. 北京: 科学出版社, 1998. 182~183