

# 不同结构的外源 ACO 基因导入番茄对乙烯生成速率的影响

陈银华<sup>1,3</sup>, 李汉霞<sup>2</sup>, 叶志彪<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; <sup>2</sup>华中农业大学国家蔬菜中心华中分中心, 武汉 430070; <sup>3</sup>教育部热带海洋与陆生生物资源研究及利用重点实验室, 海口 570228)

**摘要:** 为研究不同结构的外源基因对内源基因的影响, 通过农杆菌介导的遗传转化法将 3 种不同结构的外源 ACO 基因导入番茄基因组中, 对 3 种不同载体转基因植株的乙烯生成情况进行了检测。结果表明, 3 种载体中, RNAi 对内源 ACO 基因表达抑制作用最明显。

**关键词:** 番茄; ACO 基因; RNAi; 乙烯释放量

**中图分类号:** S 642.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 03-0644-05

## Effects of Introduction of Different T-DNA Structures of ACO Gene to Tomato Genome on Ethylene Production Rate

CHEN Yin-hua<sup>1,3</sup>, LI Han-xia<sup>2</sup>, and YE Zhi-biao<sup>1,2\*</sup>

[<sup>1</sup>National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup>National Center for Vegetable Improvement (Central China), Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>3</sup>Key Laboratory for Tropical Biological Resources, Ministry of Education, Haikou 570228, China]

**Abstract:** To analyze the effect of different structures of foreign genes on the endogenous genes, three different T-DNA structures of ACO gene were introduced into tomato genome through the method of *Agrobacterium* mediated transformation. The ethylene evolution of the transgenic tomato plants was measured by gas chromatography. The results showed that in the three different transgenic plants the maximum inhibition of endogenous ACO gene expression was observed using RNAi vectors.

**Key words:** Tomato; ACO gene; RNAi; Ethylene evolution

利用分子生物技术克隆植物乙烯 ACS (ACC 合成酶) 和 ACO (ACC 氧化酶) 基因, 通过反馈调节、反义表达等调控乙烯合成, 进而调控乙烯对植物的生理效应, 是当前乙烯作用研究的重要内容。国内关于利用反义 RNA 技术调节乙烯合成量的研究已在番茄等一些跃变型果实中获得成功 (叶志彪和李汉霞, 1996)。Picton 等应用反义 RNA 技术转移 ACC 氧化酶基因, 转基因番茄植株果实乙烯生成量比对照组下降了 90%, 而将 ACC 氧化酶基因反义导入芥菜, 转基因组织在组培 7 d 后乙烯产量比对照组降低 64% ~ 83%, 第一代转基因植株组织与亲本植株相似, 乙烯和 ACC 氧化酶活性下降了 50% ~ 75% (Pua & Lee, 1995; Savin et al, 1995)。此外, 利用 ACC 氧化酶基因的反义 RNA 技术抑制康乃馨乙烯释放从而延缓花瓣的衰老也取得成功 (Ma & Song, 1997)。至今已获得转反义 ACC 合酶基因或反义 ACC 氧化酶基因的植物还有: 香石竹、白芥属植物、烟草、甜瓜、马铃薯、百合、满天星、猕猴桃和枣树 (Lasserre et al, 1996; Guis et al, 1997; Cushman, 1998; Gallie, 1998)。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是最近几年发现和发展起来的一门新兴的转录水平上的基

收稿日期: 2006 - 11 - 18; 修回日期: 2007 - 02 - 28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (399770521, 39200079); 国家 '863' 项目 (2001AA21221)

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

因阻断技术, 是一种序列特异性的转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)。它可能是生物体的一种进化保守机制, 同时也可能成为特异性沉默内源基因和基因功能分析的一个新工具 (Fire et al, 1998; Fraser et al, 2000; Smith et al, 2000)。

本研究利用番茄 ACO 基因, 构建正义、反义、RNAi 载体进行番茄的遗传转化研究, 分析 3 种不同载体对内源基因表达抑制作用差异, 为进一步利用反义技术鉴定基因功能和创建特异突变体提供理论指导和实践依据。

## 1 材料与方法

供试番茄品种 ‘中蔬 5 号’ 种子来自于中国农业科学院; 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404 分别携带 pLBE、pABE、pD311 质粒, 这些质粒分别含有番茄 ACO 基因的正义、反义、RNAi 3 种 T-DNA 结构 (图 1)。其中 ACO 基因为根据电子克隆序列设计引物, 从病原诱导的番茄幼苗叶片中扩增的全长 cDNA 序列, 长度为 1 000 bp。

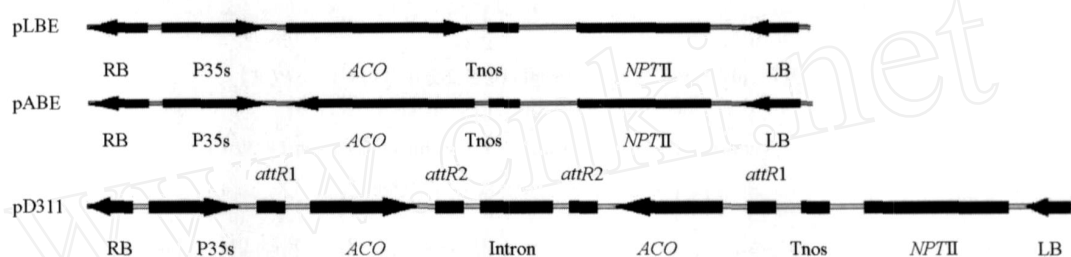


图 1 含 ACO 基因 3 种植物表达载体 T-DNA 区段结构图

Fig. 1 The T-DNA structure of the three expression vectors with ACO gene

番茄的遗传转化操作参照 Ouyang 等 (2003) 的方法。提取卡那霉素抗性植株及阴性对照的总 DNA, 进行 PCR 检测。PCR 引物为 *NPT* -F: 5'-AGACAAATCGGCTGCTCTGAT-3' 和 *NPT* -R: 5'-TCAATTCGAACCCC AGAGTC-3'。对 PCR 阳性植株进一步用不同的酶与探针组合进行 Southern 杂交检测 (Sambrook et al, 1989)。其中 *NPT* 探针扩增与 PCR 检测引物一致, 35S 的引物为, P35s-F: 5'-AGGCTTACGCA GCA GGTCTCAT-3'; P35s-R: 5'-GGAAGGGTCTTGCGAAGGATAG-3'。

转基因番茄植株的乙烯生成速率检测: 于初花期选择单拷贝转化植株 5 株混合取样, 取植株中部功能叶片 10~15 g, 剪成 1 cm × 1 cm 大小的碎片, 置于医用葡萄糖瓶中, 橡皮塞封口, 每瓶为 1 个重复, 设置 3 个重复。每隔 0.5 h 或 1 h 测定乙烯浓度, 每个重复测 3 次, 重新封口, 连续测定 6 h (叶志彪和李汉霞, 1996)。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因番茄植株的获得及其分子鉴定

为研究 ACO 基因的表达调控, 用构建的 3 个载体进行遗传转化。

农杆菌浸染的子叶外植体, 经选择培养基筛选后, 大多数子叶颜色变暗, 叶片萎蔫并最终在继代培养中死去; 只有少数子叶的基部能逐渐长出少量致密的愈伤组织并慢慢转为绿色, 大约 3~4 周后便能分化形成小芽点, 转入玉米素 (ZT) 浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的选择性芽分化培养上, 小芽点逐渐分化出幼叶, 形成小芽。将带有正常顶芽的愈伤组织转入到  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZT 培养基上, 当芽长到 3 cm 时切下, 转入生根培养基生根。再生植株在室内炼苗一周后, 进行大田栽培管理。

提取 3 个载体转化所获得的 60 株卡那霉素抗性植株基因组 DNA, 以未转化植株 (ZS5) 为阴性

对照, 质粒为阳性对照, 利用 *NPT* 引物进行 PCR 扩增。1.0 % 琼脂糖凝胶检测扩增产物, 发现质粒及其中的 48 株转基因植株都能扩增出预期大小 740 bp 的电泳条带, 而在未转化对照中则未出现该特异带, 初步推断这些植株中含有外源基因片段。

以不同的酶与探针组合对 48 株 PCR 阳性植株进行了 Southern 杂交分析。

图 2 为 *Kpn* / *NPT* 组合对 pLBE 转基因番茄植株的 Southern 杂交结果。未转基因对照 ZS5 没有杂交信号。全部 21 株转基因样品中, 10 株有杂交信号, 杂交的阳性率为 47.6%, 进一步表明外源片段已整合到这些植株的基因组中。不同的转基因单株中外源基因整合的拷贝数有明显差异, 有单拷贝和多拷贝, 单拷贝植株分别编号为 L2、L14、L16、L21。

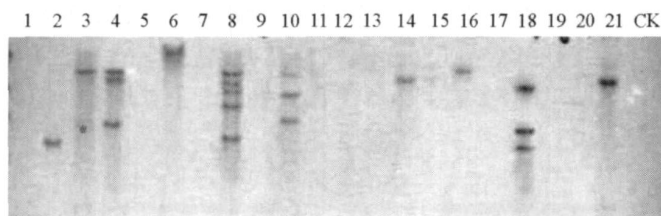


图 2 pLBE 转基因植株的 Southern 杂交分析 (*Kpn* / *NPT*)

1 ~ 21: 转基因植株; CK: 中蔬 5 号。

Fig. 2 Southern blot analysis of pLBE transgenic plants (*Kpn* / *NPT*)

1 - 21: Transgenic plants; CK: Zhongshu 5.

图 3 为 *Sac* 酶切 pABE 转基因番茄植株 DNA 样品 35S 探针杂交的结果, 对照没有杂交信号。调查的 19 株转基因材料中有 11 株出现了杂交信号。杂交阳性率为 57.8%。检测的转基因植株中, 多为 1~2 个拷贝, 多拷贝 (3 个以上) 的只出现了 1 株。其中的单拷贝编号为 E2、E4、E9、E11; 2 个拷贝的编号为 E5、E16、E17。

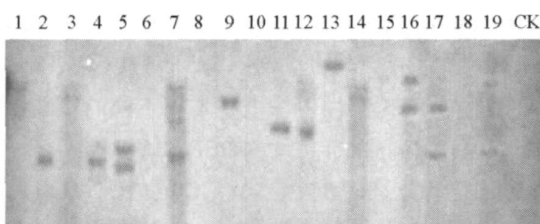


图 3 pABE 转基因植株的 Southern 杂交分析 (*Sac* / 35S)

1 ~ 19: 转基因植株; CK: 中蔬 5 号。

Fig. 3 Southern analysis of pABE transgenic plants (*Sac* / 35S)

1 - 19: Transgenic plants; CK: Zhongshu 5.

图 4 为 *Kpn* I/ *Intron* 组合对 pD311 转化植株的杂交结果。在检测的 8 株 PCR 阳性植株中有 6 株有杂交带, 阳性率为 75%。其中编号 D1、D3、D5 单株为单拷贝插入。

## 2.2 转基因植株叶片乙烯生成速率分析

取转基因单株 L2、L14 (pLBE); E4、E5 (pABE); D5 (pD311) 的叶片, 测定乙烯生成速率的变化 (图 5)。

从叶片切割受伤诱导乙烯生成速率来看, 未转基因对照植株叶片有典型的乙烯跃变曲线, 所测定的转基因植株中, 除 D5 外, 4 个单株的乙烯生成速率的变化曲线与对照一致。D5 单株在受伤后 3 h 内, 乙烯生成速率最少, 没有明显的曲线变化, 表明该单株叶片没有诱导乙烯形成, 推测是由于 *ACO* 基因的发卡结构导入基因组所引起。L14 单株乙烯生成速率大于对照, 推测由于导入的正义 *ACO*

基因在番茄植株中过量表达所致。而 L2 单株在乙烯释放高峰时的量甚至比反义载体转化植株更低, 推测由于同源抑制现象的存在导致内源基因表达量降低所致。这种同一载体转基因植株中外源基因作用的差异是否由于插入位点的差异所致, 值得进一步研究。E4、E5 单株乙烯生成速率都有一定程度的降低, 说明外源基因起到了一定作用, 但这种抑制或是促进作用并不明显。

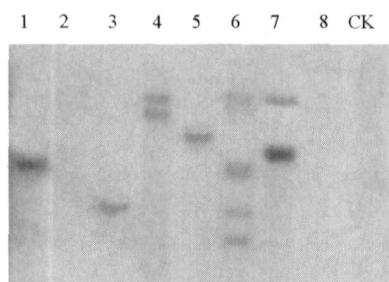


图 4 pD311 转基因植株的 Southern 杂交分析 (Kpn / Intron)

1 ~ 8: 转基因植株; CK: 中蔬 5 号。

Fig 4 Southern analysis of pD311 transgenic plants (Kpn / Intron)

1 - 8: Transgenic plants; CK: Zhongshu 5.

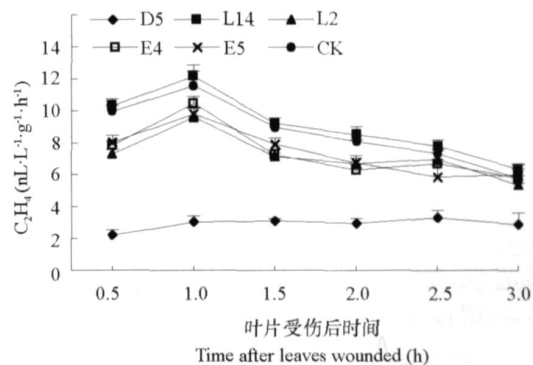


图 5 转基因植株叶片受伤后乙烯生成速率分析

Fig 5 Analysis of ethylene production rate in wounded-leaves of transgenic tomato

由于转基因植株中外源基因多以杂合体的形式存在, 对外源基因在转基因植株中的作用需要纯合株系进一步分析, 本试验的结果只能进行初步比较。

### 3 讨论

内源基因的表达调控有多种方式。反义基因技术是应用较多也较清楚的一种方式, 但该技术存在区段效应、剂量效应。Delauney 用完整的 CAT 基因或用 5'端 172 bp 区段的反义载体转化烟草时, 完整的反义基因转化植株有 9 株被部分抑制 (40%), 6 株为完全抑制; 用 5'端区段的反义载体转化的 18 株有 10 株 CAT 表达受阻减弱, 但没有一株被完全抑制 (Peach & Velten, 1991)。Saundler 发现在全长的 1565 bp 的 Nos 基因中, 第 261 ~ 900 bp 区段比其它区段对 Nos 的表达抑制更为有效。Hamilton 用分离出来的 TOM13 cDNA 构建了反义基因载体, 在所获得的转基因植株中, 乙烯释放受到抑制, 转基因自交后代分别带有 0、1 和 2 个反义基因, 含有两个反义基因的后代乙烯释放受抑的程度大于含有 1 个反义基因的植株 (Hamilton et al, 1990)。本研究构建了 E11 全长 cDNA 的正义、反义、RNAi 表达载体, 进行转基因研究。反义基因转化植株的乙烯释放量都有下降, 但这种作用与对照相比并没有显著差异, 不能引起乙烯生成曲线的变化。说明在利用反义技术抑制内源基因表达时, 确实要考虑多方面的因素。

本研究中反义基因对内源基因抑制作用的低效率是由于剂量效应、位点效应, 还是区段效应, 有待于进一步研究。

依据同源依赖性原理, 导入正义基因同样能引起内源基因的表达抑制 (Gallie, 1998)。Han 和 Grierson (2002) 报道, 反义 ACO 基因导入番茄后比正义 ACO 基因更能抑制内源 ACO 基因的表达。但从本研究的结果来看, 正义基因导入番茄基因组中既能抑制内源基因的表达, 也能促进其表达, 抑制效果比反义基因的好。但与对照相比, 无论抑制还是促进, 其差异都不显著。

RNAi 具有很高的特异性, 能够非常特异地只降解与之序列相应的内源基因的 mRNA。RNAi 抑制基因表达具有很高的效率, 表型可以达到缺失突变体表型的程度。而且相对少量的双链 RNA 分子就

能完全抑制相应基因的表达。关于利用 RNA i 技术抑制内源表达, 曾在花椰菜上取得完全抑制内源表达的转化植株 (陈银华 等, 2005)。本研究获得的 RNA i 转化株, 其乙烯生成也受到明显抑制。对比 3 种不同的载体而言, RNA i 转化株的抑制效率明显高于其他两种。

## References

- Chen Yin-hua, Zhang Jun-hong, Ouyang Bo, Li Han-xia, Ye Zhi-biao. 2005. Cloning of ACC oxidase gene and inhibition of endogenous gene expression with RNA i in cauliflower. *Acta Genetica Sinica*, 32 (7): 764 - 769. (in Chinese)
- 陈银华, 张俊红, 欧阳波, 李汉霞, 叶志彪. 2005. 花椰菜 ACC 氧化酶基因的克隆及 RNA i 对内源基因表达的抑制作用. *遗传学报*, 32 (7): 764 - 769.
- Cushman K E. 1998. The role of ethylene in the development of constant-light injury of potato and tomato. *Journal of American Society Horticulture Science*, 123 (2): 239 - 245.
- Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Melnick C C. 1998. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391 (6669): 806 - 811.
- Fraser A G, Kamath R S, Zipperlen P, Mammi M C, Sohmann M, Ahringer J. 2000. Functional genomic analysis of *Caenorhabditis elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408 (6810): 325 - 330.
- Gallie D R. 1998. Controlling gene expression in transgenics. *Current Opinion in Plant Biology*, 1 (2): 166 - 172.
- Guis M, Botondi R, Ben A M. 1997. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *Journal of American Society Horticulture Science*, 122 (6): 748 - 751.
- Hamilton A J, Lycett G W, Grierson D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plant. *Nature*, 346: 284 - 287.
- Han Y, Grierson D. 2002. The influence of inverted repeats on the production of small antisense RNAs involved in gene silencing. *Molecular Genetic Genomics*, 267: 629 - 635.
- Lasserre E, Bouquin T, Hernandez J A. 1996. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Gene and Genetic*, 251: 81 - 90.
- Ma Q H, Song Y R. 1997. Expression of tomato antisense ACC synthase gene in transgenic tomato and its role in shoot formation. *Acta Botanica Sinica*, 39 (11): 1047 - 1052.
- Ouyang B, Li H X, Ye Z B. 2003. Increased resistance to *Fusarium wilt* in transgenic tomato expressing bivalent hydrolytic enzymes. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 29: 179 - 184.
- Peach C, Velten J. 1991. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Molecular Biology*, 17: 49 - 60.
- Pua E C, Lee J E E. 1995. Enhanced de novo shoot morphogenesis *in vitro* by expression of anti-sense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene in transgenic mustard plants. *Planta*, 196 (1): 69 - 76.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 201 - 210.
- Savin K W, Baudinette S C, Graham M W. 1995. Antisense ACC oxidase RNA delay camellia petal senescence. *HortScience*, 30 (5): 970 - 972.
- Smith N A, Singh S P, Wang M B, Peter A S, Allan G G, Peter M W. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407: 319 - 320.
- Ye Zhi-biao, Li Han-xia. 1996. The physiology inhibition of two antisense genes on the transgenic tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 22 (2): 157 - 160. (in Chinese)
- 叶志彪, 李汉霞. 1996. 两个反义基因在番茄工程植株中的生理抑制作用. *植物生理学报*, 22 (2): 157 - 160.