

康乃馨 ACC 氧化酶反义基因遗传转化康乃馨的研究

张树珍¹ 汤火龙¹ 杨本鹏¹ 刘飞虎²(¹ 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101; ² 云南大学生命科学学院, 昆明 650091)

摘 要: 在建立康乃馨从愈伤组织到完整植株的高频再生体系的基础上, 用花特异表达启动子驱动的康乃馨 ACC 氧化酶反义基因通过农杆菌介导法对康乃馨进行遗传转化, 获得了 3 株转基因植株, 经多重 PCR 及 PCR-Southern 杂交检测, 证实康乃馨 ACC 氧化酶的反义基因已整合进康乃馨的基因组中。

关键词: 康乃馨; ACC 氧化酶; 花特异表达启动子; 反义基因; 遗传转化

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0699-04

康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* L.) 是典型的呼吸跃变型花卉, 控制其乙烯生物合成, 是延缓衰老、延长保鲜期的主要途径。利用反义 RNA 技术把康乃馨 ACC 合成酶或 ACC 氧化酶基因反向导入康乃馨优良品种中, 可在一定程度上抑制其内源 ACC 合成酶或 ACC 氧化酶基因的表达, 抑制乙烯的生物合成。Savin 等把反义 ACO 和 ACS 基因转入康乃馨中, 得到的转基因植株没有明显的乙烯和呼吸峰, 并且可以延迟花瓣衰老^[1,2]; Kiss 等把反向的 ACC 合成酶基因通过 EHA105 和 LBA4404 转入到康乃馨中, 经 NPTII 的 Southern 杂交以及 RT-PCR 检测, 证实外源基因已转入康乃馨中^[3]。

在自然衰老过程中, 康乃馨 ACC 氧化酶基因是在花器官中被诱导表达^[4]。PchsA 是光依赖性的并在花器官中特异表达的启动子^[5,6]。我们首先采用 RT-PCR 技术分离、克隆了康乃馨 ACC 氧化酶的 cDNA^[7], 又通过 PCR 技术获得花特异表达基因 CHSA 的启动子 PchsA^[8], 并以 PchsA 为启动子构建了康乃馨 ACC 氧化酶基因的反义植物表达载体, 通过农杆菌介导法将其导入康乃馨优良的栽培品种中, 以期获得能延长插瓶寿命的康乃馨新品种。

1 材料与方法

1.1 材料

以康乃馨马斯特 (Mastet)、多明戈 (Domingo) 和达拉斯 (Dallas) 品种的无菌苗叶片为试材, 农杆菌 EHA105 为浸染菌株, 含有质粒 pCBO (图 1)。生化试剂均购自 Sigma 公司。

RB—[NOS—pro]—[NPT II]—[NOS—tem]—[chsA—pro]—[Antisense ACO]—[NOS—tem]—LB

图 1 pCBO 质粒图谱

Fig. 1 Diagram of plasmid pCBO

1.2 方法

1.2.1 康乃馨高频再生体系的建立 分别从 3 个品种的无菌苗上取生长健壮的幼嫩叶片, 将其切成约 0.2 cm 的薄片接种于诱导培养基 (MS + 2,4-D 0.1 ~ 1.0 mg/L + 蔗糖 30 g/L, pH 5.8), 于 1500 lx, 14 h/d, (25 ± 1)℃ 条件下培养, 以诱导愈伤组织。再把生长良好的愈伤组织转移到分化培养基 (MS + BA 或者 KT, Zit, AD 1 ~ 2 mg/L + 蔗糖 30 g/L, pH 5.8), 于 25℃, 1500 lx, 14 h/d 条件下培养, 以诱导小植株产生。待小植株长至约 2 cm 高时转至生根培养基 (MS + NAA 或者 IAA, IBA 1 mg/L + 蔗糖 20 g/L, pH 5.8), 于 2000 lx, 14 h/d 的光照条件下培养以诱导生根。

收稿日期: 2003-04-17; 修回日期: 2003-06-11

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2002C0003M); 云南省自然科学基金项目 (2002C0002M)

1.2.2 农杆菌菌液的准备 从新鲜的农杆菌保存平板上挑取单菌落接种到 5 mL YEP (含 Str 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Rif 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 液体培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养至对数后期 (约 24 h)。取 2 mL 于 150 mL 三角瓶中扩大培养到 40 mL 含相同抗生素的 YEP 液体培养基中, 于相同条件下培养至 OD₆₀₀所需值 (1.3752), 转移到离心管中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$, 4000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清, 吸干残液, 用等体积 MR 液体培养基 (1/5 MS + 2,4-D 0.5 mg/L + AS 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ + 果糖 10 mmol/L + 葡萄糖 10 mmol/L + 蔗糖 25 g/L, pH 5.3) 重悬细菌, 于 25 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养 2 h, 诱导细菌 *Vir* 基因表达。作为感染转化材料的菌液原液, 稀释至农杆菌 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个/mL (OD₆₀₀1 = 3×10^9 Cells/mL)。

1.2.3 叶盘法转化 将无菌的康乃馨幼叶切成小块 (0.2 cm) 转入处理好的农杆菌菌液中, 侵染 30 min 后用无菌吸水纸吸干, 再接种于 MR 固体培养基上于 19 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 2~3 d, 其后将外植体用无菌水冲洗 3 次, 并用无菌滤纸吸干, 又将外植体接种于含 G418 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Car 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的诱导愈伤组织培养基 (MS + 2,4-D 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L, pH 5.8) 中, 于 1500 lx, 14 h/d 光照条件下培养, 其间每周在相同培养基中継代 1 次。当愈伤组织长至 0.2~0.5 cm 时, 将其转接到含 Car 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, G418 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的分化培养基 (MS + BA 2 mg/L + 蔗糖 30 g/L, pH 5.8) 中诱导小苗的再生。当在抗性培养基上长成的小植株约 2 cm 高时, 移入含 Car 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, G418 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生根培养基 (MS + NAA 1 mg/L + 蔗糖 20 g/L, pH 5.8) 上, 于 2000 lx、14 h/d 光照条件下诱导生根, 进一步筛选转化子 (转化过程中使用的抗生素的浓度根据抗性预试验结果而定)。

1.2.4 转化植株的分子检测 取转化及未转化植株嫩叶各 4 片 (约 0.1 g), 采用 SDS 法分别提取总 DNA 作为模板, 首先以 *NPT II* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增。引物 1: 5'-CCCCTCGGTATC-CAATTAGAG-3'; 引物 2: 5'-CGGGGGGTGGGCGAAGAACTCCAG-3'。正对照的模板为质粒 pCBO DNA, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析并照相。将上述 PCR 产物的电泳凝胶进行 Southern 转膜后以 *NPT II* 基因作探针进行杂交^[9]。以经 *NPT II* 基因 PCR-Southern 杂交检测呈阳性反应的转化植株的总 DNA 为模板, 分别用花特异表达启动子 (*PchsA*) 的引物 P1 (5'-GGAAGCTTTTCCTGTTCAAAGCTGATG-3')、*NPT II* 基因的引物 P1 和 ACC 氧化酶基因的引物 P1 (5'-GCTCTAGATTTTGTATTATGTTTATGT-3') 为特异引物, 进行双重 PCR 扩增, 正对照的模板为质粒 pCBO DNA, 负对照的模板为正常植株的 DNA。

2 结果与分析

2.1 康乃馨的高频再生体系

以无菌苗的幼叶为外植体, 其在各种诱导培养基上培养一周后叶块均开始膨大, 10 d 开始生长愈伤组织, 25~30 d 整个叶片切口都长满了愈伤组织。这说明使用的培养基均能诱导康乃馨幼叶产生愈伤组织, 其中以 MS + 2,4-D 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L, pH 5.8 培养基最好, 在其上长出的愈伤组织呈致密颗粒状, 愈伤组织的诱导频率为 100% (见插页 2 图版, 1)。愈伤组织在各种分化培养基上培养 20 d 后便开始发育形成丛状的小植株, 以在 MS + BA 2 mg/L + 蔗糖 30 g/L, pH 5.8 培养基上长出的小植株最多, 愈伤组织分化芽的频率也高达 100% (指每块愈伤组织均能分化出苗, 但每块愈伤组织不止分化一个植株, 见插页 2 图版, 2)。小植株在生根培养基上培养 2 周后开始生根, 20 d 后便形成了完整的根系, 随之植株也进一步长大, 生根率可达 100%。使用的几种生根培养基均能诱导生根, 其中以 MS + NAA 1 mg/L + 蔗糖 20 g/L, pH 5.8 培养基生根最快。3 个品种再生频率无明显差异。

2.2 农杆菌介导法转化康乃馨的结果

用含植物表达载体 pCBO 的农杆菌 EHA 105, 以农杆菌 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 个/mL 的菌液和康乃馨叶片侵染 20~30 min 后, 在 MR 培养基上共培养 2~3 d, 之后将叶片接种于含 G418 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Car 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的诱导培养基上培养, 约 90% 逐渐褐化死亡, 约 10% 能形成愈伤组织。这些愈伤组织经分化培养, 只有约 15% 能发育形成小植株。小植株继续在抗性培养基上长至 2 cm 后转入含 G418 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生根培养基上培养约 3~4 周后有 40% 的幼苗能生根, 幼苗也随之长大, 再继续培养 2~3 周后幼苗

根系发育良好, 具有主根和各级侧根, 而那些不长根的幼苗便逐渐黄化死亡 (见插图 2 图版, 3)。这说明 $40 \mu\text{g/mL}$ 的 G418 对转化体的初步筛选是有效的。根系发育良好的小植株移入土壤中栽培成活率达 100%。本试验获得 5 株生长良好的转化再生植株, 转化再生频率达到 0.6%。

2.3 转基因植株的分子鉴定

2.3.1 *NPT* II 基因的 PCR 扩增 由于导入的外源基因 (ACC 氧化酶的反义基因) 与该植物的内源基因 (ACC 氧化酶基因) 同源, 因此不能直接用 PCR 方法检测外源基因的整合情况, 而 *NPT* II 基因是与 ACC 氧化酶的反义基因一同导入的, 通过 PCR 方法检测 *NPT* II 基因在转化植株中的整合情况可以间接证明 ACC 氧化酶的反义基因在其中的整合情况。故本试验以转化植株的总 DNA 为模板, 用 *NPT* II 的特异性引物进行 PCR 扩增检测。从图 2 可知, 对照植株无任何扩增条带, 而有 3 株转化植株扩增出约 1.1 kb 的 DNA 条带, 这与 *NPT* II 基因大小相符, 表明 *NPT* II 基因已转入康乃馨染色体中。

2.3.2 转基因植株 *NPT* II 基因的 PCR-Southern 检测 为了进一步证明这 3 株转基因植株的可靠性, 本试验又以 *NPT* II 基因为探针, 对上述 PCR 结果做 PCR-Southern 杂交, 结果如图 3 所示, 3 株植株均呈阳性反应, 进一步证明 *NPT* II 基因已整合进这 3 株康乃馨的基因组中。

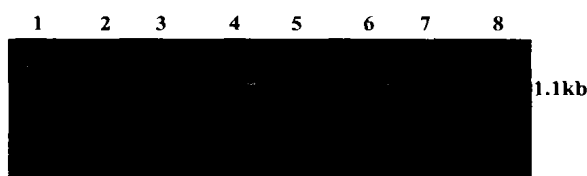


图 2 转基因植株 *NPT* II 的 PCR 检测结果

1. PCR markers; 2. 质粒 DNA; 3. 非转化植株; 4~8. 转化植株。

Fig. 2 PCR analysis of *NPT* II for transgenic plants

1. Markers; 2. Plasmid DNA; 3. Nontransgenic plant; 4~8. Transformants.

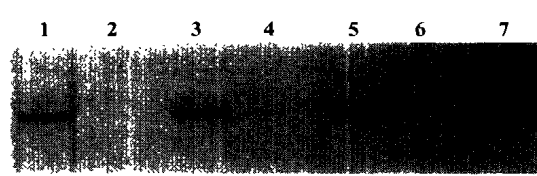


图 3 转基因植株 *NPT* II 的 PCR-Southern 检测结果

1. 质粒 DNA; 2. 非转化植株; 3~7. 转化植株。

Fig. 3 PCR-Southern analysis of *NPT* II for transgenic plants

1. Plasmid DNA; 3. Nontransgenic plant; 3~7. Transformants.

2.3.3 转基因植株的双重 PCR 检测 为了进一步证明上述结果的可靠性, 又以上述分子检测证明的 3 株转基因康乃馨总 DNA 为模板, 分别采用 *NPT* II 基因的 5' 端引物、花特异表达启动子的 5' 端引物和反义 ACC 氧化酶基因的 3' 端引物进行双重 PCR 检测, 结果为: 以花特异表达启动子的 P1 和 ACC 氧化酶基因的 P1 进行的双重 PCR, 扩增得到一条 1.7 kb 左右的片段, 而对照没有得到相应的片段 (图 4)。花特异表达启动子 *PchsA* 为 514 bp, 而 ACC 氧化酶基因为 1156 bp, 这说明花特异表达启动子和反义 ACC 氧化酶基因以二相联的方式转入到康乃馨的染色体 DNA 中。

以 *NPT* II 基因的 P1 和 ACC 氧化酶基因的 P1 进行双重 PCR, 也扩增得到了一条大小为 2.9 kb 左右的片段, 对照没有该片段 (图 5)。其中 *NPT* II 基因约 1.1 kb, *NPT* II 基因的终止子 NOS-tem 约

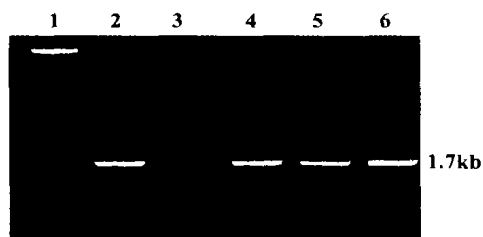


图 4 转基因植株的 *PchsA* + 反向 ACO 的 PCR 检测结果

1. λ DNA Hind III + PCR markers; 2. 质粒 DNA;

3. 非转化植株; 4~6. 转化植株。

Fig. 4 PCR analysis of *PchsA* + antisense ACO for transgenic plants

1. λ DNA Hind III + PCR markers; 2. Plasmid DNA; 3. Nontransgenic plant; 4~6. Transformants.

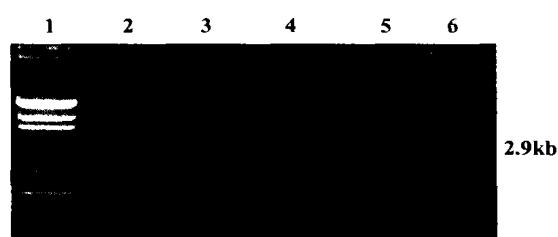


图 5 转基因植株 *NPT* II + 反向 ACO 的 PCR 检测结果

1. λ DNA Hind III + PCR markers; 2. 质粒 DNA;

3. 非转化植株; 4~6. 转化植株。

Fig. 5 PCR analysis of *NPT* II + antisense ACO for transgenic plants

1. λ DNA Hind III + PCR markers; 2. Plasmid DNA; 3. Nontransgenic plant; 4~6. Transformants.

0.2 kb, 而 PchsA + 反向 ACO 约为 1.6 kb, 其大小刚好是它们之和。这进一步说明 *NPT II* 基因与花特异表达启动子和反义 ACC 氧化酶基因已以三相联的方式转入到康乃馨的染色体 DNA 中。

以上分子检测的结果证明这 3 株转化植株为康乃馨 ACC 氧化酶反义基因的转基因植株, 这 3 株均为马斯特品种转基因植株。目前转基因植株移栽成活且生长良好。

3 讨论

康乃馨在组织培养过程中很容易玻璃化, 茎、叶失绿, 呈半透明状态, 外观形态异常, 分化能力低, 难以继代增殖, 也很难发根。为了能有效地进行遗传转化, 我们通过调整不同的培养基配方及培养条件建立了康乃馨从幼叶→愈伤组织→完整植株的高频再生系统, 有效地克服了玻璃化的形成。

农杆菌介导的遗传转化受很多因素影响, 如农杆菌菌株、质粒的毒性、诱导物的种类及浓度、培养基的 pH 值、外植体的生理状态、侵染及共培养的时间、温度等均影响转化的效果。本试验采用康乃馨无菌苗的幼叶为转化受体材料, EHA105 为转化的农杆菌菌株, *NPT II* 基因为筛选标记基因, 花特异表达启动子驱动的康乃馨 ACC 氧化酶的反义基因为目的基因对康乃馨进行了遗传转化, 经 G418 抗性筛选, 获得了 5 株抗性植株。经分子鉴定从中筛选出 3 株康乃馨 ACC 氧化酶反义基因的转基因植株。转化效率仍然不高, 还须再进行大量的转化以获得更多的转基因植株。至于转基因植株中外源基因的表达、遗传稳定性分析和进一步的保鲜期的测定还有待于进一步的试验。

参考文献:

- 1 Savin K W, Baudinette S C, Graham M W, et al. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence. *HortScience*, 1995, 30 (5): 970 ~ 972
- 2 Bovy A G, Altvorst A C van, Angenent G C, et al. Genetic modification of the vase-life of carnation. *Acta Horticulturae*, 1995, 405: 179 ~ 189
- 3 Kiss E, Veres A, Galli Z, et al. Production of transgenic carnation with antisense ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) gene. *International Journal Horticultural Science*, 2000, 6 (4): 103 ~ 107
- 4 Kende H. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant MoBiol.*, 1993 (44): 283 ~ 307
- 5 Ingrid M van der Meer, Cornelis E Spelt, Joseph N M Mol, et al. Promoter analysis of the chalcone synthase (*chs A*) gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15: 95 ~ 109
- 6 Schulze Lefert P, Dangl J L, Becker Andre M, et al. Inducible in vivo DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene. *EMBO J*, 1989, 8: 651 ~ 656
- 7 张树珍, 杨本鹏, 刘飞虎. 康乃馨 ACC 氧化酶基因的克隆及其序列的分析. *热带作物学报*, 2002, 23 (1): 67 ~ 71
- 8 张树珍, 杨本鹏, 刘飞虎. 花特异表达启动子 PchsA 的克隆及其序列分析. *农业生物技术学报*, 2002, 2: 116 ~ 119
- 9 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理. 北京: 科学出版社, 1998. 418 页

Genetic Transformation of Carnation with Its ACC Oxidase Antisense Gene

Zhang Shuzhen¹, Tang Huolong¹, Yang Benpeng¹, and Liu Feihu²

(¹ National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;

² College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The high frequency regeneration system of carnation from leaf to callus to plantlets was established. Then genetic transformation of the carnation with the ACO antisense gene, which controlled by flower-specific expression promoter (PchsA) was performed via agrobacterium mediated method and obtained 3 of transgenic plants via the pathway of regeneration plantlets from callus at last. The results of the PCR and PCR-Southern hybridization analysis showed that the carnation ACC oxidase antisense gene was integrated into carnation genomes. It will be a good foundation for improvement the longevity of carnation flowers.

Key words: Carnation; ACC oxidase; Antisense gene; Genetic transformation