

虾青素合成关键酶基因 *bkt* 在‘Brookfield Gala’苹果中的遗传转化及表达

贾东杰¹, 樊连梅¹, 沈俊岭¹, 秦松², 李富超², 刘成连¹, 原永兵^{1,*}

(¹ 青岛农业大学园艺学院, 青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室, 山东青岛 266109; ² 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071)

摘要: 虾青素是一种氧化型酮式红色类胡萝卜素, 具有更强的抗光氧化能力。将 β -胡萝卜素酮化酶(虾青素生物合成的关键酶)基因 *bkt* 构建入表达载体 pCambia1301 中, 获得植物表达载体 p1301-*bkt*, 转化根癌农杆菌 EHA105, 获得工程菌, 以黄肉苹果‘Brookfield Gala’无菌试管苗叶片为受体, 进行遗传转化。筛选压确定结果表明: ‘Brookfield Gala’对潮霉素(Hyg)很敏感, 叶片再生最佳 Hyg 选择压为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 试管苗增殖为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 头孢霉素(Cef)浓度 $\leq 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对叶片再生芽数的影响不明显。GUS 染色、PCR 和 RT-PCR 检测结果表明, 有 8 株转基因植株整合 *bkt* 基因并获得了表达, 其表型有红色产生; 转基因植株类胡萝卜素的 HPLC 测定显示, 虾青素和角黄素在叶片中的积累量达到 2.85 和 $1.79 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。本研究结果显示有望通过调控代谢途径, 在苹果中合成虾青素, 提高果实自身的抗光氧化能力, 防止日灼。

关键词: 苹果; 虾青素; *bkt* 基因; 遗传转化; 转化体系

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 01-0021-11

Genetic Transformation and Expressing of Astaxanthin Biosynthesis Genes *bkt* into ‘Brookfield Gala’ Apple Tree

JIA Dong-jie¹, FAN Lian-mei¹, SHEN Jun-ling¹, QIN Song², LI Fu-chao², LIU Cheng-lian¹, and YUAN Yong-bing^{1,*}

(¹ College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ² Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: Astaxanthin is a kind of red and ketonic carotenoids which is reported to have stronger antioxidant activity against photooxidation. The present study focused on transferring β -carotene ketolase gene *bkt* which is the key enzyme gene of astaxanthin biosynthesis into ‘Brookfield Gala’, by constructing plant expression vector pCambia1301-*bkt* with binary gene through *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that ‘Brookfield Gala’ plants were sensitive to Hyg and the optimal Hyg concentration for selected-stress was $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for leaf regeneration and $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for proliferating shoot culture and $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for rooting. The effect of cefotaxime (Cef) on the average regeneration bud number from the leaves was not obvious when the Cef concentration was not exceeding $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Histochemistry GUS

收稿日期: 2012-07-12; **修回日期:** 2012-12-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471200); 国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903044)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yyb@qau.edu.cn)

assay, PCR amplification and the results of PCR-Southern blotting analysis confirmed that *bkt* gene has been integrated into the genome of 'Brookfield Gala' and RT-PCR revealed that the *bkt* gene was expressed in the eight transgenic plants with pink color in phenotype. The carotenoid of transgenic plants was analysed by HPLC and results showed that novel ketocarotenoids were synthesized with accumulation of astaxanthin in the leaf up to $2.85 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and canthaxanthin up to $1.79 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ leaf fresh weight respectively. The study is expected to change 'Brookfield Gala' apples with astaxanthin content to have stronger antioxidant ability against sunburn by regulating metabolic pathways.

Key words: apple; astaxanthin; *bkt* gene; genetic transformation; transformation system

苹果在生长发育期间常出现日灼现象。通常苹果日灼是由于果实高温和强光下发生的光氧化伤害所致 (Ferguson et al., 1998; Chen et al., 2008), 会给生产造成了很大损失。如果提高苹果各组织的抗光氧化能力, 则在一定程度上能防止日灼的发生。

虾青素 (astaxanthin) 是一种氧化型酮式红色类胡萝卜素, 能够淬灭由光氧化产生的多种活性氧, 防止活性氧对细胞的伤害 (Naguib, 2000; Aoi et al., 2008; Camera et al., 2009; Curek et al., 2010)。与其前体物质玉米黄素和 β -胡萝卜素相比, 虾青素具有更强的抗光氧化能力。据研究表明, 虾青素抗氧化活性是维生素 E 的 550 倍, 是 β -胡萝卜素、玉米黄素等类胡萝卜素的 10 倍, 被誉为“超级抗氧化剂” (Shimidzu et al., 1996)。虾青素主要存在于水生动物、藻类、真菌、细菌等生物中, 高等植物中由于缺乏 β -胡萝卜素酮化酶基因, 所以一般不能合成虾青素。 β -胡萝卜素酮化酶 (BKT) 能作用于玉米黄素和 β -胡萝卜素等类胡萝卜素, 形成虾青素等酮式类胡萝卜素, 如果能将 β -胡萝卜素酮化酶基因转入植物中, 则高等植物中类胡萝卜素的代谢途径中最终合成虾青素成为可能, 并因此提高植物抗光氧化能力。已有科研人员在这一领域进行了尝试, Mann 等 (2000) 将蓝藻酮酶基因 (*CrtO*) 转入烟草, 获得了在花药组织中积累虾青素的转基因烟草。Gerjets 和 Sandman (2006) 将 *CrtO* 转入携带转羟化酶基因的转基因马铃薯中, 获得了在块茎中合成虾青素的马铃薯。目前, 虾青素合成基因转化苹果的研究在国内外尚未见报道。

本研究中将 β -胡萝卜素酮化酶基因 *bkt* 构建到载体 pCAMBIA1301 上获得植物表达载体 pCAMBIA1301-*bkt*, 并转化根癌农杆菌 EHA105 获得工程菌株。以黄肉苹果 'Brookfield Gala' 的叶片为受体, 由工程菌介导进行遗传转化, 希望通过调控代谢途径, 在苹果中合成虾青素等抗氧化能力更强的酮式类胡萝卜素, 这不但可能提高植株各组织的抗光氧化能力, 在一定程度上防止日灼的发生, 还可提高果实的营养品质和商品价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验于 2009—2011 年在青岛农业大学青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室进行。 β -胡萝卜素酮化酶基因 (*bkt*) 从雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 中克隆并连接到克隆载体 pMD-18T 中, 大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10、质粒载体 pBI221、植物表达载体 pCAMBIA1301 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 均来自中国科学院海洋研究所。黄肉苹果品种 'Brookfield Gala' 当年生枝条取自山东莱西果树苗木繁育中心, 经单芽茎段培养, 建立试管苗无性繁育系。组培苗在继代培养基 M1 (表 1) 上培养, 28~35 d 继代 1 次, 继代 5~6 次后, 选择生长发育良好, 整齐一致的组培苗叶片为试材进行遗传转化。培养室的温度为 25 °C, 光照强度 2 000 lx, 光周期为

16 h 光照, 8 h 黑暗。所有酶、Marker 和试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。Southern 杂交 Dig DNA Labeling 和 Detection Kit I 试剂盒购于 Roche 公司; 尼龙膜 (正电, 0.45 μm) 为 Whatman 生产; β -胡萝卜素、虾青素、角黄素标准品购自 Sigma 公司; 其它常规试剂均为分析纯。LB、YEB 培养基按照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克和拉塞尔, 2002) 制做。苹果转化培养基配方见表 1。MS 为基本培养基, 附加蔗糖 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 固体培养基附加琼脂 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8。

表 1 植物培养基
Table 1 Plant culture medium

类型 Type	成分/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Component	类型 Type	成分/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Component
M1	MS + 6-BA 1.0 + IBA 0.1	M4	MS + TDZ 1.0 + NAA 0.4 + Cef 400.0 + Hyg 3.0
M2	MS + TDZ 1.0 + NAA 0.4	M5	MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.1 + Cef 300.0 + Hyg 4.0
M3	MS + TDZ 1.0 + NAA 0.4 + Cef 400.0	M6	1/2 MS + IBA 1.0 + Cef 200.0 + Hyg 2.0

1.2 PCR 扩增目的基因的引物

根据 *bkt* (963 bp) 的碱基序列设计一对引物, 并在上游引物和下游引物的 5'端分别引入 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点。B1 (forward primer): 5'-AAAGGATCCATGCACGTCGCATC-3', B2 (reverse primer): 5'-AACGAGCTCTCATGCCAAGGCAG-3'。PCR 扩增反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 10 min。

根据潮霉素磷酸转移酶基因 (*hpt*, 600 bp) 的碱基序列设计一对引物, H1 (forward primer): 5'-CTGCTCCATACAAGCCAACC-3', H2 (reverse primer): 5'-ACAGCGTCTCCGACCTGAT-3', 扩增体系为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 10 min。PCR 反应体积为 25 μL 。

1.3 植物表达载体 pCAMBIA1301-*bkt* 的构建及其转化根癌农杆菌 *EHA105*

通过引物组合 P1/P2 对质粒 pMD-18T-*bkt* 进行 PCR 扩增, 获得 *bkt* 基因片段, 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切后回收的 *bkt* 基因替换 pBI221 中的 GUS 基因形成含有 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子的 *bkt* 基因表达盒。然后分别用 *Hind*III 和 *Eco*R I 双酶切, 将 *bkt* 基因完整表达盒插入表达载体 pCAMBIA1301 中, 获得植物表达载体 pCAMBIA1301-*bkt*, 如图 1。

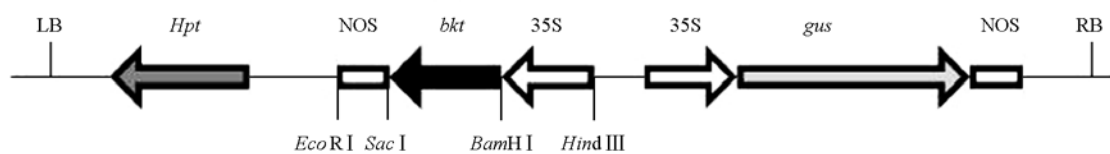


图 1 转化载体 p1301-*bkt* 的 T-DNA 结构图

Fig. 1 The map of the T-DNA region of p1301-*bkt*

提取 pCAMBIA1301-*bkt* 质粒, 采用冻融法 (罗雯和刘阳, 2006) 转化感受态农杆菌 *EHA105*, 并稍有改动 (冰浴 5 min 后转至液氮中速冻 5 min)。挑取单菌落, 采用菌液 PCR 和质粒双酶切鉴定法对 *bkt* 基因进行检测, 筛选阳性克隆, 获得含有植物表达载体的农杆菌工程菌株 *EHA105*/pCAMBIA1301-*bkt*。

1.4 最佳抗生素浓度的确定

取继代培养 28 d 的无菌试管苗顶部 2~4 片平展嫩叶作为外植体, 垂直叶片中脉划割 2~3 刀, 不伤及叶缘保持其完整, 接种在分化培养基 M2 (表 1) 上。叶片再生条件为: 黑暗培养 2 周后转到

光下培养,直至再生出不定芽。

Hyg (潮霉素)对叶片再生的影响试验: Hyg 设置浓度梯度为 0、1、2、3、4、5、6、8、10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每浓度设 3 个重复 (3 培养皿), 每重复 20 个叶片外植体, 45 ~ 50 d 观察统计叶片再生情况和褐变情况。叶片再生率 (%) = 出芽叶片数/接种叶片数 $\times 100$ 。

Hyg 对继代苗生长的影响试验: Hyg 设置浓度梯度为 0、2、3、4、5、8、10、15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种继代苗 (保持一致), 每浓度设 6 个重复 (6 瓶), 每瓶 4 株。30 ~ 35 d 统计继代苗芽增殖情况。继代成苗率 (%) = 有效苗数/接种数 $\times 100$ (有效苗标准: 长度 > 1.5 cm 的新梢)。

Hyg 对生根的影响试验: Hyg 设置浓度梯度为 0、1、2、3、5、8、10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接种继代苗 (大小、活力保持一致), 每浓度设 6 个重复 (6 瓶), 每瓶 4 株。30 ~ 35 d 统计芽生根情况。生根率 (%) = 生根新梢数/接种新梢数 $\times 100$ 。

Cef (头孢霉素)对叶片再生的影响试验: Cef 设置浓度梯度为 50、100、200、300、400、500、600、700、800 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每浓度设 3 个重复 (3 培养皿), 每重复 20 个叶片外植体。45 ~ 50 d 统计叶片再生芽数及再生率。

1.5 苹果的遗传转化与转基因植株再生

菌株的活化参照文献 (Liu et al., 2001) 进行。菌液稀释至 OD_{600} 为 0.5 时用于侵染, 取在增殖培养基 M1 (表 1) 中继代 28 d 的 'Brookfield Gala' 组培苗顶部 2 ~ 4 片幼嫩、平展的叶片, 横切两刀但不伤及边缘, 于农杆菌液中浸泡 10 ~ 15 min, 取出外植体置于无菌滤纸上吸去附着的菌液, 接种于共培养基培养基 M2 (表 1) 中, 近轴面接触培养基, (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下暗培养 3 d, 后将外植体转至 M3 (表 1) 培养基中脱菌培养 7 d, 再转至 M4 (表 1) 筛选培养基中选择培养直至抗性芽产生。待抗性芽长至 1 ~ 2 cm 时, 将其接入 M5 和 M6 (表 1) 培养基中扩繁和生根。叶片暗培养 2 周后移至光照培养, 每 2 ~ 3 周更换 1 次新鲜培养基。

1.6 转化植株的分子鉴定

黄肉苹果 'Brookfield Gala' 基因组 DNA 和总 RNA 的小量提取参考张智俊等 (2003) 的方法, 稍加修改, 从 1 份组培苗叶片材料中同时提取基因组 DNA 和总 RNA。

GUS 染色—组织化学分析: GUS 染色液含 X-Gulc 0.9 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯霉素 (Cm) 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 50%磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 20% (体积比) 甲醇, 0.1% (体积比) Triton-100。取抗性愈伤组织、抗性叶片及对照浸泡在配好的染色液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4 ~ 12 h, 然后转至 70%乙醇中脱色 2 ~ 3 次, 至阴性对照材料呈白色为止, 观察颜色变化 (Duan et al., 2007)。

PCR 检测: 提取植物基因组 DNA, 以质粒 pCAMBIA1301-*bkt* 为阳性对照, 扩增体系同 1.2。PCR 反应体积为 25 μL 。

PCR-Southern 检测: 质粒 pCAMBIA1301-*bkt* PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳回收获得 *bkt* 基因片段, 使用地高辛标记试剂盒用随机引物扩增法标记探针; 基因组 DNA 的 PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳后, 在碱性条件下转移至带正电荷的尼龙膜上 (王关林和方宏筠, 2009); 杂交温度 42 $^{\circ}\text{C}$, 杂交、洗膜和染色程序全部按 DNA Labeling and Detection Kit I 试剂盒的说明进行。

RT-PCR 检测: 取转基因株系和未转化植株的总 RNA, 用 DNA 酶消化 RNA 中少量的 DNA, 反转录体系按反转录试剂盒说明书进行。然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

1.7 转基因植株叶片中类胡萝卜素的 HPLC 分析

类胡萝卜素的提取参照 (Jia et al., 2011) 并稍做改动。取未转化和转化植株叶片 0.5 g, 加入丙酮: 正己烷 (1:1, 体积比) 混合提取液研磨浸提, 最后用丙酮将提取物定容至 2 mL。

色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm; 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈, 流动相 C 为甲醇; 洗脱梯度为: 5% A, 95% B (0 ~ 22 min); 10% B, 90% C (22.01 ~ 55 min); 100% C (55.01 ~ 60 min); 100% B (60.01 ~ 66 min)。流速为 1.0 mL · min⁻¹; 柱温为 35 ℃; 积分定量用检查波长为 470 nm; 进样量为 30 μL。

2 结果与分析

2.1 农杆菌质粒 p1301-*bkt* 的检测

植物表达载体 pCAMBIA1301-*bkt* 构建成功后, 对基因 *bkt* (963 bp) 进行 PCR 扩增鉴定和双酶切鉴定, 同时以质粒 pCAMBIA1301-*bkt* 作为阳性对照进行 PCR 扩增 (图 2, 图 3), 鉴定结果表明成功获得工程菌株 EHA105/p1301-*bkt*, 并确定该工程菌可用于进一步的转基因研究。

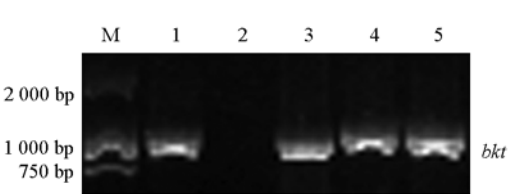


图 2 农杆菌质粒 DNA 中 *bkt* 的 PCR 检测

1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3 ~ 5: 农杆菌质粒 DNA pCAMBIA1301-*bkt*; M: Marker (DL2000)。

Fig. 2 PCR analysis of *bkt* in EHA105/pCAMBIA1301-*bkt* DNA

1: Positive constrast; 2: Negative constrast; 3 ~ 5: EHA105/pCAMBIA1301-*bkt*; M: Marker (DL2000) .

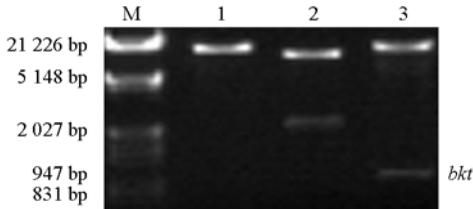


图 3 农杆菌质粒 EHA105/pCAMBIA1301-*bkt* DNA 的酶切检测

1: *Hind*III 单酶切; 2: *Hind*III 和 *Eco*R I 双酶切获 35S-*bkt*-nos 完整表达盒; 3: *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切获 *bkt* 目的片段;

M: Marker (λDNA/*Eco*R I + *Hind*III)。

Fig. 3 Restrictive digestion analysis of HA105/pCAMBIA1301-*bkt* DNA

1: Digestion by *Hind*III; 2: Digestion by *Hind*III and *Eco*R I ; 3: Digestion by *Bam*H I and *Sac* I ; M: Marker (λDNA/*Eco*R I + *Hind*III) .

2.2 最佳抗生素浓度的确定

2.2.1 Hyg 对叶片再生的影响

Hyg 对植物的生长和分化均有一定的毒害作用。由表 2 和图 4 可知, ‘Brookfield Gala’ 苹果组培苗叶片再生对 Hyg 很敏感, 附加 1 mg · L⁻¹ 对叶片再生率几乎没影响, 但再生芽数明显下降; 2 mg · L⁻¹ 时, 叶片几乎全部褐化, 再生芽数极少; 3 mg · L⁻¹ 时, 叶片全部褐化, 无再生芽形成, 因此在 Hyg 浓度上, 2 和 3 mg · L⁻¹ 作为选择压均可。

2.2.2 Hyg 对继代苗生长的影响

由表 3 和图 5 可知, Hyg 对继代苗生长和分化的影响也是比较明显的, 2 mg · L⁻¹ 时继代苗的生长就明显弱于对照, 3 mg · L⁻¹ 时茎叶大部分褐化, 继代苗生长极弱且逐级褐化, 4 mg · L⁻¹ 时茎叶全部褐化死亡, 因此可选择 Hyg 4 mg · L⁻¹ 作为继代苗生长的选择压。

表 2 Hyg 对 ‘Brookfield Gala’ 苹果叶片离体再生的影响

Table 2 Effect of Hyg on leaf regeneration of ‘Brookfield Gala’ apple

Hyg/ (mg · L ⁻¹)	叶片再生率 /%	再生芽数
	Percent of leaf regeneration	Regeneration buds
0	100 a	12.56 a
1	96.7 a	6.87 b
2	35 b	0.57 c
3 ~ 10	0 c	0 d

P < 0.05.

表 3 Hyg 对 ‘Brookfield Gala’ 苹果继代苗生长的影响

Table 3 Effect of Hyg on shoot propagation of ‘Brookfield Gala’ apple

Hyg/ (mg · L ⁻¹)	出芽数	成苗数
	Shoot number	Plantlet number
0	9.08 a	5.87 a
2	3.83 b	2.35 b
3	1.25 c	0 c
4 ~ 15	0 d	0 c

P < 0.05.

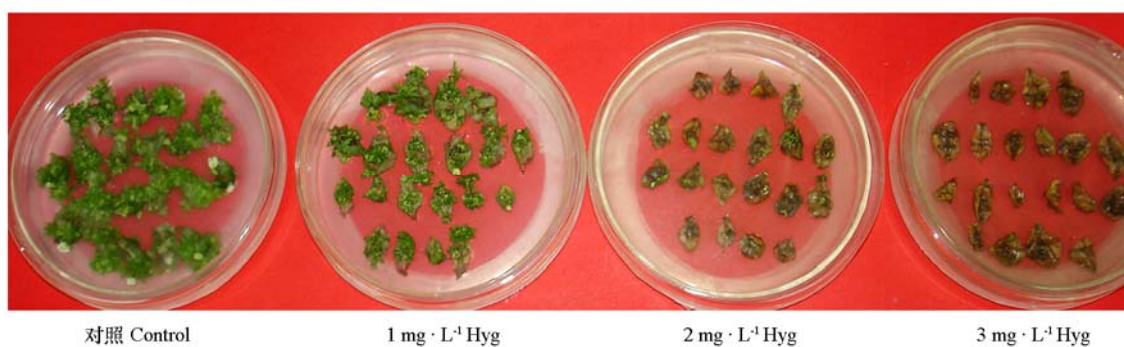


图 4 Hyg 对 ‘Brookfield Gala’ 苹果叶片再生的影响

Fig. 4 The effect of Hyg on leaf regeneration of ‘Brookfield Gala’ apple

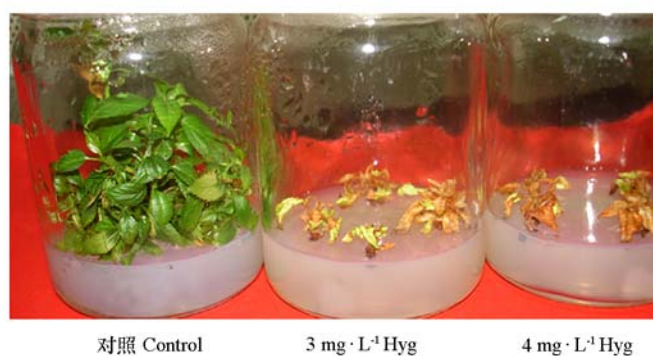


图 5 Hyg 对 ‘Brookfield Gala’ 苹果继代苗生长的影响

Fig. 5 Effect of Hyg on shoot propagation of ‘Brookfield Gala’ apple

2.2.3 Hyg 对生根的影响

试管苗生根对 Hyg 极其敏感，微量的 Hyg 都会导致试管苗生根困难或不能生根（图 6，表 4）。当 Hyg 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，试管苗的生根率和平均生根数显著低于对照；当达到 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，试管苗基部就不再有根状体和愈伤组织形成，并逐渐褐化死亡；当浓度达到 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，试管苗褐化死亡。

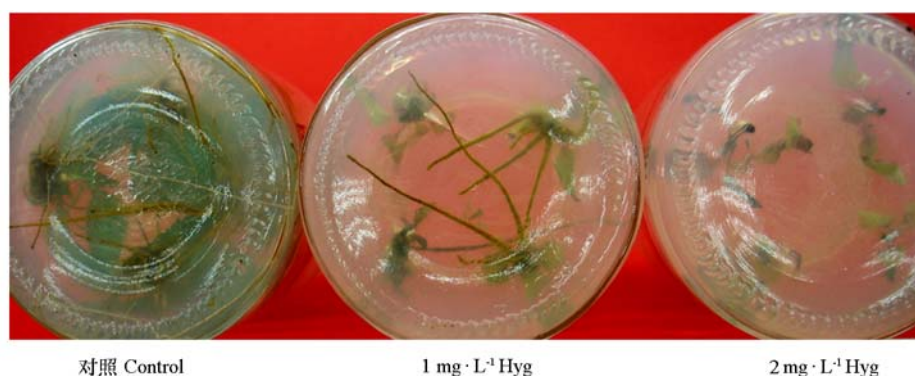


图 6 Hyg 对 ‘Brookfield Gala’ 苹果继代苗生根的影响

Fig. 6 Effect of Hyg on rooting of ‘Brookfield Gala’ apple

表 4 Hyg 对 ‘Brookfield Gala’ 苹果生根的影响
Table 4 Effect of Hyg on rooting of ‘Brookfield Gala’ apple

Hyg/ (mg · L ⁻¹)	生根率/% Rooting rate	平均生根数 The average rooting number	平均根长/cm The average root length
0	100.0 a	10.92 a	3.37 a
1	58.3 b	1.92 b	2.19 a
2 ~ 10	0 c	0 c	0 b

P < 0.05.

2.2.4 Cef 对叶片再生的影响

头孢霉素（Cef）作为一种抑菌素，被广泛应用于遗传转化中农杆菌的抑制上，同时，Cef 也是一种抗生素，对植物的生长也会有一定的抑制作用。由图 7 可以看出，Cef 浓度 $\leq 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对叶片平均再生芽数影响不大，与对照无显著差异；当 Cef 浓度为 500 和 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，叶片平均再生芽数明显低于对照；当 Cef 浓度为大于 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，叶片再生受到严重抑制。因此可选用 Cef 浓度 $\leq 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 来抑制农杆菌的生长。

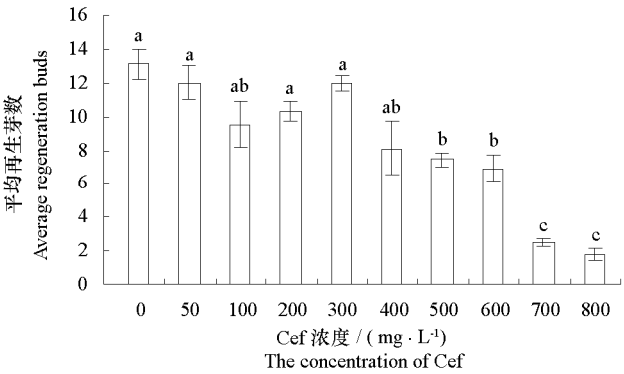


图 7 Cef 对 ‘Brookfield Gala’ 苹果叶片再生的影响
Fig. 7 Effect of Cef on leaf regeneration of ‘Brookfield Gala’ apple

2.3 工程菌 EHA105/p1301-*bkt* 介导的苹果遗传转化

2.3.1 转基因抗性植株的获得及其表型

采用农杆菌侵染叶盘法，通过 Hyg 连续筛选最终共获得 9 株抗性植株，转化过程如图 8 所示。图 8，e ~ h 显示在转基因愈伤组织和转基因植株的叶片中有红色产生，初步断定其能在 β -胡萝卜素酮化酶 BKT 作用下以玉米黄素为底物合成红色的虾青素或以 β -胡萝卜素为底物合成橙红色的角黄素，而在非转基因的愈伤组织（图 8，d）和叶片（图 8，a）中无红色出现。

2.3.2 GUS 染色

随机挑取抗性愈伤组织、转基因植株叶片进行 GUS 组织化学染色，由图 9 可知：大部分抗性愈伤组织（图 9，a ~ m）和转基因叶片（图 9，A ~ I）均可被 GUS 组织液染成蓝色，而非转基因愈伤组织和叶片（对照）经染色后未变蓝，表明 *GUS* 基因已经转化成功。说明在农杆菌 EHA105 介导下，pCAMBIA1301-*bkt* 质粒的 T-DNA 区可成功插入到苹果基因组中。

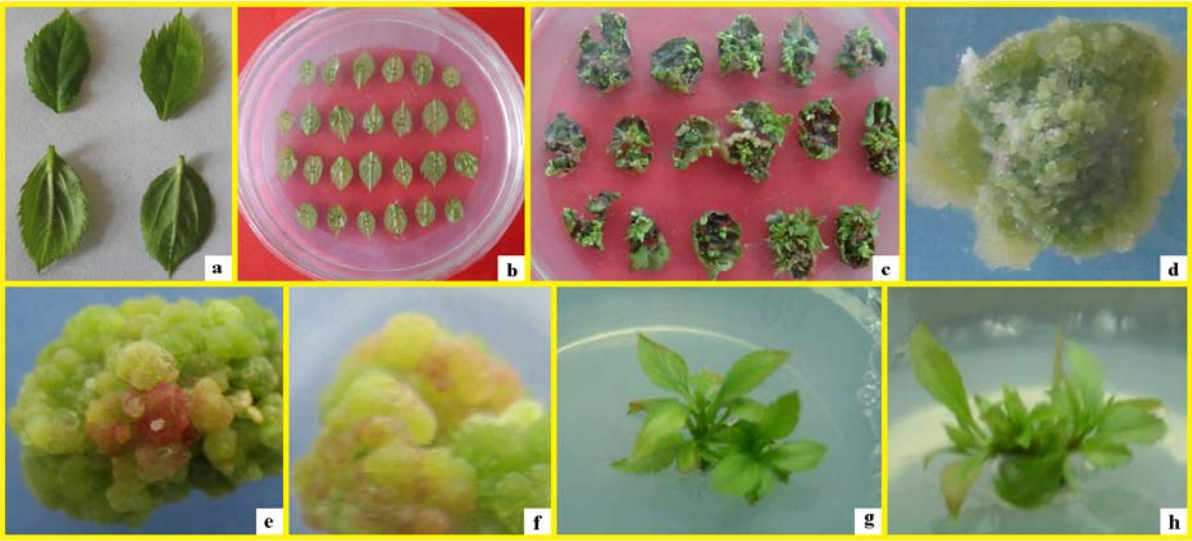


图 8 工程菌 EHA105/p1301-*bkt* 介导的苹果遗传转化及转基因植株再生

a: 继代 28 d 的组培苗顶部叶片; b: 共培养; c: 选择培养及抗性芽再生;
d: 非抗性愈伤; e、f: 抗性愈伤; g、h: 转化株系。

Fig. 8 Genetic transformation of apple by EHA105/p1301-*bkt* and regeneration of transgenic plants

a: Leaf from test-tube plantlet of 28 days; b: Co-culture; d: Non transformed calli; e, f: Transformed calli;
c: Transformed shoots were regenerated by selective culture;
g, h: Transformed plants.

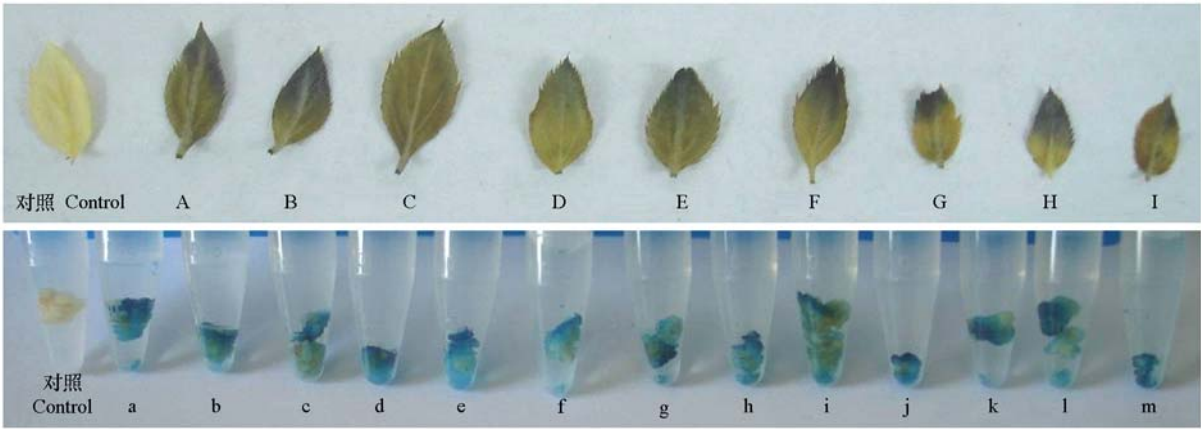


图 9 转基因植株叶片 (A~I) 和抗性愈伤组织 (a~m) 的 GUS 染色

Fig. 9 Histochemistry GUS assay of transgenic leaves (A - I) and callus (a - m)

2.3.3 PCR 检测

采用目的基因 *bkt* 和 *hpt* 的特异引物,对通过 Hyg 筛选出的 9 株抗性植株基因组 DNA 进行 PCR 扩增检测(图 10, A),质粒 pCAMBIA1301-*bkt* 为阳性对照(line 1),以水为模板作空白对照(line 2),未转化植物为阴性对照(line 3)。有 8 株为阳性,初步判断获得了 8 株转化植株,且 *bkt* (963 bp) 和 *hpt* (600 bp) 基因的转移是同步的,未发生基因分离。

2.3.4 PCR-Southern 检测

由于 PCR 扩增十分灵敏,有时会出现假阳性扩增,为进一步确定转基因植株整合的真实性,对

bkt 检测为阳性植株进行了 PCR-Southern 杂交 (图 10, B), 其结果与 PCR 扩增结果一致, 无假阳性扩增, PCR 阳性植株具有与阳性对照相同大小的杂交带, 阴性对照和未转化植株中无杂交带, 从而证明获得 8 株 (R1、R2、R3、R4、R6、R7、R8、R9) *bkt* 整合到苹果基因组中的转基因植株。

2.3.5 RT-PCR 检测

以转化植株和未转化植株的 cDNA 为模板, 对 *bkt* 和 *hpt* 基因在转化植株中的表达进行 RT-PCR 检测 (图 10, C), 8 株转基因植株中 *bkt* 基因和 *hpt* 基因均得到了表达。

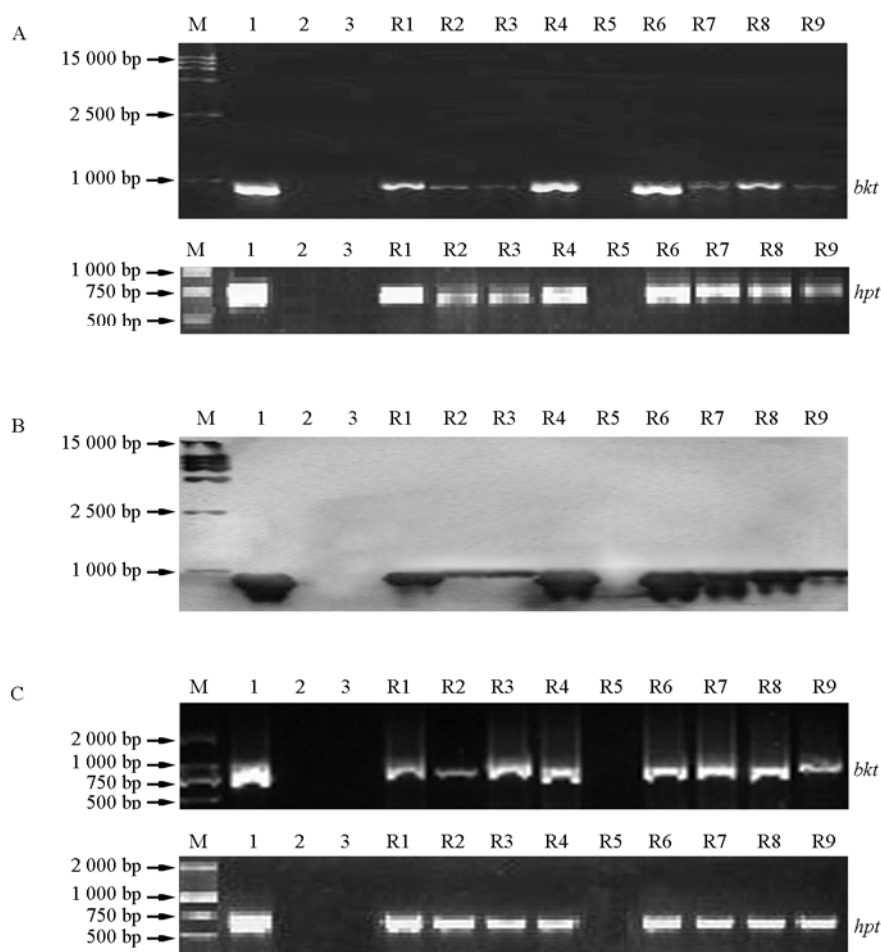


图 10 转基因株系中 *bkt* 基因的 PCR (A)、PCR-Southern (B) 和 RT-PCR (C) 检测

M: Marker; 1: 阳性对照; 2: 空白对照; 3: 未转化植株; R1 ~ R9: 转化植株。

Fig. 10 PCR (A), PCR-Southern (B) and RT-PCR (C) analysis of *bkt* in transgenic plants

M: Marker; 1: Positive control; 2: Blank control; 3: Non-transformed plant;

R1 - R9: Transgenic plants.

2.3.6 转基因植株叶片中类胡萝卜素的 HPLC 分析

对表型观察有红色物质生成的转基因植株叶片中的类胡萝卜素进行 HPLC 分析。由表 5 可以看出, 转化株系 (R1 和 R6) 叶片中均有一定量的虾青素和角黄素生成, 而未转化植株中未检测出虾青素和角黄素。说明在苹果植株中可以通过调控代谢途径使 β -胡萝卜素合成虾青素等抗光氧化能力更强的类胡萝卜素。

表 5 转化株系和未转化植株叶片类胡萝卜素的含量

Table 5 Contents of carotenoids in transgenic and wild-type apple leaves

(μg · g⁻¹ FW)

植株材料 Plant material	β-胡萝卜素 β-carotene	虾青素 Aataxanthin	角黄素 Canthaxanthin
未转化植株 KG Non-transformed plant KG	196.16 ± 6.95 a	—	—
转化株系 R1 Transformed Plant R1	145.40 ± 3.20 b	2.85 ± 0.30 a	0.76 ± 0.06 b
转化株系 R6 Transformed Plant R6	133.51 ± 3.12 c	1.87 ± 0.29 b	1.79 ± 0.20 a

 $P \leq 0.05$.

3 讨论

本试验中共获得 8 株转 *bkt* 基因植株和部分抗性愈伤组织, GUS 染色、PCR 和 RT-PCR 检测结果表明 *bkt* 基因已整合到苹果基因组中并在转基因植株中获得了表达。转基因植株中类胡萝卜素的 HPLC 检测结果表明在表型观察叶片和抗性愈伤组织变红的转基因植株中有虾青素和角黄素生成。转基因株系的抗光氧化能力在进一步检测中。

农杆菌介导的遗传转化系统中, 农杆菌菌株的选择及高效的遗传转化体系都是十分重要的。在农杆菌的选择上普遍认为 EHA105 是理想的果树基因工程转化载体系统(张志宏等, 1998; 王关林和方宏筠, 2002)。本试验中选择卸载的根癌农杆菌 EHA105, 为后面苹果的遗传转化做铺垫基础。在最佳抗生素浓度筛选上, ‘Brookfield Gala’ 叶片再生、组培苗增殖和生根对 Hyg 均很敏感, 最佳 Hyg 选择压分别为 3、4 和 2 mg · L⁻¹。也有研究认为‘嘎啦’组培苗和叶片的最佳 Hyg 选择压为 5 和 4 mg · L⁻¹(张丽丽等, 2006)。杨越等(2010)研究表明在寒富苹果遗传转化中 Hyg 适宜的筛选浓度为 4 mg · L⁻¹。王忆(2005)研究表明小金海棠再生 Hyg 选择压为 1 mg · L⁻¹。因此不同品种苹果对抗生素的敏感性是不同的。Cef 作为一种抑菌抗生素, 会对外植体的分化和再生产生影响(Lin et al., 1995)。本试验研究发现 Cef 浓度 ≤ 400 mg · L⁻¹ 时对叶片再生芽数影响较小。段艳欣(2006)研究认为 Cef (0 ~ 800 mg · L⁻¹) 对柑橘愈伤组织生长影响不大。James 等(1989)曾报道添加 250 mg · L⁻¹ Cef 可促进‘绿袖’苹果叶片再生。

表达 *GUS* 基因的转基因植株叶片和愈伤组织起源于外源 DNA 已整合的苹果细胞。本试验采用了 p35SGUSint 双元载体质粒(Hood et al., 1993), 其中的嵌合基因 *gusA* 含有植物内含子, 唯有表达 *gusA*int 报告基因的植物细胞能染成蓝色, 而农杆菌细胞则不能染成蓝色, 因为插入 *gusA* 基因的内含子的序列不能在根癌农杆菌中表达, 这克服了 GUS 染色假阳性率较高的弱点。

References

- Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Ishii T, Kawai Y, Akagiri S, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. 2008. Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative CPT I modification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366 (4): 892 – 897.
- Camera E, Mastrofrancesco A, Fabbri C, Daubrawa F, Picardo M, Sies H, Stahl W. 2009. Astaxanthin, canthaxanthin and β-carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. *Experimental Dermatology*, 18 (3): 222 – 231.
- Chen L S, Li P M, Cheng L L. 2008. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta*, 228 (5): 745 – 756.
- Curek G D, Cort A, Yucel G, Demir N, Ozturk S, Elpek G O, Savas B, Aslan M. 2010. Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. *Toxicology*, 267 (1 – 3): 147 – 153.
- Duan Yan-xin. 2006. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation and production of transgenic plants with *LFY* and *API* genes in citrus [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 段艳欣. 2006. 根癌农杆菌介导的柑橘转化体系优化与转 *LFY*、*API* 基因植株的培育 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Duan Y X, Guo W W, Meng H J, Tao N G, Li D D, Deng X X. 2007. High efficient transgenic plant regeneration from embryogenic calluses of *Citrus sinensis*. *Biologia Plantarum*, 51 (2): 212 – 216.

- Ferguson I B, Snelgar W, Lay-Yee M, Watkins C B, Bowen J H. 1998. Expression of heat shock protein genes in apple fruit in the field. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25 (2): 155 - 163.
- Gerjets T, Sandmann G. 2006. Ketocarotenoid formation in transgenic potato. *Journal of Experimental Botany*, 57 (14): 3639 - 3645.
- Hood E E, Gelvin S B, Melchers L S, Hoekema A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2 (4): 208 - 218.
- James D J, Passey A j, Barbara D J, Bevan M. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports*, 7 (8): 658 - 661.
- Jia D J, Fan L M, Liu G S, Shen J L, Liu C L, Yuan Y B. 2011. Effects of genotypes and bagging practice on content of β -carotene in apple fruits. *Journal of Agricultural Science*, 3 (4): 196 - 202.
- Lin J J, Nacyra A G, Jonathan K. 1995. Plant hormone effect of antibiotics on transformation efficient of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Science*, 109 (2): 171 - 177.
- Liu Q, Ingersoll J, Owens L, Salih S, Meng R, Hammerschlag F. 2001. Response of transgenic Royal Gala apple (*Malus \times domestica* Borkh) shoots carrying a modified cecropin *MB39* gene, to *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Reports*, 20 (4): 306 - 312, 514 - 522.
- Luo Wen, Liu Yang. 2006. Study on the optimization of transformation conditions for *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology*, 16 (1): 41 - 43. (in Chinese)
- 罗 雯, 刘 阳. 2006. 根癌农杆菌转化条件优化的研究. *生物技术*, 16 (1): 41 - 43.
- Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschberg J. 2000. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. *Nat-Biotechnol*, 18 (8): 888 - 892.
- Naguib Y M A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem*, 48 (4): 1150 - 1154.
- Sambrook J, Russell D W. 2002. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd. Huang Pei-tang, Wang Jia-xi, Zhu Hou-chu, translation. Beijing: Science Press: 26 - 118. (in Chinese)
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 W D. 2002. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础 译. 北京: 科学出版社: 26 - 118.
- Shimidzu N, Goto M, Miki W. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*, 62 (1): 134 - 137.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 2002. Present and prospective situation of study on fruit trees gene engineering. *China Fruits*, (3): 43 - 47. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2002. 果树基因工程研究进展及展望. *中国果树*, (3): 43 - 47.
- Wang Guan-lin, Fang Jun-yun. 2009. Plant gene engineering. Beijing: Science Press: 151 - 225. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 2009. 植物基因工程. 北京: 科学出版社: 151 - 225.
- Wang Yi. 2005. The establishment of apple regeneration system and functional characterization of *Mxlr1* gene [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 王 忆. 2005. 苹果再生体系建立与 *Mxlr1* 基因功能的初步研究 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Yang Yue, Zhang Zhi-hong, Liu Yue-xue, He Ping, Zhou Yu, Dai Hong-yan, Zhao Gui-ling. 2010. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for Hanfu apple. *Journal of Fruit Science*, 27 (2): 174 - 178. (in Chinese)
- 杨 越, 张志宏, 刘月学, 何 平, 周 宇, 代红艳, 赵桂玲. 2010. 根癌农杆菌介导寒富苹果转化体系的建立. *果树学报*, 27 (2): 174 - 178.
- Zhang Li-li, Shi Xiao-xin, Du Guo-qiang, Feng Sha-sha, Zhang Jun-ge. 2006. The selection of antibiotics and their concentration during gene transformation via leaf disc regeneration system in apple. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22 (10): 80 - 84. (in Chinese)
- 张丽丽, 师校欣, 杜国强, 冯莎莎, 张俊阁. 2006. 苹果叶盘法基因转化中抗生素种类和浓度的筛选. *中国农学通报*, 22 (10): 80 - 84.
- Zhang Zhi-hong, Fang Hong-jun, Jing Shi-xi, Wang Guan-lin, Wu Lu-ping, Zhu Zhen. 1998. Studies of development of efficient genetic transformation system and factors that affect transformation of the commercial apple cultivars. *Acta Genetica Sinica*, 25 (2): 160 - 165. (in Chinese)
- 张志宏, 方宏筠, 景士西, 王关林, 吴禄平, 朱 祯. 1998. 苹果主栽品种高效遗传转化系统的建立及其影响因子的研究. *遗传学报*, 25 (2): 160 - 165.
- Zhang Zhi-jun, Tan Xiao-feng, Chen Yong-zhong. 2003. A simple method for fast extracting total DNA and RNA simultaneously from *Camellia oleifera*. *Biotechnology*, 13 (3): 23 - 24. (in Chinese)
- 张智俊, 谭晓风, 陈永忠. 2003. 同时提取油茶中 DNA 和总 RNA 的简便方法. *生物技术*, 13 (3): 23 - 24.