

# 利用 Cre/lox 特异位点重组系统获得无选择标记 转 *AtMYB12* 基因的马铃薯

马连杰 刘海峰 王志强 代丽丽 丁新华 储昭辉

(山东农业大学植物保护学院/山东省农业微生物重点实验室,山东 泰安 271018)

**摘要:**类黄酮是植物产生的一类次级代谢产物的总称,长期食用含类黄酮的果实和蔬菜有益于人体健康,目前广泛种植的马铃薯品种中仅含有痕量的类黄酮。*AtMYB12* 是拟南芥中鉴定的调控类黄酮生物合成的特异性转录因子,并在烟草和番茄中得到了功能验证。为了增加马铃薯中类黄酮的含量,本研究构建 pX6-patatin::*AtMYB12* 无选择标记载体,利用农杆菌转化法将 *AtMYB12* 基因转入马铃薯品种 Desiree,并检测选择标记 *NPT II* 基因去除以及马铃薯块茎中类黄酮积累情况。结果显示,共得到 28 个阳性转基因株系。随机选择其中的 2 个株系进行雌二醇诱导,*NPT II* 去除效率达到 8.8%,转基因马铃薯块茎中芦丁的含量最高达到 3.091mg/g DW,山奈酚芸香苷含量达到 0.951mg/g DW,而对照马铃薯品种 Desiree 中芦丁和山奈酚芸香苷等类黄酮含量低于高效液相色谱检测限值。结果表明,*AtMYB12* 基因也能在马铃薯中调控类黄酮的合成。

**关键词:**马铃薯;类黄酮;*AtMYB12*;Cre/lox 重组系统;无选择标记

## DEVELOPMENT OF MARKER-FREE TRANSGENIC POTATO WITH *AtMYB12* GENE BY Cre/lox SITE-SPECIFIC RECOMBINATION SYSTEM

MA Lian-jie LIU Hai-feng WANG Zhi-qiang DAI Li-li DING Xin-hua CHU Zhao-hui

(Shandong Province Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Plant Protection,  
Shandong Agriculture University, Tai'an, Shandong 271018)

**Abstract:** As a class of secondary metabolites in plants, flavonoids is good for human health when the fruits and vegetables containing this kind of substances are often consumed. However only trace amounts of flavonoids can be detected on current widely planted potato varieties. *AtMYB12* was originally identified as a flavonoids-specific transcription factor in *Arabidopsis thaliana*, which has been confirmed to activate the flavonoids synthesis in tobacco and tomato. In order to increase the content of flavonoids in potato, we constructed the marker-free vector pX6-patatin::*AtMYB12*, then introduced it into the susceptible cultivar Desiree via *Agrobacterium*-mediated stem segment transformation. The results showed that 28 positive transgenic potato lines were acquired, and the deletion efficiency of *NPTII* in 2 marker-free lines was up to 8.8%. The content of rutin and kaempferol rutinoside was up to 3.091 and 0.951mg/g DW in transgenic potato tubers, respectively. It is suggested that *AtMYB12* can also regulate the flavonoids synthesis in potato.

**Key words:** potato; flavonoids; *AtMYB12*; Cre/lox recombination system; marker-free

收稿日期:2011-05-18 接受日期:2011-06-22

基金项目:“泰山学者”建设工程专项经费,国家高技术研究发展计划(863 计划,2010AA10Z103)

作者简介:马连杰(1982-),女,河北保定人,硕士研究生,研究方向为分子植物病理。E-mail: Malianjie@yahoo.cn

通讯作者:储昭辉(1977-),男,安徽岳西人,博士后,教授,研究方向为微生物与植物互作。E-mail:zchu@sdau.edu.cn

丁新华(1980-),男,湖北武汉人,博士,教授,研究方向为微生物与植物互作。E-mail:xhdng@sdau.edu.cn

类黄酮 (flavonoids), 又称黄酮类化合物, 是最重要的植物酚类代谢物, 广泛存在于植物中。类黄酮的分子结构通常由 2 个羟基化芳香环和 1 个氧杂环组成, 按照氧杂环的结构不同可分为黄酮、异黄酮、黄酮醇、异黄酮醇、黄烷酮、异黄烷酮, 花色素等类型<sup>[1]</sup>。植物类黄酮具有强抗氧化性, 被人体摄入后能够清除自由基引起的组织氧化损伤。另外, 植物类黄酮还具有抗癌、抗心血管病、抗炎症等作用<sup>[2-5]</sup>。拟南芥 R2R3-MYB 类转录因子 *AtMYB12* 为类黄酮生物合成的特异激活子, 在拟南芥中可以增加类黄酮含量的积累<sup>[6]</sup>。Luo 等<sup>[7]</sup>将该基因转化到番茄中, 发现芦丁和山奈酚芸香糖苷含量比对照增加了 65 倍, 总的黄酮醇积累量达到了 72mg/g DW。

转基因育种技术是常规育种的有益补充, 转基因植物中筛选标记的存在是转基因安全上争论的焦点之一, 标记基因的去留已经成为近年来转基因研究的热点。目前筛选标记的去留方法主要有转座子系统<sup>[8,9]</sup>、共转化系统<sup>[10]</sup>、同源重组以及 Cre/lox、FLP/frt 和 R/Rs 系统等位点特异性重组系统<sup>[11-13]</sup>。位点特异性重组系统因具有操作简便, 转化周期短等特点, 已逐渐成为筛选标记去除的首选工具。其中 Cre/lox 系统是应用最广泛、研究最深入的位点特异性重组系统。此系统于 1981 年在 P1 噬菌体中被发现<sup>[14]</sup>, 最早应用于动物转基因研究中。1990 年, Dale 等首次将 Cre/lox 系统应用于转基因烟草中, 实现了分子内特异性重组<sup>[15]</sup>。Zuo 等成功地开发了一个化学诱导型的 Cre/lox 系统, 此系统中, 编码重组酶的 *cre* 基因在雌二醇的诱导下表达, 将 2 个 loxp 位点之间的区间包括筛选标记的部分成功剪切掉, 从而达到去除 *NPT II* 基因的目的<sup>[11]</sup>。目前此系统已经成功应用于烟草、拟南芥、番茄等多种植物的无选择标记品种培育中。

马铃薯是重要的粮食作物之一, 属于茄科, 同源四倍体, 应用杂交育种的方法改良品种比较困难, 同时马铃薯块茎中多酚类化合物含量非常低<sup>[16,17]</sup>。为了进一步研究 *AtMYB12* 基因的功能以及雌二醇诱导的 Cre/Lox 系统在马铃薯中的应用情况, 本试验利用转基因技术将构建的无选择标记载体 pX6-patatin:: *AtMYB12* 转入到马铃薯中, 检测 *NPT II* 基因剔除效率, 同时利用高压液相色谱 (HPLC) 测定 T<sub>0</sub> 代马铃薯块茎中类黄酮的含量, 与番茄中 *AtMYB12* 表达所引起的类黄酮含量变化进行比较, 以确定该基因在调控马铃薯中类黄酮合成的作用, 为利用转录因子改良作物中类黄酮含量提供进一步的理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

农杆菌菌株 AGL1 和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。无选择标记系统二元表达载体 pX6-GFP, 由华中农业大学张余洋博士惠赠。转化受体植物马铃薯 Desiree 脱毒试管苗由山东农业科学院高新技术中心李广存博士惠赠。

马铃薯转化用培养基: M0: 1  $\times$  MS, 0.2mg/L NAA, 0.02mg/L GA<sub>3</sub>, 2.5mg/L zeatin riboside, 20g/L 蔗糖, 8g/L 琼脂粉, pH5.7 ~ 5.8; M1: M0 + 500mg/L cefotaxime, pH5.7 ~ 5.8; M2: 1  $\times$  MS, 0.02mg/L NAA, 0.02mg/L GA<sub>3</sub>, 2mg/L zeatin riboside, 500mg/L cefotaxime, 50mg/L kanamycin, 20g/L 蔗糖, 8g/L 琼脂粉, pH5.7 ~ 5.8; MR: 1  $\times$  MS, 500mg/L cefotaxime, 50mg/L kanamycin, 20g/L 蔗糖, 8g/L 琼脂粉, pH 5.7 ~ 5.8。

### 1.2 植物 DNA、RNA 的提取

马铃薯中薯 4 号叶片 DNA 提取采用 CTAB 法<sup>[18]</sup>, 取 0.5g 左右幼嫩的植物叶片, 以 300 $\mu$ l DNA 提取缓冲液 (50mmol/L Tris-HCL, 25mmol/L EDTA, 300mmol/L NaCl, 1% SDS) 研磨, 加入等体积氯仿混匀离心后采用乙醇沉淀, 最终溶解于 50 $\mu$ l TE 溶液用于后续 PCR 或 -20 $^{\circ}$ C 暂时保存。

植物组织 RNA 的提取采用 TRI reagent (Sigma, 美国) 法, 按照试剂盒说明书操作。起始材料为 100mg 拟南芥新鲜幼苗, 提取的 RNA 溶解在 50 $\mu$ l 无 RNase 去离子水中, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增和 RT-PCR 扩增

载体构建中涉及 Patatin 启动子、*AtMYB12* 基因的扩增采用高保真 PCR, 按照 Phusion 超保真 DNA 聚合酶 (FINNZYMES, 芬兰) 操作指导进行。50 $\mu$ l PCR 反应体系 (终浓度包含 1  $\times$  Phusion HF buffer, 200 $\mu$ mol/L dNTP, 0.5 $\mu$ mol/L Primer each, 0.02U/ $\mu$ l Phusion DNA Polymerase, 2ng/ $\mu$ l DNA) 在 ABI9700 型 PCR 仪上反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 1min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10s, 58 $^{\circ}$ C 退火 10s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min。载体构建过程中涉及的细菌阳性检测和转基因植株阳性检测均采用常规 PCR, 试剂采用 TaKaRa rTaq DNA Polymerase, 20 $\mu$ l PCR 反应体系 (终浓度包含 1  $\times$  PCR buffer, 50 $\mu$ mol/L dNTP, 0.2 $\mu$ mol/L Primer each, 0.05U/ $\mu$ l rTaq DNA Polymerase, 2ng/ $\mu$ l DNA) 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退

火 30s, 72°C 延伸 1min, 35 个循环; 72°C 终延伸 10min。试验中用到的引物序列及说明见表 1。

拟南芥 *AtMYB12* 基因的扩增采用两步法 RT-PCR, 第 1 链 cDNA 的合成采用 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 大连), 按说明

书操作。以上述第一链合成的 cDNA 作为第二步 PCR 扩增的模板, 利用引物 *AtMYB12F1* 和 *AtMYB12R1* 对第一链 cDNA 进行高保真 PCR 扩增, 反应体系和条件如上所述。

表 1 试验使用的引物

Table 1 Primers used in this study

| 引物<br>primer     | 基因<br>gene     | 序列<br>sequence                       | 携带的酶切位点<br>enzyme digestion site |
|------------------|----------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| <i>AtMYB12F2</i> | <i>AtMYB12</i> | 5'-ATGGAATTCACCTTTTGTGGTCAGTGAATA-3' | <i>Eco</i> RI                    |
| <i>AtMYB12R2</i> | <i>AtMYB12</i> | 5'-ATGCTCGAGAACGGATCAATCAATATCAT-3'  | <i>Xho</i> I                     |
| <i>AtMYB12F1</i> | <i>AtMYB12</i> | 5'-ACTTTTGTGGTCAGTGAATA-3'           | —                                |
| <i>AtMYB12R1</i> | <i>AtMYB12</i> | 5'-AACGGATCAATCAATATCAT-3'           | —                                |
| Patatin PRO F4   | <i>patatin</i> | 5'-ATGACTAGTGTTCAGTAATTGACCGGAGAC-3' | <i>Spe</i> I                     |
| Patatin PRO R4   | <i>patatin</i> | 5'-ATGGAATTCAATTTTGTGGTGCTTTGAG-3'   | <i>Eco</i> RI                    |
| NPT II F         | <i>NPT II</i>  | 5'-AGCCAACAACGCTATGCTCTGAT-3'        | —                                |
| NPT II R         | <i>NPT II</i>  | 5'-TGAATGAACTGCAGGACGAG-3'           | —                                |

#### 1.4 表达载体构建

采用 RT-PCR 技术利用引物 *AtMYB12F1*/*AtMYB12R1* 从拟南芥 Col-0 中扩增出 *AtMYB12* 基因, 将其克隆进 PCR 产物克隆载体并经测序验证与 Col-0 基因组序列对比无任何突变, 用于后续载体构建基因 *AtMYB12* 的供体。以此克隆为模板, *AtMYB12F2*/*AtMYB12R2* 引物组合 PCR 扩增后产物经 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切, 连接到 pBlueScript SK II (+)-*Xho*I-*Eco*RI-cut 载体上, 形成过渡载体 pBS-*AtMYB12*。以马铃薯中薯 4 号 DNA 为模板, 利用 *patatin*PROF4/*patatin*PROR4 组合扩增出马铃薯 *Patatin* 基因启动子序列并进行 *Spe* I 和 *Eco* RI 双酶切处理, 并接入 *Spe*

I 和 *Eco* RI 双酶切处理的过渡载体 pBS-*AtMYB12*, 生成新的过渡载体 pBS-*patatin*:*AtMYB12*, 完成全序列分析和验证。进一步采用双酶切和连接策略, 通过 *Xho* I 和 *Spe* I 双酶切将上述过渡载体中组装完成的 *Patatin*:*AtMYB12* 片段置换植物表达载体 pX6-*GFP* 中 *Xho* I ~ *Spe* I 区间的片段, 完成载体构建并命名为 pX6-*patatin*:*AtMYB12* (图 1-A), 载体经双酶切验证如图 1-B 所示。构建好的载体质粒通过电转化转入农杆菌菌株 AGL1, 用于马铃薯的遗传转化。

#### 1.5 马铃薯的遗传转化

马铃薯的遗传转化采用马铃薯茎段转基因体系, 参考 Steve Millam 的方法<sup>[19]</sup>。选择生长 21 ~ 28d 健壮

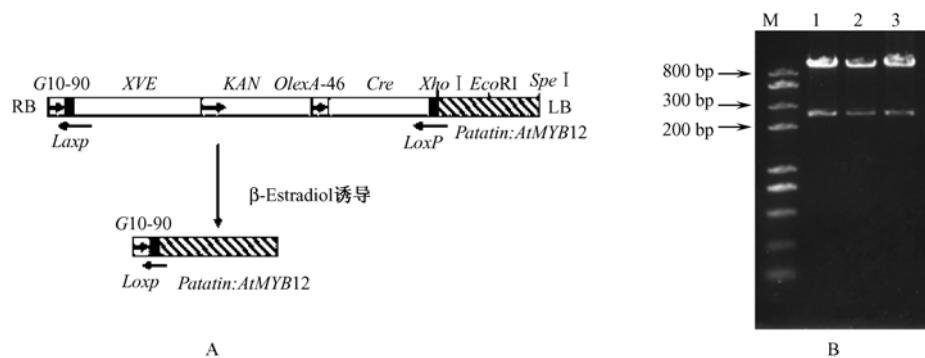


图 1 载体构建示意图和重组质粒酶切鉴定

Fig. 1 Schematic diagram of the vector construction and characterization of the recombination plasmid

A: 植物表达载体 pX6-*patatin*:*AtMYB12* T-DNA 部分示意图和  $\beta$ -Estradiol 诱导 DNA 重组后的产物; B: 重组质粒 pX6-*patatin*:

*AtMYB12* *Xho* I/*Spe* I 双酶切; M: Trans2K™ Plus II DNA 标准; 1 ~ 3: 经 *Xho* I/*Spe* I 酶切的重组质粒

A: schematic diagram of the T-DNA region of the vector pX6-*patatin*:*AtMYB12* and putative products of the  $\beta$ -estradiol-induced DNA recombination; B: identification of the recombination plasmid pX6-*patatin*:*AtMYB12* digested by *Xho* I/*Spe* I;

M: Trans2K™ Plus II DNA marker; 1 ~ 3: recombination plasmid digested by *Xho* I/*Spe* I

的马铃薯 Desiree 无菌苗, 剪取无腋芽茎段(长约 0.5cm); 在  $OD_{600}$  值为 0.8 的农杆菌悬浮液中浸没感染 20min 后, 放到干燥灭菌的滤纸上, 吸干表面的菌液, 转入共培养培养基 M0 中, 于 18℃ 暗处共培养 3d; 共培养茎段全部转到 M1 培养基后置于人工气候箱 21℃ ± 1℃、16h/d、光照强度 2000lx 条件下进行愈伤组织分化, 12d 后选择愈伤发育良好的茎段, 转入 M2 分化培养基进行选择培养, 以后每 14d 转接 1 次; 约转接到第 3 次时愈伤组织开始长出再生芽, 待再生苗长到约 2cm 高时, 转移到含卡那霉素和头孢霉素 (Cef) 的生根培养基 MR 上进行生根筛选; 根系健壮后移至温室灭菌土中生长。待转基因植株生长至 21 ~ 28d, 切取 0.5 ~ 1.0cm 的茎段直接放在 M1 (含 3μmol/L β-estradiol) 愈伤诱导培养基上培养, 12d 后转到 M2 (含 3μmol/L β-estradiol, 不加 kanamycin) 选择性培养基培养, 每 14d 更换 1 次培养基, 直到分化出芽, 待芽长到 2cm 长时, 切下转到生根培养基生根并进行温室培养。

### 1.6 类黄酮提取和 HPLC 法测定

将收获的马铃薯切成长、宽、高各约 1cm 的小块, 用冷冻干燥机 (EYELA FDU-1100, TOKOYO RIKAKIAI CO. LTD) 冷冻干燥后研成粉末。以每 mg 冻干粉末溶于 30μl 70% 甲醇的比例溶解后, 置于 20℃ 3h 进行类黄酮提取, 提取液经 1600g 离心后用 0.45μm 滤膜过滤上清液, 取 20μl 过滤液用于 HPLC 分析, 按照 Luo 等<sup>[7]</sup> 设置 HPLC 条件, 标准品为芦丁和山奈酚芸香苷 (分别购自 Sigma 和 Extrasynthese 公司)。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株阳性检测与标记基因的剔除

利用农杆菌介导转化马铃薯 Desiree。被感染的茎段在愈伤组织诱导培养基上生长 7d 左右长出白色

致密的愈伤组织, 12d 后转入选择性培养基上培养, 愈伤开始由白色渐变为绿色。部分愈伤组织生长 28 ~ 35d 后即形成芽点并分化出小芽。待小芽长到 2cm 左右时, 将其切下转到生根培养基上进行培养, 当根长好后, 取生长状态与非转基因植株无明显差异的再生植株的顶端茎段, 重新转到选择性生根培养基上筛选确认。共获得转 pX6-patatin::AtMYB12 基因的再生植株 ( $T_0$  代) 35 株。将 35 株植株叶片提取 DNA, 进行 PCR 检测。结果共有 28 株扩增出了长度大约 1178bp 的 AtMYB12 基因特异性片段, 证明目的基因已成功转入到马铃薯 Desiree 中 (图 2), 阳性率达到 70% (阳性植株/接种茎段为 28/41)。

在 PCR 检测阳性的植株中随机选择  $T_0$  代 2 个株系 (编号为 117 和 29) 进行 β-雌二醇诱导, 每株系分化出约 50 株苗进行单独 PCR, 检测抗生素筛选标记 NPT II 基因, 在总共 102 株的 2 次分化植株中, 未扩增出 NPT II 基因条带的 Marker-free 苗数量为 9 株。表明经 β-雌二醇诱导后, 转基因株系发生重组的效率达到了 8.8% 左右 (图 3)。结果说明雌二醇诱导型启动子的 cre/lox 重组系统在马铃薯中得到了很好的应用。

### 2.2 转基因马铃薯块茎的类黄酮含量检测

待马铃薯成熟收获后, 参照 Luo 等<sup>[7]</sup> 利用 HPLC 检测 AtMYB12 转基因番茄果实中类黄酮的方法, 对部分转基因和非转基因马铃薯 Desiree 块茎进行了检测。结果显示, 转 AtMYB12 基因的 Desiree 薯块中芦丁的含量从 0.051 ~ 3.091mg/g DW 不等 (表 2), 而对照中没有检测到芦丁 (图 4, 表 2)。保留时间为 31.095min 的物质 D 为山奈酚芸香苷, 含量达到 0.041 ~ 0.951mg/g DW。与转 AtMYB12 基因番茄不同的是, 转 AtMYB12 基因马铃薯块茎中有 2 种新物质 A 和 B 产生 (图 4), 其性质需要进一步的鉴定。该结果表明 AtMYB12 基因在马铃薯中也能特异性表达并参与马铃薯中类黄酮合成的调控。

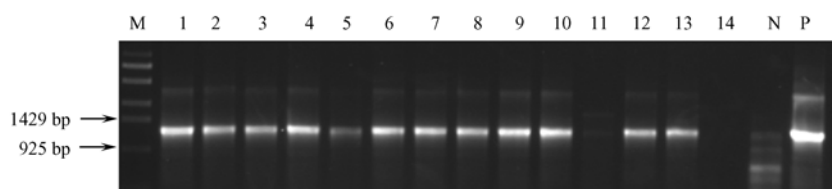


图 2 转基因植株中目的基因 AtMYB12 的 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of the AtMYB12 gene in transgenic plants

M: DNA marker (λ-EcoRT14 I digest); 1 ~ 14: 转 AtMYB12 基因植株; N: 阴性对照; P: 阳性对照 (质粒 pX6-patatin:: AtMYB12)

M: DNA marker (λ-EcoRT14 I digest); lane 1 ~ 14: transgenic potato plants with AtMYB12; N: negative control;

P: positive control (pX6-patatin: AtMYB12)

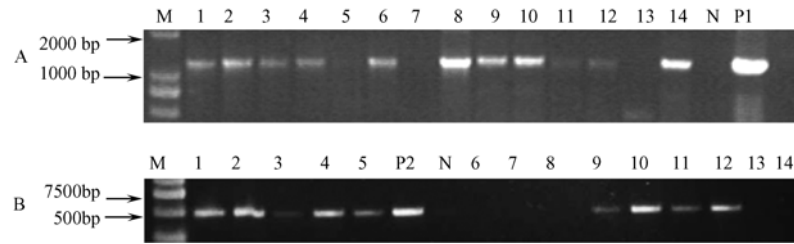


图3 雌二醇诱导后部分转基因再生植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of part transgenic plants induced by  $\beta$ -estradiol

A: *AtMYB12* 基因的 PCR 扩增; B: *NPTII* 基因的 PCR 扩增; M: DL 2000 DNA marker; 1 ~ 14: 部分雌二醇诱导后的马铃薯再生苗; N: 阴性对照 (Desiree); P1: 阳性对照 (pX6-patatin:: *AtMYB12* 质粒);

P2: 阳性对照 (转 pX6-patatin:: *AtMYB12* 基因马铃薯)

A: PCR amplification of *AtMYB12*; B: PCR amplification of *NPTII*; M: DL 2000 DNA marker; lane 1 ~ 14: transgenic potatoes with pX6-patatin:: *AtMYB12* induced by  $\beta$ -estradiol; N: negative control (Desiree); P1: positive control (plasmid of pX6-patatin:: *AtMYB12*); P2: positive control (transgenic potatoes with pX6-patatin:: *AtMYB12*)

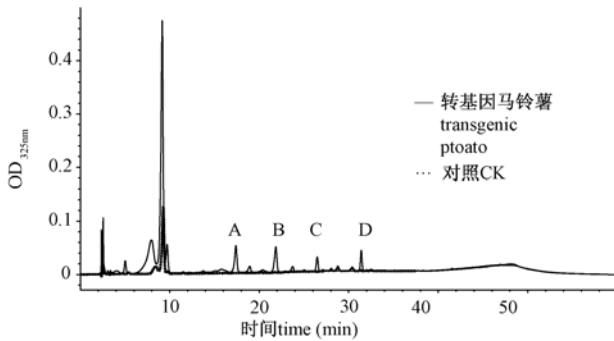


图4 转基因马铃薯块茎中类黄酮含量检测

Fig. 4 Flavonoids content analysis of transgenic potato tubers

A 和 B: 物质未鉴定; C: 芦丁; D: 山奈酚芸香苷

A and B: compounds are not identified;

C: rutin; D: kaempferol rutinoid

表2 转基因马铃薯中芦丁、山奈酚芸香苷的含量

Table 2 Content of rutin and kaempferol rutinoid in potato transgenic lines

| 样品编号<br>sample No. | PCR 检测<br>PCR detection |                | 芦丁<br>rutin<br>(mg/g DW) | 山奈酚芸香苷<br>kaempferol<br>rutinoid<br>(mg/g DW) |
|--------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|---|
|                    | <i>NPTII</i>            | <i>AtMYB12</i> |                          |   |
| 85                 | +                       | +              | 0.138                    | 0.092   |
| 111                | +                       | +              | 0.072                    | 0.078   |
| 63                 | +                       | +              | 0.051                    | 0.046   |
| 2                  | +                       | +              | 0.639                    | 0.281   |
| 23                 | +                       | +              | 0.253                    | 0.076   |
| 69                 | +                       | +              | 2.933                    | 0.937   |
| 137                | +                       | +              | 0.093                    | 0.041   |
| 29                 | +                       | +              | 3.091                    | 0.951   |
| 20                 | +                       | +              | 0.470                    | 0.244   |
| 127                | +                       | +              | 0.248                    | 0.064   |
| 117                | +                       | +              | 0.901                    | 0.281   |
| 230                | +                       | +              | 0.860                    | 0.110   |
| 132                | +                       | +              | 0.086                    | 0.099   |
| 6                  | -                       | -              | ND                       | ND  |
| Desiree            | -                       | -              | ND                       | ND  |

注: +: PCR 检测为阳性; -: PCR 检测为阴性; ND: 未检测到含量。

Note: +: positive by PCR; -: negative by PCR; ND: undetected.

本研究转 *AtMYB12* 基因的粉皮品种 Desiree 块茎 (包括皮和肉) 中芦丁 (槲皮素芸香苷) 含量和山奈酚芸香苷的含量最高分别达到了 3.091 和 0.937 mg/g DW, 而相同条件下对照 Desiree 块茎中未检测到这 2 种物质。这一研究结果与 *AtMYB12* 在拟南芥、烟草和番茄中表达导致黄酮醇大量积累基本一致。在 Luo 等的研究中<sup>[7]</sup> 提到这种变化可能是由于 *AtMYB12* 诱导黄酮醇合成途径多个酶的表达所致。说明通过利用 *AtMYB12* 基因可以调控马铃薯中类黄酮的合成。

虽然马铃薯和番茄同属于茄科, 但从本研究结果看, 两者类黄酮代谢的途径可能存在不同之处 (图 4)。

### 3 讨论

除了植物中普遍存在的花色苷外, 黄酮醇、黄酮醇、黄酮等其他类黄酮物质在马铃薯块茎、花、叶、种子中也均被发现, 但是含量极低。Lewis 等运用 HPLC 法对 26 种有色马铃薯栽培品种的块茎、花、叶中主要酚类化合物的含量进行了测定<sup>[20]</sup>。结果为花中类黄酮含量最高, 达到 1000 ~ 3000  $\mu$ g/g; 其次为叶, 为 500 ~ 200  $\mu$ g/g; 块茎中最低, 为 200 ~ 400  $\mu$ g/g, 且块茎肉中仅有 0 ~ 30  $\mu$ g/g。块茎中的类黄酮种类主要为黄酮醇、柚皮素、圣草酚、儿茶酸和表儿茶酸。最常见的槲皮素和山奈酚等黄酮醇在块茎中痕量存在<sup>[21]</sup>。

Luo 等<sup>[7]</sup>在番茄中的试验表明, *AtMYB12* 在果实特异性启动子 E8 的驱动下可以达到类黄酮累积至 72mg/g DW 的高积累水平。但本研究发现, 在马铃薯中, 芦丁和山奈酚的含量仅能达到 3 和 1mg/g DW 左右的水平, 显著低于番茄中的累积量。推测此差异的存在可能由两方面因素决定: 一方面, 马铃薯 Desiree 中类黄酮的背景非常低, 痕量存在; 另一方面, 马铃薯中类黄酮的代谢途径可能不同。本试验 HPLC 结果显示, 除了芦丁和山奈酚芸香苷的含量倍增外, 还有 2 种未鉴定的物质 A 和 B(图 4), 推测是类黄酮或其衍生物, 其峰面积甚至高于芦丁和山奈酚芸香苷, 然而这 2 种物质在转 *AtMYB12* 基因番茄中并不存在<sup>[7]</sup>, 其性质还需进一步鉴定。

在先前的研究中, Wilmer 等利用热诱导的 Cre/lox 重组系统, 在马铃薯上获得了约 4.7% 的 marker 基因去除效率<sup>[22]</sup>, 而本研究利用雌二醇诱导的 Cre/lox 重组系统使马铃薯中 marker 基因去除效率达到了 8.8%。但不同转基因系间拷贝数不同, DNA 插入位点不同等原因也会严重影响到不同转基因系间的去除效率, 要进一步提高 marker 基因去除效率还需对整个体系进行进一步的优化。

#### 4 结论

本研究证实外源 *AtMYB12* 基因能调控马铃薯中类黄酮生物合成途径, 导致马铃薯块茎中芦丁和山奈酚芸香苷的积累量大大增加, 分别达到最高 3.091 和 0.937mg/g DW, 这有利于进一步培育富含类黄酮的马铃薯品种。利用  $\beta$ -estradiol 化学诱导的 Cre/lox 系统成功获得了 marker-free 再生马铃薯苗, 标记基因的去除率达到 8.8%。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Rice-Evans C A, Miller N J. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids[J]. *Flavonoids in Health and Disease*, 1997;199-219
- [ 2 ] Koes R E, Quattrocchio F, Mol J N M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution[J]. *BioEssays*, 1994, 16(2): 123-132
- [ 3 ] Birt D F, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids [J]. *Pharmacology & therapeutics*, 2001, 90(2-3): 157-177
- [ 4 ] Hertog M G L, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study[J]. *Archives of Internal Medicine*, 1995, 155: 381-386
- [ 5 ] Geleijnse J M, Launer L J, Pols H A P, et al. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis[J]. *Archives of Internal Medicine*, 1999, 159: 2170-2174
- [ 6 ] Mehtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138: 1083-1096
- [ 7 ] Luo J, Butelli E, Hill L, et al. *AtMYB12* regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol[J]. *The Plant Journal*, 2008, 56(2): 316-326
- [ 8 ] Chang Y C, Li K T, Tai H K, Lin N S, Tu J. An inducible transposon system to terminate the function of a selectable marker in transgenic plants[J]. *Molecular Breeding*, 2008, 21(3): 359-368
- [ 9 ] Goldsbrough A P, Lastrella C N, Yoder J I. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato[J]. *Nature Biotechnology*, 1993, 11: 1286-1292
- [ 10 ] Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers[J]. *Plant Journal*, 1996, 10(1): 165-174
- [ 11 ] 单晓映, 李 蓓, 张举仁. 利用 FLP/rt 重组系统产生无选择标记的转基因烟草植株[J]. *生物工程学报*, 2006, 22(5): 744-750
- [ 12 ] Dale E C, Ow D W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1991, 88: 10558-10562
- [ 13 ] Rabbitts T H. Chromosomal translocations in human cancer[J]. *Nature*, 372: 143-149
- [ 14 ] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 sitespecific recombination I. Recombination between loxP sites [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1981, 150(4): 467-486
- [ 15 ] Zuo J R, Niu Q W, et al. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 157-161
- [ 16 ] Zhang Y Y, Li H X, Ouyang B, et al. Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects [J]. *Biotechnol Letters*, 2006, 28: 1247-1253
- [ 17 ] 杨先泉, 王 翠, 赵 勤, 刘勇强. <sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线辐照马铃薯适宜剂量与效应研究[J]. *核农学报*, 2010, 24(5): 917-921
- [ 18 ] Jones A S, Walker R T. Isolation and analysis of the deoxyribonucleic acid of *Mycoplasma mycoides* var. *capri*. [J]. *Nature*, 1963, 198: 588-589
- [ 19 ] Steve Millam. *Methods in Molecular Biology*, vol. 344: *Agrobacterium Protocols*, 2/e, volume 2 [M]. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2006: 25-35
- [ 20 ] Lewis C E, Walker J R L, Lancaster J E, Sutton K H. Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 77: 45-57
- [ 21 ] Wilmer C, Amelie G, Dennis S, et al. Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62: 71-82

(责任编辑 王媛媛)