

桃 ACO 基因反义转化桃幼胚子叶的研究

吴延军^{1,2}, 张上隆¹, 谢鸣², 陈俊伟², 蒋桂华², 秦永华¹, 秦巧平¹

(1. 浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310029; 2. 浙江省农业科学院园艺所, 杭州 310021)

摘要: 用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和基因枪两种方法, 以桃 (*Prunus persica* L. Batsch) 幼胚子叶为受体, 转化桃 ACC 氧化酶 (ACO) 反义基因片段, 经筛选培养获得了卡那霉素抗性芽。微芽嫁接培养抗性芽部分可成株。PCR、Southern 杂交和 GUS 基因表达等分子检测, 初步表明外源反义 ACO 基因已经整合到桃基因组中。

关键词: 根癌农杆菌; 基因枪; 转基因; 反义 ACO 基因

中图分类号: S662; Q785

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)01-0065-06

Genetic Transformation of Peach Immature Cotyledons with Its Antisense ACO Gene

WU Yan-Jun^{1,2}, ZHANG Shang-Long¹, XIE Ming², CHEN Jun-Wei²,
JIANG Gui-Hua², QIN Yong-Hua¹, QIN Qiao-Ping¹

(1. Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences Hangzhou 310021, China)

Abstract: Genetic transformation of peach immature cotyledons with its ACO antisense gene was studied by using particle bombardment method through *Agrobacterium tumefaciens*. Kan^r shoots and Kan^r plantlet were obtained. The plantlet with ACO antisense gene through *Agrobacterium tumefaciens* was obtained by micrografting technique and survived for nearly one month. The results of the PCR, PCR-southern, genomes southern hybridization analysis and GUS color reaction of some Kan^r materials showed in some degree that the peach ACO antisense gene was integrated into peach genomes.

Key words: peach; *Agrobacterium tumefaciens*; particle bombardment; genetic transformation; antisense ACO

桃是世界性重要果树, 我国是桃主产国, 产量位居世界各国之首。桃果质优, 在果品市场占据重要地位。但桃是乙烯跃变型果实, 采后软化进程迅速, 多数品种成熟季节又适逢高温高湿, 果实极不耐贮藏, 严重影响销售与外运, 这是长期制约桃生产的主要问题之一。

延长桃贮藏期常采用低温冷藏, 此法易造成桃果冷害, 结果并不理想。桃贮藏保鲜的现状表明延

长贮藏时间、提高贮藏品质, 延长货架期, 减少采后腐烂等目标难以靠常规措施实现。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)。抑制 ACO 活性可延缓乙烯生成, 从而延缓成熟衰老。植物转基因技术的广泛应用, 国际上番茄转 ACO 反义基因的成功为其他作物解决贮藏难问题提供了范例和良好前景^[1~4], 但至今未见有关桃转 ACO 反义基因的

收稿日期: 2004-12-14; 修回日期: 2005-01-31

基金项目: 宁波市委项目支持桃转基因研究 (2000 农业项目资助) 和浙江省农业科学院科研启动项目资助 [Supported by a grant of Ningpo Municipal Science and Technology Commission and supported by a grant of Zhejiang Academy of Agricultural Sciences]

作者简介: 吴延军 (1972—), 女, 陕西洛川人, 副研究员, 博士, 研究方向: 园艺植物生理与分子生物学研究。E-mail: wyjwjt@163.com

通讯作者: 张上隆 (1933—), 男, 福建莆田人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 果树生理与分子生物学研究。Tel: 0571-86971009; E-mail: shizhang@zju.edu.cn

研究报告。本研究用根癌农杆菌和基因枪两种方法,以桃幼胚子叶为受体,进行 ACO 反义基因转化桃研究,旨在通过改变遗传物质的角度提高桃贮藏性能提供一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

供试玉露桃幼果于盛花后 55 d 取自浙江省奉化水蜜桃研究所。选果型正常,大小均一,无伤无虫者常规消毒,除去果肉并剥开果核,取出幼胚后接入 MS 培养基,26℃ ± 1℃ 暗培养 20~30 d,子叶膨大,将此子叶挑出,作为幼胚子叶转化的实验材料。

1.1.2 质粒及菌株

质粒 PBI 0.8,由 PBI121 改造,含 CaMV 35S 启动子调控的 β -葡糖苷酸酶(GUS)报告基因和抗卡那霉素(Kan)筛选的新霉素磷酸转移酶(NPTII)基因及氨基环丙烷羧酸(ACC)氧化酶反义片段(由浙江大学生命科学学院金勇丰博士惠赠)。菌株为 GV3101。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌感染及感染材料的培养

碱裂解法提取 pBI 0.8 质粒 DNA,冻融法转入根癌农杆菌 GV3101。挑含质粒的 GV3101 单菌落,接种到含 Kan 85.8 $\mu\text{mol/L}$ 、利福平(Rif) 24.3 $\mu\text{mol/L}$ 的 YEP 4 mL 液体培养基中,180 r/min 28℃ 暗培养 36 h。取此菌液 1 mL 加入 50 mL 新鲜 YEP 及 200 $\mu\text{mol/L}$ 的乙酰丁香酮(AS)相同条件下培养 12 h 后取此液 40 mL 于 5 000 r/min 4℃ 离心 10 min,沉淀加入液体 MS 50 mL,180 r/min 28℃ 继续振荡 2 h,至对数生长期,备用。

幼胚子叶背面刻伤后分别按表 1 和表 2 两组设计进行感染,程序如下:预培养后浸入上述农杆菌悬浮液,取出并吸去多余菌液,暗中共培养。之后,外植体移入含头孢霉素(Cef) 1.195 mmol/L 的除菌培养基上生长 2 w,移入含 Cef 1.195 mmol/L 和 Kan 51.5 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基上筛选培养。部分抗性材料进行微芽嫁接。

表 1 ACO 基因反义转化桃幼胚子叶

Table 1 Anti-gene ACO transformed peach immature cotyledon

处理 Treatments	预培养时间 Preculture time (d)	感染时间 Infection time (min)	共培养时间 Coculture time (h)	激素 Growth regulator ($\mu\text{mol/L}$) [*]		
				BA	TDZ	NAA
1	0	10	36	66.6		2.68
2	1	20	72	55.5		2.68
3	2	30	24	45.3		2.68
4	3	5	60		22.7	0.26
5	4	15	12		18.1	0.26
6	5	25	48		13.6	0.26

* :基本培养基为 MS,pH 为 5.8。

* :Basal medium is MS, pH=5.8.

表 2 ACO 基因反义转化桃幼胚子叶^{*}

Table 2 Anti-gene ACO transformed peach immature cotyledon^{*}

处理 Treatments	外植体 Explants	预培养时间 Preculture time (d)	感染时间 Infection time (min)	共培养时间 Coculture time (h)
7	去胚芽单瓣子叶	2	20	48
8	Single cotyledon	2	20	60
9	without germ	3	20	48
10	完整子叶 Double cotyledon	2	20	48
11		3	20	48
12		3	30	48

* :预培养和共培养培养基为 MS + BA 45.3 $\mu\text{mol/L}$ + NAA 2.68 $\mu\text{mol/L}$ 。

* :Preculture and coculture medium are MS + BA 45.3 $\mu\text{mol/L}$ + NAA 2.68 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.2 基因枪法转化

幼胚带胚芽单瓣子叶光下或暗在中在 M8-M14、ML1 和 ML2 上培养 2 d 后,近茎面朝上密集排列在高渗培养基中基因枪可轰击范围内,4 h 后用包裹质粒 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DNA UNIQ 10 DNA 通用试剂盒提纯)的金弹轰击,每皿轰击一次。1 w 后,轰击材料移入诱导培养基培养 25 d,再转移到 51.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Kan 筛选培养基继代 2~3 次。

1.2.3 转基因材料的分子检测

1.2.3.1 PCR 检测 根据 *NPT II* 基因设计引物,上游引物 UP1, 5'-GTTCTTTTTGTCAAGACCGACC-3'; 下游引物 DP1, 5'-CAAGCTCTTCAGCAATATCACG-3' (上海生工生物工程技术有限公司合成),反应在 PTC-200 Peltier Thermal Cycler 上进行。25 μL PCR 反应体系包括:10 pmol/ μL 的 UP1 和 DP1 各 1 μL , 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.5 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 2 U *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa, Japan)。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 进行 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。此目的条带标记为 K1。

根据 ACO 在 pBI 0.8 上的位置设计上游引物 UP2, 5'-ACGCACAATCCCACTATCCTT-3'; 下游引物 DP2, 5'-TTTTCGCGGATCCAGACTGAA-3' (该设计引自浙江大学园艺系徐昌杰博士并由其惠赠引物), 扩增载体序列 + 反向 ACO 序列。反应条件同上。此目的条带标记为 P1。将转基因植株的此条带割胶回收, 连接到 pMD 18-T Vector (TaKaRa) 上,

转化到 JM109 中, 阳性克隆用 $\text{M}^+/\text{M13}^-$ 引物进行双向测序 (上海生工生物工程技术有限公司合成)。

1.2.3.2 转基因植株的 Southern blot 检测 分别对转基因及阴性对照桃总 DNA 溶液用 *Hind III* (TaKaRa) 进行酶切, 以 *NPT II* PCR 回收产物 (K1) 作为阳性对照。探针为 PCR 产物 K1、P1, 均从凝胶中回收目的片段 (UNIQ-10 柱式 PCR 产物回收试剂盒, 上海生工生物工程技术有限公司合成) 获得。随机引物法标记 [α - ^{32}P]dCTP 探针 (TaKaRa)。

1.2.3.3 *GUS* 基因瞬间表达的组织化学分析 *GUS* 基因表达采用 Jefferson 等^[5]的方法进行。抗性材料先用添加 Cef 0.5975 mmol/L 的液体培养基振荡培养 2 h^[6], 再用蒸馏水充分洗涤 5~6 次, 滤纸吸干^[7], 37 $^{\circ}\text{C}$ 染色过夜, 70% 乙醇脱色, 统计蓝色幼胚的比率。

2 结果

2.1 抗性材料的获得

表 1 实验中幼胚子叶最终得到 12 个抗性芽, 得到抗性芽最多的处理为 3 号。表 2 实验中幼胚带胚芽单瓣子叶接种获得了 14 个抗性芽, 完整子叶获得了 13 个抗性芽。

基因枪轰击材料第一次继代后统计再生芽比例如表 3 所示。筛选培养中, 已经诱导的不定芽大部分黄化、白化或褐化死亡, 也有一部分出现玻璃化, 只有少量芽仍能保持绿色, 最终得到 5 个再生抗性芽, 其中只有 1 个抗性芽能够生根。

表 3 基因枪转化桃幼胚子叶再生结果

Tabel 3 Shoots regeneration from immature cotyledons of PBM peach

培养基类型 Media	光下 In light		暗中 Under dark	
	外植体数 No. of explants	再生芽数 Percent cotyledons with shoots	外植体数 No. of explants	再生芽数 Percent cotyledons with shoots
M8	31	22	31	87
M9	30	13	30	7
M10	30	32	/	/
M12	32	38	32	48
M13	29	36	/	/
M14	28	13	/	/
ML1	31	56	/	/
ML2	30	52	29	37

2.2 PCR 分析

对载体特有的 *NPT II* 基因进行特异扩增检测(图 1),发现 PCR 阳性植株能扩出 500 bp 的特异条带,而未转化植株不能扩出任何条带,初步说明外源基因已经转入桃基因组中。取 *NPT II* 基因阳性植株的基因组 DNA,以 UP2 和 DP2 为引物进行扩增(图 2),结果显示阳性对照(pBI 0.8)和转基因材料均扩增出特异的1 000 bp 条带。测序结果表明,这 1 000 bp 序列包含 pBI 121 部分序列及反向 *ACO* 基因序列,进一步证明目的基因已整合到桃基因组中。

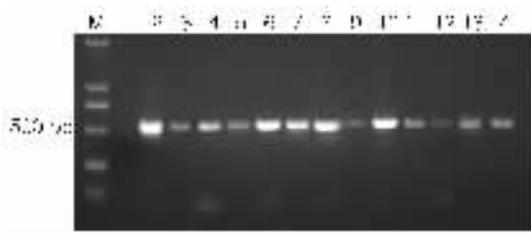


图 1 转基因桃中 *NPT II* 基因的 PCR 特异扩增检测
M:2 kb DNA 标准分子量; 1:未转化桃叶片(阴性对照);
2:pBI 0.8(阳性对照);3~10:反义 *ACO* 转基因桃叶片
(农杆菌法);11~14:反义 *ACO* 转基因桃叶片(基因枪法)。

Fig.1 PCR analysis of *NPT II* in transgenic peach

M: 2 kb marker; 1:Untransformed peach (negative control);
2:pBI0.8 (positive control); 3~10: Transformed peach
with antisense *ACO* by ATM; 11~14: Transformed
peach with antisense *ACO* by PBM.

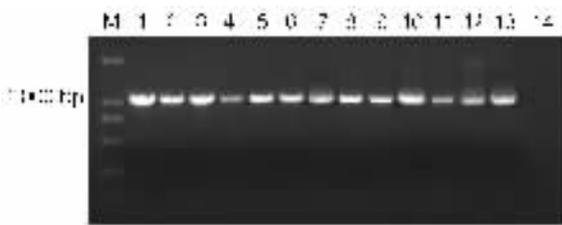


图 2 转基因桃的载体序列 + 反向 *ACO* 的
PCR 特异扩增检测

M:2 kb DNA 标准分子量;1:pBI 0.8(阳性对照);2~9:
反义 *ACO* 转基因桃叶片(农杆菌法);10~13:反义 *ACO*
转基因桃叶片(基因枪法);14:未转化桃叶片(阴性对照)。

Fig. 2 PCR analysis of vector + antisense
ACO in transgenic peach

M: 2 kb marker; 1: pBI 0.8 (positive control);
2~9:Transformed peach with antisense *ACO* by ATM;
10~13:Transformed peach with antisense *ACO*
by PBM; 14:Untransformed peach (negative control).

2.3 PCR-Southern blot

以载体 *NPT II* 基因 PCR 扩增产物为探针和阳性对照,以未转化的桃为阴性对照,对部分 PCR 鉴定为阳性的转化桃进行 PCR-Southern 杂交,结果表明在所检测的转化桃中都得到一条位置基本相同的阳性带(图 3,图 4)。说明 PCR 阳性结果完全正确。

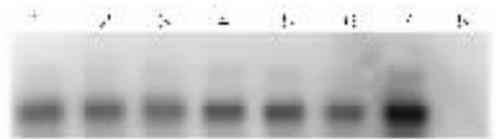


图 3 转基因桃中 *NPT II* 的 PCR-Southern 检测结果

1~4:反义 *ACO* 转基因桃叶片(农杆菌法);
5,6:反义 *ACO* 转基因桃叶片(基因枪法);
7:PCR 回收产物(阳性对照);8:未转化桃叶片(阴性对照)。

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

1~4:Transformed peach with antisense *ACO* by ATM;
5,6:Transformed peach with antisense *ACO* by PBM;
7: PCR product of *NPT II* (positive control);
8: Untransformed peach (negative control).

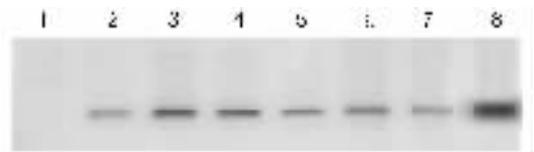


图 4 转基因桃中的载体序列 + 反向 *ACO* 的
PCR-Southern 检测结果

1:未转化桃叶片(阴性对照);2~5:反义 *ACO* 转基因
桃叶片(农杆菌法);6,7:反义 *ACO* 转基因桃叶片
(基因枪法);8:PCR 回收产物(阳性对照)。

Fig.4 PCR-Southern analysis of antisense
ACO for transgenic plants

1:Untransformed peach(negative control); 2~5:
Transformed peach with antisense *ACO* by ATM;
6,7:Transformed peach with antisense *ACO* by PBM;
8: PCR product of *NPT II* (positive control).

2.4 Southern blot

部分 PCR-Southern 杂交鉴定为阳性的转化桃基因组进行 Southern blot 检测(图 5),结果表明在检测的转化桃中都得到了位置基本相同的阳性带。说明 PCR-Southern blot 的结果完全正确。

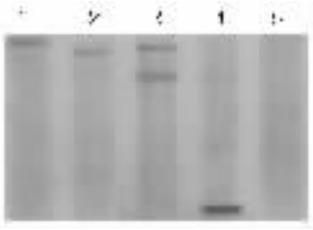


图5 转基因桃中 *NPT II* 的 Southern 检测结果
1,2:反义 ACO 转基因桃叶片(农杆菌法); 3:反义 ACO 转基因桃叶片(基因枪法); 4:PCR 回收产物(阳性对照);
5:未转化桃叶片(阴性对照)。

Fig.5 Southern-blotting analysis of *NPT II* for transgenic plants

1,2:Transformed peach with antisense ACO by ATM;
3:Transformed peach with antisense ACO by PBM;
4: PCR product of *NPT II* (positive control);
5: Untransformed peach (negative control).

2.5 GUS 基因组织化学检测

随机抽取抗性植物材料进行 *GUS* 组织化学染

色,获得了可染色的不定芽、叶片和根而非转化植株未染上色(图6,图7),表明 *GUS* 基因在组织中进行表达了,由于反义 ACO 基因位于 *GUS* 基因的上游,所以可以推测反义 ACO 基因片段也随之进行了转录和表达。

3 讨论

本文首次得到了桃转 ACO 反义基因的抗性材料,通过 PCR 及 Southern-blotting 等分子手段鉴定 ACO 反义基因已整合到桃基因组中。转基因植株生根难是大多数木本植物存在的主要问题之一。本实验中获得多个抗性芽,经多次继代尝试各种培养基,均难以成根,致使大量抗性芽在这一过程中死亡,这与转基因芽生根难有关,也可能与抗性芽的假阳性(此处表现为抗性)有关。利用微芽嫁接这种方法有可能成功获得完整的转基因桃植株。实验中共进行了17个抗性芽嫁接,其中有9个可以成活1个月

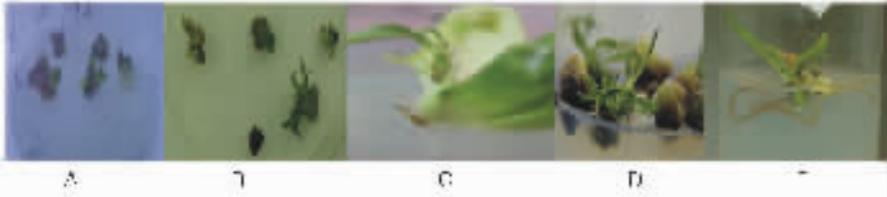


图6 农杆菌介导法和基因枪法转化桃幼胚子叶抗性植株再生

A,B:农杆菌法桃幼胚子叶抗性芽;C:微芽嫁接农杆菌法抗性芽成活;D:基因枪法桃抗性芽;E:基因枪法抗性芽生根。

Fig.6 The *kan^R* plantlet regenerated from immature cotyledons infected with ATM and PBM

A,B:*kan^R* shoots regenerated from the immature cotyledons of peach infected with ATM;C:Micrografting the *kan^R* shoots after infected with ATM;D:*kan^R* shoots regenerated from the immature cotyledons of peach PBM;

E:Rooting of regenerated *kan^R* shoots of peach by PBM.



图7 转基因桃的 *GUS* 基因 X-Gluc 组织化学染色

A,B: *GUS* 基因在转基因根中的表达;C,D:未转化桃根和叶片 *GUS* 染色;E,F,G: *GUS* 基因在转基因叶中的表达。

Fig.7 *GUS* expression (blue color) in the transgenic plant of peach

A,B: *GUS* assay of transformed peach root;C,D: *GUS* assay of untransformed peach root and leaf;E,F,G: *GUS* assay of transformed peach leaf.

以上。此文中微芽嫁接是在不定芽生根失败后进行的补救措施,可用于砧木的成熟种子数量少;加之抗性芽长时间不生根,多次继代,生活力较低;同时因微芽嫁接时未进行捆扎等多种因素,造成本实验中微芽嫁接的最终成活率不高。为了解决生根难的问题也尝试了发根农杆菌感染抗性芽、发根农杆菌和根癌农杆菌混合液感染外植体等办法,现已在用发根农杆菌 15834 感染成熟种子的实验中获得了毛状根且毛状根中可检测到 *GUS* 基因的表达,进一步的研究仍在进行中。

如果直接以转化的反义 *ACO* 基因为探针对转基因材料的 Southern blot 检测,由于在未转化和转化的桃中都存在能与转化的反义 DNA 序列杂交的相应基因,将不利于杂交结果的分析。PCR 鉴定的结果证明,在转基因材料中标记基因 *NPT II* 与转化的目的基因是相伴存在的,因此在一定程度上检测 *NPT II* 就可检测目的基因,事实上这种检测标记基因间接鉴定转基因材料的方法在反义转化中经常被采用^[8]。本研究也采用了此方法对转基因材料进行了检测。

经 PCR、Southern 结果分析表明,抗性材料中含有反义 *ACO* 基因,这为进行 *ACO* 反义基因对桃果实贮藏和品质影响的研究奠定了基础,但遗憾的是未获得完全成长并能脱离无菌培养的转基因植株,深入实验受到阻碍,未能进行 Northern 杂交分析或转基因材料的生理研究,究其原因与基因遗传转化的频率低下和转基因抗性芽生根难是分不开的。这为下一步进行桃基因遗传转化研究提出了努力方向。

参 考 文 献 (References):

[1] Hamilton A J, Lycett G W, Grierson D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants.

Nature, 1990, 346:284~287.

- [2] Savin K W, Baudinette S C, Graham M W, Graham M W, Michael M Z, Nugent G D, LU Chin-Yi, Chandler S F, Cornish E C. Antisense ACC oxidase RNA delays camation petal senescence. *Hort Science*, 1995, 30(5): 970~972.
- [3] YU Yi-Xun, BAO Man-Zhu. Carnation flower vase life prolonged by transformation with antisense *ACO* oxidase gene. *Acta-Horticulturae Sinica*, 2004,31(5):633~636.
余义勋,包满珠.反义 *ACO* 基因导入获得瓶插奉命长的香石竹植株. *园艺学报*,2004,31(5):633~636.
- [4] ZHANG Shu-Zheng, TANG Huo-Long, YANG Ben-Peng, LIU Fei-Hu. Genetic transformation of Carnation with its antisense ACC oxidase gene. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003,30(6): 699~702.
张树珍,汤火龙,杨本鹏,刘飞虎.康乃馨 ACC 氧化酶反义基因遗传转化康乃馨的研究. *园艺学报*,2003,30(6):699~702.
- [5] Jefferson R A, Kavanagh M, Bevan W. GUS fusion: glucuronidase as a sensitive and versatile gne fusion marker in higher plants. *Embo J*, 1987,(6): 3901~3907.
- [6] WU Di, ZHOU Chang-Mei, ZHU Yan-Ming. Effect of phenolic compounds on efficiency of genetic transformation in grape. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003,(1):77~78.
吴迪,周长梅,朱延明.酚类物质对葡萄遗传转化效率的影响. *园艺学报*,2003,(1):77~78.
- [7] LI Yin, HUANG Xia, HUANG Xue-Lin. Transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somaticembryos mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, 29(2): 109~113.
黎茵,黄霞,黄学林.根癌农杆菌介导的苜蓿体胚转化. *植物生理与分子生物学报*,2003, 29(2):109~113.
- [8] ZHANG Ming-Fang, XIANG Qing-Ning, YING Tie-Jin, YANG Hu-Qing, ZHENG Tie-Shong, DU Rong-Mao. Transformation and functional analysis of antisense ethylene receptor *LeETR2* genes in tomato. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(2): 144~147.
张明方,向庆宁,应铁进,杨虎清,郑铁松,杜荣茂.反义乙烯受体 *LeETR2* 基因对番茄的转化和功能分析. *农业生物技术学报*,2003, 11(2): 144~147.