

## 不同结构的外源 ACO 基因导入香石竹对瓶插寿命的影响

余义勋 包满珠\*

(园艺植物生物学教育部重点实验室, 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

**摘 要** 以香石竹叶片为外植体, 利用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法, 将香石竹 ACC 氧化酶 (ACO) 基因核 DNA 的正义 (sense)、反义 (antisense)、正义重复 (sense direct repeat) 和反义重复 (antisense direct repeat) 等 4 种 T-DNA 结构导入香石竹 'Master' 品种。经 Southern 杂交检测证明目的基因已整合到香石竹基因组, 共获得 14 个转化株系。在 25℃ 条件下比较瓶插寿命, 对照植株花朵瓶插寿命为 5.8d, 多数转化株系花朵瓶插寿命达 11d, 最长者可达 12.8d。大多数转基因株系切花衰老过程中乙烯释放量显著减少, 部分转基因株系切花衰老过程中几乎检测不到乙烯, 而对照有明显的峰值。通过对本研究转化 ACO 基因核 DNA 与前人转化 ACO 基因 cDNA 延长瓶插寿命比较以及对不同 T-DNA 结构的转化抑制内源基因表达的程度进行比较后, 初步判断用核 DNA 转化后对内源基因的抑制效果与 cDNA 相当甚至更明显, 反义基因可以比正义基因更有效地抑制内源的同源基因的表达, 转重复基因比转单个基因能更有效地抑制内源的同源基因的表达。

**关键词** 香石竹, ACC 氧化酶 (ACO) 基因, 遗传转化, 瓶插寿命, 乙烯, 基因沉默

**中图分类号** Q754 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0704-04

香石竹是世界四大切花之一, 延长切花瓶插寿命对其观赏期及流通的调节有重要作用。香石竹是典型的乙烯致衰植物, 传统的保鲜方法多采用含有乙烯抑制剂 (AVG、GVG、AOA) 或乙烯拮抗剂 ( $Ag^+$ 、STS、2,5-NBD 等) 的保鲜剂, 但这些化学物质会造成环境污染。其它如冷藏、气调等方法成本太高, 效果也不尽如人意。

近来, 国外有报道利用反义 RNA 和共抑制技术延长香石竹瓶插寿命<sup>[1,2]</sup>。本研究在前期构建 ACO 基因正义 (sense)、反义 (antisense)、正义重复 (sense direct repeat) 和反义重复 (antisense direct repeat) 4 种 T-DNA 结构的基础上<sup>[3,4]</sup>, 将该 4 种 T-DNA 结构分别导入香石竹品种 'Master', 对瓶插寿命和乙烯释放量进行了比较。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

香石竹 'Master' 品种组培苗购自云南农科院。

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 菌株分别携带 pMACO1、pMACO2、pMrACO1、

pMrACO2 质粒, 这些质粒分别含香石竹 ACO 基因核 DNA 部分片段的正义、反义、正义重复和反义重复 4 种 T-DNA 结构 (见图 1)<sup>[3,4]</sup>。其中的 ACO 基因核 DNA 片段长 1206 bp, 为非全长基因, 含 3 个外显子 (exon), 2 个内含子 (intron)<sup>[3]</sup>。

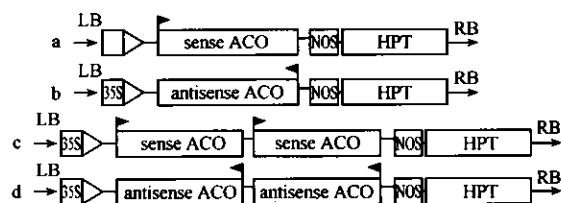


图 1 含 ACO 基因的 4 种植物表达载体 T-DNA 区域棒状图

Fig. 1 Linear maps of the T-DNA region of four vectors

treated with expression product of pPD-1A

a: pMACO1; b: pMACO2; c: pMrACO1; d: pMrACO2

#### 1.2 方法

**1.2.1 香石竹转化及其植株再生:** 参考林荣呈等的方法<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 转化植株的检测:** 以抗性植株总 DNA 为模板, 用 HPT 基因两端引物进行 PCR 扩增检测 (设正负对照), 呈阳性者进一步进行 Southern 杂交检测。

收稿日期: 2004-01-05, 修回日期: 2004-04-15。

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 39970532)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-27-87282435; Fax: 86-27-87282095; E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn

参照 Sambrook 等的方法<sup>[6]</sup>, *Eco*R I 酶切 PCR 呈阳性的抗性植株总 DNA、未转化植株总 DNA(阴性对照)及 pMrACO1 质粒 DNA(阳性对照),用于 Southern 杂交。探针为<sup>32</sup>P 标记的 HPT 基因片段。

1.2.3 转化植株的生理生化分析:

(1) 转化植株与对照植株切花瓶插寿命比较:转基因植株与对照植株盛花期(外层花瓣与茎轴垂直,此时为 0 d)时,切下 15 cm 左右长花枝,于广口瓶中蒸馏水插,光照  $12 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 每天换水 1 次,外层花瓣内卷萎蔫时瓶插寿命结束。每朵花为 1 个重复,设 5 个重复。

(2) 转化植株与对照植株切花衰老过程中乙烯释放量比较:转基因植株与对照植株盛花期时,切下 2 cm 左右长花枝 于广口瓶中蒸馏水插,每天转移至有橡皮塞的密闭透明容器中(底部盛蒸馏水),封闭 1 h,用 1 mL 注射器抽取 0.4 mL 气样用 Hitachi-163 型气相色谱仪测定乙烯含量。每朵花为 1 个重复,设 5 个重复。

2 结果与分析

2.1 香石竹叶片的选择培养和植株再生

叶片与农杆菌共培养后置于选择分化培养基中,18 d 后开始出现小芽丛,待不定芽长至 1 cm 左右时将其切下转移到选择生根培养基中。2 周后开始分化不定根,4 周后将生根苗炼苗下地。

幼叶在不加抗生素的分化培养基上的平均分化率为 58.7%,经农杆菌侵染后在选择分化培养基上的分化率为 9.7%。

2.2 Southern 杂交分析

对 14 株 PCR 检测呈阳性的植株、未转化对照植株总 DNA 和质粒 DNA(都经 *Eco*R I 酶切)进行 Southern 杂交,14 株均有杂交带出现,且均为单拷贝,而未转化对照植株无杂交带出现(见图 2)。

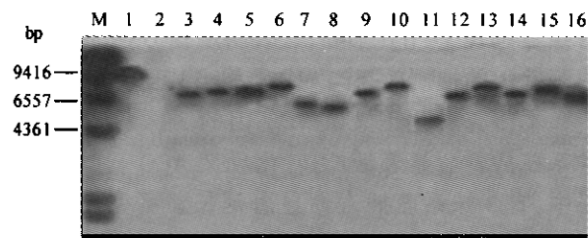


图 2 转基因香石竹抗性植株 Southern 检测(*Eco*R I 酶切)

Fig. 2 Southern blot identification of transgenic plants (*Eco*R I digested)

M: DNA/ *Hind* III marker; 1: plasmid DNA; 2: DNA of non-transformed plant; 3-16: DNA from transformants

2.3 瓶插寿命比较

未转化对照花朵衰老过程中由于乙烯高峰的产生,在盛花后第 5 天左右花瓣开始内卷,一般在第 7 天完全萎蔫,内卷、失水和失色都是一个迅速的过程。而转化植株花瓣在采后丰满状态可以保持更长时间,失水和失色是一个较缓慢的过程。有的株系(如 T556、T456、T575 株系)的部分花朵直到第 14、15 天仍具观赏价值。转正义重复 ACO 基因 T575 株系与对照瓶插寿命比较见图 3。

在转化正义 ACO 基因的 3 株系中,只有 1 株系瓶插寿命显著延长。在转化反义 ACO 基因的 4 株转化株系中,3 株系瓶插寿命得以显著延长。转化重复 ACO 基因(包括正义和反义)的 5 株系瓶插寿命均显著延长,且从表中的 a~f 所表示的显著性来看,重复基因比单基因显示出更强的显著性,重复基因之间无显著性差异。

表 1 各转化植株与未转化植株花朵瓶插寿命比较

Table 1 Comparison of vase life of transgenic and wild type of carnation cultivar 'Master'

	Line	Vase life/d
CK	T5	5.8 ± 0.4 <sup>f</sup>
	T12	10.2 ± 0.2 <sup>d</sup>
	T6	6.2 ± 0.2 <sup>f</sup>
Sense	T183	5.8 ± 0.4 <sup>f</sup>
	T190	11.8 ± 0.5 <sup>abc</sup>
	T271	11.2 ± 0.4 <sup>bed</sup>
	T237	8.6 ± 0.2 <sup>e</sup>
Antisense	T453	5.8 ± 0.4 <sup>f</sup>
	T575	11.8 ± 0.5 <sup>abc</sup>
Sense repeat	T456	12.8 ± 0.4 <sup>a</sup>
	T556	12.8 ± 0.4 <sup>a</sup>
Antisense repeat	T235	12.4 ± 0.4 <sup>ab</sup>
		11.6 ± 0.5 <sup>abc</sup>

Note: Means followed by different letters of a ~ f are significantly different according to LSD-test(  $P = 0.05$  ).

2.4 花朵乙烯释放量测定

对部分转化株系(T5、T12、T190、T237、T453、T575、T556 和 T456,包括 4 种 T-DNA 结构)及对照植株花朵衰老过程中乙烯释放量进行了测定。

乙烯释放量与瓶插寿命明显呈负相关性。对照在第 5 天或第 6 天时乙烯释放达到峰值,4 转化株系 T5、T190、T453 和 T556 株系乙烯释放量均降低到对照的 10% 以下,其中 T556 株系几乎检测不到乙烯。另 T456 株系和 T575 株系也几乎检测不到乙烯,而 T237 和 T12 株系乙烯释放量与对照无显著差异。

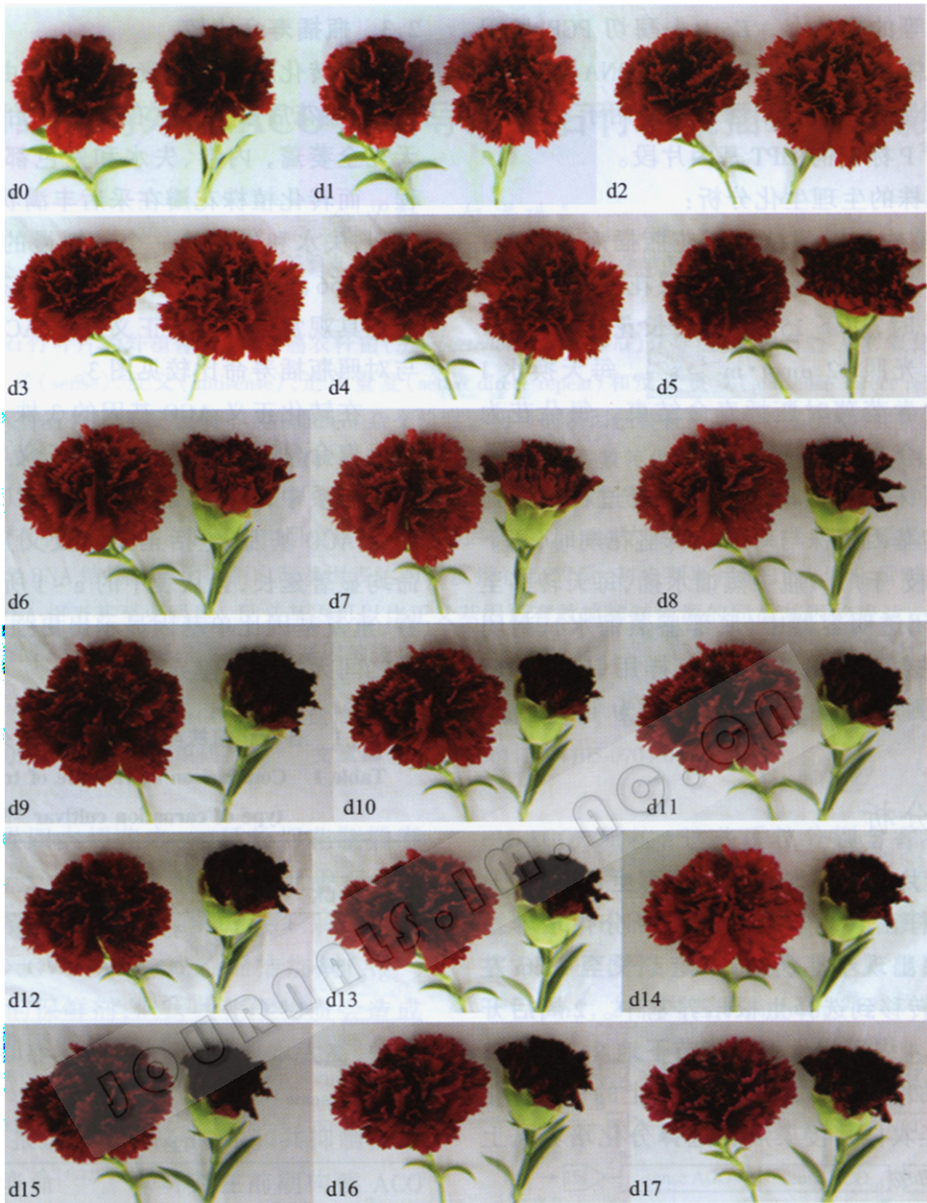


图3 香石竹品种‘Master’转正义重复 ACO 基因植株 T575 株系(左)与对照(右)花朵的瓶插寿命比较(0~17d)

Fig. 3 Senescence profile of carnation cultivar ‘Master’ cut flowers (0~17<sup>th</sup> day)

Right: control. Left: the sense direct repeat transgenic line T575

3 讨论

本研究中转基因植株的确定如果用目的基因 ACO 作探针,有可能干扰检测结果,而用 HPT 基因片段作探针,可以避免这一情况,但用 HPT 基因片段作探针只能是一种间接的检测方法,还必须结合表现型和生理生化指标的检测,方可更有力地说明转化结果。

截至目前,共有‘White Sim’、‘Scania’和‘Nora’3个香石竹品种获得 ACO 基因转化植株<sup>[1,2]</sup>,均为 ACO 基因 cDNA 单基因,瓶插寿命均延长 3~4 d。本研究首次利用 ACO 基因核 DNA 部分片段构建 4

种 T-DNA 结构,对香石竹‘Master’品种进行转化,获得了转化植株,其中单基因 T-DNA 结构瓶插寿命比对照可延长 3~6 d 不等,这表明用核 DNA 转化后对内源基因的抑制效果与 cDNA 相当甚至更明显。

本研究转化正义 ACO 基因的 3 株系中,只有 1 株系瓶插寿命显著延长;转化反义 ACO 基因的 4 株系中,有 3 株系瓶插寿命显著延长。可见反义基因比正义基因更能抑制内源的同源基因的表达。Han 等<sup>[7]</sup>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,这与本研究的结果一致。

本研究转化重复 ACO 基因(包括正义重复和反

义重复)的5株系中,其花朵瓶插寿命均显著延长,延长时间较长(12 d左右),且较彻底地抑制了乙烯生成。而转化单个基因(包括正义与反义)的7株系中,有3株瓶插寿命与对照比没有显著差异,另外4株系花朵瓶插寿命虽然延长,但延长时间不及重复基因。因此可初步判断重复 ACC 基因比单个 ACC 基因更能抑制内源 ACC 基因的表达。Sijen 等<sup>[8]</sup>、Hamilton 等<sup>[9]</sup>、Wang 等<sup>[10]</sup>在利用其他基因的基因重复与单基因的比较实验中,均得到相似的结果。

**致谢** 在研究过程中得到张献龙教授、吴谋成教授及林荣呈、张俊卫和刘国锋三位博士的帮助,谨此致谢。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Savin KL, Baidotte SC, Graham MW *et al.* Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence. *Hortscience*, 1995, 30(5): 970-972
- [2] Kosugi Y, Waki K, Iwazaki Y *et al.* Senescence and gene expression of transgenic non-ethylene-producing carnation flowers[J]. *J Japan Soc Hort Sci*, 2002, 71(5): 638-642
- [3] Yu YX(余义勋), Zhang JW(张俊卫), Sun ZY(孙振元) *et al.* Cloning of ACC oxidase gene of carnation and construction of its plant expression vectors. *Forest Research* (林业科学研究), 2002, 15(3): 256-260
- [4] Yu YX(余义勋), Bao MZ(包满珠), Sun ZY(孙振元). Construction of repeated carnation ACC oxidase gene plant recombinant expression vectors. *Forest Research* (林业科学研究) 2004, 17(1): 1-5
- [5] Lin RC(林荣呈), Chen LQ(陈龙清), Sun ZY(孙振元). Establishment of efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Forest Research* (林业科学研究), 2003, 16(2): 123-128
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- [7] Han Y, Grierson D. The influence of inverted repeats on the production of small antisense RNAs involved in gene silencing. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267: 629-635
- [8] Sijen T, Wellink J, Hiriart J B, and van Kammen A. RNA-mediated virus resistance: role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell*, 1996, 8: 2277-2294
- [9] Hamilton AJ, Brown S, Yuanhai H. A transgene with repeated DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato. *Plant J*, 1998, 15(6): 737-746
- [10] Wang MB, Waterhouse PM. High-efficiency silencing of a  $\beta$ -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology*, 2000, 43: 67-82

## Integration of Different T-DNA Structures of ACC Oxidase Gene into Carnation Genome Extended Cut Flower Vase-Life Differently

YU Yi-Xun BAO Man-Zhu\*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** The cultivar 'Master' of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) was transformed with four T-DNA structures containing sense, antisense, sense direct repeat and antisense direct repeat gene of ACC oxidase mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Southern blotting detection showed that foreign gene was integrated into the carnation genome and 14 transgenic lines were obtained. The transgenic plants were transplanted to soil and grew normally in greenhouse. Of the 12 transgenic lines screened, the cut flower vase life of 8 transgenic lines is up to 11 days and the longest one is 12.8 days while the vase life of the control is 5.8 days under 25 °C. The vase life of 2 lines out of 3 with single sense ACCO gene is same as that of the control, while the vase life of 3 lines out of 4 with single antisense ACCO gene is prolonged. The vase life of cut flowers of 5 lines with direct repeat ACCO genes is all prolonged by about 6 days, while the vase life of 3 out of 7 lines with single ACCO gene is same as that of the control. During the senescence of cut flowers, the ethylene production of the most of the transgenic lines decreased significantly, and the production of ethylene is not detectable in lines T456, T556 and T575. The results of the research demonstrate that antisense foreign gene inhibits expression of endogenous gene more significantly than sense one. Both sense direct repeat and antisense direct repeat foreign genes can suppress endogenous gene expression more significantly comparing to single foreign genes. The transgenic lines obtained from this research are useful to minimize carnation cut flower transportation and storage expenses.

**Key words** Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), ACC oxidase (ACO) gene, transformation, vase life, ethylene production, gene silencing

Received: 01-05-2004

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (No.39970532).

\* Corresponding author. Tel: 86-27-87282435; Fax: 86-27-87282095; E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn