

不同启动子驱动的 *ACDS* 基因对矮牵牛遗传转化技术研究

李建永^{1,2}

(1. 潍坊科技学院 贾思勰农学院, 山东 寿光 262700; 2. 云南大学 植物改良与应用实验室, 云南 昆明 650091)

摘要:以矮牵牛为试材,通过根癌农杆菌介导 *ACC* 脱氢酶基因(*ACDS*)(分别由 *CaMV35S*、*SAG₁₂* 和 *CHSA* 启动子驱动)转化矮牵牛叶盘,探讨了预培养时间、农杆菌菌液浓度、浸染时间、共培养时间、乙酰丁香酮(*AS*)浓度等因素对转化的影响,比较了 *ACDS* 基因在不同启动子驱动下获得转基因植株的效率及转基因植株的生长速率。结果表明:预培养 5 d 的矮牵牛叶盘在含 *AS* 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 OD_{600} 值为 0.6 的农杆菌菌液中浸染 8 min 后,共培养 4 d 时遗传转化效果最优;不同启动子驱动的 *ACDS* 基因转化效率以 *CHSA* 启动子效率最高(3%),*SAG₁₂* 启动子效率最低(1.25%)。PCR 检测证明外源基因已整合进入矮牵牛基因组中。转 *ACDS* 基因矮牵牛植株的获得,为利用基因工程技术培育抗衰老矮牵牛新品种奠定了技术基础。

关键词:矮牵牛;启动子;*ACC* 脱氢酶基因;遗传转化

中图分类号:S 681.9;Q 785 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)20-0085-07

矮牵牛(*Petunia hybrida*)属茄科矮牵牛属多年生草本花卉。花色彩丰富,花期长,是布置花坛、花境、妆点庭院的好材料。由于矮牵牛植株遗传背景清楚,是研究植物衰老生物学尤其是花器官发育的一种模式植物^[1]。MEYER 等^[2]将调控黄酮生物合成的玉米二羟基黄酮还原酶基因(*DFR*)导入矮牵牛中,使其产生新的颜色——砖红色,这是首次利用基因工程技术得到花色改变的矮牵牛。此后,关于矮牵牛基因工程的研究主要集中在花色和花器官发育方面^[3-4]。

ACC(1-氨基环丙烷基羧酸)是乙烯合成的直接前体,它决定植物体内乙烯的生成量。在土壤微生物中发现的 *ACC* 脱氢酶可以将 *ACC* 分解成 α -丁酮酸和氨^[5]。目前已经克隆了多种土壤微生物的 *ACC* 脱氢酶基因(*ACDS*),其中一些可以在植物中较好地表达,破坏植物中的 *ACC*,减少乙烯的生物合成,从而延缓乙烯跃变型瓜果的成熟,延长保鲜期^[6]。KLEE 等^[7]将 *ACDS* 基因正向导入番茄中获得转基因植株,乙烯的生物合成被抑制达 97%,其果实成熟比对照明显推迟(至少 6 周),而且对其营养生长及表型没有影响。矮牵牛是一种典型的呼吸跃变型花卉,乙烯是其内源的衰老激素,将 *ACDS*

基因导入矮牵牛,抑制其乙烯的生物合成从而延长花卉的观赏寿命,在理论上是可行的。

该研究优化了 *ACDS* 基因转化矮牵牛的主要条件,采用根癌农杆菌介导法将分别连接组成型表达启动子 *CaMV35S*、衰老特异表达启动子 *SAG₁₂* 和花特异表达启动子 *CHSA* 的 *ACDS* 基因导入矮牵牛。对在同一水平下,不同启动子驱动的 *ACDS* 基因对矮牵牛遗传转化效率的差异及转基因植株的生长速率进行了初步分析,以期利用基因工程技术培育延缓衰老的矮牵牛新品种和研究不同启动子对外源基因在受体植物矮牵牛中表达的影响奠定必要的技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为深红色品系矮牵牛,以再生无菌苗的叶片作为遗传转化的受体。

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 菌株,其中含有质粒 pBI121。植物表达载体分别由 *CaMV35S* 启动子、*SAG₁₂* 启动子和 *CHSA* 启动子驱动,该表达载体中都含有 *ACDS* 基因和 *NPT II* 筛选标记基因,后者使转化细胞及再生植株对卡那霉素(Kan)和 G418 产生抗性。基因克隆和载体构建均在云南大学植物改良与应用实验室完成^[8]。

试验中使用的各培养基成分见表 1。培养基中蔗糖含量为 3%(30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),琼脂含量为 0.65%(6.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),pH 5.8~6.0;羧苄青霉素(Carb)。

作者简介:李建永(1981-),男,硕士,讲师,研究方向为植物遗传育种与基因工程。E-mail:ljy_518@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30560095)。

收稿日期:2016-07-27

表 1

试验中使用的培养基

Table 1

Culture media used in the experiment

培养基 Culture medium	成分 Component	抗生素浓度 Concentration of antibiotic/(mg · L ⁻¹)	用途 Use
MS-1	MS+BA 2.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.1 mg · L ⁻¹	0	愈伤组织诱导、抗生素筛选、预培养、共培养
MS-2	MS+BA 1.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.1 mg · L ⁻¹	0	愈伤组织增殖与芽分化
MS-3	MS+IBA 0.05 mg · L ⁻¹	0	生根
MS-4	MS+BA 1.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.1 mg · L ⁻¹	Carb 350	延迟筛选培养
MS-5	MS+BA 1.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.1 mg · L ⁻¹	Kan 80+Carb 350	抗性筛选培养
MS-6	MS+BA 1.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.1 mg · L ⁻¹	Kan 120+Carb 200	进一步抗性筛选培养
MS-7	MS+BA 1.0 mg · L ⁻¹ +NAA 0.1 mg · L ⁻¹	G418 20+Carb 100	抗性芽复筛选培养
MS-8	MS+IBA 0.05 mg · L ⁻¹	Kan 10+Carb 80	抗性芽生根筛选

1.2 试验方法

1.2.1 矮牵牛再生体系的建立 以矮牵牛的幼嫩叶片为外植体,自来水流水冲洗 3~4 h,在无菌条件下 75%乙醇浸泡 30 s,0.1%的氯化汞灭菌 7 min。无菌水冲洗 6~8 次,接种在愈伤诱导培养基 MS-1 上,30 d 左右将愈伤组织切下转接到增殖培养基 MS-2 上,诱导外植体直接成芽;然后将幼芽转移到生根培养基 MS-3 上诱导生根。

1.2.2 根癌农杆菌的活化与制备 从-70℃冰箱保存的含 CaMV35S+ACDS 基因植物表达载体的农杆菌(PDE)菌液中吸取 500 μL,接种到 10 mL YEP 液体培养基中,于 28℃、200 r · min⁻¹ 培养至对数期 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0。4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,菌体用

不含抗生素的 MS 液体培养基重悬至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.8 (含 200 μmol · L⁻¹ 乙酰丁香酮(AS))备用。含 SAG₁₂+ACDS 基因(PDSE)和含 CHSA+ACDS 基因(PCDE)的农杆菌菌液活化与制备方法同上。

1.2.3 农杆菌转化因子试验优化设计 为了比较在同一条件下不同启动子驱动的 ACDS 基因转化矮牵牛的差异,该试验借鉴前人的优化方法^[9],以 SAG₁₂ 启动子为参照标准(表 2),设每个预设梯度均为 80 个外植体,共计 24 个,观察愈伤长势并统计比较抗性芽再生率,优化主要的转化条件。CaMV35S 启动子和 CHSA 启动子驱动的 ACDS 基因对矮牵牛的转化也在此优化的条件下进行。抗性芽再生率(%)=获得抗性芽数(Kan 120 mg · L⁻¹)/接种叶盘总数×100。

表 2

遗传转化的影响因素及水平

Table 2

Factors and levels of genetic transformation

影响因素 Factor	预设梯度 Preset gradient	其它转化条件 Other conversion conditions
预培养时间 Pre-culture time/d	1,3,5,7	含 AS 200 μmol · L ⁻¹ 的农杆菌菌液 OD ₆₀₀ 为 0.6,浸染 8 min 后,共培养 4 d,延迟筛选 5 d
菌液浓度 Bacteria concentration(OD ₆₀₀)	0.2,0.4,0.6,0.8,1.0	预培养 5 d,含 AS 200 μmol · L ⁻¹ 的农杆菌菌液浸染 8 min 后,共培养 4 d,延迟筛选 5 d
浸染时间 Infection time/min	2,5,8,11	预培养 5 d,含 AS 200 μmol · L ⁻¹ 的农杆菌菌液 OD ₆₀₀ 为 0.6,共培养 4 d,延迟筛选 5 d
共培养时间 Co-culture time/d	2,4,6	预培养 5 d,含 AS 200 μmol · L ⁻¹ 的农杆菌菌液 OD ₆₀₀ 为 0.6,浸染 8 min,延迟筛选 5 d
延迟筛选时间 Delayed selection time/d	1,3,5,7	预培养 5 d,含 AS 200 μmol · L ⁻¹ 的农杆菌菌液 OD ₆₀₀ 为 0.6,浸染 8 min,共培养 4 d
AS 浓度 Concentration of AS/(μmol · L ⁻¹)	0,100,200,300	预培养 5 d,农杆菌菌液 OD ₆₀₀ 为 0.6,浸染 8 min 后,共培养 4 d,延迟筛选 5 d

1.2.4 农杆菌介导的矮牵牛遗传转化 根据上述试验结果,将矮牵牛无菌苗叶片剪成 1.0 cm×1.0 cm 小方块(去掉主脉),接种于 MS-1 固体培养基上预培养 5 d,在农杆菌菌液中浸染 8 min,再接种于 MS-1 培养基上进行共培养 4 d。然后将外植体接种于延迟筛选培养基 MS-4 上,25℃光照培养 5 d 后转入筛选培养基 MS-5 上,每 10 d 更换 1 次培养基。1 个月后将上述抗性愈伤组织转入筛选培养基 MS-6 上,每 15 d 更换 1 次培养基。1 个月后将获得的抗性芽转入筛选培养基 MS-7 上,每 15 d 更换 1 次培养基,进行复筛选。待幼芽长至 2~3 cm,转入 MS-8 培养基进行抗性生根筛选。

1.2.5 ACDS 基因的 PCR 检测 采用 CTAB 方法^[10],分别从转化和非转化矮牵牛植株叶片中提取总 DNA,以转化植株的总 DNA 为模板,非转化植株的总

DNA 为阴性对照,质粒 pBI121/ACDS 为阳性对照,进行 PCR 扩增。引物序列如下:上游引物 Pacds1 5'-GCTCTAGAATGAACCTGAATCGTTTTGAACG-3',下游引物 Pacds2: 5'-GCGAGCTCTCAGCCGT-TACGAAACAGGAAGC-3'。

1.2.6 不同启动子与 ACDS 基因的 PCR 共检测 以转化植株的总 DNA 为模板,非转化植株的总 DNA 为阴性对照,质粒 pBI121/ACDS、pBI121/ACDS/CHSA、pBI121/ACDS/SAG₁₂ 为阳性对照,以 CaMV35S 启动子的上游引物 35S1:5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3',花特异表达启动子 CHSA 的上游引物 Pchsa1:5'-GGAAGCTTTTCCTGTTCAAAGCTGATG-3'及衰老特异表达启动子 SAG₁₂ 的上游引物 Psag1:5'-GCCTGCAG-GAATCTCTTTTATATTCAAAC-3'和 ACDS 的下游

引物 Pacds2: 5'-GCGAGCTCTCAGCCGTTACGAAA-CAGGAAGC-3'为特异引物,进行 PCR 扩增。扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,使用紫外分析仪观察并照相。

1.2.7 转基因矮牵牛植株生长速率的测量 取高度相近的不同启动子的转基因矮牵牛植株和对照植株的分化芽各 30 个,接种于生根培养基 MS+IBA 0.05 mg·L⁻¹+Carb 80 mg·L⁻¹中,每隔 10 d 测量 1 次,记录植株高度,研究转化株和对照株在生长速率上的差异。

2 结果与分析

2.1 预培养时间对矮牵牛遗传转化的影响

由图 1 可知,叶片预培养 5 d 时获得的抗性芽再生率最高,达到 10%。预培养时间过短(1 d)或过长(超过 5 d),抗性芽再生率都出现不同程度的降低。这是因为预培养时间过短,接种的外植体还未进行细胞分裂,而这时的细胞不容易整合外源 DNA,也难以进行外源基因的瞬时表达和转化。相反,预培养时间过长,外植体边缘膨大,伤口愈合,不利于 T-DNA 转移进入细胞,致使农杆菌感染后,转化细胞数量减少,从而降低外植体的转化率。

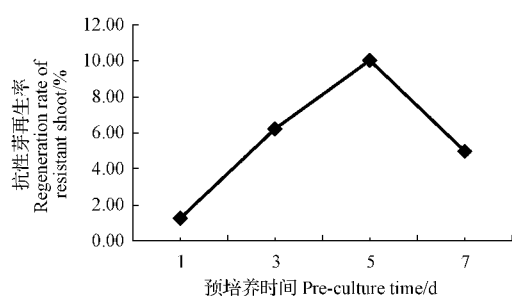


图 1 预培养时间对矮牵牛遗传转化的影响

Fig. 1 Effect of pre-culture time on genetic transformation of *Petunia hybrida*

2.2 农杆菌浓度对矮牵牛遗传转化的影响

农杆菌浸染的浓度是影响遗传转化率的一个关键因素。从图 2 可以看出,农杆菌菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6 左右时,浸染效果最好,抗性芽再生率达到 11.25%。试验还

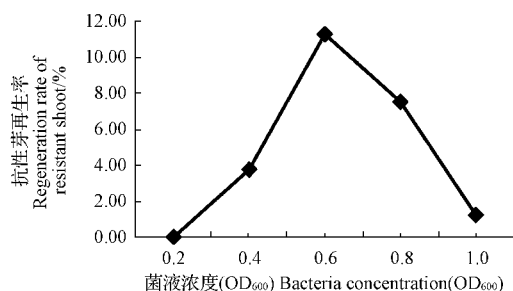


图 2 农杆菌浓度对矮牵牛遗传转化的影响

Fig. 2 Effect of *Agrobacterium* concentration on genetic transformation of *Petunia hybrida*

表明,菌液浓度过高(OD₆₀₀ 值大于 0.8)会导致叶片过度浸染,细菌生长旺盛,使其生长受到抑制,共培养后无法恢复活力,在选择培养时绝大多数褐化、死亡;菌液浓度过低(OD₆₀₀ 值小于 0.2)则不能让足够的农杆菌附着于叶片切口处,不能得到抗性芽。

2.3 浸染时间对矮牵牛遗传转化的影响

试验用农杆菌菌液(OD₆₀₀=0.6)设置 4 个不同的浸染时间。在预试验中发现浸染时间过短(2 min),共培养及选择筛选过程中愈伤组织的农杆菌污染率比较低,但最终仍不能获得抗性芽,原因是外植体上附着的菌体较少而降低农杆菌的侵入;随着浸染时间的延长,获得的抗性芽再生率不断提高,当外植体在浸染 8 min 时抗性芽再生率最高,达到 8.75%(图 3);浸染时间 11 min,矮牵牛叶片伤口变褐、腐化,最终由于农杆菌生长过于旺盛,选择培养基难以抑制其生长而使叶片全部污染,完全不能转化。

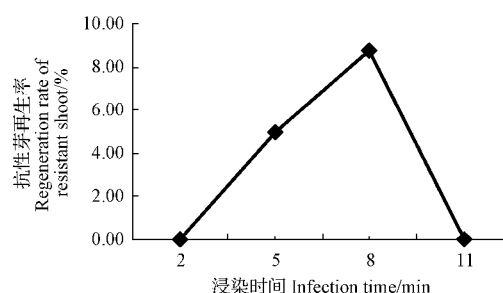


图 3 浸染时间对矮牵牛遗传转化的影响

Fig. 3 Effect of infection time on genetic transformation of *Petunia hybrida*

2.4 共培养时间对矮牵牛遗传转化的影响

共培养是整个转化过程中非常关键的一环^[11]。由图 4 可知,SAG₁₂启动子获得的抗性芽再生率随共培养时间的延长呈先上升、后下降趋势,共培养 4 d 抗性芽再生率最高,达到 8.75%。共培养时间 6 d,叶片在共培养及筛选培养中都极易发生农杆菌感染且褐化、枯萎,没有获得抗性芽。此外发现,共培养之后外植体的生长能

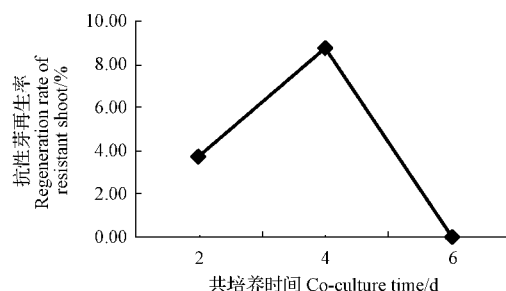


图 4 共培养时间对矮牵牛遗传转化的影响

Fig. 4 Effect of co-culture time on genetic transformation of *Petunia hybrida*

力变弱,直接筛选易引起外植体死亡。因此,该试验共培养后将外植体接入不含筛选剂(Kan)的培养基上延迟培养 5 d,获得了良好的效果。

2.5 乙酰丁香酮(AS)对矮牵牛遗传转化的影响

为了研究 AS 对矮牵牛遗传转化的影响,在浸染菌液中附加不同浓度 AS。从图 5 可以看出,在矮牵牛遗传转化中 AS 是必不可少的。在不加 AS 的条件下,没有获得抗性芽;随着 AS 浓度的增加,SAG₁₂ 启动子获得的抗性芽再生率不断提高;当 AS 浓度达到 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,获得的抗性芽再生率最高,达到 12.5%;但是过高浓度的 AS(300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 获得的抗性芽再生率反而降低。

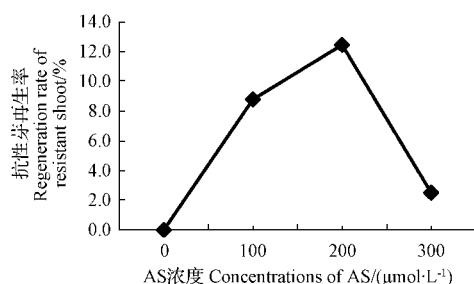


图 5 乙酰丁香酮(AS)浓度对矮牵牛遗传转化的影响

Fig. 5 Effect of concentration of acetosyringone (AS) on genetic transformation of *Petunia hybrida*

2.6 延迟筛选对矮牵牛遗传转化的影响

延迟筛选有利于外源基因的整合、表达以及表达量的积累。从图 6 可以看出,随着培养时间的延长,抗性

芽再生率也升高,当延迟培养时间为 5 d 时,得到的抗性芽再生率最高,达到 11.25%。继续延迟选择时间,叶盘就更容易因农杆菌过度生长受毒害而褐化、死亡,而且假阳性抗性芽的相对几率也提高,故必须通过抗性芽在选择压下生根才能获得真正的抗性苗。

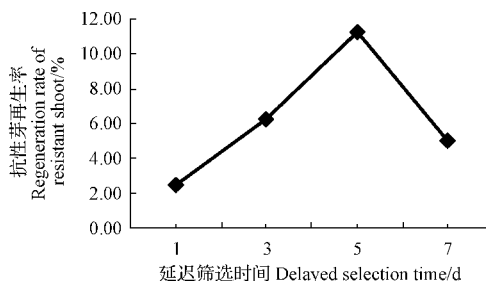
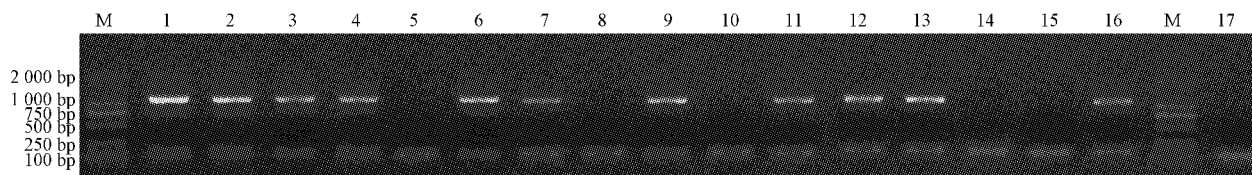


图 6 延迟筛选时间对矮牵牛遗传转化的影响

Fig. 6 Effect of delayed selection on genetic transformation of *Petunia hybrida*

2.7 基于 ACDS 基因的 PCR 检测

经过 120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ G418 的持续筛选,在同一优化条件下,共进行 24 批次(11 批 CaMV35S、8 批 SAG₁₂、5 批 CHSA),获得矮牵牛抗性植株 273 株,其中,CaMV35S 启动子植株 95 株,SAG₁₂ 启动子 46 株,CHSA 启动子 132 株。对抗性植株进行 PCR 扩增鉴定,对照植株和假阳性植株无任何扩增条带,而转化植株可扩增出约 1 017 bp 左右的 DNA 条带(图 7),与 ACDS 基因大小相符,初步表明 ACDS 基因已整合到矮牵牛基因组中。



注:1. 质粒 pACDS(阳性对照);2~4,6. 转化植株(CHSA 启动子);7,9,11,12. 转化植株(SAG₁₂ 启动子);13,16. 转化植株(35S 启动子);5,8,10,14,15. 转化植株(阴性);M. DL 2 000 DNA Marker;17. 非转化植株(阴性对照)。

Note: 1. Plasmid pACDS (positive control); 2~4, 6 transformed plants (CHSA promoter); 7, 9, 11, 12, transformed plants (SAG₁₂ promoter); 13, 16, transformed plants (35S promoter); 5, 8, 10, 14, 15, transformed plants (negative); M. DL 2 000 DNA Marker; 17. Non-transformed plants (negative control).

图 7 转基因矮牵牛植株的 PCR 检测

Fig. 7 PCR detection of transgenic *Petunia* plants

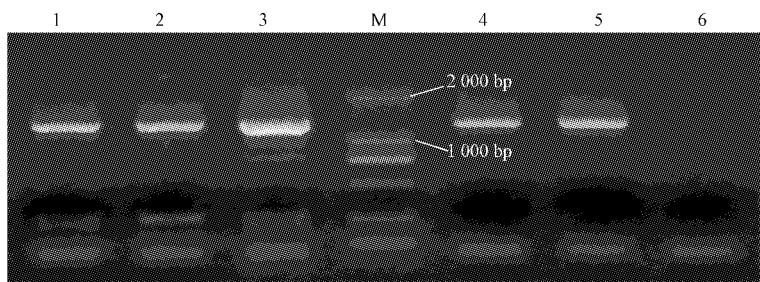
2.8 基于不同启动子与 ACDS 基因的 PCR 检测

经上述 PCR 检测,初步证明 ACDS 基因已成功地转入矮牵牛中。为了进一步从分子水平上证明其可靠性,分别采用 CaMV35S 启动子、SAG₁₂ 启动子及 CHSA 启动子的上游引物与 ACDS 基因的下游引物对转化植株总 DNA 进行 PCR 扩增,其中以 CaMV35S 为启动子的转基因植株扩增出一条约 1.55 kb 特异条带,与 CaMV35S+ACDS 基因片段大小相符(图 8);以 SAG₁₂ 为启动子的转基因植株扩增出一条约 3.09 kb 特异条

带,与 SAG₁₂ + ACDS 基因片段大小相符(图 9);以 CHSA 为启动子的转基因植株扩增出一条约 1.53 kb 特异条带,与 CHSA+ACDS 基因片段大小相符(图 10);对照植株未出现特异条带。进一步证实 3 种启动子均与 ACDS 基因一起转入矮牵牛中。

2.9 转基因矮牵牛植株的生长速率

观察发现,转基因矮牵牛植株生根的时间均迟于对照植株 5~7 d。由表 3 可知,CHSA 启动子驱动的 ACDS 基因转化矮牵牛植株的生长速率,与对照株相比

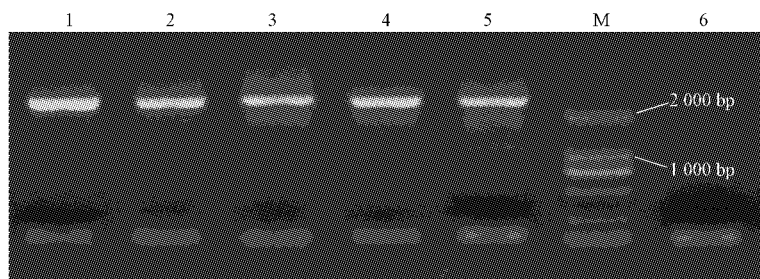


注:1,2,4,5. 转化植株(阳性);3. 质粒 pACDS (阳性对照);6. 非转化植株(阴性对照);M. DL 2 000 DNA Marker。

Note:1,2,4,5. Transformed plants (positive);3. Plasmid pACDS (positive control);6. Non-transformed plants (negative control);M. DL 2 000 DNA Marker.

图 8 35S 启动子驱动的 ACDS 基因抗性植株 PCR 检测

Fig. 8 PCR detection of ACDS gene driven by 35S promoter from antibiotic resistant plants

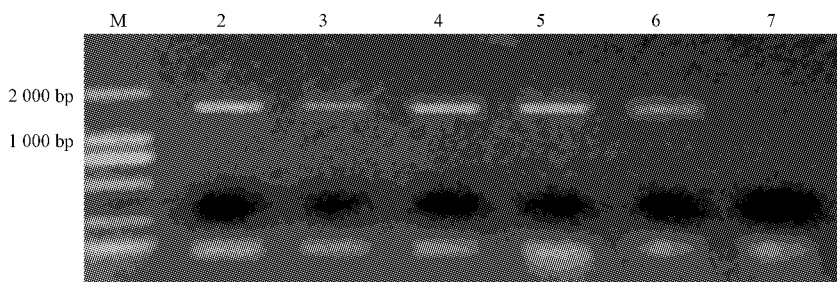


注:1. 质粒 pACDS(阳性对照);2~5. 转化植株(阳性);6. 非转化植株(阴性对照);M. DL 2 000 DNA Marker。

Note:1. Plasmid pACDS (positive control);2~5. Transformed plants (positive);6. Non-transformed plants (Negative control);M. DL 2 000 DNA Marker.

图 9 SAG₁₂ 启动子驱动的 ACDS 基因抗性植株 PCR 检测

Fig. 9 PCR detection of ACDS gene driven by SAG₁₂ promoter from resistant plants



注:2. 质粒 pACDS(阳性对照);3~5. 转化植株(阳性);7. 非转化植株(阴性对照);M. DL 2 000 DNA Marker。

Note:2. Plasmid pACDS (positive control);3~5. Transformed plants (positive);7. Non-transformed plants (Negative control);M. DL 2 000 DNA Marker.

图 10 CHSA 启动子驱动的 ACDS 基因抗性植株 PCR 检测

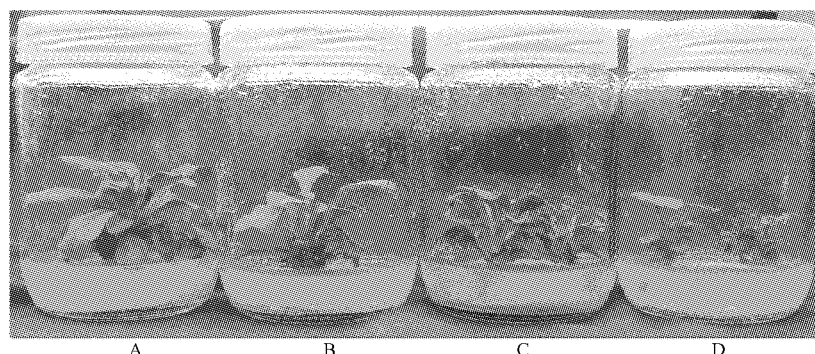
Fig. 10 PCR detection of ACDS gene driven by CHSA promoter from resistant plants

未见明显的差别,但不同启动子的转基因矮牵牛植株之间在生长速率上存在明显差异(图 11),其中以 CHSA 启动子的转化植株生长最快,10、20、30 d 的平均高度分别达到 2.8、4.1、5.1 cm;SAG₁₂ 启动子的转化植株次之,35S 启动子获得的转化植株生长速率最慢,10、20、30 d 的平均高度分别仅为 2.7、3.4、3.9 cm。CHSA 启动子的转化矮牵牛植株生长较为健壮,而 35S 启动子的转化植株有些出现叶片较小、褶皱、颜色发黄、根生长缓慢等现象。

表 3 不同启动子驱动的 ACDS 转基因矮牵牛植株的株高比较

Table 3 Comparison of growth rate of transgenic *Petunia* plants with ACDS driven by different promoters cm

植株类型 Plant type	培养时间 Cultivation days/d			
	0	10	20	30
对照植株 Control plants	2.3	2.9	4.4	5.5
35S 转化植株 35S transformed plants	2.5	2.7	3.4	3.9
SAG ₁₂ 转化植株 SAG ₁₂ transformed plants	2.5	2.8	3.6	4.6
CHSA 转化植株 CHSA transformed plants	2.4	2.8	4.1	5.1



注: A. 对照植株; B. CHSA 转化植株; C. SAG₁₂ 转化植株; D. 35S 转化植株。

Note: A. Control plants; B. CHSA transformed plants; C. SAG₁₂ transformed plants; D. 35S transformed plants.

图 11 不同启动子驱动的 ACDS 转基因矮牵牛植株的生长速率比较 (30 d)

Fig. 11 Comparison of the growth rate of transgenic *Petunia* plants with ACDS driven by different promoters (30 days)

3 讨论

3.1 影响矮牵牛遗传转化效率的因素

遗传转化体系的建立是基因转化获得新种质的关键和基础,农杆菌菌液浓度和浸染时间直接影响转化频率。菌液浓度过高或浸染时间过长,常会导致外植体受毒害而褐化死亡;而菌液浓度过低或浸染时间过短,则不能让足够的农杆菌附着于外植体切口处,致使转化频率降低,这与刘南南等^[12]的研究结果一致。试验发现矮牵牛叶片比较脆弱,不适条件的处理会极大地降低其再生频率,因此建立适宜的根瘤农杆菌浸染方法是成功转化的前提。

许多研究表明,农杆菌 Ti 质粒上 *vir* 基因的表达直接调控着 T-DNA 区的加工、转移及整合进植物基因组,是农杆菌基因转化的开关^[13]。植物受伤细胞分泌的某些酚类化合物(如 AS)使农杆菌质粒上 *vir* 基因活化和表达,从而直接影响到基因的转化效率。在花卉遗传转化中,郑楠等^[14]认为在浸染菌液中附加适量浓度的 AS 对提高萱草转化效率有一定的促进作用,课题组在矮牵牛的遗传转化中也得出相似的试验结果。

此外,李莉等^[15]在用根瘤农杆菌转化矮牵牛中,发现延迟筛选能促进抗性芽的分化、提高外源基因的转化频率,但出现假阳性抗性芽的相对几率也有提高,原因可能是矮牵牛叶片分化较快,非转化细胞进入分化阶段,导致出现较多的假阳性抗性芽,该验中出现类似的情况。因此,课题组采用了 G418 复筛选和 Kan 抗性生根筛选,以进一步减少假阳性植株。

3.2 不同启动子驱动的 ACDS 基因转化矮牵牛的差异

启动子是一段提供 RNA 聚合酶识别和结合的 DNA 序列,它位于基因的上游,是精确调控外源基因在植物体内表达的“开关”。该试验使用的启动子按其作用方式及功能可分为 3 类:组成型启动子如 CaMV35S、组织特异型启动子如花特异表达的 CHSA 和诱导型启动子

如衰老特异表达的 SAG₁₂。试验中分别以 CaMV35S+ACDS 基因、SAG₁₂+ACDS 基因和 CHSA+ACDS 基因转化矮牵牛,在同一优化条件下最终共获得矮牵牛转基因株 61 株。其中 31 株为 CaMV35S 组成型表达;12 株为 SAG₁₂ 衰老特异表达;18 株为 CHSA 花特异表达。结果发现,不同启动子驱动的 ACDS 基因对矮牵牛植株的转化效率存在差异,其中以 CHSA 启动子最高,达到 3%;CaMV35S 启动子次之,为 2.35%;SAG₁₂ 启动子最低,仅为 1.25%,该研究以及前期的转基因烟草研究中发现,组成型启动子(CaMV35S)驱动的 ACDS 基因抑制抗性芽生长及抗性植株生根的现象,而特异型启动子(CHSA)驱动的没有出现抑制现象,并且 CHSA 启动子驱动的 ACDS 基因转化矮牵牛的再生植株 PCR 阳性率高于 CaMV35S 启动子驱动的,这说明 CHSA 启动子具有更高的转化效率。至于不同启动子驱动 ACDS 基因影响转化效率的原因尚待深入研究。

根据来源不同,该研究使用的启动子分为来于宿主之外的外源性启动子(CaMV35S 和 SAG₁₂)和来于宿主自身的内源性启动子(CHSA)。通过比较转基因矮牵牛植株的生长速率发现,携带内源特异性启动子(CHSA)的转基因矮牵牛植株的生长速率明显高于外源组成型启动子(CaMV35S)的转化株。原因可能是花特异表达启动子(CHSA)来源于矮牵牛基因组,仅启动目的基因在花中特异性表达,在幼苗培育阶段是不表达的;而 CaMV35S 启动子来源于花椰菜花叶病毒(CaMV),是组成型表达启动子,在驱动外源基因表达时可能激活了邻近的基因从而影响了矮牵牛自身的生长^[16]。

参考文献

- [1] JOHN C T, ANN M A, GLENN A. The indole alkaloid tryptamine produced in transgenic *Petunia hybrida* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37(9): 665-670.
- [2] MEYER P, HEIDMANN I, FORKMANN G. A new petunia flower color generated by transformation of a mutant with a maize gene [J]. *Nature*, 1987, 333: 677-678.

- [3] 褚云霞,潘俊松,吴爱忠,等.矮牵牛花色基因工程研究进展[J].西北植物学报,2013,33(2):422-428.
- [4] 余勇,葛文东,邹世慧,等.异源表达拟南芥赤霉素 2-氧化酶基因对矮牵牛形态发育的影响[J].园艺学报,2014,41(10):2065-2074.
- [5] HONMA M, SHIMOMURA T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, 42: 1825-1931.
- [6] 王海滨,王平,陈永华. ACC 脱氨酶的作用机理和转基因的应用[J]. 生物技术通报, 2009, 12(4): 40-43.
- [7] KLEE H J, HAYFORD M B, KRETZMER K A. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants[J]. Plant Cell, 1991, 3: 1187-1193.
- [8] 黄海泉,黄美娟,丁小维,等.阴沟肠杆菌 UW4 菌株 ACC 脱氨酶基因的克隆、序列分析及原核表达[J].农业生物技术学报,2006,14(6):952-956.
- [9] 秦智慧,刘艳昆,孙彦.不同启动子驱动下 ACDS 基因转化烟草及耐盐性研究[J].生物技术通报,2010,16(10):120-125.
- [10] 马学军,舒跃龙,颜子颖,等.精编分子生物学实验指南[M].4版.北京:科学出版社,2005:53-58.
- [11] 曹冬梅,康黎芳,李永平,等.安祖花 Arizona 品种遗传转化体系的优化及矮牵牛查尔酮合成酶基因(*PhCHS*)的导入[J].农业生物技术学报,2015,23(3):329-336.
- [12] 刘南南,王宝琴,管宇.根癌农杆菌介导反义 *F3'H* 基因对矮牵牛的遗传转化[J].广东农业科学,2014,39(6):147-149.
- [13] KUMAR S V, RAJAM M V. Polyamines enhance *Agrobacterium tumefaciens* vir gene induction and T-DNA transfer[J]. Plant Science, 2005, 168(2):475-480.
- [14] 郑楠,王霞霞,曹冬梅.农杆菌介导萱草植株 *CHS* 基因的转化[J].中国园艺文摘,2015,12(2):5-11.
- [15] 李莉,祁银燕,解燕,等.矮牵牛编码 *F3'5'H* 的蓝色基因表达载体构建及转化[J].西北植物学报,2011,31(6):1090-1096.
- [16] MIKHAILO K, ZUBKO, ELENA I, et al. Stable transformation of *Petunia* plastids[J]. Transgenic Research, 2004, 13: 523-530.

Transformation Techniques for *Petunia hybrida* With ACC Deaminase Gene Driven by Different Promoters

LI Jianyong^{1,2}

(1. College of Jiasixie Agriculture, Weifang University of Science and Technology, Shouguang, Shandong 262700; 2. Laboratory of Plant Improvement and Utilization, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091)

Abstract: Taking *Petunia hybrida* as material, ACC deaminase gene (ACDS) (driven respectively by promoter CaMV35S, *SAG*₁₂ and *CHS*) was transformed into *Petunia hybrida* leaves, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The effects of the pre-culture time, concentration of *Agrobacterium tumefaciens*, infection time, co-culture time and concentration of AS on transformation were studied. The transformation efficiency of ACDS gene driven by different promoters was compared based on the percentage of transgenic plants and the growth rate of transgenic plants. The results showed that the best transformation efficiency was obtained under the conditions of *Petunia hybrida* leaves pre-culture for 5 days, infection for 8 minutes in *Agrobacterium tumefaciens* liquid of 0.6 OD₆₀₀ value containing 200 μmol · L⁻¹ acetosyringone, and then co-culture for 4 days. ACDS gene driven by *CHS* promoter had the highest transformation efficiency (3%), while ACDS gene driven by *SAG*₁₂ promoter had the lowest transformation efficiency (1.25%). PCR analysis verified that the foreign gene was integrated into the *Petunia hybrida* genome. The obtaining of *Petunia hybrida* transgenic plants set up a technical basis for breeding of anti-aging *Petunia hybrida* varieties via genetic engineering.

Keywords: *Petunia hybrida*; promoter; ACC deaminase gene; genetic transformation

欢迎订阅《北方园艺》

《北方园艺》于 1977 年创刊,是面向国内外公开发行的以科学研究和技术普及相结合的园艺类综合性学术期刊。

主要栏目: 试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、新品种选育、资源与环境、产业论坛、专题综述、经验交流、农业经纬,内容涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉等研究领域的新成果、新技术、新品种、新经验。

取得成绩: 连续 7 次入选全国中文核心期刊、中国农业核心期刊、美国化学文摘社收录期刊;全国优秀农业期刊、中国北方优秀期刊、黑龙江省优秀期刊;2 次入选“农家书屋”推荐目录;2015、2016 年获“期刊数字影响力 100 强”称号。

刊物信息: 国内外公开发行,半月刊,每月 15、30 日出版,每册定价 15.00 元,全年 360.00 元。中国标准连续出版物号:CN23-1247/S;国际标准连续出版物号:ISSN 1001-0009,邮发代号 14-150,国外代号:BM 5011。

网址: www.haasep.cn. **电话:** 0451-86674276 **邮箱:** bfybjb@163.com

地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部