

农杆菌介导的 *ACO* 基因 RNAi 载体 转化百合抗衰老研究

李小玲¹, 刘雅莉², 华智锐¹

(1. 商洛学院生物医药工程系, 陕西 商洛 726000; 2. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 本研究旨在通过根癌农杆菌介导法将 *ACO* 基因转入亚洲百合植株中, 为植物抗衰老提供理论依据和技术基础。以亚洲百合‘精粹’无菌苗离体小鳞片为外植体, 利用农杆菌介导法将携带有抗衰老基因 *ACO* 的 RNAi 载体转化到百合中, 观测分析影响百合遗传转化的因素。结果表明: 在遗传转化过程中, 预培养 3 d 后, 在菌液和共培养基中均添加 25 mg/L 乙酰丁香酮, 将 $OD_{600} = 0.8$ 的根癌农杆菌侵染小鳞片 8 min, 再共培养 3 d, 有利于获得最高遗传转化效率, 抗性植株经 PCR 检测部分呈现阳性, 初步证明 *ACO* 基因已经导入到百合基因组中。

关键词: 农杆菌介导; *ACO* 基因; RNAi 表达载体; 抗衰老; 百合

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2012)02-0088-05

利用基因工程技术延迟植物衰老、提高植物产量的研究已在水稻、烟草、番茄、油菜、菊花、香石竹、非洲菊、月季、百合等植物中获得成功^[1]。目前, 对于百合遗传转化的研究, 国内外均有成功的转化报道。Cohen 等^[2]证实了百合可被农杆菌某些株系感染, 是农杆菌潜在寄主之一。Hoshi 等^[3]利用携带双元载体农杆菌 EHA101 \ PIG121Hm 转化百合花丝诱导的愈伤组织得到转化植株, 并通过了 GUS 组织化学检测和反义 PCR 检测。近年来, 国内在百合遗传转化的研究中也取得了一定的进展, 唐东芹等^[4]以百合花丝诱导的胚性愈伤组织为受体, 利用根癌农杆菌介导法将 *pBIXPTA* 基因导入百合, 经组织化学法和 PCR 分子检测获得部分转基因植株。徐碧玉等^[5]利用农杆菌介导法对铁炮百合进行了遗传转化, 通过 PCR 扩增和 Southern 杂交手段证实获得了转基因植株。王爱菊等^[6]通过根癌农杆菌介导的遗传转化方法, 建立了凝望星空百合 (*Lilium* ‘*Star Gaz-er*’) 愈伤组织和西伯利亚百合 (*Lilium* ‘*Siberia*’) 叶片的遗传转化体系。陈莉等^[7]以麝香百合 (‘*white elegance*’) 叶片为外植体, 通过根癌农杆菌介导法, 将外源 *MnSOD* 基因转入麝香百合, 获得 PCR 阳性植株。张建鑫等^[8]以东方百合‘索邦’ (*Lilium oriental* ‘*Sorbonne*’) 无菌苗鳞茎、鳞片叶及愈伤组织为外植体, 通过 EHA105 和 GV3101 两种根癌农杆菌菌株介导, 将 *ACO* 反义基因导入东方百合“索邦”。师守国等^[9]以兰州百合试管苗鳞片叶为受体, 通过基因枪

转化法将脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 基因转入兰州百合, 并通过 GUS 染色、PCR 扩增和 Southern 杂交等技术手段证明获得了转基因植株。

目前对百合遗传转化的研究主要集中在麝香百合和东方百合等其他杂种系上, 而对亚洲百合遗传转化的研究报道较少, 且迄今为止采用 RNAi 载体转化百合并建立遗传转化体系的报道不多^[10]。本实验室已成功地从百合基因组中克隆到抗衰老的 ACC 氧化酶 (*ACO*) 基因, 并构建成 RNAi 植物表达载体。本研究旨在通过根癌农杆菌介导法将 *ACO* 基因转入亚洲百合植株中, 为培育百合抗衰老品种提供理论依据和技术基础。

1 材 料

1.1 植物材料

选用亚洲百合‘精粹’无菌苗离体小鳞片作为基因转化的受体材料。

1.2 菌株和质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105, 由美国农业部西弗吉尼亚州 Appalachian 果树实验站刘宗让博士惠赠, 转化所用 RNAi 植物表达载体由本实验室徐伟荣博士构建, 该载体插入了克隆自百合体内的 *ACO* 基因片段。启动子为 CaMV35S, 驱动卡那霉素 (Km) 的 *NPT II* 选择标记基因, 植物干扰表达载体图谱如图 1。

收稿日期: 2011-07-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371013); 陕西省科技厅项目 (2009K01-11)

作者简介: 李小玲, 女, 硕士, 讲师, 主要从事观赏植物生物技术研究。E-mail: lxlflower@163.com。

通讯作者: 刘雅莉, 女, 副教授, 主要从事鲜切花采后生理和生物技术研究。

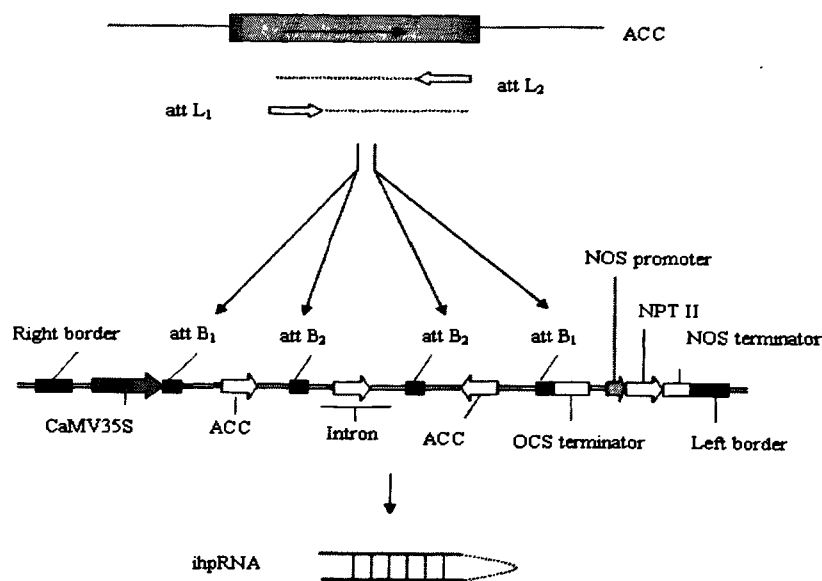


图1 RNAi 载体构建及 ihpRNA 形成示意图

Fig.1 Schematic diagram of RNAi vector and ihpRNA

1.3 主要试剂

激素、抗生素、工具酶等购自西安沃尔森生物工程公司,用于 PCR 检测的引物由上海生物工程有限公司合成。

2 方法

2.1 根癌农杆菌的活化与培养

1) 用接种环挑取少许菌液,在附加有 Kan 50 mg/L、链霉素 25 mg/L、利福平 50 mg/L 的固体 LB 培养基平板上划线,用封口膜封口后将平板倒置于 28℃ 恒温培养箱中,培养 2 d 后便可看到有单菌落长出,将长出单菌落的平板放置于 4℃ 冰箱内保存。

2) 从平板上挑取单菌落,接种到 20 mL 附加 Kan 50 mg/L、链霉素 25 mg/L、利福平 50 mg/L 的液体 LB 培养基中。在恒温摇床上,28℃ 200 rpm 振荡培养过夜。

3) 24 h 左右,当农杆菌处于旺盛生长对数期时,离心回收菌体,用 MS 液体培养基重悬至 OD₆₀₀ 为 0.8 (含 25 mg/L AS) 备用。

2.2 农杆菌介导的遗传转化

将无菌苗离体小鳞片,预培养 3~7 d。用浓度为 OD₆₀₀ = 0.8 的根癌农杆菌 EHA105 菌液侵染预培养后的外植体,以未侵染的外植体做对照。侵染时间为 6~15 min。侵染后,用无菌滤纸将外植体周围的菌液吸干,转接到分化培养基上,黑暗条件下共培养 3 d。然后,将共培养的小鳞片转接到添加有 115 mg/L 的 kan (kanamycin) 和 300 mg/L Cb 的筛选培养基;筛选培养 30 d 后,小鳞片的转化细胞即可分化

出抗性不定芽,抗性芽因其体内含有 *Npt II* 抗性基因,因此,能在含有卡那霉素的培养基上生长,而未转化的细胞则会逐渐死亡。将这些抗性材料转入不含 Cb 抑菌抗生素的继代培养基上继续选择培养。当抗性植株长至 1.5 cm 左右时,转入添加有相同 kan 浓度的 MS 生根培养基上进行生根培养。

2.3 百合遗传转化

1) 预培养。切取无菌苗小鳞片,一部分接种在分化培养基上进行预培养,分别预培养 3、5、7 d 后进行侵染,一部分不经过预培养逐渐进行侵染,统计预培养时间对转化效率的影响。

2) 农杆菌菌液浓度。制备好的菌液用 MS 液体培养基活化培养并使菌液的 OD₆₀₀ 值分别为:0.3、0.6、0.8、1.0,将预培养后的材料在菌液中浸泡 8 min,在此期间,并不时地振荡使菌液与外植体充分接触,然后取出材料用无菌滤纸吸干表面上的菌液,置于共培养基上,培养 3 d。

3) 侵染时间。将预培养 3 d 的材料放入到活化的农杆菌菌液中,其 OD₆₀₀ = 0.8 左右,不时振荡,分别侵染 6、8、10、15 min 后取出外植体,用无菌滤纸吸干多余的菌液,转入共培养基中暗培养 3 d 后,在选择培养 30 d 左右,统计不定芽分化率。

4) 乙酰丁香酮 (AS) 处理方式。处理 I 为菌液中加 AS 而共培养基中不加 AS;处理 II 为菌液中不加 AS 而共培养基中加 AS;处理 III 为菌液和共培养基中均加 AS。AS 处理的浓度均为 25 mg/L。

2.4 转基因植株的 PCR 鉴定

剪取 kan 抗性植株幼嫩叶片,采用改良 CTAB

(cetyl trimethyl ammonium bromide) 方法^[11]提取基因组 DNA 并作为模板。根据载体中的基因序列,设计一对特异引物,上游引物:5′ - CGTAAGGGATGACG-CACAAT - 3′ 和下游引物:5′ - GAGGTTGATAAC-GATGGAGTGATG - 3′,PCR 扩增的目的片断长度为 560 bp。以质粒 DNA 作阳性对照,未转化再生植株的 DNA 作阴性对照,PCR 反应采用 25 μl 体系,转基因百合基因组 DNA(模板) 1 μl,反应缓冲液 10 × Buffer(含 MgCl₂)2.5 μl,2 μl dNTP,两个引物各 1 μl,0.3 μl TaqDNA polymerase,17.2 μl ddH₂O。94℃预变性 10 min,然后 94℃变性 1 min,59℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,循环 34 次后再 72℃总延伸 10 min,最后 4℃保存。取样 8 μl 扩增产物在含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。紫外荧光下观察记录结果,照相。

3 结果与分析

3.1 影响农杆菌介导百合遗传转化效率的因素

3.1.1 预培养时间对百合转化的影响 预培养时间是影响植物基因转化效率的重要因素之一,预培养使植物组织代谢活跃,可以促进细胞分裂,利于 T-DNA 的转移和整合,因而可以提高转化率。在外植体进行转化之前,先将其放在不含卡那霉素的分化培养基上,预培养 0、3、5、7 d,比较他们在分化率上的差异。从表 1 可知,随着预培养时间的延长,小鳞片的分化率呈先升后降趋势,预培养 3 d 分化率达到 25.4% 的峰值,随后开始下降,因此在转化过程中,预培养 3 d 时间最有利于百合转化。

表 1 预培养时间对小鳞片抗性芽分化的影响
Table 1 The effect of different preculture time on inducing kanamycin-resistant buds from *Lilium*

预培养时间 (d) Preculture time	小鳞片 Scales		
	接种数 No. of inoculated explants	分化芽数 No. of explants which formed buds	分化率(%) Differentiation rate
0	68	7	10.3
3	67	15	25.4
5	72	18	25.0
7	70	16	22.9

3.1.2 不同菌液浓度对转化植株再生的影响 适宜的农杆菌菌液浓度在转化中占有很重要的位置,菌液浓度的大小也因不同植物具有差异性,一般认为菌液浓度 OD₆₀₀在 0.5 ~ 1.0 时较易侵染。从表 2 中可知,在不同菌液浓度的几个组合中,以 OD₆₀₀值为 0.8 菌液(AS 25 mg/L)侵染 8 min 的外植体再生

率最高。菌液浓度过低使细菌细胞数量不足导致转化率降低;浓度过高,农杆菌生长过度会导致转化受体死亡,且死菌数目随之增多而造成菌活力不足,也会导致转化效率降低。OD₆₀₀ = 0.8 左右时侵染效果最好,小鳞片分化率达 11.3%。

表 2 农杆菌菌液浓度对小鳞片抗性芽分化的影响
Table 2 The effect of agrobacterial concentration on inducing kanamycin-resistant buds from *Lilium*

菌液浓度 OD 值	小鳞片 Scales		
	接种数 No. of inoculated explants	分化芽数 No. of explants which formed buds	分化率(%) Differentiation rate
0.3	82	4	4.9
0.6	79	5	6.3
0.8	80	9	11.3
1.0	78	6	7.6

3.1.3 乙酰丁香酮(AS)处理对转化植株再生的影响 酚类化合物可以促进农杆菌对植物细胞的附着,也可激活农杆菌质粒上的 *Vir* 基因活化和表达,提高转化率。因此,通过乙酰丁香酮(AS)添加对比实验,证明了 AS 是农杆菌介导单子叶植物遗传转化过程中不可缺少的物质。本试验比较了 3 种不同 AS 处理方式对转化的影响研究,在上述不同菌液浓度比较试验的基础上,用 OD₆₀₀值为 0.8 的菌液,浸染外植体 8 min。结果表明(见表 3),在共培养基和菌液中同时加入 25 mg/L AS,浸染不同外植体得到的抗性芽分化率最高。试验还发现,在菌液中是否加入 AS 处理(Ⅱ和Ⅲ比较)的差别不是很大,而在共培养基中加入 AS(Ⅱ和Ⅲ)与不加 AS(Ⅰ)比较,转化率有所提高,这表明农杆菌与外植体共培养是整个转化过程中非常重要的时期。

表 3 AS 不同处理对小鳞片分化率的影响
Table 3 The effect of different treatments of AS on the differentiation of adventitious buds from the scales of lily

处理方式 Treatment of AS	小鳞片 Scales		
	接种数 No. of inoculated explants	分化芽数 No. of explants which formed buds	分化率(%) Differentiation rate
Ⅰ	82	5	4.9
Ⅱ	78	9	11.5
Ⅲ	85	11	12.9

注:Ⅰ.菌液中加入 AS;Ⅱ.共培养基中加入 AS;Ⅲ.菌液和共培养基中均加入 AS。
Notes: Ⅰ. Active bacterial suspension with AS; Ⅱ. Co-culture medium with AS; Ⅲ. Active bacterial suspension and Co-culture medium with AS.

3.1.4 侵染时间对抗性芽分化的影响 掌握外植体在菌液中的侵染时间,有利于减轻细菌对植物细胞的毒害作用。侵染时间过短,农杆菌未能附着在伤口表面,达不到侵染的目的,侵染时间过长,植物材料常因农杆菌毒害缺氧而软腐。本实验分别采用 6、8、10、15 min 对外植体进行侵染,结果表明(见表 4),侵染 8~10 min 时,不同外植体分化率较高,随着侵染时间的延长抗性芽分化率降低。可能是由于浓度过高使得外植体被繁殖的农杆菌菌丝包裹,从而使外植体褐化死亡。因此,在以后的程序化转化过程中侵染时间采用 8~10 min。

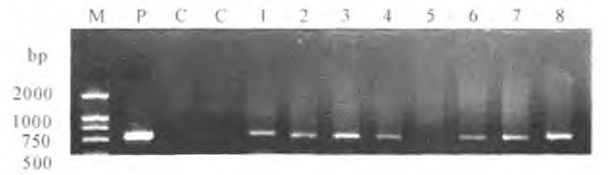
表 4 侵染时间对百合小鳞片抗性芽分化的影响

Table 4 Effect of different inoculation time on inducing kanamycin-resistant buds from *Lilium*

侵染时间 (min) Infection time	小鳞片 Scales		
	接种数 No. of inoculated explants	分化芽数 No. of explants which formed buds	分化率(%) Differentiation rate
6	76	4	5.3
8	81	9	11.1
10	78	9	11.5
15	75	5	6.7

3.2 转化植株的检测

以质粒作阳性对照,以非转基因植株作阴性对照,进行 PCR 扩增,结果表明(图 2),有 7 株特异性扩增出了约 560 bp 的片段,另外 1 株转化植株未扩增任何条带,在 2 个对照的泳道上没有该特征带,初步证明有 7 株 ACO 基因已经整合到百合基因组中。



注: M: DL2000 分子量标记;P: 阳性对照;C: 阴性对照;1~8: 转化植株。

Notes: M: DL2000 marker; P: Positive control; C: Negative control; 1~8: Transgenic plant.

图 2 转基因植株 PCR 检测

Fig.2 PCR assay of transformed plants

4 讨 论

在植物基因工程研究中,目前普遍认为农杆菌介导的遗传转化是较为理想的一种途径,并在许多植物中获得了成功。近年来,利用农杆菌将外源基因导入单子叶植物,在方法上和实际应用效果上都

取得了突破性进展。本试验中,百合鳞茎预培养 3 d,抗性芽分化率达到 25.4% 的峰值,随着预培养时间延长,分化率逐渐下降,且随着时间延长,伤口处愈伤组织形成已启动反而影响农杆菌的浸染,会致使转化率下降。不进行预培养外植体的死亡褐化率高,并且侵染后农杆菌不易去除,这主要是农杆菌侵染后造成外植体伤口褐化,使切割处细胞死亡不能再生成植株所致。综合分析确定预培养时间为 3 d,这与王凯等^[12]研究结果相似。遗传转化过程中,预培养 3 d 后,在菌液和共培养基中均添加 25 mg/L 乙酰丁香酮,将 OD₆₀₀ = 0.8 的根癌农杆菌侵染小鳞片 8 min,再共培养 3 d,有利于获得最高遗传转化效率,与赵欢蕊等^[13]在 MS 重悬液和共培养基中均添加 20 mg/L 乙酰丁香酮,OD₆₀₀ = 0.8 的根癌农杆菌侵染小鳞片 30 min 效果最佳有所区别,这可能是由于百合品种不同导致的差异。

近年来在植物抗衰老基因工程研究中多采用反义基因技术^[8,14-15],但该技术存在区段效应、剂量效应等缺点。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近几年发现和发展起来的一门新兴的转录水平上的基因阻断技术,是一种序列特异性的转录后基因沉默。它可能是生物体的一种进化保守机制,同时也可能成为特异性沉默内源基因和基因功能分析的一个新工具^[16]。

RNAi 具有很高的特异性,能够非常特异地只降解与之序列相应的内源基因的 mRNA。陈银华等^[15]通过农杆菌介导的遗传转化法比较 3 种不同结构的外源 ACO 基因导入番茄对乙烯生成速率的影响,结果表明,3 种载体中,RNAi 对内源 ACO 基因表达抑制作用最明显。此技术曾在花椰菜上取得完全抑制内源表达的转化植株^[17]。

本研究采用亚洲百合“精粹”无菌苗小鳞片为转化受体材料,EHA105 为转化的农杆菌菌株,NPT II 基因为筛选标记基因,百合抗衰老基因 ACC 氧化酶(ACO)为目的基因,将含有 ACO 基因的 RNA 干扰植物表达载体以根癌农杆菌介导的方法导入亚洲百合“精粹”,通过 Kan 抗性筛选,获得 200 株抗性株系,对其中 50 株 Kan 抗性株系进行 PCR 检测,发现 7 株为阳性,初步证明外源 ACO 基因已经整合到百合基因组中,为解决百合等乙烯敏感型花卉采后贮藏及瓶插期间的叶片花朵早衰提供一条有效的育种途径。

参 考 文 献:

[1] 周 音,张智奇,殷丽青,等.观赏植物基因工程研究进展及存

- 在问题[J]. 上海农业学报, 2000, (1): 90-96.
- [2] Cohen A, Meridith C P. Agrobacterium-mediated transformation of lily-um[J]. Acta Hort, 1992, 325: 611-618.
- [3] Hoshi Y, Kondo M, Kobayashi H. Production of transgenic lily plants by Agrobacterium-mediated transformation [J]. Plant Cell Report, 2004, 22: 359-364.
- [4] 唐东芹, 钱虹妹, 唐克轩, 等. 根癌农杆菌介导半夏凝集素基因 pBIXPTA 对百合的转化[J]. 上海交通大学学报, 2004, 22(2): 135-137.
- [5] 徐碧玉, 刘菊华, 金志强. 类黄酮. 3', 5' 羟基化酶基因的克隆及转化铁炮百合[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1051-1055.
- [6] 王爱菊, 张凤美, 鹿金颖, 等. 农杆菌介导的百合遗传转化体系的建立[J]. 园艺学报, 2006, 33(3): 664-666.
- [7] 陈莉, 马颖, 马锋旺, 等. 根癌农杆菌介导麝香百合遗传转化体系的建立[J]. 西北植物学报, 2007, 27(7): 1335-1340.
- [8] 张建鑫, 刘雅莉, 孟芮, 等. 农杆菌介导的百合 *ACO* 反义基因遗传转化的研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(6): 158-163.
- [9] 师守国, 梁东, 王顺才, 等. 兰州百合基因枪转化方法的研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(4): 645-651.
- [10] Langeveld S A, Gerrits M M, Derks F L M, et al. Transformation of lily by agrobacterium[J]. Euphytica, 1995, 85: 1-3, 97-100.
- [11] Tai T H, Tanksley D D. Rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue[J]. Plant Mol Biol Rep, 1990, 8(4): 229-303.
- [12] 王凯, 车代弟, 王金刚, 等. 百合遗传转化体系的建立[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(5): 39-43.
- [13] 赵欢蕊, 刘雅莉, 王跃进, 等. 根癌农杆菌介导 *ACO* 基因对亚洲百合的转化[J]. 中国农学通报, 2010, 26(18): 213-218.
- [14] 余义勋, 包满珠. 反义 *ACO* 基因导入获得瓶插寿命长的香石竹植株[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 633-636.
- [15] 陈银华, 李汉霞, 叶志彪. 不同结构的外源 *ACO* 基因导入番茄对乙烯生成速率的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(3): 644-648.
- [16] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Celegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [17] 陈银华, 张俊红, 欧阳波, 等. 花椰菜 *ACC* 氧化酶基因的克隆及 RNAi 对内源基因表达的抑制作用[J]. 遗传学报, 2005, 32(7): 764-769.

Agrobacterium-mediated transformation of RNAi vector with *ACO* gene on anti-aging of lily

LI Xiao-ling¹, LIU Ya-li², HUA Zhi-rui¹

(1. Department of Biomedical Engineering, Shangluo University, Shangluo, Shaanxi 726000, China;

2. College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: With the scale of asiatic lily as explants, the RNAi vector with *ACO* anti-aging gene was transferred into lily with Agrobacterium-mediated transformation to study the factors which affected the transformation and to provide theoretical and technical basis for anti-aging of plants. The results showed that the highest transformation efficiency was obtained through the following transformation procedure: after preculture for 3 d, 25 mg/L acetosyringone (AS) was added to Agrobacterium and co-cultivation medium respectively, the explants were inoculated for 8 min with diluted OD₆₀₀ = 0.8 recombinant Agrobacterium tumefaciens culture liquid, and then co-cultivated for 3 d. PCR detection showed that some resistant plants were positive, which indicated preliminarily that the *ACO* gene was integrated into the genome of transgenic plants.

Keywords: Agrobacterium-mediated; *ACO* gene; RNAi expression vector; anti-aging; lily