

# 农杆菌介导的 *ACO* 反义基因对铁皮石斛的遗传转化

武荣花<sup>1</sup>, 康莹莹<sup>1</sup>, 王洁琼<sup>2</sup>, 刘佳<sup>2</sup>, 崔波<sup>2,3</sup>, 蒋素华<sup>3</sup>, 张开明<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学 林学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 生命科学院, 河南 郑州 450002;

3. 郑州师范学院 生物工程研究所, 河南 郑州 450044)

**摘要:**以铁皮石斛原球茎为受体,用农杆菌介导 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(*ACO*)的反义基因对铁皮石斛进行遗传转化,并对影响转化的几个因素进行优化,结果表明:经刀切法处理的原球茎,在 AS 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$ 、农杆菌菌液 OD<sub>600</sub> 值为 0.8 的条件下侵染 30 min,共培养 60 h,接种到含有 30 mg/L Mer 和 3.0 mg/L PPT 的筛选培养基中,遗传转化效率最高。筛选获得的抗性植株经 GUS 组织化学染色和 PCR 鉴定,初步证明 *ACO* 反义基因已整合到铁皮石斛的基因组中。

**关键词:**铁皮石斛; ACC 氧化酶; 遗传转化; 根癌农杆菌

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)02-0017-05

doi: 10.7668/hbxb.2015.02.004

## Genetic Transformation of *ACO* Antisense Gene into *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. by *Agrobacterium* Mediation

WU Rong-hua<sup>1</sup>, KANG Ying-ying<sup>1</sup>, WANG Jie-qiong<sup>2</sup>, LIU Jia<sup>2</sup>,

CUI Bo<sup>2,3</sup>, JIANG Su-hua<sup>3</sup>, ZHANG Kai-ming<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 3. Institute of Biotechnology, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China)

**Abstract:** The *ACO* antisense gene was transformed into the protocorms of *Dendrobium officinale* by *Agrobacterium* mediation. To optimize the transformation efficiency, several related factors were studied in this paper. The results showed that, after infected for 30 min at 100  $\mu\text{mol/L}$  of AS, 0.8 of OD<sub>600</sub> and 60 h of incubation in darkness, the cut protocorms gained the highest transformation rate in the medium of 30 mg/L Mer and 3.0 mg/L PPT. The selected plants were tested by PCR and GUS histochemical staining, indicating that the *ACO* antisense gene had been successfully integrated into *D. officinale*.

**Key words:** *Dendrobium officinale*; ACC oxidase; Genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo.)是兰科石斛属多年的草本植物,又称黑节草,为我国传统的名贵药材,具有很高的药用价值。铁皮石斛植物体内含有大量诸如多糖、生物碱等有利于人类健康的药用成分,多以新鲜或干燥的茎秆入药。因此,茎秆的生长质量成为鉴定铁皮石斛品质的关键。人工栽培的铁皮石斛开花繁盛,植株空耗的养分大,有检测表明,铁皮石斛开花后茎秆多糖含

量比开花前明显降低<sup>[1]</sup>。因此,抑制其早期开花,促进植物茎生长,对减少养分消耗、提高药材品质和产量具有重要意义。然而,减少其乙烯生物合成是抑制开花,促进植物营养生长,提高铁皮石斛茎品质的主要途径。

1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(*ACO*)基因是控制乙烯在植物体内合成的关键性酶,通过调节它的表达能有效地调控乙烯的生成量<sup>[2]</sup>。利用反转义

收稿日期: 2015-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101562); 河南省高等学校重点科研项目(15A220006)

作者简介: 武荣花(1964-),女,河南叶县人,副教授,博士,主要从事花卉栽培生理研究。

通讯作者: 张开明(1978-),女,河南郑州人,副教授,博士,主要从事园林植物与观赏园艺研究。

技术将 ACC 氧化酶基因反向导入植物细胞内,可以抑制 ACC 氧化酶基因的表达,减少植物体内乙烯的合成,从而调控植物的生长发育过程。目前,已有通过反义技术将 ACO 成功转化到植物中的报道。Savin 等<sup>[3]</sup>和 Bovy 等<sup>[4]</sup>把反义 ACO 和 ACS 基因成功转入康乃馨中,有效抑制了乙烯的释放,延缓了花瓣衰老。熊爱生等<sup>[5]</sup>将 ACC 氧化酶的反义 RNA 导入番茄,获得延熟的转基因番茄。但尚未见到 ACC 氧化酶反义基因转化铁皮石斛以及对其生长发育影响的报道。鉴于此,以乙烯生成过程中的关键酶 ACC 氧化酶的反义基因为目的基因,通过农杆菌介导法对铁皮石斛进行遗传转化,并对影响遗传转化的几个因素进行优化,对研究铁皮石斛的分子育种和提高其药材品质具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 材料与试剂 铁皮石斛的原球茎由郑州师范学院生物工程研究所提供;草甘膦(PPT)、美罗培南(Mer)、乙酰丁香酮(AS)、卡那霉素(Kana)、利福平(Rif)试剂均由北京索莱宝科技有限公司供应。

1.1.2 菌种与质粒 菌株:EHA105;质粒:pCAM-BIA3301-RTACO。

### 1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌菌液的活化 将带有 pCAM-BIA3301-RTACO 的农杆菌菌株 EHA105 的单菌落接种到 1 mL YEB 液体培养基(pH 值 7.0)中,YEB 中加入 100 mg/L Kana 和 50 mg/L Rif。放摇床上过夜培养,摇床设置 28 ℃,240 r/min,第 2 天将菌液按 1% 的比例转入 50 mL YEB 液体培养基中,其中加入抗生素,培养 16 h,测其  $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ ,4 ℃、5 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,然后用 1/2 MS 液体培养基重悬沉淀,28 ℃下摇床 75 r/min 横摇 1 h 活化菌液,用来侵染外植体。

1.2.2 原球茎的预培养 将长势整齐的铁皮石斛原球茎转接到继代培养基(1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + 椰汁 20 g/L,pH 值 5.8)中,置于 25 ℃暗培养箱中培养 2~3 d。作为被侵染植物备用。

1.2.3 原球茎对 PPT 的敏感性试验 将铁皮石斛的原球茎接入含 PPT 0.5,1.0,2.0,3.0 mg/L 的培养基(1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + 椰汁 20 g/L,pH 值 5.8)中,观察原球茎对 PPT 的敏感程度,60 d 统计其死亡的数目,计算死亡率。

1.2.4 外植体的侵染 挑选生长良好的预培养原

球茎,在超净工作台上,分别采用针刺法、刀切法和搥压法使原球茎产生伤口,然后放入菌液中侵染,菌液浓度即  $OD_{600}$  值分别为 0.6,0.8,1.0,1.2,菌液中分别加入浓度为 0,100,200,300  $\mu\text{mol/L}$  的 AS,侵染 30 min 后倒掉菌液,并用无菌滤纸吸干原球茎上残余的菌液,随即转接到 1/2 MS 固体培养基 28 ℃下共培养 24,36,48,60,72 h。

共培养后无菌水冲洗原球茎,将附着于表面的菌丝冲洗干净,再用 25 mg/L Mer 冲洗 3 次,其间不断振荡,保证黏附于原球茎上的农杆菌处理干净,50 mg/L Mer 浸泡 30 min 后用无菌纸将原球茎上多余的水分吸干,接入继代培养基,25 ℃光照培养,定时观察生长情况并记录。

1.2.5 转基因植株的再生与检测 将侵染过的原球茎接入含 Mer 分别为 20,30,50 mg/L,PPT 为 3.0 mg/L 的继代培养基上,25 ℃光照培养,观察 Mer 对农杆菌侵染原球茎的影响。取抗性植株和未转化植株分别依次进行 GUS 检测和 PCR 检测,PCR 引物为 F:5'-GGTCACTCATTACGGCAAAGT-3';R:5'-ACTCCACATCACCACGCTT-3',扩增产物总长为 989 bp。观察记录 GUS 染色结果和扩增条带大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同质量浓度 PPT 对铁皮石斛原球茎死亡率的影响

由表 1 可见,在含 0.5 mg/L PPT 的培养基上,原球茎生长正常,在含 1.0 mg/L PPT 的培养基上,外植体的生长开始受到抑制,并逐渐褐化死亡。当 PPT 为 3.0 mg/L 时,原球茎全部死亡。因此,3.0 mg/L PPT 可作为区分转化与未转化铁皮石斛原球茎的有效筛选压。

表 1 不同 PPT 浓度对铁皮石斛原球茎死亡率的影响

Tab.1 Effect of PPT concentration on the death rate of *D. officinale* protocorms

PPT 质量浓度 /(mg/L) Concentration of PPT	原球茎总数 Total No. of protocorms	原球茎死亡数 No. of dead protocorms	死亡率/% Death rate
0.5	79	0	0
1.0	74	32	43.24
2.0	70	66	94.29
3.0	73	73	100.00

### 2.2 不同处理方法对铁皮石斛原球茎存活率的影响

不同处理方法对原球茎存活率的影响如表 2 所示,刀切法处理下的原球茎存活率最高,达 86.54%,有利于提高铁皮石斛的转化率。

表 2 不同处理方法对铁皮石斛原球茎存活率的影响

Tab.2 Effects of treatment methods on the survival of *D. officinale* protocorms

原球茎处理方法 Processing method of protocorms	原球茎总数 Total No. of protocorms	原球茎存活数 No. of survival protocorms	原球茎存活率/% Survival rate of protocorms
摺压 Press	62	33	53.23
针刺 Acupuncture	63	28	44.44
刀切 Jackknife	52	45	86.54

2.3 不同浓度菌液对 GUS 瞬时表达率的影响

合适的农杆菌菌液浓度是影响遗传转化成功的重要因素。由图 1 可见,当农杆菌菌液 OD<sub>600</sub> 值为 0.8 时,GUS 瞬时表达率达到最高。之后,随着菌液浓度的升高,转化率降低,当农杆菌菌液 OD<sub>600</sub> 值为 1.0,1.2 时,GUS 瞬时表达率明显低于 OD<sub>600</sub> = 0.8 的瞬时表达率。由此可见,农杆菌菌液浓度过高或过低都不利于 GUS 瞬时表达。

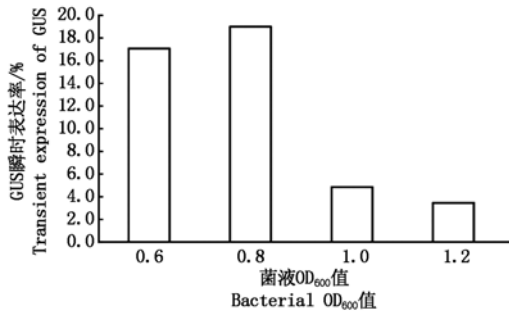


图 1 不同浓度菌液对 GUS 瞬时表达率的影响

Fig.1 Effects of bacterial concentration on transient expression of GUS

2.4 不同浓度 AS 对 GUS 瞬时表达率的影响

AS 常被加到农杆菌的侵染液或共培养培养基中,用来诱导 Vir 基因的表达,促进 T-DNA 转移到植物细胞<sup>[6]</sup>。由表 3 可见,在不添加 AS 的情况下,GUS 瞬时表达率只有 15.38%,当添加浓度为 100 μmol/L 时效果最佳,GUS 瞬时表达率为 32.50%,之后随着 AS 浓度的增加,GUS 瞬时表达率反而下降,这说明在一定范围内随着 AS 浓度的增加,GUS 瞬时表达率提高,过高浓度的 AS 则不利于外植体转化。

表 3 不同浓度 AS 对 GUS 瞬时表达率的影响

Tab.3 Effect of different concentration of AS on the transient expression of GUS

AS 浓度 /(μmol/L) Concentration of AS	蓝斑数 No. of Locus coeruleus	原球茎总数 Total No. of protocorms	GUS 瞬时 表达率/% Transient expression of GUS
0	4	26	15.38
100	13	40	32.50
200	8	33	24.24
300	7	36	19.44

2.5 不同共培养时间对 GUS 瞬时表达率的影响

由图 2 可见,共培养时间为 24 ~ 60 h 时,随着时间的延长,GUS 瞬时表达率逐渐升高,60 h 达到最高,72 h GUS 瞬时表达率迅速下降,因此,本试验转化共培养时间以 60 h 最合适。

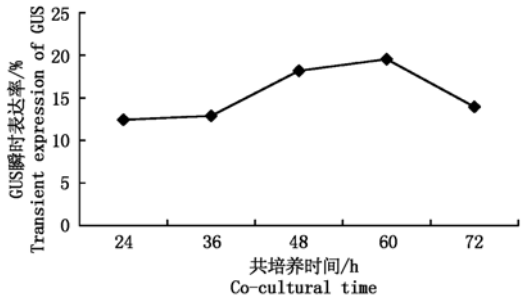


图 2 不同共培养时间对 GUS 瞬时表达率的影响

Fig.2 Effect of co-cultural time on the transient expression of GUS

2.6 不同质量浓度 Mer 对铁皮石斛原球茎存活率的影响

Mer 对农杆菌具有明显的抑制作用。由表 4 可见,Mer 质量浓度为 30 mg/L 时,侵染后的原球茎存活率高达 94.34%;Mer 为 50 mg/L 时,虽然原球茎存活率达到 100%,但高浓度的 Mer 能降低外植体的分化率,抑制原球茎的再生<sup>[7]</sup>。因此,选择 30 mg/L 的 Mer 溶液作为农杆菌的抑菌剂。

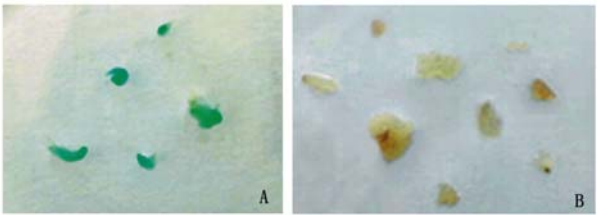
表 4 不同质量浓度 Mer 对铁皮石斛原球茎存活率的影响

Tab.4 Effect of Mer on the survival of *D. officinale* protocorms

Mer 质量浓度 /(mg/L) Concentration of Mer	原球茎 总数 Total No. of protocorms	原球茎 存活数 No. of survival protocorms	原球茎 存活率/% Survival rate of protocorms
20	46	12	26.09
30	53	50	94.34
50	50	50	100.00

2.7 抗性植株的检测

2.7.1 GUS 活性检测 经农杆菌侵染过的铁皮石斛原球茎在共培养 60 d 后,挑选部分原球茎进行 GUS 染色。结果如图 3 所示,抗性植株的原球茎被



A. 抗性植株;B. 对照植株。

A. Resistant plant;B. Control plant.

图 3 铁皮石斛原球茎的 GUS 组织化学染色结果

Fig.3 GUS histochemical staining of *D. officinale* protocorms

染成蓝色(图 3-A),而未转化的对照植株未出现蓝色(图 3-B)。初步证明农杆菌介导的 *ACO* 反义基因转化铁皮石斛成功。

**2.7.2 PCR 检测** 从抗性植株中随机选取 5 株,提取其基因组 DNA(图 4)进行 PCR 鉴定,PCR 电泳图显示(图 5),有 2 株扩增出了约 989 bp 的特异性片段,与质粒 DNA 扩增出相同的片段,初步表明目的基因已转入这 2 株铁皮石斛植物体内。

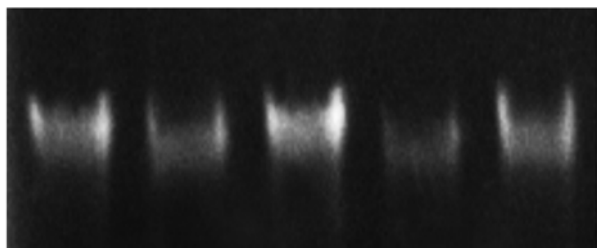
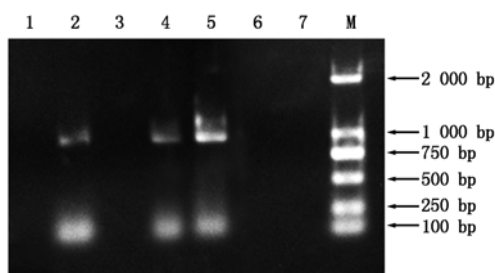


图 4 抗性植株的基因组 DNA

Fig. 4 Total DNA extraction of resistant plant



1. 未转化植株;2. pCAMBIA3301-RTACO 质粒;  
3~7. 转化植株;M. Marker DL2000。

1. Untransformed plant;2. pCAMBIA3301-RTACO  
plasmid;3~7. Transformed plant;M. Marker DL2000.

图 5 铁皮石斛转基因植株的 *GUS* 基因检测

Fig. 5 PCR analysis of transgenic *D. officinale* for the *GUS*

### 3 讨论

外植体在适宜的处理方式(刀切、摁压、针刺等)下,产生伤口并且分泌酚类物质,而适量的酚类物质有利于转化。不同处理方式下,原球茎分泌酚类物质的量不同,所以会表现出不同的转化率,本试验在对外植体处理方式的研究过程中,发现经过切割处理的原球茎的存活率最高,有利于铁皮石斛的转化,这与冯莹<sup>[8]</sup>关于 *ACS* 反义基因转化石斛兰的研究报道一致。

有研究认为:单子叶植物不能积累足够的酚类物质是其难以被农杆菌侵染的主要原因<sup>[9-11]</sup>。所以,在单子叶植物的转化中一般不添加 AS 活化通常不能转化<sup>[12]</sup>。贺杰等<sup>[13]</sup>也指出,共培养培养基中添加 AS 对保证 T-DNA 的转移非常必要,为单子叶植物小麦胚性愈伤组织转化所必需。但是在本试验中发现,不添加 AS 活化时仍有 15.38% 的转化率。目前,关于 AS 能活化 *Vir* 区基因,提高单子叶

植物的转化效率的研究报道已有很多。张妙彬等<sup>[14]</sup>使用 E1301 转化石斛兰,在侵染液中添加 100  $\mu\text{mol/L}$  的 AS 使 *GUS* 瞬时表达率提高了 10.7%。Men 等<sup>[15]</sup>发现,在培养基中添加 100  $\mu\text{mol/L}$  的 AS 能使 *GUS* 瞬时表达效果提高约 3 倍。在本试验中发现,添加 100  $\mu\text{mol/L}$  AS 可以明显提高其转化率,提高 17.12%,这一点与张妙彬等<sup>[14]</sup>和 Men 等<sup>[15]</sup>的研究一致。可见,AS 并不是实现单子叶植物转化的必需条件,但一定量的 AS 确实能够提高其转化率。

在一些有关石斛转化的研究中,采用 PLBs 和 PLB 薄片为外植体时,均以 2~3 d 为最佳共培养时间<sup>[15-16]</sup>,本试验中采用铁皮石斛原球茎为转化受体,研究结果显示,随着时间的延长,*GUS* 瞬时表达率也随着增加,60 h 达到最佳,本研究结果与 Men 等<sup>[15]</sup>和 Yu 等<sup>[16]</sup>的研究相近。而陈之林等<sup>[12]</sup>、张振华等<sup>[17]</sup>认为,石斛原球茎转化过程中最佳共培养时间为 4 d。在本试验中当共培养时间延长到 72 h 时,原球茎上附满了农杆菌,原球茎开始出现不同程度的黄化、死亡。就本试验而言,铁皮石斛最佳共培养时间为 60 h。

本试验中 *GUS* 基因 PCR 鉴定结果显示,并不是所有转化植株都呈阳性,这与崔波等<sup>[18]</sup>的研究结果相似。另外,PCR 检测只能初步证明外源基因是否整合进植物基因组中,其整合特性还需采用分子杂交等方法对植株进行进一步的鉴定与分析。

### 参考文献:

- [1] 史骥清,李娟,赵锋,等. 乙烯利对铁皮石斛除蕾及其品质的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):228-229.
- [2] 田宏现,苑平,王曼玲,等. 猕猴桃 ACC 氧化酶反义基因转化猕猴桃的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(11):115-121.
- [3] Savin K W, Baudinette S C, Graham M W, et al. Antisense ACC oxidase RNA delays camation petal senescence[J]. HortScience, 1995, 30(5):970-972.
- [4] Bovy A G, Altvorst A C van, Angenent G C, et al. Genetic modification of the vase-life of camation[J]. Acta Horticulturae, 1995 (405):179-189.
- [5] 熊爱生,姚泉洪,李贤,等. ACC 氧化酶和 ACC 合成酶反义 RNA 融合基因导入番茄和乙烯合成的抑制[J]. 实验生物学报,2003,36(6):428-434.
- [6] 刘永巨,马俊莲,张子德,等. 农杆菌介导法将 ACC 合成酶和氧化酶反义基因转入日本甜柿的研究[J]. 湖北农业科学,2009,48(8):1800-1802.
- [7] 牛苏燕. 蝴蝶兰 ACC 合成酶(ACS)反义基因植物表达

- 载体的构建及遗传转化[D]. 郑州:河南农业大学, 2012.
- [8] 冯莹. 石斛兰 ACS 反义基因的遗传转化及离体开花的研究[D]. 福州:福建农林大学, 2008.
- [9] Hiei Y, Ohta S, Komari T, *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant J*, 1994(6): 271–282.
- [10] Ishida Y, Saito H, Ohta S, *et al.* High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Nature Biotech*, 1996 (14): 745–750.
- [11] Cheng M, Fry J E, Pang S, *et al.* Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiology*, 1997 (115): 971–980.
- [12] 陈之林, 段俊, 曾宋君, 等. 原球茎为转化受体的农杆菌介导石斛遗传转化[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1): 86–90.
- [13] 贺杰, 胡海燕, 周岩, 等. 农杆菌介导小麦遗传转化影响因素的研究[J]. 河南农业科学, 2011, 40(2): 41–44.
- [14] 张妙彬, 梁擎中, 肖浩, 等. 农杆菌介导石斛兰遗传转化的研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 565–570.
- [15] Men S Z, Ming X T, Liu R W, *et al.* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium orchid* [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2003, 75(1): 63–71.
- [16] Yu H, Yang S H, Goh C J. *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium orchid* with the class 1 knox gene *DoH1* [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(4): 301–305.
- [17] 张振华, 王涛, 陈嘉蓉, 等. 农杆菌介导的 CyMV-CP 基因对石斛遗传转化研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(3): 463–467.
- [18] 崔波, 蒋素华, 牛苏燕, 等. 农杆菌介导蝴蝶兰的遗传转化研究[J]. 河南农业大学学报, 2012, 46(6): 642–645, 650.

## 《华北农学报》征订启事

《华北农学报》1986 年创刊, 由河北、北京、天津、河南、山西、内蒙古六省市农科院、农学会联合主办, 为全国首家跨省、市、区多单位联办的农业学术刊物。本刊立足华北, 面向全国和全世界。主要刊载农业基础学科学术论文、研究报告及科研简报, 报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

《华北农学报》为中国科学引文数据库核心期刊(CSCD 核心库)、中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊(A+)和中国农业核心期刊。在 2011 年版《中文核心期刊要目总览》综合性农业科学类核心期刊中排名第 2 位, 为我国有影响力的农业学术刊物。《华北农学报》多次荣获国家级及省级奖励: 全国优秀科技期刊评比三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、首届华北优秀期刊、首届北方十佳期刊、中国北方优秀期刊、河北省优秀期刊、河北省十佳期刊及河北省荣誉期刊等奖项; 2011 年被评选为“中国精品科技期刊”。

《华北农学报》国内外公开发行, 国内统一刊号: CN13–1101/S, 国际刊号 ISSN 1000–7091。双月刊, 双月 28 日出版, 国际标准大 16 开本, 240 页, 每期定价 12 元, 全年 72.00 元。邮发代号: 18–10, 国外发行代号: 5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅, 请注明刊名、份数、姓名、地址、邮编及电话。

欢迎订阅、欢迎投稿。

地址: 石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部

邮编: 050051

电话: 0311–87652166

E-mail: hbnxb@163.com

网址: <http://www.hbnxb.net/>