

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201705005

引文格式: 李会宣, 许冬倩, 闫洪波. 鸭梨 *PAL* 基因的反义遗传转化及表达分析 [J]. 广西植物, 2018, 38(4):492-500

LI HX, XU DQ, YAN HB. Antisense genetic transformation and expression analysis of *PAL* gene in Yali Pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Guihaia*, 2018, 38(4):492-500

## 鸭梨 *PAL* 基因的反义遗传转化及表达分析

李会宣\*, 许冬倩, 闫洪波

(河北经贸大学 生物科学与工程学院, 石家庄 050061)

**摘要:** 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*, EC4.3.1.5)是植物通过苯丙烷代谢途径合成木质素的关键酶和限速酶,其通过影响木质素的合成而与果实中石细胞的分化、发育及果实品质密切相关。为了降低鸭梨中苯丙氨酸解氨酶的含量,该研究利用反义 *PAL* 基因遗传转化鸭梨、降低鸭梨内源 *PAL* 基因的表达。结果表明:(1)采用 RT-PCR 技术,利用根据 GenBank 中西洋梨 *PAL* 基因序列设计特异性引物,扩增得到 496 bp 的鸭梨 *PAL* 基因片段。(2)将扩增片段反向插入载体 pBI121 的 MCS 区域,构建植物 *PAL* 基因反义表达载体 pBI121-As*PAL*。接着采用电转化法将反义表达载体转入农杆菌 EHA105 中,并制备出农杆菌工程菌液。(3)利用农杆菌介导法对鸭梨组培苗叶片外植体进行遗传转化,得到 23 株转基因鸭梨苗。PCR 检测证实 *PAL* 反义基因片段转入鸭梨中,实时定量 PCR 检测表明转基因鸭梨苗体内 *PAL* 基因表达量均有所降低,为非转基因苗的 65%~75%。该研究结果表明利用反义 RNA 技术获得了抑制内源性 *PAL* 基因表达的转基因鸭梨植株,为改善鸭梨果实品质、改良品种奠定了基础。

**关键词:** 鸭梨, 苯丙氨酸解氨酶, 反义 RNA, 遗传转化, 基因表达

中图分类号: Q943.2, S772.3, S661.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)04-0492-09

## Antisense genetic transformation and expression analysis of *PAL* gene in Yali Pear (*Pyrus bretschneideri*)

LI Huixuan\*, XU Dongqian, YAN Hongbo

(College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China)

**Abstract:** Phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*, EC4.3.1.5) catalyzes the first step from precursors to synthesizing lignin in phenylpropanoid pathway. Lignin accumulation is correlated with stone cell differentiation and fruit quality. In order to reduce the content of *PAL*, the antisense *PAL* gene transformed into *Pyrus bretschneideri* was used to reduce the expression of endogenous *PAL* gene in *P. bretschneideri*. According to pear *PAL* gene sequences in GenBank, a pair of primers were designed, and a 496 bp partial *PAL* gene fragment was amplified by RT-PCR. The *PAL* antisense expression vector

收稿日期: 2017-05-26

基金项目: 河北省自然科学基金(D2015207013); 石家庄市科学技术研究与发展计划项目(141490522A) [Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province(D2015207013); Science and Technology Research and Development Program in Shijiazhuang(141490522A)]。

作者简介: 李会宣(1972-), 女, 河北石家庄人, 博士, 副教授, 主要从事真核基因表达调控研究, (E-mail) lihuixuaner@126.com。

\*通信作者

pBI121-AsPAL was constructed by reverse inserting PAL gene fragment into pBI121 MCS region. The pBI121-AsPAL was transduced into *Agrobacterium* EHA105 by electro transformation method. Then, pBI121-AsPAL was transformed into tissue cultured *P. bretschneideri* plants mediated by *Agrobacterium*. Twenty-three transgenic lines harboring the anti-sense PAL fragment were verified by PCR. The Real-time PCR results showed that the expression level of endogenous PAL gene in transgenic plants was lower than that of non transgenic pear, with amount of non transgenic pear 65%–75%. The results showed that with transformation mediated by *Agrobacterium*, the expression of endogenous PAL gene was specifically inhibited in antisense RNA transgenic *P. bretschneideri* seedlings. Therefore, this study provides reference for improvement of the pear fruit quality and species.

**Key words:** *Pyrus bretschneideri*, phenylalanine ammonia-lyase, antisense RNA, genetic transformation, gene expression

鸭梨 (*Pyrus bretschneideri*) 作为中国的白梨品种, 味甜多汁, 香气浓郁, 营养丰富。梨果肉中的石细胞团严重影响了梨果实的食用品质 (田路明等, 2011; 吕芮宏等, 2011)。木质素作为石细胞的主要成分, 其合成是从苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 催化 L-苯丙氨酸解氨生成反式肉桂酸开始的 (Kumar & Ellis, 2001)。梨果实中的 PAL 首先参与木质素单体的合成, 然后在过氧化物酶的作用下聚合成为木质素, 进而为石细胞的形成提供原料 (Vanholme et al, 2010)。因此, PAL 为木质素合成的第一个关键酶 (Huang et al, 2010), 酶蛋白的合成与沉积以及酶蛋白的活性与石细胞的发育密切相关。

以往的研究主要集中在控制植物果实中 PAL 的活性, 以期影响木质素的含量、石细胞的形成, 进而影响果实品质。王斌等 (2013) 和刘艳等 (2011) 的研究就发现梨石细胞含量与果实中 PAL 活性呈现极其显著的正相关关系, 果实套袋能够降低 PAL 的活性, 导致木质素的合成减少、果实中石细胞的含量降低。邹丽红和张玉星 (2012) 对砂梨的研究也表明通过果实套袋抑制 PAL 活性, 可以减低石细胞的含量、密度和大小, 在一定程度上改进了果品的品质。物理方法虽然抑制了 PAL 的活性、降低木质素的含量和石细胞的形成, 但在改善果品品质方面的作用有限。近年来, 根癌农杆菌介导的遗传转化实现了对植物的遗传改造, 为进一步改善植物果实或种质品质奠定了基础 (陈晓艳等, 2017; 简兴等, 2015)。随着对鸭梨 PAL 基因结构、表达特性等方面研究的不断深入 (刘志浩等, 2011; 闫洪波等, 2014), 以及利用反义 RNA 技

术抑制鸭梨多酚氧化酶、果胶甲酯酶及 ACC 氧化酶等基因的表达也有了成功先例 (李桂琴等, 2010; 李会宣等, 2014; 齐靖等, 2014), 这些为利用反义 RNA 技术降低内源性鸭梨 PAL 基因的表达水平, 减少活性 PAL 的合成提供了理论参考和实验经验。基于此, 本研究通过构建鸭梨 PAL 基因的反义表达载体, 利用农杆菌介导法转化鸭梨组培苗, 以期获得转化反义 PAL 基因片段的鸭梨, 为获得 PAL 基因表达水平降低的转基因植株、研究 PAL 在鸭梨中的作用以及为选育石细胞含量少的优质鸭梨品种提供参考, 进而为改良品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

植物材料: 鸭梨, 河北省农林科学院梨园栽植。载体和菌株: pUCm-T vector 和大肠杆菌 Top10 购自上海生物工程公司, pBI121 和根癌农杆菌 EHA105 由本室保存。

试剂: Taq PCR Master Mix、Sac I 和 Xba I 限制性内切酶、氨苄青霉素 (Amp)、链霉素 (Str)、卡那霉素 (Kan)、羧苄青霉素 (Carb)、T<sub>4</sub> DNA ligase、连接试剂盒、IPTG、X-gal、Trizol 试剂购自上海生物工程公司; 基因组 DNA 提取试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、cDNA 合成试剂盒购自天根生化科技有限公司; Primescript RT Reagent 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒购自宝生物工程公司; 测序由上海生物工程公司完成。

## 1.2 方法

1.2.1 引物设计 参考 GenBank 公布的苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* CDS 序列(DQ901399.1)的核心区,利用 Oligo 6.0 软件设计上游引物 FP1(5'-TT-GAGCTCCAATTCCTTGGCAACCCT-3')和下游引物 RP1(5'-GCTCTAGAATAGGGTTTTTCAGTTC-CTCCTCAA-3'),粗体部引入的 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切位点。

1.2.2 目的基因的克隆和测序 利用 Trizol 法提取鸭梨叶片总 RNA,反转录成 cDNA。

PCR 扩增:以 cDNA 作为模板进行 PCR,扩增 *PAL* 基因片段。反应体系 20  $\mu$ L: 2  $\times$  Taq PCR Master Mix 10  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 30 次, 最后 72  $^{\circ}$ C 保温 10 min。

扩增产物的回收、与载体连接、转化及鉴定: 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳进行回收纯化, 纯化产物与 pUCm-T Vector 连接。连接体系 10  $\mu$ L: PCR 纯化产物 6  $\mu$ L, T<sub>4</sub> DNA ligase 1  $\mu$ L, 10 $\times$ T<sub>4</sub> DNA Ligation buffer 1  $\mu$ L, pUCm-T Vector 1  $\mu$ L, 50% PEG-4 000 1  $\mu$ L。连接物采用热激法转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 利用蓝白斑法筛选阳性菌落, 提取质粒并进行 *Sac* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。10  $\mu$ L 的酶切体系: 质粒 DNA 6  $\mu$ L, *Sac* I 1  $\mu$ L, *Xba* I 1  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer M 1  $\mu$ L。重组质粒酶切鉴定后送交上海生物工程公司测序, 并命名为 pUCm-T-*AsPAL*。

1.2.3 反义 *PAL* 基因植物表达载体的构建及鉴定 将重组质粒 pUCm-T-*PAL* 以及植物表达载体 pBI121 进行 *Xba* I/*Sac* I 双酶切, 回收目的片段并进行连接, 由于 pBI121 中 *Sac* I 的酶切位点在下, *Xba* I 的酶切位点在上, 使得 *PAL* 基因片段反向与 pBI121 连接。连接物转化 *E. coli* Top10, PCR 筛选阳性克隆, 所用引物 FP2(5'-TCTTTGCGCAATAGGGTTTTTCAGT-3') 和 RP2(5'-CAATTCCTTGGCAACCCTGTCA-3') 根据反向 *PAL* 基因片段设计。对 PCR 鉴定含有反向 *PAL* 基因片段的菌落, 进一步培养、提取质粒, 使用 *Xba* I/*Sac* I 酶切鉴定, 鉴定正确的重组质粒命名为 pBI121-*AsPAL*。

## 1.3 反义 *PAL* 基因植物表达载体转化农杆菌 EHA105

1.3.1 农杆菌感受态细胞的制备 保存的农杆菌 EHA105 进行划线分离, 挑取单菌落接种于含 Rif(50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 和 Str(50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 的 LB 液体培养基, 28  $^{\circ}$ C, 220 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 震荡过夜培养活化, 过夜培养物转接至相同抗生素的 LB 液体培养基, OD<sub>600</sub>  $\approx$  0.6 时离心收集菌体, 用 HEPES 溶液和 10% 甘油洗涤, 最后用 10% 甘油悬浮菌体, 分装, -80  $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 反义 *PAL* 基因植物表达载体电击法转化农杆菌 EHA105 感受态细胞 将 pBI121-*AsPAL* 与农杆菌 EHA105 感受态细胞混匀, 电压 2 500 V/4.3 ms 电击转化。转化后菌液黑暗条件下, 28  $^{\circ}$ C, 在含 Kan(50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)、Rif(50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 和 Str(50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 抗生素平板上倒置培养 2 d。与此同时转化 pBI121 作为阴性对照。抗性平板上长出的菌落先通过 PCR 筛选, 在培养、提取质粒用 *Xba* I/*Sac* I 酶切鉴定。正确的农杆菌菌株用 EHA105-pBI121-*AsPAL* 表示, 并用于制备工程菌液。

## 1.4 鸭梨的遗传转化与转反义 *PAL* 基因无菌苗获得

1.4.1 农杆菌工程菌液的制备 在无菌条件下将保存的 EHA105-pBI121-*AsPAL* 菌液在含 Kan 和 Rif 的 LB 培养基上划线, 28  $^{\circ}$ C 倒置、暗培养。挑取单菌落接种于含同样抗生素的 LB 液体培养基中, 28  $^{\circ}$ C、220 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 过夜培养, 培养后的菌液 1:50 转接于含同样抗生素的 LB 液体培养基中继续振荡培养, 直至 OD<sub>600</sub> = 0.5~0.6, 离心收集菌体, 用 MS 液体培养基悬浮, 稀释 10 倍备用。同样方法制备含 pBI121 空载体的农杆菌菌液作为对照组工程菌液。

1.4.2 农杆菌转化鸭梨及转基因鸭梨组培苗的获得 利用本室前期建立的再生转化体系对鸭梨外植体进行转化。取苗龄 28 d 的鸭梨无菌组培苗叶片作为外植体, 置于 EHA105-pBI121-*AsPAL* 工程菌液或含 pBI121 空载体的农杆菌工程菌液中, 浸染 5 min 后, 将离体叶片放置于诱导选择培养基(S 30 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>+BA 4.0 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>+IAA 0.3 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>+MS+Agar 4.0 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>(pH5.8) + Kan 50 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 共培养 2 d。转入添加 200 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素的诱导选择培养基进行杀菌和诱导培养愈伤组织。将愈伤

组织转入再生芽选择培养基(S 30 g · L<sup>-1</sup>+BA 3.0 g · L<sup>-1</sup>+IAA 0.5 g · L<sup>-1</sup>+Carb 200 mg · L<sup>-1</sup>+Kan 50 mg · L<sup>-1</sup> MS+Agar 4.0 g · L<sup>-1</sup>(pH5.8)) 诱导抗性不定芽再生。切下 4~6 cm 的抗性不定芽并置于抗性苗筛选培养基(S 30 g · L<sup>-1</sup>+1/2MS+IBA 1.0 g · L<sup>-1</sup>+Agar 4.0 g · L<sup>-1</sup>(pH5.8)+Carb 200 mg · L<sup>-1</sup>+Kan 20 mg · L<sup>-1</sup>) 上诱导生根、扩繁、并进行检测。

**1.4.3 转基因植株的 PCR 检测** 按照 TaKaRa 公司的基因组提取试剂盒提取转基因鸭梨叶片基因组 DNA, 使用 FP2、RP2 引物, 利用 PCR 检测鸭梨抗性植株 pBI121 中插入的反向 *PAL* 基因片段, 含 pBI121 空载体的农杆菌工程菌液侵染外植体后诱导再生的鸭梨苗作为对照。同时, 使用 *NPTII* 基因序列设计的引物 N1 (5'-ATGATTAACAAGATG-GATTGCA-3') 和 N2 (5'-TCAGAAGAAGCTCGT-CAAGAAGGC-3'), 通过 PCR 检测 pBI121 质粒, 扩增片段的长度为 778 bp。

### 1.5 转基因植株 *PAL* 表达水平检测

采用 qRT-PCR 检测转基因植株中 *PAL* 基因的表达水平。Trizol 试剂提取鸭梨叶片总 RNA, 经过 DNase I 酶解、消化后, 利用宝生物工程公司的 Primerscript RT Reagent 试剂盒反转录为 cDNA, 作为 qRT-PCR 模板。利用 ABI 公司的 PRISM 7 500 实时荧光定量 PCR 系统, 按照宝生物公司 SYBR Premix Ex Taq™ 说明书, 两步法完成荧光定量 PCR, 每个样品进行 3 次重复: 95 °C 预变性 30 s, 1 个循环; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 延伸 30 s, 40 个循环。内参为鸭梨 *actin2* 基因 (GU830958.1), A1 (5'-GGACATTCAACCCCTCGTCT-3') 和 A2 (5'-ATCCTTCTGACCATACCAACC-3') 作为正、反向引物, 转入的反向 *PAL* 基因片段使用 FP2 和 RP2 作为正、反向引物。反应结束后, 数据导入 Excel 表, 根据得到的 Ct 值, 运用 Livak 和 Schmittgen 报道的  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算目的 *PAL* 基因 mRNA 相对表达量。使用 DPS 软件进行差异的显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸭梨 *PAL* 基因反义表达载体的构建

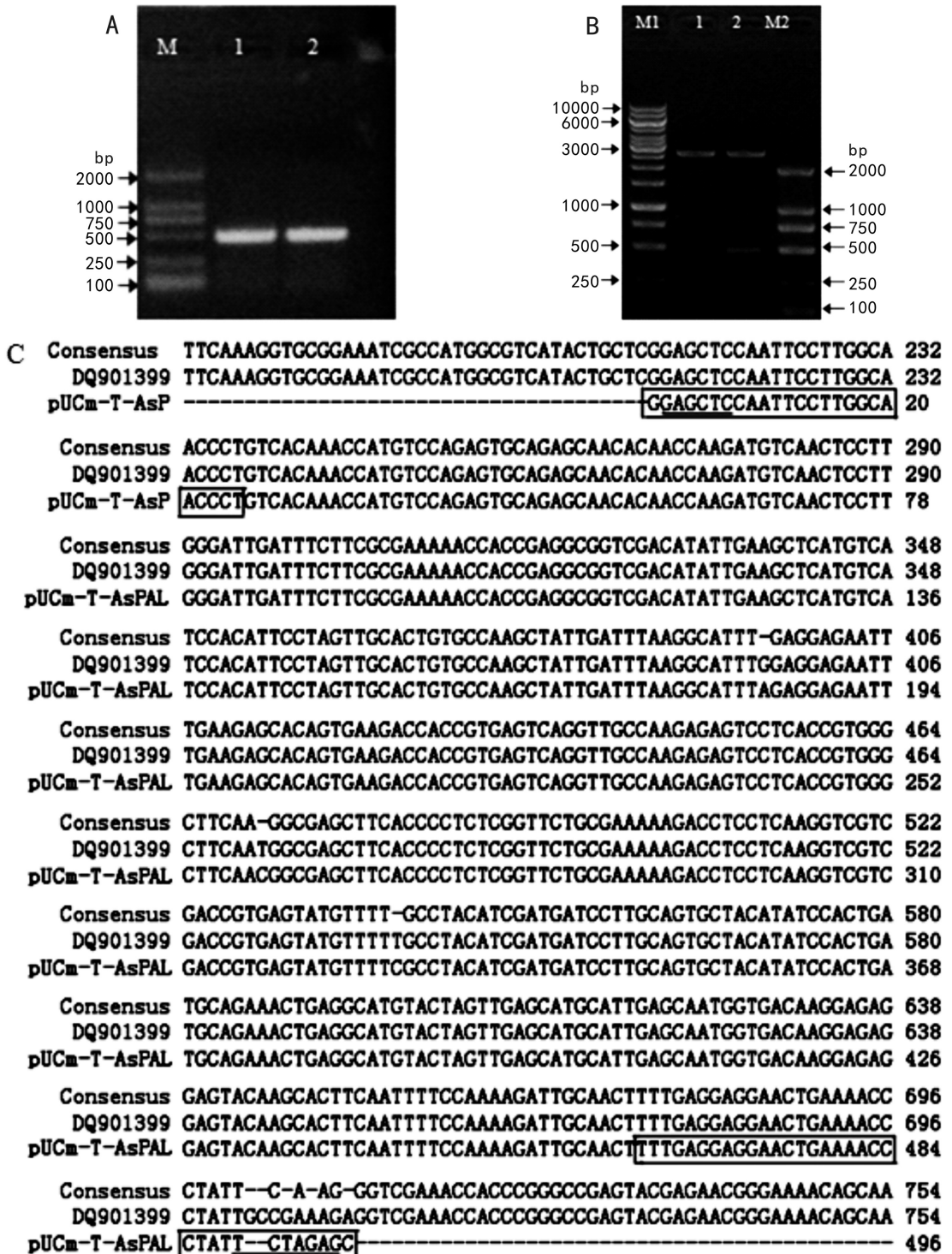
**2.1.1 鸭梨 *PAL* 基因片段的克隆及鉴定** 以鸭梨

叶片 cDNA 为模板, 用 PCR 技术扩增 *PAL* 基因片段。琼脂糖凝胶电泳检测表明 (图 1:A), 扩增得到约 500 bp 特异性的单一条带, 大小与预期相符。将扩增片段与 pUCm-T 载体连接, 转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 提取质粒进行 *Xba* I/*Sac* I 双酶切鉴定。重组质粒双酶切产物包含一个约 500 bp 小片段和一个约 2 800 bp 的大片段, 而空载 pUCm-T 载体只有一个约 2 800 bp 大片段 (图 1:B)。重组质粒命名为 pUCm-T-*PAL*, 送交上海生物工程公司测序进行测序, 结果表明插入片段为 496 bp, 与 GenBank 中的西洋梨 *PAL* 序列 (DQ901399.1) 的一致性极高 (图 1:C), 因此认定 pUCm-T-*PAL* 含有鸭梨 *PAL* 基因核心区 496 bp 的片段。

**2.1.2 鸭梨 *PAL* 基因反义表达载体 pBI121-*AsPAL* 的构建** 利用 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切植物表达载体 pBI121 (切去 1.9 kb *Gus* 结构基因, 并且保留 *CaMv35S*、*Nos* 等部分), 与 496 bp 的目的 *PAL* 基因片段连接, 由于 *Xba* I/*Sac* I 在载体和片段上的上、下游位置相反, 使得目的 *PAL* 基因片段反向与载体 pBI121 连接。连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 利用卡那霉素抗性筛选重组质粒并进行鉴定。一方面, 以引物 FP2 和 RP2 (反向 *PAL* 基因片段的上、下游引物) 对重组质粒进行 PCR 鉴定, 扩增产物电泳 (图 2:A)。另一方面, 通过 *Xba* I/*Sac* I 对重组质粒进行双酶切鉴定, 得到约 496 bp 的特异条带 (图 2:B)。综上结果表明, *PAL* 基因片段已反向插入植物表达载体 pBI121 中, 鸭梨 *PAL* 基因反义表达载体 pBI121-*AsPAL* 构建成功。

### 2.2 农杆菌介导的鸭梨 *PAL* 反义基因的遗传转化及鉴定

**2.2.1 *PAL* 基因反义表达载体 pBI121-*AsPAL* 转化农杆菌及 PCR 鉴定** 用电击法将鸭梨 *PAL* 基因反义表达载体 pBI121-*AsPAL* 转化农杆菌 EHA105 细胞, 与此同时转化 pBI121 作为对照, 培养后挑取单菌落用引物 FP2 和 RP2 对农杆菌菌落进行 PCR 鉴定 (图 3)。图 3 结果表明, pBI121-*AsPAL* 转入农杆菌 EHA105。含 pBI121 质粒的农杆菌命名为 EHA105-pBI121, 含反义表达载体 pBI121-*AsPAL* 的农杆菌命名为 EHA105-pBI121-*AsPAL*, 并作为遗传转化的工程菌液。

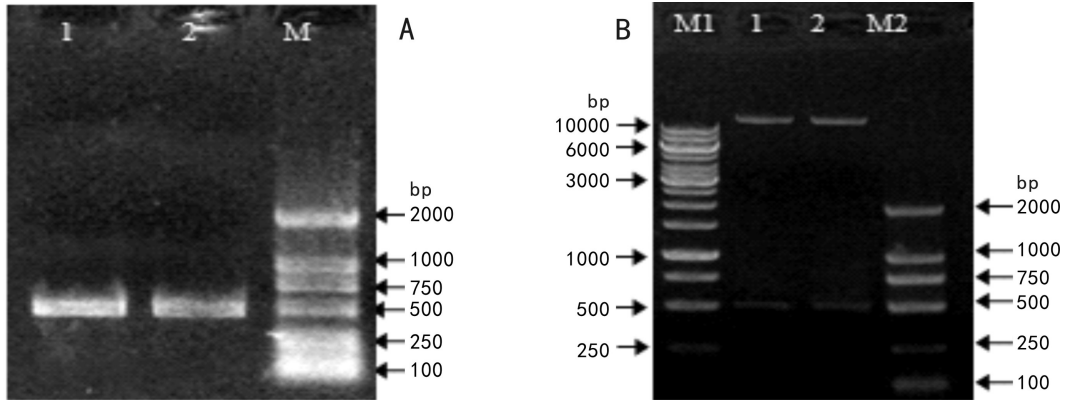


注: (A) 1, 2. PCR 扩增产物; M. DL2000 分子量标准。(B) M1. 1kb DNA 标准分子量; 1. pUCm-T; 2. pUCm-T-PAL; M2. DL2000 分子量标准。(C) Consensus. 共同序列; pUCm-T-PAL. 插入 pUCm-T 的 PAL 基因片段序列; DQ901399.1. GenBank 公布的 PAL CDS 序列, 其中方框中的序列为上、下游引物序列, 划线部分为 *Sac* I 和 *Xba* I 的酶切位点。

Note: (A) 1, 2. PCR products; M. DL2000 Marker. (B) M1. 1 kb DNA Marker; 1. pUCm-T; 2. pUCm-T-PAL; M2. DL2000 Marker. (C) Consensus. Consensus sequences; pUCm-T-AsPAL. Insertion sequences in pUCm-T; DQ901399.1. PAL CDS sequence of PAL in GenBank, sequences in boxes mean the PCR forward and reverse primer, and sequences underlined are *Sac* I and *Xba* I restriction sites.

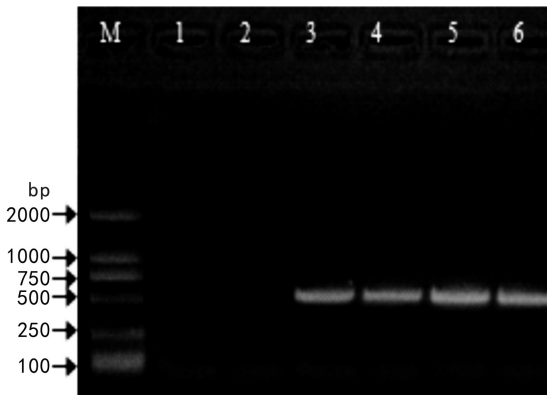
图 1 鸭梨 PAL 基因片段 PCR 扩增产物、质粒 pUCm-T-PAL 的 *Xba* I/*Sac* I 双酶切以及扩增片段与 PAL CDS (DQ901399.1) 的序列比较图

Fig. 1 PCR products of PAL fragment, pUCm-T-PAL double digested by *Xba* I/*Sac* I and alignment of cloned PAL gene fragment and PAL CDS (DQ901399.1)



注: (A) 1,2. PCR 产物; M. DL2000 分子量标准。(B) M1. 1 kb DNA 分子量标准; 1,2. pBI121-AsPAL; M2. DL2000 分子量标准。  
Note: (A) 1,2. PCR product; M. DL2000 Marker. (B) M1. 1 kb DNA Marker; 1,2. pBI121-AsPAL; M2. DL2000 Marker.

图 2 PCR 及 *Xba* I/*Sac* I 酶切鉴定反义表达载体 pBI121-AsPAL  
Fig. 2 Identification of pBI121-AsPAL by PCR and *Xba* I/*Sac* I digestion



注: M. DL2000 分子量标准; 1. pBI121 质粒; 2. EHA105-pBI121 菌落; 3. *E. coli* Top10 中提取的 pBI121-AsPAL 质粒; 4-6. EHA105-pBI121-AsPAL 菌落。  
M. DL2000 Marker; 1. pBI121; 2. Colony of EHA105-pBI121; 3. pBI121-AsPAL from *E. coli* Top10; 4-6. Colony of EHA105-pBI121-AsPAL.

图 3 菌落 PCR 鉴定含 pBI121-AsPAL 的农杆菌 EHA105 阳性克隆

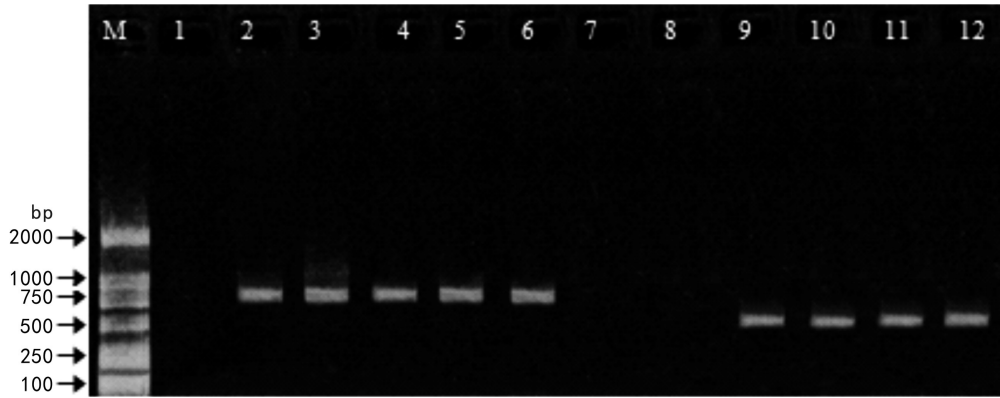
Fig. 3 Identification of pBI121-AsPAL in strain EHA105 by colony PCR

2.2.2 转 *PAL* 反义基因片段的鸭梨组培苗的获得及 PCR 检测 参照李桂琴等(2010)构建的鸭梨的遗传转化和再生体系进行鸭梨反义 *PAL* 基因的遗传转化。鸭梨叶片外植体经 EHA105-pBI121 或 EHA105-pBI121-AsPAL 工程菌液侵染后,经过再生

培养基、再生芽选择培养基、抗性苗筛选培养基培养后,最终获得具有卡那霉素抗性的鸭梨组培苗 95 株。提取再生的抗性鸭梨苗总 DNA,利用扩增 *NPT II* 基因序列的特异性引物 N1 和 N2 以及 *PAL* 基因反向序列的引物 FP2 和 RP2,对抗性鸭梨苗进行 PCR 鉴定。其中,以 pBI121-AsPAL 质粒作为 PCR 的阳性对照,阴性对照为非转基因植株,同时还辅以转 pBI121 鸭梨苗对照。95 株抗性鸭梨苗中,PCR 鉴定 23 株含有反义 *PAL* 基因片段,阳性率为 24.2%。部分结果如图 4 所示,抗性鸭梨苗(4-6泳道、10-12 泳道)分别扩增得到 800 bp 和 496 bp 特异条带,符合 *NPTII* 和反向 *PAL* 基因片段的预期长度,证明转基因鸭梨苗基因组中含有外源的 *PAL* 反向基因,即抗性鸭梨苗为转 *PAL* 反义基因再生组培苗。

### 2.3 转基因鸭梨苗 *PAL* 基因表达水平检测

提取转基因鸭梨苗叶片总 RNA,利用 RT-qPCR 方法,以非转基因鸭梨苗作为对照,检测转基因鸭梨苗中 *PAL* 基因的表达水平。检测结果表明,通过农杆菌介导的 *PAL* 反义基因的遗传转化,与对照组非转基因鸭梨苗(其 *PAL* 基因表达量设定为 1)相比,23 株转基因鸭梨苗中 *PAL* 基因表达量都有所降低,分别为对照的 65%~75%,其中相对表达量最低的为对照的 65.1%、最高的为对照的



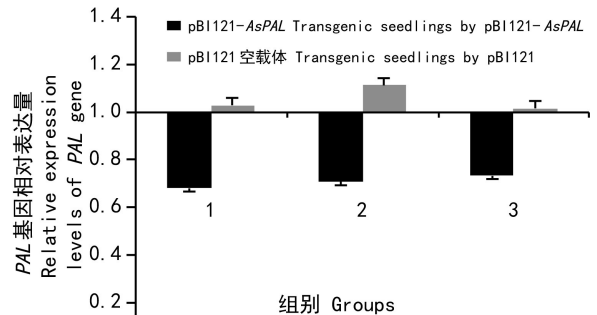
注: M. DL2000 分子量标准; 1,7. 阴性对照(非转基因植株); 2,8. 转 pBI121 鸭梨苗; 3,9. 阳性对照 (pBI121-AsPAL 质粒); 4-6, 10-12. 抗性鸭梨组培苗。

Note: M. DL2000 Marker; 1,7. Negative control (Non-transgenic plants); 2,8. *Pyrus bretschneideri* seedlings transformed by pBI121; 3,9. Positive control (pBI121-AsPAL); 4-6, 10-12. Transgenic seedlings by pBI121-AsPAL.

图 4 PCR 鉴定转基因鸭梨苗

Fig. 4 Identification of transgenic *Pyrus bretschneideri* seedlings by PCR

75.2%。图 5 列出了部分转 pBI121-AsPAL 鸭梨苗和转 pBI121 鸭梨苗中 PAL 基因的相对表达量。组 1、组 2 和组 3 中转 pBI121-AsPAL 鸭梨苗 PAL 基因相对表达量,与 PAL 基因相对表达量设定为 1 的对照非转基因鸭梨苗相比,分别为 68.14%、70.87%和 73.20%,均低于 1,表明转 pBI121-AsPAL 鸭梨苗中 PAL 基因的表达量低于非转基因苗,即转 pBI121-AsPAL 鸭梨苗中 PAL 基因的表达受到了抑制;而转化 pBI121 的鸭梨苗中, PAL 基因相对表达量分别为非转基因苗的 102.81%、111.21%和 101.39%,虽然与 PAL 基因表达量为 1 的非转基因苗有所不同,但差异不显著,表明转 pBI121 鸭梨苗与非转基因鸭梨苗中 PAL 基因表达没有差异。因此,即转入 PAL 反义基因的鸭梨苗中内源 PAL 基因的表达在一定程度上均受到了抑制,发挥抑制作用的是 PAL 反义基因表达载体 pBI121-AsPAL,而非 pBI121 空载体。



注: 1-3. 鸭梨苗。非转基因鸭梨苗为对照(其 PAL 基因表达量为 1), PAL 基因相对表达量为相对于对照的表达量。

Note: 1-3. *Pyrus bretschneideri* seedlings. Untransformed *P. bretschneideri* as control (whose PAL expression level defined is 1), the relative expression level of PAL gene is compared to control.

图 5 转基因鸭梨苗 PAL 基因相对表达水平检测  
Fig. 5 Relative expression levels of PAL gene in *Pyrus bretschneideri* plants

### 3 讨论与结论

石细胞的主要成分为木质素,由薄壁细胞的细胞壁强烈增厚形成,是影响鸭梨果实品质的重要因素。目前发现的影响梨木质素合成以及石细

胞含量、发育的有 PPO(李玲等,2011)、PAL(闫洪波等,2014)、F5H(徐超等,2015)、COMT(程敏等,2015)、PbCCoAOMT(王丹阳等,2015)、POD4(李文慧等,2017)基因等,其中 PAL 是木质素合成的首个关键酶基因。因此,可以通过基因表达调控

控制 *PAL* 的生成量, 调节木质素的代谢, 抑制石细胞的形成和发育, 从而提高梨果实的口感及经济价值。借助农杆菌介导的反义 RNA 或 RNAi 技术, 可以特异性调控基因在生物体内的表达。本研究根据西洋梨 *PAL* 基因序列设计引物, 通过 RT-PCR 扩增得到 496 bp 的 *PAL* 基因片段, 并连接到植物表达载体 pBI121, 构建鸭梨 *PAL* 基因特异性反义表达载体 pBI121-As*PAL*。利用电击法将 pBI121-As*PAL* 转入农杆菌 EHA105 中, 制备 EHA105-pBI121-As*PAL* 工程菌液。通过农杆菌介导的遗传转化将 pBI121-As*PAL* 导入鸭梨, 最终获得了转化 *PAL* 反义基因片段的转基因鸭梨。实时定量 PCR 对转基因鸭梨的 *PAL* 表达分析表明, 反义 *PAL* 基因的遗传转化降低了鸭梨内源 *PAL* 基因的表达, 为特异性抑制鸭梨 *PAL* 活性奠定了基础, 也为应用反义 RNA 技术改善鸭梨果实品质再次提供理论参考。

在以往对鸭梨 *PAL* 基因的研究中发现了两个基因, 即家族成员 *PbPAL1* (GU906268.1) 和 *PbPAL2* (GU906269.1), 与大多数植物一样, 均含有一个内含子(闫洪波等, 2014)。两个基因编码的蛋白在分子大小、结构、带电荷特性等方面没有明显的差异, 但在果实发育期过程中二者的表达量却存在差异, 说明 *PAL* 不同基因家族成员在果实发育的不同阶段可能发挥着不同的功能(闫洪波等, 2014)。本研究根据西洋梨 *PAL* 基因设计引物, 扩增序列与 *PbPAL1* 和 *PbPAL2* 序列存在极大差异, 推测原因可能是 *PbPAL1* 和 *PbPAL2* 的 CDS 区是根据 GenBank 中苹果 EST 序列设计的两对引物扩增得到的。虽然, 苹果的 61 个 EST-SSR 和 68 个 SSR 可以定位于梨的连锁图上, 证实苹果和梨二者的基因组结构存在保守性, 但不同类型基因以及基因的不同区域在进化过程中还存在保守性差异(施泽彬等, 2011; 韩明丽等, 2010)。与本研究一样, 刘志浩等(2011)也根据西洋梨 *PAL* 基因(DQ901399.1)保守区的序列设计引物, 使用鸭梨果实 cDNA 模板, 扩增得到了 478 bp 的 *PAL* 基因 cDNA 片段(GU355673), 虽然与本文中扩增得到的 496 bp 序列在西洋梨 *PAL* 基因序列中的位置有所不同, 但二者与西洋梨的 *PAL* 基因 CDS 序列的

同源性都达到了 99%。因此推测在鸭梨中可能还存在除 *PbPAL1* 和 *PbPAL2* 以外的基因家族成员, 这有待于进一步的研究和证实。通过以上对基因的深入研究, 也有待于将鸭梨 *PAL* 基因信息应用于遗传转化, 基于此, 本研究利用反义 *PAL* 基因遗传转化鸭梨, 为进一步应用于遗传育种奠定基础。

对鸭梨 *PAL* 基因家族基因表达水平分析表明, *PAL* 作为合成酚类物质关键酶参与了鸭梨幼果期木质素和石细胞的合成, 而且在果实发育过程中 *PAL* 基因的表达存在明显差异(闫洪波等, 2014)。以往的研究也证实反义 RNA 技术在转基因鸭梨的愈伤组织以及幼苗中表现出了良好的效果(李会宣等, 2014; 齐靖等, 2014)。本研究得到的 23 株转基因鸭梨苗中, *PAL* 基因的表达量均有所降低, 为对照的 65%~75% 不等, 达到了利用反义 RNA 技术抑制基因表达的效果。虽然都表现出了抑制内源基因表达的作用, 但转基因鸭梨苗中 *PAL* 基因表达降低的幅度不尽相同, 可能与环境或植株个体特异性影响基因的表达有关。鸭梨属于木本科植物, 营养生长期较长, 本研究也只对 *PAL* 基因的反义表达载体转化的鸭梨苗进行了证实和鉴定, 并未能够对转基因植株各个生长期以及植株各个部位的 *PAL* 基因表达情况进行系统检测和研究。因此, 后期研究主要针对转基因鸭梨不同时期、不同部位的 *PAL* 基因的表达情况的分析, 尤其是果实发育期, 对 *PAL* 基因的表达及 *PAL* 的活性进行分析, 为开发鸭梨种质资源和提升果品品质提供理论依据。

## 参考文献:

- CHENG M, YIN M, ZOU HW, et al, 2015. Cloning and expression analysis of COMT gene in *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su fruit [J]. *J Nucl Agric Sci*, 29(3): 454-461. [程敏, 尹梅, 邹鹤伟, 等, 2015. 砀山酥梨果实 COMT 基因的克隆和表达分析 [J]. *核农学报*, 29(3): 454-461.]
- CHEN XY, MENG YX, JIA XX, et al, 2017. Construction of potato tetravalent anti-virus plant expression vector and its tobacco transformation [J]. *Guihaia*, 37(1): 87-95. [陈晓艳, 孟亚雄, 贾小霞, 等, 2017. 四价抗马铃薯病毒植物表达载体构建及其对烟草的转化 [J]. *广西植物*, 37(1):



87-95.

- HAN ML, LIU YL, ZHENG XY, et al, 2010. Construction of a genetic linkage map and QTL analysis for some fruit traits in pear [J]. *J Fruit Sci*, 27(4): 496-503. [韩明丽, 刘永立, 郑小艳, 等, 2010. 梨遗传连锁图谱的构建及部分果实性状 QTL 的定位 [J]. *果树学报*, 27(4): 496-503.]
- HUANG JL, GU M, LAI ZB, et al, 2010. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress [J]. *Plant Physiol*, 153(4): 1526-1538.
- JIAN X, MIAO YM, SUI YH, et al, 2015. Cloning and expression vector construction of cucumber LDC and transformation to tobacco [J]. *Guihaia*, 35(2): 255-260. [简兴, 苗永美, 隋益虎, 等, 2015. 黄瓜 LDC 克隆、表达载体的构建及烟草转化研究 [J]. *广西植物*, 35(2): 255-260.]
- KUMAR A, ELLIS BE, 2001. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. structure, expression, and evolution [J]. *Plant Physiol*, 127(1): 230-239.
- LI GQ, QI J, GAO ZH, et al, 2010. Construction and transformation for antisense expression vector of polyphenol oxidase gene in Yali Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. *J Plant Genet Res*, 11(5): 635-639. [李桂琴, 齐靖, 高志华, 等, 2010. 鸭梨多酚氧化酶基因反义表达载体的构建及农杆菌介导的遗传转化 [J]. *植物遗传资源学报*, 11: 635-639.]
- LI HX, XU DQ, QI J, et al, 2014. The construction of antisense expression vector of pectin methylesterase gene and its transfer to Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. *J Nucl Agric Sci*, 28(4): 597-604. [李会宣, 许冬倩, 齐靖, 等, 2014. 鸭梨果胶甲酯酶基因反义表达载体的构建及转化 [J]. *核农学报*, 28(4): 597-604.]
- LI L, YU JJ, JIN Q, et al, 2011. PPO characterization and a PPO cDNA cloning during the development of stone cell in *Pyrus bretschneideri* cv. [J]. *Acta Las Biol Sin*, 20(3): 353-359. [李玲, 于娟娟, 金青, 等, 2011. 砀山酥梨石细胞发育过程中 PPO 酶学特性及其 cDNA 片段克隆 [J]. *激光生物学报*, 20(3): 353-359.]
- LI WH, FENG JR, TANG ZH, et al, 2017. Correlation analysis of solid stone cell content and expression of *POD4* gene in Korla fragrant pear [J]. *Xinjiang Agric Sci*, 54(1): 60-65. [李文慧, 冯建荣, 唐章虎, 等, 2017. 库尔勒香梨成熟果实石细胞含量与 *POD4* 基因表达量的相关性分析 [J]. *新疆农业科学*, 54(1): 60-65.]
- LIU Y, LU XY, HUANG XD, et al, 2011. Study on correlation among stone cell content, PAL activity and fruit hardness [J]. *Xinjiang Agric Sci*, 48(9): 1597-1601. [刘艳, 鲁晓燕, 黄学东, 等, 2011. 梨石细胞含量与 PAL 活性和果实硬度的相关性研究 [J]. *新疆农业科学*, 48(9): 1597-1601.]
- LIU ZH, ZHANG YX, SHEN LY, et al, 2011. Molecular cloning and sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from Yali [C]. *Res Dev Pear (Five)*. [刘志浩, 张玉星, 申连英, 等, 2011. 鸭梨苯丙氨酸解氨酶基因 cDNA 片段的克隆与序列分析 [C]. *梨科研与生产进展 (五)*.]
- LÜ RH, ZHANG SH, NIE JQ, et al, 2011. The effect of lignin metabolism on the content of stone cells and taste in different genotypes pear [J]. *Acta Las Biol Sin*, 20(6): 765-771. [吕芮宏, 张土鸿, 聂敬全, 等, 2011. 不同基因型梨木质素代谢对石细胞含量和果实口感的影响 [J]. *激光生物学报*, 20(6): 765-771.]
- QI J, DONG Z, ZHANG YX, 2014. Cloning of ACC oxidase gene from Yali pear and transformation of its antisense expression vector with agrobacterium-mediated method [J]. *Plant Divers Res*, 36(5): 622-628. [齐靖, 董祯, 张玉星, 2014. 鸭梨 ACC 氧化酶基因 cDNA 片段的克隆及农杆菌介导的反义遗传转化 [J]. *植物分类与资源学报*, 36(5): 622-628.]
- SHI ZB, WANG YZ, DAI MS, et al, 2011. Application of apple gene sequence for pear primer design [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 34(6): 36-40. [施泽彬, 王月志, 戴美松, 等, 2011. 苹果基因序列在砂梨引物开发中的应用 [J]. *南京农业大学学报*, 34(6): 36-40.]
- TIAN LM, CAO YF, GAO Y, et al, 2011. Effect of stone cells size and flesh texture in pear cultivars [J]. *Acta Horti Sin*, 38(7): 1225-1234. [田路明, 曹玉芬, 高源, 等, 2011. 梨品种果肉石细胞团大小对果肉质地的影响 [J]. *园艺学报*, 38(7): 1225-1234.]
- VANHOLME R, DSEMEDT B, MORREEL K, et al, 2010. Lignin biosynthesis and structure [J]. *Plant Physiol*, 153(3): 895-905.
- WANG B, ZHANG N, YAN CC, et al, 2013. Bagging for the development of stone cell and metabolism of Lignin in *Pyrus bretschneideri* 'Dangshan Suli' [J]. *Acta Horti Sin*, 40(3): 531-539. [王斌, 张楠, 闫冲冲, 等, 2013. 套袋对砀山酥梨果实石细胞发育及木质素代谢的影响 [J]. *园艺学报*, 40(3): 531-539.]
- WANG DY, GAO FY, SUN W, et al, 2015. Cloning and expression analysis of gene in fruit of 'Dangshansuli' [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 38(1): 33-40. [王丹阳, 高付永, 孙炜, 等, 2015. '砀山酥梨' 果实 CCaOAMT 基因的克隆与表达分析 [J]. *南京农业大学学报*, 38(1): 33-40.]
- XU C, FANG ZH, YANG FM, et al, 2015. Analysis of F5H expression and stone cell development in *Pyrus bretschneideri* cv. Dangshan Su Fruit [J]. *Acta Phytophysiol Sin*, 51(5): 778-784. [徐超, 方志, 杨芳梅, 等, 2015. 砀山酥梨果实 F5H 表达与石细胞发育的分析 [J]. *植物生理学报*, 51(5): 778-784.]
- YAN HB, CHENG YD, HE JG, et al, 2014. Cloning of PAL gene in 'Yali' pear and its expression during fruit development and wounding [J]. *Sci Agric Sin*, 47(21): 4341-4348. [闫洪波, 程玉豆, 何近刚, 等, 2014. 鸭梨 PAL 克隆及其在果实发育和机械伤害过程中的表达 [J]. *中国农业科学*, 47(21): 4341-4348.]
- ZOU LH, ZHANG YX, 2012. Correlation analysis of flesh browning between phenolic compound and relevant enzymatic activity in fruit of *Pyrus pyrifolia* [J]. *J Fruit Sci*, 6: 1022-1026. [邹丽红, 张玉星, 2012. 砂梨果肉褐变与酚类物质及相关酶活性的相关性分析 [J]. *果树学报*, 6: 1022-1026.]