

# ACC 氧化酶基因 *AhACO*s 对花生耐盐性的影响

黄建斌<sup>1,2</sup>, 周文杰<sup>1,2</sup>, 房磊<sup>1,2</sup>, 孙明明<sup>1,2</sup>, 李鑫<sup>1,2</sup>, 李晶晶<sup>1,2</sup>, 李晓婷<sup>1,2</sup>,  
唐艳艳<sup>1,2</sup>, 姜德锋<sup>1,2</sup>, 朱虹<sup>1,2</sup>, 隋炯明<sup>1,2</sup>, 乔利仙<sup>1,2\*</sup>

1 青岛农业大学农学院, 山东 青岛 266109

2 青岛农业大学盐碱地高效农业技术产业研究院, 山东 东营 257091

黄建斌, 周文杰, 房磊, 孙明明, 李鑫, 李晶晶, 李晓婷, 唐艳艳, 姜德锋, 朱虹, 隋炯明, 乔利仙. ACC 氧化酶基因 *AhACO*s 对花生耐盐性的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 603-613.

HUANG Jianbin, ZHOU Wenjie, FANG Lei, SUN Mingming, Li Xin, LI Jingjing, LI Xiaoting, TANG Yanyan, JIANG Defeng, ZHU Hong, SUI Jiongming, QIAO Lixian. Effect of ACC oxidase gene *AhACO*s on salt tolerance of peanut[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 603-613.

**摘 要:** ACC 氧化酶(ACC oxidase, ACO)是催化乙烯合成的关键酶之一, 乙烯参与植物的盐胁迫反应过程, 而盐胁迫严重影响花生产量。本研究通过对 *AhACO*s 基因的克隆及功能验证, 探究 *AhACO*s 在花生盐胁迫响应中的生物学功能, 为花生耐盐品种的选育提供基因资源。以花生耐盐突变体 M29 的 cDNA 为模板扩增得到基因 *AhACO1* 和 *AhACO2*, 与植物表达载体 pCAMBIA super1300 重组后, 通过农杆菌介导的花粉管注射法将重组质粒转化到花育 22 号中。收获后切取籽仁远胚端部分子叶, 利用 PCR 检测筛选阳性籽仁。利用 qRT-PCR 分析 *AhACO*s 基因表达量, 通过毛细管柱气相色谱法检测植株的乙烯释放量。阳性籽仁和对照籽仁种植 21 d 后浇盐水, 观察其表型变化。结果发现, 盐胁迫后, 转基因植株生长状况好于对照组花育 22 号, 并且其叶绿素相对含量 SPAD (soil and plant analyzer development)值和净光合速率(net photosynthesis rate, Pn)均高于对照组花生。另外, *AhACO1* 和 *AhACO2* 转基因植株的乙烯释放量分别为对照组花生的 2.79 倍和 1.87 倍。这些结果表明 *AhACO1* 和 *AhACO2* 可显著提高花生的耐盐能力。

**关键词:** 花生; ACC 氧化酶; ACO 基因; 盐胁迫; 乙烯

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR2020MC102); 黄河三角洲国家农高区科技专项(2022SZX24)

This work was supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2020MC102) and the Science and Technology Specific Projects in Agricultural High-tech Industrial Demonstration Area of the Yellow River Delta (2022SZX24).

\*Corresponding author. E-mail: lxqiao73@163.com

Received: 2022-04-25; Accepted: 2022-06-22; Published online: 2022-07-07

## Effect of ACC oxidase gene *AhACO*s on salt tolerance of peanut

HUANG Jianbin<sup>1,2</sup>, ZHOU Wenjie<sup>1,2</sup>, FANG Lei<sup>1,2</sup>, SUN Mingming<sup>1,2</sup>, LI Xin<sup>1,2</sup>, LI Jingjing<sup>1,2</sup>, LI Xiaoting<sup>1,2</sup>, TANG Yanyan<sup>1,2</sup>, JIANG Defeng<sup>1,2</sup>, ZHU Hong<sup>1,2</sup>, SUI Jiongming<sup>1,2</sup>, QIAO Lixian<sup>1,2\*</sup>

1 College of Agriculture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

2 Academy of Dongying Efficient Agricultural Technology and Industry on Saline and Alkaline Land in Collaboration with Qingdao Agricultural University, Dongying 257091, Shandong, China

**Abstract:** ACC oxidase (ACO) is one of the key enzymes that catalyze the synthesis of ethylene. Ethylene is involved in salt stress response in plants, and salt stress seriously affects the yield of peanut. In this study, *AhACO* genes were cloned and their functions were investigated with the aim to explore the biological function of *AhACO*s in salt stress response, and to provide genetic resources for the breeding of salt-tolerant varieties of peanut. *AhACO1* and *AhACO2* were amplified from the cDNA of salt-tolerant peanut mutant M29, respectively, and cloned into the plant expression vector pCambia super1300. The recombinant plasmid was transformed into Huayu22 by pollen tube injection mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. After harvest, the small slice cotyledon was separated from the kernel, and the positive seeds were screened by PCR. The expression of *AhACO* genes was analyzed by qRT-PCR, and the ethylene release was detected by capillary column gas chromatography. Transgenic seeds were sowed and then irrigated with NaCl solution, and the phenotypic changes of 21-day-seedlings were recorded. The results showed that the growth of transgenic plants were better than that of the control group Huayu 22 upon salt stress, and the relative content of chlorophyll SPAD value and net photosynthetic rate (Pn) of transgenic peanuts were higher than those of the control group. In addition, the ethylene production of *AhACO1* and *AhACO2* transgenic plants were 2.79 and 1.87 times higher than that of control peanut, respectively. These results showed that *AhACO1* and *AhACO2* could significantly improve the salt stress tolerance of transgenic peanut.

**Keywords:** peanut; ACC oxidase; *ACO* genes; salt stress; ethylene

花生(*Arachis hypogaea* L.)是我国重要的油料作物和经济作物,不仅是优质植物油脂和蛋白质的重要来源,也是优质食品的生产原料,其产业具有很大的发展潜力<sup>[1-3]</sup>。盐胁迫是限制作物产量的重要因素之一,而我国盐碱地总面积达 9 913 万 hm<sup>2</sup>,约占全国土地面积的 1/10,严重影响了我国的作物产量<sup>[4]</sup>。花生属于中度耐盐碱作物,土壤含盐量超过 0.3%就会影响花生生长发育,造成生长障碍,严重影响花生生产

量<sup>[5]</sup>。因此,解析花生对盐胁迫的应答机制,培育耐盐碱花生对有效利用盐碱地扩展花生种植面积具有重要意义。

近年来,关于花生耐盐胁迫机制的研究时有报道。例如,5-氨基乙酰丙酸能够有效清除植物体内活性氧,缓解活性氧对植株的伤害,提高花生耐盐性<sup>[6]</sup>;通过对土壤微生物的改良,可提高花生种子萌发期耐盐性<sup>[7]</sup>;本实验室发现 *AhLea-D* 基因能够改良花生的耐盐性<sup>[8]</sup>。大

量研究表明, 乙烯在植物生长和逆境胁迫反应中发挥重要作用<sup>[9-13]</sup>, 其中包括盐胁迫<sup>[12]</sup>、缺氧胁迫<sup>[14]</sup>、抗病等<sup>[15]</sup>。乙烯在植物体内合成, 最初底物是甲硫氨酸(methionine, Met), 进一步合成为 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM), 然后 SAM 在 ACC 合成酶(ACC synthase, ACS)的作用下转化为 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), ACC 继续在 ACC 氧化酶(ACC oxidase, ACO)的作用下转化为乙烯。乙烯作为气态的植物激素, 其生物合成主要通过 2 种关键的特异酶 ACS 和 ACO<sup>[16]</sup>。对于这 2 种酶的研究也已展开, 例如 *LcACO1* 基因在百脉根不同组织器官中差异表达, 根中表达量最高, 推测其主要在根的生长发育调节方面发挥作用<sup>[17]</sup>, 向日葵 *HaACO1* 在不同器官及不同 NaCl 浓度、不同时间诱导下存在特异性表达差异<sup>[18]</sup>, ACO 对植物花的寿命<sup>[19]</sup>、种脐开裂<sup>[20]</sup>、雌雄花发育<sup>[21]</sup>等方面可能也有很大影响。*SgACS3* 在调控罗汉果性别表达和花器官形态建成中发挥作用<sup>[22]</sup>。唐宇其等<sup>[23]</sup>对 *ACO* 基因的研究结果发现, 高盐胁迫能诱导粉蕉 *ACO* 基因上调表达, *ACO* 基因参与植物的盐胁迫响应过程得到初步证实。以上研究证明, ACO 和 ACS 在植物生长发育过程中起到重要作用。

目前, 关于花生中的 ACO 和 ACS 基因的研究较少。研究组在前期研究中以平阳霉素为诱变剂, 对花育 22 号胚小叶外植体进行离体诱变, 通过在培养基中添加 NaCl 进行定向筛选, 获得耐盐突变体 M29, 在 0.7% 盐溶液中其发芽率超过 50%, 而诱变亲本的发芽率只有 6.7%。应用 RNA-Seq 技术, 对 M29 及诱变亲本花育 22 号进行转录组测序分析, 筛选到 ACC 氧化酶基因 *AhACO1* 和 *AhACO2* 在 2 个样本间, 以及在盐胁迫处理前后差异表达均达到显著水平。本研究在此基础上, 克隆 *AhACO1*、*AhACO2*

基因并对其蛋白质序列进行生物信息学分析、基因表达载体的构建。进而对 *AhACO*s 基因生物学功能进行验证, 为解析 *AhACO*s 在花生盐胁迫应答机制中的作用提供理论依据, 同时也为花生耐盐品种的选育提供基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及菌液

试验材料包括耐盐突变体 M29 及其诱变亲本花育 22 号。用于质粒扩繁的菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ , 用于花生遗传转化的菌株为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404。植物表达载体为 pCambia super1300。以上所用材料均由青岛农业大学花生分子育种研究室保存。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 制备

选取花生耐盐突变体 M29 的幼叶, 采用生工生物工程(上海)股份有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒(No. B518631)提取幼叶的总 RNA, 采用 TaKaRa 公司 Prime Script TM Reagent Kit with gDNA Eraser (perfect real time) (No. RRO47A)反转录试剂盒, 将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。

### 1.3 基因 *AhACO1*、*AhACO2* 生物信息学分析

通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等在线网站查找, 确定了 25 个 *AhACO*s 基因序列, 与花生野生种基因数据库 PeanutBase 进行序列比对后, 再根据实验室前期的转录组数据结果<sup>[24-25]</sup>, 初步选定与乙烯合成相关的 2 个基因 *AhACO1*、*AhACO2*。利用 ExPASy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) 分析了花生 *AhACO1* 和 *AhACO2* 蛋白的理化性质。在 NCBI BLAST 这 2 个基因的同源基因, 通过 MEGA 11 软件分析与其他物种的蛋白进化关系, 并构建

生物进化树。

#### 1.4 *AhACO1*、*AhACO2* 克隆

通过 Primer 5 软件设计基因 *AhACO1*、*AhACO2* 的引物(表 1),以花生耐盐突变体 M29 的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增获得 *AhACO1*、*AhACO2* 的扩增产物,通过凝胶电泳分离,用艾科瑞生物公司的 SteadyPure DNA 凝胶回收试剂盒(No. AG21005)回收和纯化 PCR 产物,纯化后连接到 TaKaRa 公司的 pMD 18-T Vector,转入 DH5 $\alpha$ ,挑菌培养后经 PCR 鉴定,用 Vazyme 公司的 FastPure Plasmid Mini Kit (DC201)提取质粒,经过酶切进一步验证,并在南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

#### 1.5 表达载体的构建及双酶切鉴定

以带有连接表达载体酶切位点的合成序列为引物,以质粒为模板进行 PCR 扩增,克隆目的片段,用艾科瑞生物公司的 SteadyPure DNA 凝胶回收试剂盒(No. AG21005)回收和纯化 PCR 产物,与 pCAMBIA super1300 载体重组,构建 pCAMBIA super1300-*AhACO1* 和 pCAMBIA super1300-*AhACO2* 表达载体。将重组质粒导入大肠杆菌后,用 LB 培养基培养,挑单克隆菌落进行菌液 PCR 扩增, *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定,鉴定片段大小正确后,在生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果进行序列比对,将序列比对正确的单克隆菌液进行扩繁并提取质粒,另加甘油在-80 °C 冰箱

保存以备后期使用。将序列比对正确的重组质粒导入农杆菌后,用 YEB 培养基培养,挑取单克隆菌落进行菌液 PCR 鉴定,选择鉴定片段大小正确的单克隆菌落进行扩繁并保菌。

#### 1.6 花生遗传转化

将上述得到的农杆菌菌液接种到含 Kan 和 Rif 的 45 mL YEB 液体培养基中,培养至  $OD_{600}=0.8$ ,分出 2 mL 进行 4 °C 保菌(用于下一次菌液扩繁),剩余菌液 5 000 r/min 离心 5 min 后,去除上清液,加入侵染液将菌体悬浮。于当日 8:00 之前,使用注射器将侵染液注射到‘花育 22 号’开放花朵的龙骨瓣内,开放的花朵于当天枯萎,第 2 天注射到新开放花朵的龙骨瓣内,整个转化过程为 14 d 左右,随后对伸长的果针进行绑绳标记<sup>[26]</sup>。

#### 1.7 转基因阳性籽仁的筛选

收获注射后绑绳标记的荚果籽仁,用刀片切取籽仁远胚端一侧子叶约 20 mg,用 CTAB 法提取籽仁 DNA,利用 pCAMBIA super1300 上的潮霉素基因序列设计特异性引物 H1(表 1),扩增目的片段为 734 bp。用重组 pCAMBIA super1300 质粒作阳性对照,未进行遗传转化的花育 22 号籽仁作阴性对照,进行特异性 PCR 扩增鉴定,转基因籽仁的切口用石蜡封闭后保存。

#### 1.8 气相色谱法测定花生内源乙烯释放量

将鉴定为转基因阳性的籽仁以及作为对照的花育 22 号籽仁在人工气候室培育约 21 d,每株花生取等鲜重的叶片,置于 1.5 mL EP 管中,封口膜密封并避光保存,用气相色谱法进行花生乙烯释放量的测定,花育 22 号、*AhACO1* 和 *AhACO2* 转基因花生各进行 3 次重复。

气相色谱环境: GC-2010 (GAS CHROMATOGRAPH)型气相色谱仪;氢离子火焰(FID)检测器,柱温 45 °C; HP-55%

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Primer sequences (5'→3')
AhACO1-F	GACTCAGCGAAAACATGGAGA
AhACO1-R	GGTTTAGACAGTTGCAATGGGA
AhACO2-F	ACCATGGCAATCCACTCTTCT
AhACO2-R	TTCACAATCGGCTTCTCTTTTG
H1-F	ACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGA
H1-R	TGCCTCCGCTCGAAGTAGC

Phenylmethylsiloxane 色谱柱, 检测器温度 200 °C; 燃气 H<sub>2</sub> 流速 30 mL/min, 助燃空气流速 400 mL/min, 载气 N<sub>2</sub> 流速 15 mL/min, 不分流进样, 进样量保留时间 2 min。进样量为 1 mL, 重复进样 2 次。

在实际测定时, 环境因素所造成的误差对测定结果的影响可以忽略不计。采用相同的气相色谱条件对乙烯样品进行测定, 以及测定花生叶圆片的干重和顶空瓶的重量。通过计算得出样品中乙烯总浓度、释放量、每干重圆片的乙烯释放量(各 3 个重复)。

乙烯浓度测定公式:

单位鲜重样品的乙烯浓度=标准乙烯气体浓度(mg/L)×气样中峰面积/标准乙烯气体峰面积/花生叶片鲜重(g)。

### 1.9 花生盐胁迫处理及表型鉴定

在青岛农业大学温室培养花生, 培养基质为品氏泥炭土: 砂土: 普通土壤(1:1:1), 培养条件均为(25±1) °C, 光照时间为 13 h, 光照强度为 2 000 lx。生长约 21 d 的花生植株, 浇灌 250 mmol/L 的 NaCl 溶液至花盆, 待花盆中有

盐水流出现时, 停止浇灌。每 3 天浇灌一次, 出现表型差异时, 使用叶绿素快速测定仪(SPD502)测定对照和转基因植株的叶绿素相对含量和净光合速率, 在上午 9:00 和中午 12:00 之间进行测量。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AhACO1* 和 *AhACO2* 蛋白的生物信息学分析

*AhACO1* 蛋白的氨基酸序列长度为 320 aa, 分子量为 36.14 kDa, 等电点为 5.51, 是酸性蛋白质。亲水性-0.311, 为亲水性蛋白, 蛋白的不稳定指数是 36.06, 即该蛋白是稳定的。*AhACO2* 蛋白的氨基酸序列长度为 439 aa, 分子量为 48.21 kDa, 等电点为 8.86, 是碱性蛋白质。亲水性-0.027, 为亲水性蛋白, 蛋白的不稳定指数是 35.51。通过 MEGA 11 对 *AhACO1* 蛋白家族进行序列比对, 结果可见, 2 个蛋白分别与野生及栽培花生中的相应蛋白在进化关系上最近, 与其他物种的蛋白进化关系较远(图 1)。

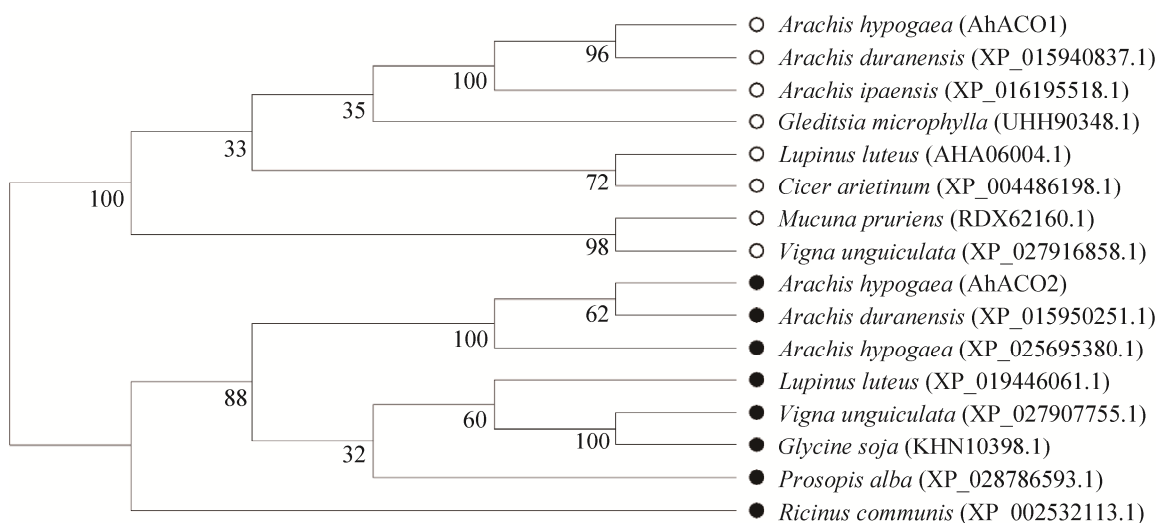


图 1 *AhACO1*、*AhACO2* 氨基酸序列比对和进化树分析

Figure 1 Amino acid sequence alignment and phylogenetic tree analysis of *AhACO1* and *AhACO2*.

## 2.2 基因 *AhACO1*、*AhACO2* 的克隆

以反转录后得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物鉴定结果表明, *AhACO1* 和 *AhACO2* 的 PCR 扩增结果与目的片段 963 bp 和 1 320 bp 大小一致(图 2)。

## 2.3 重组表达载体的构建及双酶切验证

对转入重组质粒的大肠杆菌及农杆菌进行 PCR 扩增鉴定, 结果显示, 扩增获得片段的长度分别为 963 bp 和 1 320 bp, 表明重组质粒成功转入大肠杆菌和农杆菌(图 3)。用 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定重组质粒, 鉴定结果与预期相符(图 4)。

## 2.4 转基因阳性籽仁的鉴定

切取转化后收获的籽仁远胚端部分子叶,

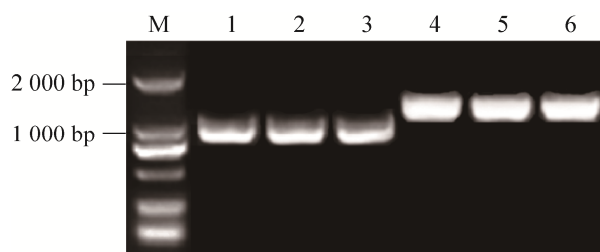


图 2 *AhACO1* 基因和 *AhACO2* 基因的 PCR 扩增结果

Figure 2 PCR amplification of *AhACO1* and *AhACO2* gene. M: DL2000 Marker; 1-3: *AhACO1*; 4-6: *AhACO2*.

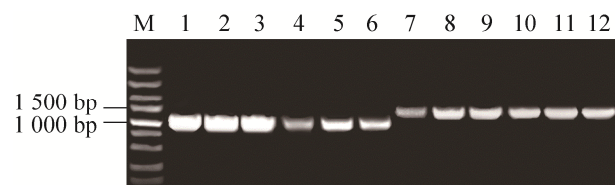


图 3 *AhACO1*、*AhACO2* 转化大肠杆菌、农杆菌的菌液 PCR 鉴定

Figure 3 PCR identification of *AhACO1* and *AhACO2* transformed *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens*. M: DL2000 Marker; PCR identification of *AhACO1* transformed *E. coli* (1-3) and *A. tumefaciens* (4-6); PCR identification of *AhACO2* transformed *E. coli* (7-9) and *A. tumefaciens* (10-12).

提取 DNA 进行 PCR 扩增, 鉴定筛选转基因阳性籽仁(图 5)。结果表明, *AhACO1* 转基因花生籽仁阳性率为 55.1% (54/98), *AhACO2* 转基因花生籽仁阳性率为 58.3% (42/72)。

## 2.5 *AhACO1*、*AhACO2* 基因的表达量分析

通过 qRT-PCR 技术对转基因花生中的 *AhACO1*、*AhACO2* 基因进行相对表达量的测定。利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算方法对 qRT-PCR 的结果进行统计分析, 结果表明, *AhACO1*、*AhACO2* 基因在 3 株转基因花生中的相对表达量约为对照组花育 22 号的 2-3 倍, 基因表达量增加极显著(图 6)。

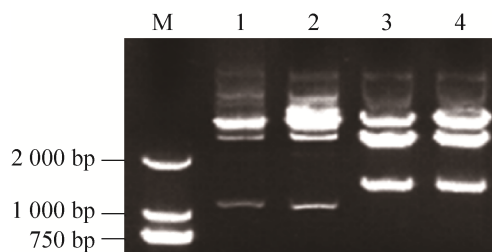


图 4 *AhACO1*、*AhACO2* 表达载体的 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切验证

Figure 4 Verification of *AhACO1* and *AhACO2* expression vectors by *Kpn* I and *Sac* I digestion. M: DL2000 Marker; 1: ACO1-1; 2: ACO1-2; 3: ACO2-1; 4: ACO2-2.

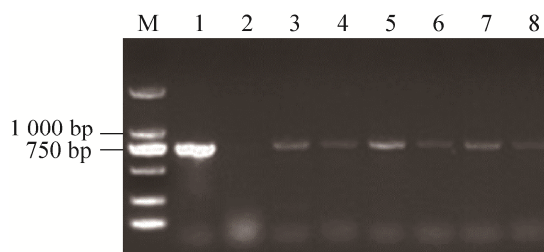


图 5 *AhACO1* 和 *AhACO2* 转基因籽仁鉴定

Figure 5 Identification of *AhACO1* and *AhACO2* transgenic seeds. M: DL2000 Marker; 1: Recombinant pCambia super1300 plasmid positive control; 2: Huayu22 leaf DNA negative control; 3-5: *AhACO1* transgenic seeds; 6-8: *AhACO2* transgenic seeds.



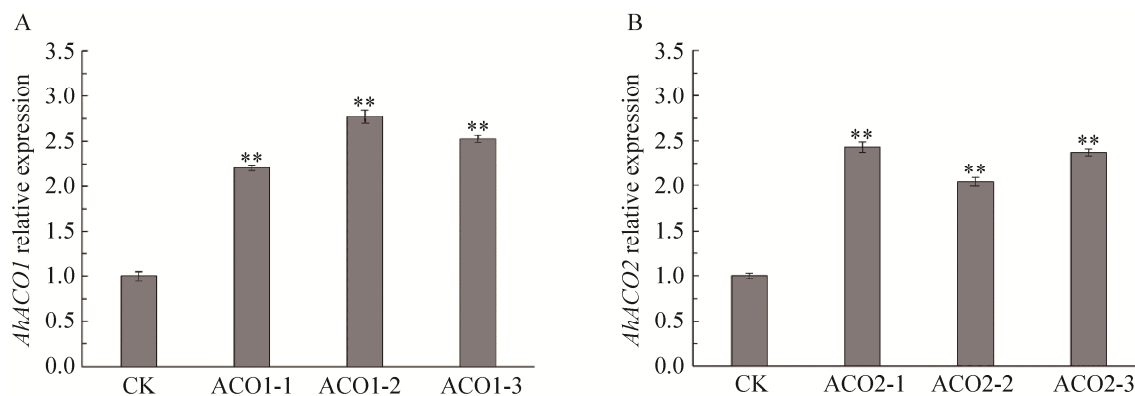


图6 转基因植株中 *AhACO1* 和 *AhACO2* 基因的表达量检测

Figure 6 The expression of *AhACO1* and *AhACO2* in transgenic plants. \*\*: Compared with CK group, the difference was extremely significant ( $P < 0.01$ ).

## 2.6 气相色谱法测定转基因花生的乙烯释放量

通过气相色谱法对 *AhACO1*、*AhACO2* 转基因花生进行乙烯浓度的测定, 结果表明, *AhACO1*、*AhACO2* 转基因花生叶片单位鲜重的乙烯释放量浓度分别为对照组花育 22 号浓度的 2.79 倍和 1.87 倍。转基因花生内源乙烯的释放量浓度与对照组相比增加极显著(图 7), 表明 *AhACO1*、*AhACO2* 的表达可以促进花生内源乙烯的合成和释放。

## 2.7 转基因花生耐盐性分析

使用 250 mmol/L 的 NaCl 溶液对花育 22 号

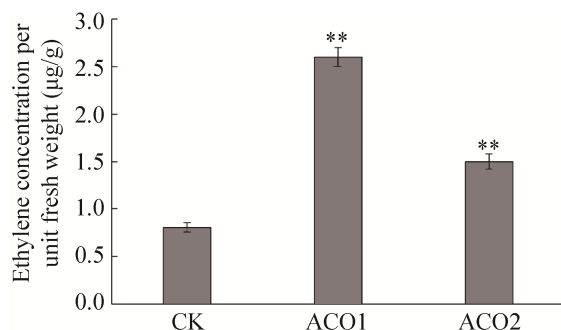


图7 花生叶片单位鲜重的乙烯浓度

Figure 7 Ethylene concentration per unit fresh weight of peanut leaves. \*\*: Compared with CK group, the difference was extremely significant ( $P < 0.01$ ).

和 *AhACO1*、*AhACO2* 转基因花生植株进行盐胁迫处理后, 对照组花育 22 号叶片表现出显著的萎蔫现象, 而转基因花生生长状况较好, 仅表现为局部失水; 测定结果显示, 转基因花生的 SPAD 和 Pn 均大于对照组花育 22 号(图 8)。表明, *AhACO1* 和 *AhACO2* 转基因花生的耐盐性强于对照组花育 22 号。

## 3 结论与讨论

植物在漫长的自然选择中, 逐步筛选出了抗逆的许多优良基因。当植物遭受盐胁迫时, 会发生多种胁迫应答反应, 其中抗盐胁迫的基因表达量必然会上升。前人对粉蕉的研究中, 高盐处理下同样能诱导 *MbACO2* 上调表达<sup>[23]</sup>。Kolarič 等<sup>[27]</sup>的研究发现 *ACO1* 基因的高表达加速了果实脱落进程, *ACO* 基因通过促进乙烯合成调控着植物器官的形成发育<sup>[28]</sup>, 是催化植物乙烯生物合成的最后一步<sup>[29]</sup>, 影响着植物的乙烯含量, 进而影响植物的抗逆能力。本研究通过在花生中过表达 *AhACO1*、*AhACO2* 基因, 提高了花生的抗盐胁迫能力, 这表明 *ACO* 基因可能通过增加内源乙烯含量而参与了转基因植株盐胁迫响应。目前, 普遍认为乙烯合成及乙烯

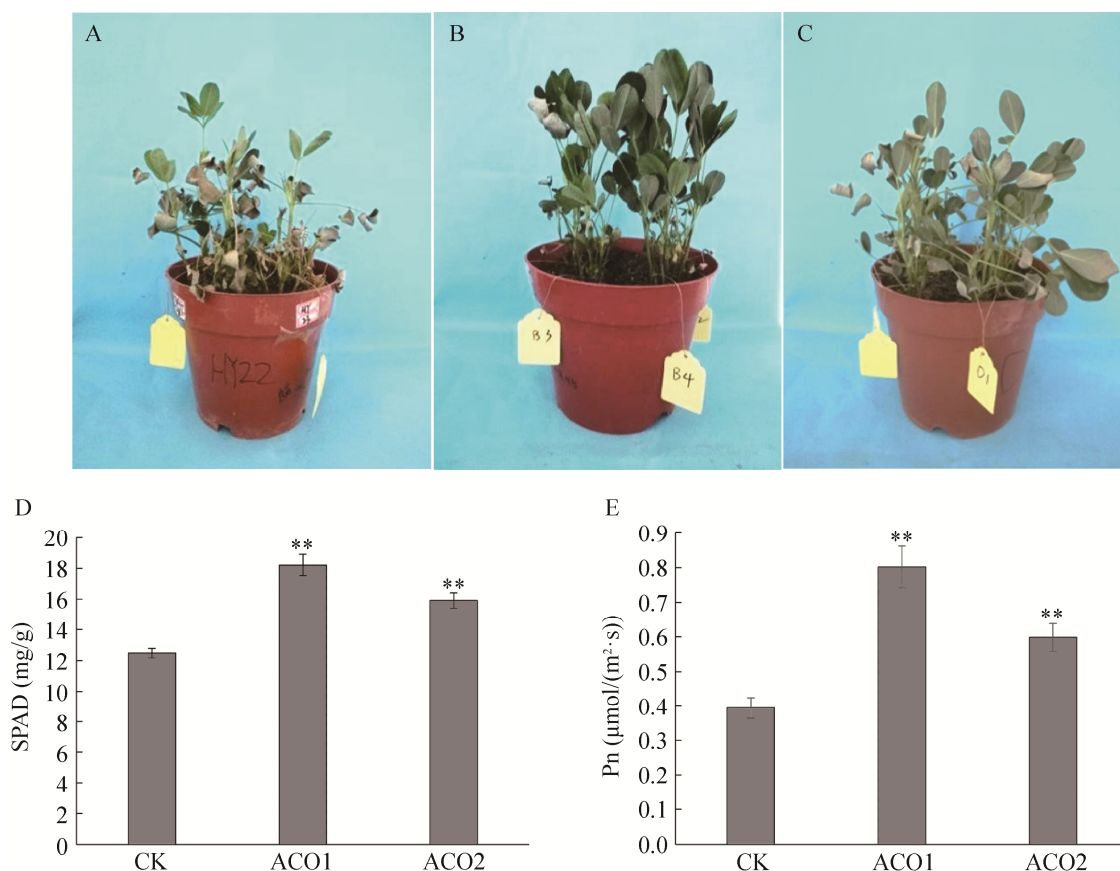


图8 *AhACOs* 转基因花生的耐盐性和生理指标检测

Figure 8 Detection of salt tolerance and physiological indexes of *AhACOs* transgenic peanut. Phenotypes of HY22 (A), *AhACO1* transgenic plant (B), and *AhACO2* transgenic plant (C) treated by salt stress; relative chlorophyll content (SPAD) (D) and net photosynthetic rate (Pn) (E) of plants treated with salt stress for 48 h. \*\*: Compared with CK group, the difference was extremely significant ( $P < 0.01$ ).

信号转导途径参与了植物的盐胁迫过程,并在盐响应过程中起着正调控的作用<sup>[30]</sup>,施加外源乙烯,也能显著提高植物的抗盐性<sup>[31]</sup>。这与本研究结果相一致,即花生内源乙烯含量增加,植株的耐盐能力增强。但在番茄的研究中有不同的结论,符秀梅等<sup>[32]</sup>对番茄施加外源乙烯处理,抑制了其幼苗的生长,并加重番茄幼苗受盐胁迫的伤害程度,这说明乙烯调控途径多样、机理复杂,可能存在多种调控结果途径。

目前,已经鉴定到许多乙烯应答因子参与盐胁迫应答,乙烯从受体到CTR1、EIN2、EIN3等这一系列成员均参与植物的盐胁迫应答<sup>[33]</sup>。

CTR1 是受体下游的一个负调控因子,它激活了乙烯信号通路,并表现出较强的耐盐胁迫能力,尤其是对高盐的耐性更加明显<sup>[34]</sup>。在拟南芥种子萌发以及后期的生长发育过程中,功能缺失型的 CTR1 突变体都表现出较强的耐盐性<sup>[30]</sup>。EIN2 在 CTR1 下游,其功能缺失突变体的乙烯信号通路中断,在种子萌发、幼苗期以及后期营养生长阶段都表现出对盐胁迫超敏感的表现,说明 EIN2 是乙烯信号途径的正调控因子<sup>[32]</sup>。EIN3 位于 EIN2 下游,是乙烯信号途径另一个重要因子<sup>[35]</sup>,研究表明,功能缺失型突变体 *ein3-1* 与野生型相比,表现出对



盐胁迫特别是高盐胁迫的敏感性增加<sup>[36-37]</sup>。虽然现在已经鉴定到许多乙烯应答因子参与盐胁迫应答,但对于具有复杂调控网络的高等植物来说,还有更多的调节因子及调控途径有待挖掘<sup>[31]</sup>。本研究检测到 *AhACO1*、*AhACO2* 转基因植株相较于对照组的乙烯含量增加,并且耐盐能力提高显著,这将对探索乙烯应答因子参与盐胁迫应答通路的研究提供一定的借鉴意义。

本研究从耐盐突变体 M29 中克隆 *AhACO1*、*AhACO2* 基因,并将其转入花育 22 号中,通过 qRT-PCR 检测植株基因表达量,通过气相色谱法检测其乙烯含量,盐胁迫处理后观察其表型。发现转基因花生中 *AhACO1*、*AhACO2* 基因表达量和乙烯含量较对照组增加显著,盐胁迫处理后,对照组花育 22 号萎蔫,而转基因花生生长状况较好。本研究结果初步证明了过量表达 *AhACO1* 和 *AhACO2* 可显著提高花生的耐盐能力。

## REFERENCES

- [1] 廖伯寿. 我国花生生产发展现状与潜力分析[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(2): 161-166.  
LIAO BS. A review on progress and prospects of peanut industry in China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42(2): 161-166 (in Chinese).
- [2] 王瑞元. 我国花生生产、加工及发展情况[J]. 中国油脂, 2020, 45(4): 1-3.  
WANG RY. Production, processing and development of peanut in China[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(4): 1-3 (in Chinese).
- [3] 张立伟, 王辽卫. 我国花生产业发展状况、存在问题及政策建议[J]. 中国油脂, 2020, 45(11): 116-122.  
ZHANG LW, WANG LW. Development status, existing problems and policy recommendations of peanut industry in China[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(11): 116-122 (in Chinese).
- [4] 朱建峰, 崔振荣, 吴春红, 邓丞, 陈军华, 张华新. 我国盐碱地绿化研究进展与展望[J]. 世界林业研究, 2018, 31(4): 70-75.  
ZHU JF, CUI ZR, WU CH, DENG C, CHEN JH, ZHANG HX. Research advances and prospect of saline and alkali land greening in China[J]. World Forestry Research, 2018, 31(4): 70-75 (in Chinese).
- [5] 温赛群, 袁光, 张智猛, 张冠初, 慈敦伟, 丁红, 徐扬, 姜常松, 戴良香. 花生品种苗期耐盐性评价与筛选[J]. 农学学报, 2021, 11(6): 29-35.  
WEN SQ, YUAN G, ZHANG ZM, ZHANG GC, CI DW, DING H, XU Y, JIANG CS, DAI LX. Salt tolerance of peanut varieties at seedling stage: assessment and screening[J]. Journal of Agriculture, 2021, 11(6): 29-35 (in Chinese).
- [6] 杨莎, 赵路颖, 宋珊珊, 李新国, 万书波. 5-氨基乙酰丙酸调控花生耐盐性的生理机制研究[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(6): 1035-1042.  
YANG S, ZHAO LY, SONG SS, LI XG, WAN SB. Mechanism of 5-aminolevulinic acid on salt tolerance in peanut[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42(6): 1035-1042 (in Chinese).
- [7] XU Y, ZHANG D, DAI LX, DING H, CI DW, QIN FF, ZHANG GC, ZHANG ZM. Influence of salt stress on growth of spermosphere bacterial communities in different peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars[J]. Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(6): 2131.
- [8] 姜平平, 潘雷雷, 黄建斌, 纪红昌, 唐艳艳, 于明洋, 朱虹, 隋炯明, 王晶珊, 乔利仙. 花生 AhLea-D 基因的克隆及耐盐性验证[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(5): 811-822.  
JIANG PP, PAN LL, HUANG JB, JI HC, TANG YY, YU MY, ZHU H, SUI JM, WANG JS, QIAO LX. Cloning and salt tolerance validation of AhLea-D gene in peanut (*Arachis hypogaea*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(5): 811-822 (in Chinese).
- [9] DUBOIS M, van DEN BROECK L, INZÉ D. The pivotal role of ethylene in plant growth[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(4): 311-323.
- [10] ZHAO H, YIN CC, MA B, CHEN SY, ZHANG JS. Ethylene signaling in rice and Arabidopsis: new regulators and mechanisms[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(1): 102-125.
- [11] LI WY, MA MD, FENG Y, LI HJ, WANG YC, MA YT, LI MZ, AN FY, GUO HW. EIN2-directed translational regulation of ethylene signaling in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2015, 163(3): 670-683.
- [12] QIN H, WANG J, CHEN X, WANG F, PENG P, ZHOU Y, MIAO Y, ZHANG Y, GAO Y, QI Y, ZHOU J, HUANG R. Rice OsDOF15 contributes to ethylene-inhibited primary root elongation under salt

- stress[J]. *New Phytologist*, 2019, 223(2): 798-813.
- [13] PANDEY BK, HUANG G, BHOSALE R, HARTMAN S, STURROCK CJ, JOSE L, MARTIN OC, KARADY M, VOESENEK LACJ, LJUNG K, LYNCH JP, BROWN KM, WHALLEY WR, MOONEY SJ, ZHANG D, BENNETT MJ. Plant roots sense soil compaction through restricted ethylene diffusion[J]. *Science*, 2021, 371(6526): 276-280.
- [14] HARTMAN S, SASIDHARAN R, VOESENEK LACJ. The role of ethylene in metabolic acclimations to low oxygen[J]. *New Phytologist*, 2021, 229(1): 64-70.
- [15] 赵玉丹, 朱晓颖, 徐国娟, 王旭丽. 乙烯信号传导途径因子 OsEIL6 调控水稻抗稻瘟病反应[J]. *植物保护*, 2020, 46(4): 12-18.
- ZHAO YD, ZHU XY, XU GJ, WANG XL. OsEIL6 is involved in regulating rice resistance to *Magnaporthe oryzae*[J]. *Plant Protection*, 2020, 46(4): 12-18 (in Chinese).
- [16] PATTYN J, VAUGHAN-HIRSCH J, van de POEL B. The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry[J]. *New Phytologist*, 2021, 229(2): 770-782.
- [17] 马兰. 百脉根 ACC 氧化酶基因 LcACO1 的克隆及序列分析[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(2): 447-453.
- LAN M. Cloning and sequence analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase gene *LcACO1* from *Lotus corniculatus*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(2): 447-453 (in Chinese).
- [18] 孙瑞芬, 张艳芳, 郭树春, 于海峰, 李素萍, 乔慧蕾, 聂惠, 安玉麟. 向日葵 ACC 氧化酶基因(*HaACO1*)的克隆及表达分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(9): 21-27.
- SUN RF, ZHANG YF, GUO SC, YU HF, LI SP, QIAO HL, NIE H, AN Y. Cloning and expression analysis of ACC oxidase gene (*HaACO1*) from sunflower (*Helianthus annuus* L.)[J]. *China Biotechnology*, 2015, 35(9): 21-27 (in Chinese).
- [19] PIYANUCH S, van DOORN WOUTER G, WACHIRAYA I, PARICHART B, SERMSIRI C. *Dendrobium* orchids carrying antisense ACC oxidase: small changes in flower morphology and a delay of bud abortion, flower senescence, and abscission of flowers[J]. *Transgenic Research*, 2020, 29(4): 429-442.
- [20] GRACIA Z, ANUPREET K, VODKIN LILA O. Overexpression of an ethylene-forming ACC oxidase (*ACO*) gene precedes the Minute Hilum seed coat phenotype in *Glycine max*[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 716.
- [21] SOMYONG S, POOPEAR S, SUNNER SK, WANLAYAPORN K, JOMCHAI N, YOOCHA T, UKOSKIT K, TANGPHATSORNRUANG S, TRAGOONRUNG S. ACC oxidase and miRNA 159a, and their involvement in fresh fruit bunch yield (FFB) via sex ratio determination in oil palm[J]. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2016, 291(3): 1243-1257.
- [22] 曾娜霞, 胡姗姗, 郝庆林, 辛佳佳, 周琼, 李刚. 罗汉果乙烯合成关键酶基因 SgACS3 的克隆及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(5): 784-792.
- ZENG NX, HU SS, HAO QL, XIN JJ, ZHOU Q, LI G. Cloning and expression analysis of ACC synthase gene (*SgACS3*) from *Siraitia grosvenorii*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(5): 784-792 (in Chinese).
- [23] 唐宇其, 颜彦, 李美英, 胡伟. 粉蕉 *MbACO2* 基因克隆及其表达分析[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(1): 155-162.
- TANG YQ, YAN Y, LI MY, HU W. Cloning and expression analysis of *MbACO2* gene in *Musa* ABB group, cv Pisang Awak, FJ[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(1): 155-162 (in Chinese).
- [24] 潘雷雷, 纪红昌, 黄建斌, 淮东欣, 雷永, 隋炯明, 唐艳艳, 朱虹, 姜德锋, 王晶珊, 乔利仙. 花粉管通道和农杆菌介导的花生 *AhFatB* 基因编辑[J]. *华北农学报*, 2020, 35(4): 64-70.
- PAN LL, JI HC, HUANG JB, HUAI DX, LEI Y, SUI JM, TANG YY, ZHU H, JIANG DF, WANG JS, QIAO LX. *AhFatB* gene editing using pollen-tube pathway and *Agrobacterium* mediated method in peanut[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2020, 35(4): 64-70 (in Chinese).
- [25] SUI JM, JIANG PP, QIN GL, GAI SP, ZHU D, QIAO LX, WANG JS. Transcriptome profiling and digital gene expression analysis of genes associated with salinity resistance in peanut[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2018, 32: 19-25.
- [26] SUI J, JIANG D, ZHANG D, SONG X, WANG J, ZHAO M, QIAO L. The salinity responsive mechanism of a hydroxyproline-tolerant mutant of peanut based on digital gene expression profiling analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162556.
- [27] KOLARIČ J, MAVRIČ PLEŠKO I, STOPAR M. The expression of MdACO1: impact on 'Golden Delicious' apple fruitlet abscission development[J]. *Acta Horticulturae*, 2016(1138): 9-18.
- [28] 张萍, 王斐, 孙辉, 李鸿彬. 棉花 *GhA COI* 基因植物

- 表达载体构建及拟南芥遗传转化[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 19-22.
- ZHANG P, WANG F, SUN H, LI HB. Construction of plant expression vector of cotton *GhA COI* and genetic transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Biology, 2011, 28(6): 19-22 (in Chinese).
- [29] SYBILLE T, EUGÉNIE F, CHRISTOPHE D, PASCAL M, EMILIEN E, MARC M, MARLÈNE M, VALÉRIE B, THIERRY T, JALILA SA. Chemical modification of 1-aminocyclopropane carboxylic acid (ACC) oxidase: cysteine mutational analysis, characterization, and bioconjugation with a nitroxide spin label[J]. Molecular Biotechnology, 2019, 61(9): 650-662.
- [30] ACHARD P, CHENG H, de GRAUWE L, DECAT J, SCHOUTTETEN H, MORITZ T, van der STRAETEN D, PENG JR, HARBERD NP. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals[J]. Science, 2006, 311(5757): 91-94.
- [31] 张丽霞, 李国婧, 王瑞刚, 黄荣峰. 乙烯调控植物耐盐性的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(9): 1-7.
- ZHANG LX, LI GJ, WANG RG, HUANG RF. Advance on ethylene regulation in plant response to salt stress[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(9): 1-7 (in Chinese).
- [32] 符秀梅, 李小靖, 吴辉, 朱红林, 韩杜, 夏幽泉, 陈银华. 外源乙烯对盐胁迫下番茄种子萌发与幼苗生长的影响[J]. 河南农业科学, 2010, 39(4): 79-82.
- FU XM, LI XJ, WU H, ZHU HL, HAN D, XIA YQ, CHEN YH. Effects of exogenous ethylene on germination and seedling growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* miller) under NaCl stress[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010, 39(4): 79-82 (in Chinese).
- [33] 王娟, 黄荣峰. 乙烯调控植物耐盐性的研究进展[J]. 植物生理学报, 2015, 51(10): 1567-1572.
- WANG J, HUANG R. Regulation of ethylene in plant salt tolerance[J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(10): 1567-1572 (in Chinese).
- [34] WANG YN, LIU C, LI KX, SUN FF, HU HZ, LI X, ZHAO YK, HAN CY, ZHANG WS, DUAN YF, LIU MY, LI X. *Arabidopsis* EIN<sub>2</sub> modulates stress response through abscisic acid response pathway[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64(6): 633-644.
- [35] CAO WH, LIU J, HE XJ, MU RL, ZHOU HL, CHEN SY, ZHANG JS. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses[J]. Plant Physiology Journal, 2007, 143(2): 707-719.
- [36] LEI G, SHEN M, LI ZG, ZHANG B, DUAN KX, WANG N, CAO YR, ZHANG WK, MA B, LING HQ, CHEN SY. EIN<sub>2</sub> regulates salt stress response and interacts with a MA3 domain-containing protein ECIP<sub>1</sub> in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell and Environment, 2011, 34(10): 1678-1692.
- [37] SHUICHI Y, SANG-DONG Y, JEN S. Differential regulation of EIN<sub>3</sub> stability by glucose and ethylene signalling in plants[J]. Nature, 2003, 425(6957): 521-525.

(本文责编 郝丽芳)