

导入 β -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因 可育油菜及其抗菌核病的研究

蓝海燕^{1,3} 王长海³ 张丽华¹ 刘桂珍¹ 王岚兰¹ 陈正华¹ 田颖川²

¹(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

²(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

³(新疆农业科学院经济作物研究所 乌鲁木齐 830000)

摘 要 利用农杆菌转化法,将组成型表达 β -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的双价植物表达载体 pBLGC 转化优质甘蓝型油菜品种 H165,并得到了抗卡那霉素(Kanamycin,Kan)的再生植株。我们对所得到的抗 Kan 的再生苗进行了初步分子生物学检测,结果表明,在 K15(Kan 15mg/L)培养基上的绿苗中有 30% 为 PCR 阳性植株,而在 K25 (Kan 10mg/L)培养基上的绿苗有 53% 的阳性率。对部分 PCR 阳性的转基因植株进行了点杂交分析,结果均表现出较强的杂交信号,这初步说明外源基因已整合到油菜基因组中。转基因植株的活体接种油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)试验表明,部分转基因植株比对照显示较强抗病性。

关键词 几丁质酶基因, β -1,3-葡聚糖酶基因, 转基因油菜, 抗菌核病, 农杆菌介导
中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0142-05

油菜是我国主要的油料作物,对于它的改良是育种专家们一直努力的目标。近年来,随着基因工程技术的发展以及油菜转化体系的建立,人们愈来愈倾向于通过基因工程的手段改良油菜的产量、品质及抗逆性^[1~3]。真菌病尤其是菌核病是甘蓝型油菜的主要病害,它严重影响着油菜的产量和品质,尤其是“双低”油菜品种由于降低了硫苷(一种十字花科植物体内先天存在的抗真菌物质)的含量使其更易感染真菌病害。目前通过传统育种方法在寻找抗源方面仍存在问题,因此利用基因工程技术以及已建立的油菜遗传转化体系,在导入抗真菌病基因从而改良油菜抗病性方面具有其独特的意义。Grisson 等人利用组成型表达的几丁质酶基因转化油菜,使其对一些真菌性病害的抗性增强^[4,5]。目前用几丁质酶和葡聚糖酶基因同时转化植物从而提高其抗病性的研究也已在烟草中取得成功^[6]。基于这一事实,我们将几丁质酶和葡聚糖酶基因的双价植物表达载体导入油菜,从中筛选抗病植株。目前已得到部分抗 Kan 再生油菜植株,并进行了初步分子生物学检测及抗病鉴定工作,以期为今后培育抗菌核病的油菜品种打下基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

转化材料为中科院遗传所经济作物细胞工程室与其协作单位选育的优质高产“双低”甘蓝型油菜品种 H165。

1.2 菌种与质粒

双价植物表达载体 pBLGC(含 β -1,3-葡聚糖酶与几丁质酶基因)为中国科学院微生物所田颖川先生实验室与遗传所陈正华先生实验室共同构建。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 由微生物所提供。

1.3 酶与试剂

各种限制酶及 DNA 修饰酶分别购自 Boehringer Mannheim、BRL、Bio-Lab 及 Promega 等公司;Taq DNA 聚合酶为微生物所 306 组自制。Dig DNA Labelling Kit 购自 Boehringer Mannheim 公司,卡那霉素(Kanamycin)、羧苄青霉素(Carbenicillin)、6-BA、NAA 为 Sigma 公司产品,利福平(Rifampicin)购自 Boehringer Mannheim 公司。其它生化试剂分别购自国内外有关厂家和公司。

1.4 PCR 引物

检测 β -1,3-葡聚糖酶基因的引物为:5'端引物:5'-GC-GGATCCGACCATGG-CTGC-TATCACAC-TCC-3';3'端引物:5'-CG-GTCGACTCACA TCT-CACT-TACGAGA-3'。检测几丁质酶基因的引物为:5'端(为35S启动子)引物:5'-CTGACGTAAGGGATGACGC-3';3'端引物:5'-GGGATGACA GTG TCA CTGAG-3'。

1.5 农杆菌介导的油菜遗传转化

将萌发4~5d的油菜无菌苗的子叶柄或下胚轴通过含有目的基因的农杆菌介导感染,在含8mg/L Kan的筛选培养基中培养2~4周。当外植体分化出小绿芽并长至1cm高时,将其切下转入含有15mg/L Kan筛选培养基中。一个月后将一部分绿苗再转入25mg/L Kan的筛选培养基中,而另一部分绿苗转入生根培养基中。在25mg/L Kan培养基中筛选一个月所得绿苗则转入生根培养基中,当根系较发达时移至花盆中。

1.6 油菜再生苗的PCR检测

1.6.1 植物总DNA提取:采用CTAB微量提取法。具体参照文献[7]方法进行。

1.6.2 油菜再生苗的PCR分析:取以上制备的总DNA 100~500ng,分别用检测 β -1,3-葡聚糖酶cDNA及几丁质酶cDNA的引物,按标准反应程序进行扩增。反应总体积20 μ L。具体条件为:(1)94 $^{\circ}$ C 3min (2)94 $^{\circ}$ C 1min;55 $^{\circ}$ C 1min;72 $^{\circ}$ C 1min;30个循环。

1.7 转基因油菜的点杂交分析

用PCR反应为阳性的植株进行点杂交分析。取总DNA 100~500ng点在尼龙膜上,将携带DNA的一面暴露于紫外光源(254nm)之下2min,然后按Boehringer Mannheim公司的Dig DNA Labeling and Detection Kit提供的方法进行探针标记及杂交。

1.8 转基因油菜的抗病性鉴定

选取生长状态一致的转基因植株及非转基因植株,将25~28 $^{\circ}$ C暗培养3~5d的油菜菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的菌丝体及连带培养基切成0.5cm \times 0.5cm小块,用保鲜膜将有菌丝的一面粘贴在植物第二或第三层幼叶上,并使之固定^[6],将其置于室外阴凉处,并保持湿润状态,5d观察感病情况。

2 结果与分析

2.1 双价植物表达载体pBLGC的结构

我们利用植物高效表达载体pB48.212做基本载体完成了此双价体的构建。pB48.212含有双增强子CaMV35S启动子及TMV的“ Ω ”翻译增强子序列,可介导外源基因在双子叶植物中的高效组成性表达^[8]。

双价植物表达载体pBLGC含有“35S启动子- Ω - β -1,3-葡聚糖酶基因-NOS终止子”和“35S启动子- Ω -几丁质酶基因-NOS终止子”双表达框架,其中两个基因的大小均为1.1kb左右。双价表达载体使这两种基因在植物中同时表达,从而起到协同作用,pBLGC的结构如图1所示。

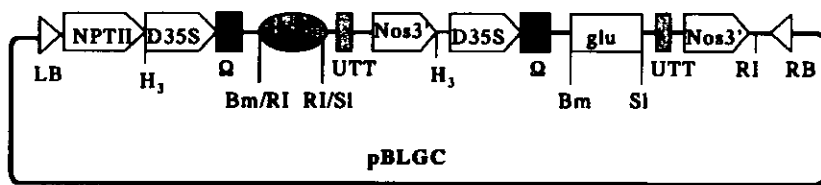


图1 双价植物表达载体pBLGC的结构图

Fig. 1 The structure of plant bivalent expression vector pBLGC

chi:chitinase cDNA; glu: β -1,3-glucanase cDNA; Bm:*Bam*HI; H₃:*Hind*III; RI:*Eco*RI; SI:*Sal*I

2.2 农杆菌介导的双价体pBLGC的油菜转化及抗Kan再生苗的获得

目前由农杆菌介导的甘蓝型油菜的遗传转化体系已建立起来,但成苗率及转化效率均较低。其中卡那霉素对其影响最大。通常当Kan浓度为10mg/L时,绿苗分化频率就很低了。在本研究中,我们将Kan浓度降至7~8mg/L,从4000多个外植体中获得了不足200棵绿苗,而最终在Kan 15mg/

L及25mg/L中存留的绿苗只有23株。

2.3 pBLGC转化油菜抗Kan再生苗的PCR检测

对10株pBLGC抗Kan再生苗进行了 β -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的PCR检测。检测所得结果如图2所示。图2a为葡聚糖酶基因,2b为几丁质酶基因。从两图上均可以看到,在约1.1kb位置有4株出现了明显的PCR条带,这初步说明这两个基因已整合到油菜基因组中。

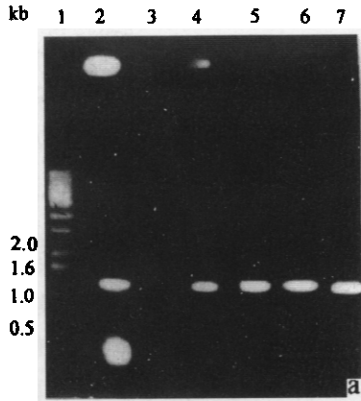


图 2a pBLGC 转基因油菜的 β -1,3-葡聚糖酶基因的 PCR 检测的电泳图

Fig. 2a Electrophoresis of PCR products of transgenic plant with β -1,3-glucanase cDNA primers

1. 1kb DNA ladder; 2. Positive control
3. Non-transgenic plant; 4~7. Transgenic plants

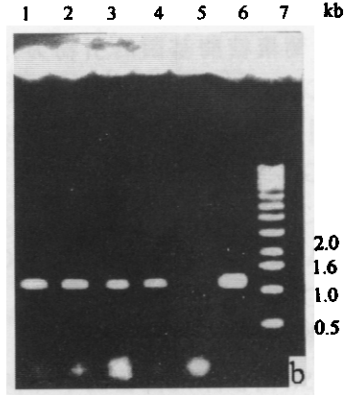


图 2b pBLGC 转基因油菜几丁质酶基因的 PCR 检测的电泳图

Fig. 2b Electrophoresis of PCR products of transgenic plant with chitinase cDNA primers

1~4. Transgenic plants; 5. Non-transgenic plant;
6. Positive control; 7. 1kb DNA Ladder

2.4 转基因植株的点杂交分析

将 4 株 PCR 表现阳性植株分别用 β -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的探针进行点杂交分析(图 3a,b)。从图上可以看出 4 株在两种基因的点杂交中均显示较强的阳性反应信号,这进一步说明了在这些植株的基因组中已包含了此外源基因。

2.5 转基因油菜的抗菌核病鉴定

将 PCR 检测为阳性的 4 株转基因植株预先进行了抗 Kan 试验。其中有 3 株对 Kan 没有反应,有

1 株有轻微变黄反应;5 株非转基因植株全部产生严重变枯黄反应。以上述 4 株转基因植株和 5 株非转基因植株做接菌试验,5d 后观察接菌叶片的变化。在 4 株转基因植株中有 1 株(正是对 Kan 产生轻微变黄反应的)叶片在接菌处表现局部枯斑(图片未显示),其它 3 株未见明显反应;相对应的 5 株对照植株全部表现出典型的菌核病毒害症状(整个接菌叶片全部变黄,继而干枯脱落)(图 4)。以上接菌实验的结果表明,转基因油菜植株对菌核病的抗性比非

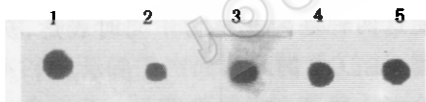


图 3a 转基因油菜的 β -1,3-葡聚糖酶基因的点杂交分析

Fig. 3a Dot blot analysis of rape transgenic plant with β -1,3-glucanase gene probe
1. Positive control; 2~5. Transgenic plants

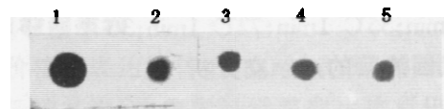


图 3b 转基因油菜的几丁质酶基因的点杂交分析

Fig. 3b Dot blot analysis of rape transgenic plant with chitinase gene probe
1. Positive control; 2~5. Transgenic plants

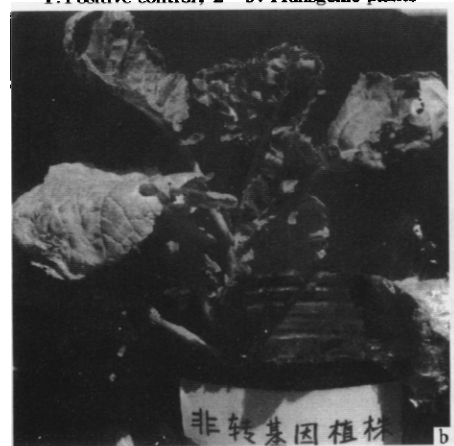


图 4 转基因油菜接种菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 7d 后的反应

Fig. 4 The reaction of transgenic plant after 7 day inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*
a. Transgenic plant; b. Non-transgenic plant

转基因植株明显增强。下一步的研究工作将对以上抗病植株进行 Southern 杂交及 Western 印迹分析,并对其第二代转基因植株进行遗传性分析,最终目的是要筛选纯合的抗病转基因植株,为油菜抗菌核病育种提供优质材料。

3 讨论

自从人类开始种植农作物以来,真菌病害就在栽培作物中占有主导地位。然而由于真菌本身的结构、基因组及其生理小种的复杂性,它的研究进展与细菌相比相对缓慢。近年来随着生物技术在这方面的应用,已陆续寻找到一些抗真菌性蛋白,将相应的基因导入植物中为植物的抗真菌病研究开创了一条简洁的途径。其中研究最多且应用最为广泛的抗真菌蛋白就是几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶。这两种物质为绝大多数真菌胞壁的主要成分,不同真菌之间无太大差异且能较稳定地存在,因而这两种基因的抗真菌性具有广谱性、持久性及协同性,而且植物本身不含有几丁质,因此它们组成型表达对植物没有伤害作用。目前这两种基因在植物抗真菌病基因工程中显示出良好的应用前景。我们利用菜豆几丁质酶与烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因构建了植物双价表达载体,已对烟草和棉花进行了转化,均取得了显著的抗病效果(作者博士论文内容)。目前甘蓝型油菜作为一种重要的经济作物,其产量和品质的最大影响因素是菌核病,而目前通过常规育种方式还未找到

合适的抗源。在本研究中,我们将此双价基因导入到甘蓝型油菜中,转基因植株对油菜菌核病表现出明显抗性。我们利用此基因对多种作物所做的研究初步证明,这两种基因在植物中的表达能有效抑制不同真菌的侵染,这在国内还未见报道。由此也展示出几丁质酶与 β -1,3-葡聚糖酶基因在抗真菌方面的巨大潜力。

本研究中我们利用农杆菌介导法对油菜进行了转化,其转化效率受到筛选抗生素及转化受体不同基因型的较大影响。筛选抗生素是影响油菜转化率的最主要因素^[9]。在我们的实验中所用标记基因为 NPT II,尽管此基因是目前最普遍利用的选择标记,但对甘蓝型油菜效果较差^[10,11],在我们的研究中也得到相似结果。据 De Block 等人报道,当 NPT II 在油菜转化中做为筛选标记时,虽然有此基因的整合,但许多转化体的表达水平很低,这种现象在烟草、马铃薯及番茄中均未观察到^[12,13]。进一步研究发现,凡是此基因在 35S, nos, rbcS 等启动子控制之下,均表现出低水平表达。基因的甲基化及发育调节也许是原因之一^[10,11]。在基因型方面,通常春性油菜比冬油菜转化率高得多,这已成为影响冬油菜遗传转化的主要障碍^[14,15]。但冬油菜生产潜力较大,对它的遗传转化技术的研究就显得尤为实际而重要。本实验中我们采用的是冬性油菜品种,其转化效率较低。我们对影响其转化效率的各种因素进行了探讨,期望能在此方面有所突破。

参 考 文 献

- [1] Knutzon D S, Thompson G A, Radke S E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**:2624~2628
- [2] De Block M, Debrouwer D. *Theor Appl Genet.* 1991, **82**:257~263
- [3] Altenbach S B, Kuo C C, Starraci L C *et al.* *Plant Mol Biol.* 1992, **18**:235~246
- [4] Broglie R, Roby D, Cressman R *et al.* *J Cell Biochem*, 1990, **14**:276
- [5] Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M *et al.* *Nature Biotechnology*, 1996, **14**:643~646
- [6] Zhu Q, Mher E A, Masoud S *et al.* *Bio/Technology*, 1994, **12**:807~812
- [7] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册, 北京:中国科学技术出版社, 1994
- [8] 李太元, 田颖川, 秦晓峰等. 中国科学(B辑), 1994, **24**(3):276~282
- [9] Flavell R B, Dart E, Fuchs R *et al.* *Bio/Technology*. 1992, **10**:141~144
- [10] Pua E C, Mehra-Palta A, Nagy F *et al.* *Bio/Technology*, 1987, **5**:815~817
- [11] Charest P J, Holbrook L A, Gabard J *et al.* *Appl Genet.* 1988, **75**:438~445
- [12] De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M *et al.* *EMBO J.* 1984, **3**:1681~1684
- [13] De Block M, De Brouwer D, Tenning P. *Plant Physiol.* 1989, **91**:694~701
- [14] Boulter M E, Croy E, Simpson P *et al.* *Plant Sci.*, 1990, **70**:91~99
- [15] Stefanov I, Sandor F, Bogre L *et al.* *Plant Sci.* 1994, **95**:175~186

Studies on Transgenic Oilseed Rape (*Brassica napus*) Plants Transformed
with β -1,3-Glucanase and Chitinase Genes and its
Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*

LAN Hai-Yan^{1,3} WANG Chang-Hai³ ZHANG Li-Hua¹ LIU Gui-Zhen¹

WAN Lan-Lan¹ CHEN Zheng-Hua¹ TIAN Ying-Chuan²

¹(Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

²(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

³(Institute of Industrial Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000)

Abstract By Agrobacterium-mediated method, the cotyledonary petiole of good quality rape variety H165 was transformed with plant expression vector pBLGC which constitutively express β -1,3-glucanase and chitinase genes. We obtained some Kanamycin(Kan)-resistant regenerational green shoots, with these shoots, PCR identification was conducted. Results showed that 30% green shoots which grew in medium of Kan 15mg/L and 53% green shoots in Kan 25mg/L had positive reaction. We also made dot blot analysis with those green shoots, some of them gave positive signal, indicating that the foreign genes had integrated into rape genome. Fungal challenge of these transgenic plants showed that some plants were much more resistant to *Sclerotinia sclerotiorum* than non-transgenic control plants.

Key words β -1,3-glucanase gene, chitinase gene, transgenic plant of oilseed rape, resistance of *Sclerotinia sclerotiorum*, *A. tumefaciens*- mediated transformation.

深切怀念卢景良先生

《生物工程学报》编委,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所研究员卢景良先生因病医治无效,于2000年1月29日不幸在哈尔滨去世,享年70岁。

卢景良先生生于1930年2月13日,辽宁省昌图县人。1955年毕业于东北农学院兽医专业。生前任兽医生物技术国家重点实验室学术委员会主任,酶工程国家重点实验室学术委员会委员,中国免疫学会常务副理事长,兽医免疫学分会理事长,中国病理生理学会动物病理生理分会、中国畜牧兽医病理研究会副理事长,中国畜牧兽医生物技术研究会理事长,黑龙江省科学顾问委员会委员,美国科学促进会会员。

卢景良先生是我国著名的兽医病理学家,在任《生物工程学报》编委期间,对我刊的工作非常支持,审阅了大量稿件。他知识渊博,学风正派,深受广大科研工作者的尊敬和爱戴。

我们永远怀念卢景良先生。

《生物工程学报》编辑部

2000年2月14日