

应用基因枪将蚕抗菌肽基因导入 水稻获抗白叶枯病株系^{*}

简玉瑜¹ 吴新荣¹ 莫豪葵¹ 陈凤珍¹ 董 春² 黄自然³

(1 华南农业大学遗传工程研究室, 广州, 510642; 2 华南农业大学资环学院; 3 华南农业大学蚕桑系)

摘要 将天蚕抗菌肽 B 基因应用基因枪法导入水稻发芽种胚, 获得转基因植株。经 Basta 抗性鉴定, 应用 PCR 技术和 Southern 印迹分析表明, 抗菌肽 B 基因已整合到水稻的基因组。T₃ 抗白叶枯病株系 Northern 印迹分析证明抗菌肽 B 基因在 RNA 水平有表达。

关键词 天蚕抗菌肽 B 基因; 基因枪转化; 水稻; 转基因植株; 水稻白叶枯病

中图分类号 S 330; Q 78

水稻是世界上最重要的粮食作物之一。应用基因工程技术, 培育高抗、优质新品种, 创造出传统育种方法难于获得的, 具有重要经济价值的新种质。自 Zhan (1988) 成功地获得水稻转基因植株以来, 水稻的遗传转化技术逐渐完善和发展, 人们希望利用基因工程技术达到上述目的。本研究报导 1994~1996 年采用基因枪法将天蚕抗菌肽 B 基因导入水稻, 获抗白叶枯病转基因植株; 并观察转基因第一代、二代株系抗白叶枯病情况。

1 材料与方法

1.1 供试品种

4 个籼稻品种: 两个高感白叶枯病品种 TN₁ 和金钢₃₀, 以及 IR₂₄ 和观₈。

1.2 培养基

N₆—N₆+2 mg/L KT+0.5 mg/L NAA; N₆²—N₆+10 mg/L KT+0.5 mg/L NAA;
MS₁—MS+2 mg/L 2, 4-D; MS₂—MS+2 mg/L 2, 4-D+1 mg/L KT+0.5 mg/L NAA;

1.3 供体 DNA

基因枪用天蚕抗菌肽 B 基因 pCB5、pCB6 质粒, 以 pRS505 为载体, 该质粒有 rbcS 和 35S 两个启动子, 有富甘氨酸细胞壁蛋白信号肽或 α-淀粉酶基因信号肽为增强子 (Sp), 以 Bar 基因为选择标记, 总长 8.51~8.52 kb, 由中国水稻所黄大年先生惠赠。质粒结构见图 1。

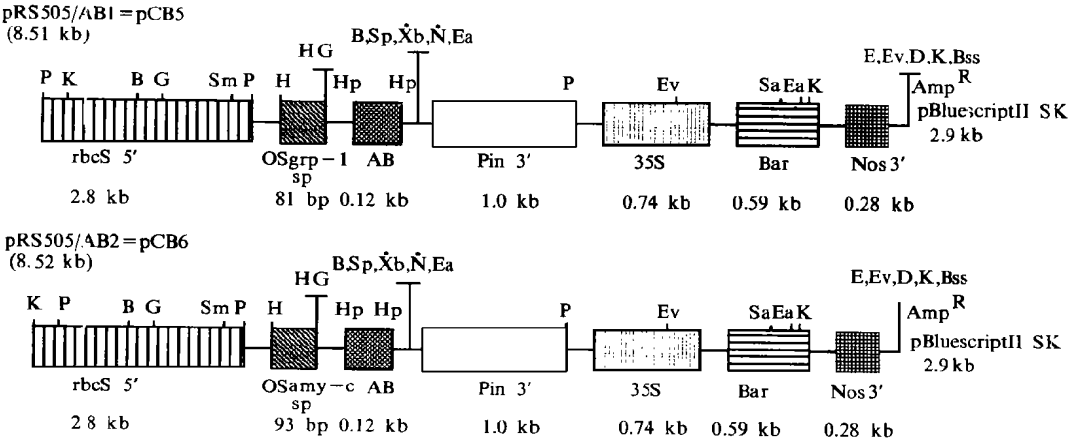
1.4 基因枪转化

采用中山大学生物工程研究中心制作火药推进基因枪, DNA 包裹的钨粒制备参照 Cao (1990) 的方法。以 TN₁、观₈ 及金刚₃₀ 3 个品种的发芽种胚、未成熟胚和愈伤组织为靶组织。外植体轰击后转入诱导培养基 (MS₂), 暗培养 7 d, 后转到 4 mg/L Basta MS₂ 筛选 30 d, 将愈伤

1997-04-29 收稿 简玉瑜, 女, 65 岁, 研究员, 博士生导师

^{*} 广东省“八五”攻关, 广东省科学基金, 高校博士点基金资助项目, 并曾得到 UNEP 通过中国微生物资源中心提供的部分资助。

组织转到分化培养基(N_6^1 、 N_6^1)。当愈伤组织开始分化,转到含 4 或 8 mg/L Basta N_6^1 、 N_6^1 再筛选 20 d,将苗转至无激素 N_6 培养基,20 d 后移入盆中。



AB: 天蚕抗菌肽 B 基因; Bar: 编码 PPT 乙酰转移酶的基因
OSgrp-1 Sp: 水稻富甘氨酸细胞壁蛋白基因信号肽 OSamy-c Sp: 水稻 α-淀粉酶基因信号肽
rbcS, 35S: 启动子; Pin, Nos: 终止子
Hp= HpaI; Xb=XbaI; N= NotI; P= PstI; G= BglII; H= HindIII; B= BamHI

图 1 质粒 pRS505(pCB5/ pCB6) 的基因结构及酶切位点图

1.5 转基因水稻植株分子检测

1.5.1 水稻 DNA 的抽提 参照 McCouch 等(1988)方法抽提抗性愈伤组织、转基因植株,转基因植株后代叶的 DNA。

1.5.2 天蚕抗菌肽 B 基因扩增引物 1994~1995 年天蚕抗菌肽 B 扩增引物 1 与 2 为(5' — ATGAATTTCTCAAGGATATTTTTC — 3' 和 5' — AATAGGATCGC-GAAACCGAAGCGGATT—3')。引物由黄自然教授提供。1996~1997 年天蚕抗菌肽 B 扩增引物 1 与 2 为(5' — AAATGGAAAGTTTTCAGAAAATCG — 3' 和 5' — ACCAA-GAGCTTTAGCTTCACCCAG—3')。根据谢毅等(1990)合成抗菌肽 B 基因序列设计,由上海 Sangon 生物工程公司合成。

1.5.3 DNA 斑点杂交、Southern 及 Northern 印迹分析 DNA 斑点杂交,分别抽提质粒及抗性愈伤组织 DNA 点于尼龙膜上,作处理后进行杂交,经洗膜压 X 光片显影。

转基因植株当代 Southern 印迹法参照 Bothwell(1990)方法进行。用限制性内切酶 PstI 酶切。转基因的 T₁ 和 T₂ 抗白叶枯病的株系的 DNA 应用 PCR 技术检测,参照 Sambrook (1989)的方法。以水稻总 DNA 为模板,反应总体积 25 μL。扩增条件为:热启动,94℃1.5 min, 94℃45 s, 64℃1 min, 72℃2 min, 38 个循环。T₁ 和 T₂ 总 DNA 的 Southern 印迹和 RNA 的 Northern 印迹分析,参照 Sambrook (1989)的方法进行。

1.6 转基因后代种植及白叶枯病抗病检测

1995、1996 年晚造盆栽种植 T₁ 305 株,种子先进行 Basta 发芽筛选,把抗 Basta 的苗盆栽,插秧后一个月用白叶枯病菌株(IV 型 X₀₀₋₈₁₂)剪叶法接种,7 d 测量病斑长度,21 d 调查发病情况并分级。1996 年早造对转基因 T₂ 在田间单株小区种植,20 个株系 404 株,以

TN₁、IR₂₄、金钢₃₀为感病品种对照, TKM₆ 为抗病对照, 于孕穗期接种, 测定 TN₁ 转基因 T₁、T₂ 对白叶枯病的抗病性。

2 结果

2.1 基因枪的转化及转化体的获得

以基因枪转化 pCB5, pCB6 质粒的 DNA , 结果见表 1。3 种外植体, 第一次筛选后, 抗性愈伤组织的发生率以愈伤组织的高; 第二次筛选, 观₈ 发芽种胚抗性植株最多; 但经分子检测未获转基因植株。而 TN₁ 发芽种胚 5 株抗性植株, 有 3 株为阳性。

表 1 基因枪转化筛选及检测结果

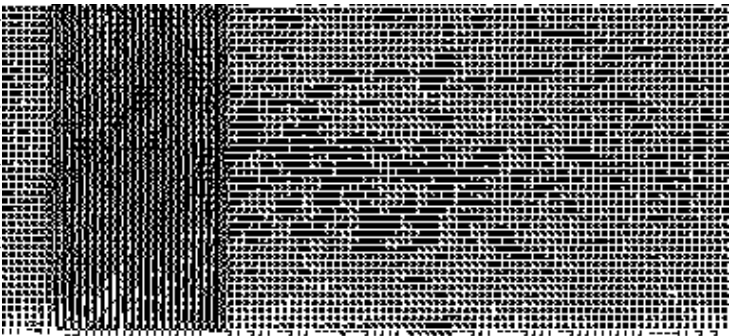
外植体	品种	转化组 织数	一次筛选存活 愈伤组织数	抗性愈伤 组织率	两次筛选 成苗数	Southern 印迹 检测样品数	转基因 植株数
发芽种胚	观 ₈	824	98	11. 9	26	9	0
	TN ₁	450	36	8 0	5	5	3
	金钢 ₃₀	846	58	6 9	0	0	0
未成熟胚	观 ₈	245	21	8 6	9	0	0
	TN ₁	137	9	6 6	0	—	—
	金钢 ₃₀	87	13	14. 9	2	—	0
愈伤组织	观 ₈	212	43	20. 3	3	—	—
	TN ₁	42	5	11. 9	0	—	—
	金钢 ₃₀	154	27	17. 5	5	5	1

2.2 转化植株分子检测结果

2.2.1 斑点杂交分析 对转化获得的抗性愈伤组织的 DNA 作斑点杂交分析, 共检测 6 个样品, 均为阳性。

2.2.2 Southern 印迹分析 首先对斑点杂交呈阳性的 6 个样品进行 Southern 印迹分析, 结果 TN₁ 2 个、金钢₃₀ 1 个样品呈阳性。其次检测 Basta 抗性植株 19 株, 结果有 4 株呈阳性 (TN₁3 株, 金钢₃₀ 1 株)。在呈阳性的 TN₁ 植株中, 再选 2 个样品重新抽提 DNA, 再次用 Southern 检测, 也得到同样结果。所有阴性对照(未转化的植株) 均无阳性反应。通过 Southern 印迹检测表明抗菌肽基因已整合到 TN₁、和金钢₃₀ 的基因组中, 其中 TN₁ 两株植株结实获得种子。

2.2.3 用 PCR 技术检测 T₁、T₂ 抗性植株 以未处理水稻植株 DNA 为阴性对照, 以纯化质粒 DNA 为阳性对照, 以抗菌肽 B 基因的引物用 PCR 技术检测抗性株系, 结果见图 2。由



1. 未转化植株对照; 2. TN₁—1—11; 3. TN₁—1—18; 4. TN₁—2—50; 5. TN₁—1—20; 6. TN₁—2—9; 7. TN₁—1—1; 8. 质粒阳性对照; 9. pBR322/HaeIII 分子量参照物

图 2 TN₁ 转基因后代植株的 PCR 分析

图 2 可见, 阴性对照未出现扩增带, 阳性对照出现电泳条带, 分子量约为 110 bp, 其分子量与予期的 DNA 扩增片段长度 108 bp 一致。检测 12 个样品, 9 个具有特异扩增条带(其中 T₂ 抗白叶枯病株系, 8 个有 5 个阳性; 2 个抗性与对照相仿的有 1 个阳性。T₁ 高抗 2 个单株, 均为阳性。)

对 PCR 阳性植株的总 DNA 用 HindIII 酶切后进行 Southern 印迹分析, PCR 阳性植株多数出现阳性结果(图 3), 表明整合的抗菌肽 B 基因能稳定遗传。选取 TN₁ 转基因 T₂ 抗病性强、PCR 及 Southern 印迹阳性植株 2 株, 剪取 T₃ 株系叶片, 进行 Northern 印迹分析, 结果其中一个株系有特异 mRNA 表达(图 4), 分子长度为 400 ~ 600 bp。证明抗菌肽基因遗传到 T₃ 代, 并在 RNA 水平上得到表达。



探针为天蚕抗菌肽 B 基因序列, HindIII 酶切 DNA. 1. TN₁ 探针为天蚕抗菌肽 B 基因序列; 1. 未转化植株对照; 2. — 2— 20; 2. TN₁— 2— 12; 3. TN₁— 2— 35; TN₁— 2— 9 的 T₃ 株系; 3. TN₁— 1— 11 的 T₃ 株系
4. TN₁— 2— 9; 5. 秋桂矮 11 的抗性愈伤组织; 6. 未转化植株对照; 7. 质粒阳性对照

图 3 转基因后代植株基因组 DNA 的 Southern 印迹分析

2.3 转基因后代对白叶枯病抗病性检测

1995、1996 年晚造对 TN₁ 转基因 T₁305 株进行 Basta 发芽筛选, 75% T₁ 抗 Basta。插秧后一个月用白叶枯病菌接种。T₁ 对白叶枯病具有一定的抗性, 病斑长度缩短, T₁ 中 23% ~ 25% 株系抗级比对照高, 其中 17% 株系抗级显著提高, 收获了 T₁ 种子。

1996 年早造对 TN₁ 转基因的 T₂ 白叶枯病抗性作鉴定。T₂ 平均病级都为 2 ~ 3 级, 抗病类型在中抗(mR)和中感(mS)之间, 而对照品种 TN₁ 平均级数为 4 ~ 5 级, 属感(S)和高感(hS)类型, 见表 2。

从调查结果看, T₂ 病斑长度比对照缩短, 病级比对照降低, 表现出抗菌肽转基因水稻对白叶枯病抗性较起始品种明显提高。但是, 各植株间的抗病性反应有差异。

图 4 转基因水稻总 RNA 的 Northern 印迹分析结果

表 2 TN₁ 转基因 T₂ 株系对白叶枯病的抗性测定结果

株系	病斑平均长度 ¹⁾ / cm	株系	病斑平均长度/ cm
TN ₁ -1-1	1.88	TN ₁ -2-3	1.80
TN ₁ -1-5	2.00	TN ₁ -2-7	1.09
TN ₁ -1-9	2.05	TN ₁ -2-9	1.09
TN ₁ -1-11	1.67	TN ₁ -2-10	1.11
TN ₁ -1-12	1.96	TN ₁ -2-12	2.70
TN ₁ -1-18	1.17	TN ₁ -2-15	1.65
TN ₁ -1-19	1.30	TN ₁ 2-17	0.96
TN ₁ -1-20	2.73	TN ₁ -2-20	1.14
TN ₁ -1-22	1.99	TN ₁ -2-21	1.47
TN ₁ -1-24	2.15	TN ₁ (CK)	2.67

1): 平均病斑长度为接种后 7 d 调查

3 讨论

3.1 基因枪转化效率

应用天蚕抗菌肽 B 基因 pCB5、pCB6 质粒直接转化发芽种胚, 经 Basta 筛选, 获得抗性植株 50 株, 经 Southern 印迹分析, 有 4 株呈阳性。基因枪转化受体类型广泛, 操作简便, 迅速, 外源 DNA 用量少; 但基因枪的物理因素如 DNA 浓度, 微粒的数量、直径, 火药的种类、数量, 挡板与样品的距离等对转化均有影响。作者使用的是国产火药推进基因枪, 轰击参数不易控制, 气流的冲击, 微粒分布不均匀, 火药污染, 枪筒扭曲, 均影响导入效率, 容易出现嵌合体。据 Li (1993) 报导用 Bio-Rad PDS 1000/He 基因枪转化率较高, 如建立严格筛选程序, 85% 的抗性植株是转基因植株。

3.2 两种抗菌肽基因对比

天蚕抗菌肽 B 基因和柞蚕抗菌肽 D 基因密码子不同。天蚕抗菌肽 B 基因化学合成选用是植物偏爱的密码子(谢毅等, 1990), 由中国水稻所提供的质粒是专门为水稻而设计的, 分别与 OSgrp-1 或 OSamy-c 信号肽序列嵌合构建, 以具有叶片组织特异性表达活性的 rbcS 为启动子, 可能会促进转基因水稻中抗菌肽基因的高效表达并分泌到胞外, 起到杀菌作用。从几年试验结果看, 两种基因进行转化, 由于天蚕抗菌肽 B 基因密码子设计合理, 与水稻基因组整合效率较高。而柞蚕抗菌肽 D 基因化学合成选用酵母常见的密码子(徐飞等, 1988), 含有 CaMV35S 启动子, 带有 NpT II 选择标记, 用卡那霉素筛选, 对水稻愈伤组织分化影响大, 很难获得绿色植株, 几年未获转基因植株。抗菌肽 B 基因用 Basta 筛选, 对水稻再生影响不大, 可获得结实的转基因植株。因此作者认为在水稻转化中天蚕抗菌肽 B 基因较柞蚕抗菌肽 D 基因好。

3.3 抗菌肽基因在转基因植物中的表达与抗病性

抗菌肽类多肽是昆虫体内经诱导产生的免疫产物, 具有广谱杀菌作用。董春(1992)研究柞蚕抗菌肽对水稻白叶枯病的作用机理, 应用柞蚕抗菌肽对 6 株国际上分离的和中国强致病白叶枯菌株进行抑菌试验, 均证实有明显的抑菌作用。用抗菌肽处理白叶枯病菌后用电镜观察, 发现处理 30 min 后, 菌体破裂, 内含物渗出死亡。水稻白叶枯病是一种典型的微

管束病害, 其致病作用主要是破坏水稻植株微管束组织, 使其丧失水分运输能力。Florack 等 (1995) 指出: 作物抗细菌病的遗传过程中应用抗菌肽 B 基因取决于 3 个因素: 即基因表达, 抗菌肽的合成水平要足以杀死病菌以及抗菌肽分泌到病菌生存地方。我们研究中发现 TN₁ 的转基因 T₁ 及 T₂ 对接种的白叶枯病菌表现出一定的抗性, 病斑长度缩短, 病级减轻, 这都可能是抗菌肽 B 基因表达并分泌到胞外的结果。作者以 PCR 检测 8 个抗病 T₂ 株系, 5 个阳性; 2 个与对照病级一样的株系, 也有 1 个阳性; 高抗的 T₁ 单株, 抗菌肽基因信号明显。Southern 印迹检测结果表明, 抗菌肽基因已整合到水稻基因组。Northern 印迹检测, 抗性提高的 2 个转基因的 T₃ 株系有一株系有 mRNA 表达 (表 3)。作者的结果与抗菌肽 B 基因, Shiva-1 基因转烟草、马铃薯、水稻结果相一致 (Hightower et al, 1994; Jia et al, 1996; 王志兴等, 1996; 黄大年等, 1997)。

表 3 TN₁ 转基因后代植株的抗病性鉴定与分子检测结果总结表¹⁾

株系	抗病性测定情况		分子检测		
	T ₁	T ₂	PCR ^A	Southern blot ^A	Northern blot ^B
TN ₁ -1-1	H	H	+	+	
TN ₁ -1-9	H	H	+		
TN ₁ -1-11	H	H	+		-(?)
TN ₁ -1-18	H	H	+	+	
TN ₁ -1-19	S	H	+		
TN ₁ -1-20	S	S	+		
TN ₁ -2-9	H	H	+	+	+
TN ₁ -2-12	H	S	-	+	
TN ₁ -2-20	H	H	-	+	
TN ₁ -2-21	H	H		+	
TN ₁ -2-35	H		+	+	
TN ₁ -2-50	H		+		
TN ₁ -2-3		H	-		
TN ₁ -2-17		H		+	

1) H: 与对照相比, 抗病能力提高; S: 与对照相比, 抗病能力未提高; A: 检测植株为 T₁ 代; B: 检测植株为 T₃ 代

致谢 感谢中国水稻所黄大年先生提供抗菌肽 B 基因 pCB5、pCB6 质粒和资料; 感谢本室庄楚雄博士在技术上的指导和帮助; 感谢杨跃生, 张伟, 陈远玲, 何汉生, 王润华参加部分工作。

参 考 文 献

王志兴, 贾士荣. 1996 抗菌肽分泌型载体的构建及马铃薯中蛋白的胞外分泌. 农业生物技术学报, 4(3): 277~286

徐 飞, 施 文, 王启松, 等. 1988 柞蚕抗菌肽 D 基因的合成. 科学通报, 21: 12~15

黄大年, 朱 冰, 杨 炜, 等. 1997 抗菌肽 B 基因导入水稻及转基因植株的鉴定. 中国科学(C 辑), 27 (1): 55~62

谢 毅, 闵永洁, 贾士荣, 等. 1990 天蚕抗菌肽 B 基因的化学合成及克隆. 生物工程学报, 6(4): 311~

315

- 董 春, 何汉生, 王润华, 等. 1992. 柞蚕抗菌肽对水稻白叶枯病的抑制作用. 华南农业大学学报, 13 (4): 58~62
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 著. 1989. 分子克隆, 实验指导. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1~1062
- Bothwell A L, George D, Yancopoulos F, Frederick W, Alt. 1990. Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1~293
- Cao J, Wang Y C, Klein T M, et al. 1990. Transformation of rice and maize using the particle gun method. In: Lamb C J, Beachy R N, eds. Plant Gene Transfer. New York: Wiley-Liss, 21~23
- Florack D, Allefs S, Bollen R, et al. 1995. Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. Transgenic Research, 4: 132~141
- Hightower R, Baden C, Penzes E. 1994. The expression of cecropin peptide in transgenic tobacco does not resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Plant Cell Reports, 13: 295~299
- Jia S R, Qu X M, Feng L X. 1996. Transgenic potato for enhanced resistance to bacterial wilt. In: Xu Z H, Chen Z H, eds. Proceedings of 2nd Asia-Pacific Conference on Plant Cell and Tissue Culture, Beijing: China Forestry Publishing House, 183~188
- Li L, Qu R, Kochko A D, et al. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Reports, 12: 250~255
- McCouch S R, Kochert G, Angles R. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor Appl Genet, 76: 815~829
- Zhan W, Wu R. 1988. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplast and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. Theor Appl Genet, 76: 835~840

TRANSFER OF CECROPIN B GENE INTO RICE (*Oryza sativa* L.) BY THE BIOLISTIC METHOD AND TRANSGENIC PROGENY LINE FOR RESISTANCE TO BACTERIAL BLIGHT

JianYuyu¹ WuXingrong¹ MoHaokue¹ Chen Fengzhen¹ Dong Chun² Huang Ziran³

(1 Genetic Engineering Laboratory, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 College of Natural Resources & Environment; 3 Dept. of Sericulture, South China Agric. Univ.)

Abstract

Transgenic plants transformed with cecropin B gene using biolistic method were regenerated from germinative embryo of rice. Herbicide basta selection, PCR technique and Southern blot analysis confirmed that stable integration of cecropin B gene into the rice genome had occurred. Results from Northern blot analysis of transgenic T₃ lines for resistance to rice bacterial blight demonstrated that the cecropin B gene was inherited by successive generations up to the T₃ progeny and expressed at the mRNA level.

Key words Cecropin B gene; Biolistic Transformation; *Oryza sativa* L.; Transgenic plants; Bacterial blight of rice (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)