

水稻几丁质酶基因导入芥菜型油菜的研究

蹇宇, 王健美, 游大慧, 吴俊, 罗勤, 李旭锋*

(四川大学生命科学学院, 四川成都 610064)

摘要: 以芥菜型油菜 (*Brassica juncea* L.) 下胚轴为转化材料, 通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导将水稻的几丁质酶基因 (Rice chitinase gene) 导入“泸州四陵”油菜品种中, 获得抗潮霉素的再生转基因植株, 并讨论了影响油菜再生及转化效率的几个因素。对部分经潮霉素筛选得到的再生植株进行了多次重复 PCR 检测, 发现其中 40% 以上的潮霉素抗性植株均表现出较强的阳性反应, 初步证明几丁质酶基因已整合到油菜细胞核基因组中。

关键词: 几丁质酶基因; 转基因油菜; 农杆菌介导法

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)02-0139-05

Studies on transgenic rapeseed (*Brassica juncea*) with rice chitinase gene by *Agrobacterium tumefaciens*

QIAN Yu, WANG Jian-mei, YOU Da-hui,

WU Jun, LUO Qin, LI Xu-feng*

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In an experiment with the hypocotyls of rapeseed (“luzhousiling” *Brassica juncea* L.) as explants in invitro culture, a transformation of introducing rice chitinase gene into “luzhousiling” by *Agrobacterium tumefaciens* was established. Some Hyg-resistant green shoots were obtained. PCR test of the resistant plants indicated that 40% of the Hyg-resistant plants showed strong positive reaction, suggesting that chitinase gene had been integrated into the genome of rapeseed.

Key words: chitinase gene; transgenic oilseed rape; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

芥菜型油菜是我国重要的经济作物之一, 但由于受到多种病害特别是菌核病的危害, 其产量和品质受到严重影响。多年来, 尽管育种工作者们试图采用传统的育种手段来获得抗病油菜良种, 但进展却十分缓慢。因此, 利用植物基因工程, 转入外源抗真菌基因使油菜获得对菌核病的抗性无疑成为油菜抗病育种的一条可行的新途径。几丁质酶是现今研究得最多且应用最广泛的抗真菌蛋白之一, 它能催化真菌细胞壁的重要物质之一几丁质(聚乙酰胺基

葡萄糖 Chitin) 水解, 从而抑制真菌的生长和增殖。利用分子生物学手段将带有强启动子的几丁质酶基因转入某些作物, 转化植株组成型超量表达几丁质酶, 可有效增强其抗病性, 此方面成功报道在国内外已日益增多(单丽波等, 1998; Grison 等, 1996)。因此, 我们利用根癌农杆菌介导的转化方法将抗真菌病的水稻几丁质酶基因 (Rice chitinase gene) 导入芥菜型油菜品种““泸州四陵”中”, 以期获得抗病转基因植株。

收稿日期: 2003-10-31 修订日期: 2003-12-26

作者简介: 蹇宇(1976-), 女, 四川成都人, 硕士生, 从事油菜育种研究。* 为通讯作者

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料 遗传转化所用的油菜品种:芥菜型油菜“泸州四陵”为本实验室所有。

1.1.2 质粒与菌株 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 为农杆菌受体菌,为本实验室所有。PMD-18T 载体和大肠杆菌 DH5 α 为本实验室所有。植物表达载体 (pcambar. chi. 11-chitinase, Hygromycin) 含有 chitinase 目的基因, Ubiquitin 启动子以及潮霉素筛选标记基因, 该质粒为蒋昌顺老师构建。结构如图 1 所示。

1.1.3 培养基 ①无菌苗培养基: MS; ②预培养基:

MS+2.0 mg/L 6-BA; ③为了获得最佳分化效果, 以 MS 为基础配制了 14 种不同的浓度的激素配比的培养基: MS+6-BA(1.0, 2.0 和 3.0 mg/L)+NAA(0.1, 0.5 和 1.0 mg/L)+2,4-D(0.5, 1.0 mg/L)+羧苄青霉素 250 mg/L, 在这些培养基中筛选出最佳的激素组合, 添加 AgNO₃ 6 mg/L, 设不含 AgNO₃ 的培养基作对照实验组; ④筛选培养基: 分化培养基+10 mg/L 潮霉素+250 mg/L 羧苄青霉素+6 mg/L AgNO₃; ⑤生根培养基: MS+300 mg/L 头孢青霉素 (cef)+10 mg/L 潮霉素 6-BA (6-Benzylaminopurine); 6-苄基氨基嘌呤; NAA (Naphthaleneacetic acid): 萘乙酸。

以上培养基均含 3% 的蔗糖, 0.8% 的琼脂, pH5.8。

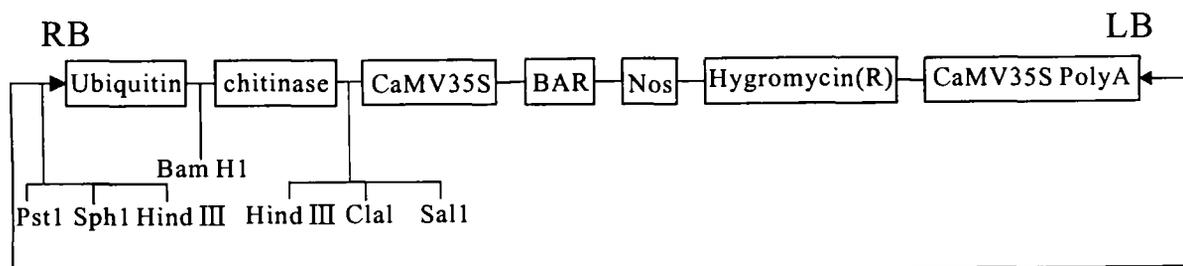


图 1 植物表达载体 PCMBAR. CHI. 11 构建图谱

Fig. 1 Chart of plants expressing vector PCMBAR. CHI. 11

1.1.4 酶与试剂 TaqDNA 聚合酶和限制性内切酶均购自上海生物工程有限责任公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.5 PCR 引物 检测水稻几丁质酶基因的引物: 5'端引物: 5'-TTGCTGAAGATCGATGCACC-3'; 3'端引物: 5'-GTCGACCTGCAGGTCAACGG-3'。引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 选取籽粒饱满的“泸州四陵”油菜种子, 70%乙醇浸泡 30 s, 0.1%的升汞溶液浸泡 8 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 接种于 MS 固体培养基上。置培养室中 26~28 °C 下、光照 16 h/d 继续萌发。取 8 d 龄无菌苗下胚轴作为转化受体。

1.2.2 农杆菌介导的遗传转化 取出-80 °C 下保存的含有目的表达载体的农杆菌菌株 LBA4404, 划线接种于附加 50 mg/L 卡那霉素、25 mg/L 链霉素的 LB 平板上, 在 28 °C 下倒置培养 2 d。从 LB 平板上挑取一个单菌落, 接种于 50 mL LB(含有 50 mg/L

卡那霉素, 25 mg/L 链霉素) 液体培养基中, 置摇床上 170 r/min, 28 °C 下培养过夜(16~20 h) 进行预活化。取 1 mL 菌液接种于 50 mL 同样 LB 培养基中相同条件下培养至对数生长期。取对数生长期菌液室温下 6 000 r/min 离心收集菌体, 弃上清, 用 MS(附加乙酰丁香酮 100 mg/L) 液体培养基 28 °C 摇床培养 2 h, 备用。取 8 d 龄的幼苗下胚轴(0.5 cm), 接入预培养基中预培养 2~3 d, 然后浸入备好的农杆菌菌液感染 30 s。其间不断振荡使菌液与外植体充分接触。用灭菌滤纸迅速吸干多余的菌液, 将下胚轴平放在预培养基上, 黑暗中共培养 2 d。共培养结束后, 取出外植体接入分化培养基中脱菌培养 6~7 d(25~28 °C, 光照 16 h/d) 后, 转入附加 10 mg/L 潮霉素和 250 mg/L 羧苄青霉素的筛选培养基中进行筛选分化培养(25~28 °C, 光照 16 h/d), 8 d 继代 1 次。2~4 周后即有愈伤组织的形成和芽的分化。待绿芽长到 1~2 cm 高后, 切下绿芽转入含 10 mg/L 潮霉素的生根培养基中, 当根系发达成为

完整的植株后,经炼苗便可移栽至土钵中。

1.2.3 植物总 DNA 提取及 PCR 检测 取抗性转基因油菜和非转基因油菜植株的幼嫩叶片各 1~2 g, 采用 CTAB 法(Murray 和 Thompson, 1980)提植物总 DNA。转基因植株的 PCR 检测:取以上制备的总 DNA 为模板,采用 25 μ L 反应体系的标准反应程序对目的基因进行 PCR 扩增。具体反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 1.5 min; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 30 cycles; 72 $^{\circ}$ C, 4 min。PCR 产物以 0.8% 的琼脂糖电泳进行检测。

2 结果与分析

2.1 高效油菜农杆菌遗传转化系统

本研究对“泸州四陵”下胚轴预培养时间及经农杆菌浸染后的“泸州四陵”下胚轴在不同激素配比的培养基中的再生和分化、 AgNO_3 浓度、农杆菌浸染浓度及时间等方面进行了优化,建立了一种适合“泸州四陵”油菜的高效转化体系。

2.1.1 预培养对下胚轴遗传转化的影响 “泸州四陵”油菜下胚轴在被农杆菌感染前用含较高浓度 6-BA 的培养基进行短时间的预培养,能提高转化率;

因为 6-BA 对芽器官发生具有很强的诱导作用。本实验采用表 1 的实验后发现:适当浓度的 6-BA(1.5~2.0 mg/L)对下胚轴进行 2~3 d 的预培养可明显地提高抗性芽率。6-BA 浓度高于 2 mg/L 或预培养时间超过 4 d 外植体两端切面会呈现疏松状,且切面创伤逐渐愈合致使农杆菌难以感染进去,从而使再生频率和转化效率降低。而 6-BA 浓度低于 1 mg/L 或预培养时间少于 1 d 时下胚轴分化不明显,感染后也会产生较严重的褐化和死亡现象,转化率较低。

表 1 预培养时间对转化效率的影响
Table 1 The influence of pre-culture to transformation efficiency

预培养时间 Pre-culture days (d)	接种下胚轴数 Inoculation number(个)	再生出绿芽的 下胚轴数(个) Shoot number	转化率(%) Transformation efficiency
0	96	2	1
1	168	12	7.14
2	175	54	30.86
3	180	53	29.44
4	132	4	3.03

2.1.2 培养基激素配比的调整 经农杆菌感染的“泸州四陵”油菜的下胚轴在分化中用了 14 种激素

表 2 NAA、6-BA 与 2,4-D 对比对诱导不定芽的影响
Table 2 The influence of hormone to shoot differentiation

培养基序号 Number	激素组合 Hormone(mg/L)			接种下胚轴数 Inoculation number (个)	25 d 后再生出绿芽 的下胚轴数(个) Shoot number	诱导率(%) Inducement efficiency
	NAA	6-BA	2,4-D			
1	0.1	1	0.5	240	25	10.42
2	0.1	1	1	240	36	15
3	0.1	2	0.5	240	50	20.83
4	0.1	2	1	240	84	35
5	0.5	1	0.5	240	18	7.5
6	0.5	1	1	240	22	9.17
7	0.5	2	0.5	240	20	8.33
8	0.5	2	1	240	19	7.92
9	1	1	0.5	240	14	5.83
10	1	1	1	240	17	7.08
11	1	2	0.5	240	16	6.67
12	1	2	1	240	15	6.25
13	0.1	3	0.5	240	18	7.5
14	0.1	3	1	240	14	5.83

配比,在实验中发现当 $\text{NAA} > 0.5$ mg/L, $6\text{-BA} > 2$ mg/L 时,不定芽的玻璃化程度严重,在含 $\text{MS} + 6\text{-BA} 2$ mg/L + $\text{NAA} 0.1$ mg/L + $2,4\text{-D} 1$ mg/L 的培养基中,20 d 后外植体的愈伤组织和不定芽的分

化率最高,达 35%(表 2)。

2.1.3 AgNO_3 对下胚轴再生的影响 AgNO_3 作为乙烯抑制剂,是油菜组织培养中常用的添加剂,它可以促进外植体分化、防止褐化,从而可以较大幅度地

提高油菜再生频率及再生芽数(Palmer, 1992; Radke 等, 1992)。

AgNO₃ 对离体培养物的再生具有直接的促进作用, 它不仅可以促进具有再生潜力的细胞数目增加并促进下胚轴芽原基的产生, 还能促进芽原基的伸长加快, 提高芽原基的成芽比例(Radke 等, 1992; 张鹏等, 1997)。

本实验在 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2, 4-D 1 mg/L 的培养基中添加了 AgNO₃ 6 mg/L, 与不添加 AgNO₃ 的对照组比较, 发现添加 AgNO₃ 的培养基上的子叶愈伤组织的褐化率大大降低, 其再生频率相对于对照(未加 AgNO₃)提高了约 30%。

2.2 农杆菌介导的遗传转化

2.2.1 共培养时间对转化的影响

在外植体与农杆菌的共培养中, 将完成外源基因向受体细胞转移并整合到受体细胞核基因组中的整个过程, 一般认为这一过程需要 16 h 以上。因此, 共培养时间对转化效率有着很大影响, 而且不同的物种和受体材料, 农杆菌的最佳共培养时间不同。由于油菜下胚轴与农杆菌易发生过敏反应, 故适宜短时间共培养。在本试验中, 共培养 2 d 可较好的完成外源基因的整合过程。继续延长共培养时间达 3 d 以上, 农杆菌会过度生长, 外植体将受到过度的感染使褐化现象严重, 再生困难, 且后继培养中抑菌困难, 转化率大大降低。

2.2.2 农杆菌菌液浓度及浸染时间对转化的影响

建立适宜的农杆菌感染浓度和时间是影响遗传转化成功与否的重要因素。试验证明, 当农杆菌菌液浓度(OD₆₀₀)在 0.5 时处理下胚轴 30 s 左右, 对培养切段的感染结果较好, 得到了较高的抗性芽率。采用 OD₆₀₀=0.5 进行短时间感染(<30 s), 尽管褐化程度减轻, 但因浸染时间过短, 农杆菌未能充分吸附于下胚轴两端切面的细胞上, 因而转化效率很低。而在 OD₆₀₀=0.5 时, 下胚轴感染时间>1 min 就会引起严重的褐化而死亡。而当 OD₆₀₀>0.5 时, 外植体褐化现象十分严重, 而且抑菌困难, 再生率极低, 大部分外植体在共培养和筛选过程中逐渐发白死亡。但若农杆菌浓度过低, 尤其是当 OD₆₀₀<0.2 时, 经过筛选几乎得不到绿芽。试验表明, 以 OD₆₀₀=0.5 的菌液处理外植体 30 s, 转化效率最高, 实验结果见表 3。

2.2.3 转化再生植株的 PCR 检测及 PCR 结果测序

取抗性植株的叶片和非转基因油菜植株的叶片, 提取基因组 DNA 后, 用 PCR 方法检测发现扩增出的 DNA 片段大小与阳性对照 PCAMBAR. CHI. 11 一致(1 108 bp), 而两个阴性对照均未扩增出任何谱带, 初步证明外源几丁质酶基因已经整合进抗性油菜植株中, 电泳检测结果见图 2。

表 3 农杆菌菌液浓度和浸染时间对转化的影响
Table 3 The influence of *Agrobacterium tumefaciens* concentration and infection to transform

感染时间 Infection time(s)	农杆菌菌液 浓度(OD ₆₀₀) <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> concentration	接种下胚 轴数(个) Inoculation number	再生出绿 芽下胚轴 数(个) Shoot number	转化率 (%) Transfor- mation efficiency
10	0.2	108	10	9.26
	0.5	97	11	11.34
30	0.1	99	16	16.17
	0.3	130	30	23.08
	0.5	160	58	36.25
60	1	150	8	5.33
	0.1	120	0	0
	0.5	98	0	0

注: 8 d 龄“泸州四陵”下胚轴经预培养 2 d 后浸染。

Note: Infect 8 d luzhousiling hypoderm of pre-culture 2 d

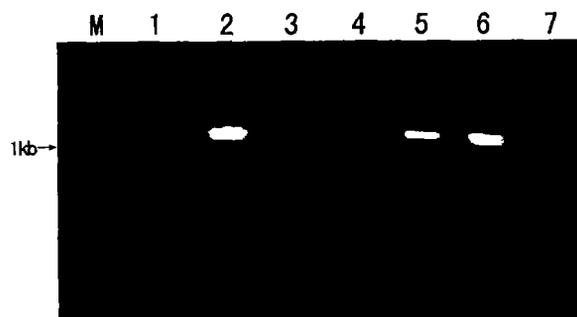


图 2 转基因植株的 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR analysis of transgenic plants

1, 7. 未转化油菜(Non-transgenic plant); 2~5. 转基因油菜(Transgenic plant); 6. 质粒(Plasmid pcambar.chi.11); M. DNA Marker DL 2 000.

回收 1 kb 左右的那条特征带与 PMD-18T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞, 挑阳性克隆测序, 确认该特征带是插入的几丁质酶基因。

3 讨论

自 1991 年 Broglie 等在 *Science* 上报道利用几丁质酶基因转化烟草使其表现对菌株病的抗性以来, 几丁质酶基因在植物抗真菌病研究中日益增多

(Uila, 1992)。目前, 国内“泸州四陵”油菜推广速度缓慢, 其原因之一是它对菌核病的抗性较差, 如能获得抗病转基因植株, 并育成新品种, 便可能加速其推广与利用。本研究室用农杆菌介导的转化方法将水稻几丁质酶基因导入“泸州四陵”芥菜型油菜中, 获得部分抗性植株并进行了初步的 PCR 分子生物学检测, 进一步的检测鉴定工作正在进行中。国内尚未见有获得“泸州四陵”油菜抗菌核病转基因植株的报道。

为了获得更多的转基因抗病植株, 首先要提高下胚轴在农杆菌浸染后再生绿芽的频率, 目前国内外关于这方面的研究主要集中在如何提高外植体再生频率这一点上。很多研究发现, 激素组合和培养条件是影响油菜外植体再生频率的因素(Jain 等, 1988; Khehra 和 Mathias, 1992), 本实验研究了一些影响油菜下胚轴不定芽再生及转化的因素, 发现预培养时间、激素组合及浓度、AgNO₃、农杆菌浸染浓度和时间对下胚轴的芽再生都有不同程度的影响。本实验发现“泸州四陵”下胚轴在农杆菌感染前进行 2~3 d 的预培养所得到较高的转化率明显高于不进行预培养和预培养时间长于 3 d 的下胚轴, 这与前人的报道(石淑稳等, 1998; Charest 等, 1998)相一致。特别值得注意的是本实验还发现最适合“泸州四陵”油菜下胚轴生长的分化培养基为含 MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 1 mg/L 的培养基, 这为提高其外植体分化率及进一步的研究提供了基础。

参考文献:

- Dan LB(单丽波), Jia X(贾 旭). 1998. Chitinase and its application in the anti-fungal diseases genetic engineering (几丁质酶及其在抗真菌病基因工程中的应用)[J]. 生物工程进展, 18(3): 37-40.
- Shi SW(石淑稳), Zhou YM(周永明), Sun XC(孙学成), et al. 1998. Transformation of *Brassica napus* with herbicide resistance gene(甘蓝型油菜遗传转化体系的研究)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University* (华中农业大学学报), 17(3): 205-210.
- Zhang P(张 鹏), Fu AG(傅爱根), Wang AG(王爱国). 1997. Role and possible mechanism of AgNO₃ in plant culture *in vitro* (AgNO₃ 在植物离体培养中的作用及可能的机制)[J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 33(5): 376-379.
- Charest PJ, Holbrook LA, Gabrd J, et al. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 17(3): 205-210.
- Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, et al. 1996. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chitinase gene[J]. *Nature biotechnology*, (14): 634-646.
- Jain RK, Chowdhury JB, Sharma DR, et al. 1988. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica species* [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, (14): 197-206.
- Khehra GS, Mathias RJ. 1992. The interaction of genotype, explants of media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L. [J]. *Journal of Experimental Botany*, 43(256): 1 413-1 418.
- Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant [J]. *DNA Nucl Acid Res*, 8: 4 321-4 325.
- Palmer CE. 1992. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate [J]. *Plant Cell Reports*, (11): 541-545.
- Radke SE, Turner JC, Daniel Facciotti. 1992. Transformation and regeneration of *Brassica rape* using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Reports*, (11): 499-505.
- Uila Rassmussen, et al. 1992. *Plant Molecular Biology*, 20: 227.