

文章编号: 0529-6579 (1999) 04-0062-05

转多个抗真菌蛋白基因水稻植株的获得 及其抗稻瘟病菌的初步研究^{*}

冯道荣, 卫剑文, 许新萍, 许 耀, 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 用基因枪法将水稻碱性几丁质酶 (RC24) 基因、苜蓿葡聚糖酶 (β -Glu) 基因、大麦核糖体失活蛋白 (B-RIP) 基因和潮霉素 (hpt) 基因同时导入籼稻品种 (七丝软占) 中, 获得了 7 个潮霉素抗性再生系, Southern blot 证明 2~3 个抗真菌蛋白基因已整合到水稻基因组中. 初步抗性鉴定表明 R0 代转基因水稻植株对稻瘟病菌的抗性有所提高.

关键词: 转基因水稻; 抗真菌蛋白基因; 基因枪转化; 稻瘟病菌

中图分类号: Q 812 **文献标识码:** A

稻瘟病是影响水稻产量最严重的真菌病害之一. 而单纯应用传统的抗病育种方法难以育出适应稻瘟病菌 (*Piricularia oryzae*) 快速变化的抗性品种. 植物基因工程的发展和一些抗真菌蛋白基因的克隆, 为抗稻瘟病育种开辟了一条可能途径.

植物受到病原菌的攻击会产生一系列的防御反应, 如抗菌毒素的产生, 细胞壁的加厚, 水解酶 (如几丁质酶、葡聚糖酶) 及其他抗菌蛋白 (如核糖体失活蛋白) 的合成等. 综合这些防御机制在抗病性上或许会有互补功能. 体外离体实验表明这些抗真菌蛋白对几种真菌有抑制能力, 综合几丁质酶和葡聚糖酶, 或与核糖体失活蛋白一起有更强的抑菌效果^[1]. 将这些抗真菌蛋白转到作物中首次获得成功的是, 转菜豆几丁质酶基因的烟草和油菜可增加对猝倒病的抗性^[2]. 近来又报道了组成型表达大豆葡聚糖酶基因的烟草植株感染真菌的敏感性变小, 受伤诱导表达大麦核糖体失活蛋白基因的烟草植株高抗立枯丝核菌^[3]. Zhu 等^[3] 实验得出转双基因 (水稻几丁质酶和苜蓿葡聚糖酶) 的烟草植株较转单个基因烟草植株有更强的抗真菌能力. Jach 等^[4] 报道同时表达几丁质酶基因、葡聚糖酶基因或同时表达几丁质酶基因和核糖体失活蛋白基因的烟草植株较转单个基因烟草植株对真菌的抗性有了数量性的提高. 本实验将水稻碱性几丁质酶 (RC24) 基因、苜蓿葡聚糖酶 (β -Glu) 基因、大麦核糖体失活蛋白 (B-RIP) 这 3 个抗真菌蛋白基因同时导入了水稻, 并初步分析了 R0 代转基因植株对稻瘟病菌的抗性.

^{*} 基金项目: 国家 863 计划资助项目

收稿日期: 1998-07-01 作者简介: 冯道荣, 女, 1972 年生, 博士研究生.

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种一七丝软占是华南地区的优质籼稻品种, 易感稻瘟病. 由广东省农科院水稻所提供. 挑取成熟种子盾片长出的胚性愈伤组织 (2~3 mm, 继代不多于 3 次), 用于基因枪转化.

1.2 质粒

质粒 pGB12, pRC24/B-RIP 由本室构建. pGB12 (8.85 kb) 含串联的分别由 Act I 启动子驱动的水稻碱性几丁质酶 (RC24) 基因和苜蓿葡聚糖酶 (β -Glu) 基因; pRC24/B-RIP (5.35 kb) 含由诱导启动子 pRC24 驱动的大麦核糖体失活蛋白 (B-RIP) 基因. 质粒 p35H 由美国 Scripps 研究所的 Dr Fauquet 赠送, 含有 CaMV35S 启动子驱动的 hpt 基因.

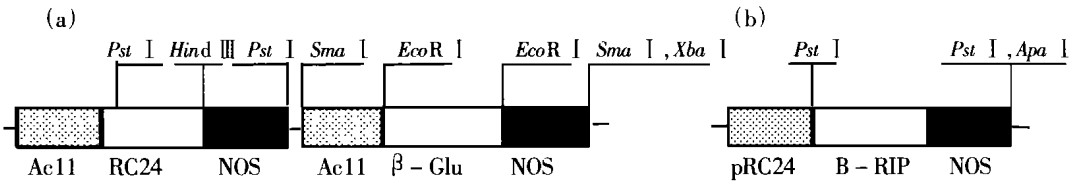


图 1 质粒图谱

Fig. 1 Figure of plasmid

a 质粒 pGB12 图谱, Xba1 是单酶切位点; b 质粒 pRC24/B-RIP 图谱, Apa1 是单酶切位点

1.3 水稻转化

采用 PDS-1000/He 基因枪, 按 n (质粒 pGB12) : n (pRC24/B-RIP) : n (p35H) = 2 : 2 : 1 混合质粒 DNA, 基因枪轰击方法所用培养基及抗性植株的筛选均参照文 [5] 进行.

1.4 再生植株的分子检测

参考文献 [6] 方法从水稻叶片组织提取基因组 DNA, 对再生植株进行点杂交和 Southern 杂交分析. 利用质粒 pGB12 的 Pst I + $Hind$ II 酶切片段 (含 RC24 结构基因, 约 1.0 kb)、pGB12 的 Eco R I 酶切片段 (含完整的 β -Glu 结构基因, 约 1.1 kb), pRC24/B-RIP 的 Pst I 酶切片段 (含完整的 B-RIP 结构基因和 NOS 终止子, 约 1.0 kb) 为探针, 分别对转化植株进行 RC24、 β -Glu、B-RIP 基因的分子鉴定. 按随机引物法 (Promega 公司的 Prime-a-Gene[®] Labeling System) 用 α -P³²dCTP 标记探针, 分子杂交参考《分子克隆实验指南》.

1.5 菌种及转基因植株的稻瘟病菌抗性的初步实验

供试稻瘟病菌生理小种 ZB13 是广东省稻瘟病菌的优势生理小种, 由广东省农科院植保所稻瘟病研究室提供. 稻瘟病菌抗性鉴定参照高桥喜夫提出的叶鞘鉴定法^[7], 采用生长状态一致的转基因植株幼苗 (叶龄 5.5~6.5 片叶子), 取第 4 和第 5 片叶子的叶鞘, 注射稻瘟病菌孢子的悬浮液 (200 倍显微镜下有 25 个孢子左右), 保持 100% 的湿度在 28℃ 恒温培养箱中培养 40 h 后, 镜检叶鞘表皮观察菌丝侵染情况, 菌丝侵染程度用扩展度来表示. 扩展度 = $(0.5 \times n_{0.5} + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + \dots) / (n_{0.5} + n_1 + n_2 + \dots)$, 其中, $n_{0.5}$, n_1 , $n_2 \dots$ 代表不同侵染级别的附着胞数目. 以生长状态一致的未转化植株作对照. 实验重复 3 次.

2 结果与分析

2.1 潮霉素抗性植株的获得

将成熟种子诱导得到的愈伤组织 (图 2a) 继代培养 1~2 次后, 挑选直径 2~3 mm 的

颗粒状胚性愈伤组织作为轰击受体材料,以 hpt 基因作为筛选基因与 RC24 基因、 β -Glu 基因、B-RIP 基因共同转化.在 30 mg/L 潮霉素培养基上,转化和非转化愈伤组织均有增殖没有明显差异,当转到 50 mg/L 潮霉素培养基上培养 2~3 周后,转化组会出现少部分生长旺盛、结构紧密的抗性愈伤组织(图 2b),而对照组的生长则明显受到抑制.将抗性愈伤组织转到含 50 mg/L 潮霉素的分化培养基上,部分抗性愈伤组织会继续增殖并分化出绿苗(图 2c).将绿苗转至 1/2MS 培养基 2~3 周后长出发达的根系(图 2d),此时植株可移栽入土.

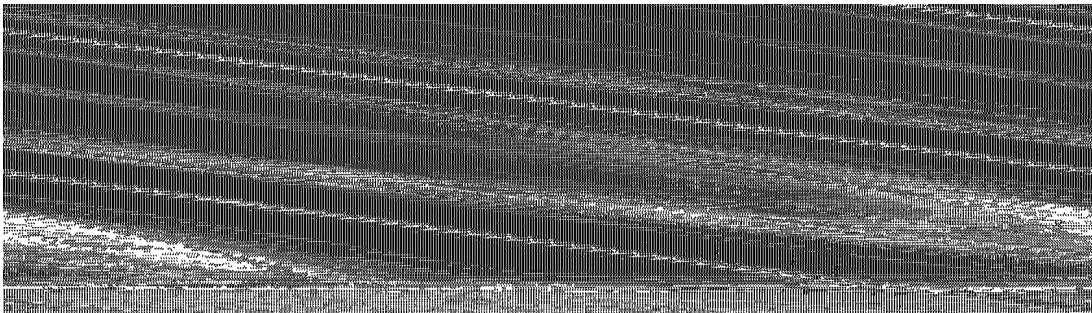


图 2 水稻转化植株的获得

Fig. 2 Regeneration of transgenic rice

a 由成熟种子诱导的胚性愈伤组织; b 转化愈伤组织在附加 50 mg/L 潮霉素继代培养基上 2~3 周后的生长状况; c 潮霉素抗性愈伤组织在附加 50 mg/L 潮霉素的再生培养基上分化成苗; d 再生小苗在附加 50 mg/L 潮霉素的 1/2MS 培养基上的壮苗情况

水稻愈伤组织转化结果:轰击愈伤组织块数为 110,抗性愈伤组织块数为 10,再生植株系数为 7,其中植株数为 66 株,可育植株系数为 6,其中植株数为 54 株.

2.2 潮霉素抗性植株的分子检测

首先对潮霉素抗性再生植株进行了点杂交分析(图片未显示),结果发现 RC24 基因探针与所有植株基因组 DNA(包括未转化植株)均呈阳性杂交信号,这是由于水稻基因组中存在与水稻来源的 RC24 基因同源的內源序列; β -Glu 基因的导入率为 71.4%,B-RIP 基因导入率为 42.8%,3 个基因共同导入的频率为 42.8%.

对点杂交阳性植株进一步做 Southern 杂交分析(图 3).由图 3 可见,未酶切的转基因植株的基因组 DNA(5,8 道)和未转化植株基因组 DNA(3 道)与 RC24 基因探针杂交都只在高相对分子质量 DNA 区域呈阳性杂交信号;经 *Pst* I 消化的转基因植株的基因组 DNA(7,10 道)在 1.0 kb 处均有强的杂交带,而 *Pst* I 消化的未转化植株基因组 DNA(4 道)没有相应杂交带,说明外源 RC24 基因已稳定整合到水稻基因组中;*Xba* I 在 pGB12 质粒上只有一个酶切位点,则每条杂交带代表不同的整合事件,图 3 中经 *Xba* I 消化的转基因植株的基因组 DNA(6,9 道)均有 3 条杂交带,其中 1 条在 8.85 kb 处,与 *Xba* I 酶切的 pGB12 片段(1 道)大小一致,表明外源 RC24 基因整合到水稻基因组中至少有 3 个拷贝,而且有串联整合现象.由图 3b 可见,经 *Sma* I 消化的转基因植株的基因组 DNA(7,10 道)在 3.2 kb 处均有强的杂交带,说明完整的 β -Glu 表达结构(Act1+ β -Glu+NOS)已整合到水稻基因组中,6 和 9 道的杂交信号则说明至少有 2 个(6 道)和 3 个(9 道)拷贝的 β -Glu 基因整合到水稻基因组中,也有串联整合现象;同样图 4(7 和 10 道)可以说明 B-RIP 基因已经整合到水稻基因组中,整合的拷贝数至少有 3 个(6 道)和 4 个(9 道).图

3 和图 4 中 8~10 道基因组 DNA 均来自同一植株, Southern 杂交结果说明上述 3 个基因都整合到了该水稻植株的基因组中。

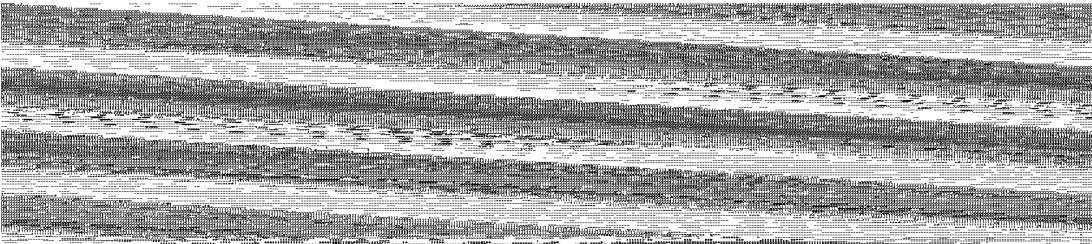


图 3 以 RC24 基因 (a) 和以 β -Glu 基因 (b) 为探针的 2 个转基因植株的 Southern 杂交

Fig. 3 Southern blot analysis of two representative R0 transgenic plants with RC24 probe (a) and with β -Glu probe (b)

1 *Xba*I 消化的 pGB12; 2 (a) *Pst*I 消化的 pGB12; (b) *Sma*I 消化的 pGB12; 3 未转化植株基因组 DNA; 4 *Pst*I 消化的未转化植株基因组 DNA; 5 和 8 转化植株基因组 DNA; 6 和 9 *Xba*I 消化的转化植株基因组 DNA; 7 和 10 (a) *Pst*I 消化的转化植株基因组 DNA; (b) *Sma*I 消化的转化植株基因组 DNA

2.3 转基因植株抗稻瘟病菌试验的初步结果

用稻瘟病菌孢子处理叶鞘 40 h 后, 可以看到叶鞘呈现不同程度的黄化. 撕下叶鞘表皮镜检可以观察到菌丝不同程度的侵染 (图 5). 根据高桥喜夫提出的扩展度计算公式, 计算得出非转化对照的扩展度是 1.8, 而转基因植株的扩展度在 1.5~1.8 之间, 说明转基因植株对稻瘟病菌的抗性有不同程度的提高。

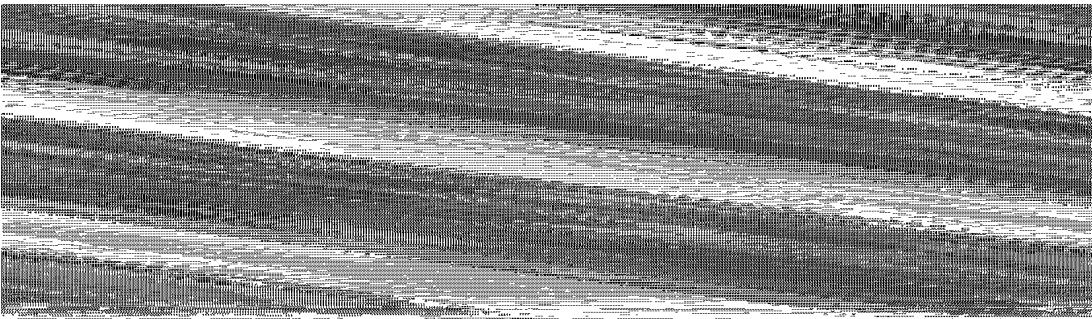


图 4 以 B-RIP 基因为探针的 2 个转基因植株的 Southern 杂交

Fig. 4 Southern blot analysis of two representative R0 transgenic plants with B-RIP probe

1 *Apa*I 消化的 pB-RIP/RC24; 2 *Pst*I 消化的 pB-RIP/RC24; 3 未转化植株基因组 DNA; 4 *Pst*I 消化的未转化植株基因组 DNA; 5 和 8 转化植株基因组 DNA; 6 和 9 *Apa*I 消化的转化植株基因组 DNA; 7 和 10 *Pst*I 消化的转化植株基因组 DNA

图 5 稻瘟病菌接种 40 h 后的叶鞘表皮细胞 ($\times 400$)

Fig. 5 Reaction of sheath epidemic cell after 40 h Infected with *Pyricularia oryzae* ($\times 400$)

a 显示菌丝向不同方向扩展, 附着胞有很多变质颗粒; b 未受侵染的表皮细胞

3 讨 论

本实验已将 3 个抗真菌蛋白基因同时导入了一批水稻植株中. 这 3 个基因防御真菌感染的机制不同: 几丁质和 β -1, 3 葡聚糖是组成绝大多数真菌 (包括稻瘟病菌) 细胞壁的主要成分, 几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶分别催化几丁质和 β -1, 3-葡聚糖的水解反应; 而大麦核糖体失活蛋白通过阻碍真菌 28S rRNA 介导的蛋白质合成, 从而起到抑制真菌生长的作用. 本实验亦表明转上述基因的水稻植株对稻瘟病的抗性有所提高. 但高水平组成型表达烟草液泡几丁质酶基因的烟草植株, 并没有增加对烟草尾孢的抗性. 尽管在离体条件下该病原菌对几丁质酶是很敏感的^[8]. 这主要是因为无法对抗真菌蛋白在转基因植株中的最佳表达部位进行定位. 这一事实也说明离体条件下得到的结果不能简单地引用于活体条件之下. 进一步研究这些抗真菌蛋白基因在转基因植物中的分子生物学特性是解决问题的关键. 本实验转基因后代的分子检测及抗病品种的选育工作正在进行之中.

参考文献:

- [1] LEAH R, TOMMERUP H, SVENDSEN I, et al. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 1564~1570.
- [2] BROGLIE K, CHET I, HOILLIDAY M, et al. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. Science, 1991, 254: 1194~1197.
- [3] ZHU Q, ERLEEN A M, SAMEER M, et al. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco [J]. Bio/Technology, 1994, 12: 807~812.
- [4] JACH G, MUNDY J, GORNHARDT B, et al. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco [J]. Plant J, 1995 (8): 97~109.
- [5] 许新萍, 胡明, 卫剑文, 等. 用高效的基因枪转化系统将抗虫抗病基因导入水稻 [J]. 遗传, 1998, 20 (增刊): 12~14.
- [6] DOYLE A. Isolation of plants DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12 (1): 13~15.
- [7] 植物病理学实验指导 [M]. 李清铎译. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 70~73.
- [8] NEUHAUS J M, AHLGÖ P, HINZ U, et al. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection [J]. Plant Mol Biol, 1991, 16: 141~151.

Introduction of Multiple Antifungal Protein Genes into Rice and Preliminary Study on Resistance to *Pyricularia oryzae* of Transgenic Rices

*
FENG Dao-rong, WEI Jian-wen, XU Xin-ping, XU Yao, LI Bao-jian

Abstract: Three antifungal protein genes: the rice basic chitinase gene, the alfalfa glucanase gene, the barley ribosome inactivating protein gene and a hygromycin phosphotransferase gene were introduced into an indica variety rice — Qisruanzhan by biolistic. Seven independent lines were obtained by selecting for hygromycin resistance. Southern blot proved two or three antifungal protein genes integrated into rice genome. The transgenic plants showed an enhanced resistance to *Pyricularia oryzae* *in vitro*.

Keywords: transgenic rice; antifungal protein gene; biolistic; *Pyricularia oryzae*

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China