

李琳, 付晓佳, 杨燕燕, 等. 农杆菌介导菜豆几丁质酶基因转化洋桔梗[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 512-519.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.008

农杆菌介导菜豆几丁质酶基因转化洋桔梗

李琳, 付晓佳, 杨燕燕, 韦银凤, 陈崇顺

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: 通过农杆菌介导法将抗真菌的几丁质酶基因转入洋桔梗, 以提高其对真菌病害的抗性。结果表明, 成功克隆了抗真菌活性较强的菜豆几丁质酶基因, 构建了植物表达载体, 并对洋桔梗 Double Mariachi Pink 叶块进行转化, 获得了卡那霉素抗性植株, 对抗性植株进行了 2 次 PCR 检测(*nptII* 基因), 第 1 次 PCR 检测获得了 13 个阳性株系, 培养 60 d 后再进行第 2 次 PCR 检测, 获得 11 个阳性株系, 再对生长良好的 5 个转基因株系进行 RT-PCR 检测, 获得了 3 个阳性株系。3 个阳性株系的几丁质酶平均活性(0.215 U、0.225 U 和 0.286 U)均显著高于未转化植株(0.133 U), 转基因株系几丁质酶粗提液对大豆链霉菌 5A、5E 和灰葡萄孢菌 3 种指示真菌的抑菌圈直径均显著大于未转化植株, 其中抑菌效果最好的株系对上述 3 种指示真菌的抑菌圈直径与对照相比, 分别增大了 106.00%、90.91% 和 71.53%。

关键词: 洋桔梗; 几丁质酶基因; 遗传转化; 真菌病害

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)03-0512-08

Agrobacterium-mediated transformation of a bean chitinase gene into *Eustoma grandiflorum*

LI Lin, FU Xiao-jia, YANG Yan-yan, WEI Yin-feng, CHEN Chong-shun

(Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: An antifungal chitinase gene was transferred into the leaf segments of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] Double Mariachi Pink to enhance the resistance to fungal diseases by the *Agrobacterium*-mediated method. Thirteen kanamycin-resistant lines were obtained and analyzed by PCR, among which, three transgenic lines were confirmed *nptII* gene positive by RT-PCR. The chitinase activities of the three transgenic lines were 0.215 U, 0.225 U and 0.286 U, significantly higher than the non-transformed line (0.133 U). The inhibitory effects (in terms of the diameter of inhibition zone) on three fungi (*Streptomyces* 5A, 5E and *Botrytis cinerea*) were significantly greater than the non-transformed line; The strongest inhibitory transgenic line showed larger diameters of inhibition zone by 106.00%, 90.91% and 71.53%.

Key words: lisianthus; chitinase gene; transformation; fungal disease

洋桔梗 [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.] 是龙胆科草原龙胆属观赏植物, 原产于北美洲^[1]。

收稿日期: 2014-12-11

作者简介: 李琳(1989-)女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 主要从事植物生物技术与分子生物学研究。(E-mail) lilin675910@163.com

通讯作者: 陈崇顺, (E-mail) chenchongshun@njnu.edu.cn

经过不断的遗传改良, 洋桔梗以茎秆修长, 花色清新, 花型别致, 而倍受人们喜爱, 成为著名的切花和盆花花卉^[2]。2009年, 洋桔梗就已跻身世界切花市场的前 10 位^[3]。

自从洋桔梗在全世界范围内引种栽培以来, 人们发现其易受多种植物病原的侵害^[4]。按照病原不同, 可将洋桔梗病害分为病毒性病害、细菌性病害

以及真菌性病害。而在所有病害中,由真菌所引起的病害占大部分^[5]。这些病害大大降低了洋桔梗的观赏价值和商业价值。利用基因工程方法改良作物性状可以减少育种时间,更快培育出具有商业价值的新品种,成为传统育种方式的重要补充^[6]。

在植物抗真菌病害基因工程育种的研究中,几丁质酶基因是广泛选用的目的基因。几丁质酶(Chitinase, EC 3.2.1.14)是一种催化 β -1,4糖苷键的水解酶,可将几丁质降解为N-乙酰氨基葡萄糖^[7]。几丁质是由N-乙酰氨基葡萄糖通过 β -1,4糖苷键连接而成的生物多聚物,是多数真菌细胞壁的组成成分^[8]。因此,几丁质酶在抵御病原真菌对植物的侵害方面具有重要作用,是植物防御系统的重要组成部分^[9]。防治真菌病害的几丁质酶基因工程研究,已经在烟草、油菜、小麦等作物上取得不同程度的进展。1986年, Schlumbaum等^[10]首次报道,提纯的菜豆几丁质酶具有抗真菌的活性。1991年, Broglie等^[11]首次报道将菜豆几丁质酶基因置于CaMV35S启动子控制下,转入烟草和油菜,转基因植物组成型表达菜豆几丁质酶基因,对立枯丝核菌表现出抗性,推迟了发病时间。刘伟华等^[12]通过基因枪法将菜豆几丁质酶基因导入小麦幼胚愈伤组织中,转基因植株的几丁质酶活性明显高于对照植株,白粉病的发生时间延缓且程度较轻。王晶晶等^[13]将菜豆几丁质酶基因通过农杆菌介导转入南瓜中,并获得了经PCR检测为阳性的转基因植株。

本研究拟从菜豆中克隆抗真菌活性较强的I类几丁质酶基因,构建植物表达载体,通过农杆菌介导法将其转入洋桔梗,对转基因阳性植株进行分子鉴定、表达分析以及抑菌鉴定,以期为培育洋桔梗抗真菌新种质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

精选的架豆王菜豆(*Phaseolus vulgaris*)种子购于南京金盛达种子有限公司。Double Mariachi Pink洋桔梗无菌苗、大肠杆菌DH5 α 、根癌农杆菌LBA4404、pBI121质粒由本实验室保存。其中pBI121质粒T-DNA区含有新霉素磷酸转移酶(Neomycin phosphotransferase)基因(*nptII*)和报告基因 β -葡萄糖苷酸酶基因(*gus*)。PCR引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。Quick T-A Cloning Kit(含pUC57-

T-vector)购于GenScript公司。植物基因组DNA提取试剂盒、质粒小提试剂盒、RNA提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒购自南京华普生物公司。卡那霉素(Kanamycin, Km)、利福平(Rifampicin, Rif)、羧苄青霉素(Carbenicillin, Cb)、3,5-二硝基水杨酸DNS等生化试剂购自南京丁贝生物公司。大豆链孢菌5A、5E和灰葡萄孢菌由南京农业大学郁志芳教授惠赠。

1.2 菜豆几丁质酶基因的克隆及植物表达载体的构建

1.2.1 菜豆几丁质酶基因的克隆 菜豆种子发芽后取新鲜叶片100 mg,液氮研磨后使用植物基因组DNA提取试剂盒提取菜豆基因组DNA。根据NCBI GenBank上公布的菜豆I类几丁质酶基因序列(M13968),设计1对特异引物,上游引物P₁序列为5'-TGCTCTAGAATGAAGAAGAATAGGATGATG-3',下游引物P₂序列为5'-CGCGAATCCTCACTGAGAGCTGACAAGAAG-3'。菜豆几丁质酶基因PCR优化扩增体系为:10 \times PCR缓冲液5.0 μ l,25 mmol/L MgCl₂3.0 μ l,2.5 mmol/L dNTP 4.0 μ l,50 μ mol/L的引物P₁和P₂各0.2 μ l,50 μ g/ml菜豆基因组DNA 5.0 μ l,5 U/ μ l Taq DNA聚合酶0.2 μ l,加ddH₂O补至50.0 μ l。反应程序为:在95 $^{\circ}$ C预变性3 min;94 $^{\circ}$ C变性1 min,55 $^{\circ}$ C复性1 min,72 $^{\circ}$ C延伸1.5 min,循环35次,72 $^{\circ}$ C延伸10 min,4 $^{\circ}$ C保温。然后用DNA胶回收试剂盒回收菜豆几丁质酶基因PCR扩增产物。使用Quick T-A Cloning Kit将回收的PCR产物Chi与pUC57-T-vector连接重组,得到重组子pUC57-Chi,并送至上海英骏生物技术有限公司测定目的基因的序列。然后根据NCBI上公布的菜豆几丁质酶基因序列,进行序列的同源性分析。

1.2.2 植物表达载体的构建 利用限制性内切酶Xba I和BamH I酶切pUC57-Chi和pBI121质粒,获得菜豆几丁质酶基因Chi和pBI121质粒的大片段。将两者相连,构建成植物表达载体pBI121-Chi(图1),然后转化大肠杆菌DH5 α ,进行酶切鉴定。再通过电转化,将pBI121-Chi转入LBA4404中,然后将转化产物涂于LB+50 mg/ml Km+50 mg/ml Rif培养基上筛选转化体^[14]。

1.3 农杆菌介导法转化洋桔梗

1.3.1 叶块预培养和农杆菌侵染液的制备 参考杨燕燕等^[15]的方法,选取洋桔梗无菌苗叶片,采用“五刀切”法,将叶片切成5 mm \times 5 mm大小均一的叶块;

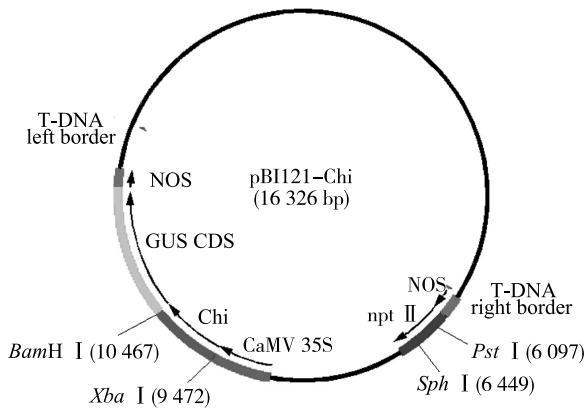


图 1 pBI121-Chi 表达载体

Fig. 1 The expression vector of pBI121-Chi

将切好的叶块置于 MS+0.5 mg/L 6-BA 的预培养基上,并与培养基完全接触,于培养室预培养 4 d。培养条件:温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照度为 $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。将经过菌落 PCR 检测显示为阳性的农杆菌单菌落在 LB+50 mg/L Km +50 mg/L Rif 的平板上进行划线,在 28°C 条件下,暗培养 2 d。用接种环从平板上挑取单菌落,接种于 40 ml LB+50 mg/L Km +50 mg/L Rif 的液体培养基中,在台式恒温振荡器 (28°C , 200 r/min) 中培养 18 h 左右。取 1 ml 菌液接种于 50 ml 无抗生素的 LB 液体培养基 (含 $100 \mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮) 中,继续培养 4~6 h 后,以 4 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入无菌的 1/2 MS 液体培养基直至测得的 OD_{600} 值约为 0.5。

1.3.2 农杆菌转化洋桔梗叶块 将在 MS+0.5 mg/L 6-BA 培养基上预培养 4 d 后的叶块置于农杆菌侵染液中浸泡 10 min。取出叶块,用无菌滤纸吸取多余的菌液后,放回原预培养基中,在黑暗条件下共培养 5 d 后,进行直接卡那霉素筛选和延迟卡那霉素筛选。直接卡那霉素筛选^[16]:将共培养后的叶块转入培养基 (MS+0.5 mg/L 6-BA +25 mg/L Km +250 mg/L Cb) 中,筛选培养 30 d,统计抗性不定芽数量。当抗性不定芽的高度为 2~3 cm 时,将其切下转入培养基 (MS+0.1 mg/L 6-BA +0.05 mg/L NAA +25 mg/L Km+200 mg/L Cb) 中增殖筛选,转接筛选培养 2 次,得到抗性无根苗。延迟卡那霉素筛选:将共培养的叶片转入不含 Km 的脱菌培养基 (MS+0.5 mg/L 6-BA+250 mg/L Cb) 中培养,待再生不定芽长至 2~3 cm 时,将其切下转入 MS+25 mg/L Km +200 mg/L Cb 增

殖筛选培养基中,将抗性不定芽转接筛选培养 2 次,得到抗性无根苗。

1.3.3 抗性无根苗的生根筛选 将经过 Km 筛选后长势良好的抗性无根苗转入 1/2 MS+0.1 mg/L NAA+15 mg/L Km 生根培养基,30 d 后,筛选能够正常生根的抗性转化植株。

1.4 转化植株的鉴定

1.4.1 第 1 次 PCR 检测 取未转化植株和能够正常生根的抗性植株新长出的幼嫩叶片,提取基因组 DNA。根据 NCBI GenBank 上所公布的 *nptII* 基因序列,利用软件 Primer 6.0 设计 1 对特异性引物,对抗性转化植株进行第 1 次 PCR 检测,以非转化植株为对照。上游引物 P_3 序列为:5'-GAGAGGCTATTCGGC-TATG-3';下游引物 P_4 序列为:5'-GCTCAGAAGAAGCTC GTCAA-3'。PCR 优化扩增体系为:10×PCR 缓冲液 2.5 μl , 25 mmol/L MgCl_2 1.5 μl , 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μl , 50 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 P_3 和 P_4 各 0.5 μl , 20 $\mu\text{g/ml}$ 基因组 DNA 2.5 μl , 5 U/ μl *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl , 加 ddH_2O 补至 25.0 μl 。反应程序为:在 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 复性 30 s, 72°C 延伸 1.5 min, 循环 35 次, 72°C 延伸 10 min, 4°C 保温,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.4.2 第 2 次 PCR 检测 将第 1 次 PCR 检测为阳性的抗性株系在生根培养基上转接 2 代,60 d 后再进行第 2 次 PCR 检测 (PCR 扩增体系和反应程序与第 1 次 PCR 检测相同),以进一步确定相关转基因在转化植株基因组中的整合。

1.4.3 转化植株的 RT-PCR 检测 从第 2 次 PCR 检测为阳性的转基因株系中,选取 5 个生长良好的株系进行进一步的 RT-PCR,检测 *nptII* 基因的表达。利用植物 RNA 提取试剂盒提取转化株系的总 RNA,按照 BioTeKe Supermo III RT Kit 的操作步骤进行 RNA 的反转录。根据 *nptII* 基因的序列,设计 1 对特异性引物扩增 cDNA,上游引物 P_5 序列为:5'-GATATG-GACCGTAGGACTG-3',下游引物 P_6 序列为:5'-TCAG-TAGGAGCAGGAGAC-3'。PCR 优化扩增体系为:10×PCR 缓冲液 2.5 μl , 25 mmol/L MgCl_2 1.0 μl , 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μl , 25 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 P_5 和 P_6 各 1.0 μl , cDNA 模板 1.5 μl , 5 U/ μl *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl , 加 ddH_2O 补至 25.0 μl 。反应程序为: 94°C 预变性 3 min, 94°C 变性 40 s, 然后 55°C 复性 50 s, 在 72°C 下延伸 10 min, 循环 35 次, 4°C 保温。扩增产物在

1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.5 转化植株的几丁质酶活性及抗真菌性检测

1.5.1 几丁质酶活性的测定 几丁质酶活性是以催化底物胶体几丁质水解反应所产生的还原糖(N-乙酰氨基葡萄糖)的量表示的^[17]。参照 Saqib 等^[18]的方法,配制 DNS 试剂并制作 N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线。参照吴子健等^[19]方法制备胶状几丁质。参考陈崇顺等^[20]的方法,制备转化植株和未转化植株叶片粗酶液,并测定几丁质酶的活性。酶活性单位(1 U)定义为 1 min 水解胶体几丁质产生 1 μ mol 乙酰氨基葡萄糖所需的酶量。

1.5.2 几丁质酶抑菌活性的测定 选择大豆链孢菌 5A、5E 和灰葡萄孢菌 3 种指示菌株,参照林慧珍等^[21]的方法,挑取少量的菌种分别接种在 PDA 平板上,在 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中倒置培养。第 1 次活化时间为 7 d,待菌丝长满培养皿后再按照此法进行 2 次活化。将活化后的菌种再培养 5 d(28 $^{\circ}$ C,黑暗),待菌体产生孢子后用无菌水反复冲洗菌体,并用无菌纱布过滤,去掉菌丝后得到孢子悬浮液,以 3 000 r/min 离心 1 min。然后用血球计数板计数,最后将得到的孢子悬浮液浓度稀释到 1 ml 2×10^5 个。参考陈崇顺等^[22]的方法,进行抑菌活性的测定。吸取 3 种真菌的孢子悬浮液 200 μ l,均匀涂布于直径为 9 cm 的 PDA 平板上,在 28 $^{\circ}$ C 下培养 2 d,用直径为 6 mm 的无菌打孔器打孔。每孔加入 200 μ l 粗酶液,每个株系 4 个重复。在 28 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后,测量不同粗酶液产生抑菌圈的直径。

1.6 数据分析

利用 SPSS 17.0 软件,对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 菜豆几丁质酶基因的克隆及表达载体的构建

以提取的菜豆基因组 DNA 为模板,利用 P_1 和 P_2 引物进行 PCR 扩增,获得 1 000 bp 左右的菜豆几丁质酶基因(*Chi*)。对 *Chi* 与 pUC57 的重组子阳性克隆 pUC57-*Chi* 用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切检测,得到分子量为 1 000 bp 和将近 3 000 bp 的条带,说明 *Chi* 确已连接到载体 pUC57 上。根据上海英骏生物技术有限公司对重组子 pUC57-*Chi* 中 *Chi* 基因(多个克隆样品)的测序结果,得到精选架豆王菜豆几丁质酶基因的全序列,该序列与 NCBI 上公布的相关序列基本一致。表明已经克隆到所

需的目的基因。

利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切 pUC57-*Chi* 和 pBI121 质粒,回收 *Chi* 和 pBI121 质粒的大片段,将两者相连,得到 pBI121-*Chi*。用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切 pBI121-*Chi*,得到 1 000 bp 左右片段;而同样用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切 pBI121 质粒,则没有该片段。表明已成功构建了植物表达载体。通过电转化法,将从大肠杆菌中提取的 pBI121-*Chi* 和 pBI121 质粒(对照)转入根癌农杆菌 LBA4404 中。

2.2 农杆菌介导法转化洋桔梗叶块

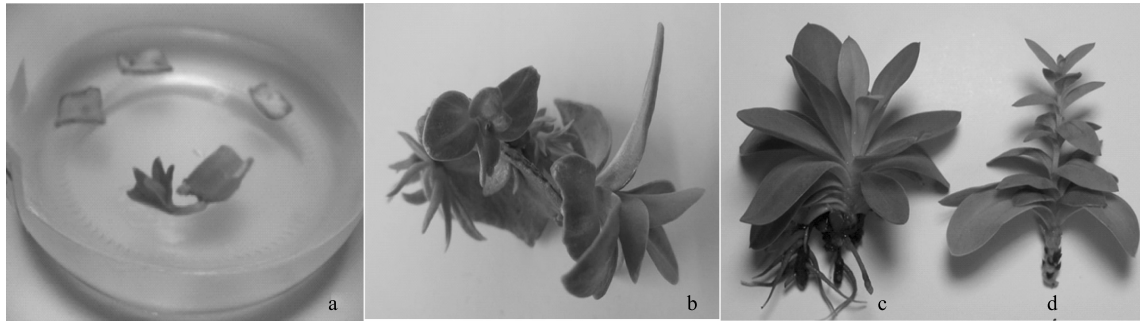
将经过 4 d 预培养、5 d 共培养的叶块,分别进行直接筛选(25 mg/L Km+250 mg/L Cb)和延迟筛选(25 mg/L Km+200 mg/L Cb)。直接筛选诱导不定芽时,2~3 个月后不定芽才逐渐再生出来,且生长很慢,而延迟筛选诱导不定芽时,叶块培养 14~21 d 时切口处即开始出现不定芽,且生长迅速(图 2)。2 种筛选方法共得到 76 个不定芽,将其在 Km 选择压下进行初步筛选,得到 42 个无根抗性苗株系。无根苗通过生根培养基(15 mg/L Km)的筛选,得到 27 个能够正常生根的株系,其中 11 个株系通过直接筛选获得,16 个株系通过延迟筛选获得(图 2)。

2.3 转化植株的鉴定

使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取抗性株系和未转化株系的基因组 DNA,并以提取的基因组为模板,利用设计的引物 P_3 和 P_4 进行 PCR 扩增,共有 13 个株系扩增出长度约为 750 bp 的 *nptII* 基因片段,其中 5 个株系通过直接筛选获得,8 个株系通过延迟筛选获得。

将经第 1 次 PCR 检测为阳性的 13 个抗性株系在生根培养基(含 15 mg/L Km)上转接培养 2 次,60 d 后进行第 2 次 PCR 检测。结果如图 3 所示,1、4、6、11、14、15、18、22、24、25、26 号株系都扩增出了约 750 bp 的特异性条带。因此,可以确认转基因 *npt II* 已经整合到这 11 个转化株系的基因组中,其中有 4 个株系通过直接筛选获得,7 个株系通过延迟筛选获得,直接筛选和延迟筛选转基因的阳性比例分别为 80.00% 和 87.50%。

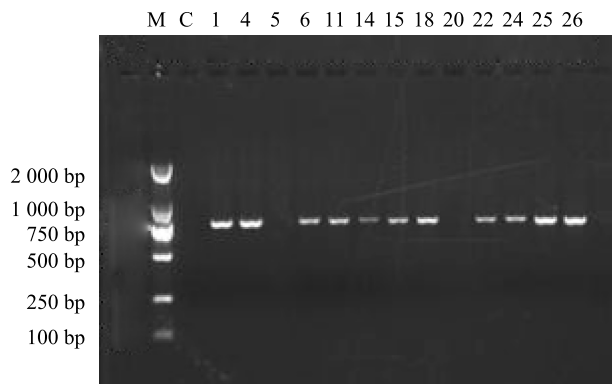
选取长势良好的 5 个转基因株系进行 RT-PCR 检测,结果如图 4 所示,6、18 和 26 号株系扩增出约 200 bp 的特异性条带。该结果表明,*npt II* 基因已经在这 3 个转化株系中正常转录。



a: 直接筛选法叶块不定芽的再生; b: 延迟筛选法叶块不定芽的再生; c: 经 Km 筛选后能正常生根的再生芽; d: 经 Km 筛选后黄化的再生芽。

图 2 叶块不定芽的再生和抗性植株的生根筛选

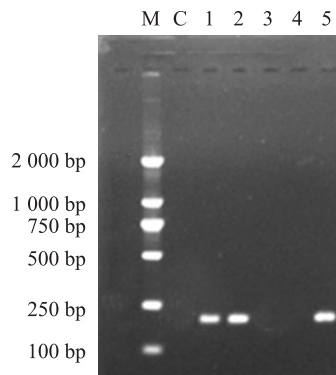
Fig. 2 The regeneration of adventitious buds and screening of the resistant seedlings by rooting



M 为分子量标准 DL 2000, C 为未转化株系, 1、4、5、6、11、14、15、18、20、22、24、25、26 为抗 Km 株系。

图 3 转接 2 次所得抗 Km 转化株系的第 2 次 PCR 检测

Fig. 3 The second PCR amplification for Km resistant lines



M: 分子量标准 DL 2000; C: 未转化株系; 1~5: 转基因株系 (6、18、22、25、26 号株系)。

图 4 转化植株的 RT-PCR 检测

Fig. 4 RT-PCR amplification of transgenic lines

2.4 转化植株的几丁质酶活性及抗真菌活性

以 N-乙酰氨基葡萄糖的浓度 (mg/ml) 为横坐标, 平均 OD_{530} 值为纵坐标, 绘制 N-乙酰氨基葡萄糖标准曲线, 得线性回归方程为 $Y = 0.590x - 0.037$, $R^2 = 0.9998$ 。说明该方法在已知浓度范围内有良好的线性关系。用 DNS 法测定 3 个转基因株系的几丁质酶活性, 6 号株系为 (0.215 ± 0.005) U, 18 号株系为 (0.225 ± 0.040) U, 26 号株系为 (0.286 ± 0.002) U, 未转化株系为 (0.133 ± 0.003) U。用 SPSS16.0 进行单因素方差分析, 结果显示 6、18 和 26 号转基因株系的几丁质酶活性与未转基因植株相比, 分别提高了 61.65%、69.17% 和 115.04%, 4 个株系之间的差异均达到显著水平 ($P < 0.05$), 在 3 个转基因株系中, 26 号株系的几丁质酶活性最高 (0.286 U)。说明导入的外源菜豆几丁质酶基因在洋桔梗转化植株体内得到了表达, 但表达量在不同株系间存在差异。

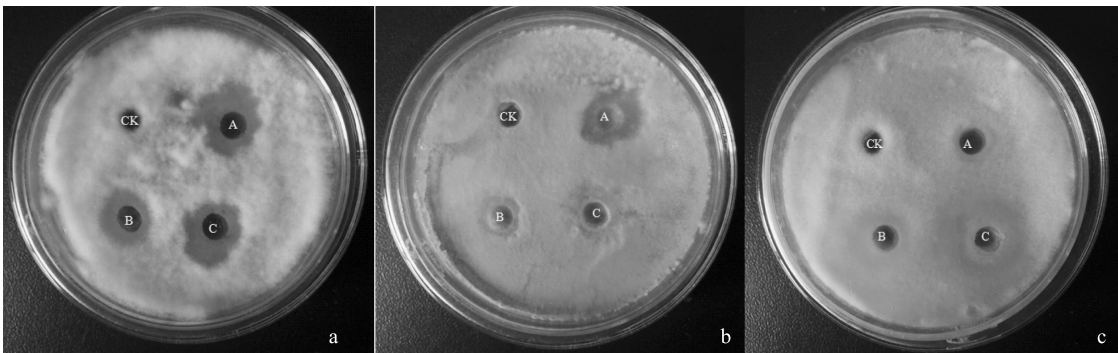
提取 6、18 和 26 号转化株系的几丁质酶粗提液, 以未转化洋桔梗植株为对照, 分别测定不同株系粗提液对大豆镰孢菌 5A、5E 和灰葡萄孢菌 3 种指示真菌的抑制作用。以抑菌圈的直径作为抑制作用强弱的判断标准。结果表明, 与未转化对照相比, 3 个转基因株系 (6、18 和 26 号株系) 的抑菌效果显著性增强, 对大豆镰孢菌 5A 的抑菌作用分别提高了 66.73%、84.91% 和 106.00%, 对大豆镰孢菌 5E 的抑菌作用分别提高了 30.36%、54.55% 和 90.91%, 对灰葡萄孢菌的抑菌作用分别提高了 48.71%、51.46% 和 71.53%, 其中 26 号株系对 3 种真菌的抑菌效果最好 (表 1、图 5)。

表 1 不同转基因株系对指示菌株的抑菌效果

Table 1 Inhibitory activities of transgenic lines against three indicator fungi

指示菌株	抑菌圈直径(mm)			
	非转化植株	转基因 6 号株系	转基因 18 号株系	转基因 26 号株系
大豆镰孢菌 5A (<i>Streptomyce</i> 5A)	5.50±0.29a	9.17±0.44b	10.17±0.44bc	11.33±0.33c
大豆镰孢菌 5E (<i>Streptomyce</i> 5E)	5.50±0.29a	7.17±0.44b	8.50±0.29c	10.50±0.29d
灰葡萄孢菌 (<i>Botrytis cinerea</i>)	5.83±0.17a	8.67±1.20b	8.83±0.17b	10.00±0.57b

同一行中不同字母表示差异达到 0.05 显著水平。



a:大豆镰孢菌 5A; b:大豆镰孢菌 5E;c:灰葡萄孢菌。CK:未转化植株;A~C:转基因 6、18、26 号株系。

图 5 转基因洋桔梗株系几丁质酶粗提液对指示真菌的抑制

Fig.5 Inhibition against indicator fungi by the crude chitinase extraction from three transgenic lines of *Eustoma grandiflorum*

3 讨论

3.1 转化体的直接筛选和延迟筛选

参考本实验室前期工作,本研究以 25 mg/L Km 为选择压,对转化体进行筛选。首先进行直接筛选,绝大部分的叶块上不能分化不定芽,逐渐白化死亡,只有极少部分叶块能够再生,但不定芽生长很慢。Van der Krol 等^[23]认为可适当降低外植体分化阶段的选择压,甚至可以除去选择压。贾庆利等^[24]认为选择压施加的时机因所使用的转化方法、外植体类型、物种等的差异而不同。如过早施加选择压,转化细胞也许来不及恢复到生长状态,抗性基因也来不及表达,转化细胞就会在选择压下被抑制甚至杀死。因此,本研究进行了延迟筛选,即待不定芽长至 2~3 cm 后,再施加选择压,不定芽生长迅速、良好,能够很快成苗。2 次 PCR 检测结果表明,直接筛选和延迟筛选转基因的阳性比例相差不大,分别为 80.00% 和 87.50%。

3.2 转化体的 2 次 PCR 检测

Southern blot 是鉴定转基因整合及其拷贝数的

传统方法,但其试验过程较为费时、费力,同时对样品的数量、质量及操作技术要求较高。转基因在受体植物中,一般有 2 种表达:瞬时表达和稳定表达。瞬时表达大多只延续 10 d 多,此后即无表达。在农杆菌介导的转基因研究中,脱菌培养一般需要 5~6 次继代培养。如果停止使用抗生素后外植体又有农杆菌生长,可再使用抗生素脱菌,对有的植物可一直使用抗生素,直到试管苗形成^[25]。

在本研究中,我们对 *nptII* 基因运用 2 次操作相对简便的 PCR 进行阳性植株的检测。首先以农杆菌转化洋桔梗,筛选再生的不定芽,然后将继代 3 次的抗性芽转入含 15 mg/L Km 的生根培养基。30 d 后,对获得的生根抗性植株的幼嫩叶片进行第 1 次 PCR 检测,获得 13 个阳性株系,再经 2 次继代后进行第 2 次 PCR 检测,获得 11 个阳性株系。经第 1 次 PCR 检测为阳性的 5、20 号株系,在第 2 次检测时为阴性,原因可能是转化株系在第 1 次检测时尚有少量残留农杆菌侵染,而在第 2 次检测时已无农杆菌残留。

3.3 转基因表达的 RT-PCR 检测

RT-PCR 方法检测外源基因的表达具有灵敏度高、特异性强、便捷快速以及对原始材料的质量要求较低等优点^[26]。Guo 等^[27]通过农杆菌介导法转化紫茎泽兰时,在 PCR 检测为阳性的 7 个株系中随机挑选 3 个进行 RT-PCR 检测,结果显示均为阳性。Jia 等^[28]将外源的几丁质酶基因转入毛白杨以增强其抗烂皮病的能力,经 PCR 检测有 16 个株系为阳性,选取 5 个株系进行 RT-PCR 检测,结果均为阳性。

在本研究中,选取 *nptII* 基因进行 RT-PCR 检测,主要考虑植物中几丁质酶基因的同源性;因 *nptII* 基因在植物中不存在,该基因的表达一定程度可作为外源几丁质酶基因表达的指示。目的基因与筛选标记基因的转录一般具有较一致的对应关系。Jayaraj 等^[29]利用农杆菌介导法,将几丁质酶基因 *chi-2* 和脂质转移蛋白基因 *lp* 转入胡萝卜中,通过 RT-PCR 检测发现,没有表达筛选标记基因 *bar* 的 7 个转基因株系中 2 个目的基因的检测结果也为阴性;Celikkol 等^[30]用农杆菌介导法转化扁豆,选用 *gus* 和 *nptII* 基因进行 RT-PCR 检测,*gus* 基因检测结果为阴性的 5 号和 7 号转基因株系的 *nptII* 基因检测结果也为阴性;Lee 等^[31]用外壳蛋白基因 *CMVPO-CP* 和 *nptII* 基因转化辣椒,RT-PCR 检测结果表明,各株系 *nptII* 基因的转录结果均与 *CMVPO-CP* 基因一致。本研究选取 5 个阳性株系,对 *nptII* 基因进行 RT-PCR 检测,有 3 个株系扩增出特异目的条带。这进一步表明,导入的外源基因已经整合于转化植株的基因组中并正常转录。其余 2 个株系没有扩增出特异目的条带,是因为外源基因虽存在于转化植株中,但未能进行正常转录,发生了基因沉默。在转基因植株中外源基因的失活是普遍存在的现象。

3.4 几丁质酶活性检测

质粒 DNA 导入植物细胞后,大部分并未插到染色体上,而是以游离状态存在。这部分质粒 DNA 在瞬时表达中起重要作用。在合适的条件下,转化外源基因的瞬时表达通常在数小时后就检测到其表达的产物,并在 1~2 d 内达到最高值,随后又逐渐降低,至 10 d 后完全消失^[25]。本研究在转化至少 6 个月之后测定转化植株的几丁质酶活性,发现与未转化植株相比,3 个转基因株系的几丁质酶活性分别提高了 61.65%、69.17% 和 115.04%。该结果充

分说明,这不是外源转基因的瞬时表达,而是外源基因整合到基因组 DNA 分子上的稳定表达。刘伟华等^[12]以 CaMV 35S 为启动子,用菜豆几丁质酶基因转化小麦幼胚愈伤组织,3 株转基因植株叶片的几丁质酶活性比未转化植株分别提高了 61.94%、65.35% 和 84.86%,感染白粉病的过程也比对照株延缓并且发病程度较轻,其中 1 株赤霉菌侵染后未扩展。Tohidfar 等^[32-33]研究发现,与非转基因植株相比,转化菜豆几丁质酶基因的棉花植株中,几丁质酶的活性增高了几倍,且在温室试验中,这些转基因植株对黄萎病均表现出更强的抗性。

本研究中 3 个转基因株系的抑菌效果也明显优于未转化植株。在这 3 个转化株系中,酶活性最高的 26 号株系对 3 种真菌的抑菌效果均优于另外 2 个株系,这可能与外源基因插入位点的不确定性有关。张志忠等^[34]指出,导入外源几丁质酶基因的转基因植物对某些病原的抗性都会有所增强,且大多数转化植物抗性增强的程度与其所表达出的几丁质酶量呈正相关,但也有例外,这可能与物种、导入的目标植物、病原菌的种类等都有关系。

参考文献:

- [1] OHKI T, KAJIHARA H, MAOKA T. First of Moroccan pepper virus on lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) in Japan [J]. J Gen Plant Pathol, 2014, 80: 90-93.
- [2] KAWABATA S, YOKOO M, NII K. Quantitative analysis of corolla shapes and petal contours in single-flower cultivars of lisianthus [J]. Sci Hort, 2009, 121: 206-212.
- [3] THIRUVENGADAM M, YANG C H. Ectopic expression of two MADS box genes from orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) and lily (*Lilium longiflorum*) alters flower transition and formation in *Eustoma grandiflorum* [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28: 1463-1473.
- [4] KIL E J, BYUN H S, HWANG H. First report of tomato yellow leaf curl virus infecting Eustoma (*Eustoma grandiflorum*) in Korea [J]. Plant Dis, 2014, 98(8): 1163.
- [5] TRUTER M, WEHNER F C. Crown and root infection of *Lisianthus* caused by *Fusarium solani* in South Africa [J]. Plant Dis, 2004, 88(5): 573.
- [6] PAOLETTI M G, PIRMENTEL D. Genetic engineering in agriculture and the environment [J]. BioScience, 1996, 46(9): 665-673.
- [7] BOLLER T, GEHRI A, MAUCH F, et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function [J]. Planta, 1983, 157: 22-31.
- [8] HAMMAM I, SIALA R, JRIDI M, et al. Partial purification and characterization of chiI08, a novel antifungal chitinase produced

- by *Bacillus cereus* I08 [J]. J Appl Microbiol, 2013, 115(2): 358-366.
- [9] 曲敏,王全伟,李新玲. 菜豆几丁质酶基因的克隆、序列分析及表达[J]. 大豆科学, 2007, 26(2): 121-126.
- [10] SCHLUMBAUM A, MAUCH F, VÖGELI U, et al. Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth [J]. Nature, 1986, 324: 355-356.
- [11] BROGLIE K E, CHET I, HOLLLIDAY M, et al. Transgenic plant with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. Science, 1991, 254(5035): 1194-1197.
- [12] 刘伟华,李文雄,胡尚莲,等. 基因枪法向小麦导入几丁质酶基因的研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(1): 54-59.
- [13] 王晶晶,屈淑平,崔崇士. 农杆菌介导几丁质酶基因转化南瓜的研究[J]. 北方园艺, 2007(10): 184-185.
- [14] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 金冬雁,译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [15] 杨燕燕,陈崇顺,瞿大枫,等. 洋桔梗高频再生系统的建立及其卡那霉素敏感性测定[J]. 江苏农业科学, 2007(2): 98-100.
- [16] 王转梅. 烟草碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因转化 Double Mariachi Pink 洋桔梗的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2009.
- [17] KATAPODIS P, CHRISTAKO P V, KEKOS D, et al. Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology [J]. Biochem Eng J, 2007, 35: 136-141.
- [18] SAQIB A A N, WHITNEY P J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars [J]. Biomass Bioenerg, 2011, 35(11): 4748-4750.
- [19] 吴子健,王新宇,石晓旭,等. TUV26 菌株几丁质酶酶解所产几丁寡糖产物的分析[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 178-181.
- [20] 陈崇顺,徐凤彩,李明启. 21 科 41 种(变种)植物叶片几丁质酶系的研究[J]. 植物资源与环境学报, 1993, 2(4): 28-33.
- [21] 林慧珍,苟萍. 灰葡萄孢菌的诱变及其致病性研究[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(5): 877-881.
- [22] 陈崇顺,朱雪峰,郁志芳. 豇豆几丁质酶纯酶液对不同真菌的作用[J]. 植物保护学报, 2000, 27(4): 375-376.
- [23] VAN DER KROL A R, MUR L A, BELD M, et al. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited marker of gene copies may lead to a suppression of gene expression [J]. Plant Cell, 1999, 2: 291-299.
- [24] 贾庆利,龚振辉,李大伟. 转基因植物的筛选[J]. 陕西农业科学, 2004(5): 53-54.
- [25] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002: 188,395,666-668.
- [26] DEAN J D, GOODWIN P H, HSIANG T. Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of β -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivum* [J]. Plant Mol Biol Rep, 2002, 20: 347-356.
- [27] GUO H M, ZHANG Y Q, WAN F H, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eupatorium adenophorum* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2010, 103:417-422.
- [28] JIA Z C, SUN Y M, YUAN L, et al. The chitinase gene (*Bbchit1*) from *Beauveria bassiana* enhances resistance to *Cytophora chrysosperma* in *Populus tomentosa* Carr [J]. Biotechnol Lett, 2010, 32: 1325-1332.
- [29] JAYARAJ J, PUNJA Z K. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26:1539-1546.
- [30] CELIKKOL A U, MAHMOUDIAN M, KAMCI H, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of a recalcitrant grain legume, lentil (*Lens culinaris* Medik) [J], Plant Cell Rep, 2009, 28: 407-417.
- [31] LEE S N, CHOI S H, RYU K B, et al. Molecular and cytogenetic assessment of transgenic hot peppers resistant to *Cucumber Mosaic Virus* [J]. Hort Environ Biotechnol, 2011, 52(2): 211-217.
- [32] TOHIDFAR M, MOHAMMADI M, GHAREYAZIE B. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2005, 83(1): 83-96.
- [33] TOHIDFAR M, RASSOULI H, NAGHNAZAI A, et al. Evaluation of stability chitinase gene in transgenic offspring of cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Iran J Biotechnol, 2009, 7(1):45-49.
- [34] 张志忠,吴菁华,吕柳新,等. 植物几丁质酶及其应用研究进展[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(4): 494-499.

(责任编辑:张震林)