

· 药材与资源 ·

基因枪转化双价防卫基因获得抗立枯病白术

毛碧增, 孙 丽, 刘雪辉*

(浙江大学生物技术研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 目的 通过基因工程育种获得抗病转基因白术株系。方法 在已建立的高效白术茎尖再生体系基础上, 利用基因枪介导法转化水稻几丁质酶基因(*RCH 10*)和苜蓿 β 1, 3-葡聚糖酶基因(*AGLU*), 对所获得的转基因株系进行PCR分析、GUS染色以及抗病性检测。结果 获得了25个PCR检测阳性的转基因株系, 其中5个株系对白术立枯病抗性增强。结论 利用转基因技术获得抗病新株系, 可以缩短抗病品种育种年限, 同时拓宽了白术抗病育种的基因库。

关键词: 转基因白术; 几丁质酶; β 1, 3-葡聚糖酶; 立枯病抗性

中图分类号: R 282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0099-04

Transgenic *Atractylodes macrocephala* with double defense genes exhibiting resistance to *Rhizoctonia solani*

MAO Bi-zeng, SUN Li, LIU Xue-hui

(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: **Objective** The transgenic *Atractylodes macrocephala* resistance to *Rhizoctonia solani* was obtained by gene engineering. **Methods** On the base of the efficient regeneration system of Baizhu via shoot organogenesis, the rice chitinase gene (*RCH 10*) and the alfalfa β 1, 3-glucanase gene (*AGLU*) were tandem-inserted into the transformation vector pB101, which was transformed into *A. macrocephala* with gene gun. Transformants were confirmed by PCR, GUS assay, and disease resistant. **Results** Twenty-five independent transformants possessed desired genes were observed by PCR detection, and among them five transformants exhibiting resistance to *Rhizoctonia solani*. **Conclusion** The disease resistant variety has been obtained by transformation, which provides a shorten avenue for the direct introduction of novel traits into *A. macrocephala* through genetic engineering without the need for numerous back-crossing in breeding programs that slow down cultivar improvement, meanwhile it improves disease resistant gene pool.

Key words: transgenic *Atractylodes macrocephala* Koidz.; chitinase; β 1, 3-glucanase; resistance to *Rhizoctonia solani*

白术是菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 主产于浙江、安徽等地, 在《神农本草经》中列为上品。白术属补益类中药, 具健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎等功效^[1]。随着研究深入, 发现白术还具有抗炎^[2]、抗肿瘤^[3, 4]、止腹泻^[5]等作用。

中药的安全、有效和稳定是实现中药现代化的关键。在中药材规范栽培中, 病害防治是最关键的环

节。随着栽培规模的扩大, 白术受到病原物的危害逐渐增强, 立枯病、根腐病、白绢病等病害都是白术生长各阶段的重要病害。一般病虫害可导致减产20%~30%, 严重的高达50%, 甚至绝收^[6]。目前, 化学防治是常用手段, 但农药的长期及不规范使用, 在造成了环境污染、农药残留超标以及病害的抗药性同时, 也降低了中药材的质量, 影响着药理品质, 已成为我国药用植物持续发展和中药材出口创汇的重

* 收稿日期: 2007-04-09

基金项目: 浙江省科技厅2005年重点和重大课题资助项目(2005C13016, 2005C22080)

作者简介: 毛碧增(1972—), 女, 副研究员, 硕士生导师, 在职博士生, 主要从事植物组织培养以及抗病分子育种, 承担了多项省部级课题, 获得2006年农业部农牧渔业丰收奖三等奖(第一完成人)。Tel: (0571)86971678 E-mail: maobz@zju.edu.cn

要障碍。

在病害防治策略中,抗性品种的应用是最为经济有效的方法,而基因工程育种是解决这一问题的理想手段。笔者通过基因枪转化几丁质酶基因(*RCH10*)和苜蓿 β 1,3-葡聚糖酶基因(*AGLU*)双价表达盒,得到了抗立枯病的转基因白术株系,增加了白术抗立枯病育种的基因资源。

1 材料与方法

1.1 药材:白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 由浙江省磐安县中药材研究所提供。转化质粒为 pZ100 (图1), 为 *RCH10* 和 *AGLU* 串联构建于 pBI101, 分别由 35S 启动子和 35S 增强子启动基因表达(由朱群博士惠赠); 基因枪为 BioListic[®] PDS—1000/He (BD-RAD); 立枯病菌 *Rhizoctonia solani* Kuhn. 株由浙江大学植保系真菌研究室提供的强致病力菌株 AG-1-2B。

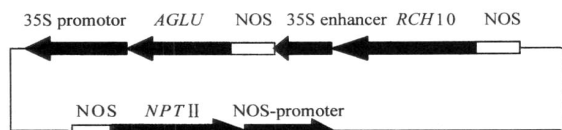


图1 转基因pZ100质粒图谱

Fig 1 Map of transgenic pZ100 plasmid

1.2 基因枪介导的白术遗传转化

1.2.1 白术苗对卡那霉素(kanamycin, Kan)的本底抗性: 取2~3 cm高的小苗分别接种到含Kan不同质量浓度(0、10、20、30、40、50 mg/L)的增殖培养基(MS+0.5 mg/L TDZ+0.2 mg/L NAA)上, 每个浓度6瓶, 每瓶5株苗, 重复3次。数据统计采用Duncan的新复极差测验的多重比较法(SSR)^[7]。

1.2.2 基因枪轰击茎尖组织及转化子的筛选: 利用本实验室已建立的高效基因枪转化体系, 把质粒pZ100导入白术茎尖, 轰击转化参数参考文献的方法^[8]。经轰击的茎尖组织接种到增殖培养基(MS+0.5 mg/L TDZ+0.2 mg/L NAA)恢复培养一周, 然后接种于含Kan的筛选培养基筛选抗性转化子。

1.3 转基因植株的PCR检测

1.3.1 转基因植株的DNA提取: 称取0.1 g叶片放入1.5 mL的离心管中, 加入400 μ L提取缓冲液TPS (100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 10 mmol/L EDTA pH 8.0; 1.0 mmol/L KCl), 用1 mL的枪头将叶片捣碎后放置75 $^{\circ}$ C的水浴锅温浴20 min, 12 000 r/min离心10 min, 取上清液加入等体积的异丙醇, 轻轻混匀, 8 000 r/min离心10 min, 取沉淀, 加入200 μ L 70%的乙醇, 8 000 r/min离心5

min, 弃上清, 将沉淀干燥, 溶于TE缓冲液, 经RNA酶消化后, 再经沉淀纯化。制备的DNA样品用于PCR分析。

1.3.2 转基因植株的PCR扩增: *NPTII*基因的引物为FP: 5'CTCGACGTTGTCACTGAAG 3'; RP: 5'TCGTCCAGATCATCCTGATC 3'; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 30 s。 *AGLU*基因的引物为FP: 5'GGTGTGCCTAATTCGACCTTC 3'; RP: 5'GTAGCCCAAGGCCTTCTTGGA 3'; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 61 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 30 s。 *RCH10*基因的引物为FP: 5'TCCTACAACTTCAACTACG 3'; RP: 5'ATCACTGTGTGGAA GCTAGG 3'; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 51 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 30 s。所有反应循环35次, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 反应产物于1.0%琼脂糖电泳检查。

1.4 转基因植株的组织化学染色: GU S活性的组织化学染色分析参照Jefferson等^[9]的方法检测。取转化植株的根与含底物X-Gluc (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-葡糖醛酸, Sigma)的染色反应液于37 $^{\circ}$ C过夜。

1.5 转基因白术对立枯病的抗性检测: 实验在人工智能气候箱内进行, 将转基因PCR阳性植株按株系种植, 在苗期接种立枯病病菌。将立枯病病菌接种于PDA培养基, 26 $^{\circ}$ C培养3 d, 5 mm $\times$ 5 mm的菌块接种于植株茎基部, 保持温度26 $^{\circ}$ C, 湿度90%。7 d后调查病情。

2 结果与分析

2.1 白术对Kan的本底抗性: 白术小苗在添加了不同质量浓度Kan的增殖培养中培养一个月后, 发现Kan对芽增殖分化以及苗的生长势具有极显著的差异, 见表1。

表1 不同质量浓度卡那霉素对芽增殖的影响

Table 1 Effect of Kan concentration on proliferation of shoots

Kan/(mg $\cdot$ L ⁻¹)	增殖倍数	生长势
0	5.08 $\pm$ 0.10 A	植株健壮, 叶色浓绿
10	4.53 $\pm$ 0.15 B	新叶黄白色
20	2.78 $\pm$ 0.12 C	新叶黄白色
30	1.40 $\pm$ 0.09 D	叶片变黄加快
40	0.00 $\pm$ 0.00 E	植株死亡
50	0.00 $\pm$ 0.00 E	植株死亡

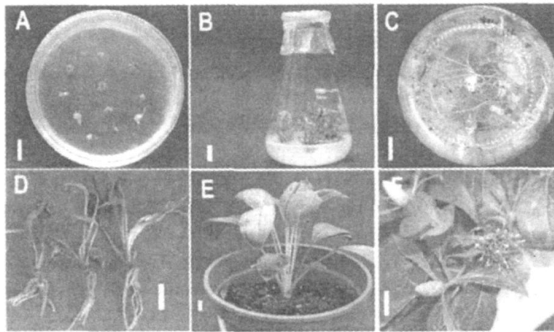
字母不同者表示相互间存在差异 ($P \leq 0.01$)

Values followed by different letters are significantly different at $P \leq 0.01$

在实验中也发现, 培养基中Kan为10~20 mg/L时, 植株新叶呈黄白色, 增殖分化能力降低; Kan

达到 30 mg/L, 植株变黄趋势加快, 基本上不分化; Kan 超过 40 mg/L 时, 植株完全不能分化, 培养过程中苗体逐渐变黄 1 个月后全部死亡。因此本实验采用 40 mg/L Kan 筛选转化后的茎尖。

2.2 转基因植株的获得: 利用基因枪介导法共转化了 812 个茎尖组织, 转化后的茎尖组织在无抗生素的增殖培养基 (MS + 0.5 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA) 上恢复一周后, 转入筛选培养基 (含有 Kan 40 mg/L 的增殖培养基) 中进行筛选, 获得抗性株系 48 个, 并得到了生长势正常的 39 个独立转化株系, 独立转化子按株系种植, T₀ 代植株在温室内生长形态和野生型相似, 能正常开花结果, 但块茎偏小, 是第一代组培苗的普遍现象, 转基因植株可以作为育种材料。转基因抗性茎尖组织、抗性植株以及盆栽苗见图 2。



A-抗性茎尖 B-抗性茎尖的快繁 C-转基因植株的根 D-移栽前转基因植株的根系 E-移栽 2 个月后的转基因植株 F-开花的转基因植株

A-production of Kan-resistant transgenic shoots of *A. macrocephala* B-proliferation of Kan-resistant transgenic shoots C-roots of transgenic plantlets D-transgenic plantlets with *in vitro*-regenerated root system before transfer to soil E-*in vitro*-regenerated transgenic plantlets 2 months after transfer to soil F-mature normal transgenic plants produced in greenhouse

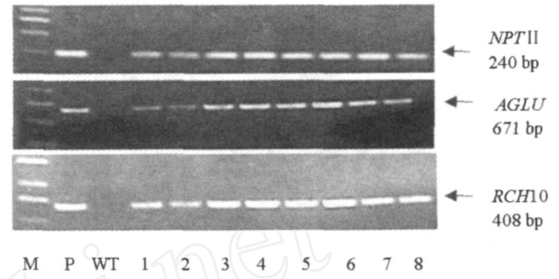
图 2 转基因白术各生长阶段

Fig 2 Various growing stages of transgenic

A. macrocephala

2.3 转基因植株的 PCR 检测: 提取 Kan 抗性白术叶片的 DNA, 以 pZ100 质粒为阳性对照, 野生型为阴性对照, 分别用 3 对引物进行扩增 (图 3)。结果表明, 39 个独立转化子中有 25 个转化子能扩增出各基因相应的目的片段, 而且这 25 个转化子同时具有 3 个基因的目的片段, 揭示了双价基因表达盒完整的导入了植株中。

2.4 GUS 染色: 将 PCR 阳性的不同 T₀ 代转基因株系和野生型植株的根浸入含有 X-Gluc 的染色反应



M-1 kb 的 DNA 标记 P-阳性质粒 WT-野生型

1~8-不同的转基因株系

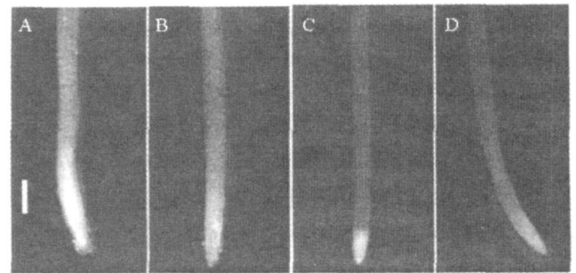
M-1 kb DNA ladder P-plasmid control WT-wild type

1-8-various transgenic lines

图 3 转基因白术的 PCR 检测

Fig 3 PCR Detection of T₀ transgenic plants

液, 37℃ 保温过夜。结果显示野生型不显色, 转基因植株的根显示蓝色, 而且有的株系根蓝色显示程度有差异 (图 4), 表明 GUS 基因已整合到白术的基因组中并进行了组成性表达且表达程度有差异。



A-野生型 B~D-转基因株系

A-wild type B-D-transgenic lines

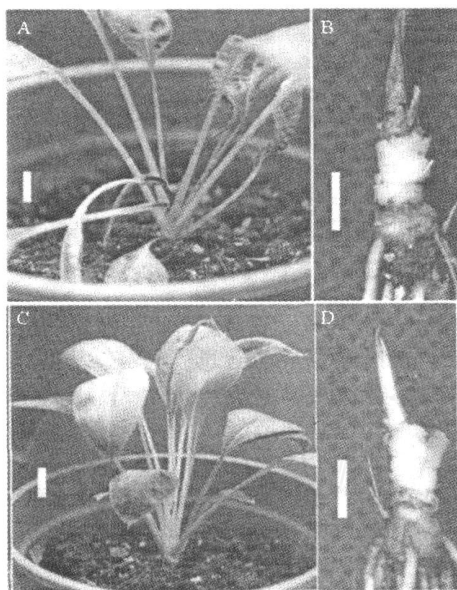
图 4 GUS 检测

Fig 4 GUS Staining assay

2.5 转基因植株的抗病性: 取其中 15 个 PCR 反应为阳性的株系 (每株系 3 株) 进行立枯病抗性检测。实验结果显示不同转基因株系的抗病性存在着较大的差异, 但都比野生型抗病性强, 见图 5。通过本研究得到了 5 个抗性比较强的株系, 可以作为进一步研究抗病分子育种的材料。

3 讨论

通过基因操作, 人们可以获得产量、品质、抗病虫害、抗逆性改良的转基因材料, 大大拓宽了育种的基因库。白术由于多年种植, 导致真菌病害严重。真菌细胞壁的主要成分是几丁质和葡聚糖, 几丁质酶和 β 1, 3-葡聚糖酶具有降解几丁质和葡聚糖的作用。近 10 年来, 许多研究者致力于利用转基因技术转化水解酶如几丁质酶基因和 (或) 葡聚糖酶基因创造了水稻^[10, 11]、油菜^[12]等一批抗真菌病害的种质资源, 同时也证实了共转化几丁质酶基因和葡聚糖酶



A-野生型植株 B-野生型茎部症状

C-转基因植株 D-转基因植株茎部症状

A-symptom of whole wild type plant B-symptom of wild type plant stem apex C-symptom of whole transgenic plant

D-symptom of transgenic plant stem apex

图5 转基因植株的抗病性检测

Fig 5 To Transgenic plants resistance to *R. solani*

基因(双价基因)能同时表达多个防卫基因以获得更强的抗病性的可能^[13, 14]。因此利用基因工程技术转化几丁质酶和 β 1, 3-葡聚糖酶基因培养抗真菌病害的转基因白术作为育种材料成为一种可能。

因为几丁质酶基因和葡聚糖酶基因(双价基因)的共转化能获得更强的抗病性,为此通过基因枪法实现了几丁质酶和 β 1, 3-葡聚糖酶基因导入白术。在39个抗Kan的独立转化子中,得到了25个具有目的基因的转化子,出现的14个假抗性的转基因株系可能与在筛选后期抗生素作用的衰退而降低了筛选浓度所致,所以在挑选抗性株系时应该关注培养中期所存活的转化子。此外,在25个能扩增出NPT II基因的转化子都能扩增出目的基因AGLU的片段,以及GUS的染色结果都证实了双价基因表达盒已整合到了白术的基因组中,5个抗性增强的转基因

白术株系更加明确了两个防卫基因的作用,这对拓宽白术抗病育种基因库具有重要的意义。下一步将深入研究转基因白术对其他真菌病害的抗性以及抗性的遗传。

参考文献:

- [1] 彭华胜, 王德群. 白术道地药材的形成与变迁 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(12): 1133-1135.
- [2] Li C Q, He L C. Establishment of the model of white blood cell membrane chromatography and screening of antagonizing TLR4 receptor component from *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. *Sci China Ser C Life Sci*, 2006, 49(2): 182-189.
- [3] Huang L H, Chen C C, Yeh C Y, et al. Reactive oxygen species mediation of Baizhu-induced apoptosis in human leukemia cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 97(1): 21-29.
- [4] 刘 旻, 叶 峰, 邱根全, 等. 白术内酯 I 对肿瘤恶病质患者细胞因子和肿瘤代谢因子的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(10): 1308-1311.
- [5] Kim S H, Jung H N, Lee K Y, et al. Suppression of Th2-type immune response-mediated allergic diarrhea following oral administration of traditional Korean medicine: *Atractylodes macrocephala* Koidz [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2005, 27(2): 331-343.
- [6] 吴 云. 白术的主要病害及其防治技术 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33(1): 55.
- [7] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [8] 毛碧增, 单兰兰, 范巍巍, 等. 盆栽非洲菊基因枪介导转化体系的建立 [J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(6): 649-652.
- [9] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. Gus fusions: β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion maker in higher plants [J]. *EMBO J*, 1987, 6: 3901-3907.
- [10] Datta K, Tu J, Oliva N, et al. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars [J]. *Plant Sci*, 2001, 160(3): 405-414.
- [11] 毛碧增, 李德葆, 李 群, 等. 转化双价防卫基因获得抗纹枯病水稻 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 39(4): 322-326.
- [12] 蓝海燕, 王长海, 张丽华, 等. 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 [J]. 生物工程学报, 2000, 16(2): 142-146.
- [13] Anand A, Zhou T, Trick H N, et al. Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum* [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(384): 1101-1111.
- [14] Zhu Q, Maher E A, Masoud S, et al. Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco [J]. *Bio Technol*, 1994, 12: 807-812.