

转几丁质酶基因的小麦后代遗传分析和抗病性鉴定

李新玲, 徐香玲*, 张楠楠

哈尔滨师范大学生命与环境科学学院, 哈尔滨 150025

摘要: 转 *Chi* 基因小麦的 T_1 、 T_2 及 T_3 代植株的遗传分析、抗白粉病鉴定和考察外源基因影响植株农艺性状的结果表明, T_1 和 T_2 代中外源 *Chi* 基因的分离比均接近 3:1, 符合孟德尔遗传规律, Southern blot 检测外源基因均为单拷贝整合。导入 *Chi* 基因的小麦对白粉病菌混合菌种的抵抗能力增强。除了株高和生育期以外, 转基因植株的其他性状与未转基因的植株基本上相同。

关键词: 小麦; 几丁质酶基因; 遗传分析; 白粉病

Genetic Analysis and Disease Resistance Identification of the Offsprings of Transgenic Wheat (*Triticum aestivum* L.) with *Chi* Gene

LI Xin-Ling, XU Xiang-Ling*, ZHANG Nan-Nan

School of Life and Environmental Science, Harbin Normal University, Harbin 150025, China

Abstract: In the text, genetic analysis and powdery mildew resistant identification had been done among T_1 , T_2 and T_3 of transferred wheat (*Triticum aestivum*) with *Chi* gene. The results indicated that segregation ratio of exogenous *Chi* gene between T_1 and T_2 was approximately 3:1, which was consistent with Mendelism. Exogenous genes were found that they all single-copy integration by Southern blot. The *Chi* gene transferred wheat had a better counteraction against powdery mildew which caused by mixed bacteria in field. Other characteristics of transgenic plant, excluding plant height and period of duration, were all the same as common one's.

Key words: wheat; *Chi* gene; genetic analysis; powdery mildew

近十几年来, 小麦育种学家们采用传统育种手段已经培育出了很多抗病品种, 但由于抗源单一且病原生理小种太多、变异太快及育种周期偏长和新小种不断出现而导致生产品种小麦的抗性丧失。因此, 如何拓宽小麦对白粉病等真菌病害的抗源, 尤其是采用基因工程技术将其他物种中的抗真菌基因导入小麦, 丰富小麦中的抗真菌病害基因就成了人们关注的问题(吴成君等 2005)。本文中采用的几丁质酶基因(*chitinase*, *Chi*)来源于菜豆, 它编码的几丁质酶可以水解真菌的细胞壁, 有效抑制真菌的生长和繁殖。迄今, *Chi* 基因转入农作物并可增强其抗病性已有所报道(Bliffeld 等 1999; Nishizawa 等 1999), 但对于转基因植物后代的遗传规律和抗病性的研究还较少。有报道认为, 外源基因在转基因小麦中符合 3:1 的分离比(Cheng 等 1997; 叶兴国等 2005a, b; 毕瑞明等 2006; 丁文静等 2007), 但也有人认为偏离 3:1 的分离比(Hu 等 2003; 徐琼芳等 2004; Gao 等 2005)。本文将具有广谱真菌病抗性的 *Chi* 基因导入小麦

中, 并在此基础上, 对转基因小麦植株的 T_1 、 T_2 和 T_3 代中外源基因的遗传、表达和抗白粉病能力以及对农艺性状的影响作了鉴定, 以期能够选育出高抗白粉病且抗病性持久的小麦株系。

材料与方法

小麦(*Triticum aestivum* L.)受体基因型‘东农 7742’由东北农业大学农学系小麦生理生物技术室提供。于 2003 年获得转 *Chi* 基因的小麦植株, 前期遗传转化中所用到的发根农杆菌 R1000 菌株由日本筑波大学遗传子研究中心镰田博教授惠赠, *Chi* 基因由中国科学院遗传研究所提供, 重组质粒 pMLH7133-*Chi* (含有 *Chi* 基因和 *NptII* 基因)由我校生物系遗传学实验室构建(图 1)。 T_0 代转基因小麦

收稿 2007-10-22 修定 2008-01-09

资助 哈尔滨师范大学科研基金(KM2006-07)和黑龙江省重大攻关课题(GA06B103-10)。

* 通讯作者(E-mail: xx18761@126.com; Tel: 0451-86840570)。

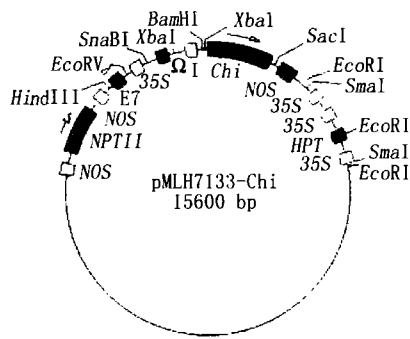


图1 质粒 pMLH7133-Chi 的 T-DNA 区示意

Fig.1 The T-DNA sketch map of plasmid pMLH7133-Chi

种子播于温室花盆内, 观察植株生长情况, 收获 T_1 、 T_2 、 T_3 代的种子。

根据外源基因的全长序列设计引物。*Chi* 基因引物为: 引物 1, 5' GCAGTGTGGAAGGCAAGCAG 3'; 引物 2, 5' CTGAGAGGTGACAAGGT-CAG 3'。*NptII* 基因引物为: 引物 3, 5' GAACG-ACGCCCGGCCGACATCC 3'; 引物 4, 5' CACCCAAAGACCGTTCGACCTG 3'。扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s (*NptII* 基因是 60 °C), 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。扩增产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

Southern blot 检测时, 以 pMLH7133-Chi 重组质粒为模板扩增出 *Chi* 基因片段, 回收后经地高辛标记作为杂交探针。转基因小麦基因组 DNA 经 *Bam*HI 酶切、电泳、转膜后, 与 *Chi* 基因探针进行杂交, 然后洗膜、显色。

NptII 基因的酶联免疫检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (试剂盒购自美国 Agdia 公司)时, 取 50~100 mg 小麦叶片, 加入 5 倍体积的蛋白质提取液, 充分研磨, 再用抽提液稀释 10 倍, 每个酶标孔加入 100 μ L 与抗体 4 °C 下反应, 24 h 后用 PBST 冲洗酶标孔 5~6 次, 充分吸干后加入 100 μ L PBST-MRS 酶耦联剂, 室温下放置 2 h, 再次洗涤、干燥, 然后每个酶标孔中加入 100 μ L TMB 底物, 15 min 后加入 50 μ L 3 mol·L⁻¹ 硫酸终止反应。

鉴定白粉病抗性时, 于孕穗期, 采用叶片摩擦法(Li 等 2002)将上一生长季于田间收集的白粉病菌接种, 灌浆初期白粉病发病充分时进行调查。白粉病调查标准采用盛宝钦等(1993)改进后的“0~9 级”法。

实验结果

1 T_1 代和 T_2 代转基因植株的 PCR 检测

用 PCR 检测 65 株 T_1 代转基因小麦中的外源 *Chi* 基因和 *NptII* 基因, 其中 *Chi* 基因呈阳性的植株有 47 株, *NptII* 基因呈阳性的植株有 49 株, 这两个基因在 T_1 代植株中的分离比分别为 2.61:1 和 3.06:1, 符合孟德尔分离规律。选择 *Chi* 基因和 *NptII* 基因均呈阳性的 T_1 代小麦植株, 收获 T_2 代种子并单株播种, 成苗后以 PCR 检测 110 株 T_2 代小麦的结果(表 1)表明, 6 株 T_1 代转基因小麦中有 1 株的自交后代(T_2)表现为 100% 阳性, 说明该株系已稳定不再分离, 其他 5 株自交后代的分离比与理论预期值(3:1)差异的发生概率在 75%~95% 之间, 说明上述实验结果和理论值是相符的, 遵循孟德尔的遗传分离规律。

表 1 T_2 代转基因小麦的 PCR 检测

Table 1 PCR detection of T_2 transgenic wheat

株系	<i>Chi</i> 阳性	<i>Chi</i> 阴性	分离比	χ^2 检测
6-2	8	3	2.67:1	$P > 95\%$
6-6	15	0	全阳性	—
15-3	13	4	3.25:1	$P > 80\%$
15-10	17	6	2.83:1	$P > 90\%$
19-1	14	4	3.50:1	$P > 75\%$
19-5	19	7	2.71:1	$P > 80\%$

2 T_1 代和 T_2 代转基因植株的 Southern blot 检测

转基因植株的 DNA 经 *Bam*HI 酶解、电泳后转移到尼龙膜上, 以地高辛标记的 *Chi* 基因为探针, 与尼龙膜上的酶解产物进行杂交的结果(图 2)显示, 无论是 T_1 代还是 T_2 代转基因植株均明显表现出杂交信号, 而且都是单拷贝, 阴性对照株无杂交信号。这进一步验证了 PCR 检测的结果。

3 *NptII* 的 ELISA 检测

ELISA 检测的 63 株 T_1 代转基因植株中, 阳性植株有 46 株, 阴性植株有 17 株, *NptII* 基因的分离比为 2.71:1, 这与 PCR 检测、Southern blot 检测的结果基本上一致。说明外源 *Chi* 基因在转基因小麦后代中正常表达, 未发生基因沉默现象。

4 T_3 代转基因株系抗白粉病能力的鉴定

T_3 代纯合转基因株系在孕穗期接种白粉病菌, 以未转基因植株为感病对照, 调查发病的情

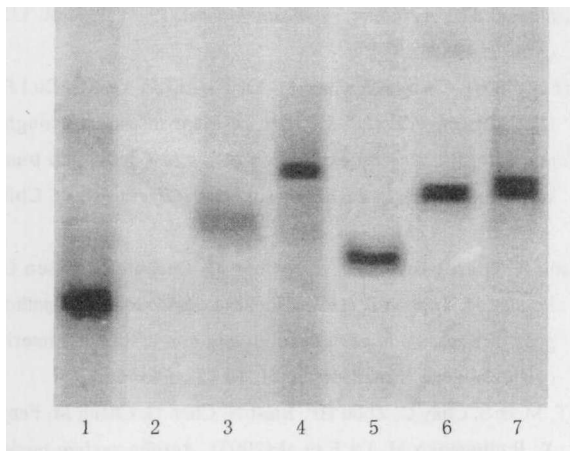


图2 转基因植株的 Southern blot 杂交

Fig.2 Southern blotting of transgenic plant

1: 阳性对照; 2: 未转基因小麦; 3~7: 转基因小麦植株。

况表明, 灌浆初期转基因植株的白粉病病害均在倒四叶以下, 对结实并不产生影响, 而未转基因植株发病情况较严重, 小穗部分也感染了白粉病菌。5个转基因株系的反应型和发病率均明显下降(表2), 都对白粉病表现高抗。说明导入 *Chi* 基因的小麦抗白粉病田间混合菌种的能力增强。

表2 T_3 代纯合系植株白粉病抗性鉴定Table 2 Powdery mildew resistance identification of T_3 homozygous plant

株系	反应型	严重度 /%	发病率 /%
'东农 7742' (对照)	6	50	100
<i>Chi-1</i>	2	10	25
<i>Chi-2</i>	1	10	20
<i>Chi-3</i>	2	15	30
<i>Chi-4</i>	2	10	25
<i>Chi-5</i>	3	20	45

5 T_3 代转基因株系的主要农艺性状分析

调查 T_3 代纯合系转基因小麦植株的株高、穗

长、分蘖数、千粒重、成熟期等性状(表3)的结果显示, 转基因植株的株高均高于未转基因植株, 抗倒伏能力差, 生育期均长于未转基因植株, 其他性状则与未转基因植株基本上相同。

讨 论

采用基因工程技术提高小麦抗病性的关键点有二, 一是应向小麦转入具有重要价值的功能基因, 二是外源基因在转基因小麦中能稳定地遗传和表达, 且应是对小麦的主要农艺性状没有太大的影响。本文所使用的外源基因属于 Class I 类碱性 *Chi* 基因, 它的抗真菌谱较广泛, 且来源于植物, 生物安全性风险较小。迄今为止, 人们已将来自多种植物的 *Chi* 基因转入油菜(Grison 等 1996)、桦木(Pasonen 等 2004)等植物, 并在防治真菌病害中显现出抗病效应。由于植物自身具有独特的防御系统, 转入的外源基因常会发生丢失及不表达等现象, 根据本文结果, 我们认为, 外源基因可能以单拷贝或寡拷贝的形式整合, 转基因植株的后代方可符合孟德尔遗传规律, 并稳定地表达出抗病蛋白, 是否如此, 尚应深入探讨。

转基因植物中外源基因的遗传效应和遗传行为比较复杂, 许多情况下并不遵循经典的遗传规律(王守才等 2000)。本文结果表明, 外源基因在转基因小麦后代中均表现显性遗传, 其遗传规律符合孟德尔分离比, 没有发生外源基因的沉默现象, 且 T_3 代纯合转基因植株对白粉病田间混合菌种的抵抗能力均有提高。此外, 本文中转基因小麦植株的株高和生长周期均有明显变异, 其他性状则与未转基因小麦植株基本上一致, 但株高高于未转基因小麦植株, 这与徐琼芳等(2004)报道的转基因小麦植株普遍矮化的结果不一致, 这是否与外源基因的整合位置、拷贝数、小麦的品种、

表3 T_3 代纯合系小麦植株与未转基因植株的主要农艺性状比较Table 3 The comparison on major agronomic characters of T_3 homozygote wheat and non-transgenic wheat

株系	株高 /cm	穗长 /cm	分蘖数	千粒重 /g	生长周期 /d
'东农 7742' (对照)	102.4	9.2	3	40.1	88
<i>Chi-6</i>	106.1	9.3	4	39.4	96
<i>Chi-7</i>	104.8	9.0	3	41.5	95
<i>Chi-8</i>	107.5	9.1	4	40.7	96
<i>Chi-9</i>	109.4	9.2	4	38.8	99

基因的类型及转基因方法有关, 也应深入研究。

参考文献

- 毕瑞明, 陈立国, 后猛, 王洪刚(2006). 小麦的遗传转化. 植物生理学通讯, 42 (3): 573~579
- 丁文静, 魏亦勤, 叶兴国, 杜丽璞, 徐惠君(2007). 外源转入基因在小麦中的遗传规律及其对农艺性状的影响. 作物学报, 33 (6): 955~960
- 盛宝钦, 周益明, 严明(1993). 小麦抗白粉病品种资源的鉴定与评价. 国外农学——麦类作物, (2): 38~41
- 王守才, 王国英, 戴景瑞(2000). 关于高等植物转基因遗传问题的讨论. 生物工程进展, 20 (4): 64~67
- 吴成君, 任贤, 叶兴国, 徐惠君, 杜丽璞(2005). 转 *Bcl* 和 *Rip* 基因小麦的鉴定和遗传分析. 中国农业科学, 38 (6): 1100~1105
- 徐琼芳, 田芳, 陈孝, 侯文胜, 李连城, 杜丽璞, 徐惠君, 辛志勇(2004). 转基因抗虫小麦中 *sgna* 基因的遗传分析及抗虫性鉴定. 作物学报, 30 (5): 475~480
- 叶兴国, 程红梅, 徐惠君, 杜丽璞, 陆维忠, 黄益洪(2005a). 转几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶双价基因小麦的获得和鉴定. 作物学报, 31 (5): 583~586
- 叶兴国, Sato S, 徐惠君, 杜丽璞, 黄益洪, 陆维忠, Clemente T (2005b). *BCL*、*RIP* 细胞凋亡基因向小麦中的导入和赤霉病抗性鉴定. 作物学报, 31 (11): 1389~1393
- Bliffeld M, Mundy J, Potrykus I, Fütterer J (1999). Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. Theor Appl Genet, 98: 1079~1086
- Cheng M, Fry JF, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol, 115 (3): 971~980
- Gao SQ, Xu HJ, Cheng XG, Chen M, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Du LP, Hao XY, Ma YZ (2005). Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress-inducible transcription factor *GmDREB* of soybean (*Glycine max*). Chin Sci Bull, 50 (23): 2714~2723
- Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, Lucante N, Olsen L, Leguay JJ, Toppan A (1996). Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. Nat Biotechnol, 14 (5): 643~646
- Hu T, Metz S, Chay C, Zhou HP, Biest N, Chen G, Cheng M, Feng X, Radionenko M, Lu F et al (2003). *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. Plant Cell Rep, 21 (10): 1010~1019
- Li H, Chen X, Xin ZY, Xu HJ, Du LP, Ma YZ (2002). Establishment of 6VS telocentric lines of *Haynaldia villosa* resistant to powdery mildew induced by immature embryo culture. Acta Bot Sin, 44 (2): 127~131
- Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, Soma M, Nakajima E, Ugaki M, Hibi T (1999). Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. Theor Appl Genet, 99: 383~390
- Pasonen HL, Seppänen SK, Degefu Y, Rytönen A, von Weissenberg K, Pappinen A (2004). Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*): resistance to fungal diseases. Theor Appl Genet, 109 (3): 562~570