

利用花粉管通道法将兔防御素 *NP-1* 基因导入小麦的研究

周春江¹,葛荣朝¹,赵宝存¹,黄占景¹,沈银柱¹,何聪芬²

(1.河北师范大学 生命科学学院,河北 石家庄 050016; 2.北京工商大学 化工学院,北京市植物资源研究开发重点实验室,北京 100037)

摘要:兔防御素 *NP-1* 是抗性谱最广的防御素之一。为提高小麦的抗病虫能力,培育优质高抗的小麦品种,采用花粉管通道法将兔防御素 *NP-1* 基因导入优质小麦品种 G8901。对得到的 193 株 T_0 植株进行抗除草剂筛选,获得 4 株抗性植株。通过 PCR 及 PCR-Southern 杂交,证实了 *NP-1* 基因已经整合到转基因植株的基因组中,并稳定遗传到 T_1 。田间抗病虫鉴定结果表明,这些植株对于白粉病、叶锈和条锈病有较强的免疫力和抗性,但对于蚜虫的抗性没有明显提高。

关键词:小麦;兔防御素 *NP-1* 基因;转化;花粉管通道

中图分类号:S512.01;Q789 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2007)02-0026-03

Study on Transgenic Wheat with Rabbit Defensin (*NP-1*) via the Pollen-tube Pathway

ZHOU Chun-jiang¹, GE Rong-chao¹, ZHAO Bao-cun¹, HUANG Zhan-jing¹,

SHEN Yin-zhu¹, HE Cong-fen²

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

2. College of Chemistry and Environment Engineering, Beijing Key Lab of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China)

Abstract: Rabbit defensin *NP-1* gene has a broad resistance spectrum to pathogens. In order to obtain high disease and insect resistance transgenic wheat, rabbit defensin *NP-1* gene was introduced into the wheat cultivar of G8901, via the pollen-tube pathway. Four transgenic plants were obtained by screening of 193 T_0 generation plants with herbicide. Genomic PCR and PCR-Southern revealed that *NP-1* gene was integrated into the genome of these transgenic plants, and it was transmitted to T_1 generation stably. The results of disease resistance and insect resistance appraisal showed that these plants had got higher resistance to powdery mildew, leaf rust and stripe rust, but the resistance to aphid had not been improved, which revealed that *NP-1* gene had expressed in wheat genome.

Key words: Wheat; Rabbit defensin *NP-1* gene; Transgenic; Pollen-tube pathway

小麦是世界上重要的粮食作物之一,由真菌引起的白粉病、赤霉病、锈病等是我国小麦产区的主要病害,小麦每年因病害减产高达 10%~50%。利用基因工程将外源基因导入小麦提高小麦的抗病性,是培育新的小麦抗病品种的一条有效途径。

防御素(Defensin)是广泛存在于动、植物体内的一类阳离子微生物抗性和细胞毒性肽。兔防御素 *NP-1* 是迄今抗性谱最广的防御素之一,能抗革兰氏阳性细菌、阴性细菌、分枝杆菌、螺旋体、许多真菌和

一些被膜病毒^[1]。将兔防御素基因转入烟草^[2]和番茄^[3],分别得到了抗青枯病的转基因植株。张文河等^[4]通过基因枪法将兔防御素 *NP-1* 基因导入玉米,发现转基因玉米能有效抵抗玉米大斑病的侵袭。GUO Dian-jing 等^[5]利用基因枪将兔防御素基因导入小麦中,体外试验表明转基因小麦对赤霉菌具有很好的抗性。

本研究采用花粉管通道法将兔防御素 *NP-1* 基因导入优质小麦品种 G8901,对获得的转基因植株进

收稿日期:2006-09-28

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(399212)

作者简介:周春江(1973-),男,河北涿州人,博士,讲师,主要从事分子生物学研究工作

通讯作者:何聪芬(1966-),女,河北石家庄人,教授,博士,主要从事分子生物学及小麦育种工作。

行了田间抗白粉病、锈病和蚜虫的检测及分子检测。

1 材料和方法

1.1 材料

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种 G8901, *E. Coli* 菌株 DH 5 α 取自河北师范大学分子细胞生物学实验室。免防御素 *NP-1* 基因植物表达载体 pBIC35SNP-1 质粒由中国科学院遗传与发育生物学研究所赵世民研究员提供。质粒图谱参见文献[6]。

1.2 小麦的转化、筛选及抗病、虫鉴定

小麦抽穗后开花前人工去雄、套袋、授粉,授粉后涂抹质粒 DNA,方法参见文献[7]。小麦正常成熟后收获转化种子,于10月初播种于大田。第2年3月底,将除草剂 Basta 稀释至 10 mg/L,并加入适量表面活性剂吐温-20,每株转基因植株选取 2 个叶片,用毛笔涂抹叶片的两面。10 d 后观察,将叶片变黄的植株淘汰。

1.3 转基因植株的分子检测

1.3.1 PCR 检测 提取 T₁ 转基因植株及对照植株的基因组 DNA(方法见文献[8]),根据 *NP-1* 基因的序列设计了 1 对引物,引物序列 P₁, 5'-CTGTAG-GATCCATGCTGGTCTGTGCGTGCAGACG-3'; P₂, 5'-GGGAGAGCTCACTAGTCCAAACATGT-3',引物由上海博亚生物公司合成。PCR 反应体系为 25 μ L,具体反应条件为 94℃变性 5 min;94℃变性 30 s, 56℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳。

1.3.2 PCR-Southern 杂交 采用毛细管转移法在 0.4 mol/L NaOH 中将 PCR 产物转移至尼龙膜上。以纯化后的 pBIC35SNP-1 质粒为探针,采用随机引物法用 α -³²P-dCTP 标记后,进行 PCR-Southern 杂交。65℃温育 20 h 进行洗膜,洗膜条件为 65℃,分别用 2 \times SSC/ 0.1% SDS,1 \times SSC/ 0.1% SDS 和 0.5 \times SSC/ 0.1% SDS 洗膜液振荡漂洗,根据杂交信号的强弱确定具体的洗膜时间。

2 结果与分析

2.1 转基因小麦植株的获得

收获经花粉管通道法转化得到的 T₀ 种子,秋播经田间越冬后成活 193 株。叶片涂抹 10 mg/L 除草剂 Basta 10 d 后,对照 G8901 小麦叶片逐渐变枯,大部分转化植株的叶片也明显变黄。最后得到 4 株 T₀ 抗性植株,这些植株的叶片涂抹除草剂后没有变化(图 1)。

2.2 转基因植株的分子检测

提取 T₁ 转 *NP-1* 基因小麦及对照 G8901 小麦叶

片的总 DNA,以 pBIC35SNP-1 质粒 DNA 为阳性对照,以未转基因 G8901 植株为阴性对照,用合成的特异引物进行 PCR 扩增。反应结束后,在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,结果得到 1 条和预期长度一致的 170 bp 左右的片段,未转化植株未出现 PCR 扩增片段(图 2)。

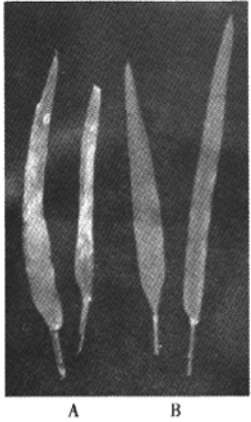
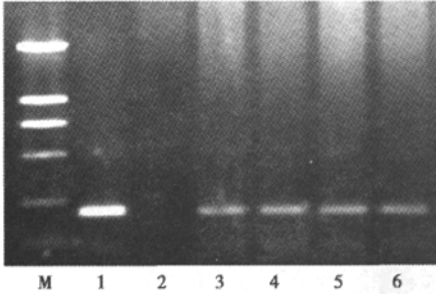


图 1 涂抹除草剂 Basta 10 d 后对照 G8901(A)与转化植株叶片(B)的对比

Fig.1 Comparison between leaves of G8901(A) and transgenic plants(B) 10 days after inoculation of Basta



M. DNA 分子量标准 DL 2000;
1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~6. 转基因植株
M. DNA molecular weight marker DL2000; 1. pBIC35SNP-1 plasmid DNA containing *NP-1* gene as positive control;
2. Non-transformed plant sample as negative control;
3~6. Transgenic plants

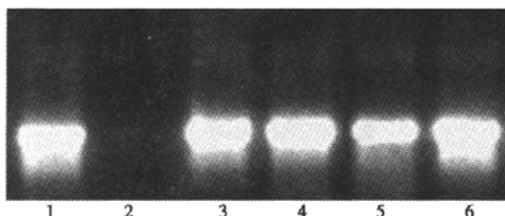
图 2 转 *NP-1* 基因小麦植株 PCR 检测
Fig.2 PCR assay of *NP-1* gene in the transgenic plants

为了进一步证明 PCR 扩增产物是否是目的基因片段,将 PCR 扩增产物电泳后转移到尼龙膜上,以纯化后的 pBIC35SNP-1 质粒为探针,进行 PCR-Southern 杂交检测。结果如图 3 所示,PCR 扩增检测呈阳性的 4 株转化植株,在 PCR-Southern 杂交中都有很强的信号,而对照则没有杂交信号,说明 *NP-1* 基因已经整合到了小麦的基因组中,并由 T₀ 稳定遗传到 T₁。

2.3 转基因植株的抗病、虫鉴定

转基因植株的抗病、虫鉴定在河北省农林科学

院植物保护研究所进行。4株 T_1 转基因植株的種子于10月初播种于大田。第2年4月上旬分别接种白粉病菌分生孢子、叶锈和条锈病菌分生孢子,5月中下旬进行2次田间调查。抗蚜虫鉴定采用田间成株自然鉴定法,于灌浆期(5月中旬)进行。4株转基因植株中,对于白粉病近免的是1株,高抗的是3株,而G8901则是中感;对于叶锈近免和高抗的都是2株,对G8901则是中感;对于条锈病高抗的是1株,中抗的为3株,而G8901则是低抗;对于蚜虫低抗的为3株,低感的1株,而对照也是低感。由此可见,4株转免防御素 $NP-1$ 基因的小麦对于白粉病、锈病的抗性明显增强,而对于蚜虫的抗性没有明显提高。



1. 阳性对照;2. 阴性对照;3~6. 转基因植株
1. pBIC35NP-1 plasmid DNA containing $NP-1$ gene as positive control; 2. Non-transformed plant sample as negative control; 3~6. Transgenic plants

图3 转 $NP-1$ 小麦植株的PCR-Southern检测

Fig.3 PCR-Southern blot assay of $NP-1$ gene in the transgenic plants

3 讨论

兔防御素 $NP-1$ 是抗菌谱最广的防御素之一,将其导入植株体内,已经分别得到了抗青枯病的转 $NP-1$ 基因烟草^[2]、番茄^[3]及抗玉米大斑病的转 $NP-1$ 基因玉米^[4]。本研究将兔防御素 $NP-1$ 基因导入高产优质小麦品种G8901,对于扩大种植面积,适应农业种植结构调整,增加农民收入,减少小麦进口都将具有十分重要的意义。结果表明,与对照G8901相比,转兔防御素 $NP-1$ 基因的小麦虽然对于蚜虫的抗性没有提高,但对白粉病、条锈和叶锈的抗性能力明显提高,GUO Dian-jing^[5]的试验证明, $NP-1$ 基因还可以抗小麦赤霉菌。至于转兔防御素 $NP-1$ 基因的小麦对于其他病菌,如散黑穗病等的抗性是否提高还有待于进一步研究。

小麦的遗传转化方法近年来虽然有了较大的进展,但还缺乏类似双子叶植物的农杆菌转化系统^[9]。目前的报道多集中在基因枪法和花粉管通道法^[10]。基因枪法可以转化多种组织和器官,转化效率较高,但基因枪法转化成本较高,试验重复性差,且外源基因常以多拷贝形式整合到基因组中,稳定性差。尽管

花粉管通道法的外源基因整合的机理还不十分清楚,但它已经被更多的学者和育种家采用^[11-14]。花粉管通道法避开了组织培养的过程,取材方便,操作简单,不需要专门的设备,成本较低,很适合于大规模的基因转化。但转化效率较低,只能在花期进行,筛选鉴定工作量大。本研究获得的转基因植株, $NP-1$ 基因可以稳定地遗传到 T_1 ,说明了花粉管通道法转化的可信性和稳定性。综合前人的研究,我们相信花粉管通道法在小麦遗传转化工作中会发挥更大的作用。

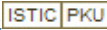
参考文献:

- [1] 傅荣昭,曹光诚,李文彬,等.兔防御素及其在基因工程上的应用前景[J].高技术通讯,1996,6(3):61-62.
- [2] 傅荣昭,彭于发,曹光诚,等.兔防御素 $NP-1$ 在转基因烟草中的表达及其对烟草青枯病的抗性研究[J].科学通报,1998,43(14):1519-1523.
- [3] 张秀海,郭殿京,张利明,等.兔防御素 $NP-1$ 基因在转基因番茄中表达的初步研究[J].遗传学报,2000,27(11):953-958.
- [4] 张文河,赵倩,于静娟,等.转兔防御素基因($NP-1$)玉米植株的获得及其抗病性分析[J].农业生物技术学报,2003,11(4):324-346.
- [5] GUO Dian-jing, FU Rong-zhao, LI Wen-bin, et al. Rabbit defensin ($NP-1$) gene transformation of wheat and in vitro microbicidal activity assay of transgenic plants[J]. High Technology Letters, 1999,5(1):95-98.
- [6] 赵世民,祖国诚,刘根齐,等.通过农杆菌介导法将兔防御素 $NP-1$ 基因导入毛白杨(*P. tomentosa*)[J].遗传学报,1999,26(4):711-714.
- [7] 李忠杰.转基因抗白粉病小麦植株的选育研究初报[J].麦类作物学报,2000,20(2):13-16.
- [8] Mccouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosome[J]. Theor Appl Genet, 1998,76:815-829.
- [9] LI Yi-wen, SEO Yong-weon, Li Zhen-sheng, et al. Genetic transformation in Triticeae crops[J]. Acta Botanica Sinica, 2002,44(5):505-518.
- [10] 武丽敏,郑有良,魏育明,等.小麦转基因研究进展[J].四川农业大学学报,2003,21(2):176-181.
- [11] 刘宝龙,张怀刚.小麦花粉管通道法转基因研究进展[J].分子植物育种,2004,2(4):535-540.
- [12] 倪建福,令利军,欧巧明,等.外源DNA导入小麦的分子育种实践[J].麦类作物学报,2005,25(5):27-31.
- [13] 赵世锋,刘根齐,田长叶,等.花粉管通道法导入外源DNA创造燕麦新种质[J].华北农学报,2003,18(3):53-58.
- [14] 赵宝存,葛荣朝,沈银柱,等.小麦T型细胞质雄性不育保持系线粒体DNA片断转化不育系的初步研究[J].华北农学报,2004,19(4):21-23.

利用花粉管通道法将兔防御素NP-1基因导入小麦的研究

作者: [周春江](#), [葛荣朝](#), [赵宝存](#), [黄占景](#), [沈银柱](#), [何聪芬](#), [ZHOU Chun-jiang](#), [GE Rong-chao](#), [ZHAO Bao-cun](#), [HUANG Zhan-jing](#), [SHEN Yin-zhu](#), [HE Cong-fen](#)

作者单位: [周春江, 葛荣朝, 赵宝存, 黄占景, 沈银柱, ZHOU Chun-jiang, GE Rong-chao, ZHAO Bao-cun, HUANG Zhan-jing, SHEN Yin-zhu](#)(河北师范大学生命科学学院, 河北, 石家庄, 050016), [何聪芬, HE Cong-fen](#)(北京工商大学, 化工学院, 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京, 100037)

刊名: [华北农学报](#) 

英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA](#)

年, 卷(期): 2007, 22 (2)

被引用次数: 11次

参考文献(14条)

1. 傅荣昭;曹光诚;李文彬 [兔防御素及其在基因工程上的应用前景](#) 1996 (03)
2. 傅荣昭;彭于发;曹光诚 [兔防御素NP-1在转基因烟草中的表达及其对烟草青枯病的抗性研究](#) 1998 (14)
3. 张秀海;郭殿京;张利明 [兔防御素NP-1基因在转基因番茄中表达的初步研究](#)[期刊论文]-[遗传学报](#) 2000 (11)
4. 张文河;赵倩;于静娟 [转兔防御素基因\(NP-1\)玉米植株的获得及其抗病性分析](#)[期刊论文]-[农业生物技术学报](#) 2003 (04)
5. GUO Dian-jing;FU Rong-zhao;LI Wen-bin [Rabbit defensin\(NP-1\) gene transformation of wheat and in vitro microbicidal activity assay of transgenic plants](#)[外文期刊] 1999 (01)
6. 赵世民;祖国诚;刘根齐 [通过农杆菌介导法将兔防御素NP-1基因导入毛白杨\(P. tomentosa\)](#)[期刊论文]-[遗传学报](#) 1999 (04)
7. 李忠杰 [转基因抗白粉病小麦植株的选育研究初报](#)[期刊论文]-[麦类作物学报](#) 2000 (02)
8. Mccouch S R;Kochert G;Yu Z H [Molecular mapping of rice chromosome](#)[外文期刊] 1998
9. LI Yi-wen;SEO Yong-weon;Li Zhen-sheng [Genetic transformation in Triticeae crops](#)[外文期刊] 2002 (05)
10. 武丽敏;郑有良;魏育明 [小麦转基因研究进展](#)[期刊论文]-[四川农业大学学报](#) 2003 (02)
11. 刘宝龙;张怀刚 [小麦花粉管通道法转基因研究进展](#)[期刊论文]-[分子植物育种](#) 2004 (04)
12. 倪建福;令利军;欧巧明 [外源DNA导入小麦的分子育种实践](#)[期刊论文]-[麦类作物学报](#) 2005 (05)
13. 赵世锋;刘根齐;田长叶 [花粉管通道法导入外源DNA创造燕麦新种质](#)[期刊论文]-[华北农学报](#) 2003 (03)
14. 赵宝存;葛荣朝;沈银柱 [小麦T型细胞质雄性不育保持系线粒体DNA片断转化不育系的初步研究](#)[期刊论文]-[华北农学报](#) 2004 (04)

引证文献(11条)

1. 宋笑明. 谷运红. 洪爱俊. 苏张磊. 秦广雍 [授粉方式对小麦花粉管通道转化效果的研究](#)[期刊论文]-[郑州大学学报\(理学版\)](#) 2009 (1)
2. 邸宏. 周羽. 梁广东. 张佩. 吕霞. 卢翠华. 王振华 [玉米三种不同花粉管通道法转化BcBCP1基因的初报](#)[期刊论文]-[作物杂志](#) 2012 (2)
3. 魏爱民. 张文珠. 杜胜利. 韩毅科. 张桂华. 刘楠 [黄瓜花粉管通道法抗虫基因导入及卡那霉素抗性筛选](#)[期刊论文]-[华北农学报](#) 2008 (6)
4. 姜昱. 王玉民. 王中伟. 林秀峰. 马瑞. 刘志铭 [转基因技术在我国小麦遗传改良方面的研究进展](#)[期刊论文]-[吉林农业科学](#) 2008 (6)
5. 刘兴舟. 郭凤芝. 刘爱峰. 赵檀方 [幼穗注射法导入外源DNA对冬小麦部分性状的影响](#)[期刊论文]-[山东农业科学](#)

2009(3)

6. [王永芳](#), [张军](#), [崔润丽](#), [李伟](#), [智慧](#), [李海权](#), [刁现民](#) [利用花粉管通道转化谷子DNA_j基因获得转基因小麦](#)[期刊论文]-[华北农学报](#) 2009(2)

7. [蒋明](#), [张志仙](#), [钱宝英](#), [李金枝](#) [结球白菜和拟南芥防御素基因的鉴定与比较分析](#)[期刊论文]-[植物病理学报](#)

2013(4)

8. [欧巧明](#), [倪建福](#), [崔文娟](#), [庞斌双](#) [高粱DNA导入引起小麦HMW-GS的变异及其品质改良和变异机理分析](#)[期刊论文]-[中国粮油学报](#) 2011(1)

9. [欧巧明](#), [崔文娟](#), [王炜](#), [倪建福](#), [王红梅](#), [杨芳萍](#), [罗俊杰](#) [花粉管通道法导入高粱DNA创造优良小麦新品系的分子聚合育种](#)[期刊论文]-[干旱地区农业研究](#) 2013(2)

10. [任海红](#), [任小俊](#), [王英](#), [刘学义](#) [非组培遗传转化法在农作物上的应用](#)[期刊论文]-[山西农业科学](#) 2010(11)

11. [付蓝宝](#), [于嘉林](#), [刘伟华](#) [防御素的生物学特性及其抗病基因工程](#)[期刊论文]-[遗传](#) 2011(5)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_hbxb200702007.aspx