

转天麻抗真菌蛋白 GAFP 基因烟草 的获得及离体抑菌活性检测

陈英¹, 王义琴², 诸葛强¹, 施季森¹, 黄敏仁¹, 王明麻¹

(1. 南京林业大学林木遗传与基因工程重点实验室, 江苏 南京, 210037; 2. 中国科学院遗传与发育生物研究所, 北京, 100101)

摘要: 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导, 采用叶盘法将天麻(*Gastrodia elata* Bl.) 抗真菌蛋白基因 GAFP 转入烟草(*Nicotiana tabacum* L.), PCR 和 Southern-blotting 分析证明已将 GAFP 基因整合进烟草植株。体外抑菌实验表明 GAFP 转基因的烟草植株对真菌瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)表现出一定的抑菌活性。

关键词: 根癌农杆菌介导; 天麻抗真菌蛋白; 转基因烟草; 离体抑菌活性

中图分类号: Q946.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2002)02-0001-05

Acquirement of tobacco with transformation genes of GAFP (Gastrodia Antifungal Protein) and evaluation of antifungal activity in vitro CHEN Ying¹, WANG Yi-qin², ZHUGE Qiang¹, SHI Ji-sen¹, HUANG Min-ren¹, WANG Ming-xiu¹ (1. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Institute of Genetics and Development Biology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2002, 11(2): 1-5

Abstract: Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, the gene of Gastrodia Antifungal Protein (GAFP) was transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using the leaf-disk method. Results of PCR and Southern-blotting proved that GAFP gene was integrated into the tobacco genome. Extracts of transgenic lines showed resistance to the growth of *Trichoderma reesei* in vitro, which suggests that the GAFP gene was expressed efficiently in transgenic tobacco and denoted antifungal activity.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation; Gastrodia Antifungal Protein; transgenic tobacco; antifungal activity in vitro

病害是农业和林业减产的主要原因之一。通常运用常规育种方法, 进行抗病选育, 同时施用化学杀菌剂或者轮伐等措施进行病害防治, 但这些方法都有一定的局限性^[1]。而现代分子生物学和基因工程的发展为抗病育种提供了一条有效途径。

天麻(*Gastrodia elata* Bl.) 是我国的传统中药, 叶退化, 无法进行光合作用, 其大部分生长发育期都是地下部分, 即块茎的生长, 主要是依靠与地下茎共生的数种真菌提供营养^[2-4]。天麻和与其共生的真菌之间不但相互利用, 也相互制约。天麻具有一套独特的防御并且消化真菌侵染物质的机制, 因而天麻的次生块茎在长达数月的时间里能够完全抑制共生真菌对其内部的侵害, 这也说明天麻块茎中含有 1 种能强烈抑制真菌生长的物质。1988 年胡忠等首次从天麻块茎中分离并提纯了该物质, 命名为天麻抗真菌蛋白(Gastrodia Antifungal Protein, GAFP), 其分子量约 14 ku^[5]。胡忠等和王义琴等分别对 GAFP

的抑菌活性进行研究, 发现它对多种真菌均有抑菌活性^[6,7]。为了进一步了解天麻-真菌的共生关系, 通过生化和免疫荧光定位研究发现, GAFP 定位于天麻次生块茎表皮及皮层^[8], 它能阻止真菌菌丝穿过皮层, 抑制真菌生长。2000 年王义琴等成功地克隆了编码 GAFP 的基因^[9], 并且原核表达证明该基因所编码的产物具有抑菌活性^[7]。

本研究将天麻抗真菌蛋白基因构建在 1 个植物表达载体上, 转化烟草, 以期提高转基因烟草对多种病害的抗性, 并且研究 GAFP 基因在植物中的整合和表达, 为进一步利用 GAFP 基因转化其他植物及提高植物抗病能力进行了初步的探讨。

收稿日期: 2002-01-31

基金项目: 国家自然科学基金农业倾斜项目(3017074)

作者简介: 陈英(1973-), 女, 四川宜宾人, 博士研究生, 从事林木基因工程研究。黄敏仁为联系作者。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 以脱毒无菌苗为实验材料; Taq 酶购自 Promega 公司; 限制性内切酶购自 Biolab 公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司; 其他试剂为 Sigma 公司或国内分析纯试剂; 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 由南京林业大学化工学院余世袁教授提供; 分化培养基: MS + 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA; 筛选培养基: MS + 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA + 100 mg/L Kan (卡那霉素 Kanamycine) + 50 mg/L Cef (头孢霉素 Cefomycine) + 0.7% Agar, pH 5.8; 生根培养基: MS + 50 mg/L Kan + 50 mg/L Cef + 0.7% Agar.

1.2 质粒和菌株

大麻抗真菌蛋白基因 GFP 表达载体 pBin35SGAFP (如图 1) 由中国科学院遗传与发育研究所孙勇如研究员提供, 将此质粒通过液氮冻融法^[10]转入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 工程菌株 LBA4404 中。

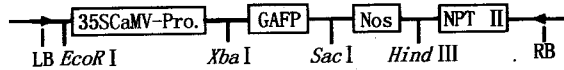


图 1 pBin35SGAFP 质粒图谱
Fig 1 The map of pBin35SGAFP

1.3 烟草遗传转化

参照 de Block^[11] 的方法, 将 pBin35SGAFP/LAB4404 培养至对数期 $OD_{600} \approx 1.0$, 离心, MS 液体重悬, 取组培 3 周龄的无菌烟草叶片, 去除中脉, 剪成 $0.5 \sim 1.0 \text{ cm}^2$ 的叶盘浸染于菌液中 10 min, 用无菌滤纸吸干剩余菌液, 移至分化培养基 25℃ 暗培养 48 h 后, 再将叶片转入筛选培养基继续暗培养约 1 周, 待叶盘边缘长出淡黄色愈伤组织后移到光下培养。每 3 周继代 1 次。约 4 周后诱导出芽, 当芽长至 1 cm 左右, 转至生根培养基诱导生根, 生根后移栽至 25℃ 左右的温室中。

1.4 转基因烟草的 PCR 分析

用 CTAB 法提取具有 Kan 抗性的部分转基因植株和阴性植株的总 DNA。GFP 双引物分别为: (1) ACG TCT AGA AGG GAT CGG TTG AAT; (2) GAT CTC GAG GCC AGA AGC CGC CGC TGT。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 30 s,

72℃ 延伸 30 s, 进行 30 个循环后再延伸 10 min。

1.5 Southern-blotting 分析

提取 pBin35SGAFP 质粒, 并用 *Xba* I 和 *Sac* I 进行双酶切, 电泳并回收目的基因片段约 400 bp 的 DNA 作为待标记的探针。采用由 Roche 公司生产的 DIG-Labelling 试剂盒进行探针标记。非转化植株和 PCR 阳性植株的总植物 DNA 同样经 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切, 电泳, 转膜。然后采用该试剂盒杂交和显影分析。

1.6 转基因植株的抑菌实验

本实验采用琼脂糖孔穴扩散法^[12], 分别取非转化植株和 PCR 检测为阳性的转基因植株的幼叶于无菌研钵中捣碎, 按照 1 g/L 加入无菌磷酸钠缓冲液 (pH 6.4), 研成匀浆。将匀浆转入无菌离心管中, 4℃ 抽提过夜, 10 000 r/min 4℃ 离心 20 min, 取上清液供测试用。

将瑞氏木霉接种于马铃薯培养基平板上, 30℃ 培养至菌丝萌发。用无菌枪头分别在菌丝处和空白马铃薯培养基平板上打孔, 取出空白琼脂块, 将有菌丝的琼脂块填入其中, 30℃ 培养至菌丝直径约为 3 cm。再在接种孔左右两边打孔, 取出琼脂块, 分别加入阴性对照和待测样品 200 μL , 30℃ 恒温箱内培养, 24 ~ 36 h 后观察抑菌结果。

2 结果与分析

2.1 转 GFP 基因的 Kan 抗性植株的获得

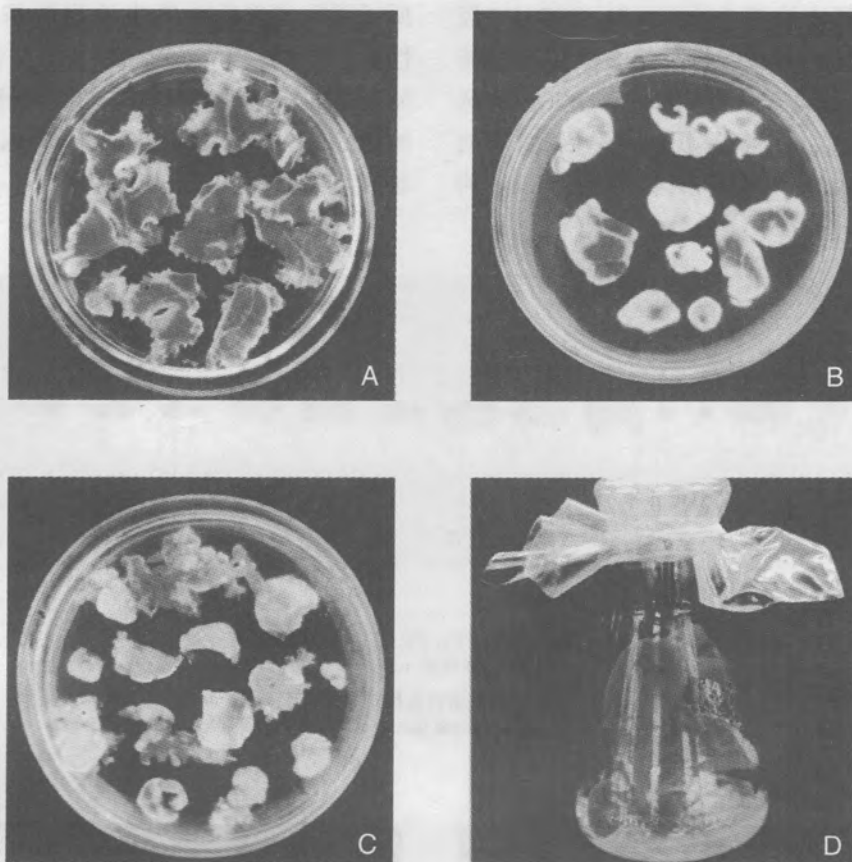
将烟草叶片转入筛选培养基约 2 周后, 叶片膨大, 周围开始皱缩, 并有淡黄色愈伤组织生成, 而阳性对照愈伤组织长势更好, 有芽点产生; 阴性对照仅叶片有些膨大。此时将它们移到光下 (16 h/d), 再过 2 周转化叶片长出 Kan 抗性苗, 阳性对照几乎没有分化出抗性芽。从 50 个叶片外植体共得到 146 株 Kan 抗性幼苗。将这些幼苗移入含 Kan 50 mg/L 的生根培养基上, 大部分幼苗在 10 d 左右都能正常生根 (见图 2)。

2.2 转 GFP 基因 Kan 抗性植株的 PCR 检测结果

选取 18 株生长状态较好的 Kan 抗性苗和 1 株非转基因植株, 用 CTAB 法提取植物总 DNA, GFP 基因采用双引物进行 PCR 扩增。结果表明, 转基因植株同阳性对照 (质粒 pBin35SGAFP) 一样, 在约 400 bp 处有一条特征带, GFP 基因全长为 387 bp, 这正是

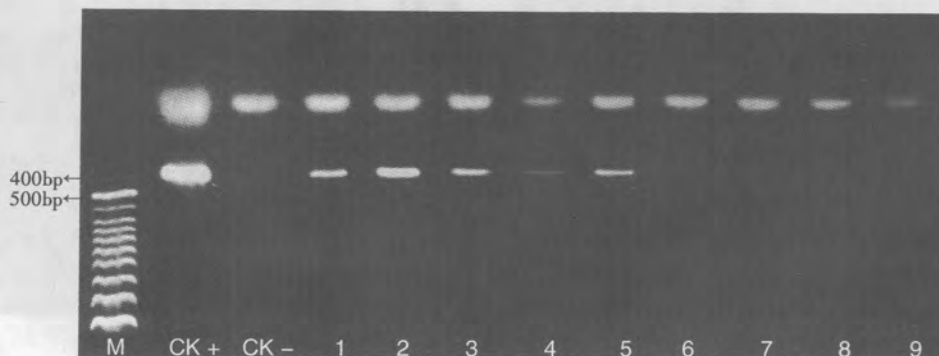
分别由各自的双引物界定的中间片段即 GAFP 基因片段,而在阴性对照的泳道上却没有该特征带(见图 3)。为了证实结果的正确,又重新取干净无菌转基因

因叶片提取 DNA,进行 PCR 检测,所得结果相同,初步证明 GAFP 基因已整合到烟草基因组中。本实验共检测了 18 株转基因植株,其中有 14 株显示 PCR



A: 阳性对照 positive control; B: 阴性对照 negative control; C: Kan 抗性芽 Kan-resistant buds; D: Kan 抗性植株 Kan-resistant plant

图 2 转天麻抗真菌蛋白基因烟草的 Kan 抗性芽分化及植株再生
Fig. 2 Kan-resistant buds and plant regeneration of GAFP transgenic tobacco



M: 100 bp ladder; CK+: 阳性对照(pBin35SGAFP 质粒) positive control (pBin35SGAFP); CK-: 阴性对照(未转化植株) negative control (non-transgenic plant); 1-9: 转基因植株 transgenic plants

图 3 部分转天麻抗真菌蛋白基因烟草的 Kan 抗性植株的 PCR 检测
Fig. 3 PCR amplification of some Kan-resistant plants of GAFP transgenic tobacco

阳性,说明转化率高。

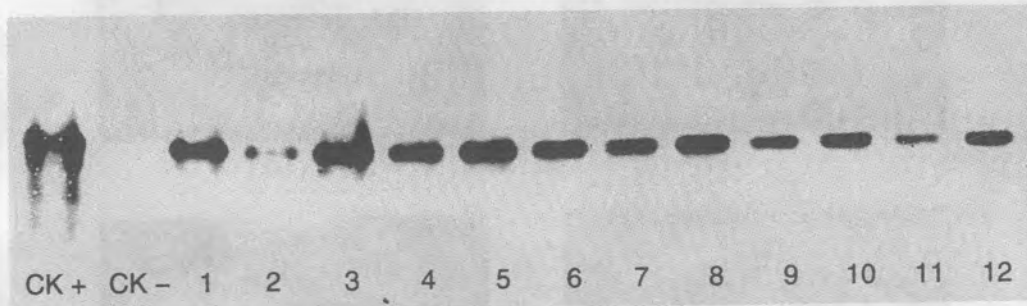
2.3 Southern 杂交分析

为了进一步验证 GAFP 基因是否已整合到植物基因组中,对 PCR 阳性植株进行了 Southern 杂交,结果见图 4。图 4 中第 1 泳道为质粒 pBin35SGAFP 经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切的阳性对照,第 2 泳道为非转化植株的阴性对照,第 3 至第 14 泳道为在 Kan 筛选培养基上能正常分化,且生长健壮的转基因植株,均有 1 条带的分子量与阳性对照相同,即约 400 bp 的

杂交带。上述结果表明 GAFP 基因已整合到烟草基因组中。

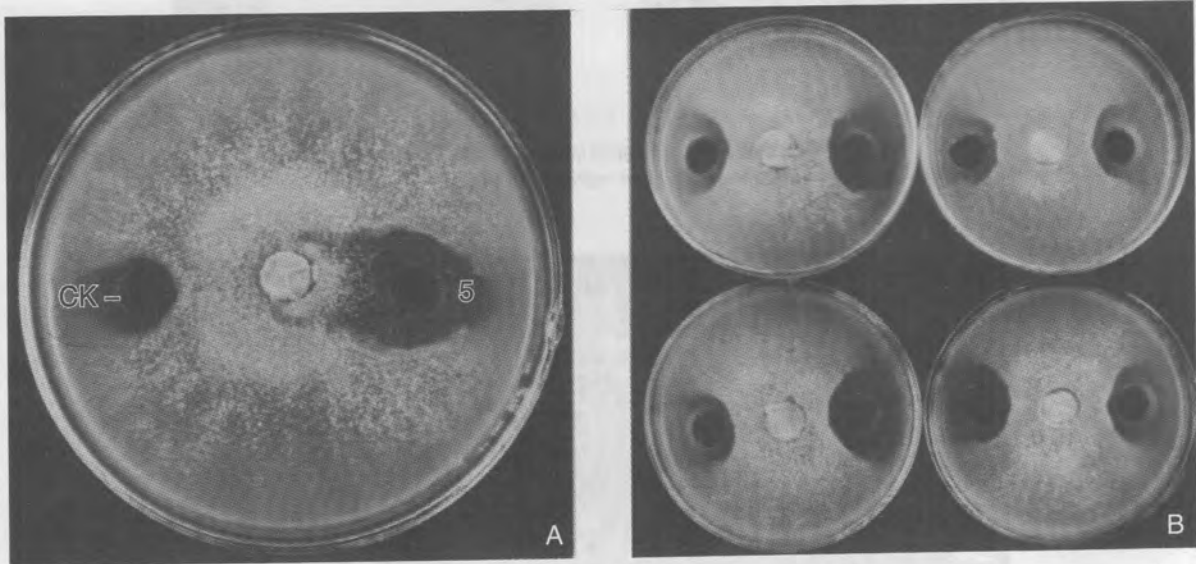
2.4 PCR 阳性植株抑菌作用检测

天麻抗真菌蛋白基因 GAFP 具有抗真菌的作用,所以用真菌瑞氏木霉来检测转基因烟草的抑菌活性,其结果见图 5。琼脂糖孔穴扩散实验结果证明:所获得的转基因烟草具有一定的抑制真菌瑞氏木霉的活性(图 5)。这说明 GAFP 基因已经整合到烟草基因组中,并且得到表达。



CK+ : 阳性对照(pBin35SGAFP 质粒) positive control (pBin35SGAFP); CK- : 阴性对照(未转化植株) negative control (non-transgenic plant); 1-12: 转基因植株 transgenic plants

图 4 部分转天麻抗真菌蛋白基因烟草植株 Southern 杂交
Fig. 4 Southern-blotting of some plants of GAFP transgenic tobacco



A: CK-, 未转化植株 non-transgenic plant; 5, 转基因植株 transgenic plant; B: 部分转基因植株 some plants of transgenic tobacco

图 5 部分转天麻抗真菌蛋白基因烟草植株离体抑菌活性检测
Fig. 5 Antifungal activities *in vitro* of some plants of GAFP transgenic tobacco

3 讨 论

如何有效地治理植物病害是人们一直致力于解决的难题之一,现代分子生物学和基因工程的发展为植物抗病育种提供了一条有效的途径。利用转基因技术将抗病基因转入植物使其组成高表达抗病蛋白来增强植物抗病原菌的报道日渐增多^[13-15],为植物抗病育种开辟了新途径,因而获得具有广谱并且有效抗真菌的基因就显得十分重要。天麻抗真菌蛋白基因 GAFP 是从天麻块茎中克隆出来的^[9],体外抑菌实验证明天麻抗真菌蛋白对苹果树轮纹病菌 (*Macrophoma kuwatsukai*)、小麦赤霉菌 (*Gibberella saubinetica*)、葡萄霜霉病菌 (*Plasmopara viticola*)、棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 以及杉木炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 等均有一定的抗性^[7]。因此 GAFP 基因在植物抗病基因工程方面具有巨大的正确性应用潜力。

本研究通过根癌农杆菌介导的方法将 GAFP 成功地转入烟草并得到表达,这说明该基因插入植物基因组中后能正常地转录和翻译,转 GAFP 基因植株具有抑菌活性。将转 GAFP 基因烟草移栽于温室后,植株生长正常,后继的研究则将进行活体接种,继续在植株整体水平上观察其抑菌活性。

参考文献:

- [1] 舒群芳,孙勇如. 抗真菌植物基因工程的策略和进展[J]. 植物学报, 1997, 39(1): 91-96.
- [2] 徐锦堂,冉砚珠,孙昌高,等. 天麻种子发芽的营养来源及其与蜜环菌的关系[J]. 中草药, 1980, 11(3): 125-128.
- [3] 徐锦堂,牟春. 天麻原球茎生长发育与紫萁小菇及蜜环菌的关系[J]. 植物学报, 1990, 32(1): 26-31.
- [4] Kusano S. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea* [J]. J Coll Agric Imp Univ, Tokyo, 1911, 4(1): 1-66.
- [5] 胡忠,杨增明,王钧. 天麻球茎中一种抗真菌蛋白的分离和部分特性[J]. 云南植物研究, 1988, 10(4): 373-380.
- [6] 胡忠,黄清藻. 天麻中抗真菌蛋白的诱导和积累[J]. 云南植物研究, 1994, 16(2): 169-199.
- [7] 王义琴. 天麻抗真菌蛋白(GAFP)的cDNA克隆、原核表达及离体抑菌活性研究[D]. 北京:中国科学院遗传与生物发育研究所, 2001.
- [8] 江流,徐锦堂,王贺,等. 天麻抗真菌蛋白的检测及免疫荧光定位[J]. 植物学报, 1993, 35(8): 593-599.
- [9] 王义琴,李文彬, Lam H, 等. 天麻抗真菌蛋白(GAFP)的N-端序列测定及cDNA基因克隆[J]. 高技术通讯, 2000, 1(1): 10-14.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆(实验指南)[M]. 金冬雁,黎孟枫,等译. 北京:科学出版社, 1992.
- [11] de Block M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Theor Appl Genet, 1988, 76(5): 767-774.
- [12] 方宏筠,王关林,王火旭,等. 抗菌肽基因转化樱桃矮化砧木获得抗根瘤病的转基因植株[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1192-1198.
- [13] Smith G, Fornbardt B, Mundy J, et al. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal protein in transgenic tobacco [J]. Plant Cell, 1995, 8(1): 97-109.
- [14] Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, et al. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene [J]. Nat Biotech, 1996, 14(3): 643-646.
- [15] Yoshikawa M, Tsuda M, Takeuchi Y. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1, 3-endoglucanase from soybean [J]. Naturwissenschaften, 1993, 80(3): 417-420.