

无选择标记转中国对虾抗菌肽基因水稻的获得及其遗传分析、抗病检测

董肇楠^{1,2},梅家松²,袁巧玲¹,涂万富¹,何正权^{1*},刘文真^{2*}
(1. 三峡大学 生物技术研究中心,湖北 宜昌 443002;
2. 中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室,浙江 杭州 310006)

摘要: 为了获得不含筛选标记、抗病性显著增强的转抗菌肽基因水稻,利用双 T-DNA 载体系统将中国对虾抗菌肽基因 *dp3* 和选择标记基因 *Hpt* 导入到水稻恢复系明恢 86 中。结果表明,T1 代 110 个株系中 88.2% 的株系出现抗感分离,其余 11.8% 的株系全为阴性。PCR 检测 7 个分离比例符合 3:1 的株系显示,*dp3* 和 *Hpt* 基因在 3 个株系中为自由组合,在 4 个株系中出现连锁。在 468 个检测单株中筛选出 31 个无选择标记的转基因植株,占总样本的 6.6%。RT-PCR 检测 T1 代转基因植株显示,抗菌肽基因在 RNA 水平上得到表达。用白叶枯病小种 PX086、PX099 和纹枯病小种 GD-118、C-30 对上述 3 个转基因株系进行接种,转基因阳性植株明显提高了对白叶枯病和纹枯病的抵抗力。
关键词: 中国对虾抗菌肽;双 T-DNA 载体;转基因水稻;无选择标记;白叶枯病;纹枯病;抗性
中图分类号: S511 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)11-0005-06

Generation of Marker-free Transgenic Rice with Antimicrobial Peptide Genes from *Penaeus chinensis* and Its Genetic Analysis and Disease Resistance

DONG Zhaonan^{1,2},MEI Jiasong²,YUAN Qiaoling¹,TU Wanfu¹,HE Zhengquan^{1*},LIU Wenzhen^{2*}
(1. Biotechnology Research Center, China Three Gorges University, Yichang 443002, China;
2. State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: To obtain marker-free transgenic rice with significantly enhanced disease resistance, the anti-microbial peptide gene *dp3* and selectable marker gene *Hpt* were integrated into *Oryza sativa* L. restoring line Minghui 86 by a double T-DNA binary vector system. Hygromycin resistance analysis revealed that 88.2% of the lines showed obvious resistant and sensitive separation, while the others 11.8% were sensitive in 110 T1 lines. PCR analysis was carried out with seven lines that matched Medel's ratio of 3:1; the results showed that *dp3* and *Hpt* genes were assorted independently in three lines, while the other four lines were detected with linkage of these two genes. Thirty-one marker-free transgenic rice plants were screened out from the generated 468 seedlings, accounting for about 6.6% of the total samples. RT-PCR analysis showed that the antimicrobial peptide gene was expressed in T1 generation. T1 generation were inoculated with the strains PX086 and PX099 of *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*(*Xoo*), GD-118 and C-30 of *Rhizoctonia solani*. The results indicated that the transgenic lines had a significantly enhanced resistance to bacterial blight and sheath blight caused by the four *Xoo* and *Rhizoctonia solani* strains.
Key words: antimicrobial peptides from *Penaeus chinensis*; double T-DNA binary vector; transgenic rice; marker-free; bacterial blight; sheath blight; resistance

收稿日期:2015-05-27
基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2013ZX08010-004)
作者简介:董肇楠(1989-),男,安徽亳州人,在读硕士研究生,研究方向:水稻遗传育种。E-mail:962677831@qq.com
* 通讯作者:何正权(1972-),男,四川宜宾人,教授,博士,主要从事分子植物学研究。E-mail:zhq_he@ctgu.edu.cn
刘文真同为通讯作者。

GT-3',反向 HygR 引物序列为 5'-AGTTTATCG-GCACTTTGCATCG-3',预计扩增片段长度为 692 bp。

检测 *dp3* 基因和 *Hpt* 基因的通用 PCR 反应体系 (15 μ L):DNA 模板 2 μ L、10 \times buffer 1.5 μ L、dNTP 1 μ L、2 条引物各 1 μ L、*Taq* 酶 0.3 μ L、ddH₂O 8.2 μ L。在 PCR 仪上进行 PCR 扩增。扩增条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上以 120 V 电压电泳 20 min,然后在凝胶成像仪中观测拍照。

1.2.4 T1 代转基因植株的表达分析 根据 RNeasy Pure Plant Kit 植物总 RNA 提取试剂盒的步骤提取水稻总 RNA,按照康为世纪公司反转录试剂盒操作,反转录合成 cDNA 的第 1 链。以 cDNA 第 1 链为模板对目的基因 *dp3* 和内参基因 *Actin* 进行 PCR 扩增,操作体系和程序同上。目的基因的引物为 P3F 和 P3R。*Actin* 引物序列为:ActinF:5'-GATGACCCAGATCATGTTTG-3'; ActinR:5'-GGGCGATGTAGGAAAGC-3'。以 cDNA 为模板,以 P3F/P3R 为引物预计可扩增出 412 bp 的特异条带,以 ActinF/ActinR 为引物预计可扩增出 308 bp 的特异条带。而以水稻基因组为模板,ActinF/ActinR 为引物可扩增出 557 bp 的特异条带。

参考 Campo 等^[15]所用的取样方法对基因表达量变化进行分析。在分蘖旺盛期,以 *Actin* 作为内参基因,参照康为世纪公司 UltraSYBR Mixture (With ROX) 试剂盒,Real Time-PCR 检测转基因植株目的基因 *dp3* 在不同时间内表达量的变化,探索不同

株系间 *dp3* 基因表达量的差异。

1.2.5 白叶枯病抗感检测 在分蘖期末,参考华志华等^[16]的剪叶接种法,进行白叶枯病菌接种。每株接种 3~5 片剑叶,用无菌手术剪刀蘸取配制好的病菌悬浮液,剪去完全展开的剑叶顶端 2~3 cm,2 周后观察发病情况,28 d 后测量各个接种叶片的病斑长度和叶长,根据公式计算病斑占叶长的比率。

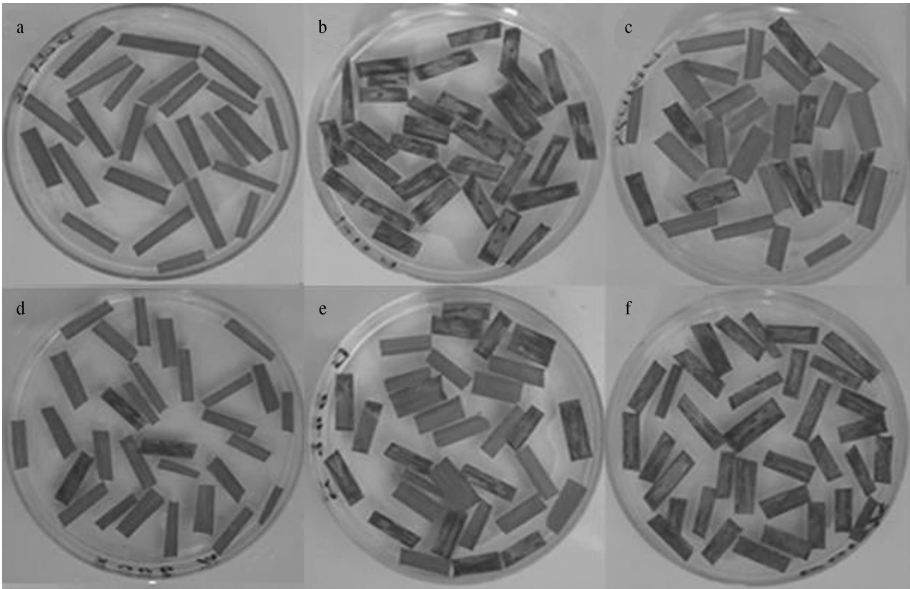
病斑比率 = 病斑长度/总叶长 \times 100%。

1.2.6 纹枯病抗感检测 在孕穗期前,参照潘学彪等^[17]的嵌入法进行纹枯病接种。每个单株接种 3~4 个茎秆,以镊子将带菌的火柴棍嵌入在茎秆倒 3 叶叶鞘上。观察发病情况,35 d 后进行发病调查,并参照左示敏等^[18]改进的调查标准判定植株的抗感情况。

2 结果与分析

2.1 T1 代转基因水稻植株潮霉素抗性分析

植物表达载体 *dph3* 转化水稻明恢 86 后,共获得 110 株转基因植株。对 110 个 T1 代转基因株系的潮霉素抗性结果进行统计分析(图 2),结果表明,出现抗感分离的有 97 个株系,占总株系的 88.2%。其中包括:I、符合 3:1 分离比的有 72 个株系($\chi^2 < \chi^2_{0.05(1)} = 3.84$,图 2c),占总株系的 65.5%;II、符合 15:1 分离比的有 1 个株系(图 2d),占总株系的 0.9%;III、既符合 3:1 又符合 15:1 的有 5 个株系,占总株系的 4.5%;IV、不符合预期遗传规律的有 19 个株系(图 2e),占总株系的 17.3%。潮霉素抗感不分离的有 13 个株系,且全都表现敏感(图 2f),占总株系的 11.8%。

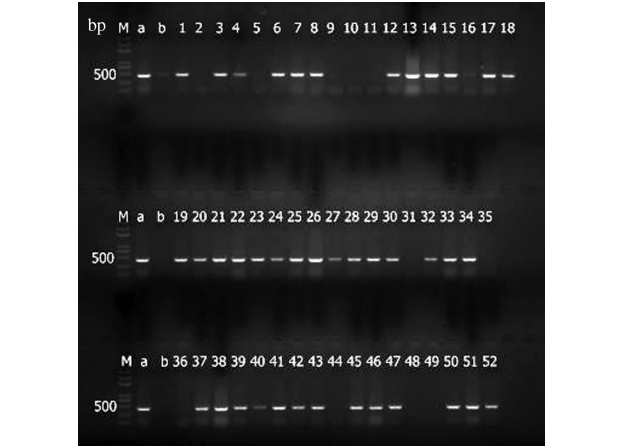


a:阳性对照;b:阴性对照;c:符合分离比 3:1 株系;d:符合分离比 15:1 株系;e:不符合分离比的株系;f:全阴性株系

图 2 T1 代转基因水稻潮霉素抗感检测结果

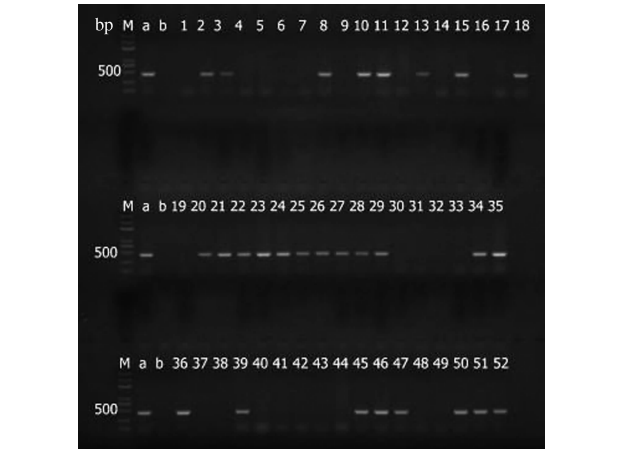
2.2 T1 代转基因植株的 *dp3* 基因检测

根据潮霉素抗性分析的结果,挑选出抗性分离比符合 3:1 的 9 个株系进行目的基因 PCR 检测。结果显示,各株系均能扩增出约 420 bp 的特异性条带(图 3、图 4)。遗传分析显示(表 1),有 8 个株系符合 3:1 的分离比(图 3),1 个株系不符合遗传分离定律(图 4)。



1—52;*dp3* 转基因植株; M:Marker; a;*dp3* 基因的阳性对照; b:阴性对照

图 3 转基因株系 W43 的 *dp3* 基因的 PCR 扩增



1—52;*dp3* 转基因植株; M:Marker; a;*dp3* 基因的对照; b:阴性对照

图 4 转基因株系 W49 的 *dp3* 基因的 PCR 扩增

表 1 目的基因 *dp3* 的分离结果

分离模式	株系编号	<i>dp3</i> ⁺ /株	<i>dp3</i> ⁻ /株	χ^2_c
3:1	E9	38	14	0.03
	E12	43	9	1.26
	E37	38	14	0.03
	E40	40	12	0.03
	E46	39	13	0.03
	W14	41	11	0.23
	W32	34	18	2.08
	W43	40	12	0.03
其他	W49	28	24	

注: $\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$ 。

2.3 T1 代转基因植株 *Hpt* 和 *dp3* 的分离分析

对上述筛选的 9 个株系,利用 PCR 技术验证 T1

代 *Hpt* 与 *dp3* 基因的分离情况。结果(表 2)显示,有 3 个株系是自由组合,单株的 4 种基因型符合 9:3:3:1 的分离比($\chi^2_c < \chi^2_{0.05(3)} = 7.81$);有 2 个株系属完全连锁,2 个外源基因共分离;有 2 个株系发生了交换;2 个株系不符合遗传分离定律。

9 个株系 468 个样品中筛选出 31 个无选择标记基因的转基因阳性植株,占总样本的 6.6%。

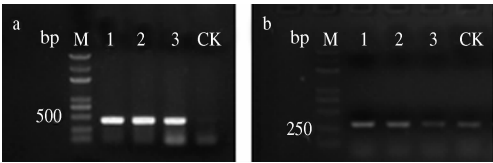
表 2 *Hpt* 和 *dp3* 的分离结果

分离模式	株系编号	基因型/株				χ^2_c
		<i>Hpt</i> ⁺ / <i>dp3</i> ⁺	<i>Hpt</i> ⁺ / <i>dp3</i> ⁻	<i>Hpt</i> ⁻ / <i>dp3</i> ⁺	<i>Hpt</i> ⁻ / <i>dp3</i> ⁻	
9:3:3:1 (自由组合)	E12	34	6	9	3	2.29
	E46	26	11	12	3	1.06
	W43	33	10	8	1	2.51
3:1 (连锁)	E9	38	0	0	14	0.03
	E40	41	0	0	11	0.23
	交换	E37	42	1	0	9
其他	W32	44	1	0	7	
	W14	40	9	2	1	11.73
	W49	28	12	0	12	33.88

注: $\chi^2_{0.05(3)} = 7.81, \chi^2_{0.05(1)} = 3.84$ 。

2.4 T1 代转基因植株的 *dp3* 基因表达分析

2.4.1 目的基因 *dp3* 的表达 植物表达载体 *dph3* 采用 35S 启动子启动目的基因表达。3 个自由组合株系中各随机抽取 1 个目的植株进行半定量 RT-PCR 分析。结果显示,以水稻 cDNA 为模板,P3F/P3R 为引物,转基因植株样品都获得了约 420 bp 的特异性条带,而阴性对照未扩增出目的条带(图 5a)。以 ActinF/ActinR 为引物所有样品都只扩增出 300 bp 的目的条带(图 5b),证明 cDNA 模板中无残留 DNA。因此,抗菌肽基因 *dp3* 在 RNA 水平上得到表达。

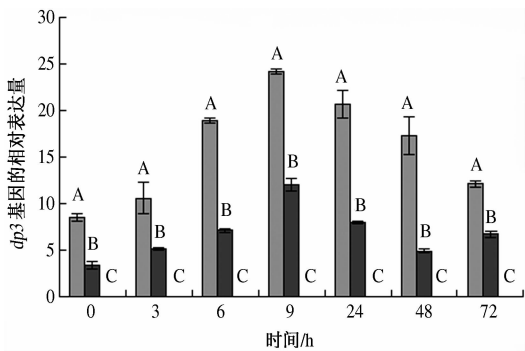


a:目的基因 *dp3* 表达分析; b:内参基因 *Actin* 表达分析;

1—3;*dp3* 转基因植株; CK:转基因阴性对照; M:Maker

图 5 *dp3* 基因表达分析

2.4.2 目的基因 *dp3* 表达量变化 以 8:00 作为起始 0 h,对同一天的不同时间点(0、3、6、9 h)和 4 d 内同一时间点(8:00 对应 0、24、48、72 h)进行取样检测,如图 6 所示,*dp3* 基因在所有阳性植株样品中都得到表达,而阴性对照的表达量为 0;在不同时间内 *dp3* 基因表达量有一定差异,推测可能受到光照、温度和损伤等的影响;在各个时间点,目的基因 *dp3* 在株系 E46 的表达量均比 E12 高,达 1.5~2.5 倍。



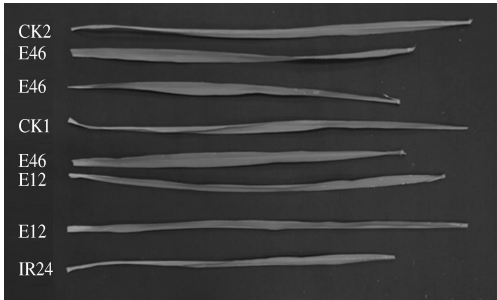
A: E46 阳性转基因植株; B: E12 阳性转基因植株; C: 非转基因对照植株
图 6 *dp3* 基因表达量分析

2.5 T1 代阳性转基因植株的抗病性分析

2.5.1 水稻白叶枯病抗性分析 选择符合自由组合的 3 个株系 (E46、E12、W43), 以无选择标记的转基因植株为主要接种对象, 在分蘖旺盛期将同一单株的不同分蘖分开移植, 用于接种不同菌种。以小种 PXO86 为例, 接种 14 d 后, 感病对照植株和非转基因植株开始出现明显病斑, 而转基因阳性植株病斑不明显。28 d 后测量病斑长度, 计算病斑比率。结果显示 (表 3、图 7), 株系 E46 和 E12 的病斑比率均在 1% ~ 10%, W43 则有单株的病斑比率在 11% ~ 20%。而非转基因对照的病斑比率则在 1% ~ 40%, 抗病性不稳定。可见, 抗菌肽 *dp3* 基因提高了水稻对白叶枯病小种 PXO86 的抗病能力。

表 3 转基因水稻植株对水稻白叶枯病菌株 PXO86 和 PXO99 的抗性反应

病斑比率 /%	PXO86				PXO99			
	E46	E12	W43	对照	E46	E12	W43	对照
1 ~ 10	4	4	2	4	4	4	1	3
11 ~ 20	0	0	1	2	0	1	1	3
21 ~ 30				1			1	1
31 ~ 40				1				0
41 ~ 50								1
51 ~ 60								1
61 ~ 70								
71 ~ 80								
总株数	4	4	3	8	4	5	3	9



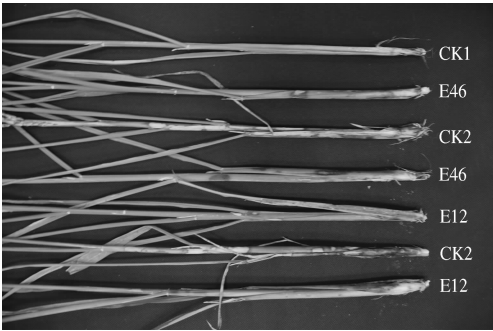
E12、E46: 阳性转基因植株; CK1、CK2: 非转基因植株; IR24: 感性对照
图 7 白叶枯病菌 PXO86 接种 28 d 后转基因植株叶片表型

同时, 对白叶枯病小种 PXO99 也进行了抗病检测。结果显示, 转基因植株的抗病能力明显好于阴性对照, 株系 E46 比其他 2 个株系表现出相对较好的抗病水平 (表 3)。

2.5.2 水稻纹枯病抗性分析 对 E46、E12 和 W43 三个株系进行纹枯病菌接种。以 GD - 118 小种为例, 接种 10 d 后, 部分单株开始在叶鞘部位出现黑色椭圆形病斑。20 d 后, 病斑增多, 沿接种部位上下发展, 分界线变窄并逐渐变成褐色, 35 d 后, 进行调查评价。调查显示 (表 4、图 8), 除 W43 的部分植株病斑达到倒 2 叶叶鞘外, E46 和 E12 转基因植株病斑多在倒 4 ~ 6 叶, 最多扩展至倒 3 叶叶鞘上。而阴性对照病斑多数达到倒 1 叶叶鞘, 甚至出现致残、致死现象。可见, 株系 E46 和 E12 的抗纹枯病能力明显提高。

表 4 转基因水稻植株对水稻纹枯病菌株 GD - 118 和 C - 30 的抗性反应

病级	GD - 118				C - 30			
	E46	E12	W43	对照	E46	E12	W43	对照
高抗 (HR)								
抗 (R)								
中抗 (MR)	6	4	1	2	5	4	1	1
中感 (MS)	0	0	2	3	0	0	2	2
感 (S)				2				2
高感 (HS)								1
总株数	6	4	3	7	5	4	3	6



E12、E46: 阳性转基因植株; CK1: 空白接种对照; CK2: 非转基因植株
图 8 纹枯病菌 GD - 118 接种 35 d 后转基因植株叶鞘表型

3 结论与讨论

利用双 T - DNA 载体和农杆菌介导转化技术获得了无选择标记的转中国对虾抗菌肽基因水稻明恢 86。对 T1 代 110 个转基因株系进行潮霉素抗性检测发现, 大部分株系符合遗传分离定律。由于转化事件混杂, 试验失误, 部分株系出现了既符合 3: 1 又符合 15: 1 的分离比的情况。还有部分株系不符合遗传分离定律, 推测可能是部分植株的 *Hpt* 基因出

现基因沉默导致的,在对 13 个潮霉素全敏感的株系进行 PCR 验证时检测出标记基因 (*Hpt*) 的目的条带,由此推测 *Hpt* 基因在这些不符合遗传分离定律的株系中可能发生了基因沉默现象^[19-20]。

对于 T1 代中 *Hpt* 和 *dp3* 基因各自都符合分离比 3:1 的 7 个株系,2 个外源基因的遗传模式符合遗传基本定律,其中 3 个株系为自由组合,2 个株系为共分离,剩余 2 个株系则发生了较低交换。另外发现,株系 W14 的 *Hpt* 和 *dp3* 基因分属于 15:1 和 3:1 的分离模式,所获得的 *Hpt*⁺/*dp3*⁺ 单株较多;推测可能是 *Hpt* 基因有 2 个拷贝或 2 个插入位点,导致其分离模式较为复杂。对转基因阳性植株进行抗病检测发现,除了株系 W43 外,转基因植株增强了抗白叶枯病和纹枯病的能力,其中株系 E46 对 4 个不同生理小种的细菌和真菌都表现出相对较好的抗性,可能与 *dp3* 基因表达量相对较高有关。W43 的抗病能力相对较差且不太稳定,推测与外源基因 *dp3* 插入位点有关,位置效应导致表达量的变化^[21]。

下一步拟设计试验验证目的基因的表达水平与转基因植株抗性之间的关系。并对不同世代转基因植株进行抗病检测,验证抗菌肽基因在水稻中的遗传和表达是否稳定。选取其他具代表性的细菌和真菌菌株进行抗病鉴定,研究中国对虾抗菌肽的抗菌谱。

参考文献:

- [1] D'Costa V M, King C E, Kalan L, *et al.* Antibiotic resistance is ancient[J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 457-461.
- [2] Cleave A P, Mitra D S, Mudge S R. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: Transient expression of recombinase and use of a conditional lethal dominant gene[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40(2): 223-235.
- [3] Kuiper H A, Kleter G A, Noteborn H P, *et al.* Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods[J]. *Plant J*, 2001, 27(6): 503-528.
- [4] Barton J E, Dracu P M. Genetically modified crops and the environment[J]. *Agron J*, 2000, 92(4): 797-803.
- [5] Park C B, Kim M S, Kim S C. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo* gargarizans[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 218(2): 408-413.
- [6] Huang Z, Kingsolver M B, Avadhanula V, *et al.* An antiviral role for antimicrobial peptides during the arthropod response to alphavirus replication[J]. *J Virol*, 2013, 87(8): 4272-4280.
- [7] Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 270(1): 1-11.
- [8] Li L, Wang J X, Zhao X F, *et al.* High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expr Purif*, 2005, 39(2): 144-151.
- [9] Kang C J, Xue J F, Liu N, *et al.* Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(7): 1535-1543.
- [10] Kang C J, Wang J X, Zhao X F, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Fish Shell Fish Immunol*, 2004, 16(4): 513-525.
- [11] Wang W, Wu C, Liu M, *et al.* Resistance of antimicrobial peptide gene transgenic rice to bacterial blight[J]. *Rice Science*, 2011, 18(1): 10-16.
- [12] 宫魁, 王雷, 付亚萍, 等. 对虾抗菌肽转基因水稻抑制饲料腐败和防治罗非鱼细菌病害的初步研究[J]. *水产学报*, 2012, 36(3): 436-443.
- [13] Wang M B, Waterhouse P M. A rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15(3): 209-215.
- [14] 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法[J]. *中国水稻科学*, 1992, 6(1): 47-48.
- [15] Campo S, Manrique S, García-Martínez J, *et al.* Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression[J]. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(6): 585-608.
- [16] 华志华, 汪晓玲, 黄大年, 等. *Cecropin B* 转基因水稻及其后代抗白叶枯病研究初报[J]. *中国水稻科学*, 1999, 13(2): 114-116.
- [17] 潘学彪, 陈宗祥, 徐敬友, 等. 不同接种调查方法对抗水稻纹枯病遗传研究的影响[J]. *江苏农学院学报*, 1997, 18(3): 27-32.
- [18] 左示敏, 张亚芳, 殷跃军, 等. 田间水稻纹枯病抗性鉴定体系的确立与完善[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2006, 27(4): 57-61.
- [19] Elmayan T, Proux F, Vaucheret H. *Arabidopsis* RPA2: A genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication[J]. *Current Biology*, 2005, 25(21): 1919-1925.
- [20] Finnegan J, McElroy D. Transgene inactivation plants fight back[J]. *Bio Technology*, 1994, 12(9): 883-888.
- [21] Chen J M, Carlson A R, Wan J M, *et al.* Chromosomal location and expression of green fluorescent protein (*gfp*) gene in microspore derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(8): 697-705.