

通过农杆菌介导法将哈兹木霉几丁质酶 ThEn-42 基因导入核桃

汤浩茹^{1,2} Wallbraun M.² 任正隆³ Reustle G. M.² Krczal G.²

(¹ 四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014; ² 德国莱茵兰—法尔兹植物生物技术中心, 67435 Neustadt/W.; ³ 四川农业大学植物遗传育种实验室, 雅安 625014)

摘要: 通过根癌农杆菌 C₅₈C₁ ATHV Rif^R 介导法, 利用烟草花叶病毒 35 S 双启动子和苜蓿花叶病毒引导序列控制下的含抗新霉素磷酸转移酶基因 (*npt*) 和哈兹木霉几丁质酶基因 (*ThEn-42*) 的质粒 pBin19ESR 为载体, 对 3 个核桃体细胞胚系进行遗传转化, 结果获得 41 个抗卡那霉素的体细胞胚系。经 PCR 和复式 PCR 检测, 41 个转化系均含有 *npt* 基因, 其中 38 个转化系含有 *ThEn-42* 基因。Southern 杂交分析表明, *ThEn-42* 基因已被整合到核桃体的基因组中。几丁质酶活性检测结果表明, 转化的体细胞胚系的几丁质酶活性比对照高几十至几千倍。遗传转化的体细胞胚系已萌发成苗。

关键词: 核桃; 几丁质酶; 转基因; 体细胞胚

中图分类号: S 664.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 01-0012-07

利用核桃 (*Juglans regia* L.) 品种的抗性防治病虫害是安全而经济的有效途径。用遗传转化的方法将抗病基因引入核桃是培育抗病新品种经济有效的方法。

目前, 已有多种抗病虫基因得到了分离与克隆^[1,2]。苏云金芽孢杆菌 Bt 毒素基因和几丁质酶基因在植物抗病虫基因工程中应用最为广泛。几丁质酶不仅能催化几丁质 (真菌细胞壁的主要成分) 水解, 而且能分解肽聚糖 (细菌细胞壁和节肢动物外骨骼的主要成分)。通过基因工程技术的方法将不同来源 (植物、微生物) 的几丁质酶基因转入植物后, 获得的转基因植株, 表达几丁质酶活性, 使植株的抗病、抗虫能力提高^[3,4]。从生防真菌哈兹木霉 P-1 株系 (*Trichoderma harzianum*) 分离的几丁质酶具有很高的抗真菌活性^[5]。Hayes 等^[6]从该株系中分离和克隆了编码几丁质酶的 *ThEn-42* 基因。Lorito 等^[7]和 Bolar 等^[8]分别将 *ThEn-42* 基因转入了烟草、马铃薯和苹果, 获得的转基因植株具有较强的抗烟草赤星菌 (*Alternaria alternata*)、马铃薯早疫病菌 (*A. solani*)、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 和苹果黑星菌 (*Venturia inaequalis*) 的能力。我们利用 *ThEn-42* 基因导入核桃, 以期获得抗性株系, 并探索该基因在林木抗病育种中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的转化外植体为 ‘W628’ 体细胞胚无性系 3 个。该体细胞胚系源于德国优良核

收稿日期: 2000 - 07 - 05; 修回日期: 2000 - 11 - 08

桃品种 ‘No. 120’ 的子叶^[9]。按文献 [10] 的方法生产体细胞胚。新形成的次生胚 (1 ~ 3 mm 大小) 用于遗传转化。

1.2 质粒与工程菌

哈兹木霉几丁质酶 *ThEr-42* 基因表达载体为 pBin19ESR 质粒 (图 1)。通过直接转化法将此质粒导入超毒力农杆菌 *C₅₈C₁* ATHV *Rif^R* 菌株中而获得含 *ThEr-42* 基因的工程菌。工程菌培养在 LB 培养基 (附加利福平 15 mg/L 和卡那霉素 50 mg/L, pH 7.0)。

1.3 遗传转化

取新形成的 1 ~ 3 mm 大小的体细胞胚于新鲜的、对数生长期的工程菌液 (DW 培养基配制, 含乙酰丁香酮 0.1 mmol/L, 菌细胞含量为 2.0×10^8 个/mL) 浸没 15 min, 按文献 [11] 总结的操作步骤进行。设 3 个重复, 每重复 20 个体细胞胚。

1.4 转基因体细胞胚的萌发与植株再生

按文献 [12] 中 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 脱水方法进行。

1.5 PCR 扩增鉴定

参照文献 [13] 的方法, 取 20 ~ 30 g 体细胞胚或叶片进行液氮研磨提取 DNA。纯化的 DNA 溶于 $1 \times \text{TE}$ 溶液中备用。PCR 引物购自德国 MWG Biotech AG。用于扩增新霉素磷酸转移酶基因 (*npt*) 的引物序列为: *npt*-5, 5'-AGG CTA TTC GGC TAT GAC TG-3'; *npt*-3, 5'-GTC CAG ATC ATC CTG ATC G-3'。用于扩增几丁质酶基因 *ThEr-42* 的引物序列为 (复式扩增): *NAD*-5, 5'-TAG CCC GAC CGT AGT GAT GTT AA-3'; *NAD*-3, 5'-ATC ACC GAA CCT GCT CTC AGG AA-3'; *Trendo*-5, 5'-TGG AAC GAC GTC GGT AAC AAT G-3'; *Trendo*-3, 5'-CTC AAC AGC TCG TCC GAT GAT GG-3'。按美国 Roche Molecular Systems, Inc 提供的 Perkin-Elmer PCR 试剂盒上的方法, 50 μL *npt*-PCR 总反应液中含 *npt*-5 和 *npt*-3 引物各 12 pmol/mL, dNTPs 10 $\mu\text{mol/mL}$, DNA 样品约 10 ng, AmpliTaqTM DNA 聚合酶 2.5 U 和 10 \times PCR 缓冲液 (Tris-HCl 100 mmol/mL, KCl 500 mmol/mL, MgCl_2 25 mmol/mL, 明胶 0.1%, pH 8.3) 9 μL 。50 μL *ThEr-42*-PCR 总反应液中含 *NAD*-5 和 *NAD*-3 引物各 4 pmol/mL, *Trendo*-5 和 *Trendo*-3 引物各 12 pmol/mL, dNTPs 20 $\mu\text{mol/mL}$, DNA 样品约 2 ng, AmpliTaqTM DNA 聚合酶 2.5 U 和 10 \times PCR 缓冲液 9 μL 。*npt* 基因的扩增程序为: 94 预处理 2 min, 94 45 s, 55 30 s, 72 45 s。35 个循环后 72 保温 2 min。*ThEr-42* 基因的扩增程序为: 94 预处理 5 min, 94 30 s, 55 30 s, 72 30 s。40 个循环后 72 保温 2 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 0.1% 溴化乙锭水溶液染色, 310 nm 紫外观测仪观测。以经 *C₅₈C₁* ATHV *Rif^R/pGUS-Int-Kan* 转化的体细胞胚^[14]为正对照, 未转化的体细胞胚为负对照。

1.6 Southern blot 分析

按文献 [15] 的方法, 取 15 ~ 20 μg DNA, 用 *EcoRI* 和 *NcoI* 酶切后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳 12 h, 再转移到 NC 膜上, 用 ³²P 标记的 *ThEr-42* 基因片段探针于 65 下杂交

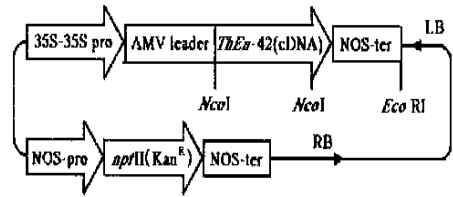


图 1 含 *ThEr-42* 基因的质粒 pBin19ESR 结构图

Fig. 1 The plasmid pBin19ESR containing the *ThEr-42* gene

过夜。膜经漂洗后在 X- 光胶片上进行放射性自显影。

1.7 几丁质酶活性测定

按文献 [16] 的方法, 取 10~20 μL 蛋白质提取物 (约含蛋白质 10 μg), 加入 37 保温的 250 mL 4-methylumbelliferyl- β -D-N, N, N-triacetyl chitotrioside (MuchT) (5 mg/L) 反应液, 在 37 以下准确反应 5 min, 用 Na_2CO_3 0.3 mol/L 终止反应。反应产物 Methylumbelliferone (MU) 用美国 Bio-Rad Laboratories 的 Bio-Rad VersaFluorTM 荧光仪测定。用酶的国际单位 (U) 表示酶含量。一个酶国际单位 (1 U) 表示每分钟每微克蛋白质产生 1 μmol MU 所需的酶量。

以经 C_{58}C_1 ATHV Rif^R/pGUS-Int-Kan 转化的体细胞胚^[14]和未经转化的体细胞胚为对照, 同一体细胞胚系测定 3 次, 试验结果以平均数表示。

2 结果与分析

2.1 抗卡那霉素的体细胞胚系的获得

未经农杆菌感染的体细胞胚 (对照, E_{00}), 78.6% \pm 3.2% 能够产生次生胚, 平均产生 7.9 \pm 0.92 个次生胚 (E_{01})。经农杆菌感染后, 在不含卡那霉素的培养基上, 有 66.5% \pm 1.8% 的体细胞胚 (E_{A0}) 产生次生胚, 平均产生 3.2 \pm 0.83 个次生胚 (E_{A1})。经农杆菌感染后, 在含 100 mg/L 卡那霉素的培养基上, 有 35.0% \pm 4.7% 的体细胞胚 (E_{K0}) 产生

表 1 遗传转化的核桃体细胞胚系的 PCR 反应与几丁质酶活性

Table 1 Expression of the *npt* and *ThEr42* genes and chitinase activity in different transformed somatic embryo lines

胚 系 Embryo line	PCR		几丁质酶活 性 Chitinase activity (U)	胚 系 Embryo line	PCR		几丁质酶活 性 Chitinase activity (U)	胚 系 Embryo line	PCR		几丁质酶活 性 Chitinase activity (U)
	<i>npt</i>	<i>ThEr42</i>			<i>npt</i>	<i>ThEr42</i>			<i>npt</i>	<i>ThEr42</i>	
A ₀	-	-	0.1	B ₀	-	-	0.3	C ₀	-	-	0.2
A _{k5-1-1-1}	+	+	13.5	B _{k3-2-1-4}	+	+	20.4	C _{k2-1-1-5}	+	+	297.7
A _{k8-1-1-4}	+	+	25.3	B _{k5-2-2-1}	+	+	14.3	C _{k2-1-9-1}	+	+	227.6
A _{k8-2-1-2}	+	+	51.2	B _{k5-2-2-2}	+	+	11.2	C _{k2-1-9-8}	+	+	219.8
A _{k3-3-1-1}	+	+	148.0	B _{k8-2-2-4}	+	(+)	5.0	C _{k4-4-6-1}	+	+	43.5
A _{k9-1-1-1}	+	-	0.7	B _{k8-6-2-2}	+	+	96.8	C _{k5-1-1-1}	+	+	16.0
A _{k10-1-1-7}	+	-	1.9	B _{k11-6-2-6}	+	+	68.5	C _{k5-1-1-3}	+	+	15.1
A _{k15-3-1-7}	+	(+)	4.8	B _{k15-2-1-3}	+	+	18.2	C _{k11-2-3-1}	+	+	43.5
A _{k15-3-4-5}	+	+	45.3	B _{k15-2-1-7}	+	+	86.9	C _{k11-2-3-5}	+	+	43.9
A _{k15-3-4-8}	+	+	24.9	B _{k17-1-1-1}	+	+	140.8	C _{k11-3-2-3}	+	+	18.9
A _{k15-3-4-9}	+	+	28.9	B _{k17-2-1-3}	+	+	297.7	C _{k11-9-3-2}	+	+	180.0
A _{k17-1-2-1}	+	+	96.3	B _{k19-2-3-2}	+	+	95.0	C _{k15-1-1-1}	+	+	199.6
A _{k17-2-1-1}	+	+	112.1	B _{k19-6-6-1}	+	+	248.2	C _{k15-1-2-1}	+	+	284.3
G ₁₇₋₂₋₃₋₁ ⁺	+	-	0.1	B _{k19-6-6-7}	+	+	163.9	C _{k15-1-4-3}	+	+	205.0
G ₁₇₋₂₋₃₋₆ ⁺	+	-	0.9	B _{k19-6-7-7}	+	+	199.0	C _{k17-1-9-1}	+	-	10.6
				G ₁₇₋₁₋₅₋₂ ⁺	+	-	5.0	C _{k19-1-2-1}	+	+	31.6
								G ₁₇₋₁₋₁₋₁ ⁺	+	-	7.9

胚系: A₀、B₀ 和 C₀: 分别表示未转化对照; A_k; B_k 和 C_k: 分别表示卡那霉素选择系; G⁺: 表示含 *npt* 基因的正对照。PCR: +: 带纹明显; -: 无带纹; (+): 带纹极弱。

A₀, B₀ and C₀ indicate non-transformed embryo lines (negative controls); A_k; B_k and C_k indicate embryo lines transformed and selected by kanamycin; G⁺ indicates embryo lines transformed with *npt* (positive controls). + means PCR test with visible bands; - means PCR test without visible bands; (+) means PCR test with weak bands.

次生胚, 平均产生 3.4 ± 0.72 个次生胚 (E_{K1})。经一次继代培养, 有 $76.5\% \pm 5.2\%$ 的 E_{O1} , $64.5\% \pm 0.8\%$ 的 E_{A1} 和 $41.9\% \pm 1.3\%$ 的 E_{K1} 产生次生胚, 分别产生 7.8 ± 1.21 个 E_{O2} , 3.8 ± 1.01 个 E_{A2} 和 5.3 ± 0.83 个 E_{K2} 。

以对照为一个体细胞胚系 (E_{O3}), 以经农杆菌感染后产生第 3 代体细胞胚的第 2 代体细胞胚为一个体细胞胚系, 共获得 84 个体细胞胚系, 其中 41 个为抗卡那霉素的体细胞胚系 (E_{K3}) (表 1)。

2.2 PCR 检测 *npt* 与 *ThEr42* 基因

经 PCR 检测, 对照体细胞胚系 (E_{O3}) 和 42 个未经卡那霉素选择的体细胞胚系 (E_{A3}) 均为 *npt*-PCR 负反应, 而 41 个经卡那霉素选择的体细胞胚系 (E_{K3}) 均为 *npt*-PCR 正反应 (图 2)。在 41 个 *npt*-PCR 正反应的体细胞胚系中, 有 38 个 (86.4%) 为 *ThEr42*-PCR 正反应 (图 3)。3 个含 *npt* 基因的正对照体细胞胚系表现为 *npt*-PCR 正反应而 *ThEr42*-PCR 负反应 (表 1, 图 2 和图 3)。

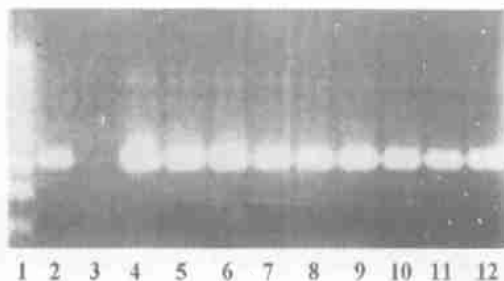


图 2 遗传转化的核桃体细胞胚 PCR 扩增产物

1. 100 bpDNA 标记; 2. 含 *npt* 基因的质粒 DNA (约 420 bp); 3. 未转化的核桃体细胞胚 (负对照);
- 4 ~ 11. 遗传转化的核桃体细胞胚系;
12. 含 *GUS* 和 *npt* 基因的核桃体细胞胚 (正对照)。

Fig. 2 The PCR product of the walnut somatic embryos mediated with *Agrobacterium tumefaciens*

1. 100 bpDNA ladder; 2. the plasmid DNA (~420 bp);
3. non-transformed somatic embryos (negative control);
- 4 - 11. transformed somatic embryos; 12. Somatic embryos contain the *GUS* and *npt* genes (positive control).

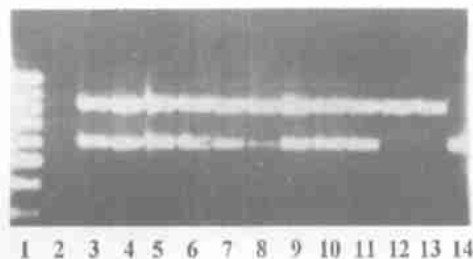


图 3 遗传转化的核桃体细胞胚复式 PCR 扩增产物

1. 100 bpDNA 标记; 2. 纯水 (负对照 1);
- 3 ~ 11. 遗传转化的核桃体细胞胚系;
12. 未转化的核桃体细胞胚 (负对照 2);
13. 含 *GUS* 与 *npt* 基因的核桃体细胞胚 (正对照 1);
14. 含 *ThEr42* 基因的质粒 DNA (603 bp, 正对照 2)。

Fig. 3 The multiplex PCR amplified DNA from somatic embryos mediated with *Agrobacterium tumefaciens*

1. 100 bp DNA ladder; 2. water (negative control 1);
- 3 - 11. transformed somatic embryos; 12. non-transformed somatic embryos (negative control 2); 13. somatic embryos containing the *GUS* and *npt* genes (positive control 1);
14. the plasmid DNA (603 bp, positive control 2).

2.3 Southern blot 分析

Southern blot 分析表明, 在所测的核桃体细胞胚系中, *ThEr42*-PCR 正反应的体细胞胚系均含有标记的 *ThEr42* 基因带, 而对照体细胞胚无任何带纹 (图 4)。这表明, *ThEr42* 基因已被整合到了核桃体细胞胚的基因组中。

2.4 *ThEr42* 基因的活性表达

几丁质酶活性测定表明, 未经遗传转化的体细胞胚系 (对照 E_{O3}) 的几丁质酶活性极低, 仅有 0.1 ~ 0.3 个单位。经遗传转化的 *npt*-PCR 正反应而 *ThEr42*-PCR 负反应的体细胞胚系 (E_{A3}) 几丁质酶活性与仅含 *npt* 基因的正对照体细胞胚系的几丁质酶活性相

似, 分别为 0.1~7.9 和 0.2~10.6 个单位。经遗传转化的、*npt* -PCR 和 *ThEnr*-42-PCR 均为正反应的体细胞胚系 (E_{K3}) 几丁质酶活性达 12.0~341.4 个单位 (表 1, 图 5)。

2.5 转基因体细胞胚的萌发与植株再生

选取不同倍数于对照 (E_{03}) 几丁质酶活性的转基因体细胞胚系 (E_{K3}), 经 $Ca(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 脱水处理 3 d 后, 在 1/2 DKW + 0.5 % 蔗糖 + 0.7 % 琼脂的培养基 (含或不含 0.5 % 的活性炭) 上萌发, 获得了转基因植株 (图 6)。

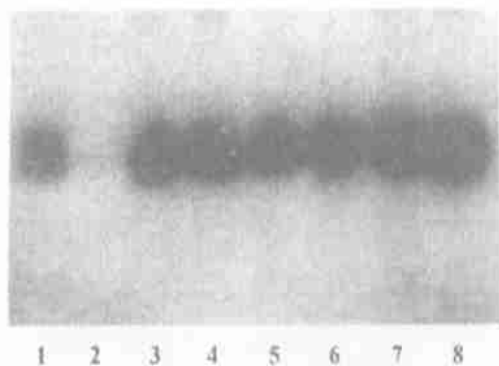


图 4 部分 PCR 正反应核桃体细胞胚的 Southern blot 分析

1. 阳性对照 (质粒 DNA); 2. 阴性对照 (未转化的核桃体细胞胚); 3~8. PCR 正反应核桃体细胞胚系。

Fig. 4 Southern blot analysis of genomic DNA from transformed somatic embryos of walnut

1. positive control (plasmid DNA); 2. negative control (non-transformed somatic embryo), 3-8. transformed somatic embryo lines.

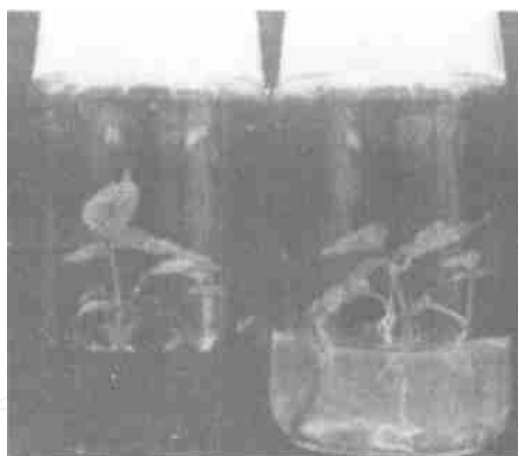


图 6 遗传转化的核桃体细胞胚萌发的植株

Fig. 6 Transgenic plantlets derived from walnut somatic embryos containing the *ThEnr*-42 gene

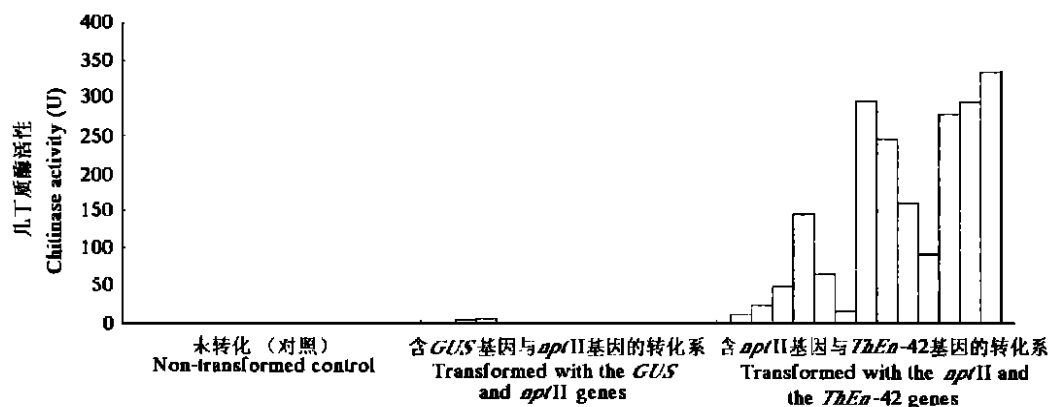


图 5 不同遗传转化的核桃体细胞胚系的几丁质酶活性

Fig. 5 Specific activity of the endochitinase in different transgenic walnut somatic embryo lines

3 讨论

自 1984 年 Herrera-Esfrella 等首次用遗传转化的方法获得转基因的烟草植株以来, 在许

多作物上都获得了转基因植株，其中包括核桃^[11]。用遗传转化的方法改良作物的关键在于有效的作物离体培养再生系统和转化基因在转化体内的稳定表达。体细胞胚胎发生与植株再生是迄今为止的唯一用于核桃转基因研究成功的离体培养再生植株系统^[11]。尽管核桃的次生胚为表皮单细胞起源^[17]，但是，由于接种时体细胞胚发育的阶段不同，受转化的第一代、乃至第二代体细胞胚将出现不同程度的嵌合性^[14,18]。由于农杆菌侵染的随机性，受转化的第一代体细胞胚可能起源于不同的感染位点。因此，以第二代体细胞胚为基础建立的转基因体细胞胚系，不仅是纯合体，而且还能避免不同感染位点起源的转化体的混杂^[14,18]。本试验同时以含 *GUS* 基因内含子的质粒/菌株 pGUS-Int/C₅₈C₁ATHV Rif^R 转化同一体细胞胚系，经组织化学测定，受转化的第三代体细胞胚为纯合体。经 pBin19ESR/C₅₈C₁ATHV Rif^R 转化而获得的转化体细胞胚系，在 *npt* 与 *ThErr42* 基因和几丁质酶活性上系内具有较高的同一性而系间表现多样性。尽管如此，本试验所获得的遗传转化系是否为相互独立的纯合转化系有待进一步测试。

核桃的体细胞胚对卡那霉素具有较强的忍耐性。但卡那霉素预选择不仅可以减少用分子生物学的方法 (PCR) 的选择量，同时也是获得遗传转化体的关键^[19]。在 41 个经卡那霉素预选择的遗传转化系中，100 % 的表现 *npt* -PCR 正反应，86.3 % 表现为 *ThErr42*-PCR 正反应，而未经卡那霉素预选择的 42 个“遗传转化系”中，无一 PCR 正反应存在。*Npt* 基因与 *ThErr42* 基因是紧密连锁的。在本试验中，有 3 个 *npt* -PCR 正反应的遗传转化体细胞胚系表现为 *ThErr42*-PCR 负反应。这可能是 *ThErr42*-PCR 对此 3 个遗传转化体细胞胚系的扩增产物量小，出现极弱的 PCR 带。事实上，*npt* -PCR 的带纹很强 (图 2)，而 *ThErr42*-PCR 的带纹很弱 (图 3)。这可能造成部分极弱带未能显示出来。

遗传转化体中外源基因的稳定与表达关系到遗传转化体的实用价值。基因表达的主要形式是经转录后合成蛋白质。几丁质酶的合成是检验几丁质酶基因是否表达的重要指标之一。Southern 杂交结果表明，*ThErr42* 基因已被整合到了核桃体细胞胚的基因组中。几丁质酶活性测定表明，经遗传转化的体细胞胚系呈几十、几百，甚至几千倍于对照的表达几丁质酶的活性。这不仅说明外源几丁质酶 *ThErr42* 基因的存在，而且说明该基因能够在核桃中表达。

参考文献：

- 1 Rao A G. Antimicrobial peptides. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1995, 8: 6~13
- 2 Shah D M, Rommens C M T, Beachy R N. Resistance to diseases and insects in transgenic plants: Progress and applications to agriculture. *Trends in Biotechnology*, 1995, 13: 362~368
- 3 单丽波, 贾旭. 几丁质酶及其在抗真菌病基因工程中的应用. *生物工程进展*, 1998, 18 (3): 37~40
- 4 高必达. 转几丁质酶基因防植物病害的研究进展、问题与展望. *生物工程进展*, 1999, 19 (2): 21~28
- 5 Lorito M, Harman G E, Hayes C K, et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 1993, 83: 302~307
- 6 Hayes C K, Klemsdal S, Lorito M, et al. Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene*, 1994, 138: 143~148
- 7 Lorito M, Woo S L, Fernandez I R, et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 7860~7865
- 8 Bolari J P, Norelli J L, Harman G E, et al. Expression of fungal chitinolytic enzymes in transgenic apples confers high levels of resistance to scab. In: Altman A. (ed.) *Plant Biotech. and In Vitro Biology in the 21st Century*. Netherlands: Kluwer Aca-

- demic Publishers, 1999. 465 ~ 468
- 9 汤浩茹, 王永清, 任正隆, 等. 德国核桃 'No. 120' 幼胚胚轴与子叶体细胞胚胎发生及其植株再生. 园艺学报, 2000, 27 (1): 59 ~ 61
 - 10 Tang H R, Ren Z L, Reustle G M, et al. Optimizing secondary somatic embryo production in English walnut (*Juglans regia* L.). Acta Horticulturae, 2001, 544: 187 ~ 194
 - 11 汤浩茹, 王永清, 任正隆. 核桃体细胞胚胎发生与转基因研究进展. 林业科学, 2000, 36 (3): 102 ~ 110
 - 12 Tang H R, Ren Z L, Krczal G. Improvement of English walnut somatic embryo germination and conversion by desiccation treatments and plantlet development by lower medium salts. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 2000, 36 (1): 47 ~ 50
 - 13 Kobayashi N, Horikoshi T, Katsuyama H, et al. A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 1998, 4: 76 ~ 80
 - 14 Tang H R, Ren Z L, Reustle G M, et al. Regeneration of transgenic plants from walnut somatic embryos mediated with *Agrobacterium tumefaciens*. Acta Horticulturae, 2001, 544: 201 ~ 208
 - 15 Carsolio C, Gutierrez A, Jimenez B, et al. Characterization of echr42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 10903 ~ 10907
 - 16 Kikkert J R, Hebert-Soule D, Wallace P G, et al. Transgenic plantlets of 'Chancellor' grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions. Plant Cell Rep., 1996, 15: 311 ~ 316
 - 17 Polito V S, McGranahan G H, Pinney K, et al. Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Juglans regia* L.): applications for *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Rep., 1989, 8 (3): 219 ~ 221
 - 18 Tang H R, Ren Z L, Reustle G M, et al. Somatic embryogenesis of English walnut and recovery of transgenic somatic embryos after *Agrobacterium*-mediated transformation. Acta Horticulturae, 2000, 538 (2): 645 ~ 650
 - 19 Tang H R, Ren Z L, Reustle G M, et al. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep., 2000, 19 (9): 881 ~ 887

Genetic Transformation of the *Trichoderma* Endochitinase Gene *ThEn-42* to Somatic Embryos of English Walnut

Tang Haoru^{1,2}, Wallbraun M.², Ren Zhenglong³, Reustle G. M.², and Krczal G.²

(¹ College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; ² Zentrum Grüne Gentechnik, SLFA, 67435 Neustadt/W., Germany; ³ State Key Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract: Somatic embryos of English walnut (*Juglans regia* L.) were *Agrobacterium*-mediately transformed with the *Trichoderma* endochitinase gene *ThEn-42* under the control of a double 35 S CaMV promoter and Alfalfa Mosaic Virus leader sequence. The selectable marker gene neomycin phosphotransferase (*npt*) driven by the nopaline synthase promoter was also used. A total of 41 putatively transformed somatic embryo lines were evaluated for expression of the *npt* and *ThEn-42* genes by PCR and multiplex PCR. All of the 41 somatic embryo selections expressed the *npt* gene, among which 38 somatic embryo selections expressed the *ThEn-42* gene. Analysis of chitinase activity by using a fluorometric assay showed dozens to 1 000-fold higher chitinase activity in transformed somatic embryos than that in non-transformed ones. All of the tested chitinase-positive somatic embryo lines analyzed by Southern blotting had an intact copy of the *ThEn-42* gene. Chitinase expressing somatic embryos were further germinated and are being propagated for disease resistance assays.

Key words: Walnut (*Juglans regia*); Chitinase; Genetic transformation; Somatic embryos