

# 雪花莲外源凝集素基因在大白菜中的表达和抗蚜性遗传分析

杨广东<sup>1</sup> 朱 祯<sup>2</sup> 李燕娥<sup>1</sup> 朱祝军<sup>3</sup> 上官晓霞<sup>1</sup> 吴 霞<sup>1</sup>(<sup>1</sup> 山西农业科学院棉花研究所, 运城 044000; <sup>2</sup> 中国科学院遗传所, 北京 100101; <sup>3</sup> 浙江大学园艺系, 杭州 310029)

**摘 要:** 通过农杆菌介导法将雪花莲外源凝集素基因 (*gna*) 导入了大白菜自交系 282。分子检测和抗虫试验表明 *gna* 基因已整合进大白菜基因组, 转基因植株较非转化对照植株有一定的抗蚜虫能力, 抗性好的植株可以检测到较强的 *gna* 基因转录产物; 后代遗传分析表明外源基因在转基因大白菜植株 282-3 和 282-9 的 T<sub>1</sub> 代呈 3:1 的孟德尔分离比例。

**关键词:** 大白菜; 外源凝集素基因 *gna*; 表达; 遗传; 抗蚜性

**中图分类号:** S 634.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0341-02

## 1 目的、材料与方法

雪花莲外源凝集素对刺吸式口器同翅目害虫, 如蚜虫、褐飞虱等具有明显的抑制作用。朱玉等<sup>[1]</sup>分离和克隆了雪花莲外源凝集素基因 (*gna*), 获得的转化植株对蚜虫均表现了一定抗性。本试验用 *gna* 基因转化大白菜, 以期获得抗蚜植株, 并对外源基因在大白菜中的表达和遗传进行分析。

供试大白菜品系为自交不亲和系 282, 转化质粒 pBinGNA 含有由花椰菜花叶病毒启动子 (CaMV 35S) 驱动的 *gna* 基因, 新霉素磷酸转移酶基因 (*nptII*) 作为筛选标记基因。以 3 日苗龄的大白菜无菌苗带柄子叶 (柄长 1 mm) 为外植体, 工程菌液的制备及转化方法参见文献 [2]。

转化植株的 PCR、Southern blot 和 Northern dot blot 分析参照 Sambrook 等<sup>[3]</sup>的方法进行。引物 1: 5'-CAAAATGGCTAAGGCAAG3'; 引物 2: 3'-ACTGCCGTTTCATTACTGGC5' 是根据 *gna* 序列由上海生物工程有限公司合成。杂交所用探针来自 *Bam*HI/*Kpn*I 酶切质粒 pBinGNA 回收约 400 bp 的 *gna* 基因片段。

对 PCR 阳性的转基因植株进行室内抗蚜鉴定, 在直径 9 cm 的培养皿中放置两层滤纸, 无菌水浸湿后置适量新鲜叶片, 以非转化植株叶片为对照, 每皿内放置 3 只 1~2 龄的菜蚜, 重复 3 次, 在 25~28℃ 和湿度 85% 下培养。每 5 d 调查 1 次蚜虫总数, 连续观察 20 d, 计算蚜虫抑制率 [(对照平均感蚜总数 - 样品平均感蚜总数) / 对照平均感蚜总数 × 100%]。在温室和田间观察转基因植株的抗蚜性。

选择抗性好的单株 282-3 和 282-9 在花期套袋自交, 得到 T<sub>1</sub> 代种子并播种在网室, 当第 4 片真叶完全展开后, 在其叶面滴 1 滴 100 mg/L 的卡那霉素, 重复 3 次, 5 d 后根据颜色变化结合 PCR 方法分析外源基因在 T<sub>1</sub> 代的分离和遗传情况。同时当 T<sub>1</sub> 代植株长至六叶一心时, 分别从里往外数取第 3 片叶进行室内抗蚜鉴定, 方法同上, 最后统计 T<sub>1</sub> 代植株的蚜虫抑制率和 *gna* 基因的遗传分离情况。

## 2 结果与分析

通过 3 次转化实验, 从 600 个外植体 (带柄子叶) 中得到 11 个卡那霉素抗性植株。PCR 扩增结果表明 11 株中有 7 个植株扩增出了预期的目的片段, 而未转化植株没有此条带。对这 7 个 PCR 阳性的抗性植株进行 Southern blot 杂交分析 (见插图 1 图版, A), 所有植株都出现了 DNA 杂交带。因此可见, 经卡那霉素抗性筛选、PCR 和 Southern blot 检测均为阳性的植株是转基因植株。

收稿日期: 2002-10-07; 修回日期: 2003-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39770440); 山西省农业科学院基金项目

抗蚜性试验表明,与对照相比,转基因植株表现出明显的对蚜虫生长的抑制作用,平均能抑制蚜虫密度达 20%,而非转化对照为 0;但单株之间差异很大,比如转基因植株 282-3 和 282-9 的蚜虫抑制率可分别达到 35% 和 29%,而 282-7 仅 7% 左右。转基因植株在田间生长时正值蚜虫发生旺期(2001 年 5~6 月),比相邻的非转基因植株表现出了较强的抗虫性(插页 1 图版,C)。对 7 个转基因植株中 *gna* 基因的转录情况进行 Northern dot blot 杂交分析(插页 1 图版,B),结果表明抗蚜性好的转基因植株如 282-3、282-9 出现了较强的杂交信号,而抗虫性较弱的 282-4、282-7 等杂交信号很弱或几乎没有信号,这预示转基因失活可能发生在基因转录时期。同一自交系的不同植株尽管基因型相同,但抗虫性差异很大,可见外源基因在转基因植株中的表达调控是一个十分复杂的问题,有待于深入研究。

选抗虫的 282-3 和 282-9 两个植株在花期套袋自交,得到了  $T_1$  代种子。室外卡那霉素筛选结合 PCR 分析表明,转基因植株  $T_1$  代中外源基因发生 3:1 分离,经  $\chi^2$  适合性检测表明(表 1)符合孟德尔分离比例。推断两个转基因植株中目的基因 *gna* 和卡那霉素抗性筛选基因 *nptII* 为共整合,且插入位点相同,并能稳定地遗传给后代。

表 1 转 *gna* 基因大白菜  $T_1$  代植株中外源基因的遗传分析

Table 1 Inheritance analysis of foreign gene in transgenic  $T_1$  Chinese cabbage plants

材料 Material	室外卡那霉素筛选 Kanamycin evaluation in field				PCR			
	调查株数 No. of plants	阳性株数 No. of positive plants	阳性/阴性 +/-	$\chi^2$	调查株数 No. of plants	阳性株数 No. of positive plants	阳性/阴性 +/-	$\chi^2$
282-3	126	97	3.34:1	0.169*	116	88	3.14:1	0.011*
282-9	187	148	3.79:1	1.499*	130	105	4.20:1	2.010*

注:  $\chi^2_{0.05} = 3.841$ , \* 表示  $\chi^2$  测验符合 3:1 分离比例。Note:  $\chi^2_{0.05} = 3.841$ , \* Represent that  $\chi^2$  test accord with 3:1 segregation ratio.

对转基因的 282-3 和 282-9 的  $T_1$  代植株抗蚜性试验表明,不同植株之间抗蚜能力差异很大,大部分植株的蚜虫抑制率在 20%~30% 之间,23%~27% 的植株几乎没有抗蚜性,蚜虫抑制率低于 10%,若以蚜虫抑制率低 10% 者为不抗蚜植株,高于 10% 者为抗蚜植株,那么经过卡方 ( $\chi^2$ ) 适合性检测表明,  $T_1$  代植株中抗与不抗的分离比例符合 3:1 的孟德尔分离规律,这同前面的卡那霉素检测和 PCR 分析结果相符合。

#### 参考文献:

- 1 朱玉,吴茜,高越峰,等.雪花莲外源凝集素基因的克隆、序列分析和植物表达载体的构建.农业生物技术学报,1997,5(4): 331~338
- 2 杨广东,李燕娥,上官晓霞.大白菜遗传转化体系优化的研究.见:奥岩松,秦智传主编.园艺学进展(第四辑).哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2000. 300~304
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 362~490

## Expression and Inheritance of Snowdrop Lectin Gene (*gna*) in Chinese Cabbage

Yang Guangdong<sup>1</sup>, Zhu Zhen<sup>2</sup>, Li Yan'e<sup>1</sup>, Zhu Zhujun<sup>3</sup>, Shanguan Xiaoxia<sup>1</sup>, and Wu Xia<sup>1</sup>

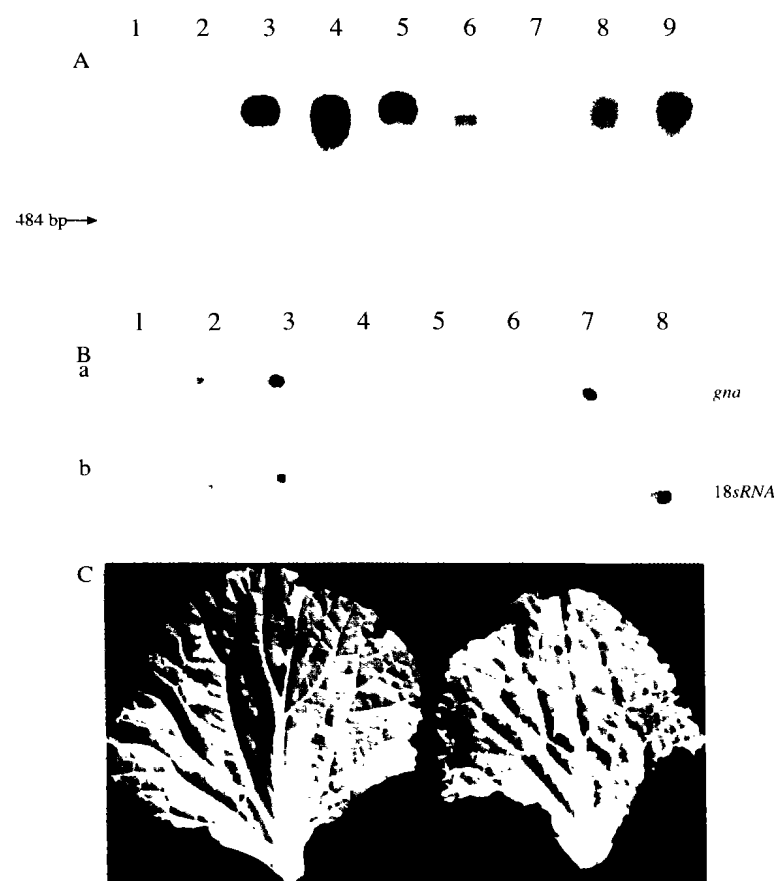
(<sup>1</sup> Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China; <sup>2</sup> Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>3</sup> Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** Molecular test and insect bioassays with aphid (*Myzus persicae* Sulzer) larvae verified that *gna* gene had been integrated into Chinese cabbage genome mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, and all 7 transgenic plants were aphid resistant, strong mRNA of *gna* could be detected in transgenic plants with higher insect resistance. The results of inheritance analysis showed foreign gene in 2 transgenic Chinese cabbage plants 282-3 and 282-9 is in the model of the simple Mendel's fashion in their  $T_1$  progenies.

**Key words:** Chinese cabbage; *gna*; Expression; Inheritance; Aphid resistance

# 杨广东等：雪花莲外源凝集素基因在大白菜中的表达和抗蚜性遗传分析

Yang Guangdong, et al. Expression and Inheritance of Snowdrop Lectin Gene (*gna*) in Chinese Cabbage

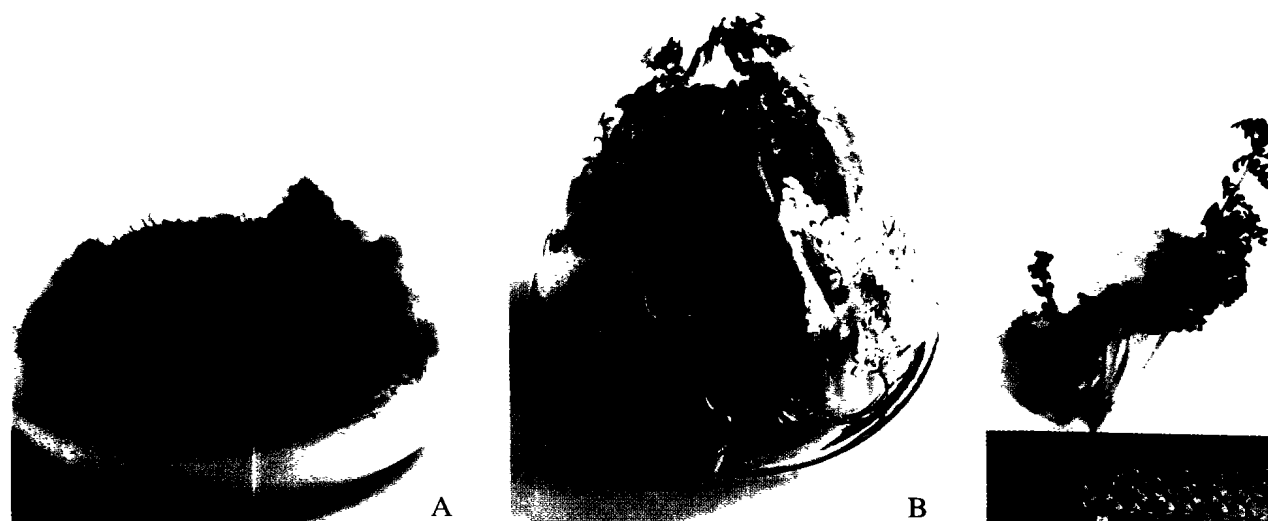


图版说明：A.转化植株的Southern blot分析（1.阳性对照，*Sal* I 酶切pBinGNA；2.阴性对照，*Sal* I 酶切非转化植株基因组DNA；3~9. *Sal* I 酶切转基因植株基因组DNA）； B.转基因植株Northern dot blot杂交分析（1.非转基因植株RNA；2~8. 转基因植株RNA；a.以*gna*基因片段为探针的杂交结果；b.以18S RNA基因为探针的杂交结果）； C.田间自然抗蚜性观察（左为抗性植株，右为对照）。

Explanation of plates: A. Southern blot analysis on transformed plants (1. pBinGNA digested with *Sal* I as positive control; 2. Nontransformed plants as negative control; 3-9. Transgenic plants); B. Northern dot blot of transgenic Chinese cabbage plants (1. RNA of non-transformants; 2-8. RNA of transgenic plants; a. result of *gna* used as probe; b. Result of 18S RNA used probe); C. Survey on insect aphid resistant in the field, transgenic plant (left) and nontransformed plant (right).

# 姜长阳等：蕨菜愈伤组织高效再生体系的建立

Jiang Changyang, et al. A High Efficient Plant Regeneration System from Callus of *Pteridium apuilingense*



图版说明：A. 在1/2MS培养基上诱导芽分化；B. 在生根培养基上形成的根茎；C. 根茎上长出叶片。

Explanation of plates: A. Shoot differentiation on medium of 1/2MS; B. Rhizome formation on rooting medium; C. Leaves on rhizomes.