

利用类甜蛋白基因诱导表达提高马铃薯对晚疫病的抗性研究

金红¹, 岳东霞², 周良炎², S. Muthukrishnan³

(1 天津市农业科学院中心实验室, 天津 300192; 2 天津市农业生物工程研究中心, 天津 300192; 3 美国肯色斯州立大学)

摘要: 将类甜蛋白基因(TLP)及其紧密连锁的抗除草剂 bar 基因以农杆菌介导法导入脱毒微型种薯“津引薯 8 号”, 经除草剂筛选后的转基因单株无性繁殖用于分子检测, 标记基因 bar 基因的 PCR 反应和含 TLP 基因特异探针的 Southern 检测结果, 转基因植株分别显示出 0.54 kb 和 3.0 kb 的特异性条带, 证明 TLP 基因已成功地整合到转基因马铃薯基因组中。利用 TLP 基因特异性抗血清对转基因植株进行 Western 反应检测, 结果表明, 转基因植株中 TLP 基因表达量显著高于对照组, 经晚疫病菌游离孢子接种离体抗性分析, 转基因株系表现出对晚疫病的明显抑制作用和症状发生的延迟作用。

关键词: 马铃薯晚疫病; 类甜蛋白基因; 表达; 抗病性

中图分类号: S532.035.3; 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2001)01-0067-06

阻碍马铃薯生产的最主要因素是马铃薯晚疫病, 它是一种毁灭性病害, 全球每年因此损失达 170 亿美元。由于其病原菌(Phytophthora infestans)变异快, 生理小种多, 使马铃薯常规育种难以持久、有效地抵抗晚疫病。为此, 自 90 年代后, 美国、德国和中国科学家从遗传工程角度来探索抗马铃薯晚疫病的途径, 如利用 Osmotin 蛋白基因^[1], 细菌核酸酶^[2]和细菌葡萄糖氧化酶^[3]等基因导入马铃薯, 不同程度地抑制或推迟了晚疫病症状的发生或降低了病原菌的产孢率。为了更有效地诱导晚疫病的抗性, 本研究将从非洲甜菊中分离出的类甜蛋白(TLP)基因导入到马铃薯中, 以诱导提高晚疫病抗性。TLP 蛋白是第 5 类致病相关蛋白, 离体实验证明它对多种真菌具有明显抗性, 转基因植株表现出抗真菌的特性, TLP 蛋白的发现为培育马铃薯抗晚疫病新品种提供了新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

马铃薯品种为脱毒微型种薯“津引薯 8 号”, 由天津市蔬菜研究所提供; 含双元表达载体 pCAMBAR D34 的农杆菌 LBA4404(该质粒上含有 Ubiquitin 启动子控制的目的基因 TLP 和其紧密连锁的由 CaMV 35S 控制的 bar 基因), 用于检测的 PCR 引物以及 TLP 抗体均由美国

收稿日期: 2000-06-30

基金项目: 天津市青年科学基金(983701811)

作者简介: 金红(1967-), 女, 副研究员, 硕士, 主要从事植物生物技术研究工作。

肯色斯州大学的 S. Muthukrishnan 教授惠赠; 马铃薯晚疫病病菌由天津市蔬菜所居玉玲老师提供。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养及 TLP 基因向马铃薯组织转化及植株再生见参考文献[4]。

1.2.2 转基因植株的扩繁 为了获得在同一遗传基质背景下的重复实验数据, 取每一株转基因单株的单芽茎段, 以含有一定量除草剂的 MS 培养基进行无性繁殖^[4]。

1.2.3 PCR 和 Southern 杂交检测转基因植株 植物总 DNA 的提取见参考文献[5]。标记基因 bar 的 PCR 反应条件为: 95 ℃变性 5 min, 开始 30 个循环(95 ℃变性 1 min, 54 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min), 72 ℃增加延伸 10 min。引物为 5' - CTC GGT CAC GGG CAG GAC CGG ACG - 3'; 5' - AGA ACG ACG CCC GGC CGA CAT - 3'。

Southern 杂交: 探针制备方法为将质粒 pCAM BAR 用 Hind II 酶切, 分离回收含 TLP 基因及启动子序列的 3.0 kb 片段, 按照 Promega 的单基因标记方法说明进行标记。

1.2.4 植物可溶性蛋白的提取和 Western 分析按参考文献[6]的方法进行。

1.2.5 转基因马铃薯对晚疫病的抗病性鉴定 马铃薯晚疫病病菌的培养及游离孢子诱导: 马铃薯晚疫病病菌培养用的培养基为 60 g 黑麦种子经浸泡搅碎后加 15 g 琼脂和 20 g 蔗糖, 0.1 MPa/20min 高压灭菌后即可使用。

从冰箱中取出已培养好的平板, 用无菌水将孢子囊冲洗下来, 4 ℃孵育 4 h 以诱导游离孢子的释放, 在显微镜下计数, 并根据计数将接种液的游离孢子数分别调整到 10^4 个 \cdot mL⁻¹, 10^3 个 \cdot mL⁻¹, 10^2 个 \cdot mL⁻¹, 备接种。

转基因植株的抗病性分析: 将经鉴定的转基因植株栽植在蛭石中, 生长 8 周, 分别取生长良好的老叶和嫩叶各 15 片, 用微量取液器在叶子中央部分, 无创伤接种 5 μ L 游离孢子液 (10^4 , 10^3 , 10^2 个/mL) 相对湿度 100%, 18 ℃光照培养 16 h, 15 ℃暗培养 8 h, 每天记录发病时间和病斑发展情况, 以未转化的马铃薯植株为对照。

2 结果与分析

2.1 马铃薯外植体的基因转化及植株再生

分别以试管薯和微型薯薯片为外植体, 经转化后产生分化芽, 将分化芽转入含 0.5 mg \cdot L⁻¹ 除草剂的 MS 筛选培养基上生根, 试管薯产生抗性芽的比例为 50%, 而微型薯则为 21%。

2.2 转化植株的 DNA 水平检测结果

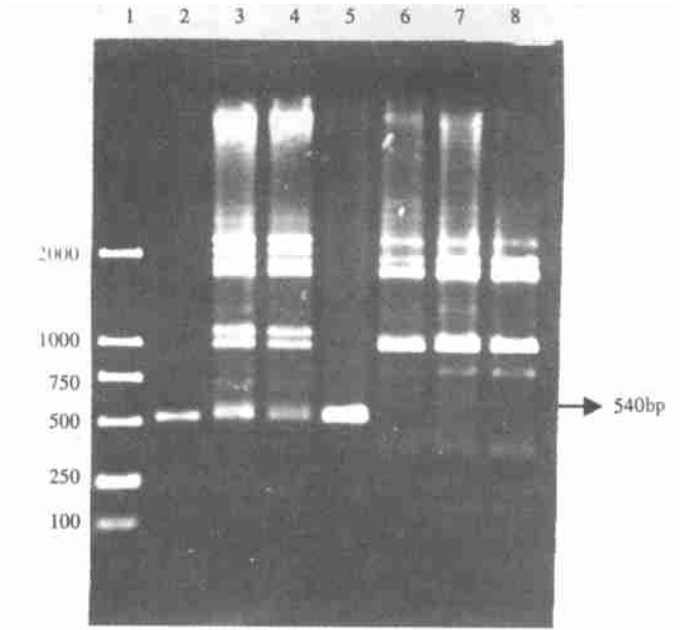
对获得的转化植株 5 个株系进行标记基因 bar 的 PCR 检测, 其中有 3 个转基因株系呈阳性结果(图 1- A), 扩增出 0.54Kb 的 bar 基因片段, 与质粒 DNA 扩增出的片段大小完全一致, 非转基因植株则表现为阴性。

同时利用含目的基因 TLP 的特异探针进行 Southern 杂交, 所有转基因株系均显示出 3.0 kb 阳性条带(图 1- B), 证明 TLP 基因已整合到马铃薯基因组中。

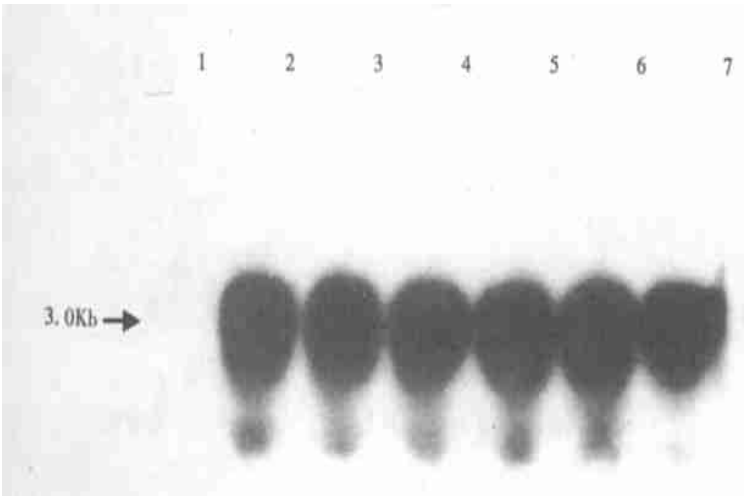
2.3 转基因植株的蛋白表达分析

取经 DNA 水平检测为阳性的转基因株系和对照的未转基因株系, 所取样品重量、取样部位一律相同, 提取各自总蛋白, 经电泳分离后, 与 TLP 蛋白的特异性抗血清进行 Western blot

反应, 结果除对照外, 其他转基因株系均产生 24 Kb 大小的明显的蛋白印迹带, 明显高于对照。而对照只有非常浅、近于空白的反应(图 2), 说明 TLP 基因在转基因植株中获得表达。对照中有很浅的印迹, 是因为 TLP 基因来源于植物, 并在多种植物中具防卫作用, 在通常非转基因情况下, 植物中的 TLP 表达量是很小的。

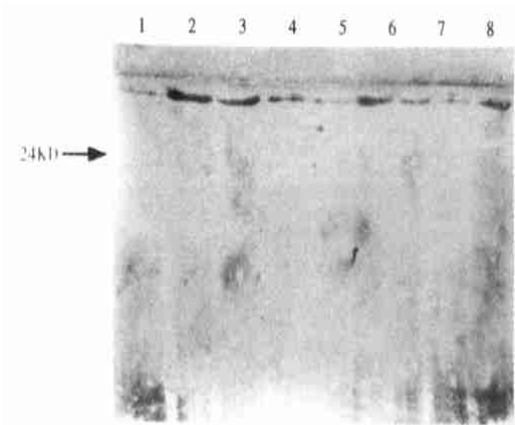


1. DNA 标准 2. 质粒 DNA 3~ 5. 转基因植株 6~ 7. 非转基因植株 8. ck
A. bar 基因 PCR 反应结果



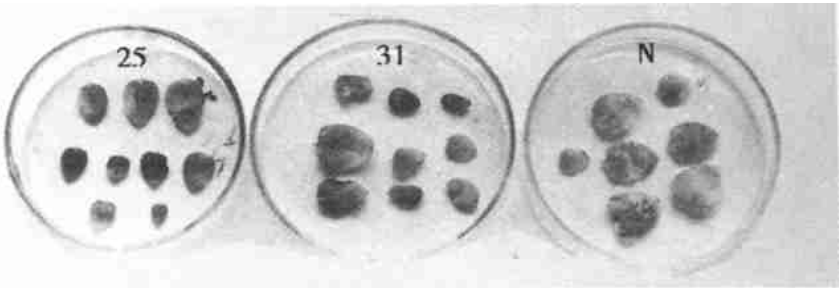
1. ck; 2~ 7. 不同的转基因株系
B. TLP 基因的 Southern 杂交结果

图 1 转基因马铃薯植株的 DNA 水平检测结果

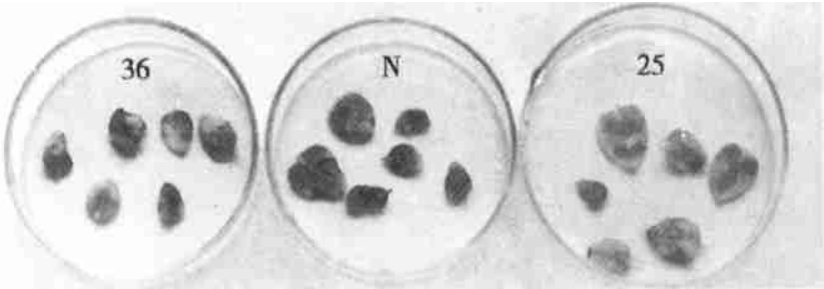


1. ck 2~ 8 不同的级转基因株系

图 2 转基因植株的 Western blot 分析结果



A. 接种后 5d



B. 接种后 8 d N 为 ck; 25, 31, 36 为不同的转基因株系

图 3 转基因与非转基因马铃薯植株离体叶片抗性表现

2.4 转基因马铃薯对晚疫病的抗病性分析

选择经 DNA 水平和蛋白质水平鉴定为阳性的转基因株系 T25, T36, T31 的离体叶片, 以 $1 \text{ 万个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 游离孢子的浓度接种, 100% 保湿。非转基因植株叶片从接种第 3 d 就开始发病, 病斑从接种点逐渐向四周扩散, 形成除接种点外的多处大小不一的黑色病斑, 叶片逐渐发黄, 至接种第 8 d 左右, 在高湿度情况下, 严重处长毛, 叶片腐烂。相比之下, 转基因株系发病时间晚 1~ 2 d, 病斑从接种点蔓延较慢, 多数叶片上接种点病斑不扩散, 叶片仍为绿色, 嫩叶表现尤为突出(图 3)。

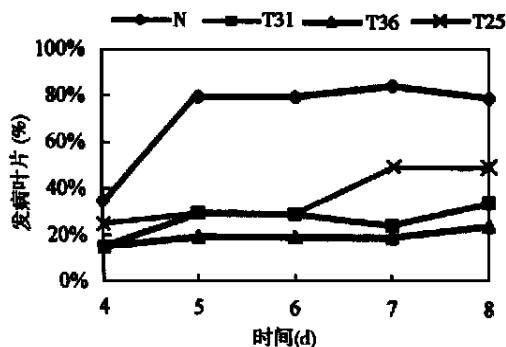


图 4 转基因与非转基因马铃薯接种后不同时间的发病情况分析

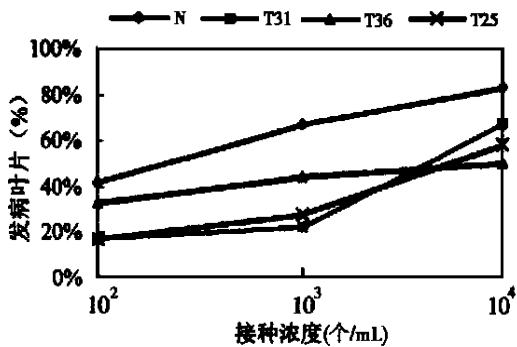


图 5 转基因与非转基因马铃薯对不同浓度晚疫病菌的离体抗性分析

从图 4 可见,在接种后 4 d,转基因植株与非转基因植株间发病叶片的数量还不是很,到接种后 5~6 d,非转基因植株的发病叶片明显高于转基因植株。尽管在接种 8 d 后,转基因植株发病叶片数明显增加,但至少可以认为转基因植株上晚疫病症状的明显延迟发生是显而易见的。

为了能够找到一个更好的鉴别转基因植株和非转基因植株的接种浓度,我们还进行了不同浓度的接种试验。在接种后 5 d 调查结果,从图 5 可见,综合 T31, T36 和 T25 3 个株系的发病情况,以 10^3 游离孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度接种非转基因植株和转基因植株间发病叶片数量差异最大、最明显,此浓度可以作为离体鉴定浓度。

3 讨论

植物在受到各种病原菌侵染或外界因素刺激时会产生多种抗性蛋白,即病程相关蛋白。这些蛋白在通常情况下表达量很低,而绝大多数病程相关蛋白的表达启动是受病原攻击引起的,推测这些病程相关蛋白的诱导是植物本身为了阻止病原菌的进入和扩散而采取的防御系统。本研究正是基于以上的理论,将已证明在体外有各种抗真菌特性的类甜蛋白基因导入植物,以提高植物在未受病原侵染情况下仍有较高水平的病程蛋白的表达。

TLP 是第 5 类病程相关蛋白,已从多种植物中提取出来,如小麦、高粱、番茄和马铃薯等,并证明它们抑制真菌生长的作用是通过一种通常的膜渗透机制,即改变真菌细胞膜的渗透性而达到抑制真菌的目的。马铃薯晚疫病是属于 oomycete 类,其细胞壁中含有少量的几丁质,因此通过常规的几丁质酶降解途径难以达到抑制真菌的目的。TLP 的膜渗透特性为控制晚疫病菌这一类的病原提供了可能。

从本研究的 Western 反应结果来看,转基因株系中 TLP 基因的表达明显高于非转基因株系;离体叶片的抗性分析也证明了转基因株系 TLP 的表达量的诱导提高可能是对晚疫病抗性增强的一个重要原因。

从不同浓度的离体叶片抗性分析结果可以看出,转基因株系对晚疫病菌的抗性水平在 $10^3 \sim 10^4$ 个游离孢子 $\cdot\text{mL}^{-1}$, TLP 的主要作用表现延迟晚疫病症状发生上,特别表现在发病

的关键时期第 5~6 d 时。这一结果再次证明提高 TLP 的表达对晚疫病抗性提高的重要作用。但更大量地提高 TLP 表达或是有效地使表达产物从胞内释放到真菌生长的胞间是十分关键的。更进一步的设想是将多种抗菌基因共同表达,如几丁质酶基因+ β 1,3-葡萄糖酶基因+TLP,可能会大幅度提高抗菌蛋白的水平,这将是今后马铃薯晚疫病抗病基因工程育种的攻关方向。

参考文献:

- [1] Liu D, Raghothama K G, Hasegawa P M, *et al.* Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 1888–1892.
- [2] Strimttatter G, Janssens J, Opsomer C, *et al.* Inhibition of fungal disease development in plant by engineering controlled cell death [J]. *Bio/Technology*, 1995, 13: 1085–1089.
- [3] Wu G, Shortt B J, Lawrence E B, *et al.* Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H_2O_2 -generating glucose oxidase in transgenic potato plant [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1357–1368.
- [4] 岳东霞, 金红, 周良炎, 等. 外源类甜蛋白基因在马铃薯中的表达[J]. *华北农学报*, 2000, 15(1): 12–16.
- [5] Jungham H, Metziaff M. A single and rapid method for the preparation of total Plant DNA [J]. *Biotechniques*, 1990, 8(2): 176.
- [6] Lin W, Anuratha C S, Datta K, *et al.* Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight [J]. *Bio/Technology*, 1995, 13: 686–691.

Studies on Enhancement of Transgenic Potato's Resistance to Late-blight by Inducing the Expression of Thaumatin-like Protein Gene

JIN Hong¹, YUE Dong-xia², ZHOU Liang-yan², S. Muthukrishnan³

(1 Central Lab of Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300192, China;

2 Tianjin Agricultural Biotechnology Research Center, Tianjin 300192, China; 3 Kansas State University, USA)

Abstract: Thaumatin-like protein (TLP) gene and bar gene which is closely combined with TLP gene were transferred into virus-free micropotato variety Jing Yinshu 8 by agrobacterium-mediated transformation. Transgenic plants selected by bialaphos were amplified for detection. The results of PCR of maker bar gene and Southern blot of specific probe with TLP gene showed that transgenic plants displayed 0.54 kb and 3.0 kb bands, respectively, indicating TLP gene has been successfully integrated into the chromosome of transgenic potatoes. The western reaction of transgenic plants using TLP antiserum showed the expression of TLP gene in transgenic plants was much higher than the control. Through the vitro assay of leaves inoculated by alive spores of *Phytophthora*, leaves of transgenic potato plants exhibited significant inhibition on late-blight disease and delayed development of disease symptoms.

Key words: Potato late-blight; Thaumatin-like protein(TLP) gene; Expression; Resistance