

文章编号 :1003-8701(2003)04-0012-03

农杆菌介导将 Pti5-VP16 基因 导入烟草的研究

张艳华,王 罡

(中国人民解放军军需大学植物基因工程研究中心,吉林 长春 130062)

摘 要:番茄 Pti5 基因位于 Pto 基因下游,Pti5 基因编码的蛋白作为转录调控因子能够增强病程相关蛋白(PR 蛋白)基因的表达,从而提高其抗病性。以烟草叶片为外植体,通过根癌农杆菌叶盘转化法,将 Pti5-VP16 基因导入烟草 SRI 中,经卡那霉素筛选,获得了 27 株抗性植株,经 PCR 检测,表明抗性植株中整合了 Pti5-VP16 基因。然后通过病原菌 *Pseudomonas syringae* pv.tabaci 的接种来检测转基因烟草植株的抗病性。

关键词:PR 蛋白;Pti5-VP16;烟草;PCR

中图分类号:Q943.2

文献标识码:A

植物病害给人类带来严重的危害,因而人类与植物病害的斗争贯穿于农业的发展与进步之中。兴起于 20 世纪初期的经典遗传学使人们能够通过杂交育种成功地培育出抗病新品种,大幅度地提高粮食产量。近年来,分子生物学理论和技术的不断发展完善,使人们不但能够从分子水平上进一步研究植物与病原菌的相互作用机制,而且还可以通过基因工程这一现代生物技术直接、快速、高效地培育抗病作物品种。

一种有前景的基因工程策略是利用抗病反应传导链中的组分以激发植物自身抗病机制来获得广谱抗病基因工程植株^[1]。在 Pto 介导的信号传递中,avrPto 与 Pto 蛋白的结合直接激活了 Pto 蛋白的激酶活性,并将与 Pto 蛋白互作的 Pti 蛋白磷酸化^[2]。Pti5 基因位于 Pto 基因下游,Pti5 基因编码的蛋白磷酸化之后能够特异识别存在于 PR 基因启动子区的一段 DNA 序列并与之结合,从而调控 PR 基因的表达^[3]。所以 Pti5 基因就是 Pto 介导的抗病反应传导链的组分,将 Pti5 基因导入植物,通过调控 PR 基因的表达来激发植物自身抗病机制,这种策略为抗病育种工作提供了一个新思路。Pti5-VP16 是一个嵌合基因,VP16 来自 Herpes simplex virus VP16,VP16 蛋白的活化序列是能够在植物中起作用的最强的活化序列,将 Pti5 与 VP16 构成嵌合基因,能增强 Pti5 基因的表达。

1 材料与方法

1.1 供试材料

植物材料:烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)种子 (SRI)由季静教授提供。

菌种:根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105 (含 pBI121UCH1 质粒,携带

收稿日期:2002-09-09

基金项目:国家植物转基因中试及产业化基地专项基金(项目编号 J99-B-001)

作者简介:张艳华(1972-),女,助理研究员,从事分子植物病理学研究。

Pti5-VP16 基因 ,由本室构建) ,*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (吉林农业大学高杰老师提供)。

药品和试剂 :所用 PCR 引物由 “PRIMERS ”引物设计软件设计 ,由 TAKARA 生物工程 (大连)有限公司负责合成 ,其他生化试剂购自北京鼎国生物技术公司。

引物 1 序列 5 ’ -AATTCGGCACGAGAAAATCC-3 ’ Tm=59.4 GC%=45%

引物 2 序列 5 ’ -CGACGCACATCTTGATTCAA-3 ’ Tm=58.6 GC%=45%

1.2 试验方法

1.2.1 烟草转化^[4]

取烟草无菌苗叶片 ,用打孔器 (直径 0.4 cm)打成圆叶片 ,加入适量的 EHA105 (含 pBI121UCH1)培养液 ,浸 1 ~ 2 min 后 ,滤纸吸干 ,转入覆有一层滤纸的 MS 基本培养基上 ,共培养 2 d ,然后转至选择培养基上 (MS 培养基加 1 mg/L BA、0.1 mg/L NAA、400 mg/L 头孢霉素、100 mg/L 卡那霉素)。每 20 d 转一次 ,待卡那霉素抗性芽长至 1 ~ 2 cm 时 ,转至生根培养基中 (MS 基本培养基 ,补加 400 mg/L 头孢霉素、100 mg/L 卡那霉素) ,待根系发育完全后移入土壤中。

1.2.2 转化植株的 PCR 检测

植物 DNA 提取按修改的 CTAB 程序^[5]进行 ,最终 DNA 溶于 TE 缓冲液中。以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增 ,扩增产物为 500 bp ,反应条件为 94℃ 3 min ,一个循环 :94℃ 1 min ,55℃ 1 min ,72℃ 1 min ,35 个循环 ,72℃ 5 min。取 10 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳 ,溴化乙锭染色 ,紫外灯下观察结果。

1.2.3 转化植株的抗病性鉴定^[6]

当烟草长出 8 ~ 9 片叶子时 ,取转基因烟草和非转基因烟草各 12 株 ,分成 3 组 ,每组 4 株 ,每株烟草从植株顶部计起取第 3、4、5 片展开叶进行磨擦接种。用纱布蘸取菌悬液 (浓度约 10⁷ CFU/mL)在叶片表面上轻轻磨擦接种。接种完毕 ,置于人工气候室内 ,设置光照 16 h(18℃) ,黑暗 8 h(15℃) ,相对湿度 89%。

2 结果与讨论

2.1 烟草转化

烟草是进行转基因的模式植物 ,它具有操作容易、培养基配方简单、组织培养周期短和转化效率高等优点。为研究 Pti5-VP16 基因在异源植物中的表达情况 ,我们选择烟草作为转化对象 ,使 Pti5-VP16 基因在烟草中表达。

烟草转化采用叶盘法。将浸染过农杆菌的烟草叶盘置于共同培养基中 ,25℃暗中培养 2 d 后 ,转至选择培养基中 ,同时设未经农杆菌侵染的叶盘放在选择培养基中作为对照。培养 2 周左右 ,未经转化的对照叶盘体积不膨大并逐渐变黄枯死。用带 pBI121UCH1 质粒的农杆菌转化的叶盘在选择培养基上培养 2 周左右 ,叶盘周围产生不定芽 ,并伴随有少量愈伤组织 ,在继代选择培养基上继续培养 ,待幼芽长至 1 ~ 2 cm 时转入生根培养基中。经农杆菌转化的幼苗在生根培养基中 2 周左右有 80% 的幼苗能生根 ,幼苗也随之逐渐长大 ,有一些不生根并逐渐黄化死亡。生根后的幼苗移入土壤中栽培 ,成活率达 100%。本实验获得 27 株生长良好的抗卡那霉素再生植株。

2.2 转化植株的 PCR 扩增

用 CTAB 法提取烟草总 DNA ,以其为模板 ,用 Pti5-VP16 基因 5 ’端和 3 ’端引物进行 PCR 扩增 ,同时设非转基因烟草为对照。结果表明 ,所有转化植株均能扩增出一条约

500 bp 的特异带 ,而非转化对照植株以及没有长根的植株无此目标带。推测这些不长根的苗为假转化体 (escapes) ,即在选择培养基上形成的植株 ,没有整合进外源基因却逃脱了选择压力的影响。因为一般情况下试管苗对卡那霉素选择压力不如愈伤组织那样敏感。因此 ,非转化的试管苗也可能在选择培养基上生长 ,但根对抗生素的敏感性很强 ,在含高浓度卡那霉素选择压力的选择培养基上非转化苗是很难生根的 ,只有转化的苗才可能生根。PCR 检测初步表明 ,Pti5-VP16 基因已整合到烟草基因组中。

2.3 转基因烟草抗性鉴定

表 1 转基因烟草植株叶片及对照接种 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 的发病情况

级别	标 准	转基因烟草植株叶片			对照烟草植株叶片		
		第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 1 组	第 2 组	第 3 组
0	不发病	0	0	0	0	0	0
1	很少数量的小斑	3	5	5	0	0	0
2	少数小斑	7	5	6	2	1	1
3	许多小斑	2	2	1	6	6	7
4	许多中等大小的斑	0	0	0	3	3	2
5	病斑严重 ,数量多	0	0	0	1	2	2
病情指数		38.33	35.00	33.33	65.00	70.00	68.33

注 :每组 4 株 ,每株取 3 个叶片。

为了评价转 Pti5-VP16 基因的烟草对病原菌的抗性 ,用 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 接种转基因烟草植株 ,同时接种非转基因植株作为对照 ,菌悬液浓度为 10⁷ CFU/mL。叶片的病级分为 6 级 ,分级标准参照《植病研究法》。经 t 检验 ,转基因烟草植株的抗病性与对照植株相比差异极显著 (α=0.01) ,转 Pti5-VP16 基因烟草植株对该病原菌的抗病性明显增强 (表 1)。上述结果表明 ,Pti5-VP16 基因在所获得的转基因烟草中得到了表达 ,并通过对 PR 基因转录的调节来提高转基因烟草的抗病性 ,证实了用 Pto 信号传导链中的 Pti5 基因激发植物自身抗病机制获得广谱抗病基因工程植株的设想是可行的 ,Pti5 基因具有非常好的应用前景。

参考文献：

[1] 刘胜毅 ,许泽永 ,何礼远 . 植物与病原菌互作和抗病性的分子机制[J] . 中国农业科学 ,1999 ,32 (增刊) :94-102 .
[2] Martin G B, Brommonschenkel S H, Chunwongse J, et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato[J]. Science, 1993, 262: 1432-1436 .
[3] Zhou J ,Tang X, Martin G B, et al. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes[J]. EMBO, 1997, 16(11): 3207-3218 .
[4] 王关林 . 植物基因工程原理与技术[M] . 北京 :科学出版社 ,1998. 552-555 .
[5] Porebskis, Bailey G, Baumb B R. Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Mol. Biol. Rep, 1997, 15: 8-15 .
[6] 方中达 . 植病研究法[M] . 北京 :农业出版社 ,1972. 177-178 .