

商陆愈伤组织的筛选及其对 TMV 抗性的研究

刘海礁¹, 万瑞晨¹, 郭小玲², 崔红^{*}, 王燕萍¹

(1 河南农业大学农业生物技术重点实验室 国家烟草栽培生理生化研究基地, 河南 郑州 450002

2 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 商陆抗病毒蛋白(PAP)是一种广谱的植物抗病毒蛋白. 本试验以商陆叶片为外植体, 在附加 0.5 mg/L 2, 4-D (2, 4-二氯苯氧乙酸)和 0.5 mg/L 6-BA (6-苄氨基嘌呤)的 MS 培养基上诱导愈伤组织, 通过继代筛选培养获得 3 个稳定的愈伤组织株系: 黄色系(Y-型)、粉色系(P-型)、红色系(R-型), 不同株系具有不同的生长特性. Northern 杂交结果证明不同株系中 PAP 基因转录水平有明显差异. 离体烟草叶片摩擦接种实验表明, 不同株系的蛋白提取液对 TMV 均具有显著抗性, 其中黄色株系具有较明显的优势. 商陆离体愈伤组织的研究为生产安全、高效的植物源抗病毒制剂提供了一定基础.

关键词: 美洲商陆; 愈伤组织; 商陆抗病毒蛋白; TMV

中图分类号: Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)S-0063-03

商陆抗病毒蛋白(PAP)是从美洲商陆(*Phytolacca americana* L.)植株体内(主要是从叶片和种子)分离出来的碱性蛋白质, 属于 I 型核糖体失活蛋白^[1]. PAP 具有广谱的抗病毒能力, 它不但对植物病毒: TMV、CMV、AMV、PVX、PVY、CaMV、ACMV 具有抑制作用^[2], 而且对微生物病毒、动物病毒及人类免疫缺陷型病毒(HIV)等也具有一定的抑制^[3~5]. 作为广谱的植物抗病毒蛋白, PAP 在植物基因工程及新药开发中具有广阔的应用空间. 人们试图将 PAP 基因在大肠杆菌^[6]、酵母^[7]中进行表达以获得活性抗病毒蛋白, 用以弥补天然集成、栽培提取中所存在的资源短缺、成本高等缺陷. 在外源表达系统中虽然可以检测到活性蛋白的存在, 但因为 PAP 具有毒性作用, 影响了细胞的生长和 PAP 的积累. 基于植物细胞全能性理论, 通过细胞大量增殖达到目的产物富集的离体培养技术, 是目前进行 PAP 开发和利用的一条捷径. 本实验通过商陆愈伤组织的诱导、筛选, 对不同株系中 PAP 基因转录水平的表达差异、蛋白组成以及 PAP 对 TMV 的抗性进行了比较研究, 为商陆离体培养生产植物源高效抗病毒制剂奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

美洲商陆种子, 采自河南省卢氏; 心叶烟种子, 由许昌烟草研究所提供; TMV 病毒, 由河南农业大学植

物保护学院蒋士君博士提供.

1.2 商陆无菌苗诱导

挑选商陆种子, 用浓硫酸浸泡 10 min, 用 10% 的次氯酸钠消毒 20 min, 最后用双蒸水冲洗 5 次, 置于无激素 MS 培养基上, 光照培养, 一个月左右可成苗.

1.3 愈伤组织的诱导、继代和筛选

将无菌苗的叶片剪切成 0.5 cm² 的圆片, 置于附加 0.5 mg/L 2, 4-D 和 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上, 25(±2)℃ 暗培养, 诱导脱分化. 诱导出的愈伤组织按其生长势、质地、色泽进行筛选, 转接到新鲜培养基上, 在 2 000 lx 光照、25(±2)℃ 条件下继代培养 30 d.

1.4 RNA 提取及 Northern 杂交

Trizol(Gibco 公司)法提取愈伤组织的总 RNA^[8]. 不同愈伤组织株系总 RNA 调至相同浓度^[9].

PAP 基因序列: 5' 端引物 I 5'-CGGGATCCATGAAGGTGATGCTTGTAGT(28bp), 3' 端引物 II 5'-AAAGTCGACTCAGAATCCTTCAAATAGATCAC(32bp); 采用地高辛标记 DNA 杂交试剂盒(Boehringer Mannheim)标记 PAP cDNA 探针. 将相同浓度的愈伤组织总 RNA 各 20 μg 甲醛变性电泳, 用毛细管法转移到 HybondTM N⁺ (Am-Pharmacia)膜上, 并按杂交试剂盒(Boehringer Mannheim)规定程序进行预杂交、杂交、洗膜和染色.

1.5 不同愈伤株系的蛋白提取液对 TMV 抗性研究

取新鲜愈伤组织 5 g 加入蛋白提取液(0.1 mol/L

收稿日期: 2006-01-06

作者简介: 刘海礁(1981-), 女, 硕士研究生.

* 通讯作者: cuhong@371.net

NaH_2PO_4 , 0.1 mol/L Na_2HPO_4 , pH 6.5), 冰浴中研磨成匀浆, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清, 4 000 r/min 离心 20 min, 收取上清即为蛋白提取液. 新鲜 TMV 病叶加入磷酸提取液 (pH 6.5), 冰浴中研磨匀浆, 灭过菌的双层纱布过滤即得 TMV 病毒液.

采摘心叶烟植株同一部位长势旺盛、大小均匀的叶片, 留出少许叶柄用无菌棉纱包裹, 喷适量蒸馏水保湿, 撒上少许石英砂, 在每片叶子的左半叶, 用相同浓度的愈伤株系蛋白提取液与病毒液等体积混合摩擦接种, 在右半叶用无菌水与病毒液等体积混合的处理作为对照. 接种后用蒸馏水冲洗, 放置于铺有湿润滤纸的培养皿中, 于 28℃暗培养. 每个处理做 3 个重复. 3d 后统计处理和对照半叶的枯斑数, 计算抑制率. 抑制率 = (对照半叶平均枯斑数 - 处理半叶平均枯斑数) ÷ 对照半叶平均枯斑数 × 100%.

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导和株系筛选

商陆叶片外植体接种 2 周后, 在边缘形成肉眼可见的愈伤组织. 愈伤组织呈现白色和粉红色的区别 (图 1a). 根据愈伤组织的生长势、质地、色泽进行筛选和分型, 分为 3 个型: P-型、Y-型和 R-型. P-型呈浅粉色, 水乳状, 结构疏松, 且生长旺盛 (图 1b). Y-型呈黄绿色, 质地紧密, 表面有瘤状突起, 生长较为缓慢 (图 1c). R-型: 呈深红色, 质地松脆, 生长迅速 (图 1d).

2.2 不同愈伤株系生长特性比较

将不同愈伤株系分别按一定量接种在继代培养基上, 20 d 后测其鲜重, 比较生长量. 结果如表 1 所示, 其中 R-型愈伤株系生长速率最高.

表 1 愈伤组织不同株系生长量比较				
Tab 1 Growth comparison of different calli lines				
株系	接种量 /g	收获量 /g	相对生长速率 /%	平均值
P	0.162	8.032	19.52	19.23
	0.212	9.153	18.83	
	0.188	8.975	19.33	
Y	0.203	5.693	16.67	17.37
	0.152	6.234	18.57	
	0.174	5.086	16.88	
R	0.227	12.551	20.06	20.98
	0.193	13.335	21.18	
	0.167	12.793	21.69	

注: 相对生长速率: $R' = T^{-1} \ln(W_2/W_1)$ 其中 T : 生长时间 (d); W_1 : 接种愈伤鲜重 (g); W_2 : 经 T 天后愈伤鲜重 (g).

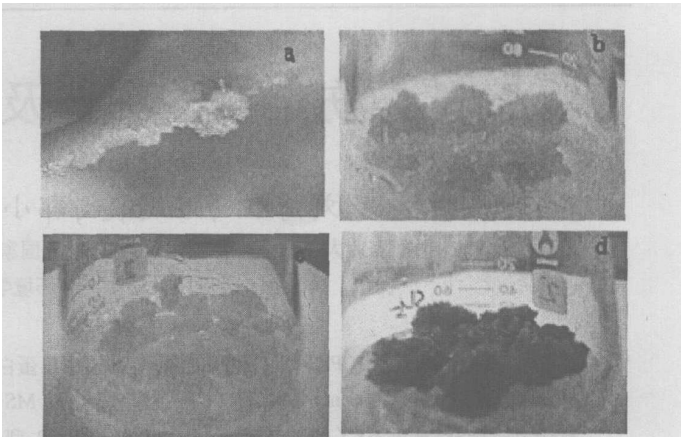


图 1 愈伤组织的诱导和筛选
a 叶盘边缘诱导出愈伤组织; b P-型愈伤组织;
c Y-型愈伤组织; d R-型愈伤组织

Fig 1 Calli induction and selection

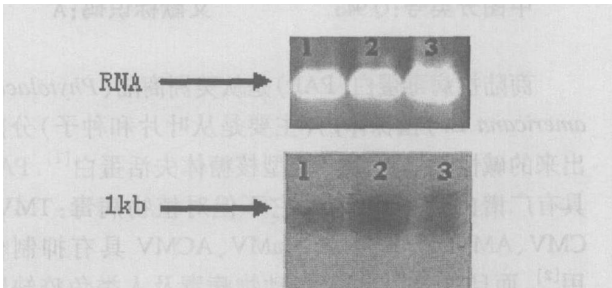


图 2 不同愈伤株系的 Northern 杂交
1 P-型愈伤组织; 2 Y-型愈伤组织; 3 R-型愈伤组织

Fig 2 Northern blot analysis of different callus type

2.3 Northern 杂交

不同愈伤株系总 RNA 调至相同浓度后的电泳结果及 Northern 杂交结果如图 2. 3 个株系中都检测到了 PAP 基因的转录产物, 但转录水平存在差异. 其中 Y-型愈伤株系杂交信号最强, 说明其 PAP 基因具有较高的转录水平.

2.4 不同愈伤株系蛋白提取液对 TMV 抗性比较

采用浓度相同 (2.86 μg/mL) 的不同愈伤株系蛋白提取液, 与 TMV 病毒液等体积混合, 进行半叶法摩擦接种. 接种 2 d 后, 被处理的烟草叶片开始发病, 左右半叶枯斑数差异显著; 第 3 天枯斑稍有增大, 数目稍有变化; 4 d 枯斑大小与数目均趋于稳定, 从统计结果 (表 2) 可以看出, 3 个株系对 TMV 均具有显著抗性, 其中 Y-型愈伤株系的枯斑抑制率最高, R-型愈伤株系的枯斑抑制率最低 (图 3).

3 讨论

在植物脱分化过程中, 由于外植体本身细胞组成

的差异以及外源激素的作用, 导致愈伤组织在形态组织学、生理生化和遗传水平发生变异, 体细胞无性系变异在后续的继代过程中被放大并逐渐稳定下来形成不同的株系. 在雪莲^[10]、百合^[11]、紫草^[12]等植物中, 都有利用无性系变异筛选次生代谢高产株系的研究报道.

表 2 不同株系蛋白提取液对 TMV 抗性比较
Tab 2 Comparison of TMV resistance of protein extracts from different calli lines

株系	枯斑数		抑制率 %
	左半叶	右半叶	
P	14.5	49.5	70.7
Y	10.5	46.5	77.4
R	19	42	54.8

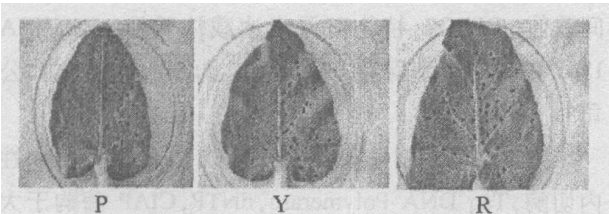


图 3 愈伤株系对 TMV 抗性鉴定
Fig 3 Resistance of protein extracts of different calli lines to TMV

商陆作为重要的抗病毒植物近年来引起了广泛关注, 人们将 PAP 基因转入烟草^[13]、油菜^[14]中进行表达以提高作物抗病性; 并试图将 PAP 基因在微生物中进行外源表达以便提取利用. 但通过离体培养途径合成 PAP 并加以研究和利用还鲜有报道. 李景原^[15]在商陆愈伤组织诱导中也发现较大的无性系变异, 并利用单细胞平板培养技术筛选出了色素高产细胞株. 陶文沂^[16]对美洲商陆不同愈伤组织色系进行了筛选, 比较了不同色系的蛋白质含量、组成以及部分区域的蛋白质比例上的差异, 推测白色愈伤系具有较高的 PAP 合成能力, 但对离体培养中 PAP 的表达和活性未作研究. 本研究在进行美洲商陆愈伤组织诱导过程中, 发现愈伤组织在形成初始就有明显的颜色分化, 在继代过程中分化更为明显, 通过切割继代, 形成了生长旺盛、色泽均一的 3 个株系. 3 株系的组织形态及生长势不同, Northern 杂交结果证实 Y 型愈伤系 PAP 基因转录活性较高. 在离体接种试验中, Y 型愈伤株系也表现出了较高的抗 TMV 病毒活性. 但 Y 型愈伤株系生长势较弱, 而且质地较为紧密, 给大规模培养带来难度, 相比之下 P 型愈伤株系具有更大的应用潜力, 对其大规模培养过程中 PAP 基因的表达调控应做深入研究.

参考文献:

[1] Irvin J D. Purification and partial characterization of the anti-viral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1975, 169: 522–528

[2] Chen Z C, White R F, Antoniw J F. Effects of pokeweed anti-viral protein PAP on the infection of plant viruses [J]. *Plant Pathol* 1991, 40: 612–620

[3] Zarling J M. Inhibition of HIV replication by pokeweed anti-viral protein targeted to CD 4+ cells by monoclonal antibodies [J]. *Natl*, 1990 347: 92–95

[4] Aaron G M. Inhibition of herpes simplex virus multiplication by the pokeweed antiviral protein antimicrob [J]. *Agents Chemother* 1980, 17: 1032–1033

[5] Olson M. Ribosomal inhibitory proteins from plants inhibits HIV-1 replication in acutely infected peripheral blood mononuclear cells [J]. *AIDS Res Hum. Retrovir* 1991, 7: 1025–1030

[6] Kataoka J, Noriyulzi H, Chikara M. Isolation and analysis a genomic clone coding pokeweed antiviral protein [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 20: 879–883

[7] 陈定虎, 王锡峰, 李莉, 等. 美洲商陆抗病毒蛋白真核表达载体的构建及在毕赤酵母中的表达 [J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11: 183–186

[8] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (third edition) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 441–444

[10] 褚云霞, 张永春, 杨红娟. 百合药药愈伤组织诱导中的基因型差异 [J]. *上海农业学报*, 2002, 18(3): 17–20

[11] 陈玉珍, 卢存富. 水母雪莲愈伤组织和悬浮培养细胞的抗冻性研究 [J]. *植物学通报*, 2002, 19(2): 219–223

[12] 张海燕, 田颖川, 周亦华. 将商陆抗病毒蛋白导入油菜获得抗病毒转基因植株 [J]. *科学通报*, 1998, 43(23): 2534–2540.

[13] 柴红梅, 张绍松, 万萌, 等. 雪花莲凝集素 (GNA) 基因植物表达载体的构建及其对烟草遗传转化 [J]. *西南农业学报*, 2002, 15(4): 35–39

[14] 严海燕, 曹日强. 紫草愈伤组织培养中紫草素形成的影响因素 [J]. *华北农学报*. 2002, 17(2): 116–120

[15] 李景原, 王太霞, 李贺敏. 商陆单细胞平板培养及色素高产细胞株的筛选 [J]. *天然产物研究与开发*, 2000, 4: 62–65

[16] 陶文沂, 张礼星, 唐蕾. 美洲商陆细胞株系的选择和蛋白质产生情况比较 [J]. *无锡轻工业学院学报*. 1994, 13(2): 98–102

(下转第 69 页)

[J]. *Planta* 2003, 216: 604– 613.

[3] Ye J R, Huang M J, Wu N H. Fertility analysis of the Arabidopsis transformed with antisense rice *osRACD* gene[J]. *Progress in Natural Science*, 2003, 13 (6): 424– 428.

[4] Sharma A, Matsuoka M, Tanaka H, et al. Antisense inhibition of a BR II receptor reveals additional protein kinase signaling components downstream to the perception of brassinosteroids in rice[J]. *FEBS Letters*, 2001, 507 (3): 346– 350.

[5] Wang M B, Waterhouse PM. Application of gene silencing in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(2): 146– 150.

Construction of *O sICK* 1 Plant Antisense Expression Vector

ZENG Ya-ming, HE Yi-bin, ZHANG Hong-xin, CHEN Liang*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Cyclin-dependent protein kinases (CDKs) have a central role in cell cycle regulation. It can be inhibited by the binding of small protein CDK inhibitors (CKIs). *O sICK 1* is a putative cyclin-dependent protein kinase inhibitor gene found in rice. The aim of this research was to study the function of *O sICK 1* by expressing antisense *O sICK 1* in rice. First, we constructed a plant *O sICK 1* antisense expression vector under the control of CaMV35S promoter and NOS terminator. Then, the antisense gene was integrated into the genome of rice callus via *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mediation. It provided a reliable base for the function study on *O sICK 1*.

Key words *O sICK 1*; antisense; expression vector

(上接第 65 页)

Selection the Calli Lines of High PAP Production from *Phylacca americana* and Research in the Resistance of PAP to TMV

LU Hai-jiao¹, WAN Rui-chun¹, GUO Xiao-ling², CUI Hong^{*}, WANG Yan-ping¹

(1. Key Lab for Agricultural Biotechnology in Henan Agricultural Univ., Centre for Tobacco Physiology and Biochemistry Research, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract PAP is a kind of broad spectrum antiviral protein. A callus induction system was developed for *Phytolacca americana* on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L 6-BA. Three stable types specialized in morphology, color and growth characteristics were obtained after 2-years subculture and selection: type Y was yellow-green and compact and grew relatively slow. Type P was white pink and watery. Type R was dark red and crisp and grew fastest. The results Northern blot also revealed the different transcription level of PAP gene in different lines. Disease challenge test of detached tobacco leaves with TMV showed that the resistance was dramatically enhanced when TMV treated by protein of different calli lines, especially type Y. The result implicated that callus culture of *Phylacca americana* in vitro had a potential application in the production of the safe, efficiency plant viral inhibitor.

Key words *Phylacca americana*; callus produced antiviral protein; TMV